

GABRIELA GENNARO

**AVALIAÇÃO DA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA AO REDOR
DE IMPLANTES DE TITÂNIO INSTALADOS EM RATOS
DIABÉTICOS**

FLORIANÓPOLIS

2007

GABRIELA GENNARO

**AVALIAÇÃO DA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA AO REDOR
DE IMPLANTES DE TITÂNIO INSTALADOS EM RATOS
DIABÉTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia / Área de Concentração em Implantodontia, Departamento de Estomatologia do Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção do Título de Mestre em Implantodontia.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Rodrigues Filho

FLORIANÓPOLIS

2007

Hoje, sou mestre de mim mesmo.
Amo as pessoas sem que delas tenha que depender.
Reconheço seu valor sem ter que perder.
Aprendo de mim aquilo que preciso saber.
Dou a mim sem ter que pedir.
Experimento Deus em intensidade.
Vivo a condição da humanidade.
Canto de alegria,
choro de tristeza, mas sempre de verdade.
Não sou mais, nem melhor,
nem menos, nem pior.
Apenas vou onde sinto que devo ir,
faço o que sinto que devo fazer,
falo o que sinto que devo falar,
mas o que devo é somente sinceridade
perante mim mesmo.
Hoje, sou meu mestre porque sei o caminho.
Hoje sou mestre de mim mesmo
mas, também, sou mestre de mais ninguém.

DEDICATÓRIA

AOS MEUS PAIS,

Que na luta diária, de esforços infinitos, proporcionaram as melhores condições para que eu me tornasse quem eu sou, permitindo que todos os meus planos sempre se concretizassem. Que mesmo longe, mas incondicionalmente, nunca deixaram de transmitir força, com as palavras mais certas de coragem e amor, ainda que fossem firmes na voz.

AO MEU IRMÃO,

Meu grande amigo Lucas, fiel, compreensivo, que tanto me faz rir, mas que também escuta com toda paciência meus lamentos e, no final, sempre tem uma sábia palavra a me dizer, devolvendo-me à razão.

AGRADECIMENTOS

A Deus por dar-me a vida tão maravilhosa que tenho, com todas as capacidades perfeitas, o que me permitem as realizações profissionais e pessoais. Além da Sua proteção diária e das energias positivas que vibram, trazendo-me forças e amor.

A todos da minha família que entenderam e souberam conviver com a minha ausência durante o período de desenvolvimento deste trabalho.

Em especial, ao Prof. Dr. Rubens Rodrigues Filho, professor de Farmacologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina, pela sua orientação, confiança em meu trabalho, disponibilidade em me auxiliar arduamente na conclusão deste, com suas críticas e sugestões que, ao final, resultaram em significantes melhorias. Finalmente, agradeço por todo conhecimento, atenção, paciência e tempo dedicados a mim, durante todo esse período de convivência.

Ao Prof. Dr. Ricardo Magini de Souza, coordenador do curso de Mestrado em Implantodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina, por ter me acolhido como aluna do programa, pelos conhecimentos transmitidos e amizade.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Cardoso, coordenador do curso de Doutorado em Implantodontia, pelos conhecimentos protéticos transmitidos e por sua incansável dedicação.

À Prof^a. Gláucia, professora de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina, pelos conhecimentos transmitidos, e, muito além, pela amizade tão valiosa que adquiri, assim, sou grata a toda sua hospitalidade, carinho, apoio, compreensão e alegrias doadas.

À Prof^a. Ariadne Cruz, professora substituta do departamento de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina, pelos conhecimentos transmitidos como também pelo vínculo de amizade que estabelecemos, sua generosidade, paciência e lealdade, sempre disposta a ajudar.

Ao Prof. Dr. Adair dos Santos, professor de Fisiologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina, por ter aberto as portas do seu laboratório para a viabilização deste trabalho, com tanta gentileza.

A todos os pós-graduandos do laboratório de fisiologia que direta ou indiretamente, auxiliaram-me neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis, professor de Histologia da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, por viabilizar a realização de todo o processamento histológico em seu laboratório e pela sua orientação.

Em especial, à Tânia Mary Cestari, técnica do laboratório de Histologia da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, pela inspiração que passa por sua dedicação ao trabalho, pelas sugestões e conhecimentos decisivos no conteúdo desta pesquisa, além do

seu imensurável auxílio na histologia e estatística, disponibilizando tanto do seu tempo ao meu trabalho.

À Daniele Santi Ceolin, técnica do laboratório de Histologia da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, pelo conhecimento, presteza e paciência no auxílio ao processamento histológico das amostras.

Aos meus amigos do mestrado: André Ricardo Buttendorf, Elisa Oderich, Gisele Bustamante, Leonardo Bez e Rodrigo Granato, pela amizade, dedicação, colaboração e pelos bons momentos compartilhados que ficarão guardados no coração.

Aos amigos do doutorado: Aline Franco Siqueira, César Augusto Benfatti, Cimara Fortes, Cleide Ribeiro, João Rodrigo Sarotti e Ricardo Hochheim Neto, pela amizade conquistada, por toda colaboração, pelos conselhos bem ditos e, também, pelos tantos bons momentos de alegrias que deixarão saudades.

Aos estagiários Ernesto Barqueiro, Izabelle Goulart, Miriam Carrard e Newton, pelo auxílio, dedicação e amizade prestados ao longo do tempo.

Em especial, aos amigos Leonardo Bez, Ernesto Barqueiro e José Ramon que me auxiliaram de maneira fundamental, com dedicação, paciência e carinho, durante a fase experimental deste trabalho e, que sem eles, seria impossível realizar essa etapa principal.

Em especial, às amigas Aline, Cleide, Cimara e Elisa que além de companheiras dos bons momentos de alegria, balada, praia, foram também firmes nos momentos difíceis, em que tudo parecia o fim, sem solução, e com enorme paciência, diziam “calma Gabi, isso vai passar e ainda vamos todas rir dessa situação”. Amigas, realmente tudo passa!

Em especial, aos amigos César, Ernesto, Leonardo e Rodrigo pela lealdade e “parceria” nos momentos em que mais precisei. Além da amizade, em muitas vezes, também fizeram o papel da minha família, dando conselhos e cuidados como se fossem meus pais.

Em especial, à Patrícia Garcia, colega desde os tempos da faculdade em Bauru, e que por razões do destino, viemos para a mesma cidade, em situações tão semelhantes. E aqui, fomos amigas, irmãs, passando juntas por tudo aquilo que nos fez felizes e mais “humanos como seres”.

Em especial, à Brunna Genaro Pultrin, mais que prima, uma irmã, que me acolheu em Bauru durante todo o tempo que passei executando etapas deste trabalho, sempre me incentivando, escutando-me e dizendo palavras de amor emanadas desse coração tão lindo que possui.

Às funcionárias do CEPID: Dolores Rossi, Gisela Mengaz e Mirian, responsáveis pelo perfeito funcionamento dessa instituição, pela competência e atendimento a tantos pedidos de ajuda.

Às funcionárias do Centro Cirúrgico Odontológico: Janete (*in memoriam*) e Nilséia Arruda, pela eficiência, dedicação e préstimos.

A Sra. Marilena e aos demais funcionários da limpeza, pelo trabalho digno e de fundamental importância para a manutenção das boas condições de higiene dos locais clínicos e de estudo.

Aos pacientes que contribuíram para a minha formação, pela confiança creditada, paciência e carinho, durante a realização dos trabalhos, e que, em alguns, extrapolou-se a relação profissional para estabelecer-se um elo de amizade.

GENNARO, G. **Avaliação da neoformação óssea ao redor de implantes de titânio instalados em ratos diabéticos.** 2007. 83 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de Concentração Implantodontia) – Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RESUMO

O diabetes é associado a várias complicações que aumenta a morbidade e mortalidade em indivíduos afetados. Portanto, existem diversas alterações no metabolismo ósseo associadas ao diabetes e, que conseqüentemente, podem afetar o processo de osseointegração dos implantes dentários. Este estudo visou comparar a formação óssea ao redor de implantes de superfície lisa e tratada, instalados em ratos diabético-induzidos e não-diabéticos, investigando se há diferenças na formação óssea entre os dois quadros metabólicos, melhora no padrão de osteogênese entre as diferentes superfícies e, sua relação com o diabetes. Foram instalados implantes de titânio de superfícies lisa e tratada, no fêmur de ratos machos Wistar e os animais divididos em 2 grupos: diabético-induzidos com estreptozotocina (grupo experimental) e não diabéticos (grupo controle). As análises histomorfológica e histomorfométrica do bloco ósseo foram realizadas nos períodos de 10 e 21 dias de cicatrização. Os resultados obtidos foram analisados por meio de ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de **Bonferroni's**. O percentual de neoformação óssea, ao redor dos implantes de superfície lisa e tratada, não apresentou significância estatística comparando os grupos diabético e controle. Entretanto, no período de 21 dias, nos ratos diabéticos o osso apresentou-se mais imaturo em relação àquele de aspecto maduro formado nos animais controle. Quando comparadas as diferentes superfícies (lisa e tratada), observou-se, aparentemente, que aos 10 dias, a superfície lisa favoreceu a maior formação de osso cortical e medular ao redor dos implantes. Já aos 21 dias, não ocorreu diferença na neoformação óssea entre as duas superfícies. Os dados presentes sugerem que o atraso na maturação do tecido ósseo, se deu provavelmente, devido ao diabetes-induzido e suas implicações no metabolismo ósseo. Além disso, os implantes de superfície lisa, também na presença de diabetes, parecem ser melhores indutores de neoformação óssea.

Palavra-chave: implante dentário; diabetes mellitus experimental; osteogênese; osseointegração.

GENNARO, G. **Assessment of bone neoformation around titanium implants inserted in diabetic rats.** 2007. 83 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de Concentração Implantodontia) – Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ABSTRACT

Diabetes is associated with many complications that increase morbidity and mortality in affected individuals. Therefore, there are many changes in bone metabolism associated with diabetes that can consequently affect the process of osseointegration of dental implants. This study aimed at comparing bone formation around implants with smooth and treated surface, inserted in induced diabetic rats and in non-diabetic rats, investigating whether there are differences in bone formation between both metabolic conditions, improvement in osteogenesis pattern between different surfaces and their relation with diabetes. Titanium implants (smooth and treated surface) were inserted in male Wistar rats, which were divided into two groups: streptozotocin-induced diabetic rats (experimental group) and non-diabetic rats (control group). Histomorphologic and histomorphometric analyses of bone block were performed at 10 and 21 days of healing. Results were analyzed by two-way ANOVA, followed by Bonferroni's test. The percentage of bone neoformation around implants of smooth and treated surface did not have statistical significance after comparison between diabetic and control groups. However, at 21 days, the bone was more immature in diabetic rats in relation to that with a mature aspect formed in control animals. When different surfaces were compared (smooth and treated), at 10 days the smooth surface apparently favored better formation of cortical and cancellous bone around the implants. On the other hand, at 21 days there was no difference in bone neoformation between both surfaces. The present data suggest that delay in bone tissue maturation was probably a result of induced diabetes and its implications in bone metabolism. In addition, smooth surface implants, also in association with diabetes, seem to be better inducers of bone neoformation.

Key Words: dental implant; diabetes mellitus experimental; osteogenesis ; osseointegration.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2 METODOLOGIA.....	29
2.1 ANIMAIS.....	29
2.2 INDUÇÃO DO DIABETES MELLITUS.....	29
2.3 IMPLANTES.....	31
2.3.1 Superfície dos implantes.....	31
2.4 PROTOCOLO CIRÚRGICO.....	31
2.5 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....	36
2.5.1 Coloração Hematoxilina-Eosina.....	36
2.6 ANÁLISE QUALITATIVA.....	37
2.7 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA.....	37
3 ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	39
RESUMO.....	40
1 INTRODUÇÃO.....	41
2 MATERIAIS E MÉTODO.....	42
3 RESULTADOS.....	44
4 DISCUSSÃO.....	51
5 CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS.....	55
4 ARTIGO EM INGLÊS.....	58
ABSTRACT.....	59
INTRODUCTION.....	60
MATERIALS AND METHOD.....	61
RESULTS.....	63
DISCUSSION.....	70
CONCLUSION.....	72
REFERENCES.....	73
REFERÊNCIAS GERAIS.....	76

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A osseointegração é caracterizada como a formação de osso vital em contato direto com a superfície de titânio sem a presença de qualquer outro tecido interposto Branemark et al. (1969). Desde então, a longevidade e a taxa de sucesso dos implantes endósseos de titânio vêm sendo discutidas e mostram que a reabilitação do paciente ocorre tanto no âmbito funcional, estético e fonético, como também no aspecto psico-social, facilitando seu reenquadramento ao meio (Adell et al., 1981).

Imediatamente após a instalação do implante, uma série de eventos ocorre entre o hospedeiro e a superfície dos implantes. Esta seqüência de eventos inicia-se com a interação entre o coágulo e a superfície do implante, em que fatores de crescimento e células são dinamicamente recrutados. Posteriormente, há um processo inflamatório, com reabsorção do coágulo e formação de um tecido altamente vascularizado, seguido da diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos, os quais secretam a matriz osteóide, que será mineralizada e constituirá o tecido ósseo primário. Finalmente, a osseointegração completa-se após a remodelação, formando o tecido ósseo secundário (maduro) (Lemons, 2004).

