



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Campus de Araçatuba

LETÍCIA PITOL PALIN

“Avaliação do processo de reparo alveolar em ratos portadores de diabetes tipo 2, induzido por dieta hiperlipídica e baixa dose de estreptozotocina. Análise morfométrica, imunoistoquímica e por microscopia de birrefringência”

Araçatuba – SP

2018

LETÍCIA PITOL PALIN

“Avaliação do processo de reparo alveolar em ratos portadores de diabetes tipo 2, induzido por dieta hiperlipídica e baixa dose de estreptozotocina. Análise morfométrica, imunoistoquímica e por microscopia de birrefringência”

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Roberta Okamoto

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Doris Hissako Sumida

Araçatuba – SP

2018

ERRATA

PITOL-PALIN, L. "Avaliação do processo de reparo alveolar em ratos portadores de diabetes tipo 2, induzido por dieta hiperlipídica e baixa dose de estreptozotocina. Análise morfométrica, imunoistoquímica e por microscopia de birrefringência" 2018. 83 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

Folha	Linha	Onde se lê	Leia-se
11	7		Agradecemos ao laboratório de multiusuários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba/UNESP pela utilização do microtomógrafo computadorizado (processo 01.12.0530.00 FINEP/Proinfra 01/2011)

Dedicatória

Aos meus pais, Lilian e Sérgio

Foram vocês quem sempre me incentivaram e sempre fizeram com que eu buscasse o meu melhor, sou extremamente grata a tudo que fizeram e ainda fazem por mim. Vocês são meu porto-seguro, meus grandes amores, muito obrigada por sempre acreditarem nos meus sonhos e por nunca me deixarem desistir, mesmo quando tudo parecia estar fora do meu alcance.

Eu dedico todas as minhas conquistas e vitórias a vocês. Amo vocês para toda a minha vida e espero nunca os decepcionar.

Aos meus avós, Delcídes, Vilma e Matilde

Vocês são meus exemplos de vida e meus maiores orgulhos. São vocês em quem me inspiro quando penso em trabalho, amor, fé e honestidade. É uma honra para mim ter vocês por perto, sempre me aconselhando nos momentos em que mais preciso. Obrigada por me incentivarem a dar sempre o meu melhor em tudo o que eu faço, nunca me deixando desistir e me fazendo querer sempre ir mais longe. Amo vocês.

À Deus

Por ter sempre iluminado meu caminho, me dado forças para acreditar nos meus sonhos e não me deixar desistir nos momentos difíceis.

“O amor é a força mais sutil do mundo”

Mahatma Gandhi

Agradecimentos

Especiais

À minha orientadora, Profª Drª Roberta Okamoto

A senhora despertou algo especial em mim, algo que me mudou para melhor. Conviver com a senhora é aprender a trabalhar com prazer, humildade e principalmente dedicação, a senhora sempre faz com que tudo pareça mais simples e fácil. Muito obrigada por todo ensinamento teórico durante as aulas de graduação, e também pelos conhecimentos científicos, práticos, técnicos ao longo de minha iniciação científica. Muito obrigada principalmente por ter me acolhido tão bem na sua equipe, sou muito honrada e grata por todas as oportunidades dadas pela senhora sempre.

À minha co-orientadora, Profª Drª Doris Hissako Sumida

Agradeço por ter sido minha professora durante a graduação, com a qual pude aprender muito durante as aulas teóricas, mas agradeço principalmente por toda ajuda, ensinamentos e disponibilidade durante a execução dos meus dois projetos de iniciação científica nos quais a senhora sempre ajudou com muita paciência e com um sorriso no rosto.

Aos membros da Banca Examinadora

Professor Dr. Francisley Ávila Souza, tenho imensa admiração pelo senhor e pelo seu trabalho. Gostaria de agradecer por todo carinho ao longo da graduação e também por ter me orientado ao longo da monitoria na disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, onde pude aprender ainda mais com o senhor.

Dr. Fábio Roberto de Souza Batista, gostaria de agradecer por toda ajuda durante o desenvolvimento e execução deste trabalho. Pude aprender muito com você ao longo da minha graduação, obrigada por tudo.

Aos meus familiares

Agradeço por todo apoio e por nunca medirem esforços para me ajudar. Em especial à minha tia, **Fabrizia**, que foi sempre meu exemplo e inspiração desde minha infância.

Ao meu namorado, Rafael

Agradeço por todos os anos de muita paciência, companheirismo, amor, amizade e respeito. Você é a pessoa com quem compartilho meus sonhos, alegrias e tristezas, é quem está sempre ao meu lado e nunca mede esforços para me ver bem. Sou muito feliz e grata por te ter na minha vida.

Às amigas de Iniciação Científica (“Meninas da Imuno”)

Ana Cláudia Ervolino, Jaqueline Hassumi, Elisa Furquim, Maria Isabela Gandolfo, Naara Monteiro, Paula Frigério, Jaqueline Silva, Flávia Liro, Juliana Moura, Ana Carolina Passos e Tatiany Castro e também as que já se “aposentaram” **Danila Oliveira, Fernanda Yogui e Karen Lumi**. Muito obrigada por toda ajuda, por cada risada e por sempre estarem disponíveis quando precisei de ajuda, muito obrigada também por estarem ao meu lado nos momentos de dificuldades, fazendo com que tudo se tornasse mais fácil e agradável. Além de companheiras de iniciação científica fico muito feliz em dizer que vocês são minhas grandes amigas, as quais levarei sempre em meu coração.

Aos amigos da Pós-graduação

Juliana Zorzi, Pedro Henrique Ferreira, Gabriel Mulinari e Breno Fernandes agradeço toda disposição e ajuda durante a execução deste projeto, sempre pude contar com todos vocês para me ensinar todos seus conhecimentos teóricos e práticos. Agradeço principalmente pela amizade durante estes anos de minha graduação.

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós. ”

Antoine de Saint-Exupéry

Agradecimientos

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP**, e em especial à **Faculdade de Odontologia de Araçatuba** na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. **Wilson Roberto Poi** e do vice-diretor Prof. **João Eduardo Gomes Filho**.

À **Fundação de amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão de minhas duas bolsas de Iniciação Científica (Processos nº: 2014/15396-0 e 2016/25747-0) durante quatro dos meus seis anos de graduação.

Aos meus queridos **professores** ao longo da graduação, pessoas das quais admiro muito e me inspiro profissionalmente. Muito obrigada por ensinar toda a teoria e prática sempre com muita vontade e paciência.

Aos meus colegas e amigos da **15ª turma do curso noturno de Odontologia**, muito obrigada por dividirem comigo momentos de muita alegria e também os momentos de dificuldade. Fico muito feliz e grata por ter participado de alguma forma da vida de todos vocês.

Ao **Departamento de Ciências Básicas** onde ao longo da graduação realizei os experimentos para o desenvolvimento deste projeto e onde aprendi muito. Obrigada aos **professores da Disciplina de Histologia e Embriologia** (Prof. Dr. Edilson Ervolino, Profª Drª. Mariza Akemi Matsumoto, Profª Drª Alaide Gonçalves e Prof. Dr. Cláudio Aparecido Casatti), aos **professores da Disciplina de Anatomia** (Prof. Dr. José Américo de Oliveira, Prof. Dr. Roelf Justino Cruz Rizzolo, Prof. Dr. Paulo Roberto Botacin e Profª. Drª. Roberta Okamoto), aos **funcionários** e todos os outros **estagiários**. Muito obrigada por toda ajuda e pelo acolhimento durante estes anos de convívio.

Aos professores da **Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial** (Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Junior, Prof. Dr. Osvaldo Magro Filho, Prof. Dr. Francisley Ávila Souza, Prof. Dr. Leonardo Peres Faverani, Profª Drª Ana Paula Bassi, Profª. Drª Daniela Ponzoni e Profª. Drª. Alessandra Aranega) que além de serem excelentes professores, abriram as portas do departamento e laboratório da disciplina quando precisei.

Aos **funcionários** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, pela ajuda e por fazerem funcionar os diversos setores da nossa faculdade. Muito obrigada!

Agradeço a todos que torceram por mim, de longe ou de perto e que contribuíram diretamente ou indiretamente para a realização deste sonho.

Epígrafe

“Não é o que você faz, mas quanto amor você dedica no que faz que realmente importa”

Madre Teresa de Calcuta

Resumo

PITOL-PALIN, L. “Avaliação do processo de reparo alveolar em ratos portadores de diabetes tipo 2, induzido por dieta hiperlipídica e baixa dose de estreptozotocina. Análise morfométrica, imunoistoquímica e por microscopia de birrefringência” 2018. 83 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

RESUMO

O diabetes tipo I interfere no metabolismo ósseo atrasando o reparo ósseo alveolar, porém pouco se sabe da influência do tipo II da doença no processo reparacional alveolar pós exodontia. **Objetivo:** Analisar a dinâmica do reparo ósseo alveolar em ratos diabéticos tipo II através das análises imunoistoquímica, por birrefringência, de microtomografia computadorizada e por microscopia confocal. Foram utilizados 50 ratos (n=25 por grupo), divididos em dois grupos: Controle (CO) e Diabéticos tipo II (DBT-2). Os animais do grupo DBT-2 tiveram o diabetes induzido por dieta hiperlipídica e aplicação única de Estreptozotocina (35mg/kg). Após a comprovação do diabetes tipo II, os animais foram submetidos à cirurgia de exodontia e eutanasiados aos 3, 7, 14 e 42 dias respectivamente. Para a análise imunoistoquímica, foram utilizados anticorpos contra TNF α , TGF β , IL6 (resposta inflamatória aos 3 e 7 dias) TRAP, OC, WNT (reparo ósseo aos 14 e 42 dias). Para a análise de birrefringência, os cortes corados com Picrosirius-red, foram analisados para avaliar a organização e quantidade das fibras colágenas aos 14 e 42 dias após a exodontia. Para análise de Micro-CT (42 dias) os parâmetros avaliados foram BV/TV, Po.Tot, Tb.Th, Tb.N e Tb.Sp. Para a análise de microscopia confocal, os parâmetros utilizados foram de dinâmica do tecido ósseo e superfície de mineralização ativa. Os dados quantitativos foram submetidos a uma análise estatística e foi adotado nível de significância de 5%. **Resultados:** Na análise imunoistoquímica, aos 3 dias, o grupo CO apresentou uma marcação leve para IL-6, TNF α e TGF β enquanto aos 7 dias, apresentou marcação leve para IL-6, e moderado para TNF α e TGF β . No grupo DBT-2, aos 3 dias as marcações para IL-6, TNF α e TGF β foram moderadas enquanto aos 7 dias, houve marcação intensa para IL-6 e TGF β e moderada para TNF α . Aos 14 dias, o grupo CO apresentou marcação moderada para OC, Wnt e TRAP e, aos 42 dias, moderada para OC e Wnt e leve para TRAP. O grupo DBT-2, aos 14 dias, apresentou marcação moderada para OC, Wnt e TRAP e, aos 42 dias, marcação leve para OC e Wnt e moderada para TRAP. Na

análise por birrefringência, menores valores numéricos foram observados no grupo DBT-2 aos 42 dias ($p < 0,05$). A análise de Micro-CT apresentou diferença estatisticamente significativa para os parâmetros BV/TV, Po.Tot, Tb.Sp e Tb.Th, com $p < 0,05$. A dinâmica do tecido ósseo apresentou diferença estatisticamente significativa entre: CO (calceína) X CO (alizarina), CO (calceína) X DBT-2 (calceína) e CO (alizarina) X DBT-2 (alizarina), com $p < 0,05$. **Conclusão:** As análises mostraram que os animais com diabetes tipo 2 tem um processo de reparo alveolar prejudicado, apresentando quantidade e qualidade óssea alveolar inferiores ao dos animais do grupo CO.

Palavras Chave: Diabetes Mellitus; Dieta Hiperlipídica; Estreptozotocina; Alveolo Dental; Densidade Óssea; Ratos

Abstract

PITOL-PALIN, L. *"Alveolar repair process evaluation in rats with type 2 diabetes, induced by high-fat diet and low dose of Streptozotocin. Morphometric, Immunohistochemistry and birefringence microscopy analysis"* 2018. 83 p. End of course paper (Bachelor degree) – Dental School, São Paulo State University, Araçatuba, 2018.

ABSTRACT

Type I diabetes interferes with bone metabolism, delaying alveolar bone repair, but little is known about the influence of type II disease in the alveolar repair process after the dental extraction. **Objective:** To analyze the dynamics of alveolar bone repair in type II diabetic rats by immunohistochemical, birefringence, microtomographic and confocal microscopy analysis. Fifty rats (n = 25 per group) were used, divided into two groups: Control (CO) and Diabetic type II (DBT-2). The animals in the DBT-2 group had diabetes induced by cafeteria diet and a single application of streptozotocin (35mg/kg). After the verification of type II diabetes, the animals were submitted the surgery of dental extraction and euthanasia after 3, 7, 14 and 42 days respectively. For the immunohistochemical analysis, antibodies against TNF α , TGF β , IL6 (inflammatory response at 3 and 7 days) and TRAP, OC, WNT (bone repair at 14 and 42 days) were used. For the birefringence analysis, the sections stained with Picrosirius-red were analyzed to evaluate the organization and quantity of the collagen fibers at 14 and 42 days after the dental extraction. For Micro-CT analysis (42 days) the parameters evaluated were BV/TV, Po.Tot, Tb.Th, Tb.N and Tb.Sp. For confocal microscopy analysis, the parameters used were bone tissue dynamics and active mineralization surface. The quantitative data were submitted to a statistical analysis and a significance level of 5% was adopted. **Results:** In the immunohistochemical analysis, at 3 days, the CO group presented a light staining for IL-6, TNF α and TGF β while at 7 days, presented light staining for IL-6, and moderate for TNF α and TGF β . In the DBT-2 group, at 3 days the markers for IL-6, TNF α and TGF β were moderate whereas at 7 days, there was intense staining for IL-6 and TGF and moderate for TNF α . At 14 days, the CO group presented moderate staining for OC, Wnt and TRAP and, at 42 days, moderate for OC and Wnt and light for TRAP. The DBT-2 group, at 14 days, presented moderate staining for OC, Wnt and TRAP and, at 42 days, light staining for OC and Wnt and moderate for TRAP. In the birefringence analysis, lower numerical values were observed in the DBT-2 group at 42 days ($p < 0.05$). Micro-CT presented a

statistically significant difference for the parameters BV/TV, Po.Tot, Tb.Sp and Tb.Th, with $p < 0.05$. The dynamics of bone tissue presented a statistically significant difference between: CO (calcein) X CO (alizarin), CO (calcein) X DBT-2 (calcein) and CO (alizarin) X DBT-2 (alizarin), with $p < 0.05$. **Conclusion:** The analyzes showed that animals with type 2 diabetes have a poor alveolar repair process, presenting lower alveolar bone quantity and quality than the animals in the CO group.

Keywords: Diabetes Mellitus; Diet, High-Fat; Streptozotocin; Tooth Socket; Bone Density; Rats

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Aplicação de estreptozotocina via endovenosa (veia peniana). 42
- Figura 2- Cirurgia de exodontia do incisivo superior direito. 43
Em A: incisivos superiores direito e esquerdo do rato; em B: antissepsia do campo operatório; em C: sindesmotomia e luxação do incisivo superior direito; em D: luxação com fórceps adaptado (Okamoto e Russo, 1973); em E: remoção do incisivo superior direito com forceps adaptado; em F: incisivo superior direito removido.
- Figura 3- Análise de birrefringência do tecido ósseo alveolar. 46
Imagens representativas dos alvéolos dos grupos CO e DBT-2 aos 14 e 42 dias após exodontia. Em vermelho está corado colágeno maduro, enquanto em verde colágeno imaturo. Contra-coloração: *Picrossirius red*. Aumento original de 25x.
- Figura 4- Imagens das maxilas obtidas pela microtomografia 48
computadorizada.
Em A: Imagem representativa do grupo CO obtidas pela reconstrução durante a microtomografia computadorizada; Em B: Imagem representativa do grupo DBT-2 obtidas pela reconstrução durante a microtomografia computadorizada.
- Figura 5- Alvéolos grupos CO e DBT-2 obtidas pela microscopia confocal. 50
Imagens representativas dos alvéolos dos grupos CO e DBT-2 aos 42 dias após exodontia. Em verde calceína precipitada na matriz óssea, enquanto em vermelho alizarina também precipitada. Contra-coloração: *Calceína e Vermelho de Alizarina*. Aumento original de 10x. FONTE: elaborado pelo autor.

Figura 6- Imunomarcção da proteína IL-6 no tecido ósseo alveolar aos 3 e 7 dias após a exodontia. 54

Fotomicrografias das imunomarcções da proteína IL-6 para os grupos CO e DBT-2. Marcação leve aos 3 e 7 dias pós exodontia no grupo CO. Marcação moderada aos 3 dias e intensa aos 7 dias após exodontia no grupo DBT-2. Símbolos: setas vermelhas – células imunomarcadas. Contra-coloração: *Hematoxilina de Harris*. Aumento de 25 x e barra de escala de 100 µm.

