

Augusto César Rodrigues de Souza

**Avaliação da formação óssea em implantes
dentários de ratos não diabéticos, diabéticos não
controlados e controlados com insulina**

*Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em “Bases Gerais
da Cirurgia” da Faculdade de Medicina
de Botucatu, Unesp, para obtenção do
título de Mestre.*

Orientadora: Prof^ª. Dra. Erika Veruska Paiva Ortolan

Co-Orientador: Prof. Dr. Carlos dos Reis Pereira de Araújo

**FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

-2011-

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Souza, Augusto César Rodrigues de.

Avaliação da formação óssea em implantes dentários de ratos não diabéticos,
diabéticos não controlados e controlados com insulina. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual
Paulista, 2011

Orientador: Erika Veruska Paiva Ortolan

Co-orientador: Carlos dos Reis Pereira de Araújo

Capes: 40102149

1. Diabetes. 2. Implantes dentários. 3. Insulina. 4. Cirurgia Experimental.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus ; Implantes dentários; Insulina; Osseointegração.

*“Todo grande progresso da ciência
resultou de uma nova audácia da imaginação.”*

(John Dewey)

Dedico esta dissertação à minha família.

HOMENAGEM

À Professora Dra. Erika Veruska Paiva Ortolan por ter me acolhido nesta faculdade, ter confiado em meu trabalho e pelo prazer em tê-la como orientadora.

À Professora Dra. Maria Angélica Rheder de Araújo, minha amiga e conciliadora, por confiar em mim e por transmitir de forma ímpar sua seriedade e responsabilidade, no trabalho e na vida, mostrando e apoiando o longo caminho da vida profissional.

Ao Professor Dr. Carlos dos Reis Pereira de Araújo, pelo apoio constante em todos os meus projetos, encorajando-me nas diversas oportunidades da vida, e demonstrando que tudo realizado através de disciplina atinge invariavelmente o sucesso.

A dedicação e o amor com que esses professores conduzem os seus projetos, nos mais variados campos, me faz ter muito orgulho de pertencer à seus grupos de pesquisa.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, pela minha vida;

À minha mãe, Maria Cristina, por ter orientado minha vida com total responsabilidade, não medindo esforços para que meus planos se concretizassem, e principalmente, por ser sempre de forma brilhante “MÃE e PAI”;

À minha irmã, Letícia, pelo amor demonstrado em seus atos e pelos conselhos através de sábias palavras que sempre estarão em minha memória;

Aos meus avós, Paulo e Maria de Lourdes, pela demonstração de equilíbrio e cautela necessários para percorrer os caminhos desejados;

À minha namorada, Beatriz, pela forma com que apóia minhas decisões, e principalmente por tornar minha vida mais feliz e completa;

Ao Leandro, por transmitir a mim seu carinho de forma ingênua e sincera;

Aos meus tios, José Roberto e Márcia, pelo apoio cedido em todos os momentos dessa trajetória, facilitando de inúmeras maneiras o alcance de meus objetivos;

Aos meus primos, Gustavo e Guilherme, companheiros indispensáveis em minha vida, pela amizade verdadeira;

Ao meu tio Antônio Carlos, pelo exemplo de determinação demonstrado em toda sua vida;

Aos demais familiares, que de diversas formas apóiam meu crescimento profissional e pessoal;

Ao Prof. Dr. César Tadeu Spadella por ter me introduzido nesta linha de pesquisa;

À Profª. Drª. Maria Aparecida Custodio Domingues pela orientação na análise dos estudos histopatológicos, pela dedicação que apresenta em sua forma de ensinar; e pela disponibilização de seu tempo ao meu trabalho;

Às professoras Profª. Dra. Lídia Raquel de Carvalho e Miriam Harumi Tsunemi, pela eficiência na análise estatística dos resultados;

À aluna da graduação Miriam, bolsista CNPQ de iniciação científica desse projeto, pela dedicação e disponibilidade, tornando possível a conclusão desta pesquisa;

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, em especial Sra. Regina Celia Spadin pela amizade e paciência nas orientações dadas para a realização desta dissertação;

Aos funcionários da Pós-Graduação da Cirurgia, em especial à Sra. Simone Barroso Corvino Camargo, pela atenção prestada durante toda esta caminhada e ao Douglas de Jesus pela formatação desta dissertação

Ao funcionário e colega Luis Carlos E. Bardella, pela contribuição no cumprimento rigoroso do cronograma experimental, organização de protocolos e execução da coleta dos materiais para dosagens realizadas neste trabalho;

Aos funcionários do Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu, em particular à Cecília, Danilo Chaguri e Arlindo, pelo relevante serviço no seguimento dos animais;

Aos funcionários Lígia Barbosa Costa, Claudete dos Santos Tardivo, Tiago dos Santos Tardivo, Hugo Leonardo Fermino do Carmo, pelo auxílio na realização dos estudos na microscopia eletrônica de varredura;

Ao funcionário Paulo Roberto Cardoso pelo auxílio na preparação e confecção das lâminas para estudo de microscopia óptica;

À Maria Salete Sartori e Maria Luísa dos Santos, pela realização das dosagens bioquímicas deste estudo;

Às bibliotecárias Rosemeire Aparecida Vicente pela elaboração da ficha catalográfica e Rosemary Cristina da Silva pela adequação das referências bibliográficas;

Aos professores e colegas Renato, César, Fábio e Rickson, pelo apoio nos momentos de incerteza e pelos conselhos bem ditos;

Aos meus colegas de trabalho, em especial Ana Cláudia, Adriana, Agner, Roberta e Emilene, pelos momentos de prontidão, ajudando e dando suporte a vida clínica, tornando assim, possível a realização deste estudo;

Aos meus colegas do mestrado, em especial Érica, Thaianne, Tatiana, Tatiani, Juliana, Amanda, Lucas, Monique e Damiano, pela amizade e pelos momentos compartilhados que ficarão guardados no coração;

À Neodent, por ter possibilitado a fabricação dos implantes utilizados na pesquisa;

Aos meus pacientes, maiores motivos de minha dedicação aos estudos;

Às pessoas não citadas explicitamente, cujo carinho e afeto jamais me faltaram, o meu sincero pedido de desculpas e a certeza de que a omissão se restringe apenas a estas páginas.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| INTRODUÇÃO | 09 |
| 1. Histórico do diabetes | 09 |
| 2. Diabetes no contexto atual | 09 |
| 3. Diabetes na Odontologia | 10 |
| OBJETIVOS | 15 |
| MATERIAL E MÉTODO | 16 |
| 1. Animais utilizados e grupos experimentais | 16 |
| 2. Parâmetros analisados | 16 |
| 2.1 Parâmetros relacionados ao diabetes..... | 16 |
| 2.2 Parâmetros relacionados à osseointegração..... | 16 |
| 3. Delineamento experimental | 17 |
| 3.1 Adaptação, indução do diabetes e sorteio dos grupos..... | 17 |
| 3.2 Período de diabetes e seleção dos procedimentos cirúrgicos..... | 18 |
| 3.3 Momentos de avaliação e sacrifício..... | 18 |
| 3.4 Administração de insulina..... | 19 |
| 3.5 Implantes..... | 19 |
| 4. Técnicas Utilizadas | 21 |
| 4.1 Anestesia..... | 21 |
| 4.2 Indução do diabetes experimental..... | 21 |
| 4.3 Pré-operatório..... | 21 |
| 4.4 Cirurgia..... | 22 |
| 4.5 Pós-operatório..... | 24 |
| 4.6 Sacrifício e remoção das peças para estudo..... | 24 |
| 5. Metodologia empregada na coleta de dados metabólicos | 25 |
| 5.1 Dosagens dos dados metabólicos..... | 25 |
| 6. Estudo histopatológico à microscopia óptica | 26 |
| 6.1 Preparo das amostras..... | 26 |
| 6.2 Análise histopatológica..... | 27 |
| 7. Análise ultraestrutural à microscopia eletrônica de varredura | 29 |
| 8. Análise estatística | 30 |
| 8.1 Tamanho amostral..... | 30 |
| 8.2 Análise dos resultados..... | 30 |

| | |
|--|-----------|
| RESULTADOS..... | 31 |
| 1. Método de indução do diabetes..... | 31 |
| 2. Evolução clínica..... | 31 |
| 3. Exames laboratoriais..... | 35 |
| 4. Análise histopatológica à microscopia óptica..... | 39 |
| 4.1 Formação osteóide..... | 39 |
| 4.2 Presença de osteoblastos..... | 42 |
| 4.3 Presença de osteócitos..... | 45 |
| 4.4 Presença de vasos sanguíneos..... | 48 |
| 4.5 Presença de osteoclastos..... | 51 |
| 4.6 Presença de necrose..... | 55 |
| 4.7 Presença de fibroblastos..... | 55 |
| 5. Análise ultraestrutural à microscopia eletrônica de varredura..... | 56 |
| DISCUSSÃO..... | 61 |
| 1. Quanto aos animais utilizados..... | 61 |
| 2. Quanto ao tempo de diabetes e observação dos animais..... | 61 |
| 3. Quanto às técnicas utilizadas..... | 61 |
| 3.1 Anestesia..... | 61 |
| 3.2 Indução do diabetes experimental..... | 62 |
| 4. Quanto à evolução clínica..... | 64 |
| 5. Quanto aos exames laboratoriais..... | 65 |
| 6. Quanto ao local escolhido para colocar os implantes..... | 66 |
| 7. Quanto à análise à microscopia óptica..... | 67 |
| 8. Quanto à análise ultraestrutural das fibras de colágeno..... | 70 |
| CONCLUSÕES..... | 72 |
| RESUMO..... | 73 |
| SUMMARY..... | 75 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 77 |

INTRODUÇÃO

1. Histórico do diabetes

Os primeiros relatos do diabetes datam da era egípcia. Cerca de 2000 mil anos depois, por volta de 70 d.C, o médico Areteus da Capadócia, na Grécia, descreveu o diabetes, que levava a quatro complicações: fome (polifagia), sede (polidipsia), urina em excesso (poliúria) e fraqueza (poliastenia), além do fato das pessoas entrarem em coma antes da morte, e mesmo com a fartura de alimentos, a falta de energia corporal permanecia. O médico inglês Thomas Willis, em 1670 detectou que indivíduos com os mesmos sintomas apresentavam urina "muitíssimo doce, cheia de açúcar". No ano de 1815, Dr. M. Chevreul, demonstrou que o açúcar dos diabéticos era glicose, passando a chamar a doença de "diabetes açucarada" ou "Diabetes Mellitus". A palavra "mellitus" é latina e quer dizer "mel ou adocicado". Em 1889, os alemães, Von Mering e Minkowski, descobriram que o pâncreas produz uma substância, ou hormônio, capaz de controlar o açúcar no sangue e evitar os sintomas do diabetes. Em 1921, Frederick Banting e seu colaborador Charles Best, utilizando cães, isolaram uma substância capaz de eliminar os sintomas do diabetes. O extrato foi batizado de insulina (vindo do latim *insula*, que significa "ilha"). Àquela época, o uso da insulina, mesmo em uma forma impura, significava a diferença entre a vida e a morte. O objetivo era proteger o paciente da descompensação aguda do diabetes e da cetoacidose. Posteriormente atenção foi direcionada para as complicações tardias. Em 1966, Obermeier e Geiger, conseguiram provar que era tecnicamente possível transformar insulina suína em humana. Surgiu, então, a fabricação da insulina em escala industrial (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2010).

2. Diabetes no contexto atual

A busca pela melhor qualidade de vida é foco de estudos no atual contexto mundial. Sendo assim, a importância de se prevenir e tratar doenças sistêmicas com grande prevalência torna-se objetivo comum de profissionais da área da saúde. Pesquisas são realizadas em todo planeta para que soluções de doenças possam ser descobertas, assim como métodos de tratamento.

O diabetes mellitus é considerado hoje, um problema de saúde pública mundial, tanto em termos do número de pessoas afetadas, como também em relação aos custos envolvidos no controle e tratamento de suas complicações.

Projeções de 2007, do IBGE, indicaram uma prevalência de diabetes no país de 5,9% da população, o que equivaleria hoje a 11 milhões de pessoas e dessas, 50% desconhecem a sua condição, e serão diagnosticadas durante algum procedimento cirúrgico ou em virtude do aparecimento de uma de suas complicações crônicas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2010). Estudo epidemiológico realizado em 191 países membros da Organização Mundial de Saúde projetou uma prevalência global para 2030 de 4,4% da população mundial, ou seja, 366 milhões de pacientes diabéticos (WILD et al., 2004)

Em que pese os avanços conseguidos no controle da doença, infelizmente o diabetes ainda é uma das principais causas de incapacitação física para o trabalho, tornando o seu portador vinte e cinco vezes mais propenso à cegueira, dezessete vezes mais susceptível à nefropatia, com chances cinco vezes maiores de amputação de membros e risco duas vezes maior de doença cardiovascular (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2004). A doença periodontal é considerada a sexta principal complicação do diabetes (NERY, 2008).

3. Diabetes na Odontologia

Conhecer o paciente como um todo é imprescindível para a realização adequada do tratamento odontológico. É um consenso geral que pacientes diabéticos mal controlados não devem receber tratamento dentário até que o controle metabólico seja estabelecido, permitindo ao paciente diabético tratamento semelhante ao de um paciente não diabético. A hiperglicemia associada ou não a oscilações dos níveis glicêmicos pode predispor o paciente à infecção ou cicatrização deficiente (SABBAGH-HADDAD, 2000).

Doenças periodontais são um grupo de lesões que afetam os tecidos que rodeiam e suportam os dentes nos seus alvéolos, produzindo bolsas (TODESCA, 1995), e posterior perda do elemento dentário. Além do aumentado risco da doença periodontal, pacientes diabéticos podem apresentar vários graus de xerostomia e uma maior incidência de candidíase bucal. O alto nível de glicose na saliva, associado à xerostomia, pode aumentar o risco de cáries, aumentando ainda mais as chances de perda do elemento dental (MEALEY, 1996). Assim o diabetes age como importante fator de risco, mas também fator etiológico para doença periodontal. Por isso, o diabetes mellitus e a doença periodontal são foco de estudos constantes, pois afetam diretamente a qualidade de vida dos indivíduos, principalmente por possuírem relação bidirecional (MEALEY, 1996). Isto pode ocorrer devido a mudanças vasculares, disfunção neutrofílica, alterações na síntese do colágeno, fatores microbianos e predisposição genética (OLIVER & TERVONEN, 1994). A associação desses fatores agrava ainda mais a doença periodontal.

Devido à elevada quantidade de pessoas que apresentam diabetes hoje, e com a probabilidade de aumento desses números em um futuro próximo, e a contínua perda de dentes por estes indivíduos, a utilização dos implantes osseointegrados tem sido cada vez mais recomendada para pessoas diabéticas, por ser atualmente a melhor maneira de manter a qualidade da saúde bucal dos indivíduos edêntulos.

O tratamento reabilitador por meio de implantes osseointegrados em pacientes parcialmente ou totalmente edêntulos tem sido utilizado na clínica odontológica com alta predicatibilidade. Atualmente vários sistemas de implantes foram desenvolvidos, disponibilizando no mercado uma grande variedade de implantes e componentes protéticos. Estas variações podem ser macro, micro ou ultraestruturais, objetivando, dentre outros fatores, maior estabilidade primária, simplificação de técnica, melhor estética, redução de tempo e de custos (SYKARAS et al, 2000; GUO et al., 2010).

Mesmo nos casos de edentulismo total, a possibilidade de utilização das próteses implanto-suportadas representou um grande avanço técnico e científico na odontologia. Pacientes desdentados totais, que, tradicionalmente, tinham como única alternativa de tratamento próteses totais muco-suportadas, passaram a ter como opção terapêutica próteses retidas por implantes osseointegráveis. A eficácia desta modalidade de tratamento foi demonstrada em diversos estudos longitudinais. Em acompanhamento por mais de cinco anos, a taxa de sucesso encontrada em implantes colocados na maxila foi superior a 80% e em mandíbula superior a 90% (ADELL et al., 1981; ADELL, 1983; ALBREKTSSON et al., 1988).

Após a instalação de implantes dentários a formação óssea ocorre ao redor destes, inicialmente pela interação entre o coágulo e a superfície do implante, com a atração de células indiferenciadas e fatores de crescimento. Acontece secundariamente a reabsorção do coágulo, formação de tecido vascularizado, diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos. A chegada de sangue ao sítio do implante permite a diferenciação de células mesenquimais em fibroblastos. Estes secretam matriz osteóide, que após mineralização constituem o tecido ósseo primário (LEMONS, 2004).

OTHA em 1993 realizou estudo em macacos e definiu a cicatrização óssea ao redor de implantes nas seguintes fases: angiogênese, osteogênese, crescimento ósseo e manutenção do tecido ósseo. A angiogênese acontece do 3º ao 7º dia, seguida pela osteogênese onde ocorre formação de tecido ósseo esponjoso, ao redor de uma rede capilar na superfície do implante. Posteriormente, em direção ao implante, acontece um avanço do trabeculado ósseo, finalizando com a compactação desse trabeculado e sua maturação. Após a sua formação, há a

remodelagem no tecido ósseo, que foi comprovada através de estudos de microscopia eletrônica, através da presença de fibras colágenas mineralizadas, material proteínáceo, matriz fibrilar e osteoblastos, na interface osso-implante (ALBREKTSSON, 1985; LISTGARTEN et al., 1996).

Numa tentativa de tornar viável e seguro o implante dentário em pacientes diabéticos, vários estudos experimentais estudando a osseointegração de várias formas, tem sido desenvolvidos. IYAMA et al. (1997) realizaram estudo comparando a quantidade e distribuição regional de formação óssea ao redor de implantes instalados na tíbia, em ratos normais e diabéticos induzidos por estreptozotocina. Foram utilizados os marcadores ósseos calceína, alizarina e tetraciclina no 7º, 14º e 21º dias, respectivamente. Após o implante os animais foram sacrificados no 28º dia. Em ambos os grupos, a formação óssea desenvolveu-se da superfície em direção ao endósteo, ao periósteo ou ao osso medular. No grupo controle, a neoformação óssea mostrou uma extensa marcação com as três camadas de cores e no grupo diabético a densidade do marcador tetraciclina, no 21º dia, estava baixa, demonstrando que nos animais diabéticos, a osseointegração foi suprimida em relação ao grupo controle.

NEVINS et al. (1998), analisaram ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina e não diabéticos com 28 e 56 dias após a colocação de implantes de titânio no fêmur. Resultados histométricos indicaram que apesar da quantidade de formação óssea ser semelhante entre os animais diabéticos e controle, o contato osso-implante foi menor para ratos diabéticos. Este estudo demonstrou que o processo de osseointegração é afetado pelo diabetes.

OTTONI & CHOPARD (2004), quantificaram a neoformação óssea ao redor de implantes instalados em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. Os animais foram avaliados durante 8 semanas, através da utilização dos marcadores ósseos calceína, tetraciclina e alizarina. Não houve diferença estatística entre os grupos quanto à neoformação óssea cortical junto ao implante. Essa se mostrou significativamente menor nos animais diabéticos quando foi avaliado o canal medular.

SHYNG et al (2006), verificaram em estudo experimental através de análise histológica, após 20 dias, em implantes inseridos imediatamente após extração de dentes primeiros molares, que em implantes de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina ocorreu formação de tecido ósseo e tecido fibroso enquanto que ao redor dos implantes de ratos normais ocorreu uma maior formação de osso lamelar. Aos 40 dias de pós-operatório, houve uma grande quantidade de tecido de granulação fibroso e reabsorção óssea extensa ao redor dos implantes de ratos diabéticos. Em ratos normais, o osso esponjoso ao redor do

implante era denso e bem organizado. Em conclusão, os resultados sugerem que a inserção do implante imediatamente após a extração dentária em animais com diabetes mal controlado pode ser contra-indicada.

HASEGAWA et al. (2008), através de estudo histológico analisaram a cicatrização óssea ao redor de implantes de titânio, em fêmures de ratos diabéticos tipo 2. Os resultados mostraram que o volume de tecido ósseo ao redor dos implantes foi menor para o grupo diabético em relação ao grupo controle na área cortical, enquanto o volume de tecido ósseo na área medular não foi afetado pelo diabetes. A porcentagem de contato osso-implante foi significativamente menor para o grupo de diabetes em ambas as áreas, com o contato osso-implante de 4 semanas na área cortical sendo 12% para o grupo de diabetes e 61% para o grupo controle. Os ratos diabéticos apresentaram tecido ósseo fragmentado e intervenção de tecido mole. Os autores concluíram que a redução da quantidade de tecido ósseo no contato osso-implante em ambas as áreas foi notável nos animais diabéticos.

Após vários estudos experimentais comprovarem sob diferentes aspectos que o diabetes leva a uma pior osseointegração, refletindo o que já se observava na prática clínica (OLSON, et al., 2000; FARZAD et al., 2002; PELED et al., 2003), ficou clara a necessidade de estudos experimentais dos efeitos do tratamento com insulina nos animais com implantes ósseos.

SIQUEIRA et al.(2003), realizaram implantes dentários na tíbia, em grupos de ratos diabéticos induzidos por aloxana, com e sem tratamento com insulina, e compararam com o grupo controle. Concluíram ao avaliar após 10 e 21 dias de osseointegração que a reparação óssea em torno de implantes foi devido, pelo menos em parte, à insulina, e sugerem que o controle do estado metabólico do paciente diabético é essencial para o sucesso de uma osseointegração.

KNOW et al.(2005), avaliaram histologicamente o contato osso-implante, em ratos diabéticos não controlados e controlados com insulina. Demonstraram que a osseointegração de implantes dentários em ratos diabéticos controlados por insulina manteve o contato ósseo ao longo de um período de 4 meses. No entanto, esse contato ósseo pareceu diminuir com o tempo em ratos diabéticos não controlados.

MCCRACKEN et al. (2006), realizaram implantes dentários, na tíbia, em grupos de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, não controlados e controlados por insulina, e compararam com grupo controle. Concluíram após 2, 7, 14, e 24 dias de osseointegração, que o aumento da resposta óssea é mediada pelo tratamento com insulina.

QUINTERO et al. (2010) realizaram estudo em 32 ratos através da aplicação de produtos finais da glicação avançada (AGEs), sendo estes acompanhados por períodos de 14 e 28 dias. Ao compararem com grupo controle os estudos indicam uma associação entre AGEs e a inibição da formação óssea, sugerindo que a formação de AGEs em condições de alta glicemia, tais como o diabetes, podem contribuir para uma menor taxa de osseointegração que afeta negativamente a estabilidade do implante.

RETZEPI et al. (2010), avaliaram trinta e cinco ratos Wistar divididos em três grupos experimentais: diabéticos não controlados, induzidos por estreptozotocina; diabéticos controlados por insulina e não diabéticos. Microimplantes de titânio padronizados com superfície jateada e com ataque ácido foram colocados na borda inferior da mandíbula bilateralmente. O microimplante foi coberto com uma membrana de titânio reforçado politetrafluoroetileno expandido firmemente fixado na mandíbula de acordo com o princípio da GBR (regeneração óssea guiada). Os resultados revelaram que em todos os grupos experimentais, nos locais tratados com GBR ocorreu significativa osteogênese. Os autores concluíram que formação óssea significativa pode ser conseguida através do tratamento de GBR, mesmo na presença de diabetes não controlada, embora de forma menos previsível em comparação com o estado saudável. Efeitos adversos podem ser revertidos através do controle metabólico com insulina.

Estudos em humanos levam às mesmas conclusões dos estudos experimentais sobre a osseointegração em diabetes tratados. JAWED & ROMANOS (2009), após realizarem uma revisão sistemática da literatura sobre o impacto do diabetes e controle glicêmico sobre a osseointegração de implantes dentários concluíram que implantes dentários podem ser realizados em indivíduos com diabetes com bom controle metabólico (glicêmico e níveis séricos de hemoglobina glicosilada na faixa normal) de uma forma semelhante à de indivíduos sem diabetes. COURTNEY et al. (2010), através de uma revisão de literatura sugeriram que os resultados do tratamento com implantes podem ser bem sucedidos quando a colocação for realizada cuidadosamente em pacientes diabéticos selecionados com níveis de hemoglobina glicosilada inferior a 8 por cento e com a administração profilática de antibióticos.

Apesar dos trabalhos experimentais citados, dada a relevância do tema, ainda existem aspectos no estudo da osseointegração de implantes em animais diabéticos controlados ou não, que não foram totalmente elucidados. Por isso, visando dar sequência a esses estudos experimentais já existentes, esse estudo foi delineado para avaliação da osseointegração de implantes dentários em animais normais, diabéticos e diabéticos tratados com insulina, utilizando parâmetros adicionais nunca antes avaliados.

OBJETIVOS

Avaliar a formação óssea ao redor de implantes dentários em ratos diabéticos aloxânicos controlados com insulina, em relação a ratos não diabéticos e diabéticos não controlados, através de análise histológica e ultraestrutural à microscopia eletrônica de varredura.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais utilizados e grupos experimentais

No presente estudo foram efetivamente utilizados 72 ratos Wistar adultos, machos, alogênicos, com aproximadamente 3 meses de idade e com peso entre 200 e 300 gramas. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Campus da UNESP de Botucatu.

