

**UNIVERSIDADE SANTO AMARO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM IMPLANTODONTIA**

**MAURO ROBERTO HANS**

***ANÁLISE HISTOMÉTRICA DA OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES  
DENTÁRIOS EM RATOS DIABÉTICOS E DIABÉTICOS  
CONTROLADOS POR INSULINA***

**SÃO PAULO**

**2009**

**MAURO ROBERTO HANS**

***ANÁLISE HISTOMÉTRICA DA OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES  
DENTÁRIOS EM RATOS DIABÉTICOS E DIABÉTICOS  
CONTROLADOS POR INSULINA***

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Odontologia com área de concentração em Implantodontia do Programa de Pós-Graduação em nível de mestrado da Faculdade de Odontologia da Universidade de Santo Amaro, sob a orientação do Prof. Dr. Paulo José Bordini.

SÃO PAULO

2009

**Ficha Catalográfica elaborada pela  
Biblioteca Milton Soldani Afonso – Campus I**

Hans, Mauro Roberto

Análise Histométrica da Ósseointegração de Implantes Dentários em Ratos Diabéticos e Diabéticos Controlados por Insulina / Mauro Roberto Hans. Orientação do Prof. Dr. José Paulo Bordini. – São Paulo: 2009.

67p.

Dissertação (Mestrado). Área de Concentração em Implantodontia. Faculdade de Odontologia. Universidade de Santo Amaro.

1. Ósseointegração 2. Implantes Dentários 3. Diabetes 4. Indução do Diabetes

Autorizo a impressão parcial do ou total do meu trabalho acadêmico para fins de divulgação científica.

São Paulo, 30 de Novembro de 2009.

Mauro Roberto Hans

MAURO ROBERTO HANS

*ANÁLISE HISTOMÉTRICA DA OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES  
DENTÁRIOS EM RATOS DIABÉTICOS E DIABÉTICOS CONTROLADOS POR  
INSULINA*

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Odontologia com área de concentração em Implantodontia do Programa de Pós-Graduação em nível de mestrado da Faculdade de Odontologia da Universidade de Santo Amaro.

Aprovado em 30 / 11 / 2009.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Paulo José Bordini

Doutor em Odontologia, área de concentração em Diagnóstico Bucal, sub-área Semiologia, pela Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

---

Prof. Dr. José Peixoto Ferrão Junior

Doutorado Multidisciplinar em Ciências da Saúde pela Universidade de Brasília (UnB) e Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

---

Prof. Dr. Luciano Artioli Moreira

Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente pela Universidade Estadual de Campinas

CONCEITO FINAL: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente à **Deus**,

Pois Ele permitiu que eu tivesse saúde e energia para toda semana estar cursando este mestrado;

Concedeu-me pais maravilhosos, admiráveis e incentivadores, **Paulo Roberto e Neidy Maria** sempre ajudando-me em cada etapa da minha vida, mostrando através de suas atitudes e exemplos muita coragem, perseverança, força, amor, bondade e principalmente fé e obediência Naquele que é o criador e mantenedor de todas as coisas;

Deu-me um irmão **Paulo Henrique** e Irmã **Lygia Leticia** com seu marido **Gerson** e filho **Matheus** que estiveram sempre ao meu lado dando-me conforto e alegria quando mais precisava;

Concedeu-me uma família unida com **Avós, tios e primos** que me deram muita força quando pensava que não agüentaria mais;

Completo-me com uma noiva perfeita **Leiliane**, amiga, carinhosa, que sempre acreditou que seria capaz de atravessar essa etapa e me deu apoio nas horas mais difíceis, mostrando o lado positivo de todas as coisas e por estar lá, bem juntinho, quando eu mais precisava;

Concedeu-me pessoas maravilhosas que abriram-me as portas com muito amor e carinho, **Eliseu Menegusso e Nilda, Claudio, Keyse e Denise**;

Permitiu-me conhecer pessoas maravilhosas que de uma forma ou de outra me ajudaram nesta etapa tão importante da minha vida, **Leandro, Noedi, Dr. Márcio Augusto de Oliveira e Dr. Mário Sérgio Fatureto**.

### *Epígrafe*

*“Muda que quando a gente muda o mundo muda com a gente  
A gente muda o mundo na mudança da mente  
E quando a gente muda o mundo anda para frente  
E quando a gente manda ninguém manda na gente  
Na mudança de atitude não a mal que não se mude,  
nem doença sem cura  
Na mudança de postura a gente fica mais seguro  
Na mudança do presente a gente molda o futuro.”  
(Gabriel “O Pensador”)*

*Portanto...*

*“Não importam as dificuldades, às circunstâncias, as situações, não importa,  
Dê o seu melhor, Faça alguém feliz, Entregue-se por completo,  
Não importa quantas vezes você fez o bem e não teve nada em troca,  
Não importa quantas vezes você sorriu e não foi correspondido,  
Continue fazendo a sua parte e alguém também fará por você.”  
(Autor Desconhecido)*

## RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a quantidade de osseointegração na interface osso-implante, de implantes instalados em tíbias de ratos, divididos em três grupos assim denominados: diabéticos, diabéticos controlados por insulina e controle nos períodos de 28 e 56 dias. Para tanto, foram utilizados 40 ratos *wistar*, que receberam um implante nas tíbias direita e esquerda. Decorridos os dias da instalação dos implantes, os animais foram sacrificados, os respectivos cortes histológicos realizados e os grupos comparados entre si através de análise histométrica. Os resultados obtidos em relação à quantidade da osseointegração foram submetidos à análise estatística a qual não mostrou diferença significativa em nenhum dos cruzamentos realizados. Pode-se então concluir que os níveis de glicemia no presente estudo não interferiram no resultado final de osseointegração.

Palavras-chave: 1. Osseointegração 2. Implantes Dentários 3. Diabetes Mellitus 4. Diabetes Mellitus Experimental

## **ABSTRACT**

The objective of this study is to evaluate the quantity of osseointegration in the osseointegration interface of implants placed in tibia of rats, divided in three groups identified as follow: diabetics, insulin-controlled diabetics and controlled in the periods of 28 and 56 days. For that purpose, 40 wistar rats were used, which received implant on the right and left tibia. Upon completion of the days of the installation of implants, the animals were killed, the respective histological cuts performed and the groups were compared among them through histometric analysis. The results obtained in relation to the quantity of osseointegration were submitted to statistical analysis which has not showed significant difference in any of the crossings realized. One can thus conclude that glycemic levels in the present study have not interfered on the final results of the osseointegration.

Key-words: 1. Osseointegration 2. Dental Implants 3. Diabetes Mellitus 4. Diabetes Mellitus, Experimental

## LISTA DE FIGURAS

Figuras 1a e 1b – Animais utilizados no estudo.....	29
Figuras 2a e 2b – Divisão e armazenamento dos animais.....	30
Figuras 3a e 3b – Apresentação e aplicação da estreptozotocina (STZ).....	31
Figura 4 – Comparação do tamanho dos animais do grupo controle (GI) e grupo diabético (GII) .....	32
Figura 5 - Amostras de sangue obtidas da ponta da cauda dos animais.....	32
Figura 6 - Insulina humana, suspensão neutra injetável (Novo Nordisk) .....	33
Figuras 7a, 7b e 7c – Amostras de sangue aferidas no glicosímetro dos grupos GI, GII e GIII, respectivamente. ....	33
Figura 8 - Tricotomia e antissepsia .....	34
Figura 9 – Campo operatório utilizado .....	34
Figura 10 – Descolamento do periósteo .....	35
Figura 11 – Implante utilizado .....	36
Figura 12 – Loja óssea após a perfuração .....	36
Figuras 13a e 13b – Instalação do implante .....	37
Figura 14 – Bloco obtido após a inclusão .....	39
Figura 15 – Aparelho EXAKT® 300 CP utilizado para corte dos blocos .....	40
Figura 16 – Momento do corte do bloco .....	40
Figura 17 – Lixadeira Panambra® DP-10 utilizada para reduzir a espessura da lâmina .....	40
Figura 18 – Equipamento utilizado para foto, mensuração e leitura das lâminas .....	41
Figura 19 – Áreas de mensuração dos implantes .....	41
Figura 20 – Área da superfície do implante .....	42
Figura 21 – Área de contato osso-implante .....	42
Figuras 22a e 22b – Fotografia das lâminas de cortes histológicos de tíbia de rato e implante de titânio após 28 dias de implantação, grupo diabético controlado (GIII), mostrando início do processo de neoformação óssea. Corada com azul de Toluidina a 1%. Aumento original de 4x e 10x respectivamente .....	43

Figuras 23a e 23b – Fotografia das lâminas de cortes histológicos de tibia de rato e implante de titânio após 56 dias de implantação, grupo diabético controlado G(III), mostrando neoformação óssea. Corada com azul de Toluidina a 1%. Aumento original de 4x e 10x respectivamente.....	44
Figuras 24a – Fotografia das lâminas de cortes histológicos de tibia de rato e implante de titânio utilizadas para mensurações. Medidas apontadas indicando o local da superfície do implante (SI).....	45
Figuras 24b – Fotografia das lâminas de cortes histológicos de tibia de rato e implante de titânio utilizadas para mensurações. Medidas apontadas indicando o local do contato osso-implante (COI) estudado.....	45

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Período de sacrifício dos grupos 28 e 56 dias. ....	38
Tabela 2 – Medidas das superfícies dos implantes, contato osso-implante e da porcentagem de osseointegração do grupo controle (GI).....	47
Tabela 3 – Medidas das Superfícies dos implantes, contato osso implante e da porcentagem de osseointegração do grupo diabético (GII).....	49
Tabela 4 – Medidas das Superfícies dos implantes, contato osso implante e da porcentagem de osseointegração do grupo diabético controlado por insulina (GIII).....	51

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Comparação dos valores da superfície do implante mensurados nos animais do grupo controle (GI) com 56 dias.....	48
Gráfico 2 – Comparação dos valores do contato osso-implante mensurados nos animais do grupo controle (GI) com 56 dias.....	48
Gráfico 3 – Comparação dos valores percentuais do contato osso-implante mensurados nos animais do grupo controle (GI) com 56 dias.....	49
Gráfico 4 – Comparação dos valores da superfície do implante mensurados nos animais do grupo diabético (GII) com 56 dias.....	50
Gráfico 5 – Comparação dos valores do contato osso-implante mensurados nos animais do grupo diabético (GII) com 56 dias.....	50
Gráfico 6 – Comparação dos valores percentuais do contato osso-implante mensurados nos animais do grupo diabético (GII) com 56 dias.....	51
Gráfico 7 – Comparação dos valores da superfície do implante mensurados nos animais do grupo diabético controlado (GIII) com 56 dias.....	52
Gráfico 8 – Comparação dos valores do contato osso-implante mensurados nos animais do grupo diabético controlado (GIII) com 56 dias.....	52
Gráfico 9 – Comparação dos valores percentuais do contato osso-implante mensurados nos animais do grupo diabético controlado (GIII) com 56 dias.....	53
Gráfico 10 – Média dos valores da superfície dos implantes (SI) dos grupos GI, GII e GIII.....	54
Gráfico 11 – Média dos valores da superfície do contato osso-implante (COI).....	54
Gráfico 12 – Média da relação entre a superfície do implante e contato osso-implante sendo colocado em porcentagem.....	55

## **LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS**

AGE – Advanced Glycosilation Endproducts

COI – Contato Osso-Implante

DM - Diabetes Mellitus

PDGF – Platelet-derived Growth Factor

STZ – Estreptozotocina

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1. Diabetes.....	16
2.2. Efeitos do diabetes mellitus em relação ao osso.....	17
2.3. Indução do diabetes.....	21
2.4. Controle do diabetes.....	21
2.5. Implantes osseointegrados e diabetes.....	22
3. PROPOSIÇÃO.....	28
4. METODOLOGIA.....	29
5. ASPECTOS HISTOLÓGICOS.....	44
6. RESULTADOS ESTATÍSTICOS.....	47
7. DISCUSSÃO.....	56
8. CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS.....	60
ANEXOS	

## 1 INTRODUÇÃO

Os princípios para instalação de implantes osseointegrados foram definidos na década de 1960 por Brånemark, os quais trouxeram uma nova perspectiva para a reabilitação de desdentados totais e parciais.

Com o desenvolvimento e aperfeiçoamento da técnica de reposição de dentes com implantes osseointegrados, um aumento neste tipo de tratamento tem sido observado e a expectativa é de que esse número aumente ainda mais no futuro, demonstrando uma previsibilidade de sucesso de 93% a 97%, baseado nas evidências dos últimos 5 anos de acompanhamento.

Os principais interessados que procuram implante dentário são pessoas acima de 40 anos, que como consequência da idade, possuem maior incidência de doenças sistêmicas, como diabetes mellitus e doenças do metabolismo ósseo, o que pode influenciar no sucesso deste tipo de tratamento.

Alguns fatores locais, como: adequada seleção de pacientes, plano de tratamento, desenho do implante, material apropriado, técnica cirúrgica e tratamento protético são pontos cruciais que podem influenciar no sucesso do tratamento. Porém esse sucesso pode ser afetado negativamente por alguns fatores sistêmicos como: doenças relacionadas ao osso e má cicatrização.

Um número grande de estudos tem observado que o metabolismo mineral e ósseo são alterados no diabetes, acarretando diminuição considerável da formação óssea bem como o seu remodelamento.

O uso de implantes em pacientes diabéticos ainda apresenta controvérsias quanto à sua possibilidade, seja em relação ao tempo para ósseointegração, ou à forma de controle e durabilidade dos mesmos.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar e comparar, mediante observações microscópicas, a superfície de contato entre osso e implante (COI), após a colocação de implantes em ratos diabéticos, ratos diabéticos controlados com insulina e ratos saudáveis.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 DIABETES**

O diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica grave que acomete milhares de pessoas em todo mundo. O tratamento intensivo e orientação médica adequada acarretam considerável gastos para o sistema de saúde (Edelman, 1998). Esta doença afeta mais de 15 milhões de americanos trazendo, assim, grande impacto na saúde e causando alto grau de morbidade e mortalidade nesses pacientes (Zimmet e Alberti, 2001).

Entre 1986 e 1988 foi realizado um estudo em nove capitais brasileiras onde se observou a prevalência de 7,6% de diabetes mellitus numa população com idade entre 30 e 69 anos (Georg et.al., 2005). Resultados semelhantes foram obtidos em outros países como Estados Unidos, Itália e Argentina em período semelhante (Malerbi e Franco, 1992). Esta prevalência vem aumentando progressivamente com os anos.

O Diabetes mellitus é uma doença cujos relatos estão descritos desde o ano 1500 a.C. no antigo Egito. Os gregos no século II faziam referência a uma doença chamada diabetes, caracterizada como uma estranha doença em que a carne e os ossos fluem juntos pela urina, levando o indivíduo à morte. No século VI, os indianos identificaram a substância doce na urina como sendo glicose e adicionaram a palavra mellitus ao diabetes (Notkins, 1979).

No ano de 1921, os canadenses Frederick, Banting e Charles Best mostraram que alguma substância do pâncreas seria a responsável pelo controle do diabetes. Ao injetarem extrato de pâncreas em cães diabéticos, a glicemia dos animais foi reduzida. Dessa forma, foi possível iniciar o tratamento dos indivíduos que eram acometidos pela enfermidade (Mendez e Ramos, 1994).

Atualmente sabe-se que o DM é uma síndrome crônica do metabolismo da glicose, de lipídeo e de proteína. Secreção insulínica insuficiente ou resistência à insulina do tecido do alvo são as principais causas da doença. A incidência do diabetes na população é de aproximadamente 3% e metade dos comprometidos mal sabem que são portadores desta doença (Fiorellini e Nevins, 1999).