Otha (1993), estudando o processo de cicatrização óssea ao redor de implantes fixados em mandíbulas de macacos, sugeriu a seqüência de 4 estágios evolutivos 1) angiogênese; 2) osteogênese; 3) crescimento ósseo e 4) manutenção do tecido ósseo. A angiogênese, mais intensa nas superfícies anguladas dos sulcos do implante, desenvolve-se do 3º ao 7º dia após a instalação do mesmo. Os sulcos são preenchidos por uma camada de fibras colágenas, fibroblastos e mesênquima indiferenciado. A osteogênese inicial consiste na formação de tecido ósseo, esponjoso primário e secundário, ao redor de uma rede capilar na superfície do implante. Há um avanço do trabeculado ósseo em direção ao implante. A maturação do

tecido constitui-se da compactação óssea em pequenas áreas. Os sulcos são completados e preenchidos por tecido ósseo. Estudos de microscopia eletrônica evidenciam que a presença de fibras de colágeno mineralizadas, material proteináceo, matriz fibrilar e osteoblastos, na interface osso-implante, é indicativa de que essa região remodela-se (Albrektsson, 1985; Listgarten et al., 1996).

Além da função de sustentação, o osso é o reservatório natural de cálcio e fósforo. Muitos fatores de ação local ou sistêmica influenciam o metabolismo ósseo. Entre os fatores sistêmicos encontram-se os hormônios (glicocorticóides, hormônio do crescimento, hormônios tireoideanos e paratireoideanos, insulina, estrógeno) e as vitaminas (C, D). Os fatores locais são representados por prostaglandinas (PGs); interleucina-1(IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF) (Canalis et al., 1991).

O osso é considerado fonte abundante de fatores de crescimento que ficam imersos em sua matriz e têm ação autócrina ou parácrina. Estes fatores, produzidos por células da linhagem osteoblástica e por macrófagos, são polipeptídeos que estimulam a síntese protéica, a migração e a multiplicação celular. Os fatores de crescimento relacionados ao metabolismo ósseo incluem: Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), Fator Transformador do Crescimento (TGF *A* e *B*), Fator de Crescimento Fibroblástico (FGF *a* e *b*), Fator de Crescimento semelhante à Insulina (IGF I e II), Fator de Crescimento Epitelial (EGF) e Proteína Óssea Morfogenética (BMP) (Canalis et al., 1991).

A insulina é o hormônio responsável, primariamente, pelo controle da captação, utilização e armazenagem de nutrientes celulares, sendo indispensável em processos anabólicos que incluem a utilização e armazenagem de glicose, aminoácidos e gorduras (Davis & Granner, 1996). É um hormônio esteotrópico e, de forma similar ao que acontece nos

tecidos adiposo e muscular, a expressão de seu receptor depende do estágio de diferenciação do osteoblasto (Hill et al., 1995).

O sistema IGF compreende os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF-I e II) e as proteínas de ligação desses fatores (IGFBPs). Os IGFs atuam em receptores específicos e no receptor da insulina, têm alta afinidade pelas IGFBPs e atuam nas células do tecido ósseo regulando sua atividade em sinergismo com outros fatores de crescimento como o PDGF e o FGF. As IGFBPs têm diferentes efeitos sobre os IGFs; algumas inibem e outras potencializam seus efeitos metabólicos e mitogênicos (Cohick et al., 1993). O IGF-I é considerado um dos principais responsáveis pela manutenção da massa óssea (Canalis et al., 1991). A síntese de colágeno, *in vitro*, é aumentada pela insulina e pelo IGF-I, o qual também reduz a degradação de colágeno na matriz e, conseqüentemente, aumenta a área de matriz depositada. Portanto, é indiscutível o papel regulador da insulina e do sistema IGF na atividade celular do tecido ósseo (Cohick et al., 1993).

O Diabetes, classificado em tipo I e tipo II, é associado a uma ampla amostra de complicações que aumenta a morbidade e mortalidade em indivíduos afetados. Essas complicações resultam de uma regulação anormal do metabolismo de glicose, devido à ausência ou redução da produção de insulina (Oliver & Ternovem, 1994).

O diabetes tipo I, usualmente, resulta da destruição auto-imune da insulina produzida pelas células β do pâncreas. Um ou mais marcadores de destruição auto-imune estão geralmente presentes, como os anticorpos para as células das ilhotas pancreáticas e para insulina. As células β do pâncreas são destruídas quando indivíduos geneticamente predispostos são expostos a eventos desencadeantes, como infecções virais, que induzem uma resposta auto-imune. Há também as formas idiopáticas de diabetes tipo I em que não há evidência de auto-imunidade. O início é geralmente abrupto,

o tratamento pode ser difícil e predispõe a cetoacidose se não for bem controlada (Mealey & Moritz, 2003).

O diabetes tipo II pode resultar da resistência à insulina; de uma relativa deficiência desta, entretanto, não de uma absoluta ausência de produção do hormônio, como ocorre no tipo I; ou ainda, do aumento na produção de glicose. O pâncreas ainda produz insulina, entretanto a resistência tecidual ao hormônio diminui sua atividade e capacidade de metabolizar a glicose em níveis celulares. A maioria dos pacientes são obesos e isto, por si só, leva à resistência à insulina. O início da doença é gradual, não sendo diagnosticada por um longo período, às vezes, durante anos (Mealey, 2000).

Classicamente, a doença está associada a um grupo de complicações micro e macrovasculares. As alterações na macrovascularização causam aterosclerose agressiva que predispõe ao desenvolvimento precoce de eventos cardiovasculares e cerebrovasculares. Os danos microvasculares podem levar a complicações que resultam em retinopatias, nefropatias e atraso na cicatrização de feridas (Lalla et al., 2000). A hiperglicemia resulta em alterações no metabolismo de lipídeos e na glicosilação não-enzimática de proteínas como o colágeno. Essas mudanças resultam em funções alteradas de membranas celulares e mudanças nas interações célula-célula ou matriz-célula. Isto pode levar a aumento na espessura dos vasos, formação de ateromas e microtrombos em vasos grandes; na microvasculatura pode ocorrer alterações funcionais em células endoteliais e na permeabilidade vascular (Mealey; Moritz, 2003).

A glicosilação de proteínas e ácido nucléico nos diabéticos resulta em acumulação de proteínas glicosiladas em pequenos e grandes vasos sanguíneos, em órgãos como a retina, glomérulos e na região endoneural. Essas proteínas glicosiladas são conhecidas como produtos finais da glicosilação (AGEs) e se formam tanto nos diabéticos como nos indivíduos

não-diabéticos, entretanto, seu acúmulo é bem maior nos primeiros, com a hiperglicemia sustentada. O resultado disso é o aumento da espessura da membrana basal na retina e ao redor dos nervos, espessamento dos glomérulos e acúmulo de colágeno nos vasos grandes. O efeito cumulativo é um estreitamento progressivo do lúmen dos vasos e perfusão diminuída nos órgãos afetados (Schmidt et al., 1996).

Um outro fator notável é que, no paciente diabético, a imunidade do hospedeiro prejudicada, relacionada à resposta alterada às infecções, pode ser explicada pela deficiência na quimiotaxia e fagocitose de neutrófilos, o que leva a uma excessiva destruição tecidual por bactérias patogênicas. Em adição, uma resposta inflamatória exacerbada por mediadores, como os lipopolissacarídeos, contribui para um dano tecidual agressivo (Molvig et al., 1988; Owen et al., 1998). Nesse contexto, demonstra-se que, em diabéticos, uma resposta inflamatória aumentada, regulada por monócitos, resulta em maior produção de TNF α , IL 1- β e PGE-2. Junto a esse fator, a deficiência na produção de colágeno, bem como a atividade exacerbada da collagenase, causa uma maior destruição periodontal e, conseqüentemente, agrava a severidade das doenças periodontais (Ramamurthy & Golub, 1983; Sasaki, 1992).

Também, existem diversas alterações no metabolismo ósseo associadas ao diabético. A insulina não é somente um hormônio importante para o controle glicêmico, mas tem um papel na modulação do crescimento esquelético normal. Esta não regula a reabsorção óssea, mas estimula a síntese de matriz; os efeitos são diretos e indiretos no metabolismo ósseo. Diretamente, estimula a síntese de matriz osteoblástica e, indiretamente, induz a produção de IGF-I pelo hospedeiro. Conseqüentemente, o IGF-I aumenta a síntese de matriz por dois mecanismos: aumenta o número de osteoblastos presentes e regula a diferenciação osteoblástica (Canalis, 1980). Isso é possível provar em modelos diabéticos experimentais, uma

vez que os estudos demonstram redução na mineralização, na produção de osteóide e formação óssea total e, contrariamente, os animais tratados com insulina demonstram crescimento ósseo e formação de osteóide em níveis similares aos controles (Glajchen et al., 1988). Os experimentos realizados *in vitro* indicam que a aplicação tópica de insulina estimula o processo de ossificação intramembranosa em fraturas (Yano et al., 1996); aumenta a área de osteóide, o número e a sobrevivência dos osteoblastos, reduzindo seu índice de apoptose (Hill et al., 1997). Ainda, outro estudo *in vitro* avaliou a proliferação e a mineralização dos osteoblastos cultivados em diferentes condições (glicose normal, hiperglicemia, hiperglicemia com IGF-I e hiperglicemia com insulina); como resultado, observou-se que a hiperglicemia aumentou a proliferação e inibiu a mineralização das células ósseas, enquanto o IGF-I pareceu reverter esses efeitos, recuperando o balanço entre proliferação e diferenciação (Fang, 2006).

Glajchen et al., em 1988, estudaram, durante 7 semanas, aspectos do metabolismo ósseo em ratos diabético-induzidos por estreptozotocina e utilizaram a osteocalcina sérica (BGP) como um marcador de anormalidades ósseas. Puderam observar histomorfometricamente que, a remodelação óssea, o volume de osteóide e o número de osteoclastos estavam reduzidos nos animais diabéticos.

Em um trabalho realizado por Takeshita et al. (1997), foram instalados implantes de hidroxiapatita nas tíbias de ratos induzidos a diabetes por estreptozotocina e, durante 84 dias, administraram marcadores de cálcio para mapear a deposição óssea. Sob microscopia de luz observaram que a superfície do implante estava completamente adaptada ao osso cortical, tanto nos animais controle como nos diabéticos. Porém, quando analisado o osso medular, perceberam que nos animais saudáveis o implante apresentava-se envolvido por uma fina camada de osso lamelar, enquanto que nos diabéticos, estava parcialmente circundado por osso

lamelar e com células fibroblasto-arentes dispostas paralelamente a sua superfície, onde não existia contato osso-implante. Sob microscopia de varredura, observaram que existia somente um pequeno aumento de tecido ósseo formado entre o 28º e o 84º dia tanto nos animais controle como nos experimentais. No entanto, concluíram que a porcentagem de tecido ósseo em contato com o implante e a espessura da lâmina óssea, eram maiores nos ratos controle que nos diabéticos.

Iyama et al. (1997) realizaram um estudo com o objetivo de compararem a quantidade e distribuição regional de formação óssea ao redor de implantes de hidroxiapatita em ratos normais e diabético-induzidos por estreptozotocina. Foram injetados os marcadores calceína, alizarina e tetraciclina no 7º, 14º e 21º, respectivamente após a implantação e os animais foram sacrificados no 28º dia. Em ambos os grupos, a formação óssea desenvolveu-se da superfície da hidroxiapatita em direção ao endóstio, ao perióstio ou ao osso medular. No grupo controle, circundando a superfície do implante próxima ao perióstio e endóstio, o novo osso mostrou uma extensa marcação com as três camadas de cores, mas no grupo diabético, a densidade do marcador tetraciclina, no 21º dia, estava baixa. Em contraste, na área lateral ao implante, distante do perióstio e endóstio, houve consideravelmente menos formação óssea no grupo controle e quase completa supressão no grupo diabético-induzido.

Nevins et al. (1998) induziram diabetes, por meio de estreptozotocina, em 20 ratos que foram acompanhados por 28 e 56 dias. A osseointegração se deu em ambos os grupos, entretanto, a análise em microscopia de luz revelou diferenças no padrão de formação óssea. Os implantes instalados nos ratos controle foram consistentemente envoltos por osso, com mínimo de ausência de formação óssea, localizada no espaço medular distante da superfície do implante. Nos ratos diabéticos, o osso neoformado parecia imaturo e desorganizado. Além disso, para ambos os

grupos, a taxa de osteogênese não aumentou significativamente da 4^a para a 8^a semana. Entretanto, houve mais contato osso-implante no grupo controle comparado ao diabético, o que corresponde a uma porcentagem de osseointegração menor no segundo em relação ao primeiro.

Fiorellini et al., em 1999, propuseram um estudo, utilizando parâmetros histomorfométricos, em que avaliaram o processo de cicatrização óssea ao redor de implantes de titânio, com superfície tratada por spray de plasma, instalados em ratos normais e em animais diabéticos tratados com insulina. Os resultados indicaram que a insulino-terapia foi capaz de regular a formação de osso ao redor dos implantes inseridos nos animais diabético-induzidos. Embora a densidade óssea tenha sido maior no grupo insulino-tratado, houve significativamente menos contato osso medular/implante nesse grupo quando comparado ao controle.