Os animais foram distribuídos em três grupos experimentais de vinte e quatro animais cada um, divididos por sorteio:

- **Grupo Controle (GC):** constituído de ratos sadios, não-diabéticos.
- **Grupo Diabético (GD):** constituído de ratos diabéticos induzidos pela aloxana, sem tratamento para diabetes.
- **Grupo Insulina (GI)** constituído de ratos diabéticos induzidos por aloxana, tratados com insulina.

Cada um dos grupos experimentais foram subdivididos em três subgrupos com 8 animais cada um, para serem avaliados e sacrificados em diferentes momentos, conforme descrito no item 3.3.

2. Parâmetros analisados

2.1 Parâmetros relacionados ao diabetes

- Clínicos: evolução do peso corporal, e diurese de 24 horas
- Laboratoriais: dosagem de glicose plasmática, níveis séricos de insulina, hemoglobina glicosilada e glicosúria em fitas reagentes.

2.2 Parâmetros relacionados à osseointegração

- Análise ultraestrutural à microscopia eletrônica de varredura: avaliação da formação do tecido ósseo em contato com a superfície dos implantes, de forma qualitativa.
- Análise histológica à microscopia óptica: avaliação da formação osteóide, osteoblastos, osteoclastos, osteócitos, vasos sanguíneos, presença de necrose e fibroblastos.

3. Delineamento experimental

3.1 Adaptação, indução do diabetes e sorteio dos grupos

Todos os procedimentos realizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, sob protocolo nº 700, aprovado em 25 de setembro de 2008.

Oriundos do Biotério Central da Unesp, os animais foram inicialmente acomodados no Laboratório de Cirurgia Experimental em caixas de poliuretano, em grupos de 4 animais por caixa, sendo oferecidas ração e água *ad libitum*.

Permaneceram nestas condições por um período de adaptação de 7 dias, quando foram tratados profilaticamente por três dias de verminoses, com mebendazol (Abbott – Cifarma, São Paulo – SP), adicionado à água de beber (25mg/Kg de peso/dia) e pediculose com fipronil/metoprene (Merial Saúde Anima Ltda., Paulínia - SP) colocado na superfície da pele.

Terminado o período de adaptação, os animais foram inicialmente sorteados em dois grupos experimentais (1º sorteio): o primeiro de animais que permaneceram como controle (grupo normal não diabético), e o segundo, aos animais que foram submetidos à indução do diabetes experimental com aloxana (grupo diabético). Após a indução do diabetes, os animais foram acompanhados por 14 dias, quando foram colocados em gaiolas metabólicas no 7º e 14º dias após a injeção de aloxana, visando à seleção dos animais diabéticos graves, conforme critérios clínicos e laboratoriais previamente estabelecidos (item 4.2). A sequência dos procedimentos realizados nesse período está sumarizada na figura 1.

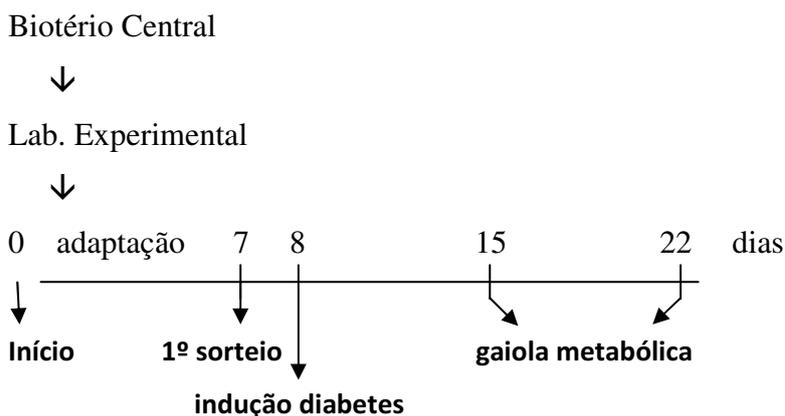


Figura 1 - Sequência inicial dos procedimentos executados com os animais.

3.2 Período de diabetes e seleção dos procedimentos cirúrgicos

No 15º dia após a indução, os animais diabéticos foram novamente sorteados (2º sorteio) para a seleção dos animais que receberiam tratamento com insulina (GI) e os que não receberiam tratamento (GD).

O grupo de animais que recebeu tratamento com insulina teve sua glicemia normalizada em 7 dias, conforme seqüência descrita no item 3.4. Após a normalização da glicemia nesse grupo tratado, todos os animais dos três grupos receberam os implantes (Figura 2).

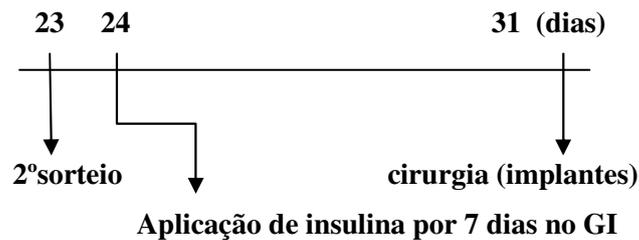


Figura 2 – Seqüência de procedimentos com os animais entre o 2º sorteio e a cirurgia.

3.3 Momentos de avaliação e sacrifício

Definidos os grupos, foi realizado um 3º sorteio para a definição dos momentos de avaliação dos parâmetros clínicos e laboratoriais:

M7: 7 dias de pós-operatório.

M14: 14 dias de pós-operatório.

M21: 21 dias de pós-operatório.

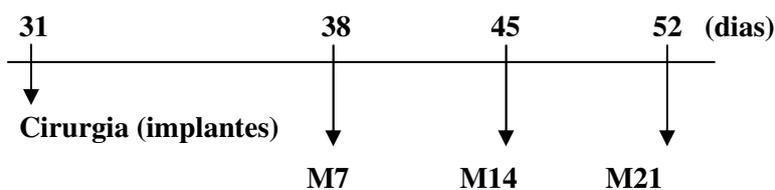


Figura 3 - Síntese dos momentos de avaliação.

Em cada momento de avaliação, 8 animais de cada grupo experimental foram submetidos à avaliação de parâmetros clínicos e laboratoriais, sendo sacrificados por punção cardíaca a seguir. Após o sacrifício, foi coletado o fêmur direito contendo o implante de todos os 8 animais de cada momento, sendo 4 para análise à microscopia óptica e 4 para microscopia eletrônica de varredura.

3.4. Administração de insulina

Todos os animais diabéticos do grupo experimental GI foram tratados com administração de insulina humana Novolin N, 100UI/ml (Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd – Dinamarca) administrada diariamente, em dose única, por via subcutânea, no período vespertino, com o objetivo da manutenção de um valor glicêmico normal para o rato, medido por fitas reagentes de glicosúria. A dose inicial de insulina administrada foi de 10U/kg de peso corporal, sendo as demais calculadas com bases nos níveis de glicosúria determinados através de fitas reagentes.

Para a fidelidade das avaliações, os animais foram alimentados regularmente no período noturno, sendo a dieta retirada pela manhã; a seguir foi realizada a avaliação da glicosúria matinal (pós-prandial) e ao final da tarde a glicosúria de jejum. O ajuste das doses diárias de insulina obedeceram a seguinte padronização:

- a) Glicosúrias negativas pela manhã e à tarde – não foi administrado insulina;
- b) Glicosúria +/++ pela manhã e negativa à tarde – foi diminuída a dose de insulina administrada (1/3 da dose anterior);
- c) Glicosúria ++/+++ pela manhã e +++ à tarde – foi aumentada a dose de insulina administrada (1/3 da dose anterior);

3.5 Implantes

Os implantes utilizados no estudo foram desenvolvidos e fabricados especialmente para essa pesquisa, de titânio, com medidas de 1,5mm de diâmetro e 6mm de comprimento, com tratamento de superfície (Neodent Implantes Osseointegráveis, Curitiba, Paraná), conforme ilustrado na figura 4. Para instalação desses implantes foi utilizado kit cirúrgico para enxerto ósseo (Neodent Implantes Osseointegráveis, Curitiba, Paraná).

4. Técnicas Utilizadas

4.1 Anestesia

Os procedimentos cirúrgicos, incluindo os utilizados para o sacrifício dos animais, foram realizados com o uso de Xilasina (0,5 ml/Kg de peso) e Ketamina (1ml/Kg de peso) administrados subcutaneamente (Rhobifarma Ind Farmacêutica Ltda, Hortolândia – SP).

4.2 Indução do diabetes experimental

O diabetes experimental foi induzido pela administração de uma solução aquosa de aloxana 2% (5,6 dioxiuracil monohidratado – Sigma Co, USA) por via endovenosa, na dose única de 42mg/Kg de peso corporal, utilizando-se uma das veias da cauda do animal.

Após jejum alimentar de 12 horas, com fornecimento de água *ad libitum*, cada rato foi colocado em uma caixa aquecida com lâmpada elétrica por um período de aproximadamente 10 minutos (tempo necessário para a dilatação das veias da cauda). A seguir o animal foi contido em uma pequena caixa individual, ficando com sua cauda exposta. A droga foi inoculada por punção de uma das veias da cauda, utilizando uma agulha de calibre 13,0 X 4,5 mm. Decorridos 30 minutos, os animais foram realimentados normalmente.

Neste estudo foram considerados diabéticos graves apenas os animais que apresentaram glicemia de jejum acima de 200mg/dl e glicose urinária maior que 3+ medidas em fitas reagentes, em duas dosagens sucessivas (7 e 14 dias após a indução). Também foram avaliados parâmetros clínicos, como perda de peso e aumento da diurese. Animais que não preencheram os critérios laboratoriais acima citados foram descartados do estudo, com ou sem parâmetros clínicos de diabetes.

4.3 Pré-operatório

Na véspera dos procedimentos cirúrgicos todos os animais foram submetidos a jejum de 12 horas com fornecimento de água *ad libitum*.

No dia da cirurgia foi realizada a tricotomia, e o animal foi fixado em tábua para a realização do procedimento (figura 5), após a anestesia. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados em condições estéreis. Utilizou-se para antissepsia álcool iodado.



Figura 5 – Animal no momento pré-operatório após tricotomia e antisepsia.

4.4 Cirurgia

Incisou-se o membro inferior direito através de lamina nº 10 (Lamedic Comercial e Serviços Ltda, Barueri – São Paulo) para bisturi nº4. A incisão foi realizada no plano epitelial e posteriormente por planos, até atingir a musculatura que foi divulsionada para exposição do fêmur (Figura 6).



Figura 6 - Imagem da exposição do fêmur do animal após incisão e divulsão.

Todos os animais foram submetidos à cirurgia para instalação de 1 implante no fêmur direito. As perfurações ósseas foram realizadas com o auxílio de um contra-ângulo para instalação de implantes com torque de 20:1 (Antoghir, Injecta - Brasil), acoplada a um motor elétrico (Tecdrill, São Paulo - Brasil) a 800 rpm e irrigação abundante com solução salina 0,9%.

Na cirurgia foi utilizado kit de enxerto ósseo (Neodent Implantes Osseointegráveis, Curitiba - PR) onde a sequência de brocas utilizadas para a perfuração do fêmur foram: braça tipo lança, broca 1.1mm, broca 1.3mm, conforme ilustra a figura 7.

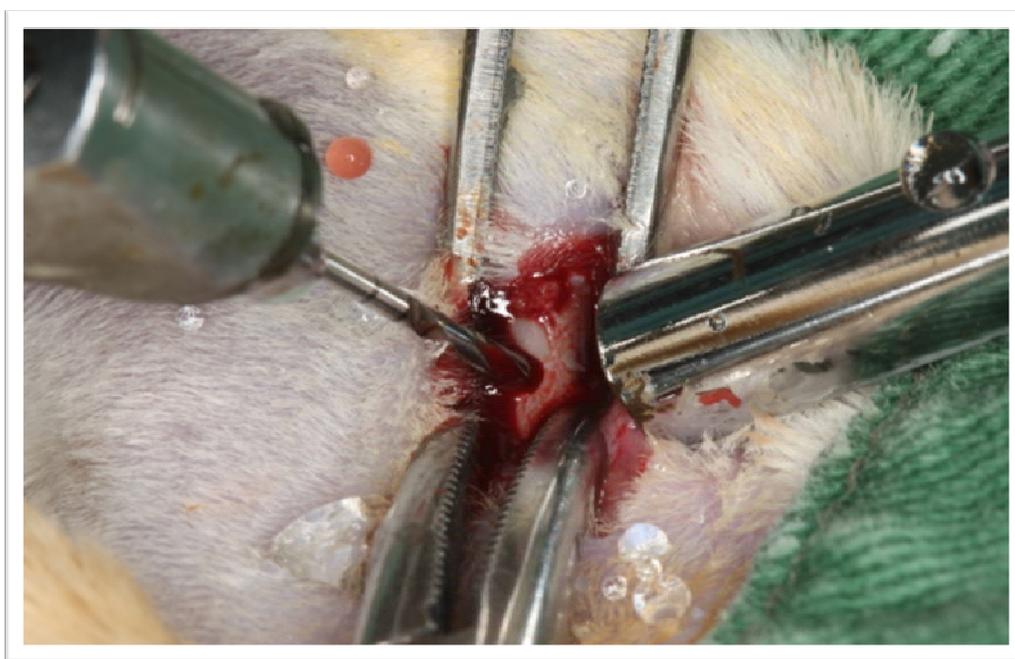


Figura 7 - Imagem do fêmur do animal no momento de preparação para instalação do implante.

As perfurações foram de 6mm de profundidade. A fixação dos implantes foi por rosqueamento com chave manual, até a cabeça do implante tocar completamente a cortical óssea. Todos os implantes, ao término desse procedimento estavam com boa estabilidade e sem sinais de mobilidade (figura 8). Após a colocação dos implantes foi realizada sutura por planos com fio de nylon 5-0, agulha triangular (Brasuture Ind. Com. Imp. Exp. Ltda., São Sebastião da Grama – São Paulo).

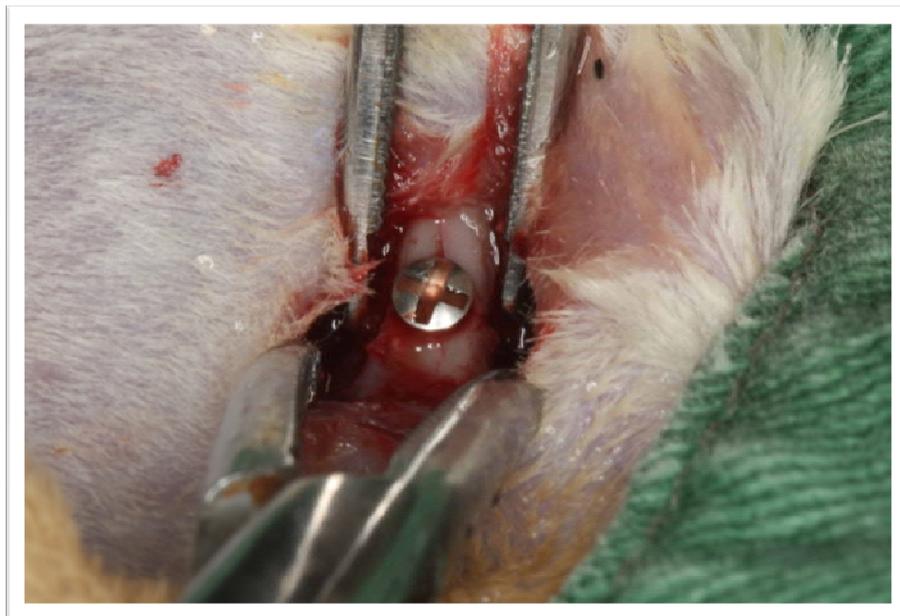


Figura 8 - Imagem demonstrando o implante instalado no fêmur do animal.

4.5 Pós-operatório

Após o término do procedimento cirúrgico, os ratos foram alojados em caixas plásticas individuais, com assoalho forrado com palha, e colocados em ambiente aquecido, até a completa recuperação anestésica. Aproximadamente 6 horas após, foram oferecidas água e dieta.

A antibioticoterapia foi realizada em todos os animais através da adição de tetraciclina na água de beber, na dose de 50mg/kg de peso corporal por dia, durante 5 dias de pós operatório. Durante o pós-operatório foi administrado como analgésico, paracetamol, 10mg/Kg, em gotas diluídas na água de consumo, por dois dias consecutivos, trocada diariamente.

4.6 Sacrifício e remoção das peças para estudo

Em cada momento de avaliação os animais foram submetidos à anestesia e posteriormente foi realizado o sacrifício através de punção cardíaca.

Após o sacrifício e dissecação da área, o fêmur de cada animal foi removido através de secção do membro com peça reta e disco metálico e as amostras armazenadas em frascos com solução de formol 10% (amostras para microscopia óptica) e glutaraldeído 5% (amostras para microscopia eletrônica de varredura).

5. Metodologia empregada na coleta de dados metabólicos

Para a coleta de dados metabólicos, cada animal foi submetido a um esquema padronizado de avaliação, onde foi seguida a seguinte metodologia.

- a) Colocação dos animais em gaiolas metabólicas individuais durante 24 horas.
- b) Fornecimento de volume conhecido de água durante todo o período de 24 horas
- c) Fornecimento de quantidade conhecida da ração NUVILAB-CR15 (Nuvital – Nutrientes Produtos Veterinários Ltda, Curitiba – PR) durante período noturno de 12 horas, seguido por um jejum alimentar de 12 horas. No grupo insulina foi realizado jejum de 6 a 8 horas. Inicialmente realizou-se jejum de 12 horas, mas a mortalidade tornou essa etapa proibitiva, e tivemos que reduzir o tempo de jejum.
- d) Determinação, ao final do período, do peso do animal em gramas e do volume de diurese de 24 horas em mililitros.
- e) Coleta de amostra da urina coletada em 24 horas para a dosagem da glicose urinária, por imersão de fita, em cruzeiros.
- f) Coleta de uma amostra de 1,5 ml de sangue para a dosagem da glicose plasmática, em miligramas por decilitro, após jejum de 12 horas, através da secção da ponta da cauda. Após a retirada do volume de sangue necessário para os exames laboratoriais, a cauda foi amarrada com fio de algodão 2-0 com finalidade hemostática.
- g) Os animais foram mantidos em caixas individuais recebendo água e ração *ad libitum*.
- h) Todas as amostras de sangue obtidas durante o sacrifício dos animais foram colhidas por punção cardíaca, com o tórax aberto.

5.1 Dosagens dos dados metabólicos

As dosagens de glicose sangüínea foram realizadas pelo método da glicose oxidase com utilização do equipamento Vitro da Johnson & Johnson. As dosagens de hemoglobina glicosilada foram realizadas por eletroforese, em sangue total, utilizando “kits” da marca Sebia. A insulina foi medida pelo ensaio imunoenzimático, empregando-se o kit comercial Rat/Mouse Insulin Elisa da Millipore Corporation (Billerica, Ma – EUA), com limite de detecção 35pM, faixa de normalidade de 0,2 - 10ng/mL e coeficiente de variação (C.V.) intraensaio de 3,22% e interensaio de 6,95%. As diferenças entre as duplicatas foi > 15%.

6. Estudo histopatológico à microscopia óptica

6.1 Preparo das amostras

- Fixação em solução de formol a 10%, por 48 horas;
- Imersão em álcool etílico 70%, por 24 horas;
- Remoção dos implantes e descalcificação com ácido nítrico 10%, duas trocas a cada 24 horas;
- Desidratação com banhos respectivos em: álcool 95%, álcool absoluto (dois banhos consecutivos), xilol (três banhos consecutivos), parafina à 60°C (três banhos consecutivos).
- Confeção dos blocos em parafina.
- Cortes dos blocos em secções de 0,3µm de espessura seguindo, paralelamente, o longo eixo dos implantes;
- Colocação em estufa por 20 minutos à 60°C;
- Desparafinização através de: três banhos de xilol de 5 minutos cada, quatro banhos de álcool absoluto seguido de lavagem com água corrente 2 minutos;
- Aplicação de hematoxilina por 10 minutos seguida de água corrente, colocação em diferenciador, lavagem água corrente, banho em água amoniacal, lavagem em água corrente por 5 minutos, banho em álcool absoluto, colocação em eosina por 2 minutos, passagem em álcool absoluto por 4 vezes consecutivas e banho de xilol.
- Posteriormente foi realizada a montagem das lâminas.

Foram confeccionadas 2 lâminas de cada animal, com 3 cortes cada, de onde foi selecionada 1 lâmina, que apresentou corte mais centralizado à posição onde estava o implante. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico, analisando em cada lado do local do implante a presença ou ausência de tecido ósseo neoformado e diferentes estados de maturação deste. Assim, cada lateral, dos implantes, foi analisada, delimitando-se campos (figura 9), baseados nas regiões em que, antes, estavam as roscas dos implantes removidos. A leitura foi realizada através de microscópio óptico Nikon Microphot-FXA, em aumentos de 400x e 1000x.

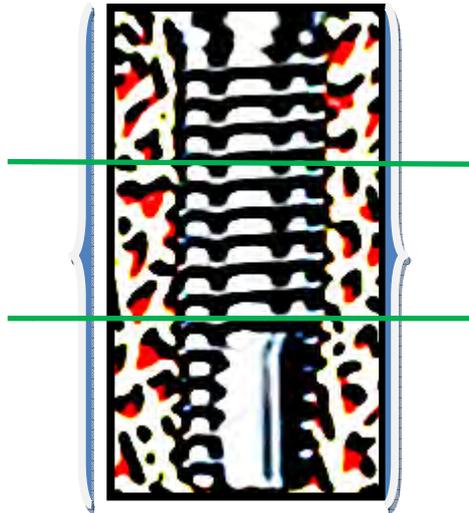


Figura 9 – Desenho esquemático da área de avaliação do tecido ósseo.

6.2 Análise histopatológica

Foi realizada análise dos seguintes parâmetros: formação osteóide, osteoblastos, osteoclastos, osteócitos, vasos sanguíneos, presença de necrose e fibroblastos na área em contato com a superfície dos implantes. Tal análise foi realizada utilizando-se um escore de leitura baseado na semiquantificação dos parâmetros escolhidos levando-se em conta a quantidade e extensão.

Para avaliação da quantidade estabeleceram-se os seguintes valores:

- 0 - ausente;
- 1- discreta quantidade;
- 2- moderada quantidade;
- 3- elevada quantidade.

Para avaliação da extensão dos parâmetros na amostra analisada (toda área ao redor do implante representada na lâmina) estabeleceram-se os seguintes valores:

- 0- ausente;
- 1- menos de um terço da área;
- 2- entre um terço e dois terços da área;
- 3- acima de dois terços da área.

Também foi analisada a distribuição sendo indicada a letra “D”, se os parâmetros analisados estavam distribuídos difusamente, e “F” (focal), se em áreas concentradas. A

leitura das lâminas foi realizada pelo aluno pesquisador e patologista colaborador, sem prévio conhecimento de qual grupo as lâminas pertenciam.

7. Análise ultraestrutural à microscopia eletrônica de varredura

As peças foram analisadas na microscopia eletrônica de varredura, seguindo a seguinte padronização de preparo das amostras:

- Amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5 % em tampão fosfato, pH 7,3 por um período de 7 a 15 dias.
- Lavagem em água destilada (3 vezes de 5 minutos cada).
- Pós-fixação em tetróxido de ósmio 0,5 % em água destilada por 30 minutos.
- Desidratação em série crescente de etanol (7,5 % a 100 %).
- Secagem das peças em aparelho de ponto crítico Balzers CPD-020, utilizando o dióxido de carbono líquido.
- Montagem das amostras em suportes apropriados.
- Cobertura das amostras com 10nm de ouro em metalizador MED-010 de Balzers.
- Análise das amostras em microscópio eletrônico de varredura QUANTA 200 da Fei Company, sob tensão de 15 kv, em aumentos de 90 a 3000 vezes, cujas imagens foram digitalizadas por computador (processador Pentium-Pró, sistema Windows NT).

A análise dos blocos à microscopia eletrônica de varredura foram realizadas sem a retirada dos implantes, observando as características do osso neoformado perimplante e a integração osso-implante.

8. Análise estatística

8.1 Tamanho Amostral

O tamanho amostral foi determinado baseando-se numa diferença média esperada entre os grupos para as áreas estudadas, poder do teste de 80%, nível de 5% de significância, ficando determinado em 24 animais por grupo, que deveriam ser subdivididos em 8 animais a serem sacrificados em 3 momentos diferentes e destes 8, 4 seriam analisados por microscopia óptica e 4 por microscopia eletrônica.

8.2 Análise dos resultados

Para as variáveis peso, diurese, hemoglobina glicosilada, glicemia e insulina foi realizada a análise através do teste Anova, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni para detectar quais os pares que diferiram de forma significativa. Para as variáveis caracterizadas por escores, foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis na comparação dos grupos em cada momento e o teste de Friedmann na comparação dos momentos em cada grupo. O nível de significância utilizado foi de 5%.