Diabetes Mellitus é uma doença significativa observada ao redor do mundo. Em 2000, estimava-se que 16 milhões de americanos eram portadores desta patologia (Olson e Shernoff, 2000). Em países em desenvolvimento, como o Brasil, está previsto aumento na prevalência de DM de 170% no período de 1995 a 2025. A prevalência de diabetes está aumentando e intervenções com finalidade de prevenir tal condição, como atividade física e dieta, são subutilizadas (King e Aubert, 1998; Narayan e Gregg, 2000). Aproximadamente 651.000 casos de diabetes são diagnosticados todos os anos na população em geral. Existe a grande possibilidade de que esses números de novos casos dobrem a cada 15 anos (Connell, 1985; Harris e Hadden, 1987).

O diabetes mellitus está entre as 10 principais causas de mortalidade. Contribuindo para esse cenário desfavorável, existe alta prevalência de diabéticos não diagnosticados e expressiva proporção de casos com evidência de complicações ao diagnóstico (Malerbi e Franco, 1992). A ciência da glicemia dos pacientes por parte do profissional de odontologia torna-se algo importante para tratar diferencialmente os pacientes metabolicamente alterados, evitando-se emergências e alterações locais decorrentes. Do total de 306 pacientes submetidos aleatoriamente ao teste de glicemia, 2% apresentaram glicemia acima de 200 mg/dl associados a sinais e sintomas de DM, estas condições são suficientes para o diagnóstico. Outros 5% mostraram a glicemia aumentada para valores entre 126 e 200 mg/dl e embora esse dado isolado não seja suficiente para o diagnóstico, houve primeiro o direcionamento do paciente em busca de um diagnóstico definitivo. Destes 7% com alteração, apenas 2% eram portadores cientes, porém julgavam estar controlando a disfunção. Assim o teste, foi importante para mostrar que uma porcentagem significativa desta população possui alteração glicêmica ignorada, além de mostrar que o teste realizado deveria ser difundido entre os profissionais (Sasaki e Tajima, 2006).

Existem dois tipos de DM: No tipo 1 onde ocorre a destruição das células  $\beta$  do pâncreas e, em geral, decorre de um processo auto-imune. A consequência da perda dessas células é a deficiência absoluta da secreção da insulina. O pico de incidência ocorre dos 10 aos 14 anos, havendo uma diminuição progressiva da incidência até os 35 anos. Eisenbarth (1986) com muita propriedade e fundamento subdividiu o desenvolvimento do DM insulino dependente em 6 fases distintas: I. suscetibilidade genética; II. evento desencadeante; III.

desenvolvimento da auto-imunidade ativa; IV. anormalidade imunológica e perda progressiva da secreção de insulina; V. diagnóstico do diabetes e VI. destruição completa das células  $\beta$ . O DM tipo 2 caracteriza-se por distúrbios da ação e secreção da insulina, sendo a etiologia exata desse processo desconhecida. No entanto, a maioria dos pacientes apresenta obesidade e resistência à ação insulínica. A idade de início do diabetes tipo 2 é variável, embora seja mais freqüente após os 40 anos de idade (Bell e Xiang, 1991).

Pacientes com o quadro de diabetes tem como uma das mais importantes complicações a deficiência da microcirculação através da diminuição do metabolismo protéico, aumenta consideravelmente o tempo de cicatrização tanto de tecidos moles como de tecidos duros (Silhi, 1998; Bell e Large, 1999), por isso sendo considerado muitas vezes fator de contra-indicação para implantes dentais (Smith e Berger, 1992).

A tríade clássica de sintomas do diabetes mellitus é a polifagia, polidipsia, poliúria, mais característico no diabetes tipo 1 do que no 2. Além dessa sintomatologia e de outras alterações sistêmicas, os pacientes diabéticos apresentam alterações periodontais, ressecamento da mucosa, diminuição do fluxo salivar, aumento dos níveis de glicose na saliva, tendência à formação de abscessos e aumento da prevalência de doença periodontal, conseqüentemente à perda dos elementos dentários (Kirchberger e Coenen, 2009).

Em estudo Umino e Nagao em 1993 observaram que doenças sistêmicas se mostravam presentes em 65% dos entrevistados. Doenças cardiovasculares eram as mais freqüentes seguidas da diabetes mellitus.

Os princípios definidos por Branemark na década de 1960 abriram nova possibilidade de reabilitação de desdentados totais, e posteriormente suas indicações foram estendidas para a reposição de dentes ausentes em desdentados parciais (Adell e Eriksson, 1990).

Morris e Ochi (2000) observaram que a taxa de sobrevivência dos implantes em pacientes com diabetes tipo 2 foi menor que em pacientes não diabéticos mostrando que a osseointegração é prejudicada quando a taxa de insulina está descompensada comparando com a população em geral. Um grande número de perdas de implantes tem sido observado em pacientes diabéticos, sendo que a maioria das falhas ocorrem durante o primeiro ano quando colocado em função, e, possivelmente, a deficiência da

microvascularização pode ter sido um fator causal para as complicações dos tecidos.

Com relação à Implantodontia, em modelos experimentais diabéticos, tem sido demonstrado um nível de contato reduzido entre osso-implante, e isso, pode ser reversível com o tratamento com injeções de insulina (Fiorellini e Nevins, 1999). O diabetes pode ser reproduzido em animais por cirurgia, infecção viral, administração de dietas e agentes químicos, ou a doença pode se desenvolver de forma espontânea, como ocorre nos ratos (Mendez e Ramos, 1994).

Em 1943 iniciaram-se os experimentos com aloxana e em 1963 com estreptozotocina (STZ), a qual foi acidentalmente descoberta e descrita por Rakieten (Rakieten e Rakieten, 1963). Essas drogas demonstraram significativa seletividade e citotoxicidade para a célula  $\beta$ , revelando-se como potentes substâncias diabetogênicas (Akpan e Wright, 1982). Desde então, a aloxana e a STZ têm sido amplamente usadas para a indução de diabetes em modelos experimentais.

Muitas pesquisas têm sido feitas em ratos diabéticos induzidos e tem demonstrado que existe uma redução da taxa de formação óssea e do contato osso-implante (COI). Outras, mostrando que apesar do controle da glicose com insulina, não houve melhora nos efeitos da diabetes, indicando que mesmo o nível glicêmico tendo valores parecidos com os de ratos normais os resultados do contato osso-implante foram menores estatisticamente (Iyama e Takeshita, 1997; Takeshita e Iyama, 1997; Nevins e Karimbux, 1998; Fiorellini e Nevins, 1999 )

## **2.2 EFEITOS DO DIABETES MELLITUS EM RELAÇÃO AO OSSO**

O sucesso do implante depende da formação de osso ao seu redor, e essa neoformação é aceita como um mecanismo normal de reparação óssea. A manutenção em longo prazo dos implantes depende da remodelação fisiológica do osso. Muitas investigações estabeleceram que o metabolismo mineral ósseo é alterado no DM, diminuindo a quantidade de osso formado e alterando a remodelação. Isso pode estar relacionado a anormalidades no colágeno em resposta à ação de uma classe de moléculas formadas de modo irreversível que

tem sido denominada de produtos finais de glicosilação avançada (AGEs). Essas moléculas causam mudanças qualitativas e quantitativas nos componentes da matriz extracelular como os colágenos, a laminina e a vitronectina. A formação óssea e o osteóide têm sido reduzidos no diabetes experimentais, assim como a homeostase óssea mineral, havendo um retardo no tempo de mineralização. O osteóide se mostrou aumentado em animais diabéticos não controlados, e a quantidade de osso mineralizado com volume na matriz óssea estavam reduzidos em animais diabéticos (Fiorellini e Chen, 2000).

A prevalência de osteopenia, patologia que consiste na diminuição da densidade mineral dos ossos, entre pacientes com diabetes tende a ser maior que entre a população geral, esta diferença pode estar relacionada com a hiperglicemia. Há longo prazo relata-se que a perda óssea é mais severa entre pacientes com diabetes tipo 1 do que em diabetes tipo 2 e que a densidade óssea mineral em pacientes com diabetes tipo 1 é pelo menos 10% menor que entre a população saudável. Estudos em animais diabéticos tipo 1 não tratados mostraram número menor de osteoblastos, tecido osteóide e menor nível de osteocalcina no plasma, obtendo-se assim menor formação óssea (Elsubeihi et. al., 2002).

Um grupo de proteínas existentes no organismo humano, as responsáveis pelos fatores de crescimentos (PDGF), aceleram certos aspectos da reparação óssea. Esses fatores já foram identificados na saliva de humanos e animais. Em seu estudo Morris e Ochi (2000) verificaram que apenas 28% dos ratos diabéticos produzem o PDGF quando comparados com animais saudáveis.

Em estudo experimental Devlin e Sloan (1996) observaram que a estrutura de colágeno em locais de extração dentária está inibida em diabéticos tipo 1, atrasando a reparação e aumentando a perda óssea.

Segundo Giglio et. al. (2000) as desordens ósseas relacionadas ao diabetes ainda não estão bem claras, sendo que existem algumas explicações para isso:

1. Redução de liberação de insulina, diminuindo a produção de colágeno;
2. Depressão do turn-over ósseo devido à inativação dos osteoblastos seguido da redução da atividade osteoclástica;
3. Diminuição da síntese protéica e atividade de fosfatase;

4. Mudanças nos componentes da matriz extracelular e metabolismo ósseo causado por glicosilação avançada;
5. Redução no volume ósseo mineralizado.

Entre as possíveis razões para formação óssea pobre e a fibrose nos ratos diabéticos está a concentração decrescente de íons cálcio no sangue, além das concentrações aumentadas de cálcio e fósforo na urina. A produção de colágeno diminui de acordo com a diminuição da liberação de insulina. Muitos osteoclastos são ativados na presença do paratormônio em altas concentrações e a formação óssea parece ser suprimida no estado hiperglicêmico como resultado de aumento de secreção de paratormônio. Finalmente, o efeito do hormônio de crescimento é diminuído quando a concentração de insulina está baixa (Takeshita e Iyama, 1997).

### **2.3 INDUÇÃO DO DIABETES**

A utilização de drogas para indução do diabetes é uma das técnicas mais antigas empregadas. É um dos modelos experimentais mais agravantes, pois a substância exógena administrada ao animal promove alterações diretas no metabolismo basal, podendo levar aos sintomas do diabetes. Entre as substâncias mais citadas pela literatura destacam-se: estreptozotocina, aloxana e glutamato monossódico.

A estreptozotocina (STZ) foi uma das primeiras drogas a ser utilizada para estudo do diabetes mellitus, tanto do tipo 1 como do tipo 2. No caso do diabetes tipo 2, esta droga é administrada, em dose única em animais neonatos (Ward e Yau, 2001). De acordo com artigos revisados, a via de administração pode ser intravenosa ou intraperitoneal, a dose pode variar de 30 a 200 mg/kg, sendo que os animais submetidos à aplicação desta droga adquirem diabetes tipo 2 na idade adulta (Abdel-Wahab e O'harte, 1996; Wang e Wu, 1998; Murali e Goyal, 2001; Peredo, 2001). Sua administração ocasiona destruição seletiva da célula  $\beta$  em várias espécies animais. A maneira pela qual produz lesão citotóxica é discutida e hipóteses têm sido levantadas. Entre estas, a que tem melhor aceitabilidade é aquela que menciona o componente glicose da sua molécula

como responsável pela incorporação da metilnitrosuréia na célula  $\beta$ , a qual seria a indutora de citotoxicidade (Bedoya e Solano, 1996; Burkart e Brenner, 1996).

De forma semelhante à estreptozotocina, a aloxana também é uma droga utilizada para a indução dos dois tipos de diabetes mellitus. No diabetes do tipo 2, essa droga lesa as células  $\beta$  pancreáticas e os animais adquirem sintomas do diabetes tipo 2 no início da fase adulta (três meses de idade) (Ozuari e Ozturk, 1993; Altan e Ongun, 1994).

Em seu experimento Anderson e Stitt (1993) combinou a mistura de estreptozotocina com aloxana em cães descrevendo um excelente modelo para a pesquisa do diabetes.

## **2.4 CONTROLE DO DIABETES**

A insulina é o hormônio responsável pela redução da glicemia ao promover o ingresso de glicose nas células, sendo essencial no consumo de carboidratos, na síntese de proteínas e no armazenamento de lipídios. É produzida nas ilhotas de Langerhans, células do pâncreas endócrino. Ela age em uma grande parte das células do organismo, como as células presentes em músculos e no tecido adiposo, apesar de não agir em células particulares como as células nervosas (Wei e Ong, 2003).

Desde a descoberta da insulina em 1921, muito esforço tem sido dedicado ao entendimento do mecanismo molecular de ação deste hormônio. A importância do estudo da ação da insulina é dada pela prevalência da resistência à insulina, presente na patogenia de diversas doenças como obesidade, DM tipo 2 e associada a outras enfermidades endócrinas como hipercortisolismo e acromegalia (Matschinsky, 1996).

A ação da insulina na célula inicia-se pela sua ligação ao receptor de membrana plasmática. Esse receptor está presente em praticamente todos os tecidos dos mamíferos, mas suas concentrações variam desde 40 receptores nos eritrócitos circulantes até mais de 200,000 nas células adiposas e hepáticas. O receptor de insulina é uma glicoproteína heterotetramérica constituída por 2 subunidades  $\alpha$  e duas subunidades  $\beta$ , unidas por ligações dissulfeto (Kahn e Crettaz, 1985).

A insulina estimula diretamente a formação de matriz osteoblástica. Em modelos experimentais de diabetes, os níveis de normoglicemia obtidos pelo tratamento com insulina leva a um crescimento em matriz óssea e formação de osteóide similares aos indivíduos controle. Enquanto a hiperglicemia pode reduzir a recuperação óssea em 40% seguida de osteotomia circular, o tratamento com insulina normaliza essa recuperação, indicando que a deterioração óssea está estritamente relacionada ao mau controle do diabetes. Várias pesquisas têm confirmado que a osteopenia associada a diabetes induzido em animais pode ser revertida quando o tratamento com insulina é aplicado (Valero et. al., 2007).

Quando implantes são colocados na tíbia de ratos diabéticos, uma redução de 50% é observada na área de formação óssea e na superfície de contato entre osso-implante se tornando similar à aquela do grupo controle. Esses resultados sugerem que o controle metabólico é essencial para a osseointegração acontecer, assim como a hiperglicemia atrasa a cicatrização do osso ao redor do implante. Embora numerosos estudos mostrem que a terapia com insulina permite regular a formação óssea ao redor dos implantes e aumentar o osso néoformado não é possível igualar o contato osso-implante quando comparado com o grupo não diabético (Valero et. al., 2007).

## **2.5 IMPLANTES OSSEOINTEGRADOS E DIABETES**

Após controle de um ano, Shernoff e Colwell (1994) observaram uma taxa de sucesso de 92,7% em 178 implantes realizados em 89 pacientes diabéticos não insulino dependentes tipo 2.

Em 1997 Takeshita e Iyama examinaram a influência do diabetes na interface implante-osso de implantes com hidroxiapatita colocados na tíbia de 40 ratos, sendo sacrificados 84 dias após a instalação. No grupo controle os implantes estavam completamente encapsulados de osso na área do osso medular, no grupo diabético estavam parcialmente recobertos por fina camada de osso e existiam uma grande quantidade de fibroblastos correndo paralelamente à superfície do implante nas áreas de contato ósseo. Na avaliação quantitativa mostrou que o grupo controle obteve formação mais rápida, maior espessura óssea e maior área de contato que o grupo diabético. O grupo

diabético mostrou uma redução aproximada de 30% de contato osso-implante e 50% de redução da espessura e área de tecido ósseo.