McCracken et al., em 2000, instalaram implantes em 16 ratos diabético-induzidos por estreptozotocina e em 16 animais com glicemia normal, que foram acompanhados durante 14 dias. O grupo de estudo demonstrou significativamente menos osseointegração que o controle. Entretanto, contrariamente ao esperado, a quantidade total de volume ósseo ao redor dos implantes foi 4 vezes maior nos diabéticos que nos animais controlados.

Com o objetivo de investigar o curso histológico e as mudanças ultra-estruturais no processo de osseointegração, sob influência da insulina, foram instalados implantes em 3 diferentes grupos de ratos: diabético-induzidos por aloxana; tratados com insulina e não-diabéticos. Os animais foram sacrificados 10 e 21 dias após a cirurgia. Relativo aos valores controle, os ratos diabético-induzidos exibiram uma redução de 50% na área óssea formada e na superfície de contato osso-implante, 21 dias após a instalação. Mas, não houve diferenças estatísticas entre os grupos, quando avaliados 10 dias após a cirurgia. Os valores retornaram aos níveis normais

nos ratos diabéticos após o tratamento com insulina. A presença de células condrócito-semelhantes circundando uma matriz semelhante à cartilagem, sugere um atraso no processo de reparo ósseo. As características ultra-estruturais da interface osso-implante, em ratos tratados com insulina, foram semelhantes àsquelas observadas nos controles. Assim, pôde-se concluir que o reparo ósseo ao redor dos implantes é regulado, ao menos em parte, pela insulina. Esses resultados levaram os autores a afirmar que, o controle do “status” metabólico dos pacientes diabéticos, é essencial para o sucesso da osseointegração (Siqueira et al., 2003).

Otoni & Chopard (2004) quantificaram a neoformação óssea ao redor de implantes instalados em ratos diabético-induzidos por estreptozotocina. Os animais foram avaliados por um período cicatricial de 8 semanas, durante o qual, administrou-se marcadores de deposição óssea (calceína, tetraciclina e alizarina). O período de maior atividade osteogênica foi entre o início da quarta semana e o final da quinta. A neoformação óssea na região periostal e na cortical junto ao implante não mostraram diferença estatística entre os grupos. Essa se mostrou significativa quando avaliado o canal medular; na avaliação do tecido neoformado como um todo e na área de contato osso-implante, quando analisada sua porção intramedular.

Seguindo o propósito de avaliar a osseointegração dos implantes, em situações de hiperglicemia não-controlada e controlada com insulina; foram instalados, em ratos diabético-induzidos por estreptozotocina, implantes de superfície tratada com spray de plasma. Durante 28 dias de acompanhamento, foram ministradas injeções diárias de insulina em metade da amostra, enquanto a outra permaneceu não-controlada. Os resultados mostraram que o contato osso-implante foi maior nos animais que receberam a insulina e que esse contato pareceu diminuir com o tempo

nos ratos diabéticos não-controlados, sugerindo menor osseointegração (Kwon et al., 2005).

Com o intuito de se obter a modulação dos efeitos do diabetes na osseointegração, 4 grupos de ratos foram submetidos a diferentes tratamentos. Um deles serviu como controle enquanto os outros foram induzidos a diabetes. Após a instalação de implantes de titânio com superfície de plasma-spray, foi dado aminoguanidina a um grupo diabético, doxíciclina a outro e nenhuma medicação ao terceiro. Após 28 dias observou-se que o contato osso medular-implante (COMI) foi maior no grupo controle que no diabético. Os animais tratados com aminoguanidina tiveram maior COMI que os diabéticos não-medicados. Já o grupo que recebeu doxíciclina não apresentou diferenças quando comparado aquele não-tratado. Assim, concluiu-se que a diabetes inibe a osseointegração, mas isso pode ser modificado administrando aminoguanidina sistemicamente (Kopman et al., 2005).

Com base nos resultados obtidos nos diversos trabalhos, que encontraram redução do contato osso-implante, Shyng et al. (2006) testaram a hipótese de que essa menor osseointegração pode ser devido à diminuição da taxa de deposição mineral. Em 20 ratos normais e 20 diabéticos, foram instalados implantes nos alvéolos, imediatamente após a exodontia dos molares. Realmente, houve uma significativa redução na taxa de deposição mineral no grupo teste, o que sugere uma função osteoblástica prejudicada ou mineralização deficiente. Mas, não houve diferenças entre os ratos sacrificados em 20 e 40 dias. Extrapolando para a situação clínica, os autores sugerem que a inserção de implantes, imediatamente após a exodontia, pode estar contra-indicada, em pacientes com glicemia mal controlada.

Em um trabalho recente, 122 ratos divididos em três grupos (controle, diabéticos não-controlados e diabéticos insulino-tratados),

receberam implantes de titânio. A análise histológica procedeu-se após 2, 7, 14 e 24 dias de período cicatricial. O volume ósseo teve seu pico no 7º dia e diminuiu até o 24º dia, para todos os grupos avaliados. Entretanto, nos ratos diabéticos, a quantidade de osso adjacente aos implantes foi significativamente maior que nos animais controle, confirmando os resultados encontrados no estudo de McCracken et al. (2000). Já naquele grupo tratado com insulina, não houve diferenças estatísticas em relação ao controle. Uma das justificativas para esses achados é que, devido às anormalidades cicatriciais relacionadas ao diabetes, haja um atraso na remodelação e maturação do osso adjacente ao implante, assim, os animais diabéticos apresentariam maior volume ósseo associado aos implantes devido à cicatrização comprometida, em que a atividade osteoclástica e a diferenciação osteoblástica estão inibidas (McCracken et al., 2006).

Além dos estudos *in vitro* e dos realizados em animais, a literatura apresenta alguns trabalhos que avaliaram a osseointegração dos implantes dentários instalados em pacientes diabéticos. Entretanto, o tratamento com implantes nesses indivíduos é controverso. Os critérios gerais a serem estabelecidos incluem o tipo de diabetes, a idade de início e o nível de controle glicêmico. Um paciente com início tardio da desordem, controle dietético adequado, perdas dentárias não associadas às periodontites e reabilitação unitária, pode ter um risco diminuído de falhas. Contrariamente, um paciente com diabetes tipo I, perda de dente como resultado de doença periodontal e indicação de reabilitação total pode ter um risco alto para perda dos implantes (Fiorellini & Nevins, 2000).

Accursi, em 2000, examinou, retrospectivamente, o impacto do diabetes nos implantes dentários em pacientes que foram acompanhados de 1 a 17 anos. Um total de 59 implantes no grupo diabético foi comparado a 111 instalados no controle, concordando com os critérios de sucesso estabelecidos. Portanto, concluíram que os pacientes diabéticos não

estavam mais relacionados às experiências de falhas nos implantes que os não-diabéticos.

Em um estudo prospectivo, analisou-se o sucesso de implantes dentários instalados na região da sínfise mandibular em 89 pacientes diabéticos tipo II. Os dados foram coletados após 60 meses da instalação da prótese (overdenture tipo barra-clipe) e obteve-se 88% de sucesso para as reabilitações. Mesmo com uma taxa de sucesso inferior a média para procedimentos semelhantes (Lindquist et al., 1996), os autores suportam o conceito de que a instalação de implantes em pacientes diabéticos é previsível. Entretanto, os resultados sugerem que a duração da doença foi um fator significativo para a falha dos implantes (Olson et al., 2000).

Abdulwassie & Dhanrajani em 2002, instalaram 113 implantes dentários em 25 pacientes diabéticos, mas com controle metabólico adequado. A taxa de sucesso foi de 95,57%, correspondendo a cinco implantes perdidos, todos no período pós-cirúrgico, antes da instalação das próteses. Assim, os autores afirmam que é possível obter sucesso no tratamento com implantes, em pacientes diabéticos que mantêm níveis glicêmicos sob controle.

Kotsovilis et al. (2006) realizaram uma revisão de 8 estudos que reabilitaram pacientes diabéticos com a instalação de implantes dentários. As conclusões gerais foram que a maioria não contra-indica a instalação dos implantes em diabéticos, desde que haja o controle metabólico, além disso, a duração da doença tem sido estatisticamente correlacionada com a taxa de sobrevivência dos implantes.

Diante das implicações observadas no processo de osseointegração dos implantes em quadros diabéticos, um dos tópicos de maior interesse para clínicos e pacientes é a obtenção de resultados tão favoráveis quanto aqueles encontrados em condições metabólicas normais. Considerando-se a interação que ocorre entre a superfície do material implantado e o tecido

ósseo, as condições sistêmicas do indivíduo e a biocompatibilidade do material são requisitos fundamentais, durante o processo de cicatrização, para o estabelecimento de um contato íntimo entre o osso e a superfície do implante dentário (Lacefield, 1998). Assim, o “design” dos implantes tem sido modificado, ao longo dos anos, por diversos propósitos, incluindo facilidade de inserção intra-óssea, capacidade de melhorar a distribuição de carga, bem como o aumento da biocompatibilidade e das propriedades de osseocondutividade, buscando facilitar a osseointegração e seu tempo (Buser et al., 2004).

Uma vez que, a superfície do implante é o primeiro componente a reagir com o hospedeiro, as modificações nela são extensivamente empregadas como uma tentativa de acelerar a cicatrização. Superfícies com alta osseocondutividade podem promover aposição e cicatrização ósseas, que levam à rápida fixação biológica do implante ao osso (Lemons, 2004). Estudos apontam que, as modificações de superfície têm fundamental importância na resposta biológica em ossos de menor densidade, bem como, na redução do período de latência entre os procedimentos cirúrgico e restaurador (Albrektsson & Wennerberg, 2004b; Butz, 2006). As modificações topográficas de superfícies [especialmente se os valores de rugosidade (Ra) estiverem entre 0,5 a 1,5 μm] tendem a não somente aumentar o contato implante-osso, como também, a resistência da interface entre eles (Albrektsson & Wennerberg, 2004). Baseado nisso, desde meados da década de 90, dados experimentais obtidos de superfícies rugosas com valores de Ra próximos a 1,5 μm , mostraram melhor resposta óssea comparados a implantes de superfície lisa ou aos de superfície tratada com Ra > 2,0 μm (Albrektsson & Wennerberg, 2004a). Todavia, apesar de existirem diferenças entre os princípios físicos utilizados, todas as técnicas visam aperfeiçoar o binômio osseocondução/osseoindução,

proporcionando, assim, um aumento na capacidade de ancoragem da interface osso-biomaterial a curto, médio e longo prazo (Lemons, 2004).

Estudos *in vitro* testaram a biocompatibilidade do titânio, usando células osteoblásticas, e demonstraram que superfícies rugosas favorecem o aumento da adesão celular, a síntese de colágeno, de matriz extra celular, de fatores de crescimento e, conseqüentemente, a formação óssea. O perfil topográfico mostra importante relação no que diz respeito ao posicionamento e alinhamento celular e, assim, torna as superfícies texturizadas preferíveis às superfícies lisas (Brunette et al., 2005).

A dinâmica do remodelamento ósseo ao redor de implantes de titânio de superfícies lisas e rugosas foi observada em ovelhas, por um período de 3, 6, 12 e 18 meses. Avaliou-se, histomorfometricamente, a quantidade de osso ao redor dos implantes (volume, fração em volume de osso imaturo, espessura e interface de contato), a atividade osteoblástica (taxa de aposição e formação ósseas), bem como, a taxa de reabsorção. Decorridos 12 e 18 meses da implantação, o volume ósseo e a interface de contato continuaram aumentando, havendo sempre, uma tendência positiva dos implantes de superfície rugosa estarem associados aos maiores valores (Grizon et al., 2002).

Butz (2006), em um estudo experimental realizado em ratos, afirmou que, em geral, as diferentes superfícies rugosas, como as obtidas por meio de jateamento, ataque ácido ou anodização, demonstram maiores valores de torque, no período inicial de implantação, se comparadas às superfícies lisas. Entretanto, é necessário observar que os testes de resistência à remoção tendem a favorecer os implantes de superfícies rugosas devido ao travamento mecânico entre esses e o osso. Por isso, são fundamentais as investigações para esclarecer se as superfícies rugosas favorecem a resposta hospedeiro/implante, aumentando as propriedades mecânicas do osso no período inicial da implantação, ou se o travamento mecânico, entre a

superfície rugosa e o osso, é o responsável por aumentar os valores dos testes de resistência (Butz, 2006).

No entanto, a maioria dos estudos, compara superfícies rugosas e lisas, utilizando um número moderado de parâmetros (torque e superfície de contato), falta a avaliação da dinâmica óssea ao redor de diferentes tipos de implantes. Isso leva a especulações infundadas a respeito do mecanismo que as superfícies rugosas podem exercer a favor da resposta hospedeiro/implante, não fornecendo nenhuma contribuição adicional ao desenvolvimento tecnológico das superfícies. Entretanto, deve haver estudos considerando parâmetros histomorfométricos estáticos e dinâmicos, comparando várias superfícies rugosas e lisas, para que, assim, determinem-se as características críticas no “design” dessas superfícies (espessura da camada de óxido, tratamento químico e textura) com o objetivo de aprimorar a resposta hospedeiro/implante, nas próximas gerações de materiais disponíveis na implantodontia.