RESULTADOS

1. Método de indução do diabetes

A indução do diabetes através da injeção de aloxana endovenosa foi realizada sem dificuldades, devido à colocação prévia dos mesmos em uma caixa aquecida, provocando vasodilatação das veias da cauda do animal. Foram considerados diabéticos graves os animais que apresentaram no período pós-indução, valores de glicemia acima de 200mg/dl e de glicosúria maior ou igual a 3+(medida em fitas reagentes), presentes no 7º e no 14º dias após a indução com aloxana, além dos parâmetros clínicos como perda progressiva de peso e aumento da diurese. Do total de 364 animais utilizados neste estudo, 340 animais foram submetidos à injeção de aloxana endovenosa. Destes, 163 não ficaram diabéticos (47,9%), ou o fizeram de forma leve ou moderada, e por isso foram excluídos. Os 177 animais restantes tornaram-se diabéticos graves. Desses, 43 foram a óbito após a injeção de aloxana; 20 morreram durante o experimento, em decorrência de complicações do diabetes e 16 em decorrência do tratamento com insulina e do jejum prolongado. Noventa e oito animais foram submetidos à cirurgia para colocação do implante no fêmur, e 72 permaneceram vivos nos seus respectivos grupos até o momento do sacrifício. Ao separarmos esses resultados entre os grupos, no grupo controle não houve óbitos; no grupo diabético tratado com insulina, 16 animais vieram à óbito antes da realização da cirurgia, e 15 após o procedimento cirúrgico devido à complicações do tratamento com insulina e jejum e no grupo diabético 20 animais foram a óbito antes do ato cirúrgico, e 11 após a cirurgia por complicações do diabetes.

2. Evolução clínica

Os animais do grupo controle (GC) apresentaram aos 7 dias de pós-operatório perda inicial de peso, porém nos demais momentos evoluíram com ganho ponderal em relação ao período da cirurgia. Os animais do grupo diabético controlado com insulina (GI), apresentaram ganho de peso aos 7 dias de pós operatório, porém aos 14 dias de pós-operatório diminuíram de peso em relação ao M7, com recuperação ponderal no M21, com ganho superior aos demais grupos. Os animais do grupo diabético não tratado apresentaram perda inicial de peso e ganho menor de peso em relação aos grupos GC e GI .

Os animais do GI e GD apresentaram valores de diurese inferiores ao grupo controle em todos os momentos. A diurese foi maior nos animais do grupo diabético (GD), e apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle no momento da cirurgia, e apesar de apresentar valores mais elevados em todos os outros momentos, essa diferença não foi estatisticamente significativa.

Os animais do grupo diabético (GD) apresentaram comportamento clínico semelhante entre si durante todo o acompanhamento e distinto dos GC e GI. Estes animais evoluíram com parâmetros clínicos e laboratoriais compatíveis com diabetes grave e apresentaram, ao longo do seguimento, progressiva queda do estado geral, além de alterações na pelagem e episódios frequentes de pneumonia e piodermite.

OBS: Em todas as tabelas as letras minúsculas comparam momentos dentro de um mesmo grupo e as letras maiúsculas comparam grupos em cada momento.

Tabela 1- Médias e desvios-padrão referentes a diferença de peso (g) segundo momentos e grupos.

| Variável | Grupos | Cirurgia | 7 dias | 14 dias | 21 dias |
|-----------------|------------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Dif_Peso | Controle | - | Média -18,6±8,1 Aa | Média 22,4± 19,6Ab | Média 32,6± 9,6 Ab |
| | Diabetico | - | -1,6±5,0 ABa | 21,3± 33,2Aa | 18,6± 16,4Aa |
| | Insulina | - | 17,5 ±31,5 Ba | 13,9± 30,1Aa | 46,0± 38,5Aa |

Comentário: O grupo controle apresentou resultados significativamente menores em relação ao grupo insulina, após 7 dias de pós operatório, pois os animais diminuíram de peso em relação ao momento da cirurgia. Nos demais momentos não ocorreu diferenças entre os grupos. Os animais do grupo controle apresentaram resultados significativamente maiores nos momentos 14 e 21 dias de pós operatório em relação aos 7 dias de pós operatório. Nos demais grupos não ocorreram diferenças significativas entre os momentos.

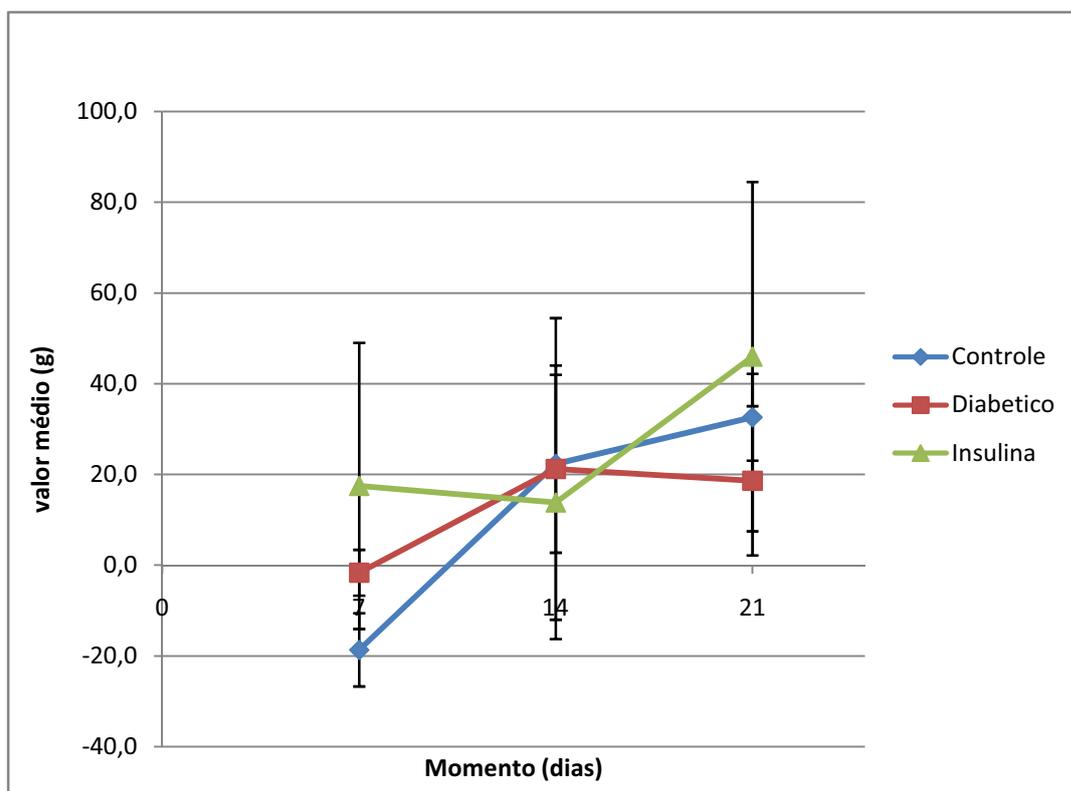


Figura 10 - Médias e desvios-padrão referentes a diferença de peso (g) segundo momentos e grupos.

Tabela 2 – Médias e desvios-padrão referentes à diurese (ml/24h) segundo momento e grupo.

| Variável | Grupos | Cirurgia | 7 dias | 14 dias | 21 dias |
|----------|-----------|-------------|------------|------------|--------------|
| | | Média | Média | Média | Média |
| Diurese | Controle | 3,0± 2,0Aa | 6,3± 4,4Aa | 4,6± 9,1Aa | 5,1± 4,5Aa |
| | Diabetico | 8,2± 7,0Ba | 9,0± 2,6Aa | 8,9± 6,0Aa | 14,5± 23,8Aa |
| | Insulina | 6,0± 5,3ABa | 7,3± 7,4Aa | 5,6± 4,8Aa | 7,8± 4,9Aa |

Comentário: A diurese foi significativamente maior no grupo diabético em relação aos grupos controle e insulina no momento da cirurgia. Não ocorreram diferenças significativas entre os grupos nos momentos de sacrifício, apesar do GD apresentar tendência a valores mais elevados. Não ocorreram diferenças significativas entre os momentos em cada grupo.

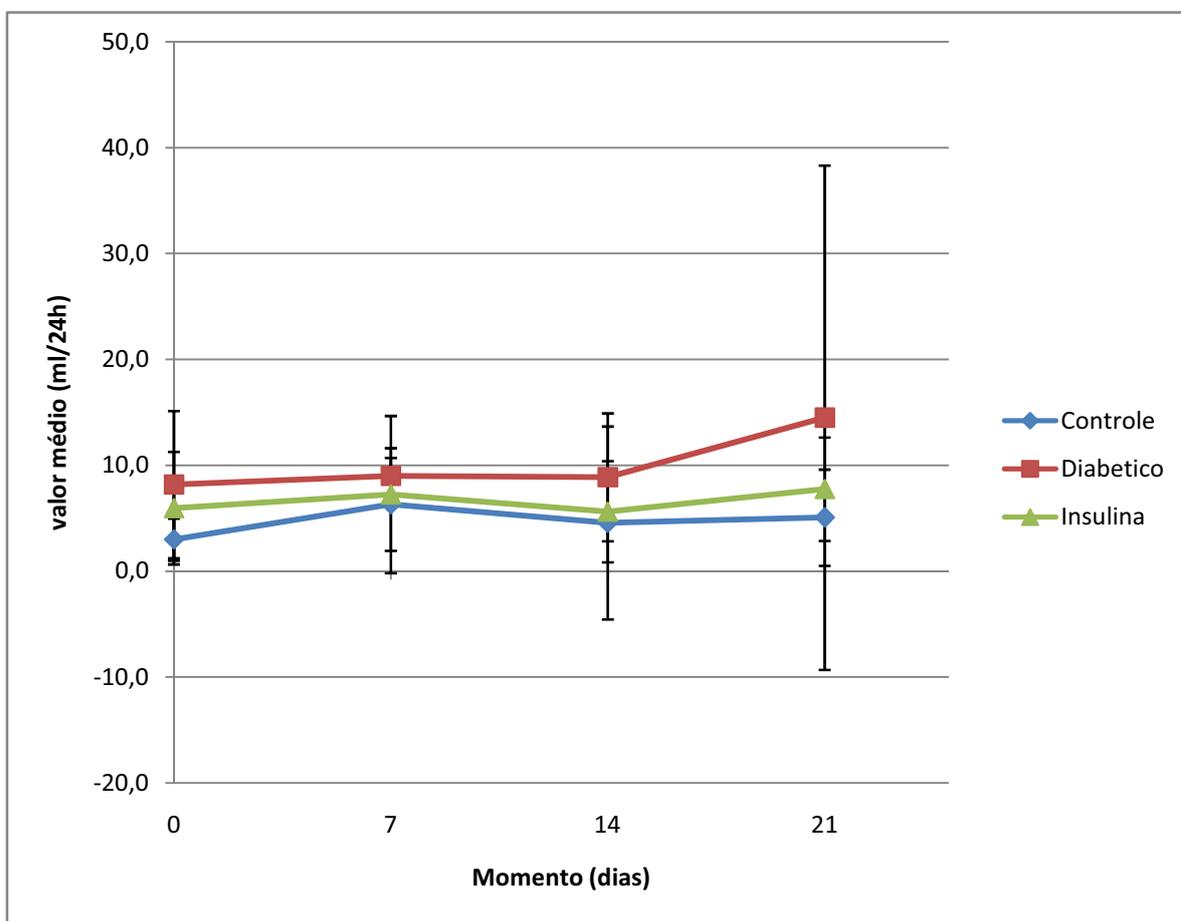


Figura 11 - Médias e desvios-padrão referentes à diurese (ml/24h) segundo momentos e grupos.

3. Exames laboratoriais

Os animais pertencentes ao grupo controle (GC) não apresentaram quaisquer alterações nas dosagens laboratoriais realizadas durante todo o experimento, mantendo valores semelhantes a animais normais de mesma raça e idade. Todos os animais do grupo diabético (GD) apresentaram alterações laboratoriais compatíveis com diabetes grave, representadas por glicemia de jejum acima de 200mg/dl, elevação dos valores da hemoglobina glicosilada e valores de insulina sérica menores que os GC e GI. Os animais do grupo GI apresentaram alterações laboratoriais compatíveis com diabetes grave inicialmente e normalização da glicemia em 7 dias, verificadas por medidas de glicosúria em fitas reagentes. Valores estatisticamente menores, em relação ao grupo diabético, de hemoglobina glicosilada afirmam o controle da glicemia no momento da cirurgia.

Tabela 3 - Médias e desvios-padrão referentes à glicemia (mg/dL) segundo momentos e grupos .

| <i>Variável</i> | <i>Grupos</i> | <i>Cirurgia</i> | <i>7 dias</i> | <i>14 dias</i> | <i>21 dias</i> |
|-----------------|------------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|
| | | <i>Média</i> | <i>Média</i> | <i>Média</i> | <i>Média</i> |
| Glicemia | Controle | 112,0± 15,7Aa | 116,3± 17,3Aa | 212,8± 41,0Ab | 187,4± 30,2Ab |
| | Diabetico | 353,6±187,2Ba | 406,9± 107,4Ba | 368,0± 180,4Aa | 279,6± 132,0Aa |
| | Insulina | 558,8±116,8Ca | 502,5± 107,4Ba | 627,7± 88,9Ba | 525,9± 144,6Ba |

Comentário: O grupo diabético apresentou resultados significativamente maiores em relação ao grupo controle nos momentos da cirurgia e aos 7 dias de pós operatórios. O grupo insulina diferenciou-se estatisticamente com maiores valores em relação ao grupo controle em todos momentos e em relação ao grupo diabético nos momentos da cirurgia, aos 14 e 21 dias de pós operatório. Estes resultados apresentam-se superiores pois esses resultados não traduzem a glicemia de jejum no GI.

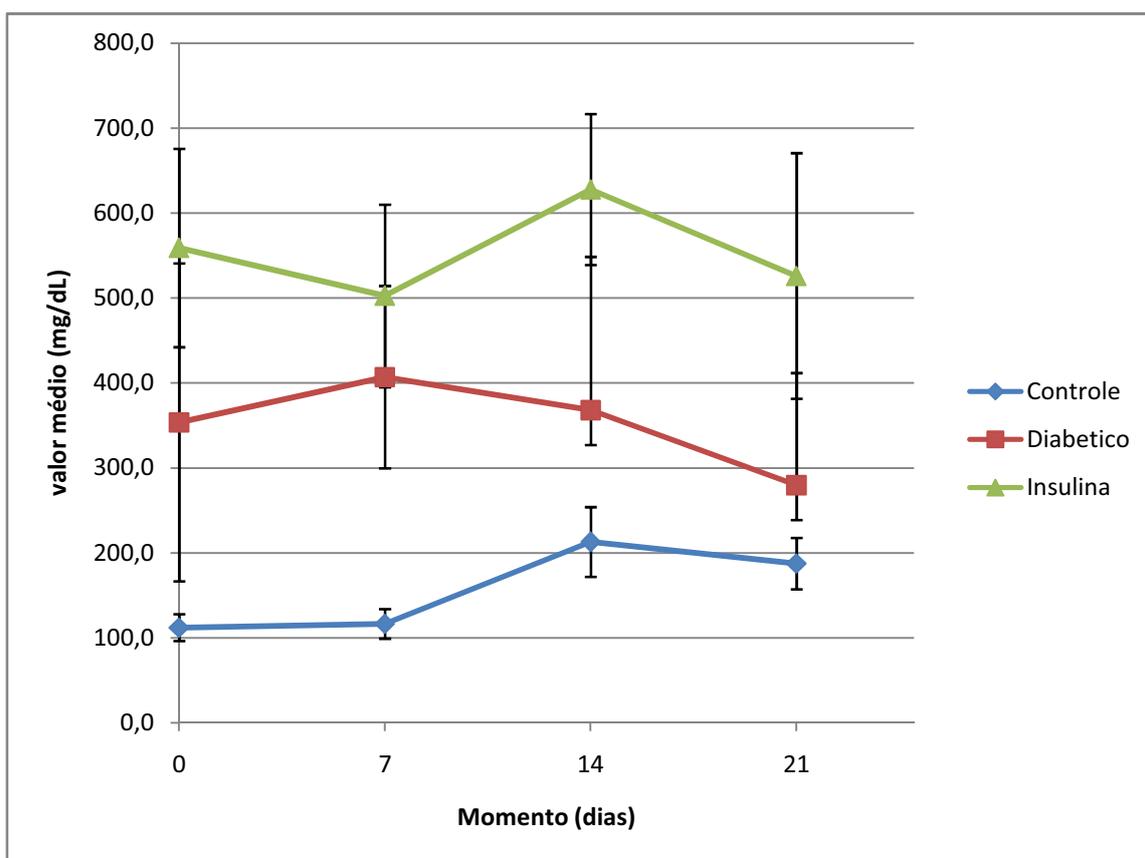


Figura 12 - Médias e desvios-padrão referentes à glicemia (mg/dL) segundo momentos e grupos.

Tabela 4 - Médias e desvios-padrão referentes à hemoglobina glicosilada (%) segundo momentos e grupos.

| Variável | Grupos | Cirurgia | 7 dias | 14 dias | 21 dias |
|-------------|-----------|---------------|-------------|---------------|---------------|
| | | Média | Média | Média | Média |
| Hemoglobina | Controle | 13,6± 2,1 Aa | 14,3± 1,7Aa | 13,8± 1,6Aa | 13,6± 1,9 Aa |
| | Diabetico | 23,1 ±1,8 Ba | 21,4± 1,8Bb | 25,0± 2,4 Bab | 22,8± 1,7 Bb |
| | Insulina | 19,9 ±2,0 Cab | 19,0± 1,3Ca | 18,2± 2,9 Cb | 18,7± 3,9 Cab |

Comentário: Os grupos apresentaram diferenças estatísticas entre si em todos os momentos, sendo os valores mais elevados no GD, os valores mais baixos no GC, enquanto que o GI apresentou resultados intermediários em relação aos demais grupos em todos os momentos.

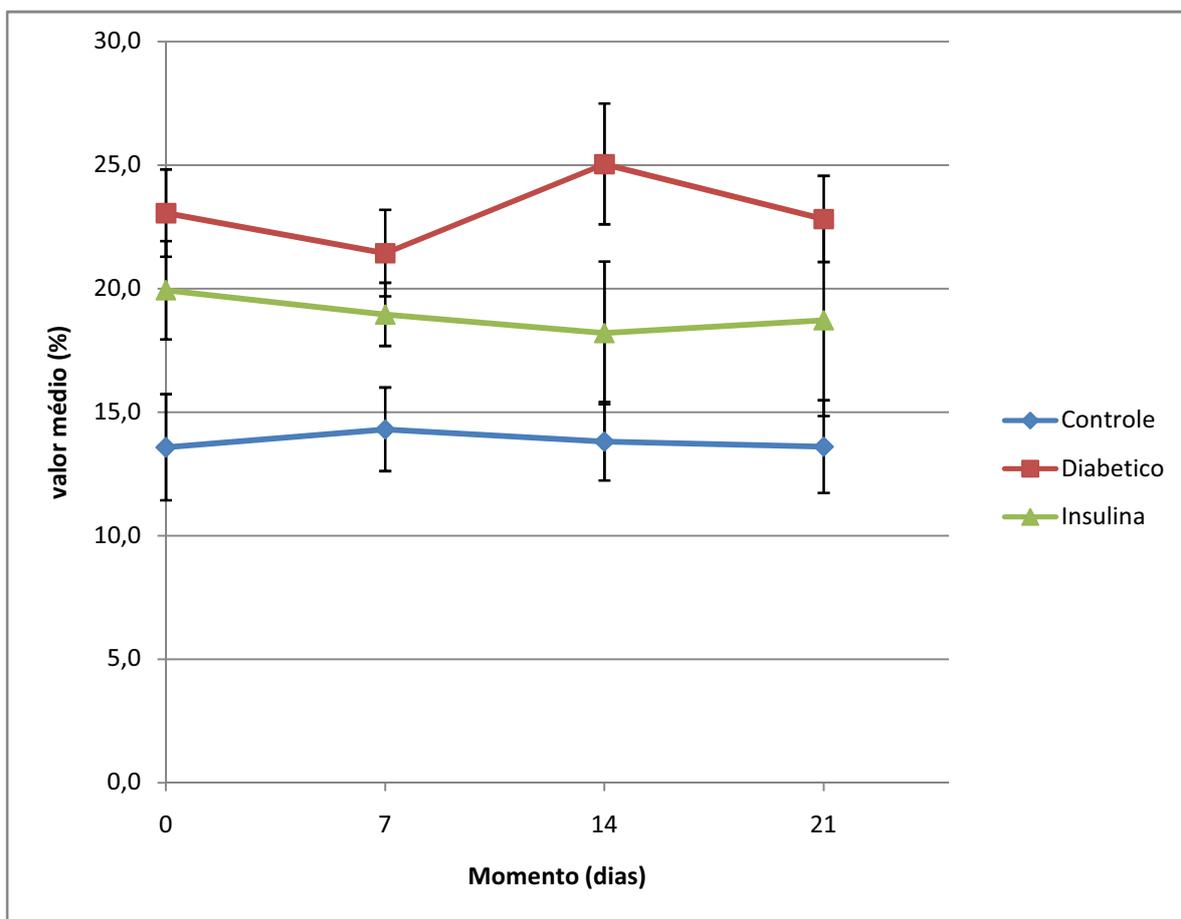


Figura 13 - Média e desvio-padrão referentes à hemoglobina glicosilada (%) segundo momento e grupo.

Tabela 5 - Médias e desvios-padrão referentes à insulina (ng/mL) segundo momentos e grupos.

| Variável | Grupos | Cirurgia | | | |
|----------|-----------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| | | 7 dias | 14 dias | 21 dias | |
| | | Média | Média | Média | Média |
| insulina | Controle | 1,59± 0,96Aa | 0,49± 0,25Ab | 0,49± 0,24Ab | 0,41± 0,07Ab |
| | Diabetico | 0,58± 0,21Ba | 0,30± 0,11Ab | 0,31± 0,04Ab | 0,28± 0,04Aab |
| | Insulina | 0,51± 0,14Ba | 0,47±0,27Aa | 0,51± 0,17Aa | 0,87± 0,61Aa |

Comentário: No momento da cirurgia o GC apresentou valores maiores que os GD e GI, que não diferiram entre si. Nos demais momentos não ocorreram diferenças estatísticas entre os grupos, apesar do GD apresentar tendência a valores inferiores aos grupos controle e diabético em todos os momentos de sacrifício.

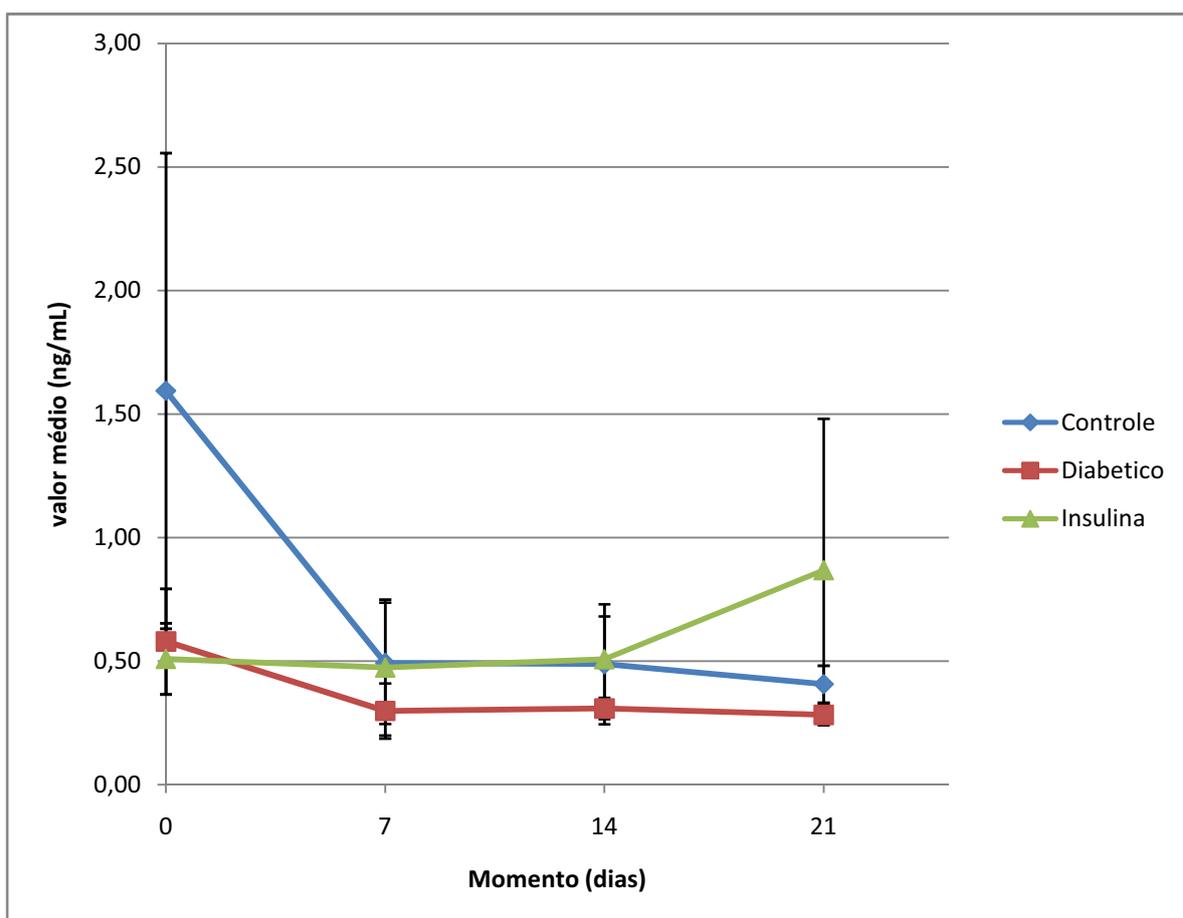


Figura 14 - Média e desvio-padrão referentes à insulina (ng/mL) segundo momento e grupo.