Já em 1998 os autores observaram redução da área de contato entre osso/hidroxiapatita e osso/titânico em tíbia de ratos diabéticos não controlados. O grupo diabético mostrou redução de 30% no contato osso implante e redução de 50% na espessura ao redor dos implantes. Avaliação quantitativa indica que o grupo controle mostrou porcentagem significativamente maior de contato e espessura óssea do que o grupo diabético, sugerindo que diabetes não controlado pode atrapalhar a formação óssea ao redor dos implantes de titânio em ratos.

Nevins e Karimbux (1998) realizaram seu estudo em 20 ratos divididos em grupo controle e grupo diabético induzido com estreptozocina. Os implantes foram instalados no fêmur 14 dias após injeção contendo STZ e fizeram observações histológica e histomorfométricas após 28 e 56 dias. A osseointegração ocorreu em ambos os grupos, e a análise microscópica revelou diferenças no modelo de formação óssea entre os grupos. Os implantes colocados em ratos do grupo controle foram envolvidos em osso, com poucas áreas sem formação óssea nos espaços medulares da superfície dos implantes. Nos ratos diabéticos a morfologia da neoformação óssea foi imatura e desorganizada, quando comparada com o grupo controle. Avaliação histométrica demonstrou quantidade de osso novo na região periimplante de 250  $\mu$ m para ambos os grupos. Entretanto, havia mais contato osso-implante no grupo controle do que no diabético. Havia também uma redução correspondente na porcentagem de osseointegração nos diabéticos, comparados com o controle, medida pelo contato direto osso-implante.

Kapur e Garret (1999) documentaram não existir falhas em acompanhamento de 24 meses em 52 pacientes portadores da DM tipo 1.

Em semelhança a este estudo Balshi e Wolfinger (1999) relataram sucesso de 94,3% de sucesso em implantes instalados em pacientes diabéticos e relataram que estes implantes podem ser usados com segurança nestes pacientes desde que uma adequada anamnese seja feita e que nível glicêmico esteja controlado.

Comparando-se implantes instalados em ratos diabéticos controlados com insulina com grupo controle Fiorellini e Nevins (1999), observaram não

haver diferença significativa entre os grupos no contato osso implante (BIC), porém quando relacionados à formação óssea, pode-se observar um aumento considerável quando comparado os grupos, mostrando vantagem quando no controle com insulina. Em seu outro trabalho no ano 2000, os pesquisadores observaram que a formação de osso durante o processo de osseointegração pode ser afetado pelo controle glicêmico com insulina quando comparado ao grupo controle.

Morris e Ochi (2000) observaram que a taxa de sobrevivência dos implantes em pacientes com diabetes tipo 2 foi menor que em pacientes não diabéticos.

Olson e Shernoff (2000) em estudo prospectivo avaliaram 89 pacientes diabéticos tipo 2 submetidos a 2 implantes na sínfise mandibular. Os pacientes foram controlados tanto no que se refere à saúde dos implantes como do diabetes. Os autores observaram sucesso cumulativo de 89,8% após 5 anos. Concluíram que o uso de implantes em paciente tipo 2 pode ser realizado desde que seja realizado um controle do nível de glicemia.

Farzad e Andersson (2002) ao estudar implante dental em pacientes diabéticos verificaram que a taxa de insucesso é semelhante a da população em geral, se a taxa de glicose estiver normal ou controlada.

Analisando 113 implantes instalados em 25 pacientes diabéticos controlados por dieta, hipoglicemiantes ou insulina, Abdulwassie e Dhanrajani (2002) observaram sucesso de 95,57% e concluíram que os resultados foram aceitáveis nos tratamentos com implantes nesses pacientes, desde que estes estejam controlados e seja feito um bom planejamento, execução e acompanhamento.

Observando 41 pacientes diabéticos tipo 2 após a instalação de 141 implantes Peled e Ardekian (2003) relataram a perda de 4 implantes durante o período de observação que foi desde o segundo estágio cirúrgico até 2 anos com elemento protético, relatando sucesso de 94.4% após 5 anos de proervação.

Siqueira e Cavalher-Machado (2003) avaliando a influência da taxa de insulina na formação óssea ao redor de implante de titânio em tibia de rato, concluem que esta formação é regulada em parte pela insulina, obtendo-se bons resultados quando houver o controle e este for bem feito.

Margonar e Sakakura (2003) estudaram a influência do DM e insulino terapia na retenção biomecânica ao redor do implante em ratos e verificaram os melhores resultados no grupo controle não diabético, enquanto que nos grupos de diabetes induzido não tratados e naqueles tratados com insulina não houve diferença significativa.

Otoni e Chopard (2004) através de avaliação histomorfométrica de nova formação óssea em ratos diabéticos submetidos a implantes constataram que a formação de osso medular e cortical não variou, no entanto, obtiveram diferença significativa no total da formação do osso novo no canal medular e na área de contato.

Tonetti e Cortellini (2004) em seu estudo afirma que o prognóstico a médio e longo prazo dos implantes realizados em pacientes diabéticos ainda não está estabelecido.

Entretanto Kwon e Rahman (2005) estudando a manutenção da osseointegração utilizando insulino terapia em modelo de rato diabético demonstraram que a integração osso-implante nos ratos com diabetes controlada manteve-se por um período acima de 4 meses e diminuiu com o passar do tempo nos ratos não controlados.

Claro e Lima (2005) avaliaram histológica e histomorfometricamente a reação tecidual periimplantar após a instalação de implantes de polietileno poroso no crânio de ratos com diabetes induzida, tratadas com calcitonina. Os autores observaram que nas amostras de 30 dias houve diferença significativa entre os grupos diabéticos e diabéticos tratados, e entre os grupos diabéticos e controle. Nas amostras de 60 e 90 dias não houve diferença significativa, observando reação inflamatória crônica no grupo de 90 dias.

Revisando a literatura publicada nos últimos 10 anos Valero et al. (2006) puderam concluir que a sobrevivência dos implantes em pacientes diabéticos está entre 88,8% a 97,3%, após 1 ano e de 85,6% a 94,6% um ano após a instalação da prótese.

Em outra revisão de literatura, Kotsovilis et. al. (2006) chegou à conclusão de que os estudos experimentais parecem revelar uma resposta reparacional prejudicada à colocação dos implantes em animais diabéticos, comparando-se com o grupo controle, tanto qualitativa como quantitativamente. A maioria dos estudos clínicos tendem a indicar que o diabetes não é contra indicado para a

colocação de implantes, sob a condição de haver controle metabólico. Entretanto, guias como critérios específicos, como tipo, duração do diabetes e níveis de hemoglobina glicolisada, precisam ser estabelecidos.

Mccracken e Lemons (2006) realizaram implantes em tíbia de ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina e compararam com ratos não diabéticos. Este estudo permitiu os autores concluir que em ratos diabéticos houve menor osseointegração do implante principalmente em osso medular. Já em 2006 os mesmos pesquisadores observaram não haver diferença significativa entre o grupo diabético tratado com insulina e o grupo controle, mostrando uma boa formação óssea em ambos os grupos.

Dowell et. al. (2007) após instalação de 50 implantes em 35 pacientes diabéticos do tipo 2, observaram nenhuma perda e relataram não haver evidência do insucesso clínico ou complicações associadas com a terapia de implantes nos pacientes com o nível de glicose controlado.

Avaliando histomorfometricamente o volume ósseo trabecular e a osseointegração após 1, 2, 4 e 8 semanas em 140 animais, Casap et. al. (2008) não encontraram diferença entre os grupos.

Hasegawa et. al. (2008) comparou implantes instalados em ratos controle e diabéticos modificados geneticamente e concluiu que a porcentagem osso-implante foi consideravelmente menor para o grupo diabético tanto no osso cortical como no medular. O contato osso-implante na cortical foi de 12% para os diabéticos e 61% para o controle. O tecido ósseo nos ratos diabéticos foi caracterizado por tecido fragmentado e tecido mole. Concluíram que o diabetes tipo 2 atrapalha a capacidade de osseointegração desproporcionalmente entre o osso cortical e medular.

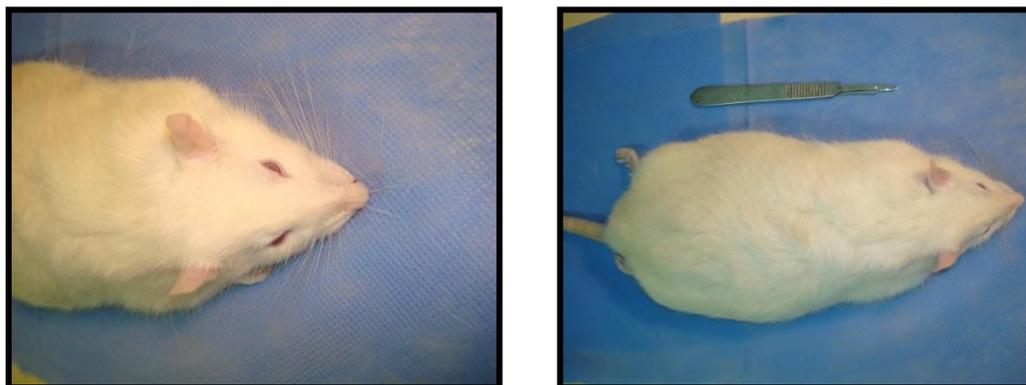
### **3 PROPOSIÇÃO**

Analisar a quantidade da osseointegração de implantes dentários instalados em tíbia de ratos com diabetes induzida, diabéticos controlados por insulina e não diabéticos, através da análise histométrica decorridos 28 e 56 dias da instalação destes implantes.

## 4 METODOLOGIA

### Seleção dos Animais

Foram utilizados 40 ratos machos da espécie *Rattus norvegicus*, albinos da linhagem Wistar, com idade de 90 dias, pesando aproximadamente 200g cada (figuras 1a e 1b)



Figuras 1a e 1b – Animais utilizados no estudo

O experimento foi desenvolvido durante o período de janeiro a julho de 2009. Todos os ratos foram provenientes do laboratório de pesquisa do biotério do Laboratório Universitário de Análises Toxicológicas (UNITOX) da Universidade Santo Amaro (UNISA), assistidos e medicados por médicos veterinários, e as cirurgias realizadas nas dependências do laboratório de cirurgia experimental do Unitox.

Os animais foram separados em gaiolas plásticas de 45 x 30 x 15 cm de comprimento, largura e altura respectivamente, com tampa gradeada de metal e mantidos com livre acesso à alimentação e água *ad libitum*, a uma temperatura de 24°C e com iluminação artificial por lâmpada fluorescente (modelo luz do dia, 40W) com fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro (figuras 2a e 2b).



Figuras 2a e 2b – Divisão e armazenamento dos animais

Esta pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Santo Amaro (UNISA) e aprovada com o parecer número 089/2008 em 27 de agosto de 2008. O protocolo dessa pesquisa foi realizado de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, elaborados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), entidade filiada ao International Council of Laboratory Animal Science (ICLAS), segundo normas internacionais para a utilização de animais em pesquisas embasadas na tríade “sensibilidade, bom senso e boa ciência”.

### **Divisão**

Os 40 animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos, assim sendo:

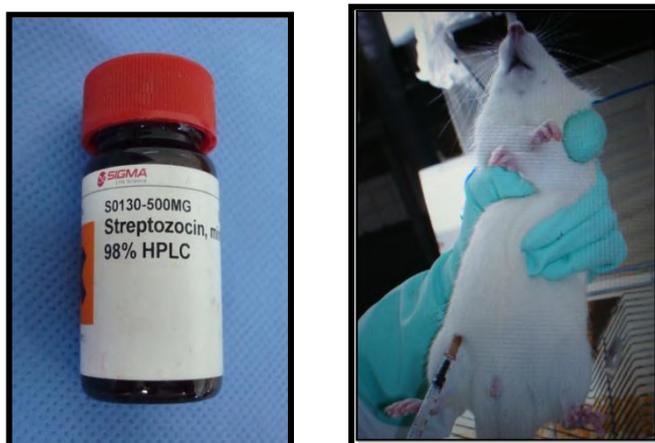
- Grupo I: grupo controle – 10 animais – os animais deste grupo não receberam nenhum tipo de droga ou veículo e permaneceram com alimentação e água *ad libitum*;

- Grupo II: grupo diabético induzido – 15 animais – neste grupo, os animais receberam injeção de Streptozotocina (Sigma®), intraperitoneal, diluída em tampão citrato 0,1M, pH 4,5;

- Grupo III: grupo diabético induzido, controlado por insulina – 15 animais – neste grupo, os animais receberam o mesmo tratamento que o G II, e após o desenvolvimento da doença (6 semanas) foram controlados com insulina humana biossintética, suspensão neutra injetável (Novolin N®, Novo Nordisk®).

### Indução do diabetes

Após jejum de 14 horas, recebendo apenas água *ad libitum*, os animais dos grupos II e III receberam por via intraperitoneal, uma única dose de estreptozotocina (STZ) dissolvida em tampão citrato (0,01M; pH4.5), na concentração de 65mg/kg de peso corpóreo (Sigma, St. Louis, MO, USA). Após a administração da droga, a alimentação e água foram restituídas (figuras 3a e 3b)



Figuras 3a e 3b – Apresentação e aplicação da estreptozotocina (STZ)

A solução de tampão citrato contém: ácido cítrico 20,1 g/L, hidróxido de sódio 8 g/L, diluída em água destilada e ajustado o pH com ácido clorídrico diluído (Farmacopédia Portuguesa).

Após 21 dias foram constatado os quadros de polidipsia, polifagia, poliúria e perda de peso (figura 4) nos animais induzidos dos grupos diabéticos (STZ) II, III, retratando os sinais clássicos da diabetes. Nesta ocasião, foram coletadas amostras de sangue obtidas da ponta da cauda dos ratos, para comprovação do quadro diabético, através de análise glicêmica (figura 5).

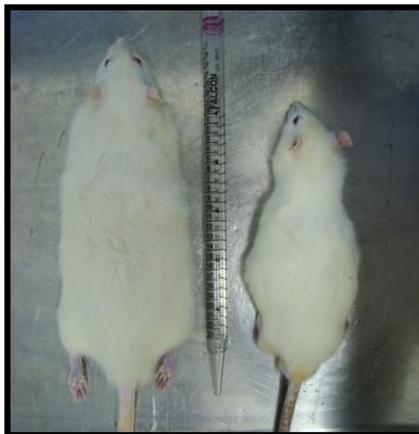


Figura 4 – Comparação do tamanho dos animais do grupo controle (GI) e grupo diabético (GII)



Figura 5 - Amostras de sangue obtidas da ponta da cauda dos animais

### **Controle glicêmico**

As amostras de sangue dos animais diabéticos foram coletadas no período entre 6h e 8h. As amostras foram colhidas e realizados os testes de glicose com o auxílio de um glicosímetro digital (Accu-Chek Active, Roché) sendo considerado como diabetes níveis de glicose plasmática acima de 250 mg/dl.

Um dia após a confirmação do quadro de diabetes, os animais do grupo III receberam injeção intramuscular de insulina humana biossintética, suspensão neutra injetável (Novolin N, Novo Nordisk)(figura 6). Os demais ratos do grupo diabéticos II, e os animais controle do grupo I foram mantidos sem modificações.

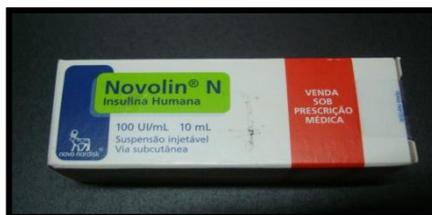


Figura 6 - Insulina humana, suspensão neutra injetável (Novo Nordisk)

Após 7 dias de injeções diárias de insulina, constatou-se o sucesso do controle glicêmico dos animais do G III (figuras 7a, 7b e 7c), sendo então submetidos à cirurgia para colocação dos implantes.