Figura 7- Imunomarcção da proteína TNF α no tecido ósseo alveolar aos 3 e 7 dias após a exodontia. 55

Fotomicrografias das imunomarcções da proteína TNF α para os grupos CO e DBT-2. Marcação leve aos 3 e 7 dias pós exodontia no grupo CO. Marcação moderada aos 3 dias e 7 dias pós exodontia no grupo DBT-2. Símbolos: setas vermelhas – células imunomarcadas. Contra-coloração: *Hematoxilina de Harris*. Aumento de 25 x e barra de escala de 100 µm.

Figura 8- Imunomarcção da proteína TGF β no tecido ósseo alveolar aos 3 e 7 dias após exodontia. 56

Fotomicrografias das imunomarcções da proteína TGF β para os grupos CO e DBT-2. Marcação leve aos 3 e moderada aos 7 dias após exodontia no grupo CO. Marcação moderada aos 3 dias e intensa aos 7 dias após a exodontia no grupo DBT-2. Símbolos: setas vermelhas – células imunomarcadas. Contra-coloração: *Hematoxilina de Harris*. Aumento de 25 x e barra de escala de 100 µm.

Figura 9- Imunomarcação da proteína Wnt no tecido ósseo alveolar aos 14 e 42 dias após exodontia. 57

Fotomicrografias das imunomarcações da proteína Wnt para os grupos CO e DBT-2. Marcação moderada aos 14 e 42 dias após exodontia no grupo CO. Marcação moderada aos 14 dias e leve aos 42 dias após a exodontia no grupo DBT-2. Símbolos: setas vermelhas – células imunomarcadas. Contra-coloração: *Hematoxilina de Harris*. Aumento de 25 x e barra de escala de 100 μ m.

Figura 10- Imunomarcação da proteína OC no tecido ósseo alveolar aos 14 e 42 dias após exodontia. 59

Fotomicrografias das imunomarcações da proteína Wnt para os grupos CO e DBT-2. Marcação moderada aos 14 e 42 dias após exodontia no grupo CO. Marcação moderada aos 14 dias e leve aos 42 dias após a exodontia no grupo DBT-2. Símbolos: setas vermelhas – células imunomarcadas. Contra-coloração: *Hematoxilina de Harris*. Aumento de 25 x e barra de escala de 100 μ m.

Figura 11 - Imunomarcação da proteína TRAP no tecido ósseo alveolar aos 14 e 42 dias após exodontia. 60

Fotomicrografias das imunomarcações da proteína TRAP para os grupos CO e DBT-2. Marcação moderada aos 14 dias e leve aos 42 dias após exodontia no grupo CO. Marcação moderada aos 14 e 42 dias após a exodontia no grupo DBT-2. Símbolos: setas vermelhas – células imunomarcadas. Contra-coloração: *Hematoxilina de Harris*. Aumento de 25 x e barra de escala de 100 μ m.

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Grupos experimentais. Grupo CO e DBT-2 com 25 animais em cada grupo.	41
Tabela 2-	Escores das imunomarcações para as proteínas IL-6, TNF α e TGF β nos grupos experimentais CO e DBT-2 ++: marcação leve; +++: marcação moderada; ++++: marcação intensa. Período de avaliação: 3 e 7 dias após a exodontia do incisivo superior direito.	61
Tabela 3-	Escores das imunomarcações para as proteínas Wnt, OC e TRAP nos grupos experimentais CO e DBT-2 ++: marcação leve; +++: marcação moderada; ++++: marcação intensa. Período de avaliação: 14 e 42 dias após a exodontia do incisivo superior direito.	61
Tabela 4-	Índice glicêmico dos animais dos grupos CO e DBT-2. Médias de valores de índice glicêmico obtidos nos grupos experimentais. Período de avaliação: 3, 7, 14 e 42 dias após a exodontia do incisivo superior direito.	71

Lista de Gráficos

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1- Resultados obtidos na análise por birrefringência no período de 14 dias após a exodontia. 62
Área de colágeno imaturo (verde): CO (1.120 μm^2) X DBT-2 (1.981 μm^2); Área de colágeno maduro (vermelho): CO (25.625 μm^2) X DBT-2 (29.228 μm^2). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de estudo ($p > 0,05$).
- Gráfico 2- Resultados obtidos na análise por birrefringência no período de 42 dias após a exodontia. 63
Área de colágeno imaturo (verde): CO (2.771 μm^2) X DBT-2 (1.795 μm^2); Área de colágeno maduro (vermelho): CO (33.197 μm^2) X DBT-2 (26.717 μm^2). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de estudo ($p > 0,05$).
- Gráfico 3- Parâmetro de BV/TV obtido pela Micro-CT. 64
Porcentagem de volume ósseo. Grupo CO (67,25%) X Grupo DBT-2 (33,84%), com diferença estatisticamente significativa (*) entre os grupos ($p < 0,05$).
- Gráfico 4- Parâmetro de Tb.Th obtido pela Micro-CT. 65
Espessura do trabeculado. Grupo CO (0,1618 mm) X Grupo DBT-2 (0,0909 mm), com diferença estatisticamente significativa (*) entre os grupos ($p < 0,05$).
- Gráfico 5- Parâmetro de Tb.N obtido pela Micro-CT. 66
Número de trabéculas. Grupo CO (4,158/mm) X Grupo DBT-2 (3,728/mm), sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$).
- Gráfico 6- Parâmetro de Tb.Sp obtido pela Micro-CT. 67
Espaçamento entre as trabéculas. Grupo CO (0,1288 mm) X Grupo DBT-2 (0,2484 mm), com diferença estatisticamente significativa (*) entre os grupos ($p < 0,05$).

- Gráfico 7- Parâmetro de Po.Tot obtido pela Micro-CT. 68
Porosidade total. Grupo CO (32,75 mm²) X Grupo DBT-2 (66,16 mm²), com diferença estatisticamente significativa (*) entre os grupos (p < 0,05).
- Gráfico 8- Microscopia confocal - Dinâmica do tecido ósseo. 69
Dinâmica do tecido ósseo. Grupo CO (calceína) (15.069 μm²) X Grupo CO (alizarina) (27905 μm²), grupo CO (calceína) (15.069 μm²) X DBT-2 (calceína) (34916 μm²) e grupo CO (alizarina) (27.905 μm²) X DBT-2 (alizarina) (20.478 μm²) com diferença estatisticamente significativa (*) entre os grupos (p < 0,05).
- Gráfico 9- Microscopia confocal - Superfície de mineralização ativa (MS). 70
Superfície de mineralização ativa. Grupo CO (371,4 μm/mm²) X Grupo DBT-2 (318,4 4 μm/mm²), sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p > 0,05).

*Lista de
Abreviaturas*

LISTA DE ABREVIATURAS

‰: Porcentagem

>: Maior

<: Menor

µm: Micrometros

µm²: Micrometros quadrado

BV/TV: Porcentagem de volume ósseo

CEUA- FOA: Comitê de ética no uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba

CO: Grupo controle

DBT-2: Grupo diabetes tipo II

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

FOA: Faculdade de Odontologia de Araçatuba

g: Gramas

IL-6: Interleucina 6

LSMT: Laboratório para estudo de tecido mineralizado

mg/Kg: Miligramas por quilograma

Micro-CT: Microtomografia computadorizada

ml: Mililitros

mm: Milímetros

mm²: Milímetros quadrado

mm³: Milímetros cúbico

n: Número

OC: Osteocalcina

PBS: Tampão fosfato salino

pH: Potencial hidrogeniônico

Po.Tot: Porosidade total

ROI: Área de interesse para análise microtomográfica

STZ: Estreptozotocina

Tb.N: Número de trabéculas

Tb.Sp: Espaçamento entre trabéculas

Tb.Th: Espessura trabecular

TGFβ: Fator de transcrição do crescimento

TNF α : Fator de necrose tumoral

TRAP: Fosfatase ácida resistente ao ácido tartárico

UNESP: Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”

Sumário

SUMÁRIO

1.	Introdução	36
2.	Objetivo	39
3.	Metodologia	41
3.1.	Animais	41
3.2.	Indução do diabetes tipo 2	41
3.3.	Cirurgia de exodontia	42
3.4.	Injeção dos fluorocromos	43
3.5.	Eutanásia	44
3.6.	Análise dos tecidos desmineralizados	44
3.6.1.	Análise imunoistoquímica	44
3.6.2.	Análise por birrefringência	45
3.7.	Análise dos tecidos mineralizados	46
3.7.1.	Análise de microtomográfica	46
3.7.2.	Análise por microscopia confocal	48
3.8.	Análise estatística	50
4.	Resultados	53
4.1.	Análise imunoistoquímica	53
4.1.1.	IL-6	53
4.1.2.	TNF α	54
4.1.3.	TGF β	55
4.1.4.	Wnt	56
4.1.5.	OC	57
4.1.6.	TRAP	59

4.2.	Análise por birrefringência	61
4.3.	Análise microtomográfica	63
4.3.1.	BV/TV	63
4.3.2.	Tb.Th	64
4.3.3.	Tb.N	65
4.3.4.	Tb.Sp	66
4.3.5.	Po.Tot	67
4.4.	Análise por microscopia confocal	68
4.4.1.	Dinâmica do tecido ósseo	68
4.4.2.	Superfície de mineralização ativa (MS)	69
4.5.	Índice glicêmico	70
5.	Discussão	73
6.	Conclusão	77
	Referências	79
	Anexos	83

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O reparo alveolar representa um modelo para avaliação da dinâmica do tecido ósseo, no qual o organismo cria condições para produção de tecido ósseo com o objetivo de preenchimento do alvéolo previamente ocupado pelo dente e finalizado pela etapa de remodelação do tecido ósseo, onde observa-se o equilíbrio entre as atividades celulares responsáveis pelo processo de formação e reabsorção óssea [1,2].

Diversos pesquisadores apontam fatores locais e sistêmicos que interferem nas respostas teciduais e na reparação alveolar, sendo o diabetes uma patologia significativa para o processo [1]. A cavidade bucal sofre transtornos frente à enfermidade gerando sinais e sintomas que promoverão atraso na proliferação celular [3,4] e no metabolismo do colágeno [5,6].

O Diabetes é uma doença crônica (classificada em Diabetes tipo I, Diabetes tipo II ou Diabetes Gestacional), que ocorre quando o pâncreas não é capaz de produzir insulina em quantidade suficiente, ou quando o corpo não pode usar a insulina que produz de forma eficaz. Isto leva a uma concentração aumentada de glicose no sangue (hiperglicemia). A “World Health Organization” publicou dados alarmantes sobre o número de diabéticos ao redor do mundo, onde o número de pessoas com a doença passou de 108 milhões em 1980 para 422 milhões em 2014 e, em 2012, cerca de 1,5 milhão de mortes foram diretamente causadas por diabetes e outras 2,2 milhões de mortes foram atribuídas à alta glicemia [7].

Em vista disso, o presente trabalho teve como alvo o estudo do Diabetes tipo II, síndrome de etiologia múltipla e que acomete a maior parte dos pacientes diabéticos (entre 90% e 95% dos pacientes), decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade da mesma de exercer adequadamente seus efeitos, resultando na resistência deste hormônio, seguida pela incapacidade das células β em compensar tal resistência (disfunção das células β pancreáticas). Esta síndrome caracteriza-se pela presença de hiperglicemia crônica, frequentemente, acompanhada de dislipidemia, hipertensão arterial e disfunção endotelial [8].

Um dos principais fatores de risco para o diabetes é a obesidade e um estilo de vida pouco saudável (alimentos ricos em açúcar, gordura e sódio em combinação com a falta de atividade física). Além disso, a obesidade aumenta o risco de

desenvolver resistência à insulina pela desregulação da leptina e da adiponectina [9].

A resistência à insulina induzida pela obesidade está geralmente ligada a outros distúrbios, como inflamações, esteatose hepática e estresse oxidativo [9]. Hábitos de vida sedentários da população, associado às condições de estresse exacerbado tornam essa condição muito frequente na população mundial, como mencionado anteriormente.

Oates e colaboradores em 2013, afirmaram que o diabetes mellitus interfere no metabolismo ósseo influenciando na perda de dentes e que essas perdas dentárias poderiam influenciar diretamente no tipo de dieta e isso levar a uma deficiência nutricional que por sua vez atrasaria o reparo ósseo.

Destacamos que muitos estudos avaliam o processo de reparo ósseo e modelos experimentais desenvolvidos para o diabetes tipo I, com a utilização de aloxana [11] ou estreptozotocina [12, 13]. A utilização de um modelo que mimetiza a condição de diabetes tipo II, em função da grande incidência desta condição sistêmica na população, foi o grande impulsionador para o desenvolvimento do presente projeto em nosso laboratório, que tem como foco principal caracterizar o processo de reparo do tecido ósseo comprometido sistemicamente.

Vale destacar que com a popularização dos implantes dentários, o entendimento das características estruturais e a reversão das alterações patofisiológicas do osso, são de grande importância para se aumentar a previsibilidade de sucesso no tratamento reabilitador que acontecerá posteriormente à realização de exodontias. Neste sentido, questiona-se o quanto esta condição sistêmica interfere sobre o metabolismo ósseo.

Objetivo

2. OBJETIVO

Analisar a dinâmica do reparo ósseo alveolar em ratos diabéticos tipo II através das análises imunohistoquímica, por birrefringência, de microtomografia computadorizada e por microscopia confocal.

Metodologia

3. METODOLOGIA

3.1. Animais

Após a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal o projeto teve início em seu desenvolvimento. Foram utilizados um total de 50 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), provenientes do biotério central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, machos, adultos, com peso de aproximadamente 300 gramas.

Estes animais foram divididos em dois grupos: Controle (CO), com 25 animais, onde os animais não eram diabéticos; e Diabéticos tipo II (DBT-2), com 25 animais, onde os animais foram induzidos à diabetes por uma dieta hiperlipídica associada a aplicação de estreptozotocina (STZ) pela veia peniana.

Tabela 1: Grupos experimentais

GRUPO CONTROLE (CO)	GRUPO DIABÉTICO (DBT-2)
25 animais	25 animais
Dieta normal (NUVILAB, 1.4% Ca e 0.8% P e água ad libitum)	Dieta hiperlipídica (cafeteria) + aplicação de Estreptozotocina (STZ)

Grupo CO e DBT-2 com 25 animais em cada grupo. FONTE: elaborado pelo autor.

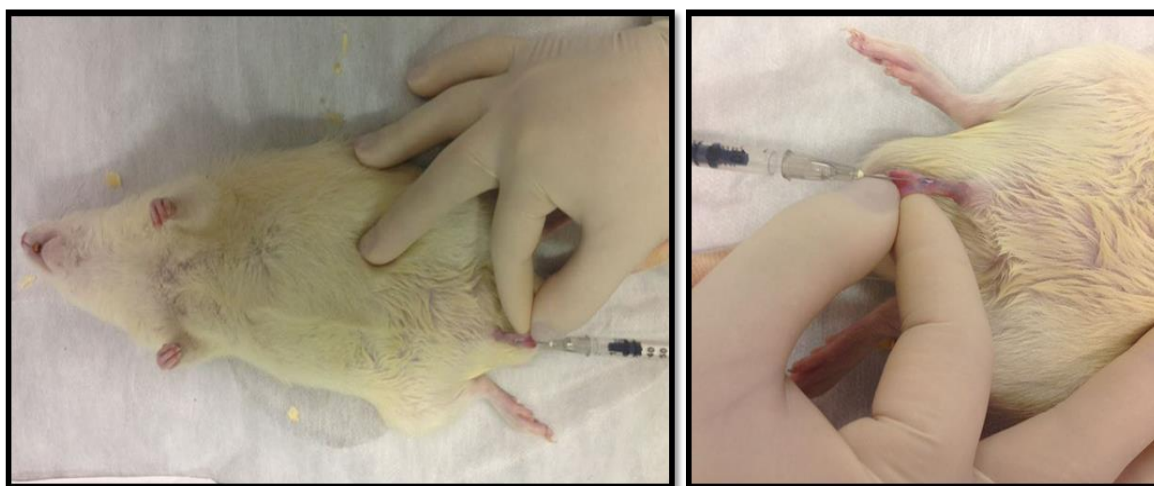
3.2. INDUÇÃO DO DIABETES TIPO II

Foi utilizado o modelo de estudo segundo Correia-Santos e colaboradores de 2012, onde apesar da existência da predisposição genética, são citados outros fatores como o envelhecimento, a obesidade, a qualidade da dieta e o estilo de vida sedentário como os principais fatores de risco envolvidos no desenvolvimento deste tipo de diabetes.

Para a indução do diabetes tipo II, primeiramente, foi realizada uma dieta de alta densidade energética (hiperlipídica) de cafeteria (Gomez-Smith, et al. 2016 e Carillon et al. 2013), pelo período inicial de três semanas, e após as três semanas da dieta,

os ratos receberam injeção pela veia peniana (i.v.) de STZ em baixa dosagem (35mg/kg) dissolvida em veículo (solução de citrato de sódio 0,01M, pH = 4,5), de acordo com Srinivasan et al em 2005. Os ratos que consumiram a dieta controle receberam somente o veículo pela veia peniana.

Figura 1: aplicação da STZ.



Aplicação de estreptozotocina via endovenosa (veia peniana). FONTE: elaborado pelo autor.