Este estudo visou comparar a formação óssea ao redor de implantes de superfície lisa e tratada, instalados em ratos diabético-induzidos e não-diabéticos, com o intuito de investigar se há diferenças na formação óssea e melhora no padrão de osteogênese entre as diferentes superfícies e sua relação com o diabetes.

2 METODOLOGIA

Os procedimentos realizados neste experimento foram conduzidos de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e tiveram sua aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina.

2.1 ANIMAIS

Foram utilizados 20 ratos Wistar, machos, com idade aproximada de 3 meses e peso médio de 350g, provenientes do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclo claro/escuro de 12h, (luz após as 7:00 horas) e com livre acesso a água e comida. Os ratos foram divididos em 2 grupos, teste (10 diabético-induzidos) e controle (10 não-diabéticos).

2.2 INDUÇÃO DO DIABETES MELLITUS

O diabetes foi induzido por injeção i.p. de estreptozotocina (Streptozocin Sigma-Aldrich), 70mg/Kg, em dose única, de acordo com o protocolo estabelecido por Fiorellini et al. (1999) e Kwon et al. (2005). O estado de hiperglicemia foi verificado semanalmente, durante todo o experimento, desde previamente à indução até a data do óbito. As amostras de sangue foram coletadas por punção na extremidade da cauda dos animais (Figura 1) e mensuradas pelo método da glicose-oxidase, utilizando-se um glicosímetro digital (Accu-Chek Active, Roche, Alemanha). Foram considerados diabéticos aqueles ratos, cuja glicemia

apresentava-se acima de 200 mg/dL de sangue (Figura 2). Após 7 dias da indução, os animais foram submetidos à cirurgia para instalação dos implantes.



Figura 1 – Punção na extremidade da cauda do rato para a coleta do sangue na fita, para mensurar a glicemia



Figura 2 – Glicosímetro digital usado para medir os níveis de glicemia

2.3 IMPLANTES

Os implantes (Systhex, Brasil) foram confeccionados em titânio comercialmente puro e desenhados de tal forma a conferir estabilidade ao implante e reduzir ao mínimo o trauma ósseo.

O implante é constituído por uma cabeça de 2,6 mm de diâmetro e 0,5 mm de altura, com um furo central para adaptação de chave hexagonal; corpo cilíndrico, de 2 mm de diâmetro, com roscas para permitir maior estabilidade e possui uma altura total de 4 mm.

2.3.1 Superfície dos implantes

Foram utilizados 2 tipos de implantes: a) denominados U, que foram usinados convencionalmente e b) denominados T, os quais, após a usinagem, receberam um tratamento químico de superfície, com ataque ácido, para produzir rugosidades adicionais.

2.4 PROTOCOLO CIRÚRGICO

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados usando técnica asséptica, sob anestesia profunda, induzida por injeção i.p. de solução de hidrato de cloral a 7% (0,6 mL/100 gramas de peso corporal). Em seguida, realizou-se a tricotomia na região do fêmur esquerdo e antissepsia com álcool 70%. Após a incisão da pele e tecido subcutâneo, descolou-se o perióstio para exposição do fêmur (Figuras 3 e 4). Cada animal recebeu 2 implantes distando entre eles, aproximadamente, 5mm. O implante U foi instalado na diáfise e o T na epífise. As perfurações ósseas foram realizadas com o auxílio de uma peça reta (Kavo, Brasil), acoplada a um motor elétrico (Driller, Alemanha) a 900 rpm e irrigação abundante com solução

salina 0,9% . Inicialmente, utilizou-se uma broca elicoidal de 1,5 mm de diâmetro e, em seguida, outra semelhante, medindo 3 mm (Figura 5).

A fixação endóstea dos implantes se deu por rosqueamento com chave manual hexagonal, até a cabeça do implante tocar completamente a cortical óssea (Figura 6). Todos os implantes, ao término desse procedimento, permaneciam com boa estabilidade e sem sinais de mobilidade. A sutura foi realizada por planos com fio de nylon 4.0 (Figura 7). No pós-operatório imediato, administrou-se Benzilpenicilina benzatina (Benzetacil 1.200.000 U.I., Eurofarma Laboratórios Ltda.) 0,06 mL/Kg em dose única intramuscular e, como analgésico, o Paracetamol (Paracetamol, Eurofarma Laboratórios Ltda.) 10mg/Kg, em gotas diluídas na água de consumo, por dois dias consecutivos, trocada diariamente. Essa diluição tomou como base que o consumo médio de água por um rato adulto é de aproximadamente 20 mL/dia (Waynforth et al., 1988).

Cada grupo (controle e teste) foi subdividido em dois outros grupos, sendo: a) 5 animais monitorados por 10 dias e b) 5 animais monitorados por 21 dias.

Assim, no 10º ou 21º dias após a cirurgia, os ratos foram sacrificados por inalação de dióxido de carbono. Com a exposição do fêmur, procedeu-se a avaliação visual dos tecidos e da cabeça dos implantes, bem como, o teste de mobilidade dos implantes, para certificar-se a osseointegração. Posteriormente, os blocos ósseos, contendo os implantes, foram removidos, utilizando-se uma peça reta com um disco de carborundum, irrigado com solução salina, acoplada ao motor elétrico (Figuras 8 e 9). As amostras foram fixadas em formaldeído a 10%.



Figura 3 – Delimitação cutânea da incisão a ser realizada



Figura 4 – Acesso ao fêmur do rato, após divulsão dos tecidos por planos



Figura 5 – Preparo do leito ósseo, por meio das perfurações na epífise e diáfise, para receber os implantes

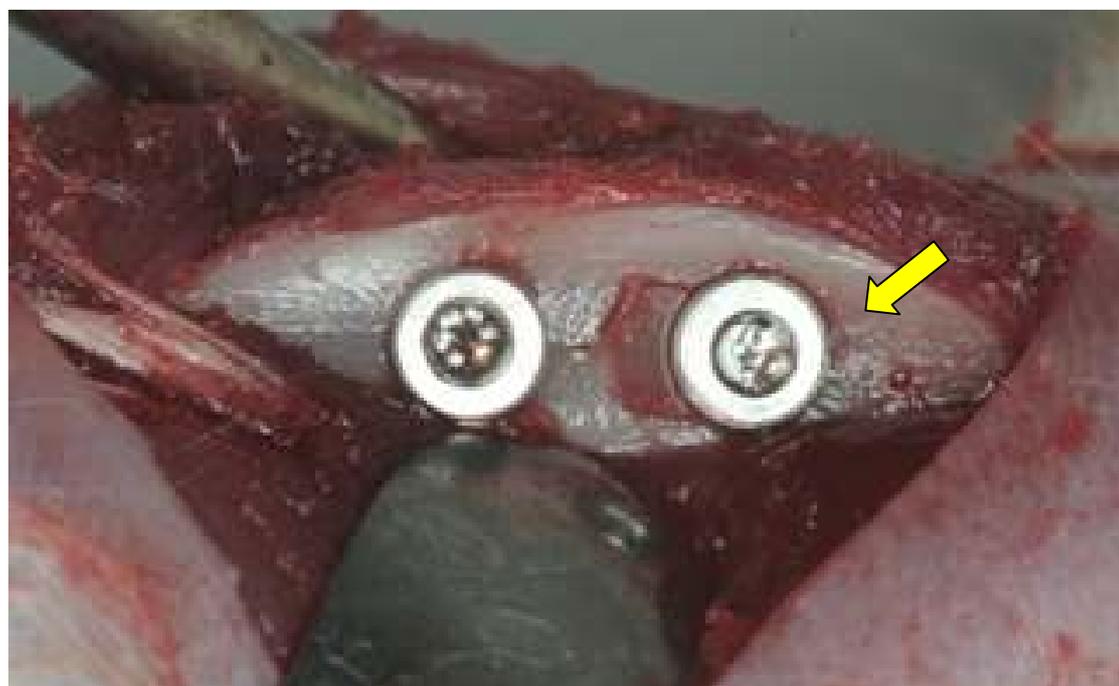


Figura 6 – Implantes de superfícies lisa (seta amarela) e tratada instalados no fêmur esquerdo dos ratos



Figura 7 – Sutura realizada por planos



Figura 8 – Remoção do fêmur após período cicatricial



Figura 9 – Vista interna do fêmur, mostrando osso cortical e medular, onde os implantes foram ancorados

2.5 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Primeiramente as 20 amostras foram desmineralizadas em solução de Morse (ácido fórmico 50% + citrato de sódio 20%, na proporção de 1:1), durante 15 dias, controladas radiograficamente, até que toda a porção mineral do osso fosse removida. Após a desmineralização, os implantes foram retirados, as peças banhadas em soluções de diferentes concentrações de álcool e xilol, incluídas em parafina. Os blocos parafinados foram cortados no micrótomo convencional para tecido mole, a uma espessura de 5µm, seguindo, paralelamente, o longo eixo da loja óssea dos implantes.

2.5.1 Coloração Hematoxilina-Eosina

A coloração em HE dos cortes foi realizada, convencionalmente, conforme a seguinte seqüência:

Desparafinar:

Xilol 1: 2 banhos de 15'

Xilol 2: 1 banho de 15'

Hidratar:

Álcool absoluto 1: 2 banhos de 5'

Álcool absoluto 2: 1 banho de 5'

Álcool 70%: 1 banho de 5'

Água corrente: 10'

Hematoxilina:

Corar durante 40''

Lavar 10' em água corrente

Eosina:

Corar durante 2'

Lavar ligeiramente apenas para remover o excesso, pois o corante é solúvel em água

Desidratar:

Álcool 70%: 1 banho rápido

Álcool absoluto 1: 2 banhos rápidos

Álcool absoluto 2: 1 banho de 3'

Álcool absoluto 3: 1 banho de 3'

Diafanizar:

Xilol 1: 1 banho de 3'

Xilol 2: 1 banho de 3'

Xilol 3: permanecer no líquido até a montagem das lâminas, em que é colada a lamínula de vidro sobre o corte histológico já corado.

2.6 ANÁLISE QUALITATIVA

Foram selecionadas 2 lâminas de cada animal, que apresentavam os cortes mais centrais nas regiões dos implantes. Os grupos teste e controle foram divididos de acordo com o período de cicatrização (10 e 21 dias), além disso, diferenciou-se, dentro de cada amostra, os implantes de superfície lisa e tratada, subdividindo-os em lado mesial e distal. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico, analisando-se em cada lado a presença ou ausência de tecido ósseo neoformado, diferentes estados de maturação deste (nos períodos de 10 e 21 dias), além da existência de tecido conjuntivo e infiltrado inflamatório.

2.7 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Foi selecionada apenas 1 lâmina de cada animal, com corte mais central, seguindo o mesmo padrão de subdivisão da análise qualitativa.

Procedeu-se a leitura das lâminas em um microscópio óptico acoplado a uma câmera de vídeo e a um computador com um programa (KS300) capaz de capturar as imagens em um aumento de 40 vezes. Assim, cada lateral, dos diferentes implantes, foi analisada, delimitando-se campos, baseados nas regiões em que, antes, estavam as roscas dos implantes removidos. Portanto, com a imagem projetada na tela do computador, em cada rosca, determinou-se uma área. Nesta região, analisou-se a área total, de osso neoformado (AT), de tecido conjuntivo (TC), de infiltrado inflamatório (II), de osso autógeno pré-existente (AO) e de osso medular (OM). Assim, quantificando todas as superfícies mesiais e distais (de coronal a apical), onde antes estavam instalados os implantes.

ARTIGO EM PORTUGUÊS**Avaliação da Neoformação Óssea ao Redor de Implantes de Titânio Instalados em Ratos Diabéticos**

**Gabriela GENNARO, Mestre em Implantodontia
Departamento de Estomatologia, Faculdade de Odontologia, Universidade
Federal de Santa Catarina.**

**Gerson Francisco de ASSIS, Mestre e Doutor em Patologia Bucal
Professor Associado, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de
Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.**

**Tânia Mary CESTARI, Doutora em Biologia Oral
Técnica Especializada, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de
Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.**

**Rubens RODRIGUES Filho, Mestre e Doutor em Farmacologia
Professor Adjunto, Departamento de Estomatologia, Faculdade de Odontologia,
Universidade Federal de Santa Catarina.**

Endereço de Correspondência do Autor:**Rubens Rodrigues Filho****Departamento de Estomatologia****Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC****Trindade, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, CEP: 88040-970****Tel: 55 (48) 3721 9520****Fax: 55 (48) 37219542****Email: rubens_ccs@yahoo.com.br**

Avaliação da Neoformação Óssea ao Redor de Implantes de Titânio Instalados em Ratos Diabéticos

Palavra-chave: implante dentário; diabetes mellitus experimental, osteogênese.