Figuras 7a, 7b e 7c – Amostras de sangue aferidas no glicosímetro dos grupos GI, GII e GIII, respectivamente.

### **Anestesia e Preparo dos Animais**

Após 6 semanas, os animais foram pesados para que fosse utilizada a quantidade de droga anestésica ideal para cada animal. A indução anestésica foi realizada, por via intraperitoneal com Cetamina® (cloridrato de Ketamina 150 mg/kg) associada com Xilazina® (Cloridrato de Xilazina 10 mg/kg) com agulhas de tamanho (30x7).

Verificado o plano anestésico, foi realizada tricotomia e antissepsia nas áreas a serem operadas com auxílio de uma solução degermante de iodo-povidine (figura 8), nas tíbias direita e esquerda. Foram utilizados campos estéreis para a manutenção da assepsia durante a cirurgia (figura 9). Os animais foram anestesiados seguindo o protocolo do laboratório de pesquisa do biotério

do Laboratório Universitário de Análises Toxicológicas (UNITOX) da Universidade Santo Amaro (UNISA), assistidos e medicados por médicos veterinários.



Figura 8 - Tricotomia e antissepsia



Figura 9 – Campo operatório utilizado

### **Procedimento Cirúrgico**

Após a indução e controle glicêmico dos animais a serem estudados foi iniciado o ato cirúrgico que consistiu em duas etapas. Primeiramente foi realizado o procedimento cirúrgico no grupo 56 dias, após 28 dias foi realizada a segunda etapa cirúrgica, a repetição dos mesmos procedimentos no grupo de 28 dias, para posterior eutanásia.

A incisão foi padronizada para exposição tibial, a fim de não ter a interferência da musculatura da região tanto na incisão quanto no descolamento. Para exposição do tecido ósseo foi realizada uma incisão retilínea de aproximadamente 2 cm utilizando-se uma lâmina de bisturi nº15. Com auxílio de descoladores de periósteo a área foi exposta, mantendo a área cirúrgica livre, auxiliando no procedimento. Para a colocação

dos implantes utilizamos um motor para implante (Driller BLM 550), contra-ângulo (W&H 20:1) e brocas.

Com auxílio de descoladores de Molt e Freer, promovemos o afastamento de todo perióstio deixando o osso da área receptora exposto (figura 10).



Figura 10 – Descolamento do perióstio

Iniciamos primeiramente a loja óssea com broca guia esférica de 0,5 mm de diâmetro e a perfuração com fresa helicoidal de 1 mm de diâmetro e 3 mm de comprimento com rotação a 1350 rpm com abundante irrigação com solução salina estéril.

Feita a fresagem foi realizada a instalação dos mini-implantes, um na tibia direita e um na tibia esquerda de cada animal, a justificativa para a utilização das duas tibia é que o ato de deambulação, ou seja mancar, podendo retardar a reparação óssea, atrasando assim a ósseointegração, mini-implantes de tamanho 1.4 mm de diâmetro x 2.7 mm de altura (SIN – Sistema de implante)(figura 11) com auxílio de uma chave hexagonal 0,9 até alcançar um travamento mecânico, avaliada manualmente, e de forma que todo o comprimento estivesse intraósseo (figuras 12 e 13a e b).

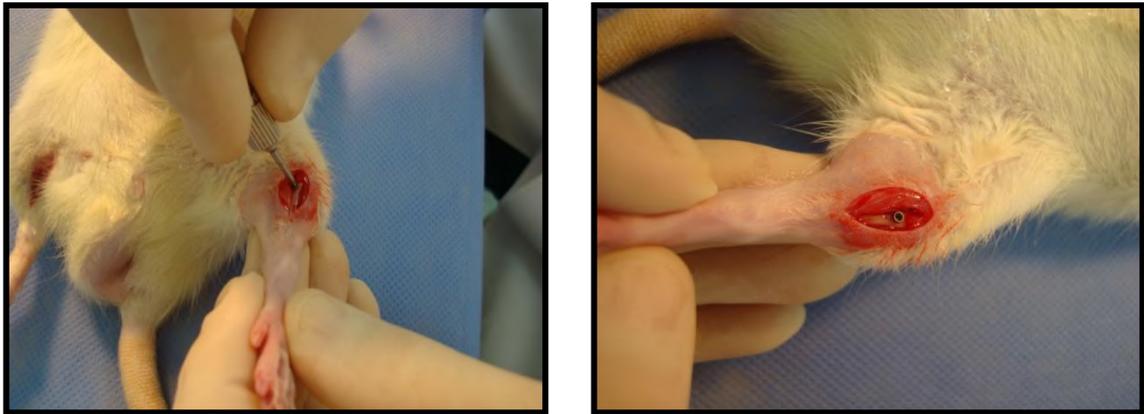


Figura 11 – Implante Utilizado



Figura 12 – Loja óssea após a perfuração

Após a instalação, o retalho foi novamente colocado em posição e realizada suturas internas e externas com pontos simples com auxílio do fio CatGut Simples 5-0 (Technosuture®).



Figuras 13a e 13b – Instalação do implante

Toda a seqüência de incisão, descolamento e cuidados foram realizadas repetidamente em todos os animais utilizados.

### **Controle Pós-operatório**

Após a cirurgia os ratos foram medicados com analgésicos (paracetamol 2 gotas) e antibióticos (Benzilpenicilina - Benzatina 150.000 UI - intramuscular 0,06 ml/kg) e acompanhados até a sua total recuperação.

Os animais foram recolocados em suas gaiolas de origem, em ambiente limpo até a recuperação anestésica e foram observados diariamente até o dia do sacrifício.

Neste período observamos a perda de 13 animais dos 40 inicialmente separados para o estudo que não suportaram o trauma pós-cirúrgico e morreram antes do prazo estipulado para realização da eutanásia, restando em nosso estudo 7 animais controle (GI), 10 animais diabéticos (GII) e 10 animais diabéticos controlados com insulina (GIII), totalizando 27 animais.

### **Eutanásia**

Após a obtenção dos resultados e respeitando o período de cada grupo, os ratos foram sacrificados em períodos de 28 e 56 dias após a instalação dos implantes para serem submetidos à amputação das tíbias para posterior análise histológica (Tabela 1). Foram anestesiados e submetidos à eutanásia por overdose de Thiopental sódico (150 mg/kg, Thiopentax®) por via intraperitoneal seguindo o protocolo do laboratório de pesquisa do biotério do Laboratório

Universitário de Análises Toxicológicas (UNITOX) da Universidade Santo Amaro (UNISA), assistidos por médicos veterinários.

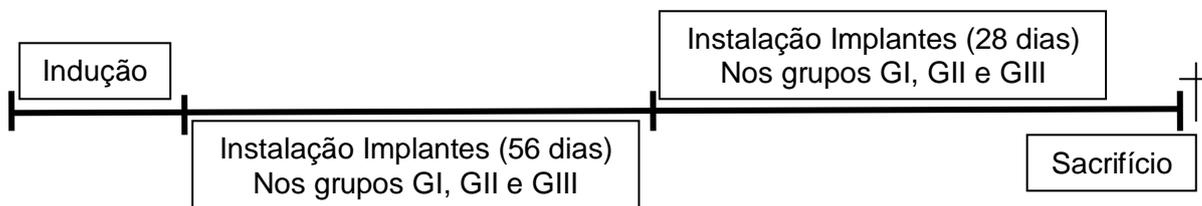


Tabela 1 – Período de sacrifício dos grupos 28 e 56 dias.

### **Coleta Amostrais**

Após o procedimento cirúrgico, as amostras contendo o tecido ósseo e implantes foram imersas em solução de formol tamponado a 10%, catalogadas e encaminhadas para estudo histológico para posterior utilização.

### **Preparo e Inclusão dos blocos Ósseos**

Os cortes dos blocos ósseos, inclusão em resina, preparação e coloração das lâminas foram realizados no Laboratório de tecidos mineralizados de histologia do ICB III da USP (Universidade de São Paulo – campus São Paulo).

Após a retirada da solução de formol a 10% foram feitos cortes nos blocos com disco diamantados com caneta de baixa rotação, deixando um remanescente ósseo de 4 mm das porções mesial e distal dos implantes.

As peças foram lavadas em água corrente por 24 horas, desidratadas por meio de banho de álcool 70°m por 24 horas (banho I), álcool absoluto por 24 horas (banho II), novamente álcool absoluto por 48 horas (banho III) e álcool absoluto por mais 56 horas (banho IV). Foram diafanizadas em Xilol, por uma seqüência de dois banhos sendo o primeiro pelo período de 24 horas e o segundo por 48 horas.

Finalizado estes processos de fixação, desidratação e diafanização, as peças foram incluídas em resina com Di-isobutilftalato, Metilmetacrilato e Peróxido de Benzoila.

Para inclusão inicial e impregnação foi preparada a solução denominada “A”, composta de 15% de Di-isobutilftalato e 85% Metilmetacrilato. Esta solução

foi dividida em recipientes de vidro com tampas de rosca de aproximadamente 10 ml de capacidade volumétrica cada, onde as amostras haviam sido colocadas.

As 27 amostras permaneceram imersas nesta solução por um período de 7 dias, estocadas a uma temperatura de 6° a 8°C a fim de se evitar a polimerização da resina. Ao término desse período, as peças foram mergulhadas por mais 7 dias em solução denominada “B”, composta de 15% de Di-isobutilftalato e 85% Metilmetacrilato com mais 4 gr de Peróxido de Benzoila à mesma temperatura da solução anterior iniciando-se lentamente o processo de polimerização.

Finalmente as amostras foram mergulhadas em uma solução “C” composta de 15% de Di-isobutilftalato e 85% Metilmetacrilato e agora com 20 gr de Peróxido de Benzoila, permanecendo desta vez em temperatura ambiente até a completa polimerização da resina, onde os vidros foram quebrados e obtidos blocos de resina onde se encontrava a tibia contendo o implante (figura 14).



Figura 14 – Bloco obtido após a inclusão

Para os cortes de tecidos descalcificados foi tomado como base o protocolo de Donath e Breuner (1982). Os blocos foram cortados no aparelho (EXAKT® 300 CP) a uma espessura de 800 µm a 1000 µm (figuras 15 e 16), fixados a uma lâmina de acrílico transparente de 40 mm de largura x 70 mm de comprimento x 2 mm de espessura com Éster de Cianocrilato (SuperBonder®). Após este processo iniciou-se a diminuição da espessura do corte na lixadeira (DP-10 Panambra®) com auxílio de lixas de carbeto de silício de várias

granulações (600, 1200, 2000, 2500 e 4000), com irrigação de água, reduzindo-as a uma espessura de 200  $\mu\text{m}$  (figura 17) e coradas em Azul de Toluidina a 1%.



Figura 15 – Aparelho EXAKT® 300 CP utilizado para corte dos blocos

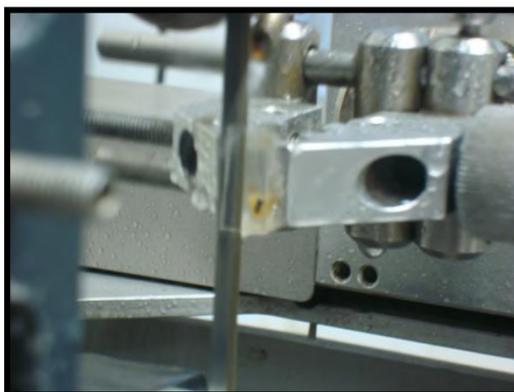


Figura 16 – Momento do corte do bloco



Figura 17 – Lixadeira Panambra® DP-10 utilizada para reduzir a espessura da lâmina

## Histometria

A Histometria foi realizada no Laboratório de Histologia da UNIFESP (Universidade Federal de São Paulo) através da captura de imagens por um microscópio de Luz (Axiolab E re, Carl Zeiss, Alemanha) e a digitalização da imagem feita por intermédio de uma câmera (Axio Cam MRc5, Carl Zeiss, Alemanha), acoplada ao microscópio e ligado ao programa Axio Vision 4.6 (Carl Zeiss, Alemanha) (figura 18).

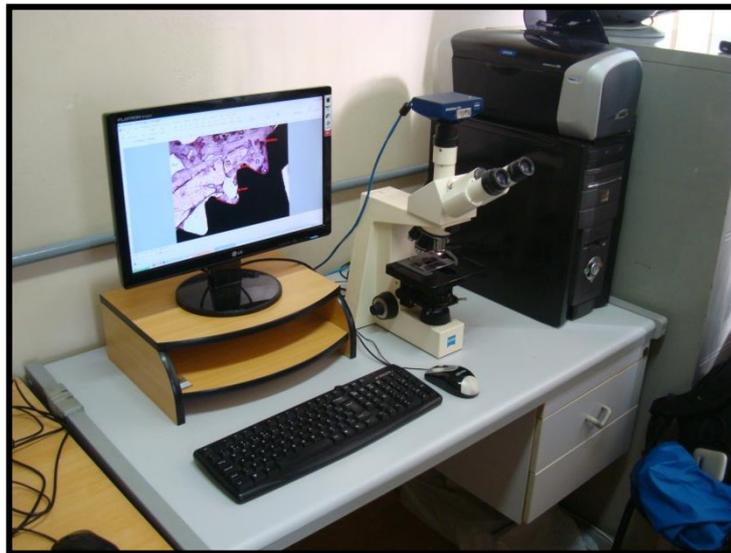


Figura 18 – Equipamento utilizado para foto, mensuração e leitura das lâminas

As áreas utilizadas para as mensurações foram:

- Área total das superfícies das espiras a ser mensurada (figura 19);

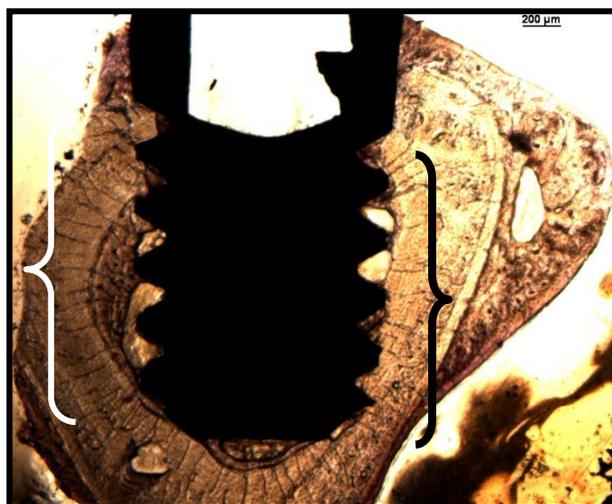


Figura 19 – Área de mensuração dos implantes

- Área da superfície mensurada em aumento de 20x (figura 20);

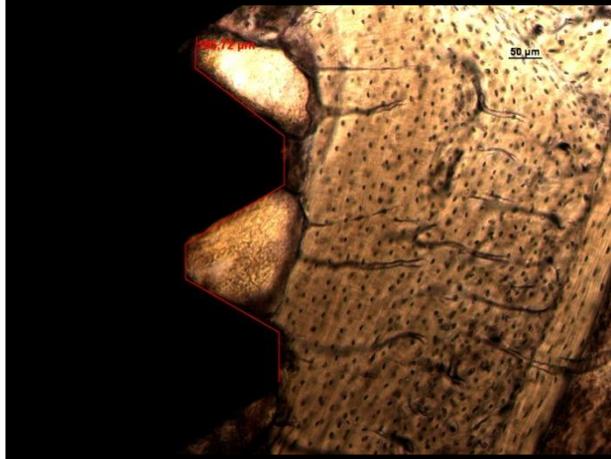


Figura 20 – Área da superfície do implante

- Área de contato osso implante (figura 21);

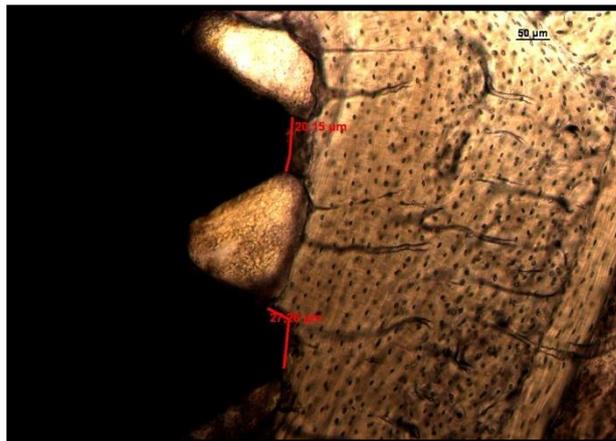


Figura 21 – Área de contato osso-implante

A mesma metodologia foi utilizada para medir a superfície do implante e o contato osso-implante em cada um dos cortes histológicos, obtendo assim valores matemáticos que pudessem determinar estatisticamente a formação de novo osso no interior de cada espira.