O peso corporal e a glicose plasmática foram analisados antes da administração da dieta hiperlipídica, ao final das três semanas de administração da dieta (antes da injeção da STZ) e depois de 7 dias da injeção, isto é, com 4 semanas de administração da dieta nos ratos.

A confirmação do diabetes foi feita seguindo os seguintes critérios: concentração de glicose plasmática máxima maior que 288mg/dL, ou concentração maior que 198mg/dL após 120 minutos de administração de solução oral de glicose (2g glicose/kg de massa corporal) [15].

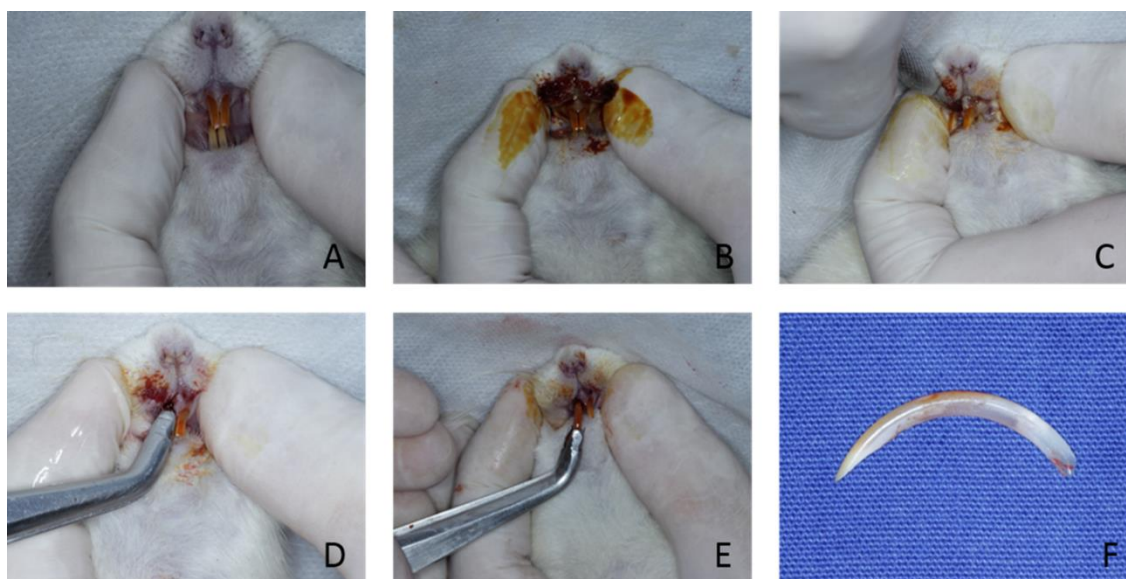
Este modelo de estudo mostra que a combinação de dieta hiperlipídica e baixa dose de STZ por via endovenosa (veia peniana) é eficaz em gerar um modelo animal que reproduz a história natural e as características metabólicas comuns da diabetes tipo 2 em humanos [8].

3.3. CIRURGIA DE EXODONTIA

Após a comprovação do diabetes tipo II, os animais foram anestesiados por infiltração intramuscular de Cloridrato de Xilazina e Cloridrato de Cetamina na

dosagem indicada pelo fabricante, será realizada a antissepsia do campo operatório com polivinilpirrolidona iodada (Riodeine Indústria Química e Farmacêutica Rio Química, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil) e em seguida, foi realizada a exodontia do incisivo central superior direito, utilizando instrumental especialmente adaptado para este fim (Okamoto; Russo, 1973). A mucosa gengival foi suturada com fio de poliglactina 910 (Vicryl 4.0 – Jhonson&Jhonson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos).

Figura 2: Cirurgia de exodontia do incisivo superior direito.



Em A: incisivos superiores direito e esquerdo do rato; em B: antissepsia do campo operatório; em C: síndesmotomia e luxação do incisivo superior direito; em D: luxação com fórceps adaptado (Okamoto e Russo, 1973); em E: remoção do incisivo superior direito com fórceps adaptado; em F: incisivo superior direito removido. FONTE: elaborado pelo autor.

3.4. Injeção dos Fluorocromos (apenas para os animais eutanasiados aos 42 dias após a exodontia)

Passados 14 dias da cirurgia de exodontia do incisivo central, os animais receberam uma injeção intramuscular do fluorocromo calceína (20 mg/kg). Após mais 20 dias, os mesmos animais receberam uma injeção intramuscular do fluorocromo vermelho de alizarina (20 mg/kg). [16,17]

3.5. Eutanásia

Foi realizada a eutanásia de todos os animais dos grupos experimentais através de sobredosagem anestésica de anestésico inalatório (Halotano, Tanohalo®, Cistália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, Nova Itapira, Itapira, SP), sendo dez animais aos 3 dias (n=5 por grupo), dez animais aos 7 dias (n=5 por grupo), dez animais aos 14 dias (n=5 por grupo) e vinte animais aos 42 dias (n=10 por grupo) após a exodontia, foram retiradas as hemi-maxilas direitas para a realização das análises dos alvéolos.

3.6. Processamentos Laboratoriais

Análise dos tecidos desmineralizados (procedimentos histotécnicos)

As peças foram fixadas em formol e sofreram descalcificação em EDTA (10%) e em seguida a desidratação utilizando uma sequência de álcoois. Após estas etapas, realizou-se a diafanização com xilol para posterior inclusão em parafina para obtenção de corte com 5 µm de espessura e montados em lâminas. As lâminas foram separadas para a coloração de picosirius (picosirius-red) e reações imunohistoquímicas. Previamente a realização das análises imunohistoquímicas, as amostras foram codificadas de maneira que somente o orientador conhecerá quais grupos pertencem. Um único examinador realizou as análises e o mesmo desconhecia o respectivo grupo da secção.

3.6.1. Análise Imunohistoquímica

O processamento imunohistoquímico foi realizado no Laboratório para o Estudo de Tecidos Mineralizados, do Departamento de Ciências Básicas, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (FAPESP, 2015/14688-0).

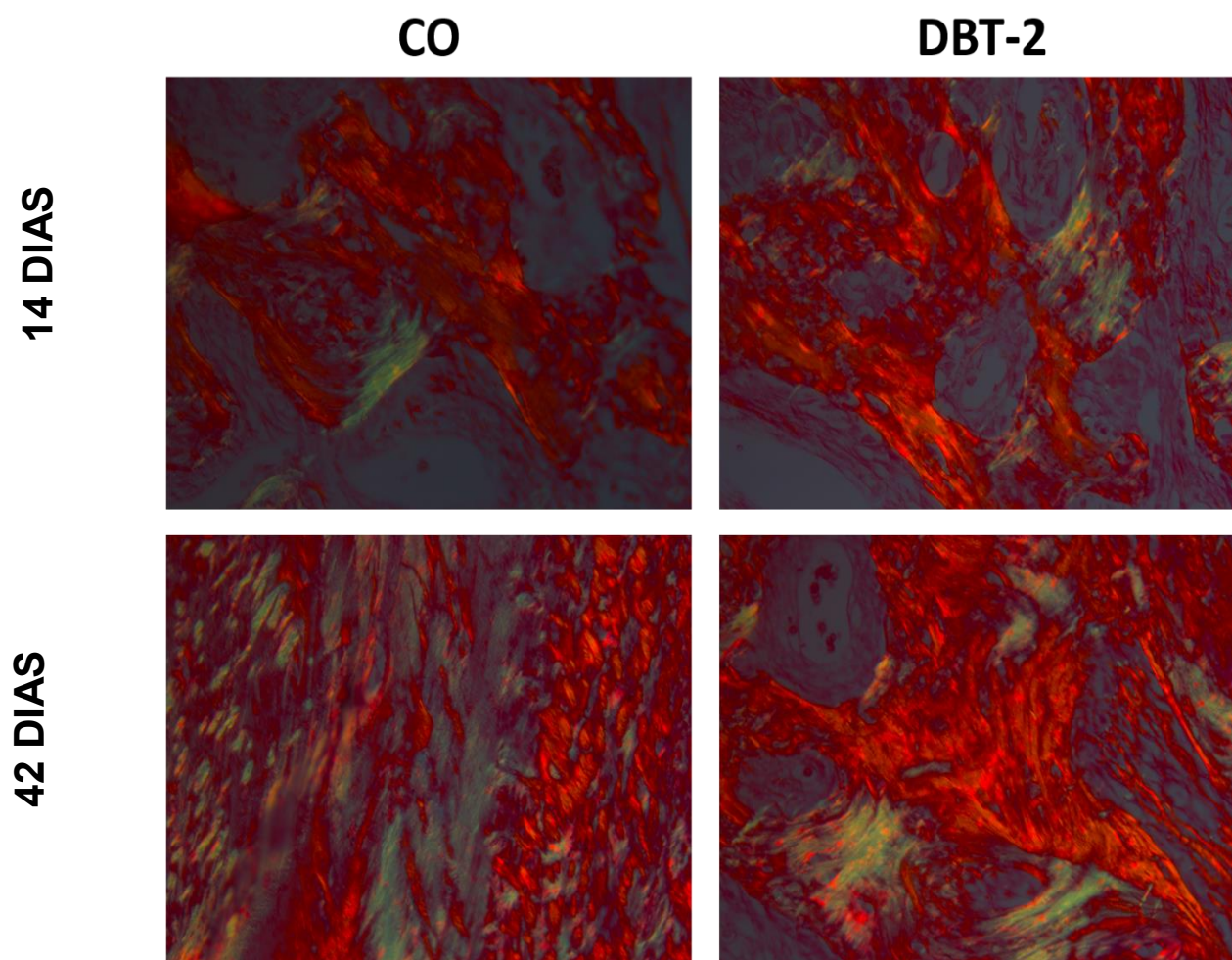
A atividade da peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio. A seguir, as lâminas passaram pela etapa de recuperação antigênica com tampão fosfato citrato (ph 6.0). Os anticorpos primários utilizados foram contra TNF α , TGF β e IL6 com objetivo de observar as respostas inflamatórias dos tecidos aos 3 e 7 dias; WNT para analisar o processo de formação óssea regulado pela via Wnt; TRAP com o objetivo de se analisar as respostas celulares quanto ao processo de reabsorção óssea; e OSTEOCALCINA (OC) (Santa Cruz Biotechnology), com o objetivo de se analisar a formação e mineralização óssea.

Foram realizados experimentos de imunistoquímica utilizando como método de detecção a imunoperoxidase. O anticorpo secundário utilizado foi o biotilado anti-cabra produzido em coelho (Pierce Biotechnology), o amplificador a Streptavidina e Biotina (Dako) e a diaminobenzidina (Dako) como cromógeno. Ao término da reação imunistoquímica, foi realizada a contra-coloração com hematoxilina de Harris e a seguir foram montadas as lâminas para a realização da análise no microscópio óptico. (Leica R DMLB, Heerbrugg, Switzerland). Para cada um dos anticorpos utilizados, foi realizada uma análise qualitativa ordinal, onde foram atribuídos escores que representam a extensão da área de imunomarcagem positiva pela diaminobenzidina, observada no campo avaliado. (Pedrosa e cols., 2009; Manrique e cols., 2015).

3.6.2. Análise por Birrefringência

Os cortes corados com Picrosirius-red foram analisados em microscópio de luz polarizada a fim de se avaliar a organização e quantidade de feixes de fibras colágenas considerando-se a intensidade de birrefringência da matriz colágena. A quantificação da intensidade do brilho de birrefringência foi realizada utilizando-se o software KS 300/400 com AxioVision versão 4.8 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha). Inicialmente foram definidos os espectros de cor verde, amarela e vermelha (**Figura 3**), seguindo valores de RGB (red, green, blue), os quais foram padronizados para todas as imagens. Para a quantificação, as imagens foram binarizadas para cada espectro de cor e a quantidade em pixels de cada cor correspondente a cada campo. Posteriormente, foram calculadas as médias dos valores em pixels e submetidas a análise estatística para cálculo das médias e desvios-padrão de cada grupo em cada período experimental.

Figura 3: Fibras colágenas dos grupos CO e DBT-2 aos 14 e 42 dias após exodontia, pela coloração de Picrosirius Red em microscópio de luz polarizada.



Imagens representativas dos alvéolos dos grupos CO e DBT-2 aos 14 e 42 dias após exodontia. Em vermelho está corado colágeno maduro, enquanto em verde colágeno imaturo. Contra-coloração: *Picrosirius red*. Aumento original de 25x. FONTE: elaborado pelo autor.

3.7. Análise dos Tecidos Mineralizados

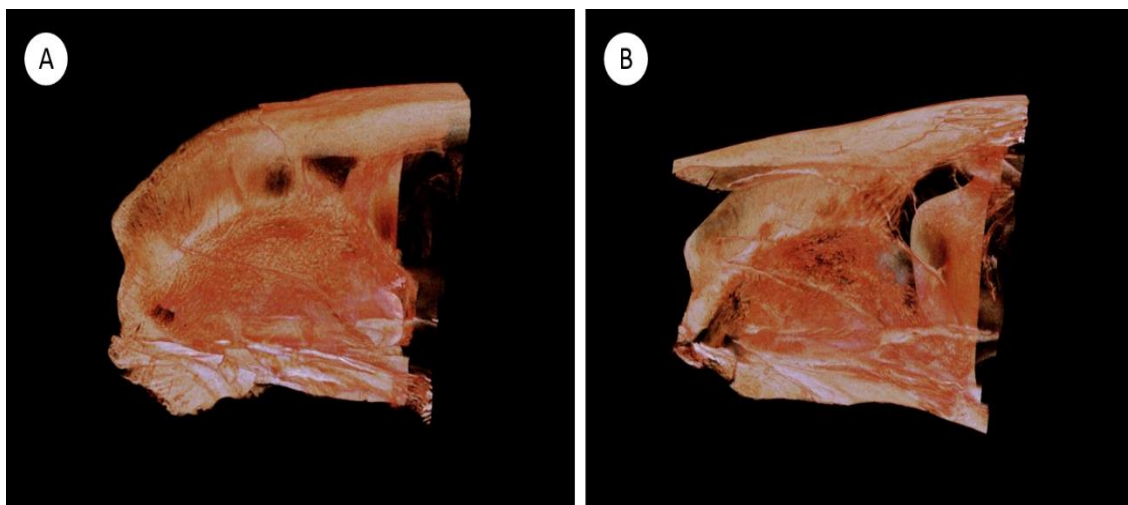
3.7.1. Análise Microtomográfica (Micro-Ct)

Ao término da etapa de fixação, as maxilas foram lavadas por 48 horas em água corrente e armazenadas em álcool 70%, a fim de serem submetidas à análise por varredura de feixe de raios-X em um sistema de microtomografia digital computadorizada (FOA/UNESP). As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 BrukerMicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) utilizando cortes

de 9 μm de espessura (50Kv e 500 μ), com filtro de Cobre e Alumínio e passo de rotação de 0.3 mm. As imagens obtidas pela projeção dos raios-X nas amostras foram armazenadas e reconstituídas determinando a área de interesse pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0). No software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) as imagens foram reconstruídas para adequação do posicionamento padrão para todas as amostras, podendo ser observada em três planos (transversal, longitudinal e sagital). Em seguida, utilizando o software CTAnalyser – CTAn (2003-11SkyScan, 2012 BrukerMicroCT Versão 1.12.4.0) foi definida a área de interesse para avaliação tridimensional. (ROI). O software CTAn analisa e mede a imagem de acordo com a escalas de cinza (threshold). O threshold utilizado na análise será de 25-90 tons de cinza, que possibilita obter o volume de osso formado nos alvéolos em reparação. (Ramalho-Ferreira *et al.*, 2015).

Vale destacar que as imagens obtidas a partir da microtomografia computadorizada foram utilizadas para caracterizar a densidade óssea mineral em cada um dos grupos experimentais, espessura do trabeculado, bem como a distância entre as trabéculas e porosidade do osso, verificando assim o efeito do diabetes tipo II durante o processo de reparo alveolar [20].

Figura 4: Imagens representativas da microtomografia do grupo CO (A) e grupo DBT-2 (B).



Em A: Imagem representativa do grupo CO obtidas pela reconstrução durante a microtomografia computadorizada; Em B: Imagem representativa do grupo DBT-2 obtidas pela reconstrução durante a microtomografia computadorizada. FONTE: elaborado pelo autor.