RESUMO

Introdução: O diabetes é associado a várias complicações que aumenta a morbidade e mortalidade em indivíduos afetados. Portanto, existem diversas alterações no metabolismo ósseo associadas ao diabetes e, que conseqüentemente, podem afetar o processo de osseointegração dos implantes dentários. **Objetivos:** Este estudo visou comparar a formação óssea ao redor de implantes de superfícies lisa e tratada, instalados em ratos diabético-induzidos e não-diabéticos, investigando se há diferenças na formação óssea entre os dois quadros metabólicos, melhora no padrão de osteogênese entre as diferentes superfícies e, sua relação com o diabetes. **Materiais e método:** Foram instalados implantes de titânio com superfícies tratada e lisa, no fêmur de ratos machos Wistar e os animais divididos em 2 grupos: diabético-induzidos com estreptozotocina (grupo experimental) e não diabéticos (grupo controle). As análises histomorfológica e histomorfométrica do bloco ósseo foram realizadas nos períodos de 10 e 21 dias de cicatrização. Os resultados obtidos foram analisados por meio de ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de **Bonferroni's**. **Resultados:** O percentual de neoformação óssea, ao redor dos implantes de superfície lisa e tratada, não apresentou significância estatística comparando os grupos diabético e controle. Entretanto, no período de 21 dias, nos ratos diabéticos o osso apresentou-se mais imaturo em relação àquele de aspecto maduro formado nos animais controle. Quando comparadas as diferentes superfícies (lisa e tratada), observou-se, aparentemente, que aos 10 dias, a superfície lisa favoreceu a maior formação de osso cortical e medular ao redor dos implantes Já aos 21 dias, não ocorreu diferença na neoformação óssea entre as duas superfícies. **Conclusão:** Os dados presentes sugerem que o atraso na maturação do tecido ósseo, se deu provavelmente, devido ao diabetes-induzido e suas implicações no metabolismo ósseo. Além disso, os implantes de superfície lisa, também na presença de diabetes, parecem ser melhores indutores de neoformação óssea.

1 INTRODUÇÃO

O diabetes, classificado em tipo I e II, é associado a várias complicações que aumentam a morbidade e mortalidade em indivíduos afetados. Essas complicações resultam de uma regulação anormal do metabolismo de glicose, devido à ausência, redução da produção de insulina ou resistência a esta (Oliver & Ternovem¹⁸, 1994).

Existem diversas alterações no metabolismo ósseo associadas ao diabetes e, que conseqüentemente, podem afetar o processo de osseointegração dos implantes dentários. A insulina atua direta ou indiretamente na síntese de matriz óssea e no metabolismo ósseo. Diretamente, estimula a síntese de matriz osteoblástica e, indiretamente, induz a produção do Fator de Crescimento Insulínico (IGF-I) pelo organismo. O IGF-I regula a síntese de matriz óssea por dois mecanismos: aumenta o número de osteoblastos presentes e controla a função de diferenciação osteoblástica (Canalis⁵, 1980). Os experimentos realizados *in vitro* indicam que a aplicação tópica de insulina estimula o processo de ossificação intramembranosa em fraturas (Yano et al²⁴, 1996); aumenta a área de osteóide, o número e a sobrevivência dos osteoblastos, reduzindo seu índice de apoptose (Hill et al⁹, 1997). Ainda, outro estudo *in vitro* verificou que a hiperglicemia aumentou a proliferação e inibiu a mineralização dos osteoblastos cultivados, enquanto o IGF-I reverteu esse quadro (Fang⁶, 2006).

Estudos em que foram instalados implantes, nas tíbias de ratos, induzidos a diabetes por estreptozotocina e que administraram marcadores de deposição óssea, demonstraram que a superfície do implante estava completamente adaptada ao osso cortical, tanto nos animais controle como nos diabéticos, não havendo diferença estatística entre os grupos. Porém, quando analisado o osso medular, perceberam que a porcentagem de tecido ósseo em contato com implante e a espessura do tecido neoformado eram maiores nos ratos controle que nos diabéticos, o que corresponde a uma porcentagem de osseointegração menor no segundo grupo em relação ao primeiro (Takeshita et al²³ 1997; Iyama et al¹⁰ 1997; Ottoni & Chopard¹⁹ 2004).

Com base nos resultados obtidos dos diversos trabalhos, que encontraram redução do contato osso-implante na presença do diabetes, Shyng; Devlin; Liang²¹ (2006) testaram a hipótese de que essa menor osseointegração poderia ser devido à diminuição da taxa de deposição mineral. Assim, foram instalados implantes nos alvéolos de ratos, imediatamente após a exodontia dos molares e foi observado que realmente, houve uma significativa redução na taxa de aposição mineral no grupo teste, o que sugere uma função osteoblástica prejudicada ou mineralização deficiente. Extrapolando para a situação clínica, os autores sugeriram que a inserção de implante,

imediatamente após a exodontia, pode estar contra-indicada em pacientes com glicemia mal controlada.

Na tentativa de se favorecer a osteogênese, principalmente em pacientes que apresentam condições sistêmicas desfavoráveis a mesma, tem-se alterado a topografia superficial dos implantes, de tal forma que esta apresente uma energia de superfície maior, favorecendo a adesão, organização e maturação do coágulo, bem como a posterior deposição de matriz óssea, proporcionando, assim, um aumento na capacidade de ancoragem da interface osso-biomaterial a curto, médio e longo prazo (Albrektsson & Wennerberg¹, 2004; Lemons¹³, 2004).

Seguindo esses princípios, alguns autores sugerem a utilização de implantes de superfície tratada por diversos propósitos, incluindo capacidade de melhorar a distribuição de carga, bem como o aumento da biocompatibilidade e das propriedades de osseocondutividade, buscando facilitar a osseointegração e seu tempo (Albrektsson, Wennerberg², 2004b; Buser et al³, 2004; Butz⁴, 2006).

Este estudo visou comparar a formação óssea ao redor de implantes de superfície lisa e tratada, instalados em ratos diabético-induzidos e não-diabéticos investigando se há diferenças na formação óssea entre os dois quadros metabólicos, melhora no padrão de osteogênese entre as diferentes superfícies e, sua relação com o diabetes.

2 MATERIAIS E MÉTODO

Os procedimentos realizados neste experimento tiveram sua aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina.

2.1 ANIMAIS

Foram utilizados 20 ratos Wistar, machos, com idade aproximada de 3 meses e peso médio de 350g, mantidos em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclo claro/escuro de 12h e livre acesso a água e a comida. Os animais foram divididos em 2 grupos: teste (10 ratos diabético-induzidos) e controle (10 ratos não-diabéticos).

2.2 INDUÇÃO DO DIABETES

O diabetes mellitus foi induzido por meio de injeção intraperitoneal de estreptozotocina (Streptozocin Sigma-Aldrich) na dosagem de 70mg/Kg corporal. Foram considerados diabéticos aqueles animais cuja glicemia apresentava-se acima de 200mg/dL de sangue e o estado hiperglicêmico foi verificado semanalmente, durante todo o experimento. As amostras de sangue foram coletadas por punção na

extremidade da cauda dos animais e mensuradas pelo método da glicose-oxidase, utilizando-se um glicosímetro digital (Accu-Chek Active, Roche, Alemanha).

2.3 PROTOCOLO CIRÚRGICO DE INSTALAÇÃO DOS IMPLANTES

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados usando técnica asséptica, sob anestesia profunda, induzida pela injeção i.p. de solução de hidrato de cloral a 7% (0,6 mL/100 gramas de peso corporal). Em seguida, instalou-se, no fêmur de cada animal, 2 implantes (2mm de diâmetro por 4 mm de altura - Systhex, Brasil) distando entre eles, aproximadamente, 5mm. O implante de superfície lisa foi instalado próximo à diáfise e o tratado (superfície atacada por ácido) mais próximo à epífise.

No pós-operatório imediato, administrou-se Benzilpenicilina benzatina (Benzetacil 1.200.000 U.I., Eurofarma Laboratórios Ltda.) 0,06 mL/Kg em dose única intramuscular e, como analgésico, o Paracetamol (Paracetamol, Eurofarma Laboratórios Ltda.) 10mg/Kg, em gotas diluídas na água de consumo, por três dias consecutivos, trocada diariamente.

Cada grupo (controle e teste) foi subdividido em dois outros grupos, sendo: a) 5 animais monitorados por 10 dias e b) 5 animais monitorados por 21 dias. Assim, no 10º ou 21º dias após a cirurgia, os ratos foram sacrificados por inalação de dióxido de carbono. Os blocos ósseos, contendo os implantes, foram removidos e fixados em formaldeído a 10%.

2.4 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Primeiramente, as 20 amostras foram desmineralizadas em solução de Morse (ácido fórmico 50% + citrato de sódio 20%, na proporção de 1:1), durante 15 dias e controladas radiograficamente. Após a desmineralização, os implantes foram retirados, as peças banhadas em soluções de álcool e xilol e incluídas em parafina. As amostras foram cortadas a uma espessura de 5µm e coradas por hematoxilina e eosina (HE).

2.5 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Foi selecionada uma lâmina de cada animal e nesta, o corte mais central foi estudado. Procedeu-se a leitura das lâminas em um microscópio óptico acoplado a um sistema de captura e análise de imagem (KS300), estas foram avaliadas histomorfometricamente. Assim, cada lateral, dos diferentes implantes, foi analisada, delimitando-se campos, baseados nas regiões em que, antes, estavam as roscas dos implantes removidos. Portanto, com a imagem projetada na tela do computador, determinou-se uma área em cada rosca. Nesta região, analisou-se a quantidade de

osso neoformado (ON), de tecido conjuntivo (TC), de infiltrado inflamatório (II), de osso autógeno pré-existente (OA) e de medula óssea (MO).

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística das diferenças entre superfícies (lisa e tratada) e condição (diabético e não-diabético), utilizou-se ANOVA a dois critérios, complementada pelo teste de Bonferroni's para comparações múltiplas, sendo adotado o valor de $P < 0,05$ como nível significância.

3 RESULTADOS

O estado diabético (glicemia acima de 200mg/dL) foi previsivelmente induzido e mantido durante os períodos cicatriciais. Nos grupos diabéticos de 10 e 21 dias, a glicemia média foi de 456 ± 128 e 496 ± 174 , respectivamente, enquanto que nos grupos controle (não-diabéticos) as médias obtidas foram de 111 ± 29 e 103 ± 12 , na mesma ordem (Figura 1).

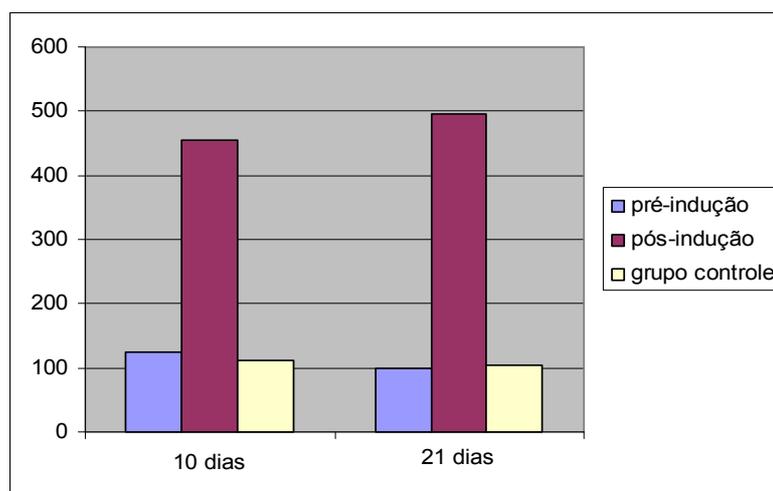


Figura 1 – Índice glicêmico de ratos (n=5) diabético-induzidos e controles, nos diferentes tempos experimentais

Conforme o esperado, os ratos não-diabéticos tiveram, aproximadamente, um aumento de 5% de massa corporal ao longo dos 10 e 21 dias. Contrariamente, os diabéticos apresentaram uma perda de peso de 17% para o grupo de 10 dias de cicatrização pós-cirúrgica e de 13% para o grupo de 21 dias (Figura 2).

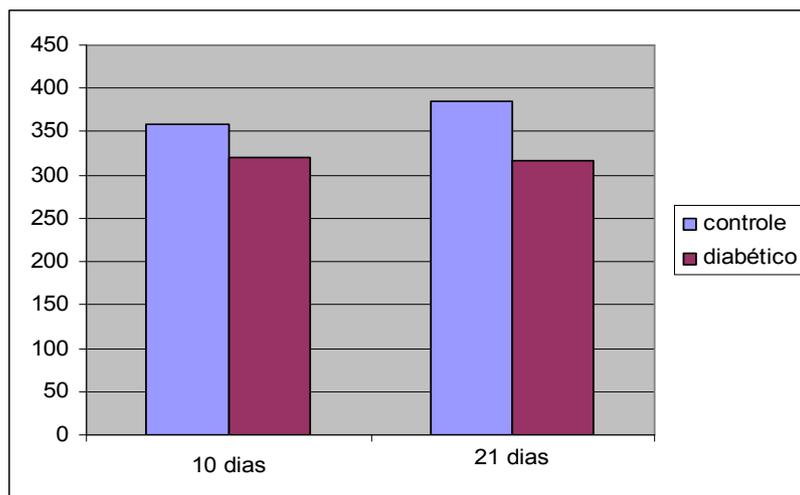


Figura 2 – Massa corporal dos animais (n=5) avaliados em relação ao tempo experimental

3.1 Histomorfologia

Quando comparados os ratos diabético-induzidos aos não-diabéticos, aparentemente, no período inicial de 10 dias, ambos apresentaram o mesmo quadro histomorfológico, tanto ao redor dos implantes de superfície lisa quanto daqueles tratados (**Figuras 3 e 4**). Entretanto, quando avaliados no tempo cicatricial de 21 dias, a quantidade de tecido ósseo neoformado foi similar, porém, no grupo diabético-induzido, esse osso apresentou-se mais imaturo em relação àquele de aspecto maduro formado nos animais controle, assim, observou-se áreas de tecido ósseo imaturo associado ao infiltrado inflamatório e ao tecido conjuntivo (**Figuras 5 e 6**).