4. Análise histopatológica à microscopia óptica

4.1 Formação osteóide

O grupo controle apresentou formação osteóide elevada no momento M7 (figura 25, A1), com pico máximo no M14 (figura 25, A2), não sendo mais detectada no M21. Esse padrão se manteve ao analisar-se a distribuição osteóide, aparecendo em toda a área no M7, com discreta diminuição no M14, até seu desaparecimento no M21 (figura 25, A3).

No grupo diabético a formação osteóide foi discreta no M7 (figura 25, B1), e se manteve no M14, atingindo seu máximo no M21 (figura 25, B3). Nesse grupo, a formação osteóide ocorreu em toda área perimplantar em todos os momentos.

No grupo insulina a formação osteóide inicial atingiu um valor intermediário de escore entre os outros dois grupos no M7, e se mantém no M14. No M21 essa formação osteóide reduz-se, semelhantemente ao grupo controle (figura 25, C3). A formação osteóide ocorreu em toda área nos momentos M7 e M14, porém apresentou-se de maneira focal aos 21 dias, devido também à sua menor quantidade.

Os valores da análise estatística dos escores referentes à formação e extensão da distribuição de material osteóide estão nas tabelas 6 e 7, e figuras 15 e 16, respectivamente.

Tabela 6 – Medianas, 1^o e 3^o quartis, entre colchetes, referentes à quantidade de formação osteóide segundo momentos e grupos.

| Grupo | Momento | | |
|-----------|------------------|-----------------|-----------------|
| | M7 | M14 | M21 |
| Controle | 2,5[2,0;3,0] Aab | 3,0[3,0;3,0]Aa | 0,0[0,0;0,0]Bb |
| Diabético | 1,5[1,0;2,0] Aa | 1,5[1,0;2,0]Ba | 3,0[3,0;3,0]Ba |
| Insulina | 2,0[2,0;2,0] Aa | 2,0[2,0;2,5]ABa | 1,0[1,0;1,0]ABa |

P<0,05

Comentário: Em relação à formação osteóide, não ocorreram diferenças entre os grupos no momento M7; no momento M14, o grupo controle apresentou valores significativamente mais elevados que os demais grupos e no momento M21 o grupo diabético apresentou valores mais elevados. Comparando-se os momentos entre um mesmo grupo, houve diferenças apenas no GC, onde o M14 apresentou maior formação osteóide. Apesar do grupo insulina não apresentar diferenças estatisticamente significativas entre os momentos, observa-se tendência à queda de formação osteóide no momento M21. O inverso ocorre com o grupo diabético, onde houve tendência à aumento de formação osteóide no M21.

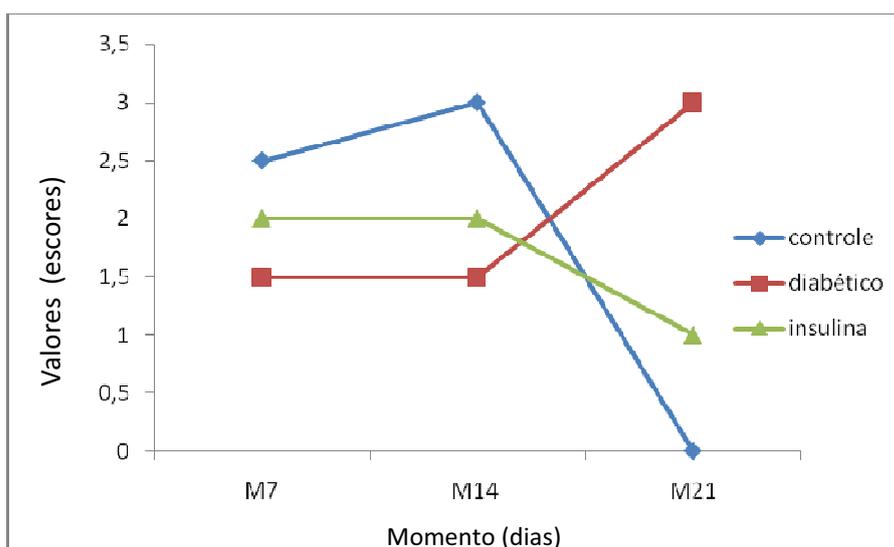


Figura 15 – Medianas, 1^o e 3^o quartis, entre colchetes, referentes à quantidade de formação osteóide segundo momentos e grupos.

Tabela 7– Medianas, 1^o e 3^o quartis, entre colchetes, referentes à extensão da distribuição de material osteóide segundo momentos e grupos.

| Grupo | Momento | | |
|-----------|----------------|-----------------|-----------------|
| | M7 | M14 | M21 |
| Controle | 3,0[2,0;3,0]Aa | 2,0[2,0;2,0]Aab | 0,0[0,0;0,0]Bb |
| Diabético | 2,5[1,5;3,0]Aa | 2,5[2,0;3,0]Aa | 3,0[3,0;3,0]Aa |
| Insulina | 2,5[2,0;3,0]Aa | 3,0[3,0;3,0]Aa | 1,0[1,0;2,0]ABa |

P<0,05

Comentário: Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, com exceção do GC que como não apresentou formação osteóide no M21, também não houve pontuação na extensão dessa.

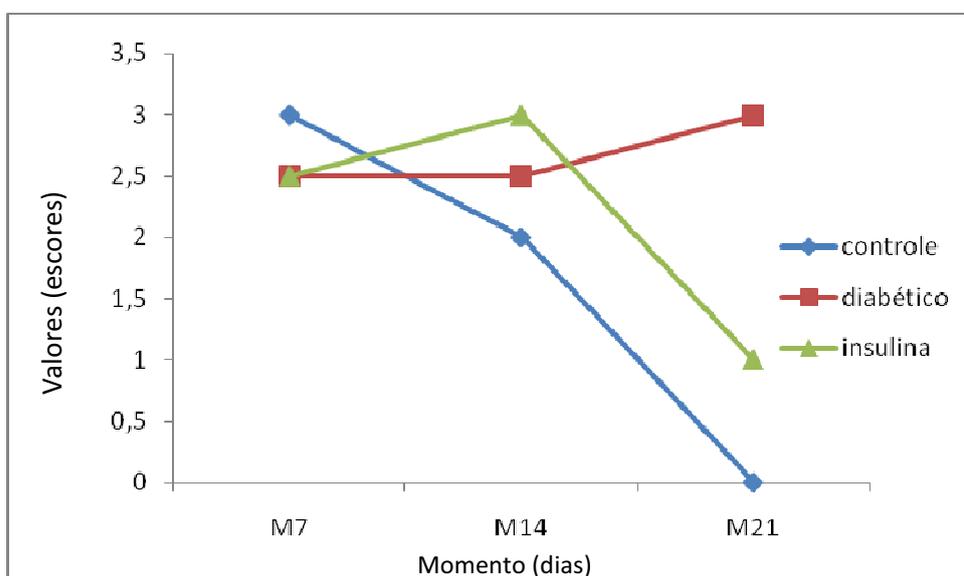


Figura 16 – Medianas, 1^o e 3^o quartis, entre colchetes, referentes à extensão da distribuição de material osteóide segundo momentos e grupos.

4.2 Presença de osteoblastos

No GC os osteoblastos estavam em grande quantidade no M7 (figura 26, A1), atingindo seu pico no momento M14 (figura 26, A2), juntamente com a melhor distribuição celular perimplantar, demonstrando plena atividade celular de formação óssea. Já no momento M21 (Figura 26, A3) esta presença não foi identificada, pois ocorreu a deposição de matriz óssea e presença de osteócitos.

Grupo diabético apresentou menor quantidade de osteoblastos nos dois primeiros momentos de pós-operatório, M7 e M14 (Figura 26, B1, B2), atingindo o máximo da concentração no momento M21 (Figura 26, B3), mas com presença dessas células em menor quantidade que no GC.

No grupo insulina a presença de osteoblastos tem escores máximos em M7 (figura 26, C1), com valores próximos aos do grupo controle e superiores ao grupo diabético. Porém a distribuição diminui nos próximos momentos e apresenta diferenças significativas em relação ao grupo controle no momento M14 (figura 26, C2), e no momento M21 (Figura 26, C3).

Os valores da análise estatística dos escores referentes à presença de osteoblastos e extensão da sua distribuição estão nas tabelas 8 e 9 e figuras 17 e 18, respectivamente.

Tabela 8 – Medianas, 1^o e 3^o quartis, entre colchetes, referentes à quantidade de osteoblastos segundo momentos e grupos.

| Grupo | Momento | | |
|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | M7 | M14 | M21 |
| Controle | 2,5[2,0;3,0]Aab | 3,0[3,0;3,0]Aa | 0,0[0,0;0,0]Bb |
| Diabético | 1,0[1,0;1,5]Ba | 1,5[1,0;2,0]Aba | 2,0[2,0;2,0]Aa |
| Insulina | 2,0[2,0;2,0]ABa | 0,0[0,0;1,5]Ba | 0,5[0,0;1,0]ABa |

P<0,05

Comentário: O grupo controle apresentou resultados significativamente maiores que os outros grupos em M7 e em M14. No momento M21 o grupo diabético apresentou resultado significativamente maior em relação aos outros grupos. No grupo controle ocorreram diferenças entre os momentos M14, onde atingiu valor máximo, e M21 onde não foram vistos osteoblastos.

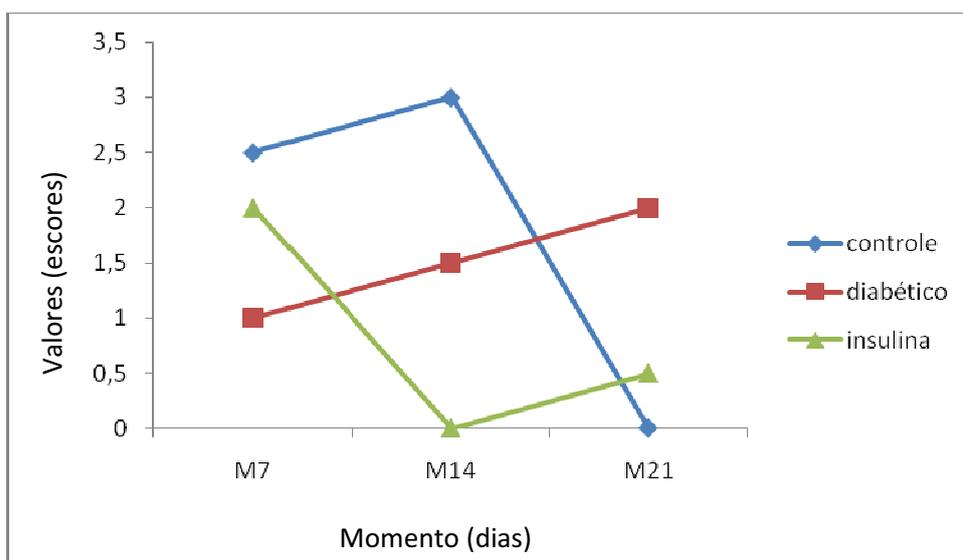


Figura 17 – Medianas, 1^o e 3^o quartis, entre colchetes, referentes à quantidade de osteoblastos segundo momento e grupo.

Tabela 9 – Medianas, 1^o e 3^o quartis, entre colchetes, referentes à extensão da distribuição de osteoblastos segundo momentos e grupos.

| Grupo | Momento | | |
|-----------|-----------------|----------------|-----------------|
| | M7 | M14 | M21 |
| Controle | 1,0[1,0;1,5]Aab | 2,0[2,0;2,0]Ab | 0,0[0,0;0,0]Ba |
| Diabético | 1,5[1,0;2,5]Aa | 1,0[1,0;1,0]Aa | 3,0[3,0;3,0]Aa |
| Insulina | 2,0[2,0;2,0]Aa | 0,0[0,0;1,5]Aa | 0,5[0,0;2,0]ABa |

P<0,05

Comentário: Não houve diferenças entre os grupos, à exceção do GC no M21, onde não houve pontuação, já que não foram detectados osteoblastos nesse período. No grupo controle os resultados apresentaram-se maiores em M14.

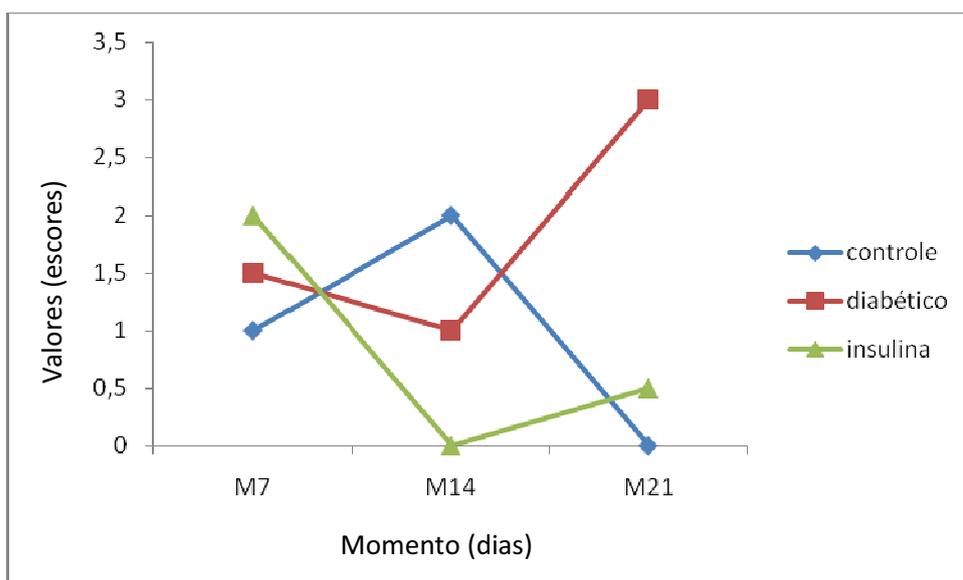


Figura 18 – Medianas, 1^o e 3^o quartis, entre colchetes, referentes à extensão da distribuição de osteoblastos segundo momentos e grupos.

4.3 Presença de osteócitos

Mesmo não ocorrendo diferenças significativas na formação de osteócitos é possível verificar que em todos os três grupos experimentais ocorreu uma melhora na distribuição em relação ao tempo, demonstrando que ocorre deposição de matriz óssea e que mesmo diferentes todos os grupos apresentam uma maturação óssea. A presença de osteócitos é maior em todos os momentos no grupo controle, e a distribuição das células na área perimplantar se difere no momento M14 (figura 26, B2) no grupo diabético, pois é menor em relação aos grupos controle e insulina. No grupo diabético os osteócitos apresentam-se de maneira focalizada não abrangendo toda área perimplantar, diferente do grupo controle que apresenta distribuição difusa, e do grupo insulina que mesmo não apresentando distribuição em toda área, os osteócitos estão dispostos de maneira difusa na área perimplantar. No grupo insulina a disposição das trabéculas ósseas apresentam-se intermitentes, demonstrando um tecido ósseo mais “frágil”, não se assemelhando ao grupo controle onde apresenta trabéculas contínuas, demonstrando uma maior mineralização óssea, mais firme e resistente.

Os valores da análise estatística dos escores referentes à presença de osteócitos e a extensão da sua distribuição estão nas tabelas 10 e 11 e figuras 19 e 20, respectivamente.

Tabela 10 – Medianas, 1^o e 3^o quartis, entre colchetes, referentes à quantidade de osteócitos segundo momento e grupo.

| Grupo | Momento | | |
|-----------|--------------|--------------|--------------|
| | M7 | M14 | M21 |
| Controle | 2,5[1,5;3,0] | 3,0[3,0;3,0] | 3,0[3,0;3,0] |
| Diabético | 1,5[1,0;1,0] | 2,0[1,0;3,0] | 2,0[2,0;2,0] |
| Insulina | 1,5[1,0;2,0] | 1,5[1,0;2,0] | 2,0[2,0;3,0] |

P>0,05

Comentário: Não ocorreram diferenças significativas na quantidade de osteócitos. Observou-se tendência a valores maiores no GC nos diferentes momentos.

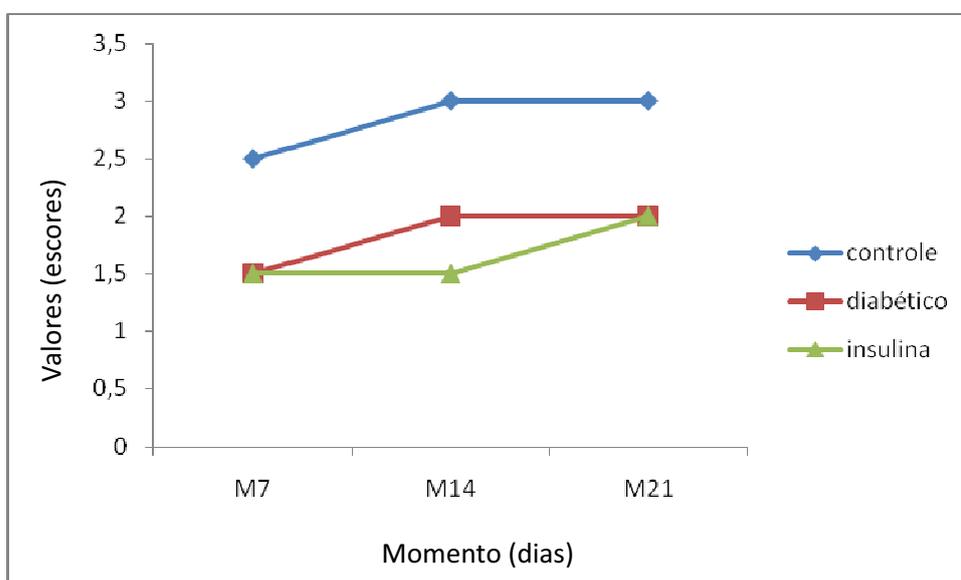


Figura 19 – Medianas, 1^o e 3^o quartis, entre colchetes, referentes à quantidade de osteócitos segundo momento e grupo.

Tabela 11 – Medianas, 1^o e 3^o quartis, entre colchetes, referentes à extensão de osteócitos segundo momento e grupo.

| Grupo | Momento | | |
|-----------|----------------|----------------|----------------|
| | M7 | M14 | M21 |
| Controle | 2,0[1,0;3,0] A | 2,0[2,0;2,0] A | 3,0[3,0;3,0] A |
| Diabético | 1,0[1,0;1,0] A | 1,0[1,0;1,0] B | 3,0[3,0;3,0] A |
| Insulina | 1,5[1,0;2,0] A | 2,0[2,0;2,0] A | 2,0[2,0;2,5] A |

P<0,05

Comentário: Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, à exceção do GD no momento M14, que apresentou valores menores.

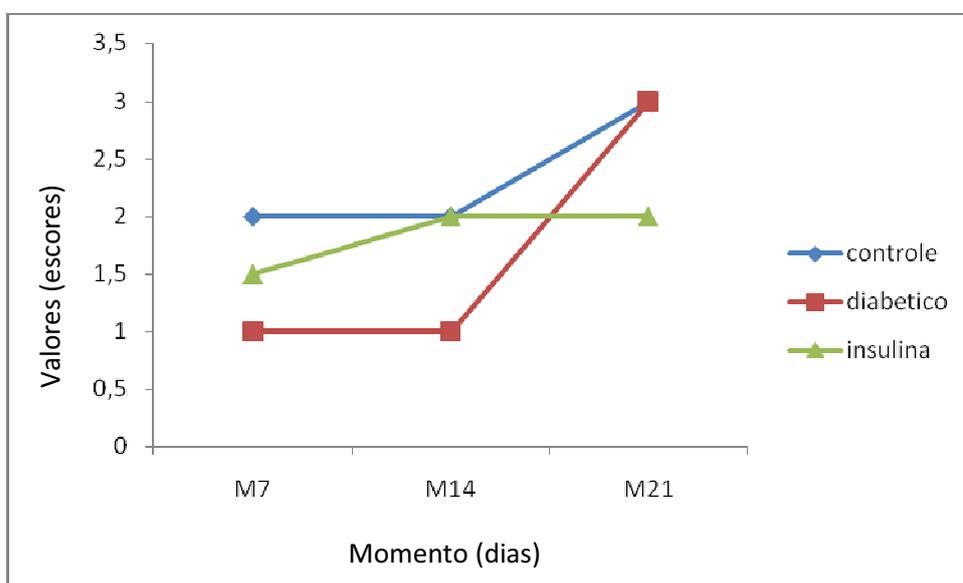


Figura 20 – Medianas, 1^o e 3^o quartis, entre colchetes, referentes à extensão de osteócitos segundo momento e grupo.

4.4 Presença de vasos sanguíneos

A presença de vasos sanguíneos no grupo controle apresentou quantidade adequada no momento M7, com pico máximo no M14 (figura 26, A1) e declínio no M21. Nos M7 e M14 os vasos sanguíneos estavam distribuídos difusamente na área perimplantar, enquanto que no M21 esses apresentavam-se com distribuição focal.

O grupo diabético apresentou uma mesma quantidade de vasos sanguíneos em todos os três momentos, com valores abaixo do GC, e ainda distribuídos de forma focalizada, não abrangendo toda área perimplantar (Figura 26, B1, B2, B3). Em M21, enquanto os GC e GI apresentam uma formação óssea mineralizada, o GD ainda apresenta atividade celular, formação óssea, e osseointegração em processo de conclusão, sem trabéculas definidas.

O grupo insulina apresentou no M7 (Figura 26, C1) a mesma concentração de vasos sanguíneos do grupo controle, porém com menor distribuição na área perimplantar. No momento M14 (Figura 26, C2) a distribuição dos vasos na região perimplantar se iguala ao grupo controle, mas com uma distribuição intermediária entre os GC e GD. Em M21 (Figura 26, C3) a quantidade e distribuição se iguala nos três grupos experimentais, porém neste momento os grupos controle e insulina já apresentam uma formação óssea mineralizada.

Os valores da análise estatística dos escores referentes à presença de vasos sanguíneos e a extensão da sua distribuição estão nas tabelas 12 e 13 e figuras 22 e 23, respectivamente.

Tabela 12– Medianas, 1^o e 3^o quartis, entre colchetes, referentes à quantidade de vasos sanguíneos segundo momentos e grupos.

| Grupo | Momento | | |
|-----------|------------------|-----------------|----------------|
| | M7 | M14 | M21 |
| Controle | 2,0[2,0;2,5] Aab | 3,0[3,0;3,0]Aa | 1,0[1,0;1,0]Ab |
| Diabético | 1,0[1,0;1,0]Ba | 1,0[1,0;1,0]Ba | 1,0[1,0;1,0]Aa |
| Insulina | 2,0[1,5;2,0]ABa | 2,0[1,5;2,0]ABa | 1,0[1,0;1,0]Aa |

P<0,05

Comentário: O grupo controle apresentou resultados significativamente maiores em relação ao grupo diabético nos momentos M7 e M14. O GI não apresentou diferenças significativas em relação aos demais grupos. O grupo controle apresentou no momento M14 valores significativamente maiores em relação ao momento M21. Os grupos diabético e insulina não apresentaram diferenças nos diferentes momentos de avaliação.

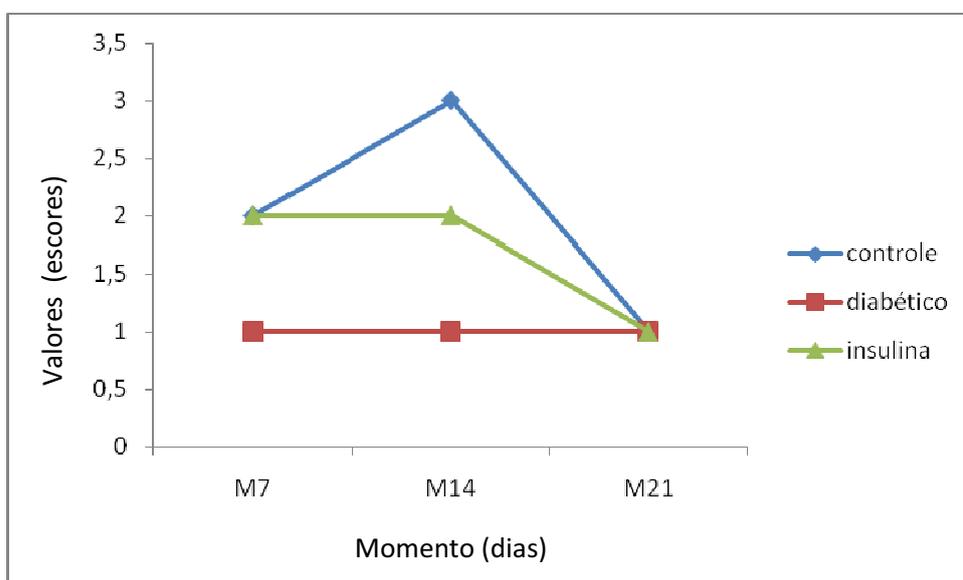


Figura 22 – Medianas, 1^o e 3^o quartis, entre colchetes, referentes à quantidade de vasos sanguíneos segundo momento e grupo.