3.7.2. Análise por Microscopia Confocal

Após a microtomografia no alveolo dos animais as maxilas foram armazenadas em álcool 70. Os espécimes foram lavados em água corrente durante 24 horas; desidratados em concentrações crescentes de álcoois; embebidos e infiltrados em uma solução de acetona e metacrilato de metilo lento (PMMAL) (Clássico, Artigos Odontológicos Clássico, São Paulo Paulo, SP, Brasil) em uma proporção de 1:1. Na sequência, receberam 3 banhos de PMMAL, sendo que no último banho foi acrescentado o catalisador peróxido de benzoíla a 1% (Riedel – De Haën AG, Seelze – Hannover, Germany). O último banho (PMMAL e catalisador) foi realizado com as peças colocadas em frascos de vidro com tampa as quais foram mantidas em uma temperatura de 37 ° C, durante 5 dias até a resina ser polimerizada. Após a polimerização os blocos contendo os espécimes foram inicialmente reduzidos com uma broca "Maxcut" montada em um motor de bancada Kota (Strong 210, São Paulo, SP, Brasil), paralelamente ao longo eixo da hemimaxila (plano sagital). Prosseguiu-se com o desgaste manual progressivo em politriz automática (ECOMET 250PRO/AUTOMET 250, Buehler, Lake Bluff, IL, USA) com lixas de granulação 120, 300, 400, 600, 800 e 1200 (Carbimet 2, Buehler, Lake Bluff, IL, USA), ao abrigo da luz fluorescente, até a espessura de 80µm mensurada por

paquímetro digital (Mitutoyo, Pompeia, SP, Brasil). Os cortes obtidos foram montados em lâminas histológicas com óleo mineral (Petrolato líquido, Mantecor, Taquara, RJ, Brasil) e fixados com lamínulas e esmalte para evitar o esvaziamento do óleo, impedindo o ressecamento do corte.

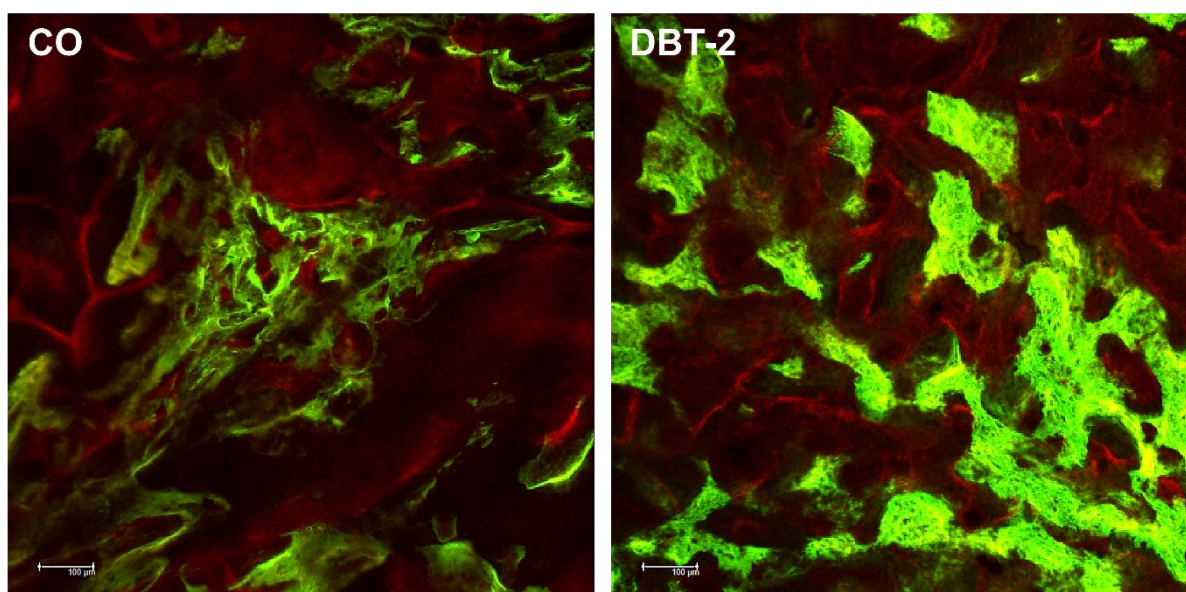
As secções longitudinais das hemimaxilas do osso alveolar adjacente ao terço apical do incisivo central superior foram obtidas pelo microscópio Leica CTR 4000 CS SPE (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha), utilizando objetiva de 10 X (aumento original 100). A área foi escolhida considerando como referência o tecido ósseo adjacente ao incisivo superior direito. Portanto, o dente foi tomado como referência, e então a área do tecido ósseo ao redor desse dente foi avaliada em cada amostra. Imagens de 1 mm em altura e largura foram obtidas correspondendo as dimensões em 512x512 pixels de secções ópticas. As imagens foram escaneadas com cortes de 2 µm de espessura durante o período de 2,5 minutos por corte. Sendo assim, para o escaneamento total de cada lâmina em 56 µm, foram obtidos 28 cortes. Os filtros de barreira utilizados serão BP 530/30 nm e LP 590 nm combinados com a ativação de DD 488/568 e para cada um dos fluorocromos, o fotomultiplicador foi em 534 para calceína e 357 para alizarina. As imagens começarão desde o início da fluorescência, representando assim, em nossa abordagem metodológica, o início da calcificação ou formação óssea (precipitação de cálcio na matriz orgânica do colágeno). As imagens obtidas pelo microscópio confocal (**Figura 5**) foram reconstruídas e assim o osso alveolar apresentou a sobreposição dos dois fluorocromos (calceína e alizarina).

Estas imagens foram salvas no formato TIFF e transportadas para o software ImageJ (Software de Processamento e Análise de Imagens, Ontario, ON, Canadá) para a realização das mensurações dos resultados. Primeiramente, a cor verde foi evidenciada (calceína) e pela ferramenta “measure” o programa forneceu a área correspondente em µm². O mesmo procedimento foi realizado para a cor vermelha (alizarina), obtendo os dados referentes à dinâmica do tecido ósseo alveolar.

O turnover de osso, nesta abordagem metodológica, é representado pela diferença entre osso antigo (verde) e osso novo (vermelho). Os fluorocromos são compostos químicos que têm a propriedade de se ligarem ao cálcio no momento da precipitação na matriz óssea. Portanto, a extensão da marcação com fluorocromo representa a quantidade de precipitação de cálcio, permitindo assim a

mensuração do evento de formação óssea. Outro aspecto a ser considerado é o período em que os fluorocromos foram injetados; como o primeiro foi calceína (verde), o osso marcado (precipitação de cálcio) com o fluorocromo verde representa o osso antigo. O último fluorocromo injetado foi a alizarina; portanto, o osso marcado (precipitação de cálcio) com o fluorocromo vermelho representa o osso novo, ou seja, a superfície ativa de mineralização [21]. Considerando estes pontos, pode-se dizer que as cores diferentes representam os diferentes períodos da formação óssea (**Figura 5**). A dinâmica do tecido ósseo é representada pela remodelação óssea, observada através da precipitação de cálcio que ocorre na formação óssea representada pelo fluorocromo vermelho. Quanto maior a prevalência da fluorescência vermelha, maior a superfície ativa de mineralização, enquanto a fluorescência verde representa o osso anterior (antigo).

Figura 5: Alvéolos grupos CO e DBT-2 obtidas pela microscopia confocal.



Imagens representativas dos alvéolos dos grupos CO e DBT-2 aos 42 dias após exodontia. Em verde, a calceína precipitada na matriz óssea, enquanto em vermelho alizarina também precipitada. Contra-coloração: *Calceína e Vermelho de Alizarina*. Aumento original de 10x. FONTE: elaborado pelo autor.

3.8. Análise Estatística

Para a estatística dos dados da análise morfométrica, foi avaliada a área de tecido ósseo presente no terço médio do alvéolo assim como a avaliação da espessura do trabeculado ósseo (em micrômetros de espessura). Os dados obtidos

nas análises foram transformados em valores absolutos, de pixels, para valores percentuais relativos, de modo que minimizou a interferência da diferença do tamanho do negativo. Para a comparação entre os valores obtidos nos diferentes grupos e períodos experimentais, foi realizado primeiramente o teste de normalidade e, de acordo com a distribuição dos resultados quantitativos na curva de normalidade, foi eleito um teste paramétrico ou não paramétrico, por meio do programa estatístico SigmaStat 3.1 (Systat Software, Inc). Foi adotado como nível de significância $p < 0,05$.

Resultados

1. RESULTADOS

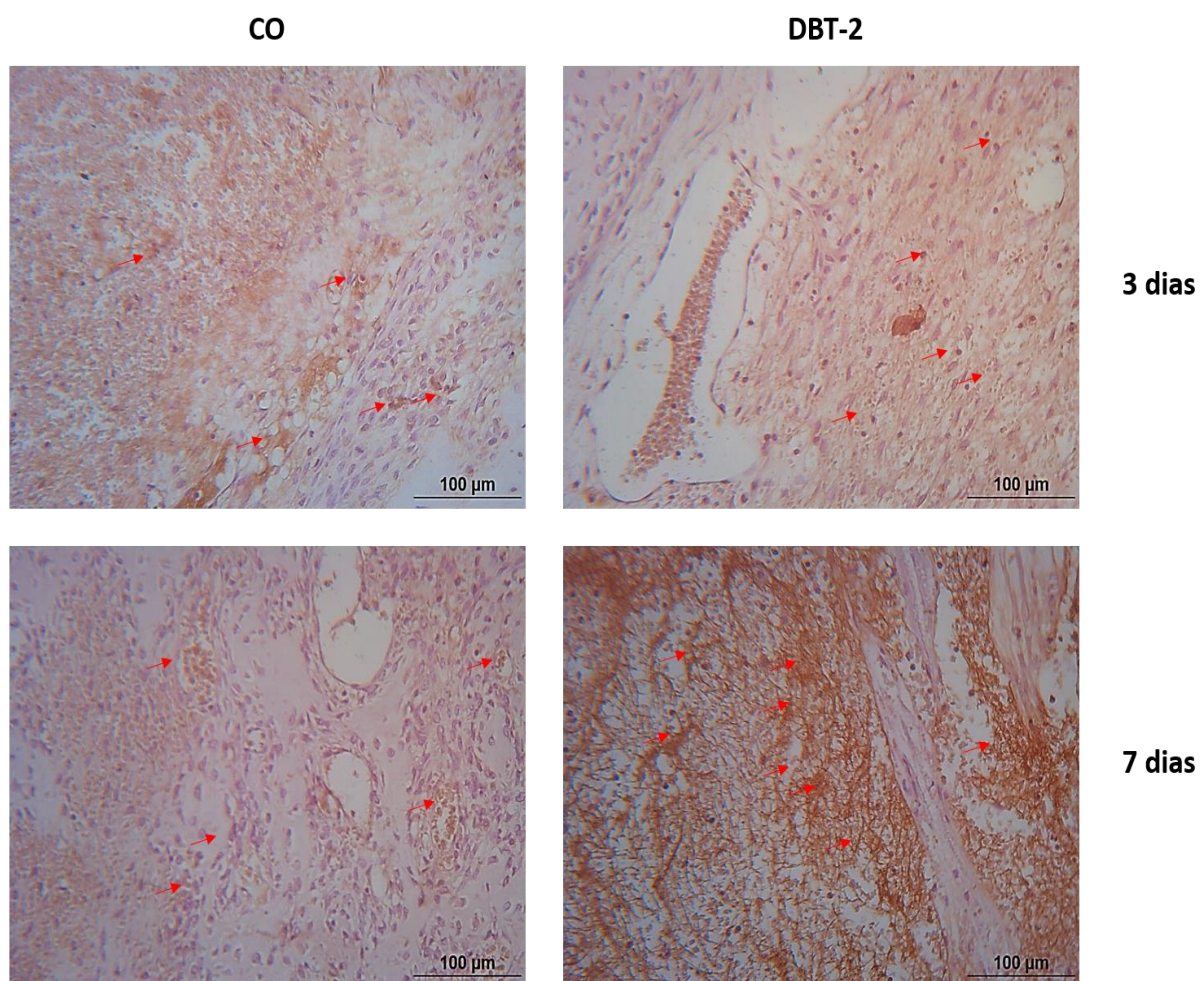
1.1. Análise Imunoistoquímica

1.1.1. IL-6

Aos 3 dias, grupo CO, observa-se o alvéolo em reparação com a presença de remanescentes do coágulo sanguíneo e um tecido de granulação incipiente, característico desta etapa. A marcação positiva para a IL-6 foi observada em células inflamatórias, mostrando-se leve, abrangendo pequena área do alvéolo em reparação. Já no grupo DBT-2, aos 3 dias, observa-se um tecido de granulação incipiente, preenchendo o alvéolo em reparação, no entanto, a marcação positiva para IL-6 mostra-se de forma moderada em todo o alvéolo em reparação.

Aos 7 dias, grupo CO, observa-se o tecido conjuntivo se organizando, pouco remanescente de coágulo sanguíneo e é possível visualizar trabéculas ósseas em estágio inicial de formação. A marcação para a IL-6 mostra-se leve. Já no grupo DBT-2, observa-se um tecido com predomínio de células inflamatórias, com marcação caracterizada como intensa para esta citocina, no alvéolo em reparação. **(Figura 6)**

Figura 6: Imunomarcção da proteína IL-6 aos 3 e 7 dias após exodontia.



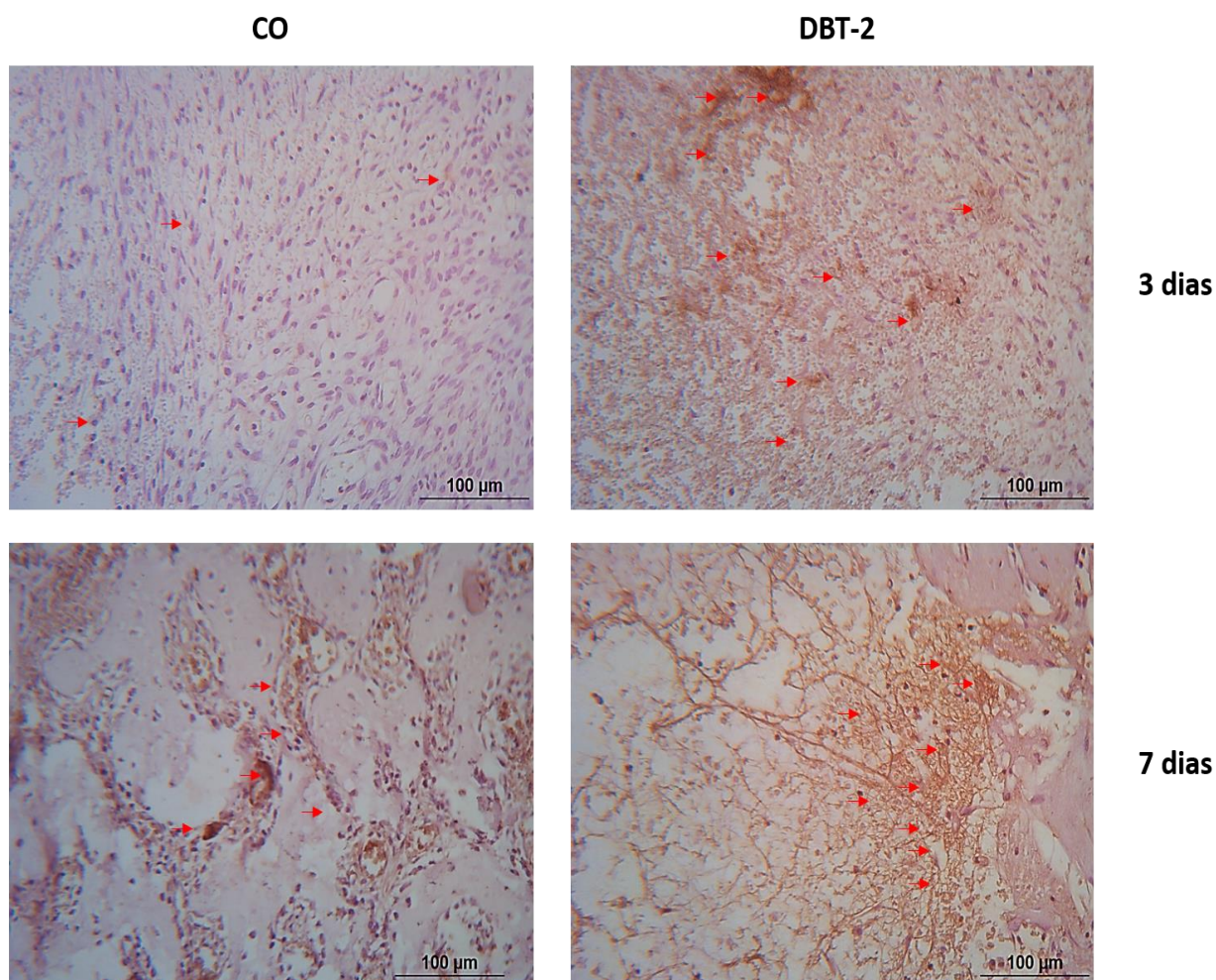
Fotomicrografias das imunomarcações da proteína IL-6 para os grupos CO e DBT-2. Marcação leve aos 3 e 7 dias pós exodontia no grupo CO. Marcação moderada aos 3 dias e intensa aos 7 dias após exodontia no grupo DBT-2. Símbolos: setas vermelhas – células imunomarcadas. Contracoloração: *Hematoxilina de Harris*. Aumento de 25 x e barra de escala de 100 μm. FONTE: elaborado pelo autor.