Quando comparadas as diferentes superfícies (lisa e tratada), observou-se, aparentemente, que aos 10 dias, a superfície lisa favoreceu a maior formação de osso cortical e medular ao redor dos implantes (**Figuras 3 e 4**). Já aos 21 dias, não ocorreu diferenças na neoformação óssea entre as duas superfícies. Entretanto, curiosamente, ao redor dos implantes tratados, ocorreu uma necrose tecidual que, lentamente, foi sendo substituída por tecido de granulação e, mais tardiamente, por tecido ósseo, o que favoreceu maior interposição de tecido conjuntivo entre osso e o implante e a menor neoformação óssea próxima a rosca. Além disso, esteve sempre presente uma quantidade de infiltrado inflamatório, ao redor dos implantes de superfície tratada (**Figuras 5 e 6**).

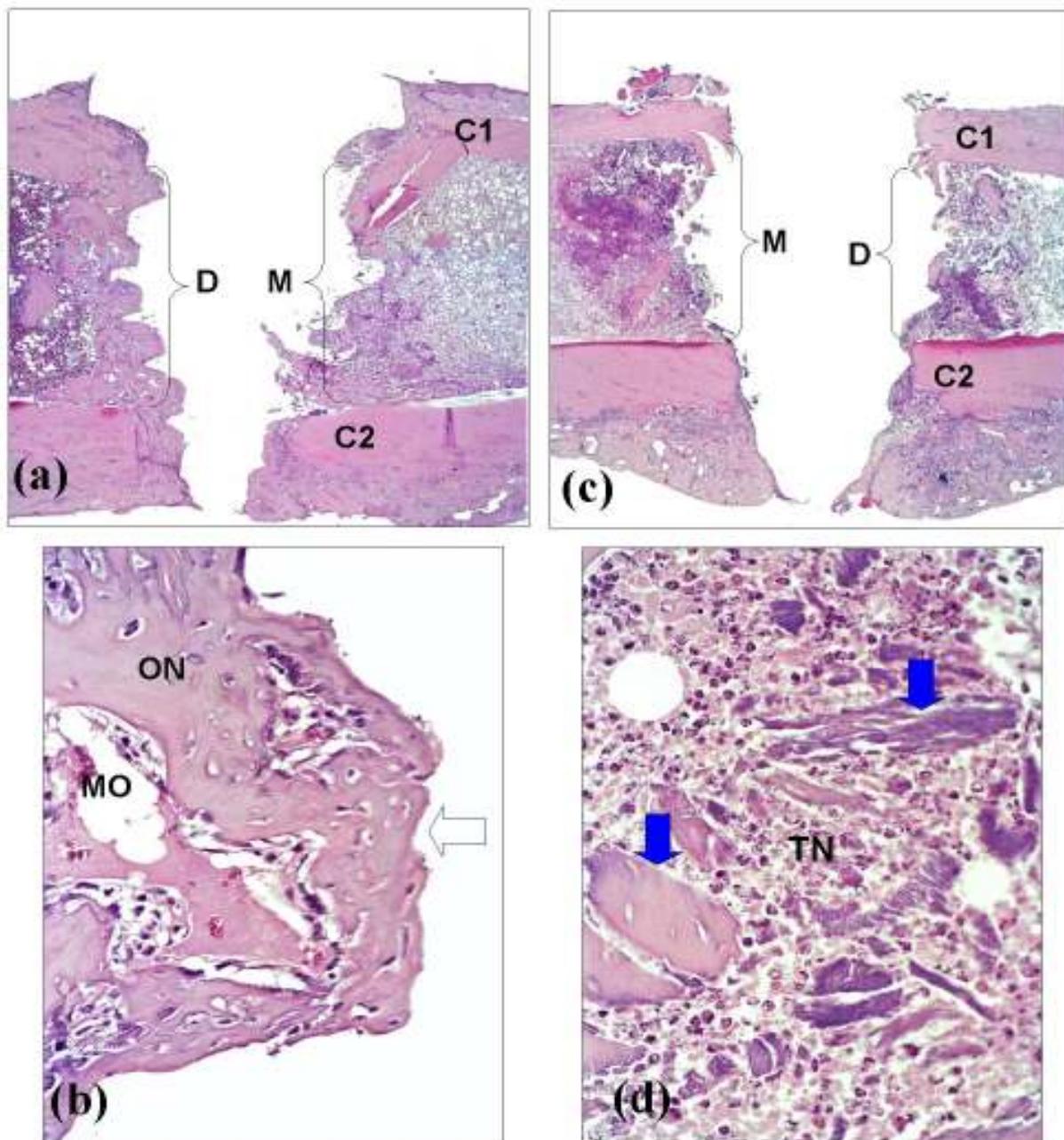


Figura 3 – Fotomicrografia da região do fêmur do grupo controle (10 dias)

Superfície lisa: a) visão panorâmica mostrando a cortical voltada para cabeça do implante (C1), tecido conjuntivo e restos de osso autógeno na porção mesial (M) e tecido ósseo na porção distal (D); b) detalhe do tecido ósseo neoformado (ON), localizado próximo a superfície da rosca do implante (seta branca), e da medula óssea (MO) entre as trabéculas.

Superfície tratada: c) Visão panorâmica mostrando cortical voltada para cabeça do implante (C1) e presença de osso autógeno e tecido necrosado tanto na superfície mesial (M) quanto distal (D); e d) detalhe do tecido necrosado (TN), próximo a superfície da rosca do implante e dos fragmentos de osso autógeno (seta azul). HE, objetivas 4X / 40X.

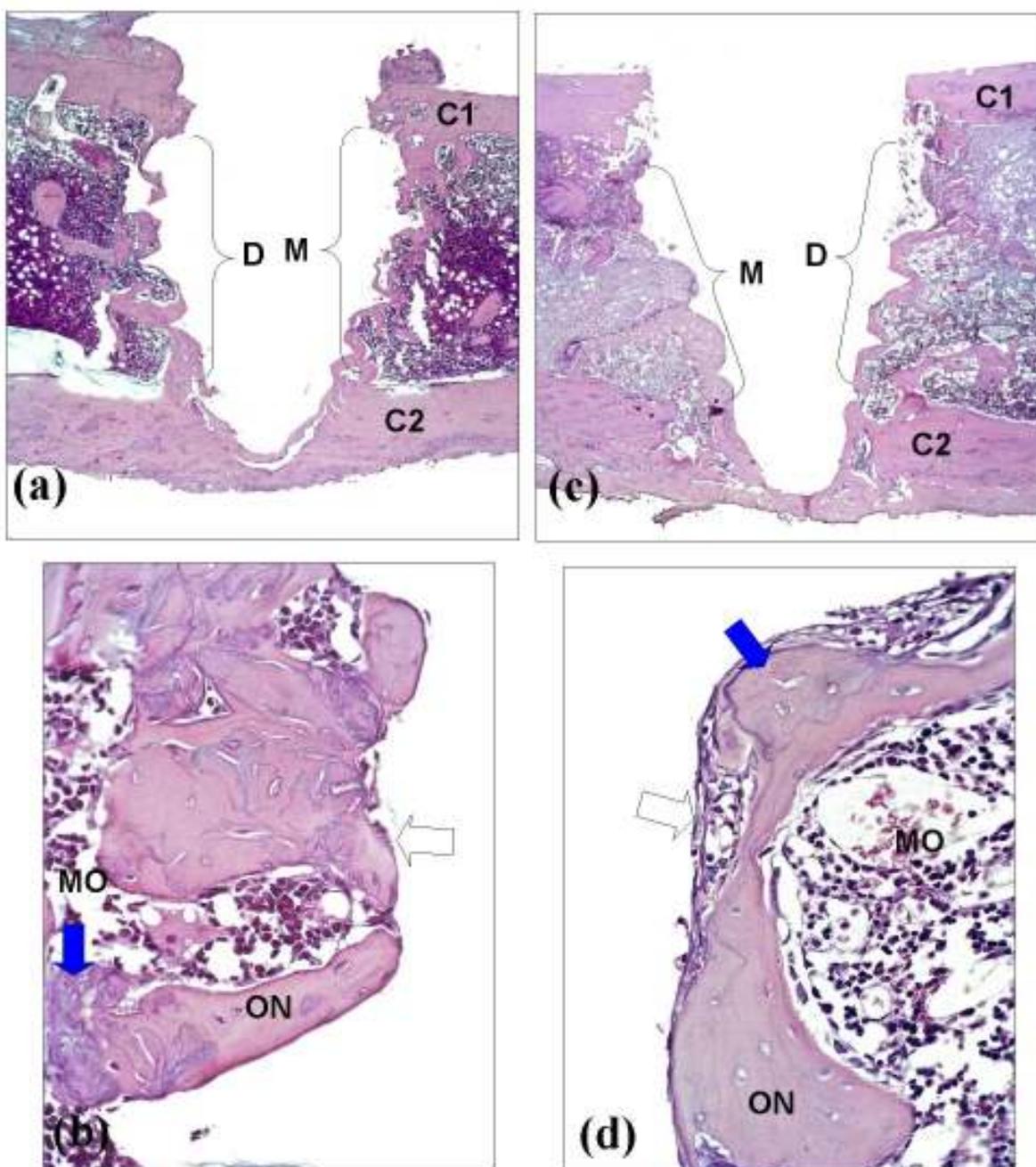


Figura 4 – Fotomicrografia da região do fêmur do grupo experimental (10 dias)

Superfície lisa: a) visão panorâmica mostrando a cortical voltada para cabeça do implante (C1), mistura de tecido conjuntivo, de infiltrado inflamatório e de tecido ósseo neoformado na porção distal (D) e de tecido ósseo na porção mesial (M); b) detalhe do tecido ósseo neoformado (ON) de arranjo trabecular, localizado próximo a superfície da rosca do implante (seta branca), e da medula óssea (MO) entre as trabéculas.

Superfície Tratada: c) Visão panorâmica mostrando cortical voltada para cabeça do implante (C1) e presença de osso autógeno e tecido necrosado tanto na superfície mesial (M) quanto na distal (D), mas com pequena neoformação óssea na distal próximo a cortical (C2); d) detalhe do tecido conjuntivo localizado próximo a superfície da rosca do implante (seta branca), do tecido ósseo (ON) e dos fragmentos de osso autógeno (seta azul). HE, objetivas de 4X/ 40X.

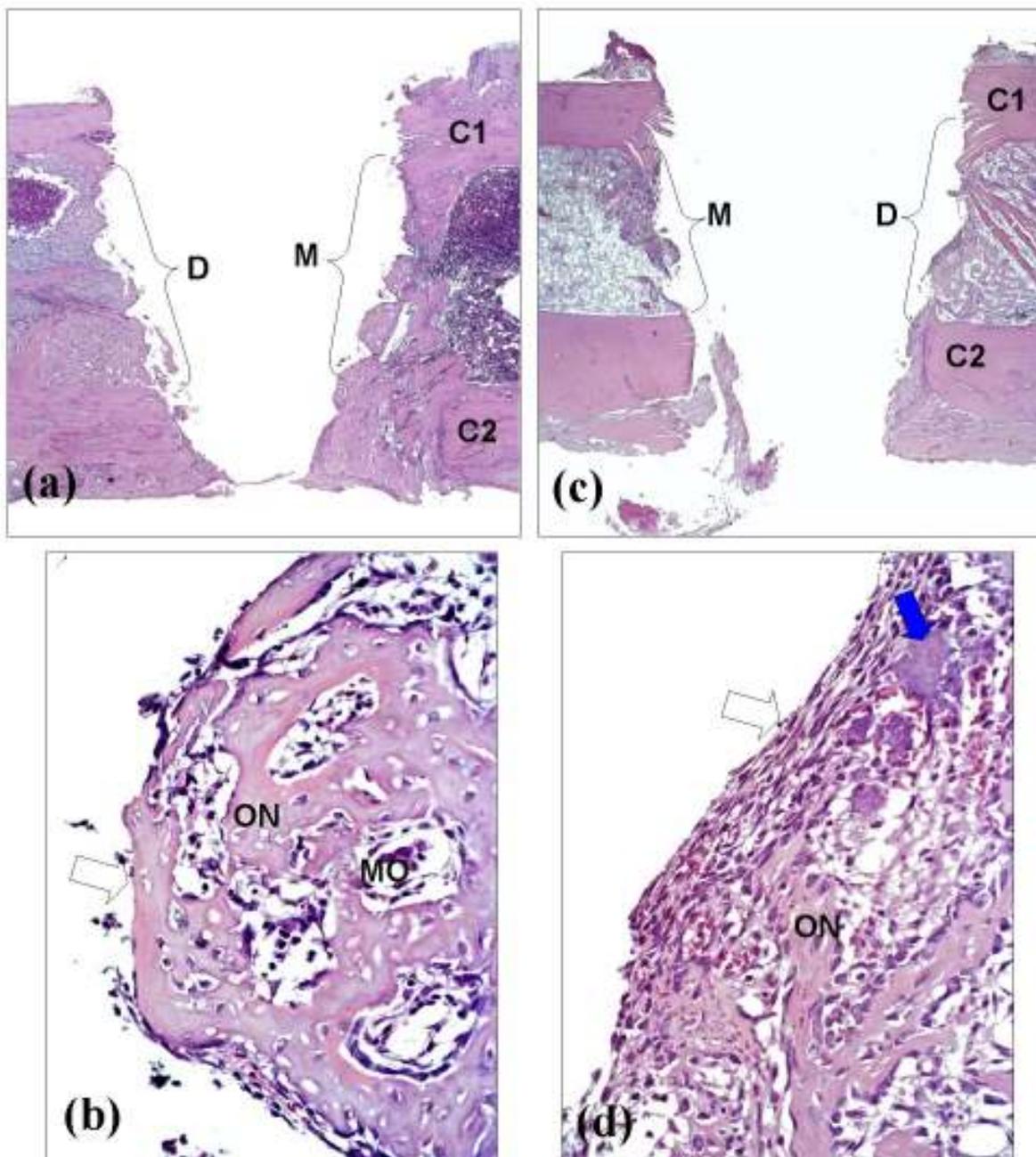


Figura 5- Fotomicrografia da região do fêmur do grupo controle (21 dias)