### **Análise de Estatística**

Os dados obtidos tiveram suas médias e erros-padrões calculados.

A análise estatística foi realizada através do teste não paramétrico Kruskal-Wallis, sendo uma alternativa para o teste ANOVA, em função do pequeno número de casos, comparando a área da superfície disponível do

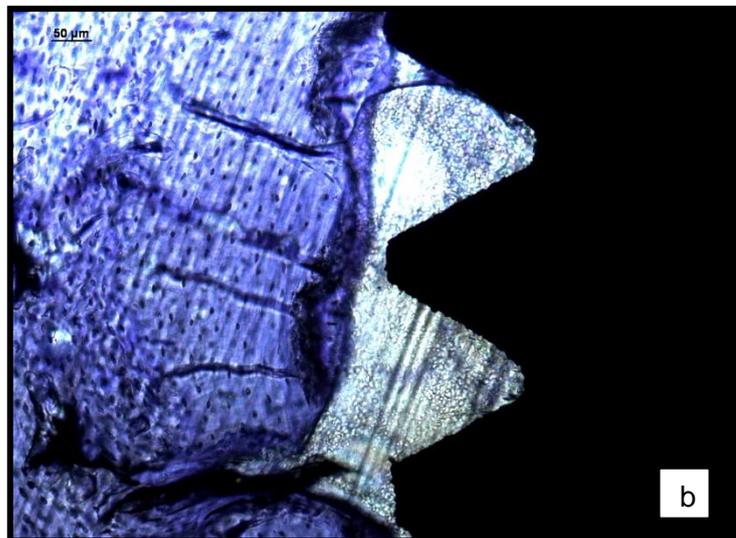
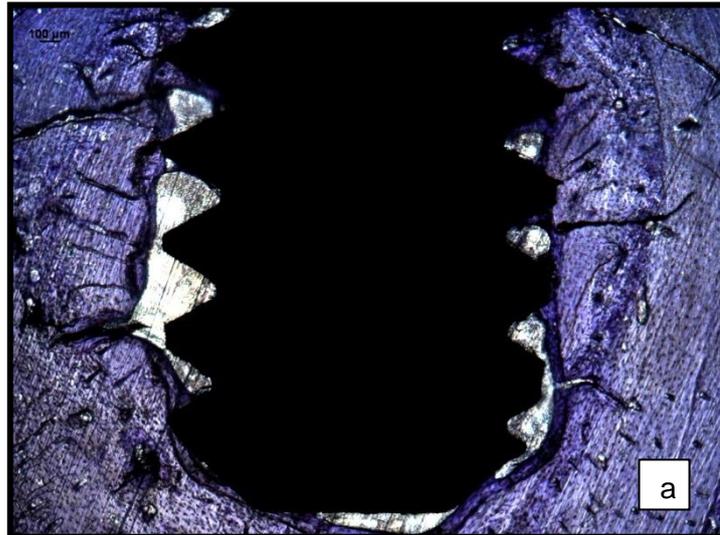
implante, contato direto do osso ao implante e a porcentagem de ósseointegração, entre os grupos GI, GII e GIII.

As análises foram realizadas nos parâmetros de tempo (28 e 56 dias) e efeito da diabetes na ósseointegração.

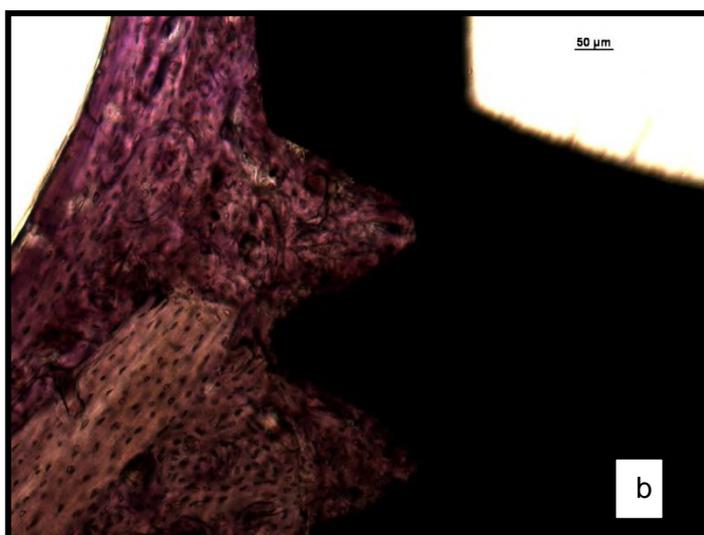
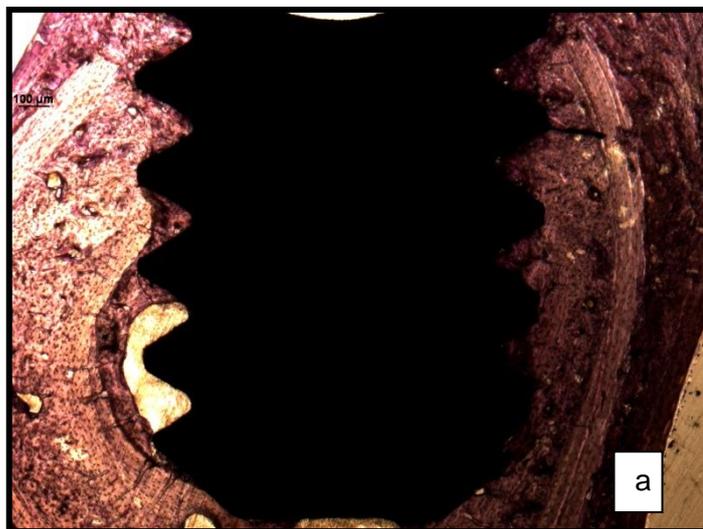
No teste foi estabelecido o nível de significância em 5% para rejeição em hipótese de nulidade sendo esta uma hipótese que é presumida verdadeira até que provas estatísticas sob a forma de testes de hipóteses indiquem o contrário.

## 5 ASPECTOS HISTOLÓGICOS

Após a confecção dos cortes histológicos e das lâminas foram feitas as leituras onde podemos observar áreas sem formação tecidual e áreas de neoformação óssea.

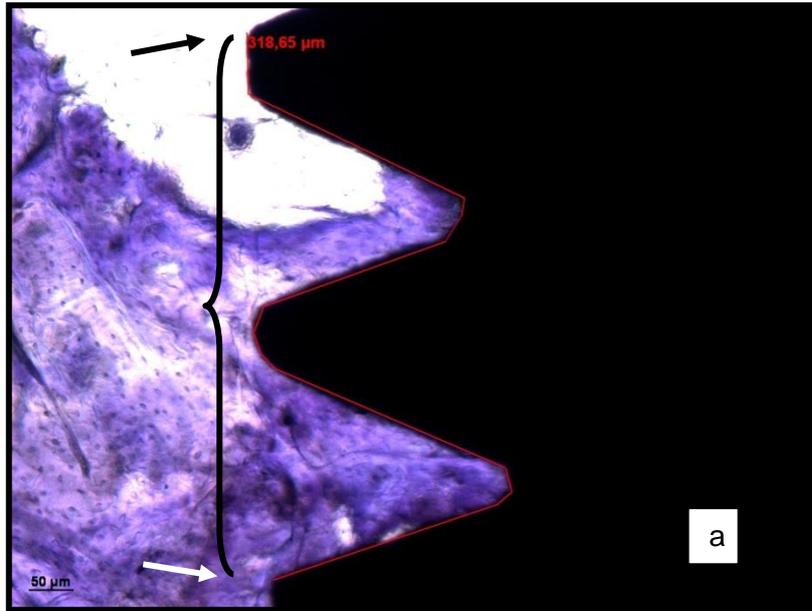


Figuras 22a e 22b – Fotografia das lâminas de cortes histológicos de tíbia de rato e implante de titânio após 28 dias de implantação, grupo diabético controlado (GIII), mostrando início do processo de neoformação óssea. Corada com azul de Toluidina a 1%. Aumento original de 4x e 10x respectivamente.

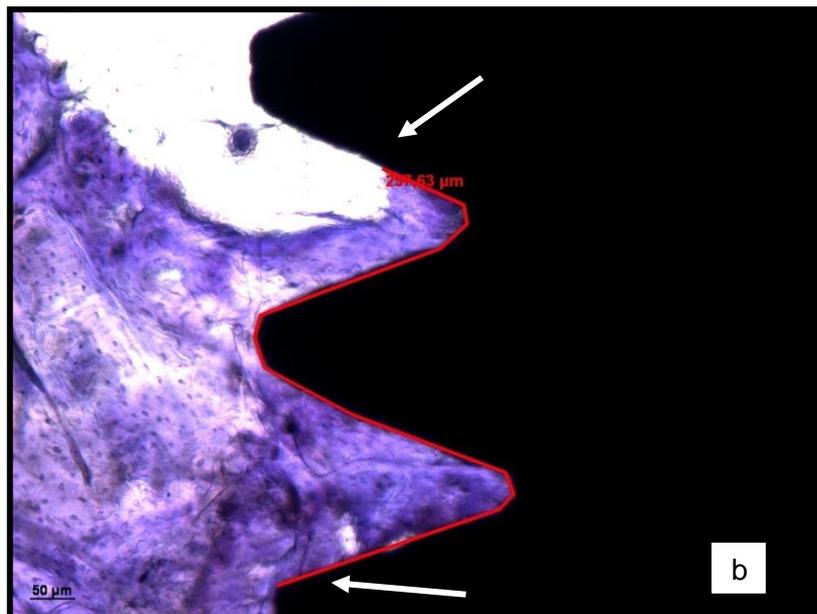


Figuras 23a e 23b – Fotografia das lâminas de cortes histológicos de tíbia de rato e implante de titânio após 56 dias de implantação, grupo diabético controlado G(III), mostrando neoformação óssea. Corada com azul de Toluidina a 1%. Aumento original de 4x e 10x respectivamente.

Para as mensurações foram utilizadas todas as lâminas confeccionadas para este trabalho com aumento de 4x onde foram aferidos os picos, flancos e vales das espiras dos implantes com recurso do programa AxionVision<sup>®</sup>, que calculou automaticamente a medida linear em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ), aferindo assim a superfície do implante (SI) e o contato osso-implante (COI).



Figuras 24a – Fotografia das lâminas de cortes histológicos de tíbia de rato e implante de titânio utilizadas para mensurações. Medidas apontadas indicando o local da superfície do implante (SI).



Figuras 24b – Fotografia das lâminas de cortes histológicos de tíbia de rato e implante de titânio utilizadas para mensurações. Medidas apontadas indicando o local do contato osso-implante (COI) estudado.

Após as mensurações as medidas foram exportadas para tabelas do Excel (Microsoft®) onde obtivemos a porcentagem e os gráficos da superfície do implante (SI) e do contato osso implante (COI), e então, submetidas à análise estatística.

## 6 RESULTADOS

As medidas foram obtidas, somadas e colocadas em tabelas, podendo assim comparar os valores entre os três grupos diferentes. (Tabelas 2, 3 e 4)

Em nosso estudo durante o procedimento cirúrgico dos animais do grupo 28 dias, 13 animais morreram em decorrência da anestesia e do trauma pós cirúrgico, inviabilizando a análise estatística deste grupo pela quantidade do n, sendo então desprezados os resultados.

Na intervenção da reabertura, nos períodos determinados, os implantes encontravam-se estáveis e com aspecto de neoformação óssea.

Os dados referentes aos animais sacrificados com 56 dias encontram-se nas tabelas 2, 3 e 4.

Tabela 2 – Medidas das superfícies dos implantes, contato osso-implante e da porcentagem de osseointegração do grupo controle (GI) 56 dias.

Nº Animais	Superfície do Implante (SI)	Contato Osso-implante (COI)	% Osseointegração
1	1066,99	722,71	67,73
2	1063,85	936,48	88,03
3	1112,73	792,96	71,26
4	1097,45	812,53	74,04
5	1217,56	835,08	68,59

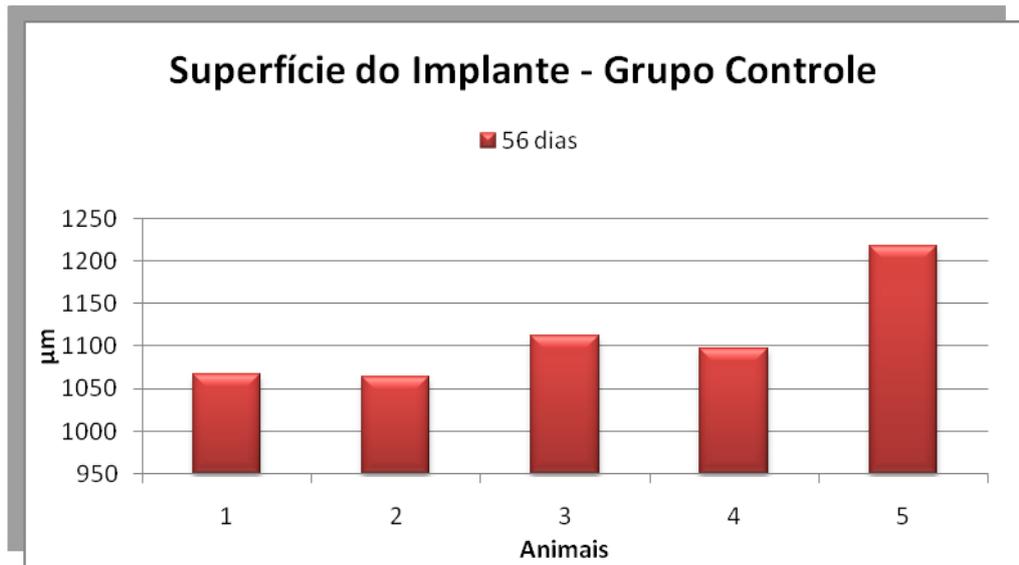


Gráfico 1 – Comparação dos valores da superfície do implante mensurados nos animais do grupo controle (GI) com 56 dias.