4.1.2. TNF α

Aos 3 dias, quanto a imunomarcção para o TNF α , foi observada marcação positiva leve das células inflamatórias no alvéolo em reparação para o grupo CO. No entanto, no grupo DBT-2, foi observada uma marcação moderada, estendendo-se por todo o alvéolo. Aos 7 dias, observando-se a organização incipiente do trabeculado ósseo neoformado no grupo CO, foi possível observar marcação caracterizada como leve a moderada, nas células inflamatórias presentes em pequena quantidade. Já no grupo DBT-2, novamente chama a atenção o atraso nos eventos reparacionais em relação ao grupo CO, notando-se a presença de um

tecido de granulação com presença de infiltrado inflamatório, marcado de forma moderada para a TNF α . (**Figura 7**)

Figura 7: Imunomarcção da proteína TNF α aos 3 e 7 dias após exodontia.



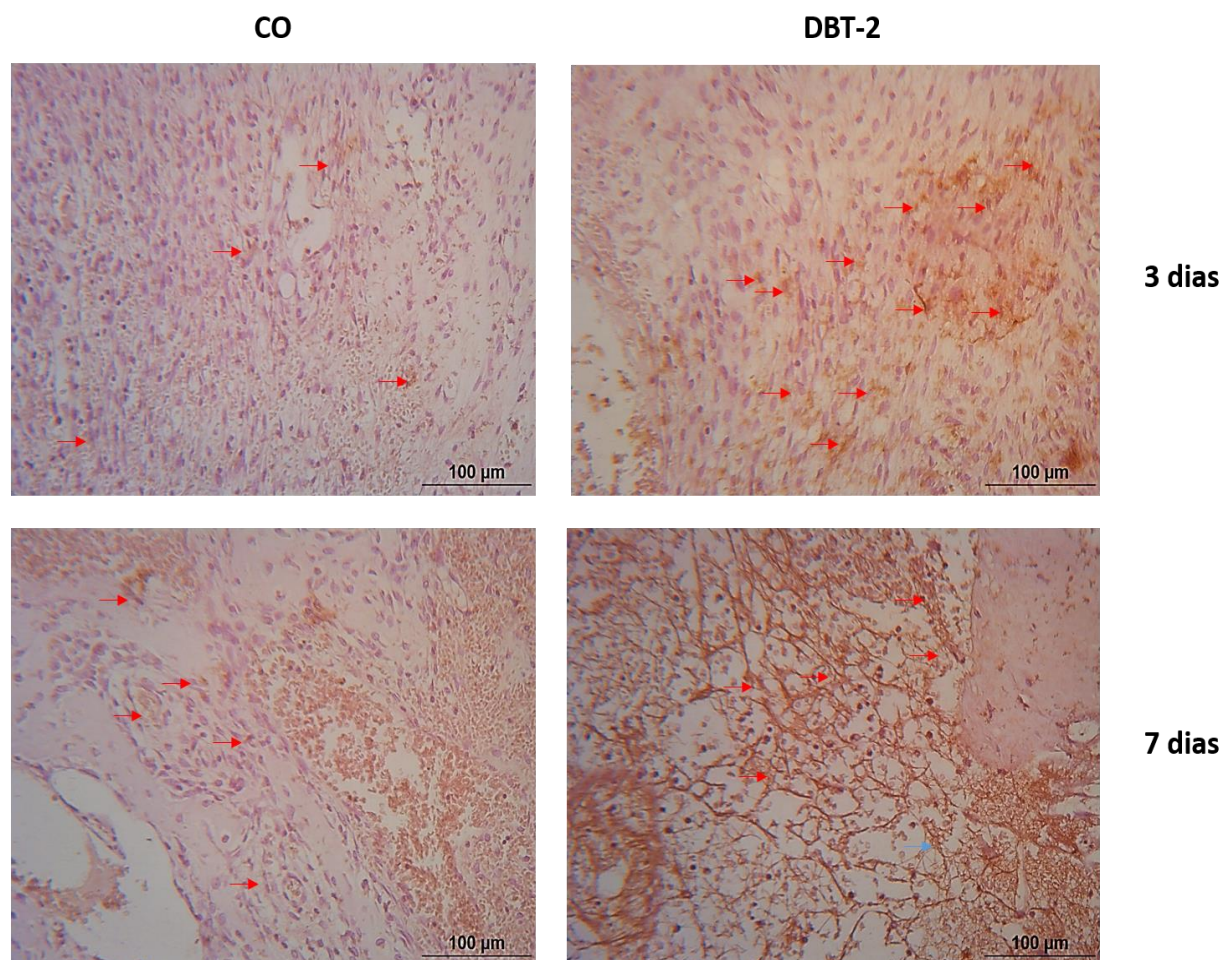
Fotomicrografias das imunomarcações da proteína TNF α para os grupos CO e DBT-2. Marcação leve aos 3 e 7 dias pós exodontia no grupo CO. Marcação moderada aos 3 dias e 7 dias pós exodontia no grupo DBT-2. Símbolos: setas vermelhas – células imunomarcadas. Contra-coloração: *Hematoxilina de Harris*. Aumento de 25 x e barra de escala de 100 μ m. FONTE: elaborado pelo autor.

4.1.3. TGF β

Aos 3 dias, foi observada marcação leve de TGF β para as células inflamatórias no alvéolo do grupo CO. Neste mesmo período, no grupo DBT-2, foi observada presença de marcação moderada deste mesmo fator para as células inflamatórias do alvéolo em reparação. Aos 7 dias, ainda com relação ao TGF β , foi observada

marcação moderada nas células inflamatórias no alvéolo do grupo CO e marcação intensa nas células inflamatórias no alvéolo do grupo DBT-2. (**Figura 8**)

Figura 8: Imunomarcação da proteína TGF β aos 3 e 7 dias após exodontia.



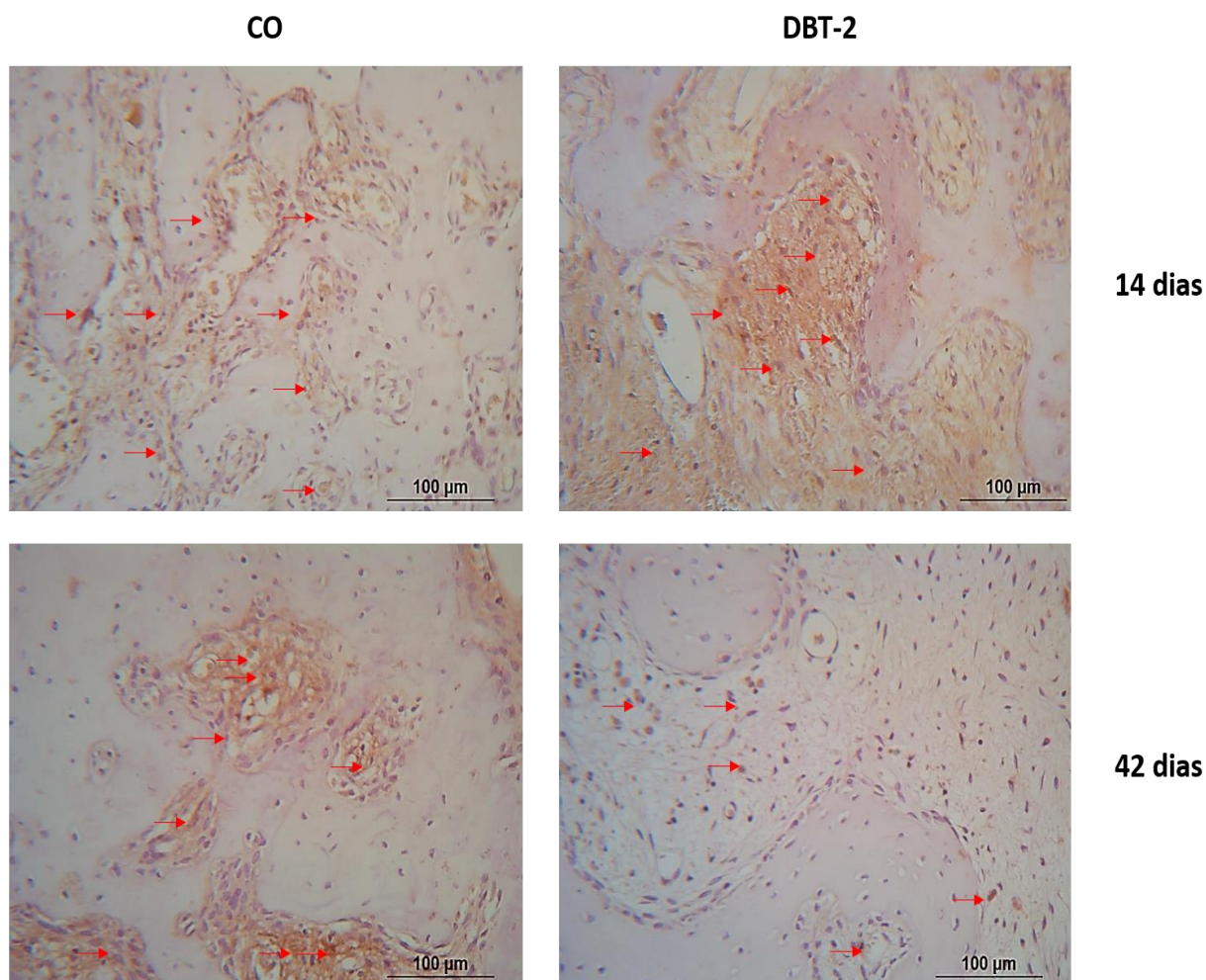
Fotomicrografias das imunomarcações da proteína TGF β para os grupos CO e DBT-2. Marcação leve aos 3 e moderada aos 7 dias após exodontia no grupo CO. Marcação moderada aos 3 dias e intensa aos 7 dias após a exodontia no grupo DBT-2. Símbolos: setas vermelhas – células imunomarcadas. Contra-coloração: *Hematoxilina de Harris*. Aumento de 25 x e barra de escala de 100 μ m. FONTE: elaborado pelo autor.

4.1.4. Wnt

Aos 14 dias, a proteína Wnt no grupo CO mostrou-se marcada de forma moderada, principalmente nos osteoblastos junto ao tecido ósseo neoformado. Também mostrou-se moderada no grupo DBT-2, no entanto, vale destacar que neste grupo, observa-se uma importante marcação no tecido conjuntivo ao redor do trabeculado ósseo neoformado. Aos 42 dias, observa-se a presença da proteína Wnt junto aos osteoblastos presentes nos espaços medulares do trabeculado ósseo

neoformado, no grupo CO, caracterizando-se por uma marcação moderada. Já no grupo DBT-2, neste mesmo período, foi observada marcação leve em osteoblastos e matriz extracelular do tecido ósseo presentes no alvéolo em reparação. **(Figura 9)**

Figura 9: Imunomarcação da proteína Wnt aos 14 e 42 dias após exodontia.



Fotomicrografias das imunomarcações da proteína Wnt para os grupos CO e DBT-2. Marcação moderada aos 14 e 42 dias após exodontia no grupo CO. Marcação moderada aos 14 dias e leve aos 42 dias após a exodontia no grupo DBT-2. Símbolos: setas vermelhas – células imunomarcadas. Contra-coloração: *Hematoxilina de Harris*. Aumento de 25 x e barra de escala de 100 μm. FONTE: elaborado pelo autor.

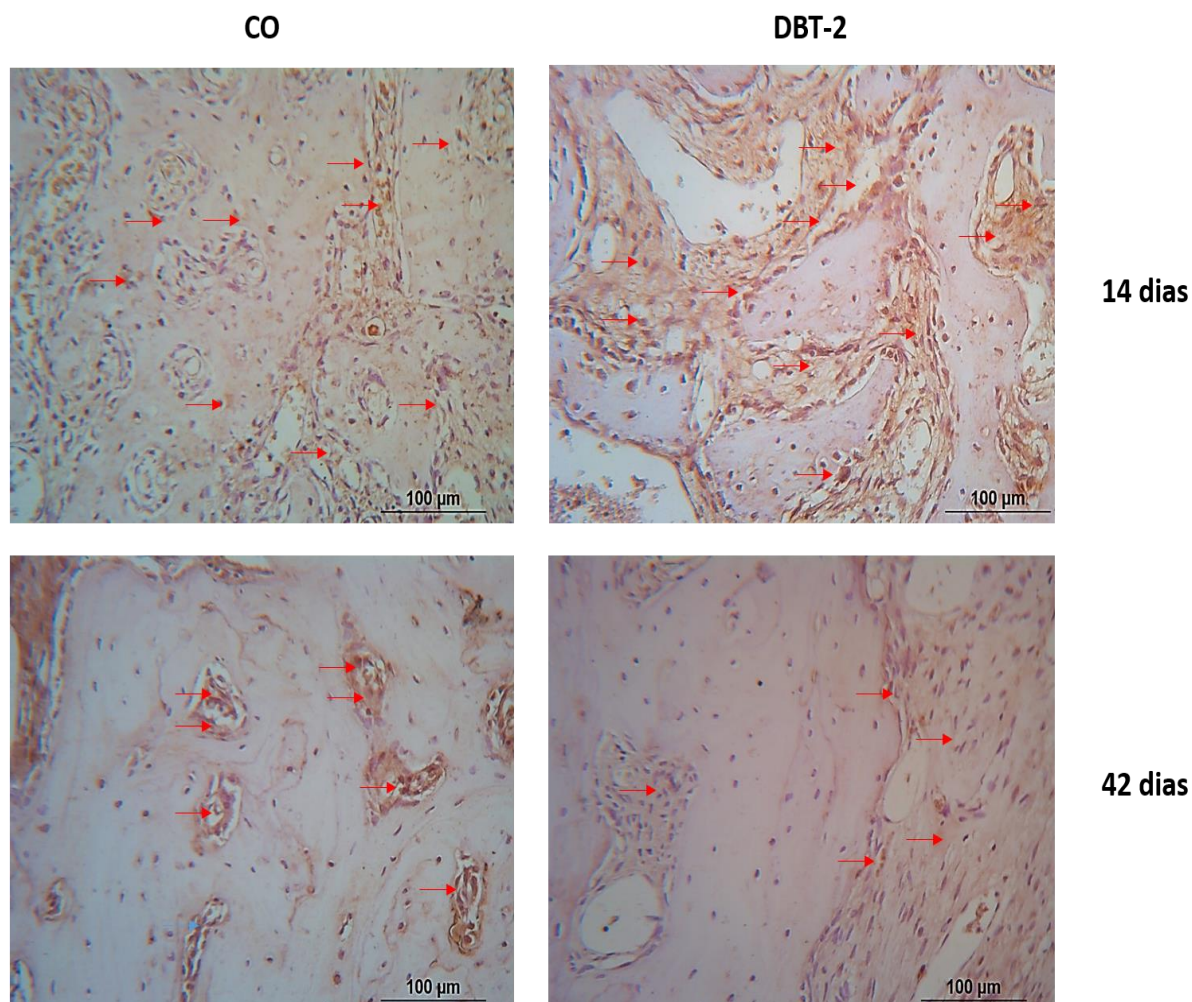
4.1.5. OC

Aos 14 dias, observa-se no grupo CO, o trabeculado ósseo organizado, com presença de osteoblastos em atividade de síntese de matriz orgânica junto ao tecido ósseo. Neste grupo, observa-se que a osteocalcina apresenta-se marcada de forma moderada tanto na forma de precipitado sobre o trabeculado ósseo

neoformado, como também junto aos osteoblastos em atividade de síntese da matriz orgânica. No grupo DBT-2, observa-se um padrão de formação de trabeculado ósseo incipiente, com trabéculas mais delgadas e com presença de grande quantidade de tecido conjuntivo, marcado de forma moderada para a osteocalcina. Osteoblastos também apresentam-se marcados positivamente para esta proteína. **(Figura 10)**

Já aos 42 dias, grupo CO, observa-se o tecido ósseo preenchendo grande parte do alvéolo em reparação, com pequenos espaços medulares. A osteocalcina mostra-se marcada de forma moderada, mostrando um tecido ósseo maduro. Aos 42 dias, para o grupo DBT-2, mostra um atraso nas respostas reparacionais, com uma marcação leve para osteocalcina especialmente no tecido conjuntivo que preenche importante porção do alvéolo em reparação. **(Figura 10)**

Figura 10: Imunomarcção da proteína OC aos 14 e 42 dias após exodontia.