Superfície Lisa: a) Visão panorâmica mostrando a cortical voltada para cabeça do implante (C1), tecido ósseo cortical e medular na porção distal (D) e mesial (M); b) detalhe da superfície (seta branca) próxima ao implante mostrando o tecido ósseo neoformado (ON) mais maduro, com alguns fragmentos de osso autógeno (seta azul) aprisionado no seu interior e a medula óssea (MO).

Superfície tratada: c) Visão panorâmica mostrando a cortical voltada para cabeça do implante (C1), predomínio de tecido conjuntivo na porção mesial (M) e presença de tecido ósseo na porção distal (D), próximos a superfície da rosca do implante; d) detalhe do tecido ósseo neoformado (ON) mais maduro, contendo alguns fragmentos de osso autógeno (seta azul) aprisionado em seu interior, medula óssea (MO) e da fina camada de tecido conjuntivo (seta branca) interposto entre o implante e o tecido ósseo neoformado. HE, objetivas de 4X/ 40X.

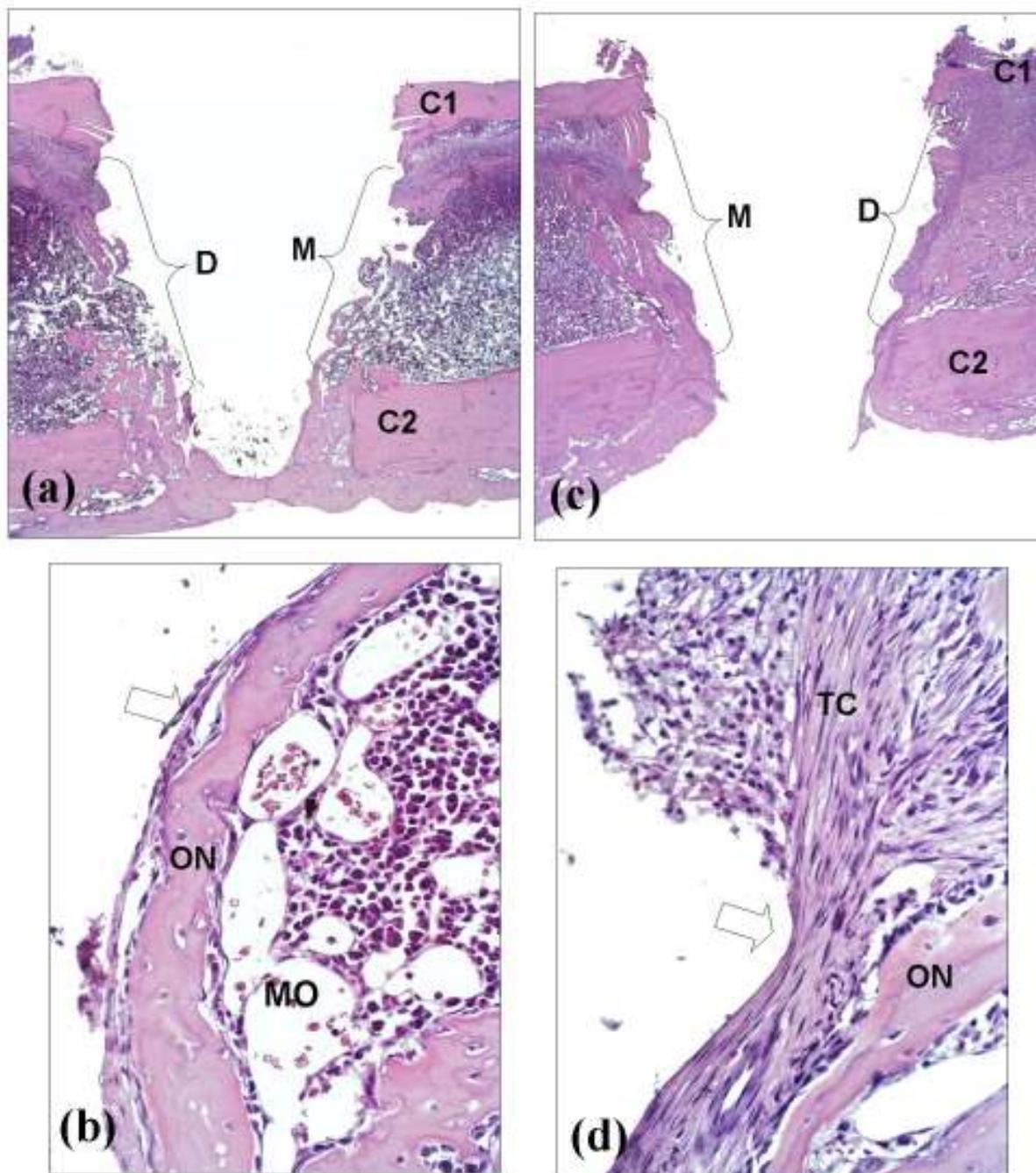


Figura 6- Fotomicrografia da região do fêmur do grupo experimental (21 dias)

Superfície Lisa: a) Visão panorâmica mostrando presença de tecido conjuntivo, restos de osso autógeno e de infiltrado inflamatório na metade da superfície mesial (M) e distal (D), próximos a cortical voltada para cabeça do implante (C1) e neoformação óssea e medular próximas a cortical apical (C2); b) detalhe do tecido ósseo neoformado (ON), da medula óssea (MO) e da fina cápsula de tecido conjuntivo (seta branca) interposta entre o implante e o tecido ósseo neoformado.

Superfície tratada: c) visão panorâmica mostrando presença de espessa cápsula de tecido conjuntivo recobrendo toda a superfície mesial (M) e distal (D) voltada o implante, reabsorção da cortical C1 e tecido ósseo neoformado próximos a cortical apical (C2); d) detalhe do tecido ósseo neoformado (ON) e da espessa cápsula de tecido conjuntivo (TC) interposta entre o implante e o tecido ósseo neoformado. HE, objetivas de 4X/ 40X.

3.2 Histomorfometria

Quando foram comparadas as superfícies lisa e tratada dos implantes, em cada grupo individualmente, observamos que, 10 dias após a instalação dos implantes, houve maior neoformação óssea ao redor das superfícies lisas, em ambos os grupos (controle e diabético-induzidos); a quantidade de osso medular formado foi significativamente maior apenas no grupo controle. Já no período de 21 dias, a neoformação óssea ao redor dos diferentes tipos de superfície, não foi estatisticamente significativa. Entretanto, a superfície lisa favoreceu a formação de osso medular, especialmente no grupo controle. Em relação à presença de infiltrado inflamatório, encontrou-se uma quantidade significativamente maior ao redor dos implantes de superfície tratada instalados em ambos os grupos e avaliados durante os diferentes tempos (Tabela 3)

Tabela 1 – Média e Desvio Padrão da porcentagem (%) das estruturas observadas entre o tecido ósseo e o implante. Comparação entre as **diferentes superfícies dos implantes** nos ratos controle e diabéticos

Parâmetros	Grupo controle		Nível de significância (P)	Grupo Experimental		Nível de significância (P)
	Liso	Tratado		Liso	Tratado	
Período 10 dias						
Osso neoformado	23,74 ± 3,83	12,87 ± 3,51	p<0,05	20,96 ± 7,92	6,22 ± 4,95	p<0,05
Medula óssea	16,29 ± 4,91	5,34 ± 1,02	p<0,05	17,68 ± 7,65	15,58 ± 4,30	p>0,05
Necrose/Tecido Conjuntivo	28,52 ± 9,64	30,58 ± 8,49	p>0,05	33,02 ± 4,64	26,28 ± 2,67	p>0,05
Infiltrado inflamatório	14,54 ± 4,66	31,47 ± 6,09	p<0,05	14,47 ± 11,24	31,54 ± 8,57	p<0,05
Osso autógeno	16,90 ± 3,93	21,74 ± 4,07	p>0,05	13,88 ± 4,74	20,08 ± 10,56	p>0,05
Período 21 dias						
Osso neoformado	20,39 ± 2,48	19,44 ± 7,09	p>0,05	17,10 ± 4,77	16,88 ± 8,62	p>0,05
Medula óssea	36,02 ± 9,22	19,35 ± 1,68	p<0,05	22,93 ± 10,40	15,07 ± 6,66	p>0,05
Necrose/Tecido Conjuntivo	18,52 ± 3,00	33,01 ± 5,96	p<0,05	26,99 ± 6,58	31,27 ± 4,99	p>0,05
Infiltrado inflamatório	6,81 ± 3,51	15,96 ± 4,46	p<0,05	19,17 ± 5,29	22,15 ± 6,96	p<0,05
Osso autógeno	18,26 ± 12,37	12,25 ± 4,75	p>0,05	13,81 ± 5,35	14,62 ± 5,55	p>0,05

As medidas histomorfométricas, comparando os grupos diabético-induzido e controle, não apresentaram significância estatística para a quantidade de neoformação óssea ao redor dos implantes de superfície lisa e tratada, avaliados durante os períodos cicatriciais de 10 e 21 dias. Porém, em relação à quantidade de infiltrado inflamatório, no período de 21 dias, o grupo diabético-induzido apresentou uma quantidade significativamente maior em relação grupo controle ao redor dos implantes de superfície lisa. Além disso, quando comparado ao grupo controle, a quantidade de osso medular foi significativamente maior ao redor dos implantes tratados instalados

nos ratos diabéticos-induzidos, no período de 10 dias. Por isso, nessa mesma área, houve uma maior neoformação óssea cortical para o grupo controle ($12,87 \pm 3,51$) em relação ao grupo teste ($6,22 \pm 4,95$), mas sem significância estatística (Tabela 2).

Tabela 2 – Média e Desvio Padrão da porcentagem (%) das estruturas observadas entre o tecido ósseo e o implante. Comparação entre **diferentes condições (ratos controles e diabéticos)** para as superfícies lisa e tratada dos implantes

Parâmetros	Liso		Nível de significância (P)	Tratado		Nível de significância (P)
	Controle	Experimental		Controle	Experimental	
Período 10 dias						
Osso neoformado	23,74 ± 3,83	20,96 ± 7,92	p>0,05	12,87 ± 3,51	6,22 ± 4,95	p>0,05
Medula óssea	16,29 ± 4,91	17,68 ± 7,65	p>0,05	5,34 ± 1,02	15,58 ± 4,30	p<0,05
Necrose/Tecido Conjuntivo	28,52 ± 9,64	33,02 ± 4,64	p>0,05	30,58 ± 8,49	26,28 ± 2,67	p>0,05
Infiltrado inflamatório	14,54 ± 4,66	14,47 ± 11,24	p>0,05	31,47 ± 6,09	31,54 ± 8,57	p>0,05
Osso autógeno	16,90 ± 3,93	13,88 ± 4,74	p>0,05	21,74 ± 4,07	20,08 ± 10,56	p>0,05
Período 21 dias						
Osso neoformado	20,39 ± 2,48	17,10 ± 4,77	p>0,05	19,44 ± 7,09	16,88 ± 8,62	p>0,05
Medula óssea	36,02 ± 9,22	22,93 ± 10,40	p>0,05	19,35 ± 1,68	15,07 ± 6,66	p>0,05
Necrose/Tecido Conjuntivo	18,52 ± 3,00	26,99 ± 6,58	p>0,05	33,01 ± 5,96	31,27 ± 4,99	p>0,05
Infiltrado inflamatório	6,81 ± 3,51	19,17 ± 5,29	p<0,05	15,96 ± 4,46	22,15 ± 6,96	p>0,05
Osso autógeno	18,26 ± 12,37	13,81 ± 5,35	p>0,05	12,25 ± 4,75	14,62 ± 5,55	p>0,05

4 DISCUSSÃO

Os sintomas de diabetes apresentados pelos ratos induzidos por estreptozotocina são bem estabelecidos (Wong²⁵, 1993). Neste estudo, os diabéticos apresentaram uma perda de peso, enquanto que os ratos-controle continuaram ganhando massa corporal ao longo do experimento, estando esses resultados de acordo com outros trabalhos (Nevins et al.¹⁷, 1998; McCracken et al.¹⁵, 2000; Siqueira et al.²², 2003; Kwon et al.¹², 2005).