Tabela 13– Mediana, 1^o e 3^o quartis, entre colchetes, referentes à extensão da distribuição de vasos segundo momento e grupo.

| Grupo | Momento | | |
|-----------|----------------|----------------|-----------------|
| | M7 | M14 | M21 |
| Controle | 2,5[1,5;3,0] A | 2,0[2,0;2,0] A | 2,0[2,0;2,0] A |
| Diabético | 1,0[1,0;1,0] A | 1,0[1,0;1,0] A | 1,0[1,0;1,0] B |
| Insulina | 1,5[1,0;2,0] A | 2,0[1,0;3,0] A | 1,0[1,0;1,5] AB |

P<0,05

Comentário: Não houve diferenças entre os grupos, à exceção do GD em M21, que apresentou resultados menores que os demais grupos.

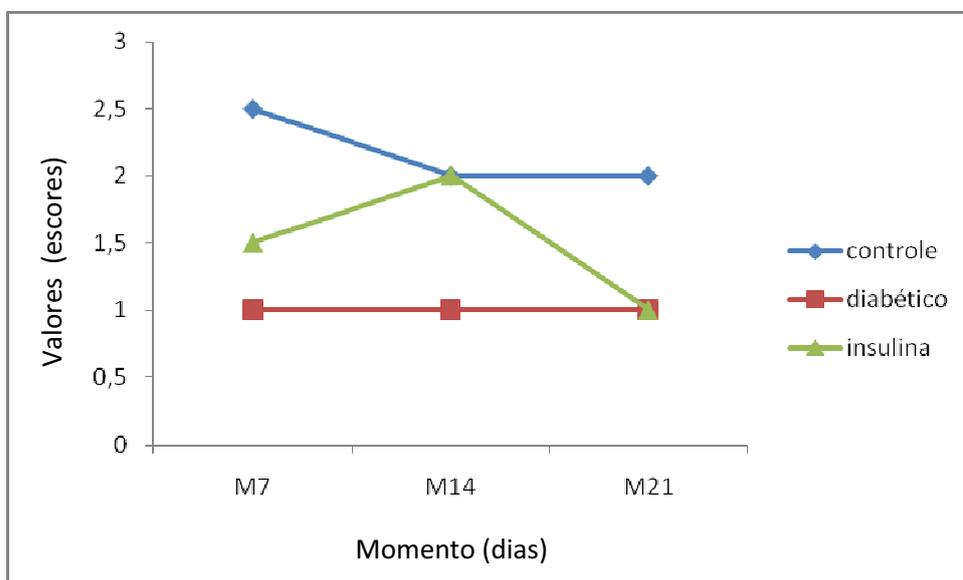


Figura 23 – Medianas, 1^o e 3^o quartis, entre colchetes, referentes à extensão da distribuição de vasos segundo momento e grupo.

4.5 Presença de osteoclastos

Os osteoclastos estiveram presentes em todos os grupos experimentais.

No grupo controle apresentaram-se em maior quantidade no momento M7, distribuídos de forma difusa na área perimplantar, sugerindo atividade celular e remodelação óssea. Nos momentos M14 e M21 os osteoclastos estavam ausentes.

No grupo diabético a presença de osteoclastos no momento M7 é pequena, diminuindo ainda mais no momento M14, até estar ausente no momento M21.

O grupo insulina apresentou quantidade discreta de osteoclastos no momento M7, semelhantemente ao grupo diabético. No momento M14 ocorreu um aumento da quantidade de osteoclastos, ao contrário do que aconteceu no grupo diabético.-Assim como nos demais grupos, no momento M21 os osteoclastos estavam ausentes.

Segundo a distribuição dos osteoclastos, o grupo controle apresentou resultado significativamente maior no momento M7 em relação ao grupo diabético e insulina que não diferiram entre si neste mesmo momento. No momento M14 o grupo insulina apresentou resultado significativamente maior em relação ao grupo controle. No momento M21 não ocorreu diferença entre os grupos. Não houve diferença entre os momentos em cada grupo.

Os valores da análise estatística dos escores referentes à presença de estão nas tabelas 20 e figura 24, respectivamente.

Tabela 20 – Mediana, 1^o e 3^o quartil, entre colchetes, referentes à quantidade de osteoclastos segundo momento e grupo.

| Grupo | Momento | | |
|-----------|----------------|-----------------|----------------|
| | M7 | M14 | M21 |
| Controle | 2,0[2,0;2,0] A | 0,0[0,0;0,0] B | 0,0[0,0;0,0] A |
| Diabético | 1,0[0,5;2,0] A | 0,5[0,0;1,0] AB | 0,0[0,0;0,0] A |
| Insulina | 1,0[1,0;1,0] A | 1,5[1,0;2,5] A | 0,0[0,0;0,5] A |

P<0,05

Comentário: Os osteoclastos não foram detectados em nenhum grupo no M21 e no M14 do grupo controle.

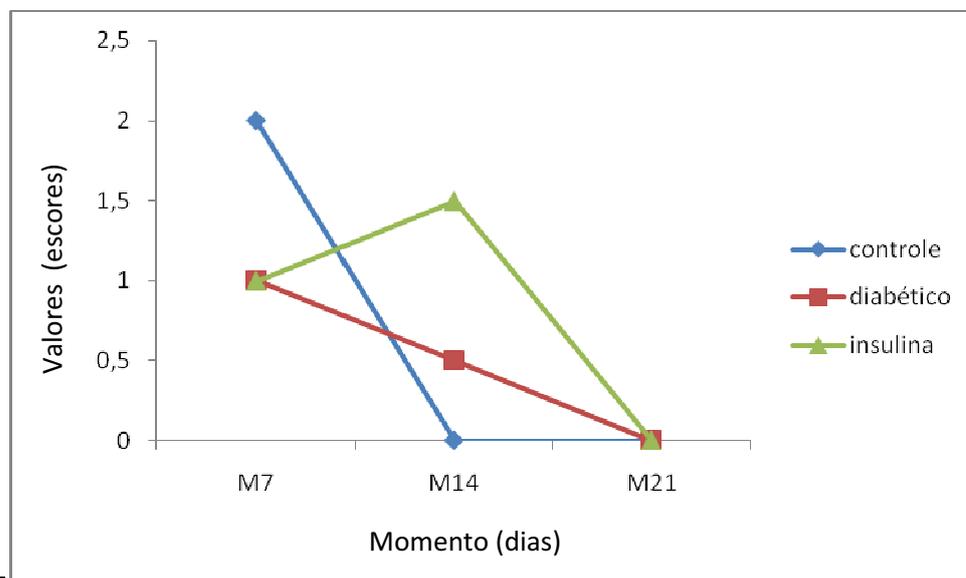


Figura 24 – Mediana, 1^o e 3^o quartil, entre colchetes, referentes à quantidade de osteoclastos segundo momentos e grupos.

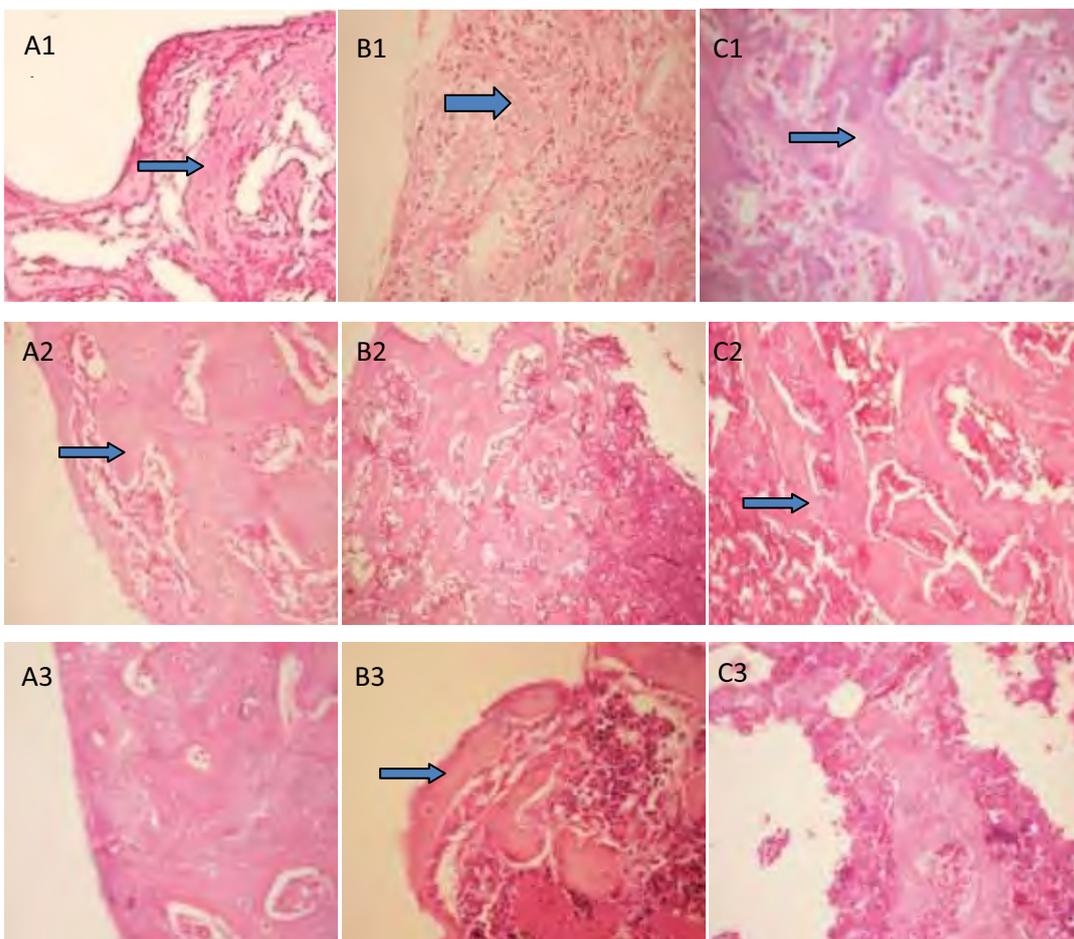


Figura 25 – Análise morfológica à microscopia óptica dos grupos controle (A), diabético (B) e insulina (C), com 7, 14 e 21 dias de pós-operatório respectivamente (1,2,3). Presença de material osteóide (setas azuis); (400X;H.E).

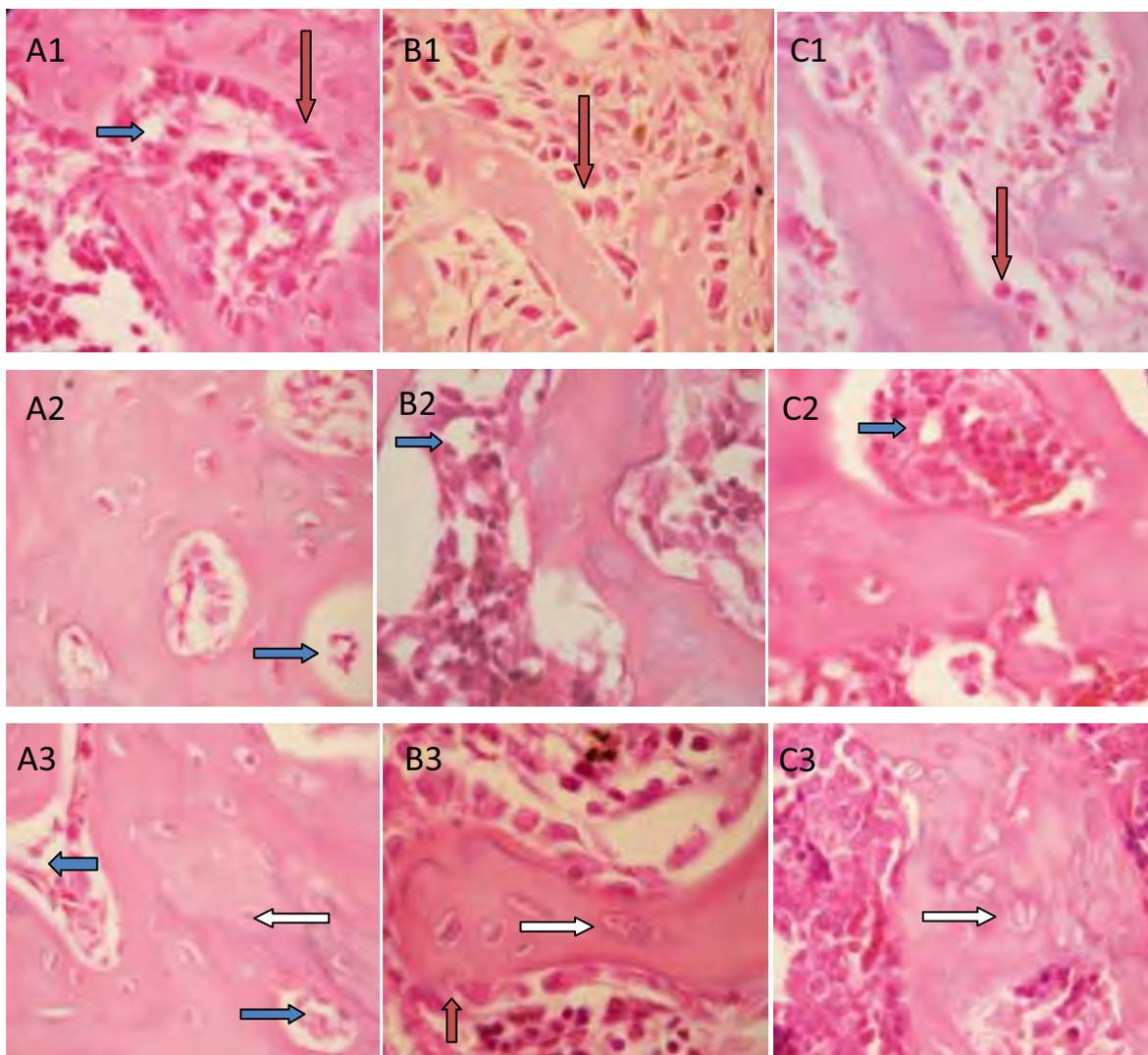


Figura 26 – Análise morfológica à microscopia óptica comparativa dos grupos controle (A), diabético (B) e insulina (C), com 7, 14 e 21 dias de pós-operatório respectivamente (1,2,3). Presença de vasos sanguíneos (setas azuis), osteócito (setas brancas) e osteoblastos (setas vermelhas); (1000X;H.E).

4.6 Presença de necrose

Os grupos experimentais não apresentaram relevância estatística em relação à necrose tecidual. Porém em três casos de ratos diabéticos e um caso do grupo tratado com insulina ocorreu presença de necrose na área perimplantar (Figura 27, C e D).

4.7 Presença de fibroblastos

Não foram detectados fibroblastos nos grupos controle e insulina. No grupo diabético ocorreu discreta presença de fibroblastos no momento M7 distribuídos de maneira focalizada. No momento M21 ocorreu presença elevada de fibroblastos (Figura 27, A, B) que se apresentaram de maneira difusa na área perimplantar.

A presença de fibroblastos foi detectada apenas no grupo diabético, em pequena quantidade em M7, e atingiu seu máximo em M21. A extensão da distribuição dos fibroblastos foi difusa em M21 e focal em M7, no GD.

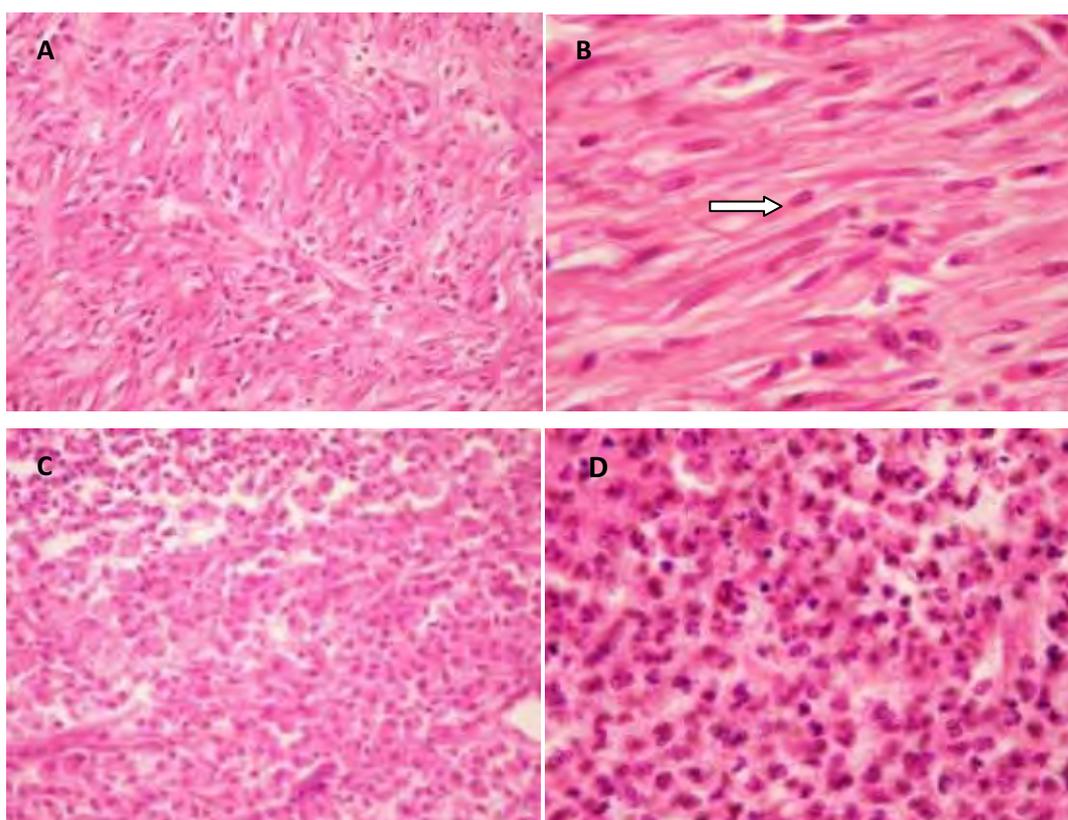


Figura 27 - Análise morfológica à microscopia óptica do grupo diabético, momento M21; A) presença de fibroblastos; 400X,H.E.; B) fibroblastos em detalhe(seta branca), 1000X, H.E.; C) presença de necrose, 400x,H.E.; D) necrose em detalhe, 1000X,H.E.

5. Análise ultraestrutural à microscopia eletrônica de varredura

Num menor aumento, que permite visão panorâmica das peças, no último momento analisado, com 21 dias de pós-operatório, observou-se que no grupo controle o tecido ósseo pode ser visto por todos os lados do implante e em sua superfície, em íntimo contato com as ranhuras desse. Já o GD apresenta espaço entre o implante e o tecido ósseo neoformado, além de praticamente não possuir material ósseo em sua superfície, revelando falha na osseointegração. O grupo insulina mostrou resultados intermediários entre esses dois grupos, com espaços menores entre o tecido ósseo e o implante e presença de tecido também na sua superfície (figura 28).

Em maior magnificação, diferenças na composição da matriz ficam ainda mais claras. No momento M7 o grupo controle já apresenta estrutura óssea densa, com poucos espaços vazios e pequena quantidade de proteoglicanas. O grupo insulina assemelha-se ao GC, mas com maior quantidade de proteoglicanas. Já o grupo diabético apresentou matriz óssea de aspecto frouxo, arranjo irregular, trabéculas finas, mais espaços vazios e a presença de grande quantidade de proteoglicanas (figura 29). Aos 14 dias de pós-operatório (M14), a matriz óssea tornou-se ainda mais densa e definida nos GC e GI, repetindo-se a presença de proteoglicanas nesse último. O grupo diabético mantém o mesmo aspecto do M7, com pouca evolução da matriz óssea, com intensa presença de proteoglicanas (figura 30). No momento M21, o tecido ósseo já está totalmente formado e denso no GC. No GD ainda é marcante a presença de proteoglicanas e observam-se trabéculas finas, entremeadas à matriz mais densa. Apesar do GI apresentar tecido ósseo formado e denso, há ainda pequena quantidade de proteoglicanas (figura 31).

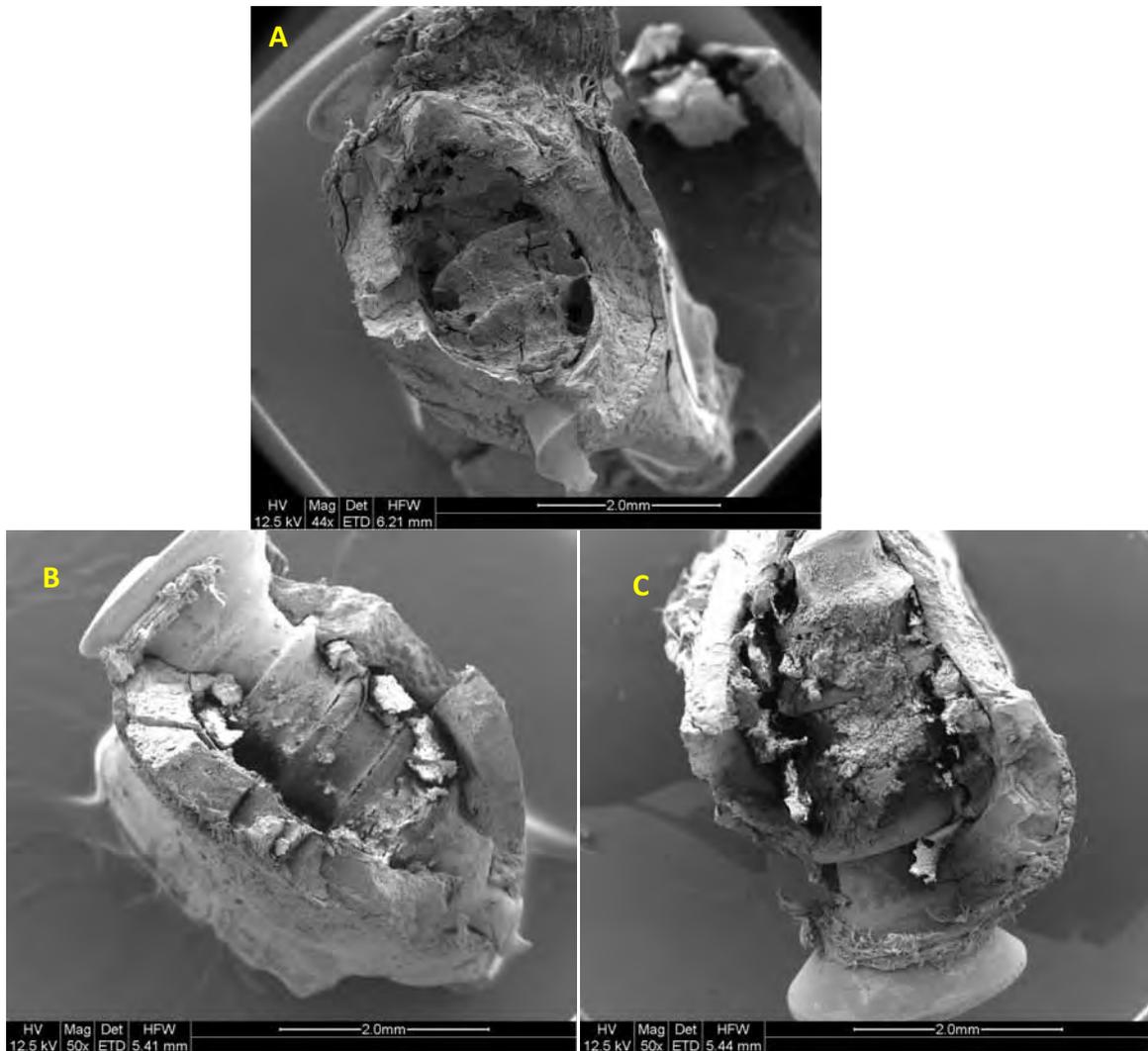


Figura 28 - Micrografias do tecido ósseo, no 21º dia de pós operatório, na microscopia eletrônica de varredura (aumento 50x), mostrando animais dos grupos controle, diabético e insulina, em A, B e C respectivamente.