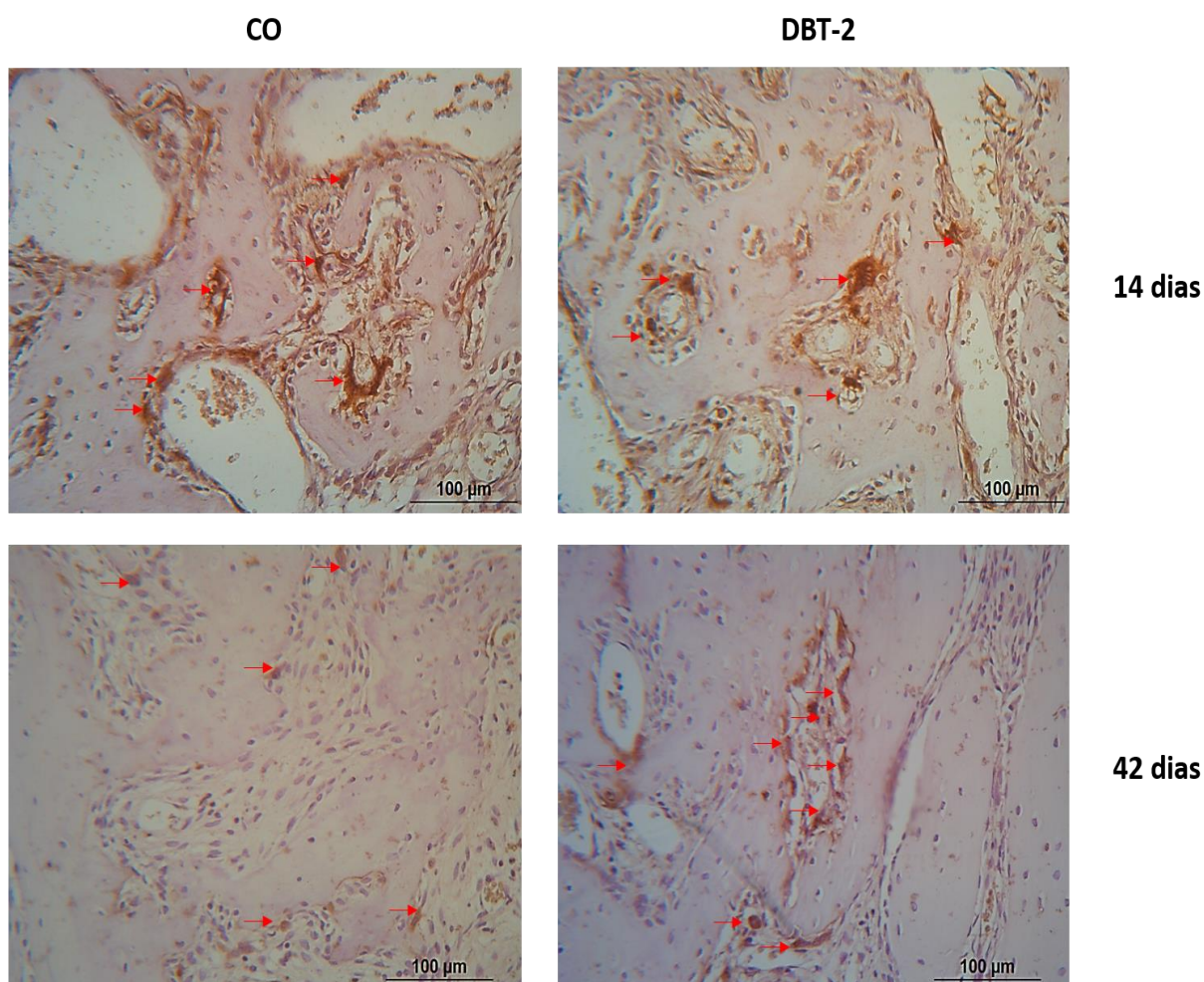
Fotomicrografias das imunomarcações da proteína Wnt para os grupos CO e DBT-2. Marcação moderada aos 14 e 42 dias após exodontia no grupo CO. Marcação moderada aos 14 dias e leve aos 42 dias após a exodontia no grupo DBT-2. Símbolos: setas vermelhas – células imunomarcadas. Contra-coloração: *Hematoxilina de Harris*. Aumento de 25 x e barra de escala de 100 µm. FONTE: elaborado pelo autor.

4.1.6. Trap

A proteína TRAP, caracterizando a atividade osteoclástica no alvéolo em reparação, mostrou-se marcada de forma moderada para o grupo CO e para o grupo DBT-2, aos 14 dias. Esta marcação mostra a atividade metabólica do alvéolo em reparação nessa etapa do processo de reparo alveolar, caracterizando ativação das unidades multicelulares básicas neste período. Já aos 42 dias, foi possível observar uma marcação leve para a TRAP no alvéolo em reparação do grupo CO

e uma marcação moderada para a mesma proteína no grupo DBT-2, o que mostra a atividade de reabsorção óssea mantida até a etapa final da reparação alveolar. (Figura 11)

Figura 11: Imunomarcacão da proteína TRAP aos 14 e 42 dias pós exodontia.



Fotomicrografias das imunomarcacões da proteína TRAP para os grupos CO e DBT-2. Marcação moderada aos 14 dias e leve aos 42 dias após exodontia no grupo CO. Marcação moderada aos 14 e 42 dias após a exodontia no grupo DBT-2. Símbolos: setas vermelhas – células imunomarcadas. Contra-coloraçãõ: *Hematoxilina de Harris*. Aumento de 25 x e barra de escala de 100 µm. FONTE: elaborado pelo autor.

Tabela 2: Escores das imunomarcações para as proteínas IL-6, TNF α e TGF β nos grupos experimentais CO e DBT-2.

	CO	DBT-2	
IL-6	++	+++	3 dias
	++	++++	7 dias
TNF	++	+++	3 dias
	++/+++	+++	7 dias
TGF	++	+++	3 dias
	+++	++++	7 dias

++: marcação leve; +++: marcação moderada; ++++: marcação intensa. Período de avaliação: 3 e 7 dias após a exodontia do incisivo superior direito. FONTE: elaborado pelo autor.

Tabela 4: Escores das imunomarcações para as proteínas Wnt, OC e TRAP nos grupos experimentais CO e DBT-2.

	CO	DBT-2	
OC	+++	+++	14 dias
	+++	++	42 dias
Wnt	+++	+++	14 dias
	+++	++	42 dias
TRAP	+++	+++	14 dias
	++	+++	42 dias

++: marcação leve; +++: marcação moderada; ++++: marcação intensa. Período de avaliação: 14 e 42 dias após a exodontia do incisivo superior direito. FONTE: elaborado pelo autor.

4.2. Análise por Birrefringência

A matriz colágena foi avaliada comparativamente entre os grupos CO e DBT-2, aos 14 e 42 dias após a exodontia do incisivo superior de ratos através da birrefringência das fibras colágenas, coradas com Picrosirius Red e avaliadas sob luz polarizada. A análise das lâminas mostrou fibras colágenas birrefringentes nas tonalidades verde e vermelha, representando, respectivamente, uma matriz

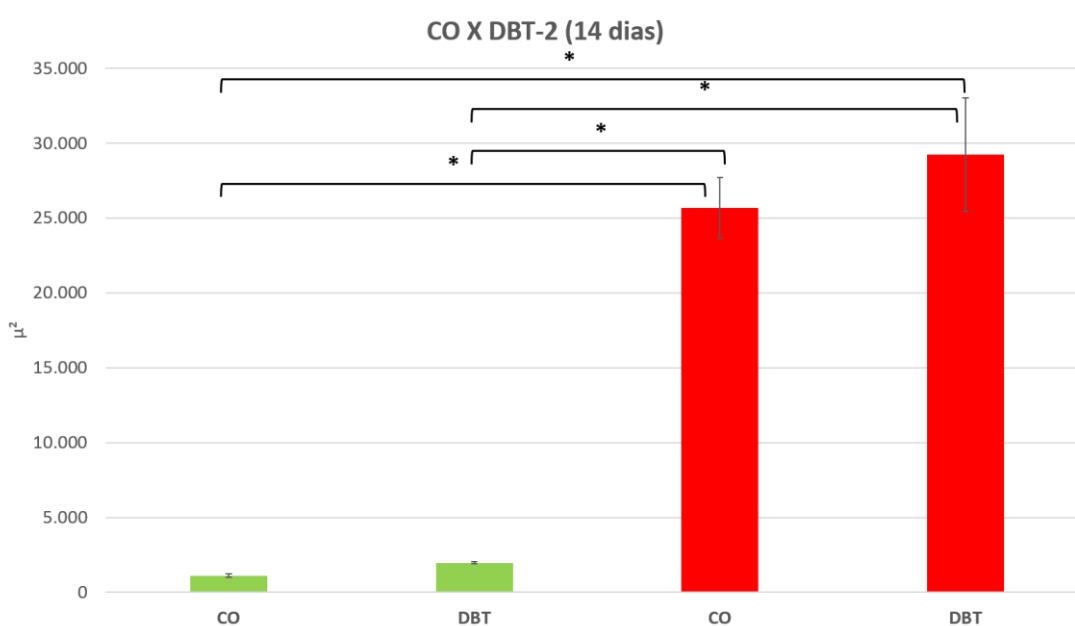
colágena menos organizada, mais imatura e uma matriz colágena mais organizada e mais madura.

Foi possível observar que tanto aos 14 como aos 42 dias, houve um aumento significativo na quantidade de fibras maduras preenchendo o alvéolo em reparação. No entanto, vale destacar que menores valores numéricos foram observados no grupo DBT-2 aos 42 dias quanto a presença da matriz colágena madura e mais organizada. **(Figura 3)**

Um aspecto importante a ser destacado é a pequena quantidade de matriz imatura tanto no grupo CO como no grupo DBT-2, mostrando que nos períodos avaliados, considerados tardios quanto a cronologia do processo de reparo alveolar, a matriz colágena já se encontra em fase de organização e com maior grau de maturidade. **(Figura 3)**

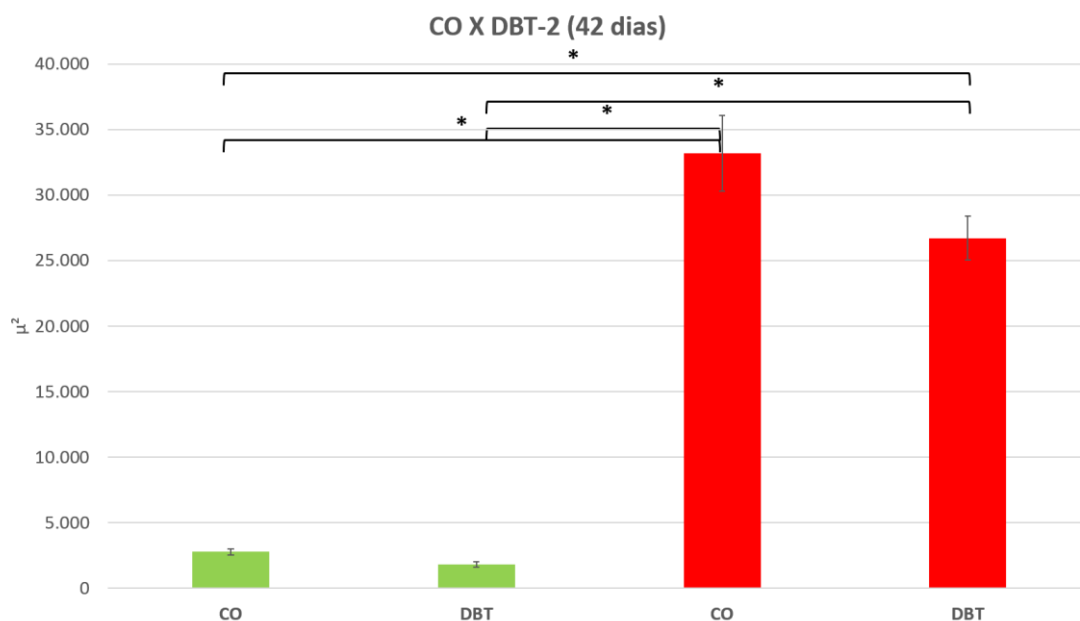
Os valores numéricos referentes a quantificação das fibras birrefringentes estão representados nos **Gráficos 1 e 2**, mostrando a comparação entre grupos CO e DBT-2 aos 14 e aos 42 dias.

Gráfico 1: Resultados obtidos na análise por birrefringência no período de 14 dias após a exodontia.



Área de colágeno imaturo (verde): CO (1.120 μm^2) X DBT-2 (1.981 μm^2); Área de colágeno maduro (vermelho): CO (25.625 μm^2) X DBT-2 (29.228 μm^2). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de estudo ($p > 0,05$). FONTE: elaborado pelo autor.

Gráfico 2: Resultados obtidos na análise por birrefringência no período de 42 dias após a exodontia.

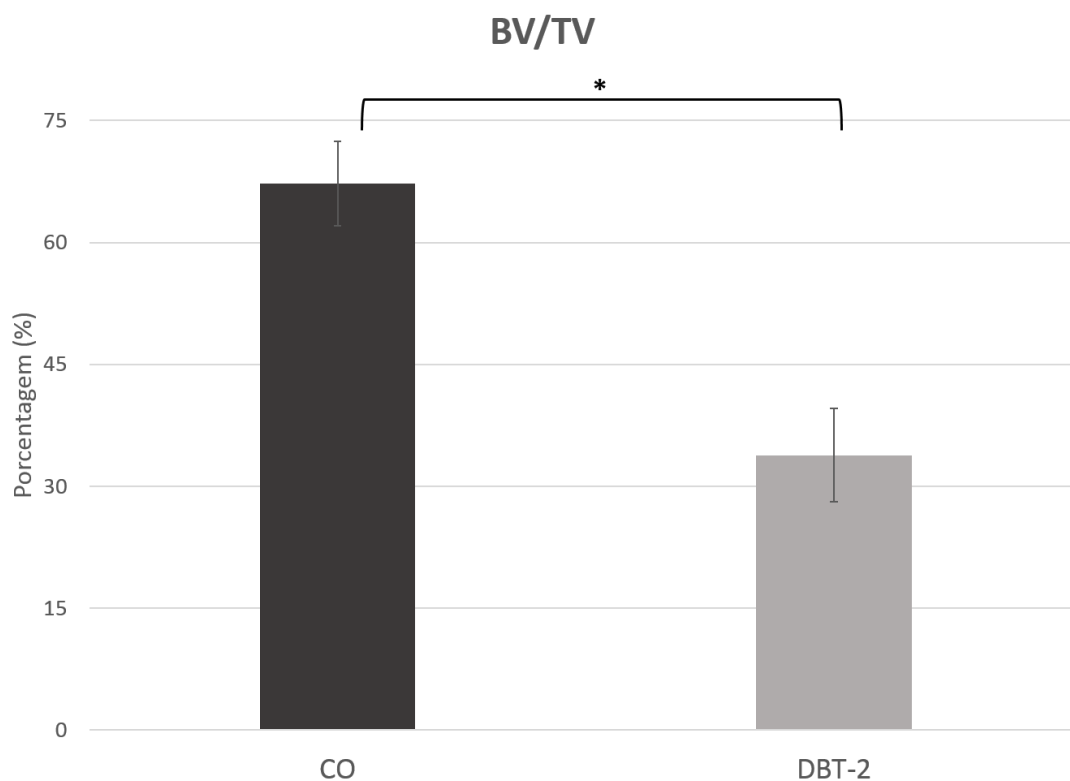


Área de colágeno imaturo (verde): CO (2.771 μm^2) X DBT-2 (1.795 μm^2); Área de colágeno maduro (vermelho): CO (33.197 μm^2) X DBT-2 (26.717 μm^2). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de estudo ($p > 0,05$). FONTE: elaborado pelo autor.

4.3. Análise Microtomográfica (Micro-Ct)

4.3.1. Porcentagem de volume ósseo (BV/TV)

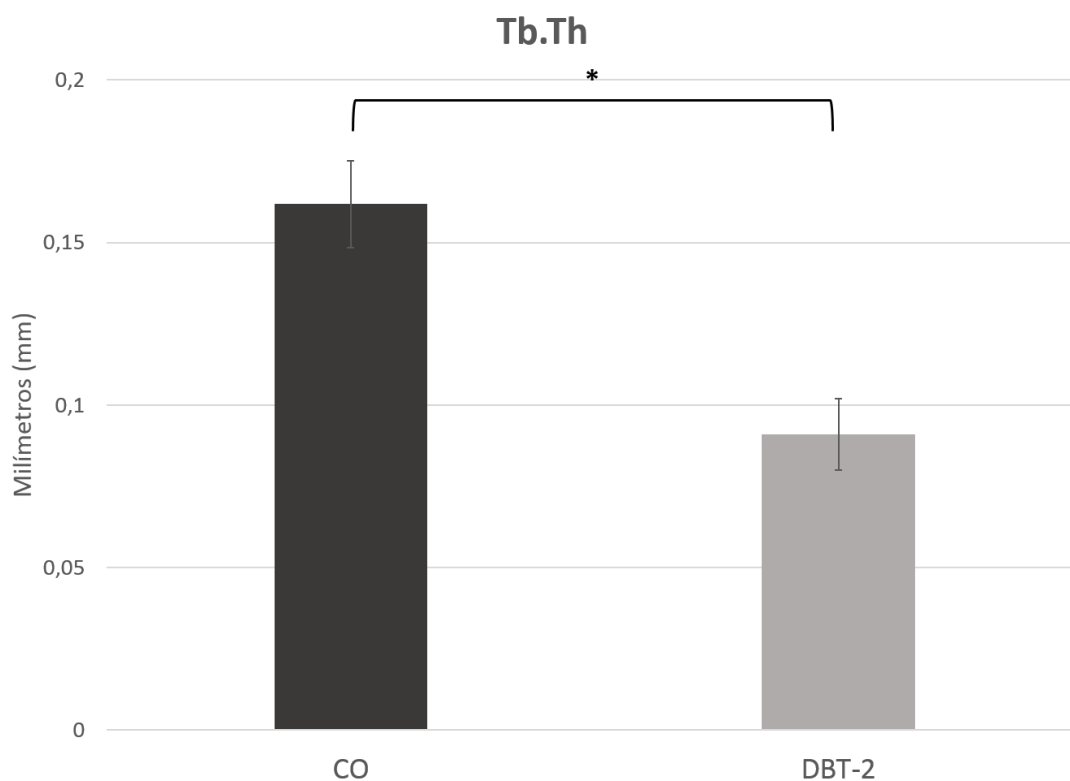
Para o parâmetro de porcentagem de volume ósseo, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, onde $p = 0,0001$. O grupo CO obteve o maior valor numérico de porcentagem de volume ósseo (BV/TV = 67,25%) quando comparado ao grupo DBT-2 (BV/TV = 33,84%). **(Gráfico 4)**

Gráfico 3: Parâmetro de BV/TV obtido pela Micro-CT.