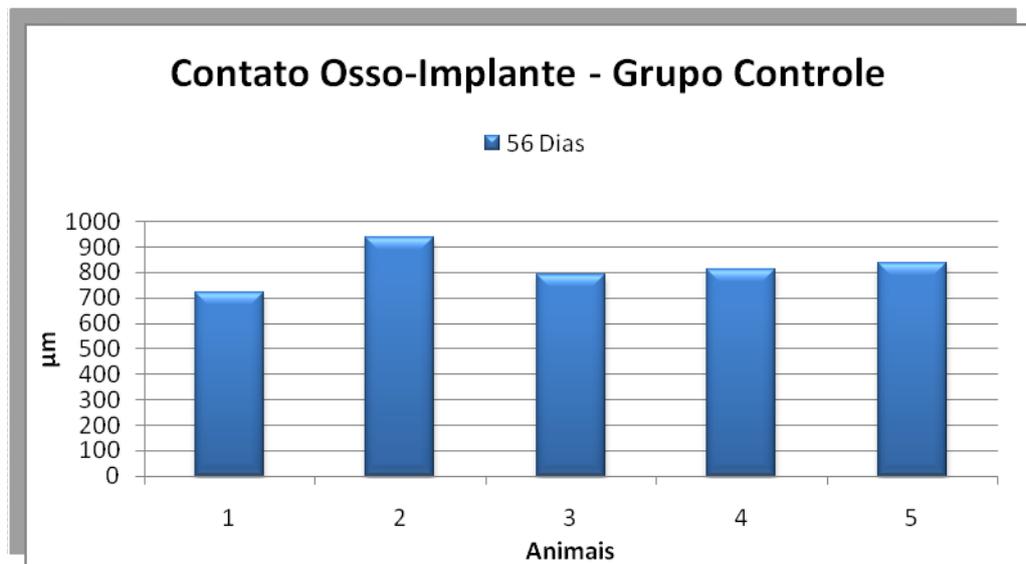


Gráfico 2 – Comparação dos valores do contato osso-implante mensurados nos animais do grupo controle (GI) com 56 dias.

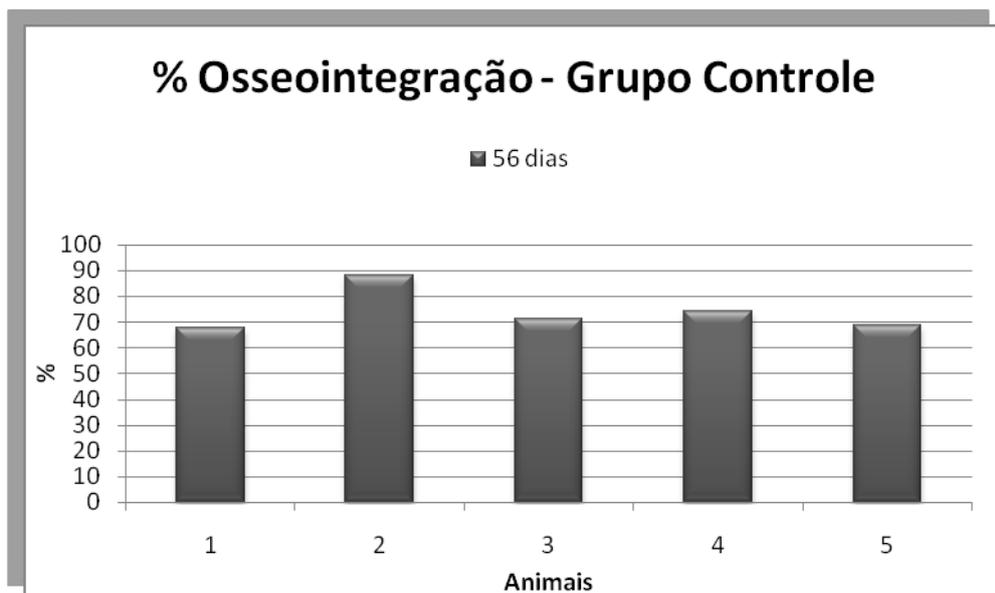


Gráfico 3 – Comparação dos valores percentuais do contato osso-implante mensurados nos animais do grupo controle (GI) com 56 dias.

Na comparação entre os resultados dos animais do grupo controle, pode-se observar haver diferença na quantidade de porcentagem de osseointegração entre os animais analisados.

Tabela 3 – Medidas das Superfícies dos implantes, contato osso implante e da porcentagem de osseointegração do grupo diabético (GII) 56 dias.

Nº Animais	Superfície do Implante (SI)	Contato Osso-implante (COI)	% Osseointegração
1	877,73	783,41	89,25
2	1199,9	731,05	60,92
3	1122,33	739,37	65,88
4	918,84	746,81	81,28
5	1243,24	1150,56	92,54
6	1067,22	817,13	76,57
7	1227,12	1037,13	84,52

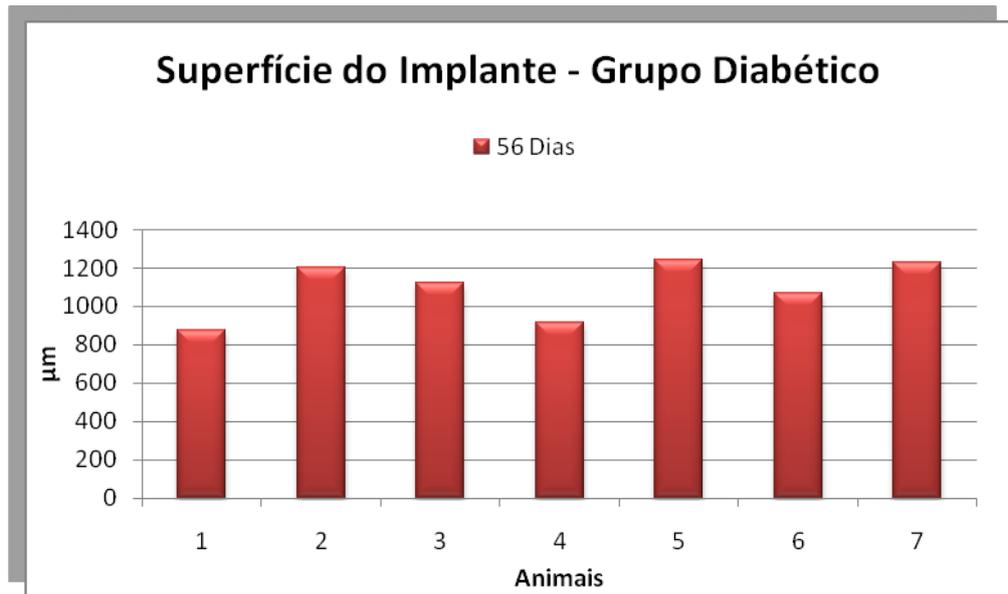


Gráfico 4 – Comparação dos valores da superfície do implante mensurados nos animais do grupo diabético (GII) com 56 dias.

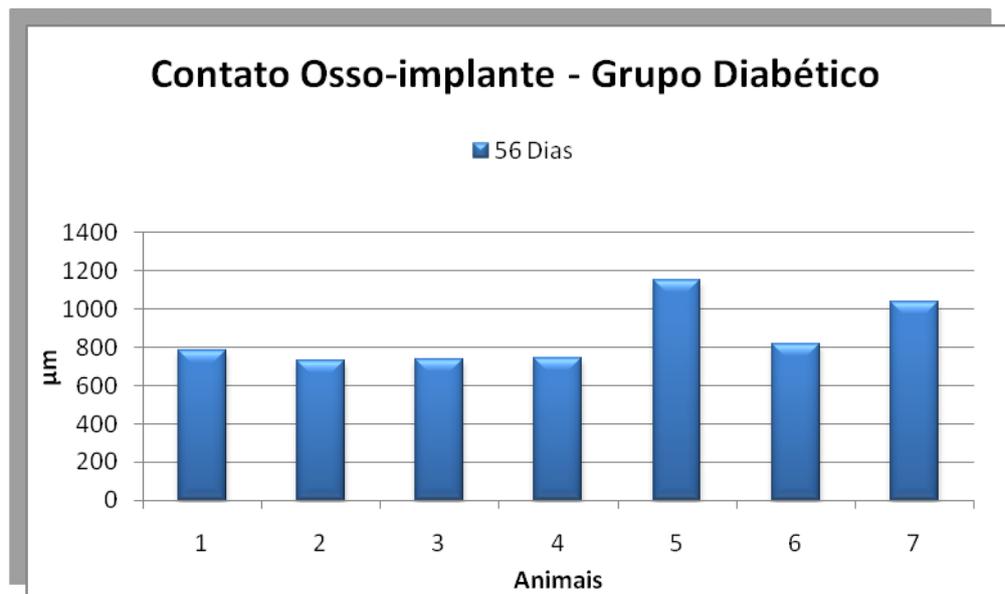


Gráfico 5 – Comparação dos valores do contato osso-implante mensurados nos animais do grupo diabético (GII) com 56 dias.

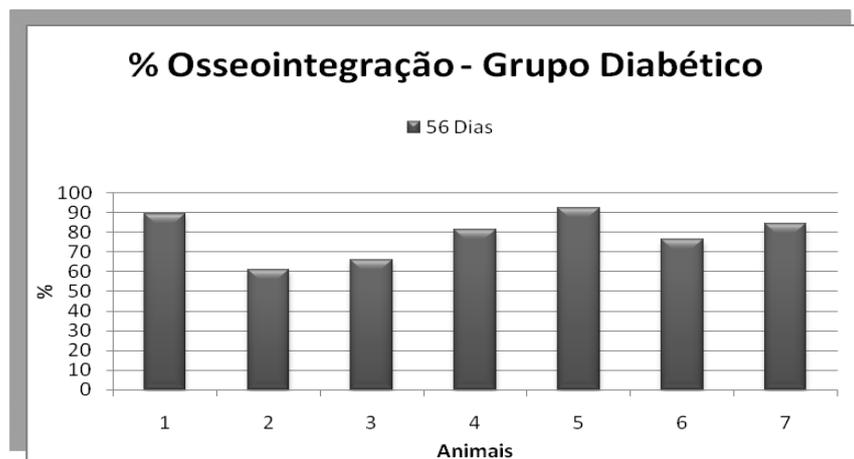


Gráfico 6 – Comparação dos valores percentuais do contato osso-implante mensurados nos animais do grupo diabético (GII) com 56 dias.

Na comparação dos resultados dos animais do grupo diabético, observamos haver diferença entre o percentual de osseointegração nos animais do mesmo grupo. Porém quando comparado com os outros grupos esta diferença acaba não existindo.

Tabela 4 – Medidas das Superfícies dos implantes, contato osso implante e da porcentagem de osseointegração do grupo diabético controlado por insulina (GIII) 56 dias.

Nº Animais	Superfície do Implante (SI)	Contato Osso-implante (COI)	% Osseointegração
1	1297,64	851,63	65,62
2	1205,11	788,92	65,38
3	1386,71	609,85	43,97
4	1096,78	910,45	83,01
5	1093,43	815,32	74,56
6	1103,04	884,60	80,19
7	1187,26	847,37	71,37
8	1097,06	637,93	58,15

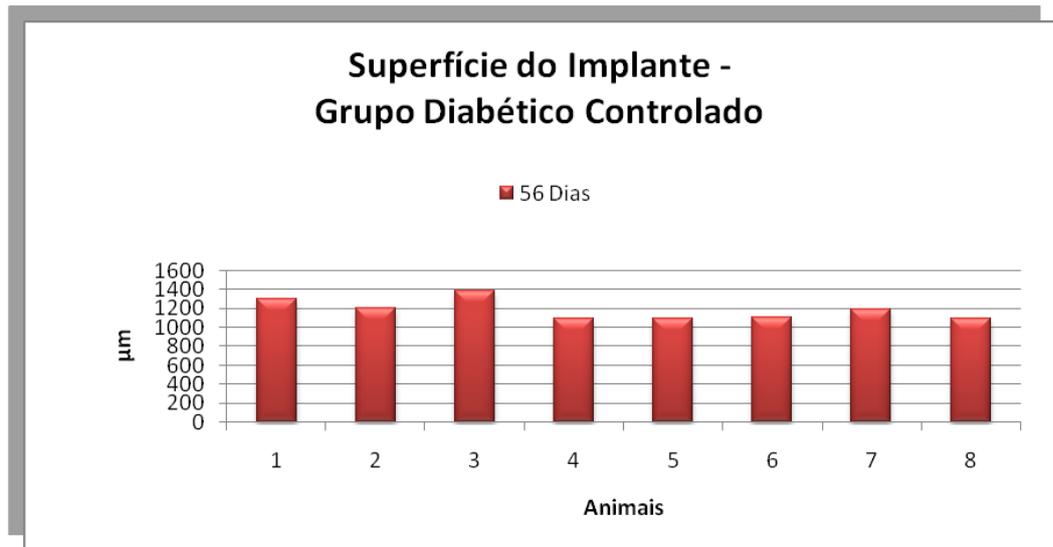


Gráfico 7 – Comparação dos valores da superfície do implante mensurados nos animais do grupo diabético controlado (GIII) com 56 dias.

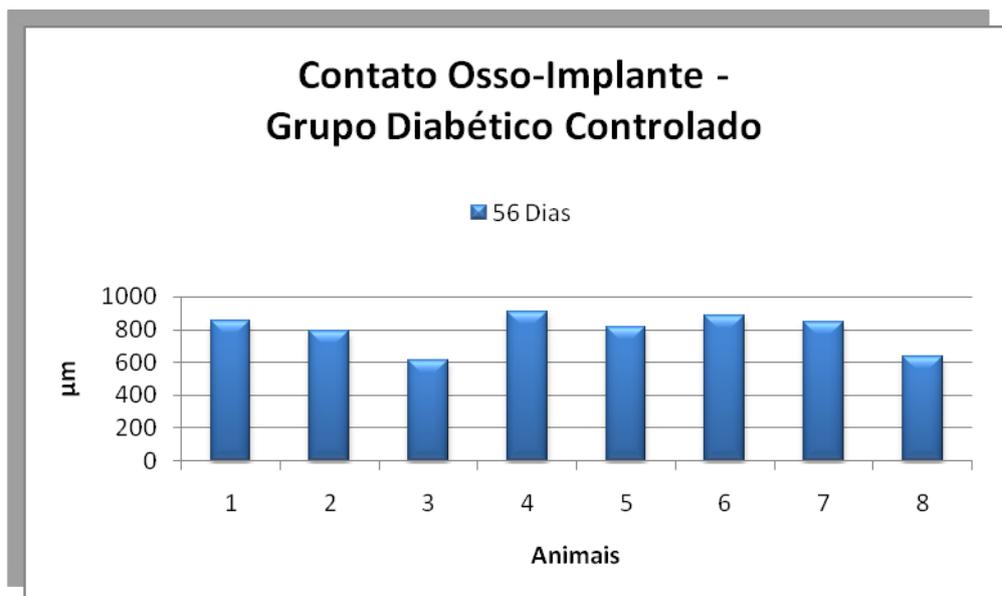


Gráfico 8 – Comparação dos valores do contato osso-implante mensurados nos animais do grupo diabético controlado (GIII) com 56 dias.

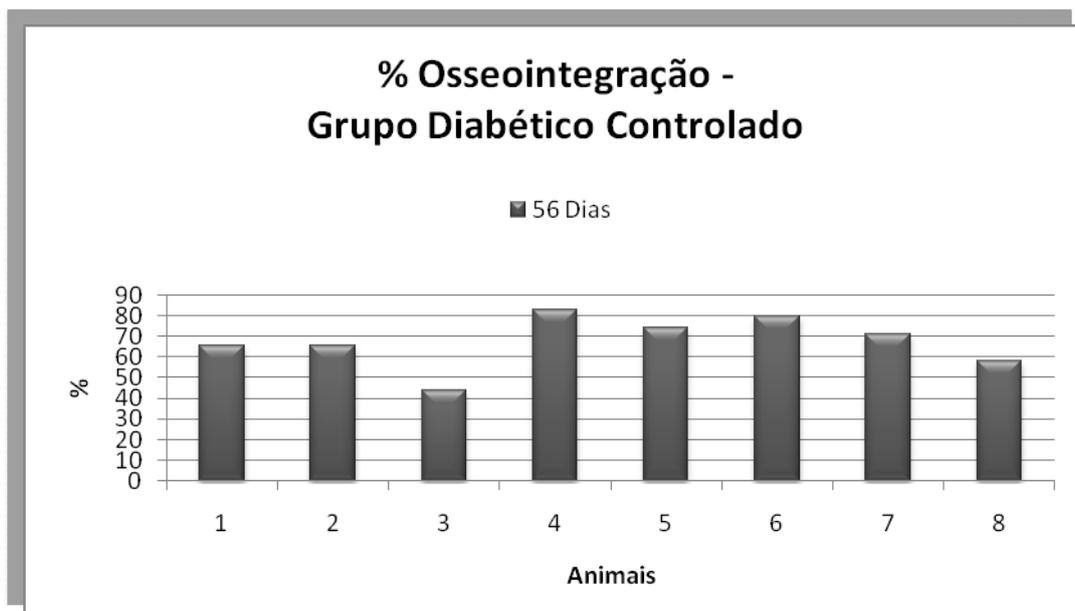


Gráfico 9 – Comparação dos valores percentuais do contato osso-implante mensurados nos animais do grupo diabético controlado (GIII) com 56 dias.