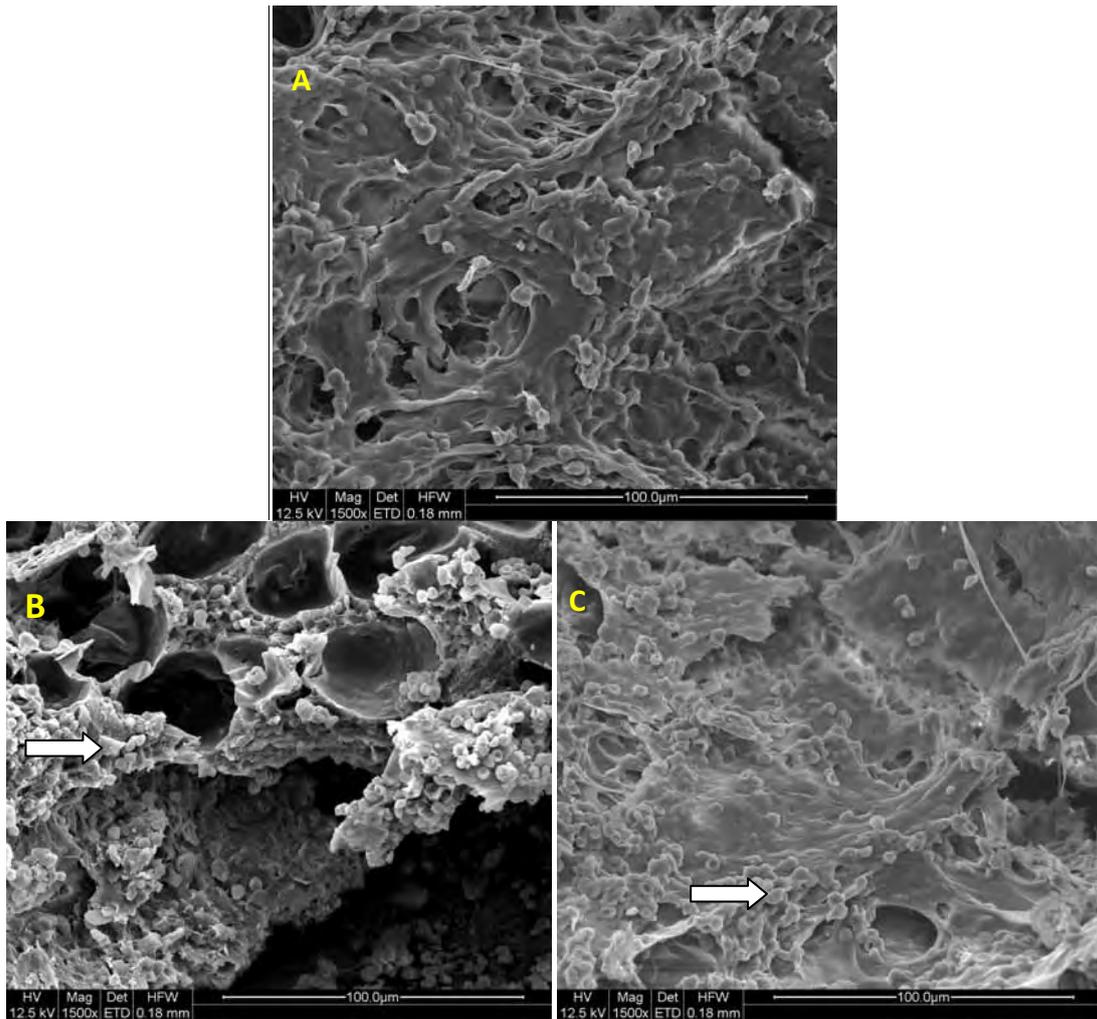


Figura 29- Micrografias do tecido ósseo perimplantar em M7, na microscopia eletrônica de varredura (aumento 1500x), mostrando em A, animal do grupo controle (GC), em B animal do grupo diabético e em C, animal do grupo insulina (GI); as setas indicam proteoglicanas.

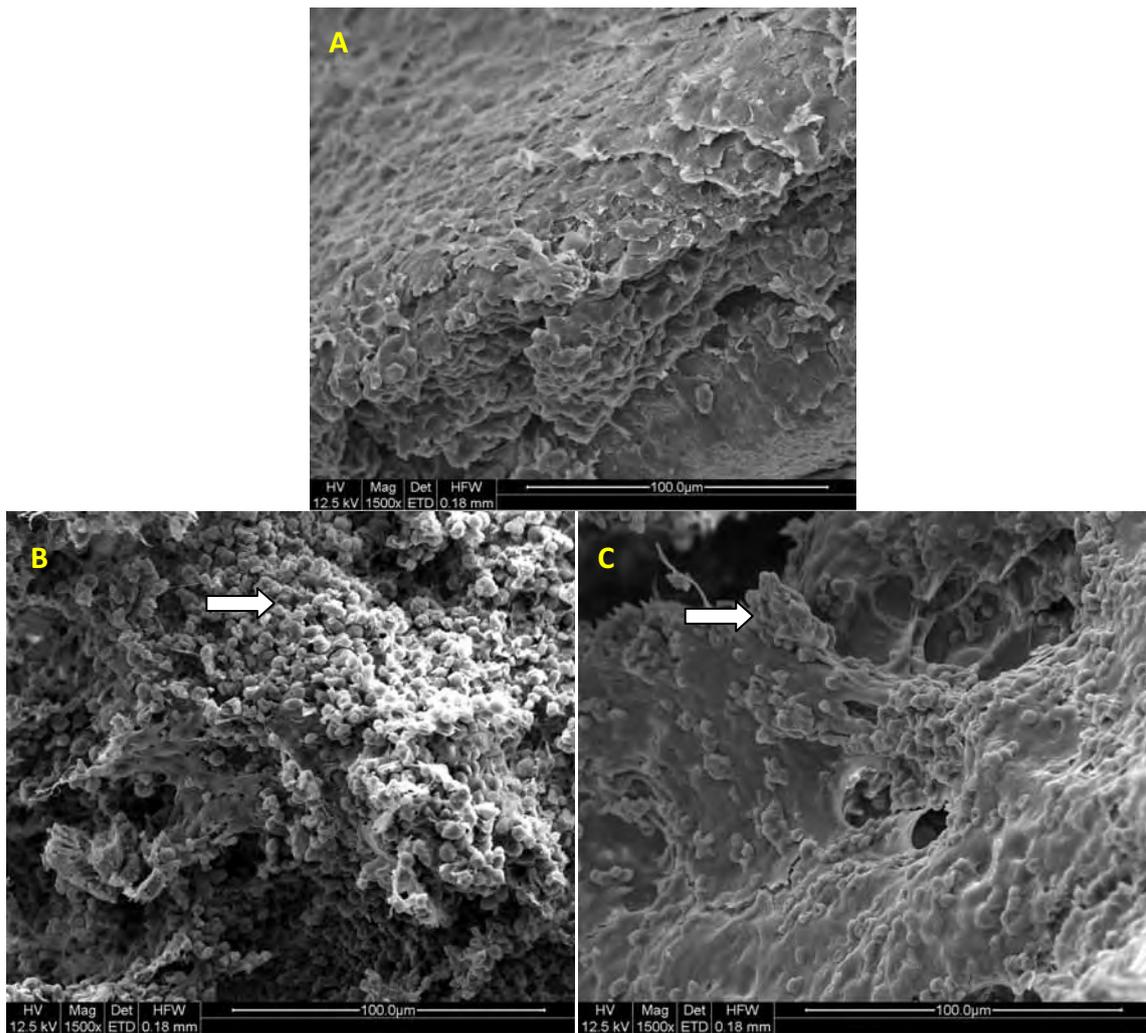


Figura 30 - Micrografias do tecido ósseo, no 14^o dia de pós-operatório, na microscopia eletrônica de varredura (aumento 1500x), mostrando em A, animal do grupo controle (GC), em B animal diabético (GD) e em C animal do grupo insulina; as setas indicam proteoglicanas.

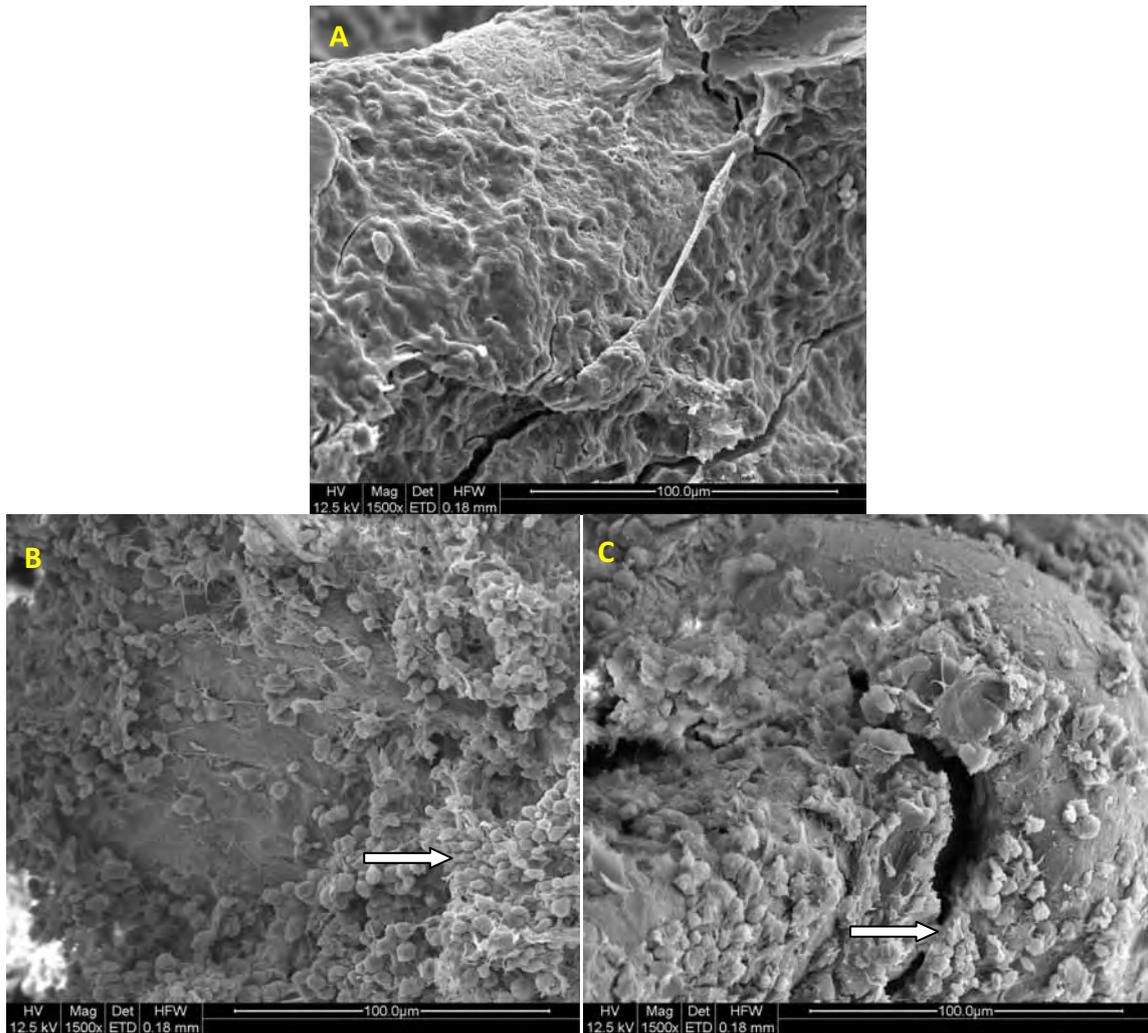


Figura 31- Micrografias do tecido ósseo, no 21º dia de pós-operatório, na microscopia eletrônica de varredura (aumento 1500x), mostrando em A, animal do grupo controle (GC), B do grupo diabético e em C do grupo insulina; as setas indicam proteoglicanas.

DISCUSSÃO

1. Quanto aos animais utilizados

O rato (*Rattus norvegicus*) tem sido o animal utilizado comumente em estudos sobre o diabetes experimental em nosso laboratório (SPADELLA, 1989; LERCO, 2000; PAIVA, 2001; MACHADO, 2002) e por pesquisadores de todo o mundo (JUNOD et al., 1967; ORLOFF et al., 1975; SCHELLINI, 1992). Este animal apresenta facilidade de manuseio, acomodação e alimentação; com resistência às infecções, quando comparados a outros animais de experimentação, e permite estudos em gaiolas metabólicas com padronização de inúmeras variáveis.

2. Quanto ao tempo de diabetes e observação dos animais

Os ratos da raça Wistar possuem vida média de dois anos. Ao iniciar o experimento os ratos tinham em média três meses de idade, e ao término, entre três e cinco meses, dos quais, um período de três semanas a um mês sob o regime de diabetes grave; o equivalente a 1/6 da vida média destes animais.

Confrontando o tempo de diabetes desse estudo com os demais trabalhos da literatura, observa-se que a grande maioria dos estudos sobre osseointegração utiliza pequenos períodos de tempo de diabetes, que variam de alguns dias a semanas (SIQUEIRA et al.2003; OTTONI & CHOPARD, 2004; KNOW et al., 2005; MCCRACKEN et al.,2006 HASEGAWA et al.,2008). Porém, a exemplo do nosso estudo, mesmo nos trabalhos de curta duração, as alterações decorrentes do diabetes em animais operados já estavam presentes precocemente (MADDEN e PEACOCK, 1968; PRAKASH et al., 1973; SPANHEIMER et al., 1988; BLACK et al., 1989). No presente estudo, desde o período de pós-indução do diabetes experimental, observou-se várias alterações clínicas e laboratoriais compatíveis com diabetes grave, acompanhadas de complicações crônicas e progressivas do diabetes, tais como emagrecimento, perda de líquido pela urina (poliúria), hiperglicemia, hipoinsulinemia crônica e altas taxas de hemoglobina glicosilada.

3. Quanto às técnicas utilizadas

3.1 Anestesia

A ketamina foi o agente anestésico utilizado no presente estudo, conjuntamente com a xilasina, por proporcionar maior facilidade na indução anestésica e manutenção duradoura do plano anestésico, durante todo o procedimento cirúrgico. Acresce-se a isto, a sua fácil

disponibilidade, baixo custo, além da larga experiência com estas drogas, por parte do nosso laboratório experimental, tendo sido os anestésicos de escolha em vários estudos (SUAREZ, 2010; CASSETARI, 2010).

3.2 Indução do diabetes experimental

O diabetes experimental pode ser provocado por estresse, infecções, toxinas, pancreatectomia (MERING e MINKOWSKI, 1889), lesões do sistema nervoso central (HETHERINGTON e RANSON, 1940), uso de hormônios antinsulínicos (MORDES e ROSSINI, 1985), exposição à hidrocortisona ou ACTH (CAVALLERO e MOSCA, 1953; LAZARUS e BENCOSME, 1955), indução por vírus (YOON, 1979) e o uso de agentes químicos beta-citotóxicos (DUNN et al., 1943; RAKIETEN et al., 1963). No presente estudo optou-se por um método químico de supressão endócrina do pâncreas, o qual exhibe todos os eventos bioquímicos, hormonais e morfológicos que ocorrem durante e após a indução do estado diabetogênico (MORDES e ROSSINI, 1985). Embora acompanhado de um elevado índice de mortalidade relativa, o método químico apresenta como vantagem a fácil execução, a possibilidade de se utilizar grande número de animais e o fato de estar perfeitamente padronizado no nosso laboratório experimental. Tem ainda a vantagem de ser seletivo, destruindo principalmente a porção endócrina do pâncreas. Dentre os agentes químicos mais utilizados na literatura para indução do diabetes experimental, destacam-se a aloxana e a estreptozotocina. Estas drogas causam diabetes por efeito tóxico sobre as células beta-pancreáticas (BELL e HYE, 1983), causando insuficiência insulínica primária do pâncreas, caracterizada por uma resposta trifásica sobre os níveis glicêmicos, durante as primeiras horas de administração, seguida do estabelecimento do diabetes permanente nas 24 horas subsequentes (JUNOD et al., 1967; MORDES e ROSSINI, 1985). A nossa pesquisa utilizou a aloxana por via endovenosa, cuja atividade diabetogênica foi inicialmente descrita por Dunn et al., em 1943. Apesar da maior especificidade da estreptozotocina sobre as células beta e sua menor toxicidade geral, a opção pela aloxana foi mantida por duas razões: a primeira de ordem econômica, dado o alto custo da estreptozotocina quando comparado com a aloxana, e a segunda, pelo uso amplamente difundido da aloxana, na indução do diabetes experimental, por inúmeros laboratórios de larga experiência no assunto (ORLOFF et al., 1975, 1988), incluindo o nosso laboratório (MACEDO et al., 1981, 1985, 1986; CALDERON, 1988; SPADELLA 1989; BREIM, 1990; SCHELLINI, 1992; MACHADO 1993, 2002; LERCO, 2000; PAIVA, 2001). Covington em 1993, realizou estudo comparativo entre as drogas indutoras do diabetes, aloxana e estreptozotocina, e concluiu que, apesar de seus diferentes

efeitos colaterais, a utilização de ambas é adequada para avaliação da cicatrização de feridas diabéticas. A aloxana administrada por via endovenosa, na dose de 42mg/kg de peso corporal (LAZAROW e PALAY, 1946; LUKENS, 1948), produziu em nossos animais, diabetes franco, com o desenvolvimento de alterações clínicas, laboratoriais, histopatológicas e estruturais bem definidas. Neste estudo, dos 340 animais submetidos à injeção endovenosa de aloxana, 163 ratos não ficaram diabéticos ou apresentaram a doença de forma leve a moderada, sendo desprezados. Os 177 animais restantes desenvolveram diabetes grave, com 79 óbitos durante o seguimento, principalmente nas primeiras 72 horas após a indução, e 26 óbitos após a cirurgia, em decorrência do ato anestésico, sendo 72 animais efetivamente utilizados neste experimento. Estes resultados são concordantes com os dois últimos estudos realizados nesta linha de pesquisa em nosso laboratório experimental. Paiva, em 2001, ao estudar o efeito do diabetes sobre o intestino sem a agressão cirúrgica obteve 27,6% de animais que não ficaram diabéticos e 42,3% de mortalidade durante os três meses de seguimento. Machado, em 2002, estudando o efeito do diabetes nas anastomoses intestinais, observou que 22,5% dos animais não ficaram diabéticos e obteve mortalidade de 50,3% durante o seguimento de três meses. Estudo realizado por Calderon, (1988) em nossa instituição, com ratas diabéticas não tratadas induzidas pela aloxana, mostrou resultados pouco discordantes destes trabalhos. A autora obteve 50% de animais diabéticos, 32,5% de animais resistentes à droga e uma taxa de mortalidade de 17,5%, até o 15º dia após a indução. Este índice diabetogênico elevado, explica-se, no entanto, pelos critérios de classificação do diabetes estabelecido pela autora, que considerou diabéticos os animais com glicemia maior ou igual a 120mg/dl. Se considerarmos apenas os ratos com valores glicêmicos superiores a 200mg/dl, observa-se que o seu percentual de animais diabéticos cai para 37,5%, valor próximo ao obtido no presente estudo. Com relação à taxa de mortalidade, Lukens, (1948), em extensa revisão da literatura a respeito da ação da aloxana sobre animais de várias espécies, incluindo o rato, o cão, o coelho, o macaco, o gato, mostrou índices muito variáveis de mortalidade, oscilando entre 33 a 100% na mesma espécie. Esta ampla variação tem etiologia multifatorial, envolvendo desde o estado de hidratação da droga, a velocidade de infusão, a via de administração, a dieta, o tempo de jejum, o peso do animal e até a interação com outras drogas capazes de influenciar seus mecanismos de ação, como os barbitúricos e o ácido nicotínico. Os ratos, animais utilizados neste estudo, são mais sensíveis a uma dose constante de aloxana após terem sido alimentados previamente com uma dieta de alto teor de gordura. Nestes casos, as taxas de mortalidade chegam a 90%. Por outro lado, dietas pobres em gordura, com altas concentrações de proteínas e carboidratos, são capazes de diminuir

estes índices para 33 a 40% (LUKENS, 1948). O jejum exerce importante papel na resposta do animal à aloxana. Dos ratos tratados com aloxana, que foram submetidos previamente a jejum de 48 a 60 horas, 95% tornaram-se diabéticos. Com a injeção de mesma dose de aloxana em animais onde não foi respeitado o jejum, a resposta diabetogênica à droga caiu para 25% (LUKENS, 1948). Outro aspecto a considerar é a via de administração da droga. A via endovenosa tem sido a escolha na maioria das espécies animais, onde os efeitos da aloxana são mais evidentes (LAZAROW e PALAY, 1946). A velocidade de infusão endovenosa também é importante, pois doses efetivas de aloxana não produzem diabetes se as mesmas forem injetadas muito lentamente. As vias subcutânea e intraperitoneal também são satisfatórias no rato, enquanto que no coelho, devem ser administradas doses muito elevadas por estas vias para que se atinja o mesmo efeito diabetogênico. Por fim, a via oral é usualmente insatisfatória para a ação da aloxana, muito embora o diabetes possa ser produzido em ratos, coelhos e gatos se a droga for rapidamente ingerida com comida, após jejum prévio prolongado (LUKENS, 1948). Gitter e Pietro (1946) relataram, segundo Lukens (1948), a importância do peso em relação à susceptibilidade do animal aos efeitos tóxicos da aloxana. Em um estudo detalhado em ratos, estes pesquisadores revelaram que a toxicidade da aloxana altera-se numa relação linear com o peso do animal, estabelecendo assim, a dose letal de aloxana para cada rato. Finalmente, algumas drogas exercem efeito direto ou indireto sobre os mecanismos de ação da aloxana. Os barbitúricos tornam os animais mais sensíveis aos efeitos da droga. Outras substâncias, como o ácido nicotínico, podem proteger o animal dos efeitos da aloxana, se administrados concomitantemente com a mesma (LUKENS, 1948).

4. Quanto à evolução clínica

Os parâmetros utilizados na avaliação clínica dos animais foram: peso corporal e diurese. Os animais não diabéticos (grupo controle), e diabéticos tratados com insulina apresentaram-se ao longo do experimento em bom estado geral e ativos. Neste estudo foi avaliada a diferença de peso dos animais nos diferentes momentos de sacrifício em relação ao momento da cirurgia, demonstrando assim, se os animais obtiveram ganho ou perda de peso entre cada momento. Os animais do grupo controle apresentaram queda de peso no primeiro momento de avaliação após a cirurgia (M7), com ganho de peso nos demais momentos. Os animais do grupo tratado com insulina apresentaram ganho de peso no primeiro momento pós-operatório (M7), e queda no segundo (M14). Ao final dos 21 dias de acompanhamento estes animais apresentaram ganho de peso em relação ao momento da cirurgia, atingindo valores superiores ao do grupo controle. Estes animais apresentaram ainda manutenção dos

valores de diurese, dentro dos padrões de normalidade para a espécie, de acordo com outros trabalhos da literatura (ORLOFF et al., 1975; BREKKE et al., 1980, 1981). Já os animais do grupo diabético, apresentaram apatia, alterações da pelagem, odor forte da urina, comprometimento do estado geral e episódios de pneumonia e piodermite, o que também foi descrito por outros autores (LEE et al., 1971, 1972; PRAKASH et al., 1973; ORLOFF et al., 1975; UEDA et al., 1979; BREKKE et al., 1980, 1981; MACEDO et al., 1981; CALDERON, 1988; SPADELLA, 1989; BREIM, 1990; LERCO, 2000; PAIVA, 2001; MACHADO, 2002). A poliúria, uma das características do estado hiperglicêmico, ocorreu nos animais do grupo diabético (GD), com valores estatisticamente significativos no momento da cirurgia em relação ao grupo controle, porém não apresentou diferenças significativas em relação aos grupos controle e insulina nos momentos de sacrifício, apesar de tendência a valores mais elevados. A poliúria é explicada pelo aumento elevado da concentração de glicose no filtrado glomerular, excedendo a capacidade das células tubulares em reabsorvê-la, dando origem à diurese osmótica (BONDY, 1973). No presente estudo, não houve diferenças marcantes na diurese dos animais do GD em relação aos demais, diferentemente de resultados anteriores em outros estudos desse mesmo grupo de pesquisa (ORTOLAN, 2006; CASSETTARI, 2010). Algumas hipóteses podem ser levantadas para esse fato. A primeira é a possibilidade da perda de urina antes da medida no laboratório experimental, apesar desse controle ter sido feito rigorosamente sempre pelo pós graduando, uma aluna de iniciação científica e um mesmo funcionário. A segunda hipótese cai sobre o menor tempo que os animais desse estudo ficaram diabéticos, em relação aos demais estudos desse grupo, onde o tempo de diabetes era padronizado em 3 meses. Esse fato poderia explicar a diurese aumentada no GD, mas ainda sem valores estatisticamente significativos.