Porcentagem de volume ósseo. Grupo CO (67,25%) X Grupo DBT-2 (33,84%), com diferença estatisticamente significativa (*) entre os grupos ($p < 0,05$). FONTE: elaborado pelo autor.

4.3.2. Espessura do trabeculado (Tb.Th)

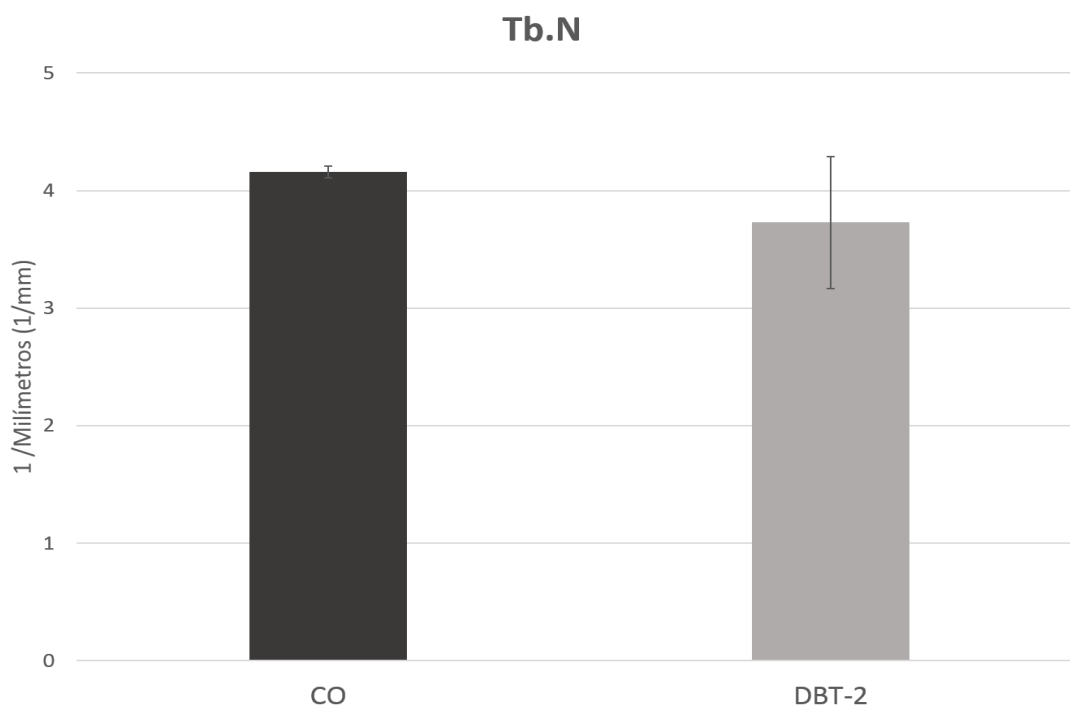
A espessura do trabeculado ósseo no alvéolo dos animais do grupo CO foi maior (Tb.Th = 0,1618 mm) quando comparado ao grupo DBT-2 (Tb.Th = 0,0909 mm), apresentando diferença estatisticamente significativa neste parâmetro, com $p = 0,0002$. **(Gráfico 4)**

Gráfico 4: Parâmetro de Tb.Th obtido pela Micro-CT.

Espessura do trabeculado. Grupo CO (0,1618 mm) X Grupo DBT-2 (0,0909 mm), com diferença estatisticamente significativa (*) entre os grupos ($p < 0,05$). FONTE: elaborado pelo autor.

4.3.3. Número de Trabéculas (Tb.N)

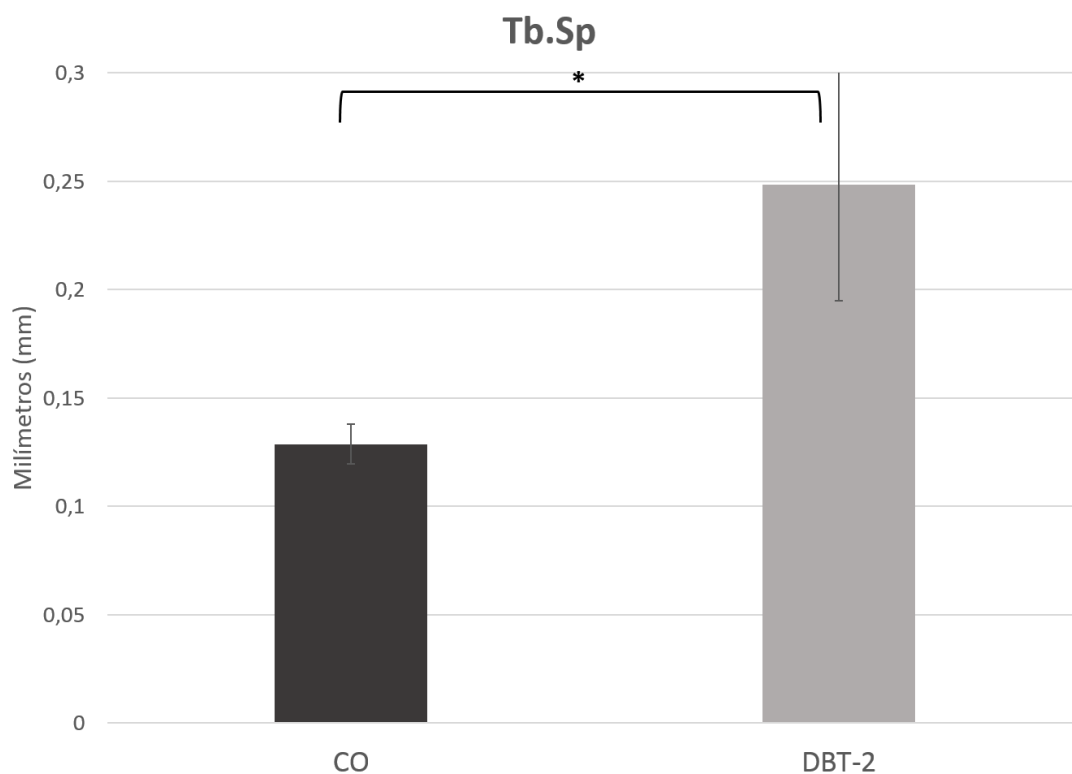
Não houve diferença estatisticamente significativa para este parâmetro ($p = 0,1771$). Os valores numéricos obtidos para os grupos foram semelhantes, contudo o grupo DBT-2 obteve um menor número de trabéculas quando comparado ao grupo CO. **(Gráfico 5)**

Gráfico 5: Parâmetro de Tb.N obtido pela Micro-CT.

Número de trabéculas. Grupo CO (4,158/mm) X Grupo DBT-2 (3,728/mm), sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$). FONTE: elaborado pelo autor.

4.3.4. Espaçamento entre as trabéculas (Tb.Sp)

Quanto ao espaço apresentado entre as trabéculas, o grupo DBT-2 apresentou um valor maior (0,2485 mm) quando comparado ao grupo CO (0,1288 mm), apresentando diferença estatisticamente significativa entre os valores ($p = 0,045$). **(Gráfico 6)**

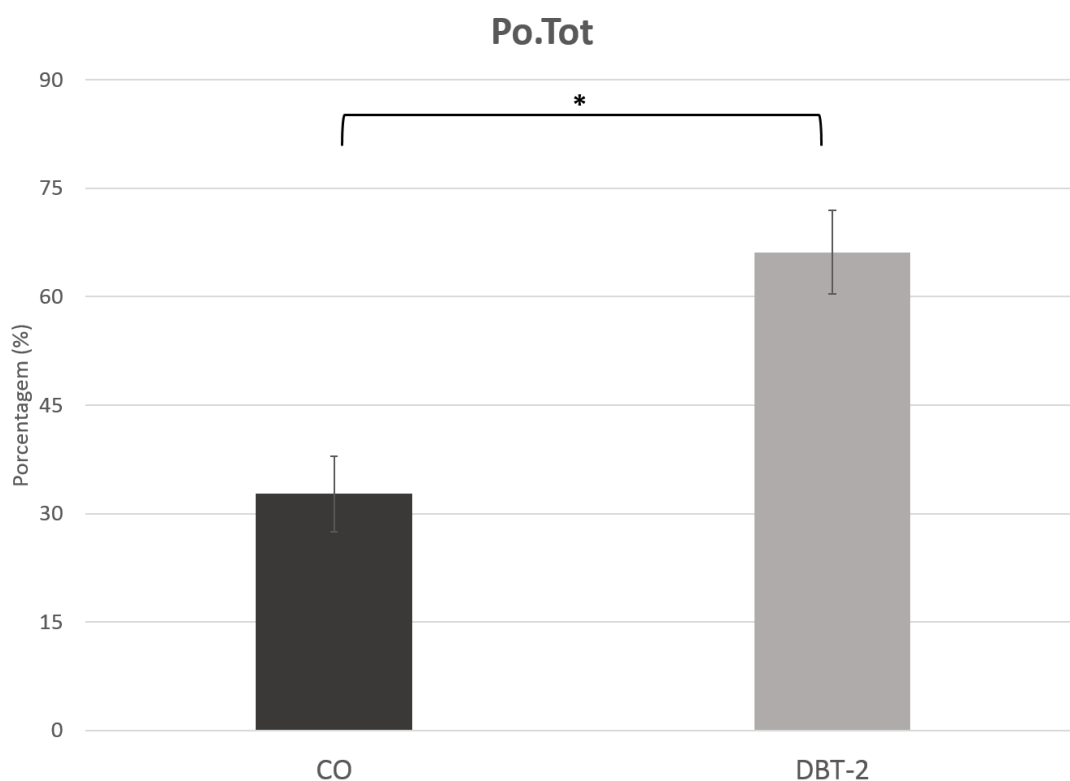
Gráfico 6: Parâmetro de Tb.Sp obtido pela Micro-CT.

Espaçamento entre as trabéculas. Grupo CO (0,1288 mm) X Grupo DBT-2 (0,2484 mm), com diferença estatisticamente significativa (*) entre os grupos ($p < 0,05$). FONTE: elaborado pelo autor.

4.3.5. Porosidade Total (Po.Tot)

Para o parâmetro de porosidade total, o grupo DBT-2 apresentou um osso de maior porosidade (66,16%) quando comparado ao grupo CO (32,75%). Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, com $p = 0,0001$. **(Gráfico 7)**

Gráfico 7: Parâmetro de Po.Tot obtido pela Micro-CT.

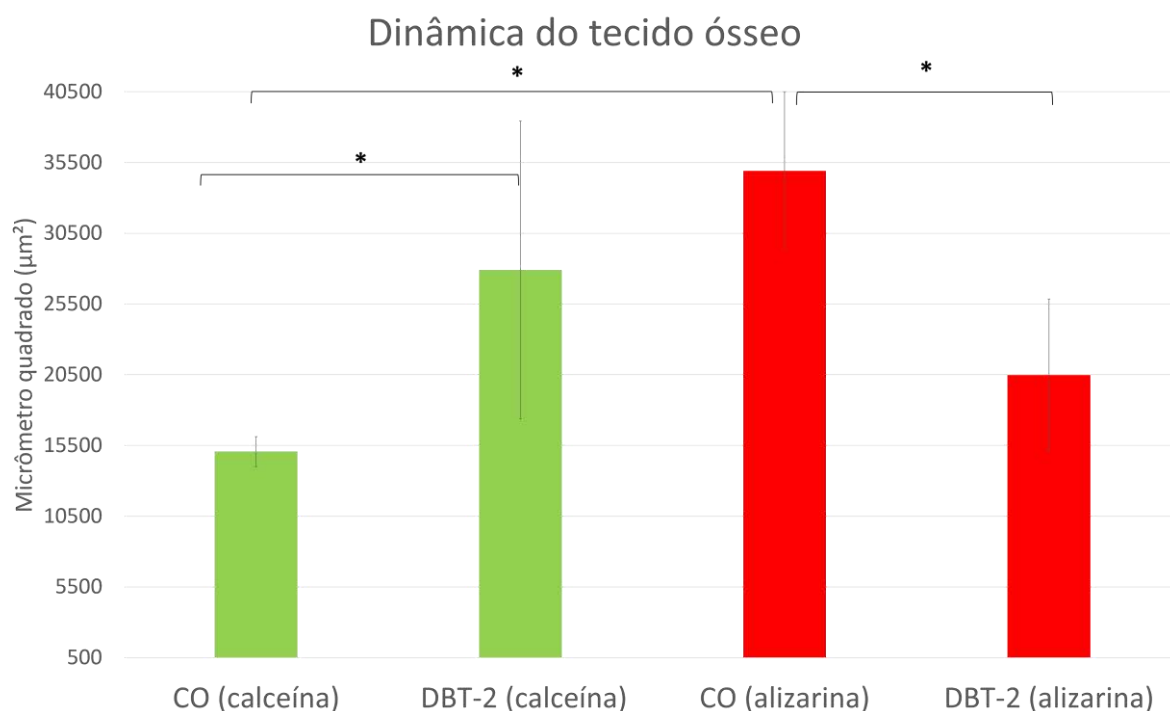


Porosidade total. Grupo CO (32,75 mm²) X Grupo DBT-2 (66,16 mm²), com diferença estatisticamente significativa (*) entre os grupos ($p < 0,05$). FONTE: elaborado pelo autor.

4.4. Análise por Microscopia Confocal

4.4.1. Dinâmica do tecido ósseo

Para a dinâmica do tecido ósseo, os resultados mostraram que houve diferença estatisticamente significativa quando compara-se a precipitação de: CO (calceína) X CO (alizarina), CO (calceína) X DBT-2 (calceína) e CO (alizarina) X DBT-2 (alizarina). $p < 0,05$. **(Gráfico 8)**

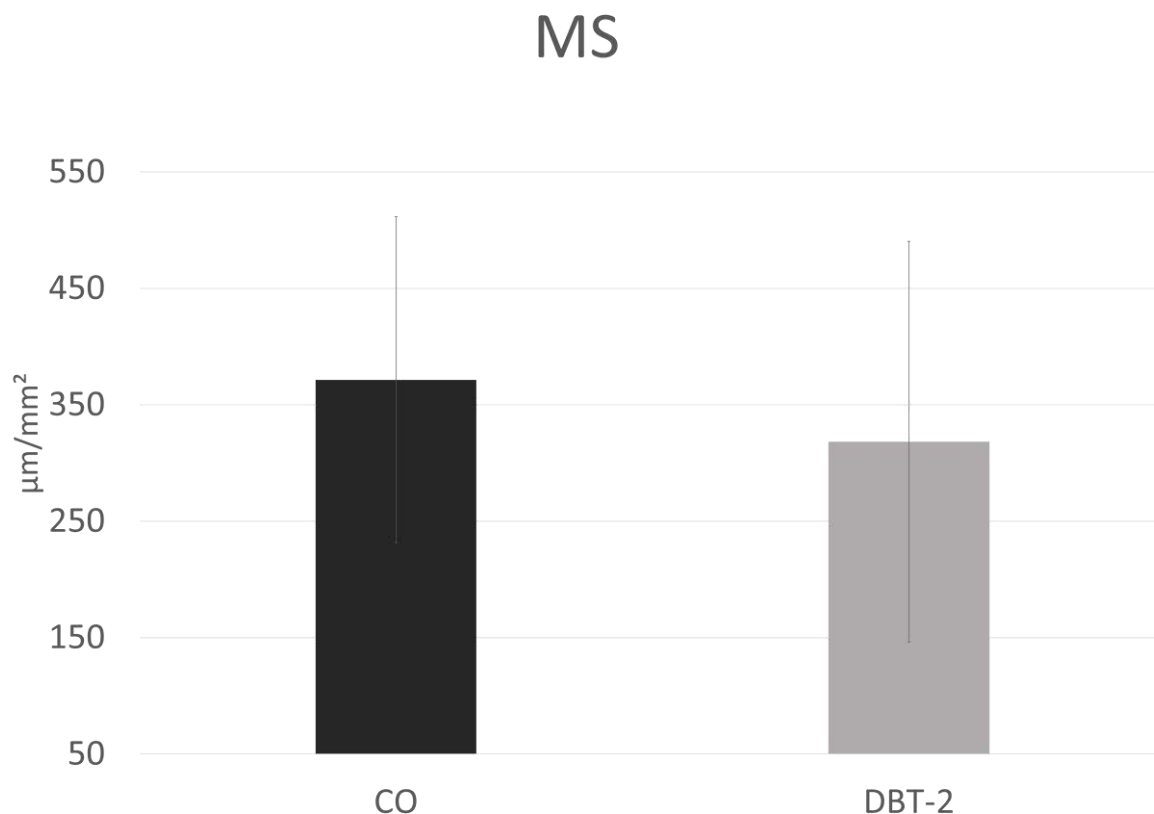
Gráfico 8: Microscopia confocal - Dinâmica do tecido ósseo.