Na comparação dos resultados dos animais do grupo diabético controlado por insulina, observamos haver diferença entre o percentual de osseointegração. Porém quando comparado com os outros grupos esta diferença não se mostra significativa estatisticamente.

Analisando os gráficos 3, 6 e 9, a princípio, nota-se uma diferença de porcentagem de osseointegração existente entre os animais dos mesmos grupos, porém esta diferença não se apresenta estatisticamente significativa. Ao se comparar os dados com os animais dos três grupos esta diferença estatística também não se confirma.

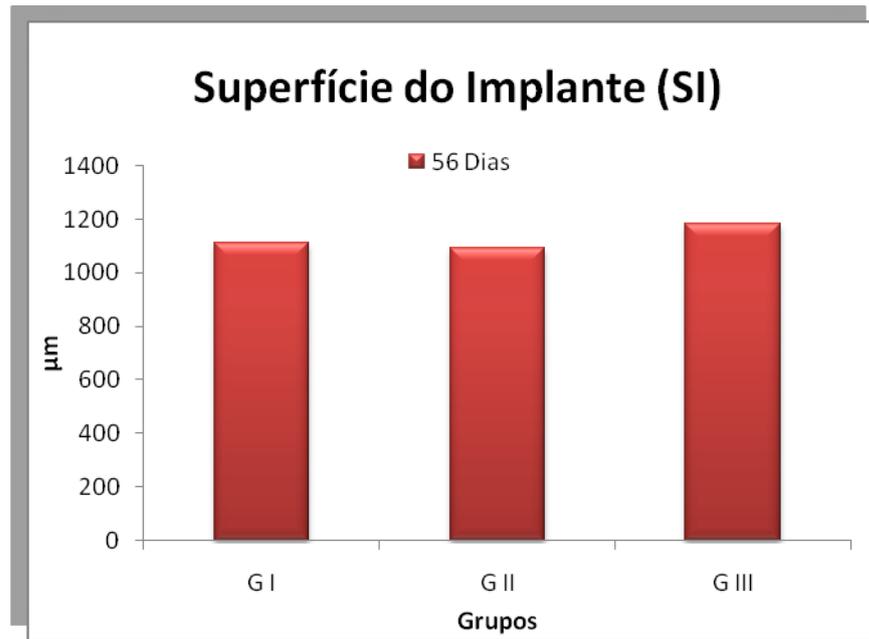


Gráfico 10 – Média dos valores da superfície dos implantes (SI) dos grupos GI, GII e GIII.

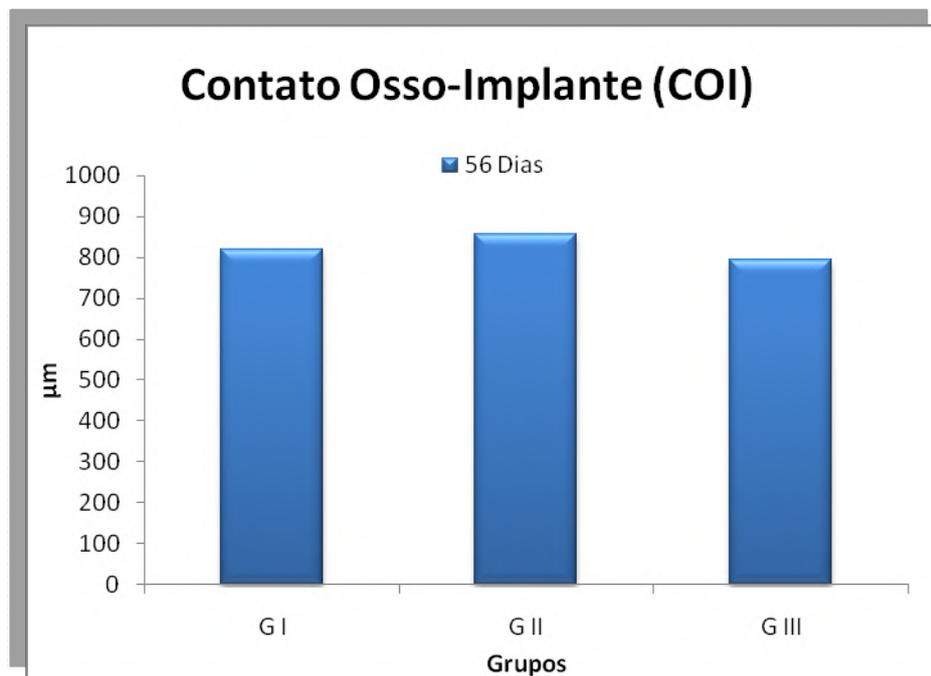


Gráfico 11 – Média dos valores da superfície do contato osso-implante (COI).

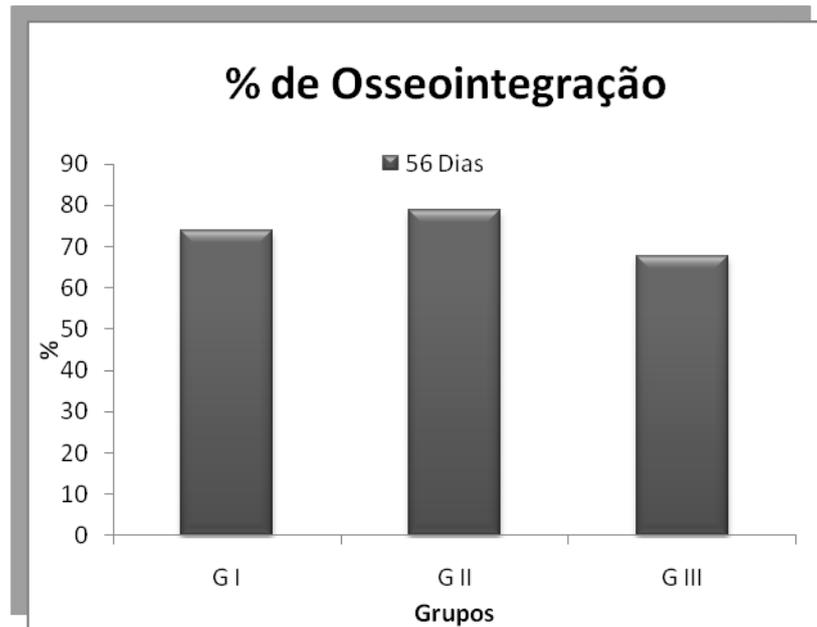


Grafico 12 – Média da relação entre a superfície do implante e contato osso-implante sendo colocado em porcentagem.

Observando os grupos analisados com 56 dias, verificamos que os resultados histométricos obtidos confirmam matematicamente o aumento de tecido total neoformado no interior das espiras, porém não confirmam existir diferença significativa entre os grupos.

## 7 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, muitos estudos concentraram-se na avaliação de pacientes sistemicamente comprometidos em relação à instalação de implantes dentários. Principalmente tratando-se do diabetes mellitus (DM) que é uma doença crônica grave que acomete milhares de pessoas em todo mundo (Edelman, 1998).

Aproximadamente 2,4% da população dos Estados Unidos da América são diabéticos, com outros 3,2% têm uma história familiar de aumento do nível de glicose. Esse problema geralmente vem acompanhando a idade do paciente, sendo que os idosos tem uma chance muito maior de desenvolvê-la. Em 1980 essa população acima de 65 anos significava 11% da população americana, hoje já estão em 12% com expectativa de crescimento para 21% em 2030. O implante está tornando-se cada vez mais aceitável para a reposição da perda dos dentes naturais, beneficiando assim essa população idosa. (Adel, 1985)

Em nosso trabalho utilizamos o medicamento estreptozotocina, que segundo Ward e Yau em 2001, em estudo, descreveram que este medicamento foi uma das primeiras drogas a ser utilizada para estudo do diabetes mellitus, tanto do tipo 1 como do tipo 2. A via de administração pode ser intravenosa ou intraperitoneal, a dose pode variar de 30 a 200 mg/kg e a administração da droga ocasiona destruição seletiva da célula  $\beta$  em várias espécies animais segundo Abdel-Wahab e O'harte (1996), Wang e Wu (1998), Murali e Goyal (2001) e Peredo (2001). De forma semelhante à estreptozotocina, Ozuari e Ozturk (1993) e Altan e Ongun (1994) descrevem que a aloxana também é uma droga utilizada para a indução dos dois tipos de diabetes mellitus.

Estudando a ósseointegração de implantes em pacientes diabéticos, Peled e Arkedian (2003) relataram a perda de 4 implantes em 41 pacientes diabéticos tipo 2 com instalação de 141 implantes, ou seja 94.4%, de sucesso com 5 anos de preservação. Comparando-se a este estudo, Olson e Shernoff (2000) avaliando 89 pacientes diabéticos tipo 2 observaram sucesso de 89,8% em 5 anos, concluindo que implantes podem ser realizado desde haja controle do nível de glicemia. Shernoff e Colwell (1994) observaram sucesso de 92,7% em 178 implantes em 89 pacientes tipo 2. Já Morris e Ochi (2000) observaram que a sobrevivência dos implantes em diabéticos tipo 2 foi menor que em pacientes não diabéticos. Entretanto, Farzad e Andersson (2002) verificaram que a taxa de insucesso é

semelhante ao da população em geral, se a taxa de glicose estiver normal ou controlada. Confrontando com estes resultados Tonetti e Cortellini (2004) afirma que o prognóstico a médio e longo prazo dos implantes em pacientes diabéticos ainda não está estabelecido.

Em nosso estudo constatamos não haver contra-indicação no tratamento de implantes dentários em pacientes diabéticos comparando-se com o estudo de Kapur e Garrett (1999) que documentaram não existir falhas no acompanhamento de 24 meses em 52 pacientes portadores da DM tipo 1. Apresentando resultados diferentes, Kotsovilis et. al. (2006), em revisão sistemática, chegou à conclusão de que estudos experimentais revelam uma resposta reparacional prejudicada à colocação dos implantes em animais diabéticos, comparando-se com o grupo controle, tanto qualitativa como quantitativamente. A maioria dos estudos clínicos tendem a indicar que o diabetes não é contra indicado para a colocação de implantes, sob a condição de haver controle metabólico. Entretanto, guias com critérios específicos, como tipo, duração do diabetes e níveis de hemoglobina glicolisada, precisam ser estabelecidos.

Observamos semelhança em nosso estudo quando comparado com o protocolo metodológico do estudo de Nevins e Karimbux (1998). Porém não obtivemos redução na porcentagem de ósseointegração do grupo diabético quando comparado ao diabético controlado ou ao grupo controle, tendo similaridade na neoformação e morfologia óssea comparando-se os grupos. Nem mesmo quando comparado ao estudo de Giglio et. al. (2000), que observou que os ratos diabéticos apresentavam um retardo no processo de reparação óssea e concluiu que o diabetes induzido não controlado retarda a cicatrização óssea peri-implantar. Mostrando boa evolução no processo de integração osso-implante, nosso trabalho não mostrou diferença entre os grupos.

Alguns autores verificaram o efeito da insulina na ósseointegração quando aplicada em animais diabéticos induzidos. Em seu estudo Fiorellini et. al. 1999 encontrou densidade óssea superior neste grupo. Resultado semelhante foi encontrado no trabalho de Siqueira e Cavalher-Machado (2003), onde a reparação óssea ao redor dos implantes em ratos diabéticos mostrou-se regulada pela insulina. Kwon e Rahman (2005) também demonstrou que a insulina pode aumentar a formação óssea ao redor de implantes nos ratos diabéticos. Diferindo destes trabalhos, nosso estudo foi realizado com intuito de avaliar diferenças entre os

grupos controle, diabético e diabético controlado por insulina, onde não foi possível notar essa diferença. Similar a nosso estudo encontramos o trabalho de McCracken e Lemons (2006) que após a indução do diabetes e controle com insulina obteve uma resposta óssea no grupo diabético significativamente maior que os outros, e não tiveram diferenças entre si.

A insulina é um hormônio importante, não só pelo controle da glicose, mas por modular o crescimento esquelético normal. Segundo Valero et. al. (2007), ela não regula a reabsorção óssea, mas estimula a síntese de matriz óssea, e tem efeito direto e indireto no metabolismo ósseo, estimulando a síntese de matriz osteoblástica diretamente e a produção do fator de crescimento (IGF-I) pelo fígado indiretamente.

Comparado ao estudo de Alkan et. al. (2002), adiamos o procedimento cirúrgico por 6 semanas contado à partir da injeção de estreptozocina até que as complicações crônicas do diabetes se tornassem evidentes. Esse período foi usado para que o alto nível de glicose pudesse levar a uma desordem do metabolismo ósseo tal como o osteopenia, sendo obtido somente quando um estágio crônico do diabético é alcançado.

Dentro do que ficou exposto e diante da complexidade do estudo, sugerimos que outras pesquisas deverão ser realizadas para avaliar outras variáveis que possam comprometer a osseointegração em pacientes diabéticos.

## 8 CONCLUSÃO

Concluiu-se que:

- A quantidade de osso formado na interface da superfície osso-implante não sofreu variação nos grupos estudados com 56 dias;
- Não foi possível a análise do grupo 28 dias pelo pequeno número de animais restantes.

## REFERÊNCIAS

ABDEL-WAHAB, Y.H., O'HARTE F.P. Glycation of insulin in the islets of Langerhans of normal and diabetic animals. **Diabetes**. v.45, n.11, Nov, p.1489-96. 1996.

ABDULWASSIE H, DHANRAJANI PJ. Diabetes mellitus and dental implants: a clinical study. **Implant Dent**. v.11, n.1, p.83-6. 2002.

ADELL, R. Tissue integrated prostheses in clinical dentistry. **Int Dent J**. v.35, n.4, Dec, p.259-65. 1985.

ADELL, R., ERIKSSON, B. Long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws. **Int J Oral Maxillofac Implants**. v.5, n.4, p.347-59. 1990.

AKPAN, J.O., WRIGHT P.H. Effect of diabetogenic nitrosourea on the activity of the pentose phosphate hunt in isolated islets. **Acta Diabetol Lat**. v.19, n.1, Jan-Mar, p.37-47. 1982.

ALKAN, A., ERDEM, E., GÜNHAN, O., KARASU, C. Histomorphometric evaluation of the effect of doxycycline on the healing of bone defects in experimental diabetes mellitus: a pilot study. **J Oral Maxillofac Surg**. v.60, n.8, Aug,p.898-904.2002.

ALTAN, N., ONGUN C.O. Effect of the sulfonylurea glyburide on superoxide dismutase activity in alloxan-induced diabetic rat hepatocytes. **Diabetes Res Clin Pract**. v.22, n.2-3, Jan, p.95-8. 1994.

ANDERSON, H.R., STITT A.W. Induction of alloxan/streptozotocin diabetes in dogs: a revised experimental technique. **Lab Anim**. v.27, n.3, Jul, p.281-5. 1993.