5. Quanto aos exames laboratoriais

O estudo dos parâmetros laboratoriais nos grupos experimentais refletiu de um modo geral, o comportamento observado na evolução clínica. Durante todo o seguimento, os grupos de animais não diabéticos (GC), mantiveram-se com os valores de glicemia de jejum dentro dos padrões da normalidade, assim como os valores de hemoglobina glicosilada, o que está de acordo com vários trabalhos experimentais anteriores que utilizaram o rato. Os animais do grupo diabético apresentaram aumento na concentração de glicose plasmática e hemoglobina glicosilada, compatíveis com diabetes grave, o que está em conformidade com os resultados de outros autores em estudos com ratos diabéticos (SUAREZ, 2010; CASSETARI, 2010). O grupo de animais tratados com insulina obteve resultados de hemoglobina glicosilada que

diferiram estatisticamente dos grupos diabéticos e controles no momento da cirurgia. Mesmo sendo superior ao grupo controle, os valores foram estatisticamente diferentes e abaixo dos obtidos no grupo diabético. A glicemia no grupo tratado com insulina (GI) obteve média superior aos grupos controle e diabético, pois nestes animais não foi conseguido jejum de 24 horas, devido à alta mortalidade após voltarem a ser alimentados. Para certificar que o diabetes estava controlado neste grupo foi realizado o exame de hemoglobina glicosilada. Os três grupos apresentaram resultados estatisticamente diferentes em todos os momentos de análise, sendo os maiores valores apresentados no GD, e os menores no GC, com valores intermediários no GI. A hemoglobina glicosilada é uma forma eficaz de avaliar o controle glicêmico, onde níveis controlados reduzem os riscos de desenvolvimento de complicações da doença (SUMITA & ANDRIOLO, 2006). Os valores de insulina não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos, porém valores inferiores foram observados no GD em todos momentos de sacrifício, enquanto que nos momentos M7 e M14 o GI obteve valores próximos ao grupo controle e superiores no momento M21. A diminuição dos valores de insulina plasmática em animais diabéticos é compatível com a fisiopatologia da doença (LUKENS, 1948).

6. Quanto ao local escolhido para colocar os implantes

Antes de optarmos pela realização dos implantes nos fêmures dos animais, realizamos estudo piloto com colocação de implantes na maxila dos ratos. Nesse local, os implantes das dimensões que dispúnhamos não ficaram firmes no tecido ósseo e a cavidade bucal do rato é de difícil controle da higiene, ficando mais susceptível à infecções. Por esse motivo optamos por instalar implantes no fêmur dos animais, pois esta região permite melhor acesso cirúrgico, controle pós-cirúrgico e possibilita avaliação do osso lamelar formado ao redor dos implantes, da mesma forma que e fossem instalados na maxila (SHYNG et al., 2006). Vários animais tem sido utilizados para o estudo da osseointegração de implantes dentários como ratos (RINALDI & ARANA-CHAVEZ, 2010), minipigs (SCHLIEPHAKE et al., 2010) e coelhos (PALMQUIST et al., 2009), sem, no entanto, haver motivo específico além das facilidades de cada laboratório experimental para a escolha do animal. Nos ratos, estudos em osseointegração já foram realizados em fêmur (BERLEY et al., 2010), tibia (IYAMA et al., 1997) e maxila (SHYNG et al., 2006).

7. Quanto à análise à microscopia óptica

Ao analisarmos animais diabéticos sem tratamento, pudemos verificar que houve um atraso na formação óssea. Isto ocorreu devido a uma menor quantidade de osteoblastos neste grupo, que por sua vez depositam uma menor quantidade de substância osteóide. Aos 21 dias de pós-operatório essa deposição se torna semelhante ao grupo controle aos 7 dias de pós-operatório, demonstrando que ocorre dificuldade de formação do tecido ósseo imaturo em ratos diabéticos sem tratamento em relação ao grupo controle. Esses achados vão de encontro aos estudos que demonstram que em animais diabéticos sem tratamento ocorrem mudanças na formação óssea, caracterizadas pela diminuição da osteogênese, menor renovação celular, osso neoformado com baixa densidade mineral e atraso no reparo das fraturas (CANALIS, 1980; GLAJCHEN et al., 1988; YANO et al., 1996; FANG, 2006). Existem também diferenças no padrão de maturação óssea de ratos diabéticos, pois o osso neoformado é imaturo e desorganizado, (NEVINS et al., 1998). A formação óssea, quando comparados os dois grupos, revela que o grupo diabético terá sempre maior dificuldade de deposição da matriz óssea, e que não deverá atingir os valores normais, pois os osteoblastos apresentam-se sempre em menor quantidade, além de atingir sua máxima quantidade e concentração difusa tardiamente. Os resultados obtidos por Santana et al.(2003), demonstram que a hiperglicemia atua na inibição da diferenciação de osteoblastos. Segundo Weiss et al. (1981), a hiperglicemia também possui efeito deletério para aderência, crescimento e acúmulo da matriz óssea extracelular.

Ao analisarmos o grupo de animais tratados com insulina a disposição das trabéculas ósseas apresentou-se intermitente, demonstrando um tecido ósseo mais “frágil”, não se assemelhando ao grupo controle que possuía trabéculas contínuas, demonstrando uma maior mineralização óssea, mais firme e resistente. No grupo insulina a formação osteóide inicial atinge um valor intermediário ao ser comparado com os outros dois grupos. No período de 21 dias de pós-operatório, houve uma diminuição da formação osteóide, devido à maturação do tecido ósseo, semelhantemente ao que ocorreu no grupo controle. É possível observar que em um primeiro instante a insulina possui efeito positivo na formação osteóide, não atingindo resultados iguais ao grupo controle, mas fazendo com que estes se assemelhem, principalmente na velocidade da maturação do tecido. Resultados semelhantes foram obtidos por Fiorellini et al., (1999), que em estudo com ratos diabéticos durante 28 dias, também não conseguiram igualar o contato osso implante quando comparado ao grupo controle. Já é sabido que a insulina estimula a síntese de matriz e estimula o metabolismo ósseo (Canallis, 1980).

Embora vários estudos tenham mostrado que a terapia com insulina permite uma regulação da formação óssea ao redor dos implantes e aumenta a quantidade de osso neoformado (SIQUEIRA et al., 2003; KNOW et al., 2005; MCCRACKEN et al., 2006; RETZEPI et al., 2010), como no nosso estudo, Fiorellini et al. (1999) também não conseguiram igualar o contato osso-implante, quando comparados com grupos não diabéticos.

Na análise da formação óssea foi também avaliada a presença de osteócitos. Mesmo não tendo diferenças estatísticas entre os grupos, a presença de osteócitos é maior em todos os momentos no grupo controle. No grupo diabético os osteócitos apresentam-se de maneira focalizada não abrangendo toda área perimplantar, diferente do grupo controle que apresenta distribuição difusa, e do grupo insulina que mesmo não apresentando distribuição em toda área, os osteócitos estão dispostos de maneira difusa na área perimplantar. Resultados apresentados por Nyomba et al., (1989), demonstraram que o diabetes pode provocar menor produção de osteóide, homeostasia mineral e formação óssea por consequência. Siqueira et al. (2003), demonstraram que quando os implantes são colocados na tíbia de ratos diabéticos, uma redução de 50% pode ser observada na área de formação óssea e na superfície de contato entre o osso e o implante. Se a insulina é usada, as características ultra-estruturais da interface osso-implante tornam-se semelhantes aos do grupo controle. Estes resultados sugerem que o controle metabólico é essencial para que ocorra osseointegração. Em nosso estudo também foram analisadas a quantidade e distribuição dos osteoclastos. No grupo controle os osteoclastos estavam presentes inicialmente em quantidade moderada, e se tornaram ausentes aos 14 dias de pós-operatório. No grupo diabético estavam presentes inicialmente de forma moderada e se tornaram ausentes aos 21 dias de pós-operatório. A atividade osteoclástica, assim como a atividade osteoblástica, é inibida em animais diabéticos (MCCRACKEN et al., 2006). Nossos resultados demonstraram que o grupo tratado com insulina possui uma remodelação óssea tardia em relação ao grupo controle, porém ela ocorre de forma mais eficaz do que no grupo diabético.

Outro fator analisado e de suma importância para que ocorra todo processo de formação óssea é a presença de vasos sanguíneos na área estudada. Os danos microvasculares alteram a cicatrização em diferentes tecidos e levam a complicações que resultam em retinopatias e nefropatias (LALLA et al., 2000), assim como pode ocorrer alterações funcionais na permeabilidade vascular e em células endoteliais (MEALEY & MORITZ, 2003). No nosso estudo, a presença de vasos sanguíneos ocorreu inicialmente em quantidade elevada e diminuíram aos 21 dias de pós-operatório no grupo controle, nos momentos M7 e M14 distribuíram-se de forma difusa na área perimplantar, demonstrando que a região estava

sendo nutrida, permitindo a chegada das células para remodelação e formação óssea, deposição de matriz celular e manutenção da osseointegração. O grupo diabético apresentou uma mesma quantidade de vasos sanguíneos em todos os três momentos, distribuídos de forma focalizada, não abrangendo toda área perimplantar. Isso se reflete na maior dificuldade do grupo diabético em formar e mineralizar o tecido ósseo, levando a uma osseointegração deficiente, com a presença de fibroblastos, podendo ocorrer necrose da área devido à falta de nutrição pelos vasos sanguíneos. Mealey & Moritz (2003) concluíram que níveis elevados de glicose sanguínea estão associados com distúrbios microvasculares e celulares, resultando em cicatrização prejudicada. O grupo insulina apresentou quantidade semelhante de vasos sanguíneos ao grupo controle, porém com menor distribuição na área perimplantar. A formação dos vasos sanguíneos atinge, aos 21 dias de pós-operatório os mesmos valores no escore nos três grupos, porém neste momento os grupos controle e insulina já apresentavam uma formação óssea mineralizada, enquanto no grupo diabético ainda havia atividade celular, formação óssea, e osseointegração em processo de conclusão, sem trabéculas definidas, o que exigiria maior irrigação e fornecimento de células do que estava sendo fornecido para que ocorresse formação óssea e osseointegração. Com os vasos sanguíneos em menor concentração o processo de reparação foi prejudicado tanto em sua velocidade quanto na qualidade da formação óssea final e osseointegração. Apesar dos vários estudos com avaliação histológica da osseointegração de implantes em animais diabéticos em diferentes momentos de pós-operatório (NEVINS et al., 1998; HASEGAWA et al., 2008; KNOW et al., 2005), esses não descrevem a presença e distribuição de vasos sanguíneos no sítio cirúrgico, fator crucial para a bem sucedida integração do implante.

A formação de tecidos indesejados na área de formação óssea ocorreu em nosso estudo. No grupo diabético houve aparecimento de fibroblastos na região perimplantar, o que interfere na osseointegração, já que estas células irão resultar em fibrose da área, antes da diferenciação dos osteoblastos. A presença de necrose nesse grupo confirma que a destruição tecidual é resultante da presença de infiltrado inflamatório (SCHMIDT et al, 1996).

8. Quanto à análise ultraestrutural das fibras de colágeno

A matriz óssea é composta por uma parte orgânica (fibrilas de colágeno, fibras elásticas e proteoglicanas) e uma parte inorgânica cuja composição é dada basicamente por íons fosfato e cálcio formando cristais de hidroxiapatita, que oferecem grande resistência mecânica. A parte orgânica é composta por 95% de colágeno tipo I. O colágeno tipo I, está presente nos ossos e possui a função de resistência à trações. Proteoglicanas são proteínas extracelulares ligadas às glicosaminoglicanas. As proteoglicanas têm a função de dar rigidez à matriz, resistindo à compressão e preenchendo espaços. Ruoslahti (1988), em extensa revisão de literatura sobre a estrutura das proteoglicanas, relatou que estas substâncias são proteínas com diferentes estruturas e funções, sendo uma das principais, o fato de as mesmas comporem a matriz extracelular e participarem dos fenômenos de adesão celular. Estas proteínas, apesar da diversidade de estruturas, são consideradas um grupo, graças às glicosaminoglicanas, que estão sempre ligadas às proteoglicanas, dando-lhes certa uniformidade e ligando-as a outras moléculas da matriz; fato que confere às proteoglicanas a capacidade de regular a espessura das fibrilas de colágeno. Vários autores (KOMURO e HASHIMOTO, 1990; KLEIN, 1983; KOMURO, 1988; PRADO, 2005) sugerem que o diâmetro das fibras colágenas pode estar relacionado à concentração de proteoglicanas presentes, sendo que, quanto maior a quantidade de proteoglicanas, menor o diâmetro das fibrilas colágenas. Estas conclusões foram apoiadas nos estudos de Cetta et al., 1982, que mostraram que o diâmetro das fibrilas colágenas de tendões aumentou com a idade do rato, enquanto que a concentração de proteoglicanas diminuiu. Azambuja (2009), observou, após 60 dias em análise de microscopia eletrônica de varredura implantes com a superfície tratada (jato + ácido) realizados em ovelha que nos espaços entre as roscas houve preenchimento de osso com sistemas e canais de Havers visíveis, demonstrando que o osso cortical apresenta-se com função normal, mantendo o contato osso-implante ao longo do tempo. Linder et al.(1983), em estudo em coelhos à microscopia eletrônica de transmissão observaram que no contato osso-implante existe uma camada de proteoglicanas, separando o colágeno da superfície do implante. Albrektsson & Jacobson (1987), através de estudos demonstraram com auxílio de microscopia eletrônica, a produção de uma fina película (200 a 300 Å) de proteoglicanas na interface osso-titânio. A mesma fica aderida à face de titânio e interposta entre o parafuso inicialmente desnudado e o osso alveolar. Na porção mais externa do filme de proteoglicanas, próxima ao osso alveolar, dispõem-se aleatoriamente *fibrilas* colágenas.

No estudo da osseointegração de implantes dentários, as pesquisas feitas utilizando-se a microscopia eletrônica de varredura, na grande maioria das vezes visa a avaliação da

osseointegração nas superfícies dos diferentes tipos de implantes existentes no mercado, sem levar em consideração o fator mais importante para que a integração ocorra adequadamente, que são as características dos receptores desses implantes (PARK et al., 2009; TETÈ et al., 2009; YANG et al., 2010; WENNERBERG et al., 2010; CASTELLANI et al., 2011).

A microscopia eletrônica de varredura já foi utilizada em estudos dos efeitos do diabetes, com ou sem intervenções cirúrgicas, na retina (HAMILTON et al., 1982), no intestino de ratos (ORTOLAN, 2008), nos rins de ratos (MAKINO et al., 1993) e macacos (MARION e CARLSON, 1989) e nos ossos (FOLLAK et al., 2003), entre outros órgãos. Follak et al., (2003), analisaram o tecido ósseo formado ao redor fios de Kirschner em fêmures de animais diabéticos geneticamente modificados, sem tratamento e com tratamento de insulina através de microscopia eletrônica de varredura, com 7, 14, 24 e 42 dias de pós-operatório, e concluíram que as fases iniciais da cicatrização óssea são as mais prejudicadas pelo diabetes. Estudos experimentais dos efeitos do diabetes na osseointegração de implantes dentários utilizando a microscopia eletrônica de varredura são necessários pois este método é de grande valia no estudo da formação óssea, propiciando a análise e descrição de amostras em tamanho maior, permitindo uma visão global do arranjo ultraestrutural da matriz óssea. No presente estudo, o GC apresentou contato íntimo entre o osso neoformado e a superfície do implante, o que não ocorreu no GD, onde foram observados espaços nestas mesmas áreas, já no GI foram notados espaços menores. O tecido ósseo apresentou no GC estrutura densa, com poucos espaços vazios, assim como no GI, o mesmo não ocorreu no GD que apresentou matriz óssea de aspecto frouxo, arranjo irregular, trabéculas finas, mais espaços vazios. As proteoglicanas apresentaram-se em elevada quantidade no GD, quantidade discreta no GC e moderada quantidade no GI.

Com base em estudos citados anteriormente, pode-se sugerir que no nosso estudo, a presença maciça de proteoglicanas nos animais diabéticos, pode ser o mecanismo responsável pelo fato da matriz ter aspecto mais frouxo e ser composta por trabéculas finas, com grandes espaços vazios. Essa imaturidade da matriz nos ratos diabéticos sem tratamento demonstra que o tecido ósseo formado ao redor dos implantes não apresenta a mesma resistência ao comparar-se ao grupo controle. Os resultados da formação de tecido ósseo dos animais diabéticos tratados com insulina se aproximam dos animais do grupo controle, sugerindo uma maior resistência ao se comparar com o grupo diabético. No entanto, a presença de proteoglicanas nesse grupo sugere um atraso na organização e maturação da matriz.

CONCLUSÕES

- O diabetes provocou alterações histopatológicas e estruturais na osseointegração de implantes no fêmur de ratos diabéticos.
- A terapia com insulina permitiu uma melhora no padrão da osseointegração dos implantes, porém não sendo possível igualar os resultados obtidos no grupo controle.

RESUMO

Introdução: O diabetes mellitus é considerado hoje, um problema de saúde pública mundial. Na odontologia está associado à doença periodontal, aumentando as chances de perda do elemento dental nos pacientes diabéticos. Implantes dentários são cada vez mais utilizados em pacientes parcialmente ou totalmente edêntulos para reposição dessas perdas. Estudos experimentais, para viabilizar o tratamento dentário de diabéticos através de implantes são cada vez mais freqüentes. Dada a relevância do tema, ainda existem lacunas no estudo da osseointegração de implantes em animais diabéticos. Por isso, visando dar seqüência a esses estudos experimentais já existentes, esse estudo foi delineado para avaliação da osseointegração de implantes dentários em animais normais, diabéticos e diabéticos tratados com insulina, utilizando parâmetros adicionais nunca antes avaliados.

Objetivo: O presente estudo teve como objetivo avaliar a formação óssea ao redor de implantes dentários em ratos diabéticos aloxânicos controlados com insulina, em relação a ratos não diabéticos e diabéticos não controlados.

Materiais e Métodos: foram avaliados 72 ratos da raça Wistar, machos, sadios ao exame clínico, pesando entre 200 e 300g, distribuídos em três grupos experimentais de 24 animais cada, sendo um grupo controle normal (GC), um grupo diabético sem tratamento (GD) e um grupo diabético tratado com insulina (GI). Os animais receberam os implantes dentários no fêmur direito e foram avaliados em três momentos pós-operatórios (7º, 14º e 21º dias), onde foram analisadas a evolução clínica (peso corporal e diurese), exames laboratoriais (glicemia de jejum, hemoglobina glicosilada e insulina sérica). Em cada um dos momentos mencionados os animais foram sacrificados e retirado o fêmur com o implante, sendo espécimes de 4 animais utilizados para análise ultraestrutural das fibras colágenas, à microscopia eletrônica de varredura, e outros 4 para o estudo histopatológico à microscopia óptica pelo método de coloração H.E. A indução do diabetes foi feita por meio da injeção endovenosa de aloxana a 2%, em dose única de 42mg/kg. Foram incluídos no experimento somente animais com diabetes grave caracterizados por valores glicêmicos acima de 200mg/dl e glicosúria maior ou igual a 3+ em fitas reagentes.

Resultados: A análise histopatológica à microscopia óptica demonstrou que o GC apresentou inicialmente (M7) elevada presença de substância osteóide e osteoblastos e elevada presença de vasos sanguíneos. Após maturação, a formação óssea apresentou-se regular e contínua com elevada presença de osteócitos (M21); o GD apresentou inicialmente discreta presença de vasos sanguíneos e formação osteóide elevada somente após 21 dias de acompanhamento, neste grupo também foram detectadas áreas de necrose e fibrose; o GI

apresentou valores intermediários de escores, a disposição das trabéculas ósseas apresentaram-se intermitentes, demonstrando um tecido ósseo mais “frágil”, porém mineralizado aos 21 dias de acompanhamento. A análise ultraestrutural à microscopia eletrônica de varredura demonstrou que o GC apresentou estrutura óssea densa, com poucos espaços vazios e pequena quantidade de proteoglicanas. Já o GD apresentou matriz óssea de aspecto frouxo, arranjo irregular, trabéculas finas, mais espaços vazios e a presença de grande quantidade de proteoglicanas. O GI teve resultados semelhantes ao GC, mas com maior quantidade de proteoglicanas.

Conclusão: O diabetes provocou alterações histopatológicas e estruturais na osseointegração de implantes no fêmur de ratos diabéticos. A terapia com insulina permitiu uma melhora no padrão da osseointegração dos implantes, porém não sendo possível igualar os resultados aos obtidos no grupo controle.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus ; Implantes dentários; Insulina; Osseointegração.

SUMMARY

Introduction: Diabetes mellitus is nowadays a public health problem worldwide. In dentistry is associated with periodontal disease, increasing the possibilities of tooth loss in diabetic patients. Dental implants are been commonly used in patients partially or completely edentulous to replace these losses. Experimental studies, to enable the dental treatment of diabetics through implants are becoming more frequent. Despite the relevance of the issue, there are still gaps in the study of osseointegration of implants in diabetic animals. Therefore, in order to fulfill some of these questions, this study was designed to evaluate the osseointegration of dental implants in normal, diabetic and diabetic treated with insulin animals, using additional parameters never studied before.

Objective: This study aimed to evaluate bone formation around dental implants in alloxan diabetic rats without treatment, controlled with insulin, and non diabetic rats.

Materials and Methods: 72 Wistar rats, male, healthy at clinical examination, weighing between 200 and 300g were divided into three experimental groups of 24 animals each, a normal control group (CG), an untreated diabetic group (DG) and a diabetic group treated with insulin (IG). The animals received dental implants in the right femur and were assessed at three post-operative moments (7, 14 and 21 days), which analyzed clinical (body weight and diuresis) and laboratorial parameters (fasting glucose, hemoglobin glycosylated and serum insulin). In each of the mentioned moments the animals were sacrificed and the femur with the implant was removed, and four specimens of animals used for ultrastructural analysis on scanning electron microscopy, and another 4 to histopathological examination by light microscopy method HE staining. Induction of diabetes was made by intravenous injection of alloxan 2% in a single dose of 42mg/kg. Were included in the experiment only animals with severe diabetes characterized by elevated blood glucose levels above 200mg/dl and glycosuria equal or greater than 3+ in strips.

Results: Histopathologic analysis by optical microscopy showed that the CG had a high presence of osteoblasts and osteoid substance initially (M7) and high presence of blood vessels. After maturation, bone formation had become regular and continuing with large numbers of osteocytes (M21), DG had initially a slight presence of blood vessels and high osteoid formation only after 21 days. In this group was also detected areas of necrosis and fibrosis. The IG scores showed intermediate values, the arrangement of bone trabeculae showed up intermittently, with a bone more "fragile", but mineralized at 21 days monitoring. The ultrastructural analysis by scanning electron microscopy showed that the CG had dense bone structure with few voids and a small amount of proteoglycans.

The DG had bone matrix aspect of loose, irregular arrangement trabeculae thinner, empty spaces and the presence of large amounts of proteoglycans. The IG was similar to CG, but with greater amounts of proteoglycan.

Conclusion: Diabetes caused structural and histopathological changes in the osseointegration of implants in the femur of diabetic rats. The insulin therapy allowed an improvement in the pattern of osseointegration of implants, but it was not possible to match the results obtained in the control group.

Key words: Diabetes Mellitus; Dental Implants; Insulin; Osseointegration.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELL, R.; ERIKSSON, B.; LEKHOLM, U.; BRANEMARK, P.I.; JEMT T. Long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws. **Int. J. Oral. Maxillofac. Implants**, v.5, p347-359,1990.

ADELL, R.; LEKHOLM, U.; ROCKLER, B.; BRÅNEMARK, P.I. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. **Int. J. Oral. Surg.**, v.10, p387-416, 1981.

ADELL, R. Clinical results of osseointegrated implants supporting fixed prostheses in edentulous jaws. **J. Prosthet. Dent.**, v.50, p251-254,1983.

ALBREKTSSON, T.; BRANEMARK, P.I.; HANSSON, H.A., LINDSTRON, J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. **Acta. Orthop. Scand.**, v.52, n.2, p.155-170,1981.

ALBREKTSSON, T.; JACOBSSON, M. Bone-metal interface in osseointegration. **J. Prosthet. Dent.**, v.57, p.597-607, 1987.

AN, Y.H.; MARTIN, K.L. Handbook of histology methods for bone and cartilage. Totowa : Humana Press, 2003.

AZAMBUJA, F. G. **Estudo estrutural e ultraestrutural da interface osso-implante em ovelhas. Dissertação** (Mestrado em cirurgia e traumatologia bucomaxilofacial) - Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

BELL JR, R.H.; HYE, R.J. Animal models of diabetes mellitus: Physiology and Pathology. **J. Surg. Res.**, v.35, p.433-460, 1983.

BERLEY, J.; YAMANO, S.; SUKOTJO, C. The effect of systemic nicotine on osseointegration of titanium implants in the rat femur. **J. Oral. Implantol.**, v.36, n.3, p.185-193, 2010.

BLACK, C.T.; HENNESSEY, P.J.; FORD, E.G.; ANDRASSY, R.J. Protein glycosylation and collagen metabolism in normal and diabetic rats. **J. Surg. Res.**, v.47, p.200-205, 1989.

BONDY, P.K. Distúrbios do metabolismo dos hidratos de carbono. In: BEESON, P.B.; McDEMOTT, W. **Tratado de Medicina**. 13.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1973, v.2, p.1627-1643.

BRANEMARK, P.I.; ADELL, R.; BREINE, U.; HANSSON, B.O.; LINDSTROM, J.; OHLSSON, A. Intraosseous anchorage of dental prostheses. Part I: experimental studies. **Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg.**, v.3, p.81-100, 1969.

BRANEMARK, P.I.; HANSSON, B.O.; ADELL, R.; BREINE, U.; LINDSTRÖM, J.; HALLÉN, O.; OHMAN, A. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10 year period. **Scand. J. Plast. Reconstr.**, v.16, suppl, p1-132, 1977.