Dinâmica do tecido ósseo. Grupo CO (calceína) (15069 µm²) X Grupo CO (alizarina) (27905 µm²), grupo CO (calceína) (15069 µm²) X DBT-2 (calceína) (34916 µm²) e grupo CO (alizarina) (27905 µm²) X DBT-2 (alizarina) (20478 µm²) com diferença estatisticamente significativa (*) entre os grupos (p < 0,05). FONTE: elaborado pelo autor.

4.4.2. Superfície de mineralização ativa (MS)

Não houve diferença estatisticamente significativa para o parâmetro de superfície mineralizada, com p = 0,5839.

Gráfico 9: Microscopia confocal – Superfície de mineralização ativa (MS)



Superfície de mineralização ativa. Grupo CO (371,4 μm/mm²) X Grupo DBT-2 (318,4 μm/mm²), sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p > 0,05). FONTE: elaborado pelo autor.

4.5. Índice Glicêmico

Ao decorrer da realização do trabalho, como dito, semanalmente a glicemia em jejum de todos os animais foi aferida e foi montada uma tabela com os valores obtidos no período inicial do estudo, ao final da dieta de cafeteria, após a aplicação da STZ, após a cirurgia de exodontia e no dia das respectivas eutanásias.

Com estes valores é possível observar, que inicialmente todos os animais tinham uma média similar de índice glicêmico, contudo após as 3 semanas de alimentação de cafeteria para o grupo diabético, já é possível observar um visível aumento da glicemia em jejum deste grupo quando comparado ao grupo CO. **(Tabela 5)**

Com a aplicação de STZ nos animais DBT-2, este aumento do valor do índice glicêmico do grupo fica ainda mais evidente quando comparado ao grupo CO, mantendo-se elevado até o momento da eutanásia. **(Tabela 4)**

Já o grupo CO mantém um padrão dos valores desde o período inicial até o momento da eutanásia. **(Tabela 4)**

Tabela 4: Índice glicêmico dos animais dos grupos CO e DBT-2.

TABELA DE ÍNDICE GLICÊMICO (média por grupo)						
	PERÍODOS	INÍCIO DA DIETA	FINAL DA DIETA (DBT-2)	APÓS APLICAÇÃO DA STZ	APÓS EXODONTIA	EUTANÁSIA
CO	3 DIAS	77 mg/dL	73 mg/dL	100 mg/dL	89 mg/dL	91 mg/dL
	7 DIAS	80 mg/dL	74 mg/dL	97 mg/dL	90 mg/dL	86 mg/dL
	14 DIAS	77 mg/dL	72 mg/dL	120 mg/dL	86 mg/dL	80 mg/dL
	42 DIAS	78 mg/dL	76 mg/dL	89 mg/dL	84 mg/dL	92 mg/dL
DBT-2	3 DIAS	75 mg/dL	110 mg/dL	302 mg/dL	315 mg/dL	385 mg/dL
	7 DIAS	76 mg/dL	135 mg/dL	200 mg/dL	198 mg/dL	323 mg/dL
	14 DIAS	76 mg/dL	123 mg/dL	259 mg/dL	280 mg/dL	277 mg/dL
	42 DIAS	78 mg/dL	108 mg/dL	290 mg/dL	315 mg/dL	455 mg/dL

Médias de valores de índice glicêmico obtidos nos grupos experimentais. Período de avaliação: 3, 7, 14 e 42 dias após a exodontia do incisivo superior direito. FONTE: elaborado pelo autor.

Discussão

5. DISCUSSÃO

A cavidade bucal frente ao diabetes tipo II sofre transtornos como doença periodontal, perda óssea, perda de dentes, xerostomia e outros tipos de infecções diante da enfermidade, gerando sinais e sintomas que promoverão atraso na proliferação celular [3,4] e no metabolismo do colágeno [5,6].

Além disso, o diabetes tipo 2 provoca alterações no metabolismo ósseo que causam diminuição da qualidade óssea, aumento do risco de fratura e cura retardada das mesmas [22]. Os mecanismos celulares e moleculares subjacentes não são totalmente compreendidos e as terapias eficientes são limitadas [23].

O processo inflamatório é importante no período inicial do reparo alveolar, porém de forma leve e com tendência a diminuição de sua atividade com o passar dos dias, como em outros tipos de reparo no organismo [1,2]. As proteínas IL-6, TNF α e TGF β tem um papel importante nesta fase inicial do processo de reparo ósseo alveolar, comandando as respostas inflamatórias do organismo [3,24].

A expressão das proteínas inflamatórias (IL-6, TNF α e TGF β) se apresentaram de forma aumentada no grupo DBT-2 quando comparado ao grupo CO, mostrando uma tentativa do organismo em estimular uma resposta imune, a qual pode ser comprovada com o número maior de proteínas inflamatórias presentes no alvéolo dos animais diabéticos nos períodos de 3 e 7 dias pós exodontia. Além disso, há um aumento da proteína TGF β nos ratos diabéticos, quando comparado aos ratos do grupo CO, mostrando maior inflamação presente durante o reparo alveolar quando há presença desta síndrome metabólica.

Na fase mais tardia do processo de mineralização, onde já existe formação de tecido ósseo, as proteínas responsáveis por este evento devem se apresentar em equilíbrio, tanto no processo de formação quanto no processo de reabsorção óssea. As proteínas Wnt e OC são importantes na fase de mineralização óssea, sendo responsáveis respectivamente pelo início do processo de mineralização e pela sua fase mais tardia. Enquanto a imunomarcagem da proteína TRAP mostra a resposta de reabsorção óssea exercida pelos osteoclastos presentes na matriz.

No processo de mineralização (Wnt e OC) e reabsorção óssea (TRAP), o grupo CO manteve uma imunomarcagem moderada nos períodos de 14 e 42 dias

para OC e Wnt e uma diminuição no processo de reabsorção óssea caracterizada pela imunomarcção da proteína TRAP. Em contrapartida, o grupo DBT-2 teve uma diminuição na expressão das proteínas responsáveis pelo processo de mineralização aos 42 dias e manteve o mesmo padrão para a imunomarcção de TRAP.

Com isso, pode-se observar um atraso no processo de reparo alveolar no grupo DBT-2 quando comparado ao grupo CO, caracterizado pela diminuição da imunomarcção de OC e Wnt do primeiro grupo e também pela diminuição da reabsorção mostrada pela imunomarcção da proteína TRAP no grupo CO aos 42 dias.

No diabetes tipo 1, existem alterações importantes no metabolismo ósseo, desde diminuição de volume ósseo até ao aumento da atividade reabsortiva [25]. Ao observar os dados de porcentagem de volume ósseo (BV/TV) e porosidade total (Po.Tot) deste trabalho, é visível que os valores do grupo DBT-2 são muito inferiores, caracterizando um tecido ósseo de menor quantidade e qualidade quando comparado ao grupo CO. Além disso, os parâmetros de trabeculado ósseo mostraram que o espaçamento entre as trabéculas do grupo DBT-2 é maior, e que a espessura de suas trabéculas são menores que dos animais CO, mesmo com um número de trabéculas semelhantes entre os dois grupos.

Em estudos mais antigos [26, 27], foi comprovada a importância das fibras colágenas no processo de reparo alveolar, principalmente as do tipo I e II. Além disso, as fibras colágenas têm grande importância em servirem de arcabouço para deposição de matriz mineral.

Assim, na análise por birrefringência, foi possível observar que tanto aos 14 como aos 42 dias, houve um aumento significativo na quantidade de fibras maduras preenchendo o alvéolo em reparação. No entanto, vale destacar que menores valores numéricos foram observados no grupo diabéticos aos 42 dias quanto a presença da matriz colágena madura e mais organizada. Este fato pode ser comprovado com os resultados encontrados na análise imunoistoquímica, onde o grupo DBT-2 apresentou um processo de reparo mais atrasado quando comparado ao grupo CO devido a expressão das proteínas responsáveis pelo processo de mineralização (Wnt e OC).

As características do processo de remodelação óssea são de extrema importância para que haja um osso de qualidade e quantidade satisfatórias. Com a análise de microscopia confocal, a caracterização do processo de dinâmica óssea mostrou que o grupo diabético apresentou uma maior quantidade de osso antigo devido à maior precipitação do fluorocromo calceína. Em contrapartida, o grupo CO, mostra um turnover ósseo adequado, com uma maior precipitação de alizarina.

Assim, nota-se que o diabetes tipo 2 influencia negativamente na dinâmica óssea, com uma maior quantidade de tecido ósseo antigo. A imunomarcagem das proteínas Wnt e OC em menor quantidade significam menor deposição de matriz mineral e, em conjunto com a atividade osteoclástica que se sobressai, caracterizam a menor quantidade de superfície óssea mineralizada mesmo sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Em conjunto, as análises imunoistoquímica, por birrefringência, de microtomografia computadorizada e por microscopia confocal mostram que há uma diferença evidente na qualidade e quantidade de tecido ósseo formado no alvéolo e também nos períodos de remodelação óssea e maturação das fibras colágenas entre os dois grupos. Além disso, é possível entender que o diabetes tipo 2, assim como o tipo 1 da doença, influencia negativamente nas características estruturais e celulares do tecido ósseo alveolar em reparo, e também no processo de maturação do colágeno e turnover ósseo quando comparado aos animais sem a doença metabólica

Assim, as análises mostraram que os animais com diabetes tipo 2 tem um processo de reparo alveolar prejudicado, apresentando quantidade e qualidade óssea alveolar inferiores ao dos animais do grupo CO.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Assim, pode-se concluir que o diabetes tipo 2 influencia negativamente nas características estruturais e celulares do tecido ósseo alveolar em reparo, e também no processo de maturação do colágeno quando comparado aos animais sem a doença metabólica. E, além disso, os animais com diabetes tipo 2 tem um processo de reparo alveolar prejudicado, apresentando quantidade e qualidade óssea alveolar inferiores ao dos animais do grupo CO.

Referências

REFERÊNCIAS

- 1) Carvalho ACP, Okamoto T. **Cirurgia bucal: fundamentos experimentais aplicados à clínica**. São Paulo: Panamericana, 1987, 139p.
- 2) Okamoto T, Russo MC. **Wound healing following tooth extraction: histochemical study in rats**. *Rev FacOdontolAraçatuba*; v2, p.153-169, 1973.
- 3) Fahey TJ, Sadaty A, Jones WG, Barber A, Smoller B, Shires GT. **Diabetes impairs the inflammatory response to wound healing**. *J Surg Res* 1991;50(4):308-13.
- 4) Cutler CW, Eke P, Arnold RR, Van Dyke TE. **Defective neutrophil function in an insulin-dependent diabetes mellitus patient: a case report**. *J Periodontol* 1991;62:394-401.
- 5) Schneir M, Bowersox J, Ramamurthy N, Yavelow J, Murray J, Edlin-Folz E, Golub L. **Response of rat connective tissues to streptozotocin-diabetes: tissue specific effects on collagen metabolism**. *Biochim Biophys Acta* 1979;583(1):95-102.
- 6) Schneir M, Ramamurthy N, Golub L. **Skin collagen metabolism in the streptozotocin induced diabetic rat: enhanced catabolism of collagen formed both before and during the diabetic state**. *Diabetes* 1982;31(5):426-31.
- 7) **World Health Organization. Diabetes Mellitus**. Fact Sheet, no. 138, April 2002. Available at: <http://www.who.int/anf/fs/en/fort138.html>. Accessed December 08, 2016
- 8) Correia-Santos AM et al. **Induction of Type 2 Diabetes by low dose of streptozotocin and high-fat diet-fed in wistar rats**. *Medicina (Ribeirão Preto)* 2012;45(4): 436-44.
- 9) Gomez-Smith M et al. **A physiological characterization of the Cafeteria diet model of metabolic syndrome in the rat** *Physiology & Behavior* 167 (2016) 382–391
- 10) Oates TW, Huynh-Ba G, Vargas A, Alexander P, Feine J. **A Critical Review of Diabetes, Glycemic Control and Dental Implant Therapy**. *Clin. Oral Impl. Res.* 24, 2013, 117–127.

- 11) Mariano R C et al. **Bone healing in critical size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometrical study in the calvaria of diabetics rats.** *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol End* 109 (2010): 72-78.
- 12) Zanelabedien S et al., **Histological and gene expression. analysis of the effects of pulsed low-laser therapy on wound healing of streptozotocin – induced diabetics rats.** *Lasers Med. Sci.*29 (2014): 1227-1235.
- 13) Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, Ramarao P. **Combination of high-fat diet and low-dose of streptozotocin- treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening.** *Pharmacol Res.* 2005; 52: 313-20.
- 14) Carillon J et al. **Cafeteria diet induces obesity and insulin resistance associated with oxidative stress but not with inflammation: improvement by dietary supplementation with a melon superoxide dismutase** *Free Radical Biology and Medicine* 65 (2013) 254–261.
- 15) Wang Y et al. **The development of diabetes mellitus in wistar rats kept on a high-fat/low-carbohydrate diet for long periods.** *Endocrine.* 2003; 22: 85-92.
- 16) Ramalho-Ferreira, G.; Faverani, L.P.; Grossi-Oliveira, G.A.; Okamoto,T.; Okamoto, R. **Alveolar bone dynamics in osteoporotic rats treated with raloxifene or alendronate: confocal microscopy analysis.** *Journal of Biomedical Optics*, v20, n3, p.038003-1 – 038003-7, 2015.
- 17) Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Momesso GA, Luvizuto ER, Oliveira Puttini I, Okamoto R. **Effect of antiresorptive drugs in the alveolar bone healing. A histometric and immunohistochemical study in ovariectomized rats.** *Clin Oral Investig.* 2017; 21(5):1485-94.
- 18) Pedrosa Jr WF et al. **Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay bone grafts remodeling. Part II: calvarial bone.** *Clin Oral Impl Res* 2009; 20:1254–1264.
- 19) Manrique N et al. **Hypertension modifies OPG, RANK, and RANKL expression during the dental socket bone healing process in spontaneously hypertensive rats.** *Clin Oral Investig* 2015; 19:1319-1327.

- 20) Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. **Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography.** J Bone Miner Res. 2010 Jul;25(7):1468-86. doi: 10.1002/jbmr.141.
- 21) Dempster DW et al. **Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee.** J Bone Miner Res. 2013;28(1):2-17.
- 22) Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ. **The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus: present and future perspectives.** Nat Rev Endocrinol. 2011 Nov 8;8(4):228-36. doi: 10.1038/nrendo.2011.183.
- 23) Picke AK, Gordaliza Alaguero I, Campbell GM, Glüer CC, Salbach-Hirsch J, Rauner M, Hofbauer LC, Hofbauer C. **Bone defect regeneration and cortical bone parameters of type 2 diabetic rats are improved by insulin therapy.** Bone. 2016 Jan;82:108-15. doi: 10.1016/j.bone.2015.06.001.
- 24) Wasan Hamdi Younisa, Natheer H. Al-Rawib, Mohamed Abdul-Hameed Mohameda, Nahi Yousif Yaseenc. **Molecular events on tooth socket healing in diabetic rabbits.** British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 51 (2013) 932–936
- 25) Najarro JA et al. **Effect of diabetes mellitus and insulin therapy on bone density around osseointegrated dental implants: a digital subtraction radiography study in rats.** Clin. Oral Impl. Res. 20, 2009 / 796–801.
- 26) Kurita K, Hashimoto Y, Takei T, Kawai T, Hayakawa T. **Changes in collagen types during the healing of rabbit tooth extraction wounds.** J Dent Res. 1985 Jan;64(1):28-32. PubMed PMID: 3855416.
- 27) Devlin H, Hoyland J, Newall JF, Ayad S. **Trabecular bone formation in the healing of the rodent molar tooth extraction socket.** J Bone Miner Res. 1997 Dec;12(12):2061-7. PubMed PMID: 9421238.

Anexos

ANEXOS

ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"	
CAMPUS ARAÇATUBA FACULDADE DE ODONTOLOGIA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA		
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals		
CERTIFICADO		
<p> Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado “Avaliação do processo de reparo alveolar em ratos portadores de diabetes tipo 2, induzido por dieta hiperlipídica e baixa dose de estreptozotocina. Análise morfométrica, imunoistoquímica e por microscopia de birrefringência”, Processo FOA nº 00385-2017, sob responsabilidade de Roberta Okamoto apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 19 de Abril de 2017. </p>		
VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 02 de Maio de 2019. DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 02 de Junho de 2019.		
CERTIFICATE		
<p> We certify that the study entitled “Alveolar repair process evaluation in rats with type 2 diabetes, induced by high-fat diet and low dose of Streptozotocin. Morphometric, immunohistochemistry and birefringence microscopy analysis”, Protocol FOA nº 00385-2017, under the supervision of Roberta Okamoto presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on April 19, 2017. </p>		
VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: May 02, 2019. DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: June 02, 2019.		
 Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani Coordenador da CEUA CEUA Coordinator		
<hr/> CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais Faculdade de Odontologia de Araçatuba Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br		