BALSHI, T.J.; WOLFINGER G.J. Dental implants in the diabetic patient: a retrospective study. **Implant Dent**. v.8, n.4, p.355-9. 1999.

BEDOYA, F.J., SOLANO, F. N-monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin-induced double strand DNA break formation in pancreatic rat islets. **Experientia**, v.52, n.4, Apr 15, p.344-7. 1996.

BELL, G.I., XIANG, K.S. Gene for non-insulin-dependent diabetes mellitus (maturity-onset diabetes of the young subtype) is linked to DNA polymorphism on human chromosome 20q. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.88, n.4, Feb 15, p.1484-8. 1991.

BELL, G.W., LARGE, D.M. Oral health care in diabetes mellitus. **Dent Update**, v.26, n.8, Oct, p.322-8, 330. 1999.

BURKART, V., BRENNER, H.H. Metabolic activation of islet cells improves resistance against oxygen radicals or streptozocin, but not nitric oxide. **J Clin Endocrinol Metab**, v.81, n.11, Nov, p.3966-71. 1996.

CASAP, N., NIMRI, S., ZIV, E., SELA, J., SAMUNI, Y. Type 2 diabetes has minimal effect on osseointegration of titanium implants in *Psammomys obesus*. **Clin Oral Implants Res**, 19(5): 458-64. 2008.

CLARO, F.A., LIMA, J.R. Porous polyethylene for tissue engineering applications in diabetic rats treated with calcitonin: histomorphometric analysis. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.20, n.2, Mar-Apr, p.211-9. 2005.

CONNELL, F.A. Epidemiologic approaches to the identification of problems in diabetes care. **Diabetes Care**, v.8 Suppl 1, Sep-Oct, p.82-6. 1985.

DEVLIN, G.H., SLOAN, P. Healing of tooth extraction sockets in experimental diabetes mellitus. **J Oral Maxillofac Surg**; 54: 1087-1091, 1996.

DOWELL, S., OATES, T.W., ROBINSON, M. Implant success in people with type 2 diabetes mellitus with varying glycemic control: a pilot study.

**J Am Dent Assoc.**, v.138, n.3, Mar, p.355-61; quiz 397-8. 2007.

EDELMAN, S.V. Importance of glucose control. **Med Clin North Am**, v.82, n.4, Jul, p.665-87. 1998.

EISENBARTH, G. S. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. **N Engl J Med**, v.314, n.21, May 22, p.1360-8. 1986.

ELSUBEIHI, EMAD S., ZARB, GEORG A. Implant Prosthodontics in Medically Challenged Patients: The University of Toronto experience. **J Can Dent Assoc**; v.68 n.2, p.103-8, Feb. 2002.

FARZAD, P., ANDERSSON, L. Dental implant treatment in diabetic patients. **Implant Dent**, v.11, n.3, p.262-7. 2002.

FIORELLINI, J.P., NEVINS, M.L. The effect of insulin therapy on osseointegration in a diabetic rat model. **Clin Oral Implants Res**, v.10, n.5, Oct, p.362-8. 1999.

FIORELLINI, J.P., CHEN, P.K. A retrospective study of dental implants in diabetic patients. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v.20, n.4, Aug, p.366-73. 2000.

GEORG E.A., TOSCANO, C.M., SCHMIDT M.I., MENGUE, S., DUARTE, C., POLANCZYK, C.A. Análise econômica de programa para rastreamento do diabetes mellitus no Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v.39, n.3, p.452-60. 2005.

GIGLIO M.J., GIANNUNZIO, G. OLMEDO, D. Histomorfometric Study of Bone Healing Aroud Laminar Implants in Experimental Diabetes. **Implant Dent.**, vol.9, n.2, p. 143-149, 2000.

HASEGAWA, H., OZAWA S., HASHIMOTO, K., TAKEICHI, T., OGAWA, T. Type 2 diabetes impairs implant osseointegration capacity in rats. **Int J Oral Maxillofac Implants**, 23(2): 237-46. 2008.

HARRIS, M.I., HADDEN, W.C. Prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance and plasma glucose levels in U.S. population aged 20-74 yr. **Diabetes**, v.36, n.4, Apr, p.523-34. 1987.

IYAMA, S., TAKESHITA, F. 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, Dec, p.1169-75. 1997.

KAHN, C.R., CRETZAZ, M. Insulin receptors and the molecular mechanism of insulin action. **Diabetes Metab Rev**, v.1, n.1-2, p.5-32. 1985.

KAPUR, K.K., GARRETT, N.R. Randomized clinical trial comparing the efficacy of mandibular implant-supported overdentures and conventional dentures in diabetic patients. Part III: comparisons of patient satisfaction. **J Prosthet Dent**, v.82, n.4, Oct, p.416-27. 1999.

KING, H., AUBERT, R.E. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. **Diabetes Care**, v.21, n.9, Sep, p.1414-31. 1998.

KIRCHBERGER, I., COENEN, M. Validation of the International Classification of Functioning, Disability and Health (ICF) core set for diabetes mellitus from the patient perspective using focus groups. **Diabet Med**, v.26, n.7, Jul, p.700-7. 2009.

KOTSOVILIS, S., KAROUSSIS, I.K., FOURMOUSIS, I. A Comprehensive and critical review of dental implant placement in diabetic animal and patients. **Clinical Oral Implants Res.**, vol.17, n.5, p.587-599. 2006.

KWON, P.T., RAHMAN, S. S. Maintenance of osseointegration utilizing insulin therapy in a diabetic rat model. **J Periodontol**, v.76, n.4, Apr, p.621-6. 2005.

MALERBI, D.A., FRANCO, L.J. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged

30-69 yr. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. **Diabetes Care**, v.15, n.11, Nov, p.1509-16. 1992.

MARGONAR, R., SAKAKURA, C.E. The influence of diabetes mellitus and insulin therapy on biomechanical retention around dental implants: a study in rabbits. **Implant Dent**, v.12, n.4, p.333-9. 2003.

MATSCHINSKY, F. M. Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. **Diabetes**, v.45, n.2, Feb, p.223-41. 1996.

MCCRACKEN, M., LEMONS, J.E. Bone response to titanium alloy implants placed in diabetic rats. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.15, n.3, May-Jun, p.345-54. 2000.

MENDEZ, J.D., RAMOS, H.G. Animal models in diabetes research. **Arch Med Res**, v.25, n.4, Winter, p.367-75. 1994.

MORRIS, H.F., OCHI, S. Implant survival in patients with type 2 diabetes: placement to 36 months. **Ann Periodontol**, v.5, n.1, Dec, p.157-65. 2000.

MURALI, B., GOYAL, R.K. Effect of chronic treatment with losartan on streptozotocin induced diabetic nephropathy. **Clin Exp Hypertens**, v.23, n.7, Oct, p.513-20. 2001.

NARAYAN, K.M., GREGG, E.W. Diabetes--a common, growing, serious, costly, and potentially preventable public health problem. **Diabetes Res Clin Pract**, v.50 Suppl 2, Oct, p.S77-84. 2000.

NEVINS, M.L., KARIMBUX, N.Y. Wound healing around endosseous implants in experimental diabetes. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.13, n.5, Sep-Oct, p.620-9. 1998.

NOTKINS, A.L. The causes of diabetes. **Sci Am**, v.241, n.5, Nov, p.62-73. 1979.

OLSON, J.W., SHERNOFF, A.F. Dental endosseous implant assessments in a type 2 diabetic population: a prospective study. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.15, n.6, Nov-Dec, p.811-8. 2000.

OTTONI, C.E., 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.

OZUARI, A., OZTURK, Y. The effects of glyburide and insulin on the cardiac performance in rats with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Gen Pharmacol**, v.24, n.1, Jan, p.165-9. 1993.

PELED, M., ARDEKIAN, L. Dental implants in patients with type 2 diabetes mellitus: a clinical study. **Implant Dent**, v.12, n.2, p.116-22. 2003.

PEREDO, H.A. Prostanoid release and constrictor responses to noradrenaline in the rat mesenteric vascular bed in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **J Auton Pharmacol**, v.21, n.3, Jun, p.131-7. 2001.

RAKIETEN, N., RAKIETEN, M.L., NADKARNI MV. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). **Cancer Chemother Rep**. v.29, May, p.91-8.1963.

SASAKI, T., TAJIMA, N.. [Type 1 diabetes mellitus]. **Nippon Rinsho**, v.Suppl 3, Sep 28, p.26-30. 2006.

SHERNOFF, A.F., COLWELL, J.A. Implants for type II diabetic patients: interim report. VA Implants in Diabetes Study Group. **Implant Dent**, v.3, n.3, Fall, p.183-5. 1994.

SILHI, N. Diabetes and wound healing. **J Wound Care**, v.7, n.1, Jan, p.47-51. 1998.

SIQUEIRA, J.T., CAVALHER-MACHADO, S.C. Bone formation around titanium implants in the rat tibia: role of insulin. **Implant Dent**, v.12, n.3, p.242-51. 2003.

SMITH, R.A., BERGER, R. Risk factors associated with dental implants in healthy and medically compromised patients. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.7, n.3, Fall, p.367-72. 1992.

TAKESHITA, F., IYAMA, S. The effects of diabetes on the interface between hydroxyapatite implants and bone in rat tibia. **J Periodontol**, v.68, n.2, Feb, p.180-5. 1997.

TAKESHITA, F., MURAI, K. Uncontrolled diabetes hinders bone formation around titanium implants in rat tibiae. A light and fluorescence microscopy, and image processing study. **J Periodontol**, v.69, n.3, Mar, p.314-20. 1998.

TONETTI, M.S., CORTELLINI, P. Clinical outcomes following treatment of human intrabony defects with GTR/bone replacement material or access flap alone. A multicenter randomized controlled clinical trial. **J Clin Periodontol**, v.31, n.9, Sep, p.770-6. 2004.

VALERO, A.M., GARCIA J.C.F., BALLESTER, A.H., RUEDA, C.L. Effects of diabetes on the osseointegration of dental implants. **Med. Oral Patol. Cir. Bucal**, vol. 12, n.1: E38-43, jan 2007.

WANG, Z., WU, L. Kinin B2 receptor-mediated contraction of tail arteries from normal or streptozotocin-induced diabetic rats. **Br J Pharmacol**, v.125, n.1, Sep, p.143-51. 1998.

WARD, D.T., YAU, S.K. Functional, molecular, and biochemical characterization of streptozotocin-induced diabetes. **J Am Soc Nephrol**, v.12, n.4, Apr, p.779-90. 2001.

WEI, M., ONG, L. The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes. **Heart Lung Circ**, v.12, n.1, p.44-50. 2003.

ZIMMET, P., ALBERTI, K.G. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, v.414, n.6865, Dec 13, p.782-7. 2001.

**Parecer Consubstanciado de Projeto**

**Título do Projeto:** Análise do contra-torque em implantes dentários em ratos diabéticos

**Pesquisador Responsável:** Prof. Dr. Paulo José Bordini  
**Pós-Graduando:** Mauro Roberto Hans

**Data da Versão:**                      **Cadastro:** 161                      **Data do Parecer:** 27/08/2008

**Grupo e Área Temática:** L5 Novos procedimentos

**Objetivos do Projeto**  
 Comparar histomorfometricamente a osseointegração dos implantes de superfície tratada em ratos normais, diabéticos induzidos e diabéticos compensados.  
 Comparar a osseointegração através da análise do contra-torque dos implantes.

**Sumário do Projeto**  
 Trinta ratos serão divididos em grupos de dez, recebendo cada grupo: 1- Controle 2- Induzido para diabetes 3- Induzido para diabetes, mas controlado por insulina.  
 Todos os animais receberão implantes ósseos em suas tíbias. Serão feitas provas de contra-torque para avaliar a ação dos implantes.

Aspectos relevantes para avaliação	Situação
Título	Adequado
Relação dos Pesquisadores	Adequada
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não
Local de Realização	Própria instituição
Outras instituições envolvidas	Não
Condições para realização	Adequadas
Introdução	Adequada
Objetivos	Adequados
Método	
Tipo de projeto	Pesquisa em Animais
Delineamento	Adequado
Tamanho de amostra	Total    Na instituição sim
Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Adequada
Critérios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco-benefício	Adequada
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Adequado
Armazenamento de material biológico	Adequado
Instrumentos de coleta de dados	Adequados
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Adequada
Termo de Consentimento	Adequado
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim
Cronograma	Adequado
Data de início prevista	01/01/2008
Data de término prevista	31/12/2008
Orçamento	Adequado
Solicita recursos à instituição	Não
Fonte de financiamento externa	Não
Referências Bibliográficas	Adequadas

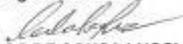
Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto

O projeto tem importância na área Odontológica, ao estudar interações entre diabetes mellitus e Implantodontia.

São Paulo, 27 de Agosto de 2008.

  
PROF. DR. CARLOS DE SOUSA LUCCI  
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisas  
UNISA - Universidade de Santo Amaro



São Paulo, 26 de agosto de 2008

A/C: Comitê de Ética

Atesto, para os devidos fins que o Projeto Científico do mestrando de Odontologia, Mauro Roberto Hans, intitulado de **Análise do contra-torque em implantes dentários em ratos diabéticos**, sobre orientação do Prof. Dr. Paulo Bordini, professor da disciplina de Estomatologia, será de minha responsabilidade no que concerne os aspectos relacionados à anestesia cirúrgica, analgesia e eutanásia dos animais. Para tanto, após os procedimentos os animais serão anestesiados com a associação de Quetamina/Xilazina e a analgesia pós-operatória com dexametasona. Os animais serão submetidos à eutanásia com o uso de Tiopental Sódico na dose de 150mg/kg.



  
Médica Veterinária Responsável

Nome: Mercedes Bero Bialko

Dr. Mercedes Bero Bialko

Médica Veterinária

(CRMV 1912)

UF: SP

Estado: SP

Pág. 1 de 1



MINISTÉRIO DA SAÚDE  
Conselho Nacional de Saúde  
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP



UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO  
Comitê de Ética em Pesquisas  
Registro CONEP n.º 306  
Aprovado em 16/05/2000

**PARECER N.º 089/2008**

**REGISTRO CEP UNISA N.º 161/08**

**Projeto de Pesquisa:** "Análise do contra-torque em implantes dentários em ratos diabéticos"

**Pesquisadores Responsáveis:** Prof. Dr. Paulo José Bordini e  
Pós-Graduando: Mauro Roberto Hans

**Faculdade:** Odontologia/Implantodontia

Prezado Pesquisador:

Ao se proceder à análise do processo em questão, cabe a seguinte consideração:

As informações apresentadas atendem aos aspectos fundamentais da Lei 6.638, de 8 de maio de 1979, que estabelece as Normas para Prática Didáticas - Científica da Vivisseção de Animais e os Princípios Internacionais para a pesquisa Biomédica envolvendo Animais.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa (**CEP-UNISA**), de acordo com as atribuições da Resolução 196/96, manifesta-se pela **APROVAÇÃO** do projeto "Análise do contra-torque em implantes dentários em ratos diabéticos"

São Paulo, 27 de Agosto de 2008.

**PROF. DR. CARLOS DE SOUSA LUCCI**  
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa  
UNISA - Universidade de Santo Amaro



São Paulo, 25 de novembro de 2009.

Ao orientador Paulo José Bordini e mestrando Mauro Roberto Hans

Foi aprovada a solicitação de mudança de título da pesquisa intitulada "Análise do contra-torque em implantes dentários em ratos diabéticos" para "Análise histométrica da osseointegração de implantes dentários em ratos diabéticos e diabéticos controlados por insulina" na reunião do dia 18 de novembro de 2009.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Carlos de Sousa Lucci', is positioned above the typed name.

Prof. Dr. Carlos de Sousa Lucci  
Presidente do Comitê de Ética em pesquisa no Uso de Animais - CEUA