BREIM, L.C. **Estudo comparativo entre o transplante total de pâncreas, transplante de ilhotas de Langerhans, e o tratamento convencional com insulina no controle das manifestações clínicas do diabetes aloxânico no rato.** 127f. Dissertação (Mestrado) em Bases Gerais da Cirurgia e Cirurgia Experimental – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1990.

BREKKE, I.B.; GULLESEN, I.; REFSUM, S.B.; FLATMARK, A. Long-term endocrine function of duct-ligated pancreas isotransplants in rats. **Eur. Surg. Res.**, v.12, p.167-178, 1980.

BREKKE, I.B.; HOSTMARK, A.T.; FLATEN, O.; OYASAETER, O. Effect of pancreas transplantation on plasma lipids and plasma concentrations of pancreatic hormones in streptozotocin diabetic rats. **Eur. Surg. Res.**, v.13, p.361- 370, 1981.

CALDERON, I.M.P. **Modelo experimental em ratas para o estudo do binômio diabetes e gravidez.** 125f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1988.

CANALIS, E. Effect of insulin-like growth factor I on DNA and protein synthesis in properties of collagen fibrils in rat intestine. **Connect. Tissue Res.**,v.12, p.71-78, 1983.

CASSETARI, L.L. **Efeitos da corrente elétrica contínua isolada e da iontoforese transdermal, associada ao zinco, sobre a resistência mecânica e o conteúdo de hidroxiprolina de cicatrizes realizadas na pele de ratos diabéticos aloxânicos.** Dissertação (Mestrado em Bases Gerais da Cirurgia e Cirurgia Experimental) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

CASTELLANI, C.; LINDTNER, R.A.; HAUSBRANDT, P.; TSCHEGG, E., STANZL-TSCHEGG, S.E.; ZANONI, G. et al. Bone-implant interface strength and osseointegration: Biodegradable magnesium alloy versus standard titanium control. **Acta Biomater.**, v.7, n.1, p.432-440, 2011.

CAVALLERO, C.; MOSCA, L. Mitotic activity in the pancreatic islets of the rat under pituitary growth hormone and adrenocorticotrophic hormone treatment. **J. Pathol. Bacteriol.**, v.66, p.147-151, 1953.

CETTA, G.; TENNI, R.; ZANABONI, G.; IPPOLITO, E.; DE MARTINO, C. Biochemical and morphological modifications in rabbit Achilles tendon during maturation and ageing. **Biochem J.**, v.204, p.61-67,1982.

COCHRAN, D.L. The scientific basis for and clinical experiences with Straumann implants including the ITI Dental Implant System: a consensus report. **Clinical Oral Implants Res.**, V.11, suppl.1, p. 33-58, 2000.

COTRAN, R.D.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. Pathologic basis of disease. In:____. **Diabetes Mellitus.**, 4. ed. Philadelphia: Saunders, 1989. p.99-110.

COURTNEY, M.W.; SNIDER, T.N.; COTTRELL, D.A. Dental Implant Placement in Type II Diabetics: A Review of the Literature. **J. Mass. Dent. Soc.**, v.59, n.1, p.12-14, 2010.

COVINGTON, D.S.; XUE, H.; PIZZINI, R.; LALLY, K.P.; ANDRASSY, R.J. Streptozotocin and alloxan are comparable agents in the diabetic model of impaired wound healing. **Diabetes Res.**, v.23, n.2, p47-53, 1993.

DIABETES COMPLICATIONS AND CONTROL TRIAL (DCCT). Research Group. The effect of long-term complications of insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.*, p.977-986, 1993.

DUNN, J.S.; SHEEHAN, H.L.; McLETCHIE, N.G.B. Necrosis of islets of Langerhans produced experimentally. **Lancet**, v.1, p.484-487, 1943.

FANG, Y.; WANG, Z.Y.; MAO, Y.; XIN, H.T.; REN, G.L.; BAI, X.F. Effects of insulin-like growth factor I on the development of osteoblasts in hyperglycemia. **Diab. Res. Clin. Pract.**, v.73, n.1, p.95-97, 2006.

FARZAD, P.; ANDERSSON, L.; NYBERG, J. Dental implant treatment in diabetic patients. **Implant. Dent.**, v.11, p.262-267, 2002.

FIORELLINI, J.P.; MARTUSCELLI, G.; WEBBER, H.P. Longitudinal studies of implant systems. **Periodontol.**, v.17, p. 125-131, 2000.

FIORELLINI, J.P.; NEVINS, M.L.; NORKIN, A.; WEBER, H.P.; KARIMBUX, N.Y.; The effect of insulin therapy on osseointegration in a diabetic rat model. **Clin. Oral. Implants Res.**, v.10, p.362-368, 1999.

FOLLAK, N.; KLOTING, I.; GANZER, D.; MERK, H. Scanning electron microscopic examinations on retarded bone defect healing in spontaneously diabetic BB/O(ttawa)K(arlsburg) rats. **Histol. Histopathol.**, v.18, p.111-120, 2003.

GLAJCHEN, N.; EPSTEIN, S.; ISMAIL, F.; THOMAS, S.; FALLON, M.; CHAKRABARTI, S. Bone mineral metabolism in experimental diabetes mellitus: osteocalcin as a measure of bone remodeling. **Endocrinology**, v.123, p.290-295, 1988.

GOODSON, W.H.; HUNT, T.K. Studies of wound healing in experimental diabetes mellitus. **J. Surg. Res.**, v.22, p.221-224, 1977.

GOTTRUP, F.; ANDREASSEN, T.T. Healing of incisional wounds in stomach and duodenum: the influence of experimental diabetes. **J. Surg. Res.**, v.31, p.61-68, 1981.

GUO, Z.; ZHOU, L.; RONG, M.; ZHU, A.; GENG, H. Bone response to a pure titanium implant surface modified by laser etching and microarcoxidation. **Int. J. Oral. Maxillofac. Implants.** v.25, p.130-136, 2010.

HAMILTON, C.W.; CHANDLER, D.B.S.; KLINTWORTH, G.K.; MACHEMER, R. A transmission and scanning electron microscopic study of surgically excised preretinal membrane proliferations in diabetes mellitus. **Am. J. Ophthalmol.**, v.94, p.473-488, 1982.

HASEGAWA, H.; OZAWA, S.; HASHIMOTO, K.; TAKEICHI, T.; OGAWA, T. Type 2 diabetes impairs implant osseointegration capacity in rats. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants.**, v.23, p.237-246, 2008.

HETHERINGTON, A.W.; RANSON, S.W. Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. **Anat. Rec.**, v.78, p.149-153, 1940.

IYAMA, S.; TAKESHITA, F.; AYUKAWA, Y.; KIDO, M.A.; SUETSUGU, T.; TANAKA, T. A study of the regional distribution of bone formed around hydroxyapatite implants in the tibiae of streptozotocin-induced diabetic rats using multiple fluorescent labeling and confocal laser scanning microscopy. **J Periodontol.**, v.68, n.12, p.1169-1175, 1997.

JAWED, F.; ROMANOS, G.E. Impact of Diabetes Mellitus and Glycemic Control on the Osseointegration of Dental Implants: A Systematic Literature Review. **J. Periodontol.**, v.80, p.1719-1730, 2009.

JUNOD, A.; LAMBERT, A.E.; ORCI, L.; PICTET, R.; GONET, A.E.; RENOLD, A.E. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. **Proc. Soc. Exp. Biol.**, v.126, p.201-205, 1967.

KLEIN, L.; EICHELBERGER, H.; MIRIAN, M.; HILTNER, A. Ultrastructural properties of collagen fiberils In rat intestine. **Connective Tissue Res.**, v.12, p.71-78, 1983.

KRÓLEWSKI, A.S.; WARRAM, J.H.; RAND, L.I.; KANN, C.R. Epidemiologic approach to the etiology of type I diabetes mellitus and its complications. **N. Engl. J. Med.**, v.317, p.1390-1398, 1987.

KOMURO, T. The lattice arrangement of the collagen fibres in the submucosa of the rat small intestine: scanning electron microscopy. **Cell Tissue Res.**, v.251, p.117-121,1988.

KOMURO, T.; HASHIMOTO, Y. Three-dimensional structure of the rat intestinal wall (mucosa and submucosa). **Arch. Histol. Cytol.**, v.53, p.1-21, 1990.

KWON, P.T.; RAHMAN, S.S.; KIM, D.M.; KOPMAN, J.A.; KARIMBUX, N.Y.; FIORELLINI, J.P. Maintenance of osseointegration utilizing insulin therapy in a diabetic rat model. **J. Periodontol.**, v.74, n.4, p.621-626, 2005.

LA PORTE, R.E. Criuckshanks: incidence and risk factors for insulin-dependent diabetes. In: HARRIS, M.I.; HAMMAN, R.F. (Eds). **Diabetes in America**. Bethesda: Nacional Diabetes Data Group, NIADDK/US, Dept Health and Human Services, 1985.
p. 1-12.

LALLA, E.; LAMSTER, I.B.; DRURY, S.; FU, C.; SCHMIDT, A.M. Hyperglycemia, lycoxidation and receptor for advanced glycation endproducts: potential mechanisms underlying diabetic complications, including diabetes-associated periodontitis. **Periodontol 2000.**, v.23, p.50-62, 2000.

LAZARUS, S.S.; BENCOSME, S.A. Alterations of pancreas during cortisone diabetes in rabbits. **Proc. Soc. Exp. Biol.**, v.89, p.114-119,1955.

LAZAROW, A.; PALAY, S.L. Production and course of alloxan diabetes in rats. **J. Lab. Clin. Med.**, v.31, p.1004-1015, 1946.

LEE, S.; CHANDLER, J.G.; KRUBEL, R.; NAKAJI, N.T.; ROSEN, H.; ORLOFF, M.J. Relief of diabetes mellitus by heterotopic transplantation in the rat. **Surg. Forum**, v.22, p.75-77, 1971.

LEE, S.; TUNG, K.S.K.; KOOPMAN, H, et al. Pancreaticoduodenal transplantation in the rat. **Transplantation**, v.13, p.421-425, 1972.

LERCO, M. M. **Caracterização do modelo experimental de Diabetes mellitus induzido pela aloxana: estudo clínico, laboratorial e histopatológico do rim, retina, coronária, aorta e artéria ilíaca do rato.** Dissertação (Mestrado em Bases Gerais da Cirurgia e Cirurgia Experimental) – Faculdade de Medicina , Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.

LINDER, L.; ALBREKTSSON, T.; BRANEMARK, P.I.; HANSSON, H.A.; IVARSSON, B.; JÖNSSON, U. et al. Electron microscopic analysis of the bone - titanium interface. **Acta orthop. scand.**, V.54, p.45-52, 1983.

LUKENS, F.D.W. Alloxan diabetes. **Physiol. Rev.**, v.28, p. 304-330, 1948.

MACEDO, A.R.; GREENLEAF, G.E.; SAYERS, H.J.; ORLOFF, M.J. Effect of whole pancreas transplantation on long-established kidney lesions of diabetes. **Surg. Forum**,v.36, p.346-348,1985.

MACEDO,A.R.; MACEDO,C.S.; MERCADANTE,M.C.S.; SPADELLA,C.T.; BREIM, L.C.; MACHADO, J.L.M.; CAPELETTI, S.M.; ROSO, S.L.O. Pancreaticoduodenal graft versus islet of Langerhans transplantation on control of diabetic stat in the rats. **Dig. Dis. Sci.**, v.31, p.3129-3131,1986.

MACEDO, A.R.; SKIVOLOCKI, W.P.; THOMPSON, K.R.; BELL JR, R.H.; LEE, S.; ORLOFF, M.J. Morphometric electron microscopy study of the effect of whole pancreas transplantation on alloxan diabetic neuropathy. **Surg. Forum**, v.32, p.1379-1380, 1981.

MACHADO, J.L.M. **Cicatrização de anastomoses intestinais e diabetes experimental. Estudo clínico, laboratorial, biomecânico e histopatológico de anastomoses realizadas no íleo terminal e cólon distal de ratos diabéticos.** 151f. Tese (Doutorado em Bases Gerais da

Cirurgia e Cirurgia Experimental) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

MACHADO, J.L.M. **Neuropatia diabética experimental: estudo morfológico e morfométrico do nervo ciático de ratos diabéticos.** Dissertação (Mestrado em Bases Gerias da Cirurgia e Cirurgia Experimental) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1993.

MADDEN, J.W.; PEACOCK, E.E. Studies on the biology of collagen during wound healing. **Surgery**, v.64, p.288-293, 1968.

MAKINO, H.; YAMASAKI, Y.; HARAMOTO, T.; SHIKATA, K.; HIRONAKA, K.; OTA, Z.; KANWAR, Y.S. Ultrastructural changes of extracellular matrices in diabetic nephropathy revealed by high resolution scanning and immunoelectron microscopy. **Lab Invest.**, v.68, p. 45-55, 1993.

MALERBI, D.A.; FRANCO, L.J. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban brazilian population aged 30-69yr. **Diabetes Care**, v.15, p.1509-1516, 1992.

MARION, M.S.; CARLSON, E.C. Ultrastructural analyses of acellular glomerular basement membranes and mesangial matrix in a spontaneously diabetic rhesus monkey. **Acta Anat.**, v.135, p.119-128, 1989.

MCCRACKEN, M.S.; APONTE-WESSON, R.; CHAVALI, R.; LEMONS, J.E. Bone associated with implants in diabetic and insulin-treated rats. **Clin. Oral. Implants Res.**, v.17, n.5, p.495-500, 2006.

MEALEY, B.L.; Periodontal implications: medically compromised patients. **Annals Periodontol.**, v.1, n.1, p.256-321, 1996.

MEALEY, B.L.; MORITZ, A.J. Hormonal influences: effects of diabetes mellitus and endogenous female sex steroid hormones on the periodontium. **Periodontol 2000**, v.32, p.29-81, 2003.

MERING, J.V.; MINKOWSKI, O. Diabetes mellitus nach Pankreasexstirpation. **Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.**, v.26, p.371-387, 1889.

MORDES, J.P.; ROSSINI, A.A. Animal model of diabetes mellitus. In: MARBLE, A.; KRALL, L.P.; BRADLEY, R.F.; CHRISTLIES, A.R.; SOELDNER, J.S. (Eds.). **Joslin's diabetes mellitus**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1985. p.110-137.

NEVINS, M.L.; KARIMBUX, N.Y.; WEBER, H.P.; GIANNOBILE, W.V.; FIORELLINI, J.P. Wound healing around endosseous implants in experimental diabetes. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants.**, v.13, n.5, p.620-629, 1998.

NYOMBA, B.L.; VERHAEGUE, J.; TOMASTE, M.; LISSENS, W. BOUILLON, R.B. Bone mineral homeostasis in spontaneously diabetic BB rats. Abnormal vitamin D metabolism and impaired active intestinal calcium absorption. **Endocrinology**, v.124, p.565-572, 1989.

OLIVER, R.C.; TERVONEN, T. Diabetes – a risk factor for periodontitis in adults? **J. periodontol.**, v.65, p.530-538, 1994.

OLSON, J.W.; SHERNOFF, A.F.; TARLOW, J.L.; COLWELL, J.A.; SCHEETZ, J.P.; BINGHAM, S.F.; Dental endosseous implant assessments in a type 2 diabetic population: a prospective study. **Int. J. Oral. Maxillofac. Implants.** v.15, p.811-818, 2000.

ORLOFF, M.J.; LEE, S.; CHARTERS, A.C.; GRAMBORT, D.E.; STORCK, G. KNOX, D. Long-term studies of pancreas transplantation in experimental diabetes mellitus. **Ann. Surg.**, v.182, p.198-206, 1975.

ORLOFF, M.J.; MACEDO, A.R.; GREENLEAF, G.E. Effect of transplantation on diabetic neuropathy. **Surgery**, v.104, p.437-444, 1988.

ORTOLAN, E.V.P. **Estudo de Cicatrização de Anastomoses Realizadas no Íleo Terminal e Cólon Distal de Ratos Normais e Diabéticos. Análise morfométrica e ultraestrutural do colágeno.** Tese (Doutorado em Bases Gerais da Cirurgia e Cirurgia Experimental) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

ORTOLAN, E.V.P. et al. Microscopic, morphometric and ultrastructural analysis of anastomotic healing in the intestine of normal and diabetic rats. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v.116: p. 198-202, 2008.

OTTONI, C.E.C.; CHOPARD, R.P. Histomorphometric Evaluation of New Bone Formation in Diabetic Rats Submitted to Insertion of Temporary Implants. **Braz. Dent. J.**, v.15, n.2, p.87-92, 2004.

PAIVA, E.V.O. **Avaliação de parâmetros de cicatrização em ratos normais e diabéticos. Estudo clínico, laboratorial, biomecânico e histopatológico do intestino delgado e intestino grosso.** 130f. Dissertação (Mestrado em Bases Gerais da Cirurgia e Cirurgia Experimental) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

PALMQUIST, A.; LINDBERG, F.; EMANUELSSON, L.; BRÅNEMARK, R.; ENGQVIST, H.; THOMSEN, P. Morphological studies on machined implants of commercially pure titanium and titanium alloy (Ti6Al4V) in the rabbit. **J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.**, v.91, n.1, p.309-319, 2009.

PARK, J.W.; KIM, H.K.; KIM, Y.J.; AN, C.H.; HANAWA, T. Enhanced osteoconductivity of micro-structured titanium implants (XiVE S CELLplus) by addition of surface calcium chemistry: a histomorphometric study in the rabbit femur. **Clin Oral Implants Res.**, v.20, n.7, p.684-690, 2009.

PELED, M.; ARDEKIAN, L.; TAGGER-GREEN, N.; GUTMACHER, Z.; MATCHEI EF. Dental implants in patients with type 2 diabetes mellitus: a clinical study. **Implant. Dent.**, v.12, p.116-122, 2003.

PRADO, I.M.M.; DI DIO L.J.A.; MIRANDA NETO, M.H.; MOLINARI, S.L.; MACCHIARELLI, G. Three-dimensional distribution of the collagen fibers in the submucosa of the swine terminal ileum. **It. J. Anat. Embryol.**, v.110, p.77-86, 2005.

PRAKASH, A.; KAPU, M.; MAINI, B.S. Wound healing in experimental diabetes: histological, histochemical and biochemical studies. **Indian J. Med. Res.**, v.61, p.1200-1206, 1973.

QUINTERO, D.G.; WINGER, J.N.; KHASHABA, R.; BORKE, J.L. Advanced Glycation Endproducts and Rat Dental Implant Osseointegration. **Journal of Oral Implantology**., v.36, n.2, p.97-103, 2010.

QUIRYNEN, M.; DE SOETE, M.; VAN STEENBERGHE, D. Infectious risks for oral implants: a review of the literature. **Clinical Oral Implants Research**, v.13, p.1-19, 2002.

RAKIETEN, N.; RAKIETEN, M.L.; NADKARNI, M.V. Studies in the diabetogenic action of estreptozotocin. **Cancer Chemoter. Rep.**, v.29, p.91-94,1963.

RETZEPI, M.; LEWIS, M.P.; DONOS, N. Effect of diabetes and metabolic control on de novo bone formation following guided bone regeneration. **Clin. Oral Implants Res.**, v.21, n.1, p.71-79, 2010.

RINALDI, J.C.; ARANA-CHAVEZ, V.E. Ultrastructure of the interface between periodontal tissues and titanium mini-implants. **Angle Orthod.**, v.80, n.3, p.459-465, 2010.

RUOSLAHTI, E. Structure and biology of proteoglycans. **Ann. Rev. Cell Biol.**, v. 4, p.229-255, 1988.

SABBAG-HADDAD, A. distúrbios endócrino-metabólicos. In: MUGAYAR, L.R.F. Pacientes **portadores de necessidades especiais**: manual de odontologia e saúde oral. Pancast, São Paulo: 2000, p.157-64.

SANTANA, R.B.; XU, L.; BABAKHANLOU, C.; AMAR, S.; GRAVES, D.T.; TRACKMAN, P.C. A role for advanced glycation end products in diminished bone healing in type 1 Diabetes. **Diabetes**, v.52, p.1502-1510, 2003.

SCHELLINI, S.A. **Retinopatia diabética experimental: estudo estrutural, ultraestrutural e morfométrico da retina de ratos normais, diabéticos e diabéticos tratados**. 1992. Tese (Doutorado em Bases Gerais da Cirurgia e Cirurgia Experimental) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

SCHLIEPHAKE, H.; HEFTI, T.; SCHLOTTIG, F.; GÉDET, P.; STAEDT, H. Mechanical anchorage and peri-implant bone formation of surface-modified zirconia in minipigs. **J. Clin. Periodontol.**, v.37, n.9, p.818-28, 2010.

SCHMIDT, A.M.; WEIDMAN, E.; LALLA, E.; YAN, S.D.; HORI, O.; CAO, R. et al. Advanced glycation endproducts (AGEs) induce oxidant stress in the gingiva: a potential mechanism underlying accelerated periodontal disease associated with diabetes. **J. Periodontal Res.**, v.31, p.508-515, 1996.

SHYNG, Y.C.; DEVLIN, H.; OU, K.L. Bone formation around immediately placed oral implants in diabetic rats. **Int. J. Prosthodont.**, v.19, p.513-514, 2006.

SIQUEIRA, J.T.; CAVALHER-MACHADO, S.C.; ARANA-CHAVEZ, V.E.; SANNOMIYA, P. Bone Formation Around Titanium Implants in the Rat Tibia: Role of Insulin. **Implant Dentistry**, v.12, n.3, p.242-251, 2003.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diabetes: Consenso da Sociedade Brasileira do Diabetes – CSBD. Rio de Janeiro, 2002. Disponível em: <http://diabetes.org.br/diabetes/info_medicos/consenso /cons_set.html>. Acesso em 15 jan. 2004.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Dados sobre Diabetes Mellitus no Brasil. 2010. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/sala-de-noticias/97-estatisticas/342-dados-sobre-diabetes-mellitus-no-brasil>>. Acesso em 10 out. 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Primeiros Relatos. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/mais-informacoes/1013-primeiros-relatos>>. Acesso 15 out. 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Descoberta da Insulina. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/mais-informacoes/1012-descoberta-da-insulina>> Acesso 15 out. 2010.

SPADELLA, C.T. **Avaliação funcional do transplante pancreato-duodenal norato diabético: estudo clínico, laboratorial, anátomo-patológico e imunohistoquímico.** Tese

(Doutorado em Bases Gerais da Cirurgia e Cirurgia Experimental) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1989.

SPANHEIMER, R.G.; UMPIERREZ, G.E.; STUMPF, V. Decreased collagen production in diabetic rats. **Diabetes**, v.37, p.371-376, 1988.

SUAREZ, O.A.X. **Estudo das alterações histopatológicas, ultraestruturais dos marcadores bioquímicos envolvidos na injúria celular mediada por espécies reativas de oxigênio (ERO) nos pulmões de ratos diabéticos induzidos pelo aloxana.** Tese (Doutorado em Bases Gerais da Cirurgia e Cirurgia Experimental) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

SYKARAS, N.; IACOPINO, A.M.; MARKER, V.A.; TRIPLETT, R.G.; WOODY, R.D. Implant materials, designs and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review. **Int. J. Oral. Maxillofac. Implants.** v.15, p.675-690, 2000.

TETÈ, S.; MASTRANGELO, F.; BIANCHI, A.; ZIZZARI, V.; SCARANO, A. Collagen fiber orientation around machined titanium and zirconia dental implant necks: an animal study. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.*, v.24, n.1, p.52-58, 2009.

TODESCA, J.H. Doença Periodontal. Classificação. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo ,1995. Publicação.

UEDA, T.; LEE, S.; STORCK, G. Metabolic effect of alloxan diabetic rats before and after pancreas transplantation. **Proc. Anat. Microsurg. Soc.**, v.3, p.423-424,1979.

VAN STEENBERGHE, D.; QUIRYNEN, N.; NAERT, I. Survival and success rates with oral endosseous implants. **Quintessence Books.**, p.242-54, 1999.

WEISS, R.E.; GORA, A.; NIMNI, M.E.; Abnormalities in the biosynthesis of cartilage and bone proteoglycans in experimental diabetes. **Diabetes**, v.30, p.670-677, 1981.

WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T. On implant surfaces: a review of current knowledge and opinions. *Int. J. Oral. Maxillofac. Implants.*, v.25, n.1, p.63-74, 2010.

WILD, S.; GODJA, R.; GREEN, A. Global prevalence of diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v.27, p.1047-1053, 2004.

YANG, G.L.; HE, F.M.; SONG, E.; HU, J.A., WANG, X.X., ZHAO, S.F. In vivo comparison of bone formation on titanium implant surfaces coated with biomimetically deposited calcium phosphate or electrochemically deposited hydroxyapatite. **Int. J. Oral. Maxillofac. Implants.**, v.25, n.4, 0.669-680, 2010.

YANO, Y.; OHYA, K.; AMAGASA, T. Insulin enhancement of in vitro wound healing in fetal rat parietal bones. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.54, p.182-186, 1996.

YOON, J.W.; AUSTIN, M.; ONODERA, T.; NOTKINS, A.L. Virus-induced diabetes mellitus. Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. **N. Engl. J. Med.**, v.300, p.1173-1177, 1979.