A indução de diabetes oferece um ambiente sistêmico adverso, caracterizado por altos níveis de glicemia sanguínea. Com isso, há uma cicatrização prejudicada que está associada com distúrbios microvasculares e celulares (Mealey & Moritz¹⁴, 2003). Também, são notadas mudanças típicas na cicatrização óssea que incluem diminuição da osteogênese, menor renovação celular, osso neoformado com baixa densidade mineral e atraso no reparo das fraturas (Canalis⁵, 1980; Glajchen et al.⁸, 1988; Yano et al.²⁴, 1996; Fang⁶, 2006).

Este estudo relata os efeitos do diabetes experimental sobre a cicatrização óssea ao redor de implantes de superfície lisa e tratada. Assim, foi possível notar que ocorreu formação óssea para os grupos diabético e controle, nos períodos cicatriciais

de 10 e 21 dias. A análise histomorfométrica revelou diferenças na formação óssea apenas entre as superfícies dos implantes. Assim, a quantidade de osso neoformado, em 10 dias, foi significativamente maior ao redor dos implantes lisos tanto no grupo controle quanto no diabético-induzido. Além disso, o infiltrado inflamatório esteve sempre presente ao redor dos implantes tratados, tanto nos animais diabéticos quanto nos controles. Assim, essa neoformação óssea desfavorável encontrada ao redor dos implantes tratados pode ser justificada pela grande presença de inflamação, como também, por terem sido instalados mais próximos à diáfise. Já no período de 21 dias, ao redor dos implantes tratados, ocorreu uma necrose tecidual que lentamente foi sendo substituída por tecido de granulação e, mais tardiamente por tecido ósseo, por isso justifica o percentual de tecido ósseo ter sido similar para ambas as superfícies, pois o tecido primário (imaturado) é mais trabeculado, menos organizado e mais volumoso em relação aquele osso cortical maduro formado ao redor dos implantes lisos em 21 dias.

Nesse estudo, apesar da quantidade de osso neoformado, ao redor dos implantes, não diferir entre os grupos controle e diabético, foi possível notar que, aos 21 dias, a maturidade do tecido ósseo no grupo diabético-induzido era menor, apresentando áreas de osso imaturo associado a um intenso infiltrado inflamatório e tecido conjuntivo.

Assim, os altos níveis de infiltrado inflamatório encontrados, circundando os implantes nos animais diabéticos, pode ser devido à resposta aumentada monócito/macrófago, presente nos quadros diabéticos, a qual resulta em um dramático aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α). Dessa maneira, a formação de produtos finais da glicosilação do colágeno (AGEs) tem um papel importante na regulação da linhagem de monócitos/macrófagos. O acúmulo de AGEs estimula a migração de monócitos para o local e, uma vez estes no tecido, os AGEs interagem com os seus respectivos receptores, na superfície das células dos monócitos. Esta interação resulta na mobilização de monócitos até o local da inflamação, o que induz uma mudança no fenótipo monocítico, um crescimento na população celular e, conseqüentemente, um significativo aumento do infiltrado inflamatório e da produção de citocinas, resultando em maior destruição tecidual (Schmidt et al²⁰, 1996).

Semelhantemente aos resultados encontrados nesse trabalho, em relação à quantidade de osso neoformado não diferir entre os grupos controle e diabético e à existência de diferenças no padrão de maturação óssea; Nevins et al¹⁷. (1998) ao induzirem diabetes em ratos, por meio de estreptozotocina, afirmaram que a osseointegração se deu semelhantemente em ambos os grupos, entretanto, a análise

em microscopia de luz revelou diferenças no padrão de formação óssea, pois nos ratos diabéticos, o osso neoformado parecia imaturo e desorganizado. Em trabalhos utilizando marcadores de deposição óssea, com o objetivo de quantificar o osso neoformado, ao redor de implantes instalados em ratos normais e diabéticos, também se encontrou que a neoformação óssea junto ao implante não mostrou diferença estatística entre os dois grupos. Entretanto, essa mostrou-se significativa quando avaliado o canal medular (Iyama et al¹⁰.1997; Ottoni & Chopard¹⁹ 2004). Siqueira et al²² (2003), com o objetivo de investigar o curso histológico e as mudanças ultra-estruturais no processo de osseointegração, instalaram implantes em ratos diabético-induzidos, não-diabéticos e tratados com insulina. Os animais foram sacrificados em 10 e 21 dias após a cirurgia. Os ratos diabético-induzidos exibiram uma redução de 50% na área óssea formada, após 21 dias à instalação, observando também um atraso no processo de neoformação óssea. Porém, não houve diferenças estatísticas entre os grupos, quando avaliados 10 dias após a cirurgia, sendo esses resultados muito semelhantes aos encontrados neste estudo. De maneira contrária às observações aqui feitas, em relação à ausência de diferenças na quantidade de osso neoformado, em um trabalho recente, encontrou-se que a quantidade de osso formado adjacente aos implantes, foi significativamente maior nos ratos diabéticos que nos animais controle. Uma das justificativas para esse achado foi que, devido às anormalidades cicatriciais relacionadas ao diabetes, houve um atraso na remodelação e maturação do osso adjacente ao implante, assim, os animais diabéticos apresentariam maior volume ósseo associado aos implantes devido à cicatrização comprometida, uma vez que a atividade osteoclástica e a diferenciação osteoblástica estão inibidas (McCracken et al¹⁶, 2006).

Portanto, a maioria das investigações indicam que um nível elevado de glicose, devido à ausência de insulina, apresenta um efeito negativo no processo de maturação óssea. Como já visto, a insulina é um hormônio fundamental não somente para o controle da glicose, mas também para o crescimento esquelético, pois atua direta ou indiretamente na síntese de matriz óssea e no metabolismo ósseo. Diretamente, estimula a síntese de matriz osteoblástica e, indiretamente, induz a produção de IGF-I pelo organismo. (Canalis⁵, 1980). No entanto, as diferenças no padrão de formação óssea neste estudo e naqueles envolvendo diabetes não-controlada, também podem resultar da interação de produtos finais da glicosilação do colágeno (AGEs) com a superfície do implante. Talvez, a presença de AGEs no tecido ósseo produza um ambiente menos favorável para a regeneração óssea. Essas moléculas podem inibir, competitivamente, a adesão das proteínas formadoras de

osso à superfície dos implantes, bloqueando o início normal da osteogênese, causando um atraso na maturação tecidual (Fiorellini et al⁷.,1999).

5 CONCLUSÃO

Apesar não ter sido encontrada diferença na quantidade de osso neoformado entre os ratos diabético-induzidos e controles, foi possível observar, para o período cicatricial de 21 dias, que o tecido ósseo neoformado apresentou-se mais imaturo em relação àquele de aspecto maduro formado nos animais controle. Assim, podemos concluir que, esse atraso na maturação do tecido se deu, provavelmente, devido ao diabetes-induzido e suas implicações no metabolismo ósseo, mas que parecem não se constituir numa contra-indicação definitiva para a implantodontia. Além disso, os implantes de superfície lisa, também na presença de diabetes, foram melhores indutores de neoformação óssea.

REFERÊNCIAS

1. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 1- review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont.* 2004; 17(5):536-43.
2. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 2-review focusing on clinical knowledge of different surfaces. *Int J Prosthodont.* 2004; 17(5):544-64.
3. Buser D et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res.* 2004; 83(7):529-33.
4. Butz F, Aita H, Wang CJ, Ogawa T. Harder and stiffer bone osseointegrated to roughened titanium. *J Dent Res.* 2006; 85(6):560-5.
5. Canalis E. Effect of insulin-like growth factor I on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria. *J Clin Invest.* 1980; 66: 709–719.
6. Fang Y, et al. Effects of insulin-like growth factor I on the development of osteoblasts in hyperglycemia. *Diab Res Clin Pract.* 2006; 73(1): 95-7.
7. Fiorellini JP et al. The effect of insulin therapy on osseointegration in a diabetic rat model. *Clin Oral Implan Res.* 1999; 10: 362-68.
8. Glajchen N et al. Bone mineral metabolism in experimental diabetes mellitus: osteocalcin as a measure of bone remodeling. *Endocrinology.* 1988; 123: 290-5.
9. Hill PA, Tumber A, Meikle M.C. Multiple extracellular signals promote osteoblast survival and apoptosis. *Endocrinology.* 1997; 138: 3849-58.
10. Iyama S. et al. 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.* 1997; 68(12):1169-75.
11. Junqueira LC & Carneiro J. *Histologia Básica.* Rio de Janeiro: Guanabara Kooga; 1995.

12. Kwon PT et al. Maintenance of osseointegration utilizing insulin therapy in a diabetic rat model. *J Periodontol*. 2005;76(4):621-6.
13. Lemons JE. Biomaterials, biomechanics, tissue healing, and immediate-function dental implants. *J Oral Implantol*. 2004; 30(5):318-24.
14. Mealey BL, Moritz AJ. Hormonal influences: effects of diabetes mellitus and endogenous female sex steroid hormones on the periodontium. *Periodontol* 2000. 2003; 32: 59-81.
15. McCracken MS. et al. Bone response to titanium alloy implants placed in diabetic rats. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2000; 15(30): 345-54.
16. McCracken MS. et al. Bone associated with implants in diabetic and insulin-treated rats. *Clin Oral Impl Res*. 2006; 17: 495-500.
17. Nevins L. M. et al. Wound healing around endosseous implants in experimental diabetes. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1998; 13(5):620-9.
18. Oliver, RC, Ternovem T. Diabetes- A risk factor for periodontitis in adults. *J Periodontol*. 1994; 65: 30-8.
19. Ottoni CEC, CHOPARD RP. Histomorphometric Evaluation of New Bone Formation in Diabetic Rats Submitted to Insertion of Temporary Implants. *Braz Dent J*. 2004; 15(2):87-92.
20. Schmidt AM 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* 1996; 31: 508–515.
21. Shyng YC, Devlin, H, Liang, KO. Bone formation around immediately placed oral implants in diabetic rats. *Int J Prosthodont*. 2006; 19(5): 513-4.
22. Siqueira JT et al. Bone formation around titanium implants in the rat tibia: role of insulin. *Implant Dent*. 2003; 12(3): 242-8.
23. Takeshita F et al. The effects of diabetes on the interface between hydroxyapatite implants and bone in rat tibia. *J Periodontol*. 1997; 68: 180-5.

24. Yano Y, Ohya K, Amagasa, T. Insulin enhancement of in vitro wound healing in fetal rat parietal bones. *J Oral Maxillofac Surg.* 1996, 54: 182-6.
25. Wong KK, Tzeng ES. Appearance of different diabetic symptoms after streptozotocin administration: A comparison study. *Biochem Mol Biol Int.* 1993; 30:1035-1041.

ARTIGO EM INGLÊS**Assessment of bone neoformation around titanium implants
inserted in diabetic rats****Running Title: Implants in diabetic rats****Gabriela Gennaro¹****Gerson Francisco de Assis²****Tânia Mary Cestari³****Rubens Rodrigues Filho⁴**

- 1. PhD Student, Department of Estomatology, School of Dentistry, Federal University Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.**
- 2. Associate Professor, Department of Biologic Sciences, Bauru Dental School, University of São Paulo, Bauru, Brazil.**
- 3. PhD Student, Department of Biologic Science, Bauru Dental School, University of São Paulo, Bauru, Brazil.**
- 4. Associate Professor, Department of Estomatology, School of Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.**

Corresponding author:**Rubens Rodrigues Filho****Department of Estomatology****Health Sciences Center****School of Dentistry, Federal University of Santa Catarina - UFSC****Trindade, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil, CEP: 88040-970****Tel: 55 (48) 3721 9520****Fax: 55 (48) 37219542****Email: rubens_ccs@yahoo.com.br**

Assessment of bone neoformation around titanium implants inserted in diabetic rats

Key Words: dental implant; diabetes mellitus; osteogenesis; bone quantity

ABSTRACT

Objectives: This study aimed at comparing bone formation around implants with smooth and treated surface, inserted in induced diabetic rats and in non-diabetic rats, investigating whether there are differences in bone formation between both metabolic conditions, improvement in osteogenesis pattern between different surfaces and their relation with diabetes. **Materials and method:** Titanium implants (smooth and treated surface) were inserted in male Wistar rats, which were divided into two groups: streptozotocin-induced diabetic rats (experimental group) and non-diabetic rats (control group). Histomorphologic and histomorphometric analyses of bone block were performed at 10 and 21 days of healing. Results were analyzed by two-way ANOVA, followed by Bonferroni's test. **Results:** The percentage of bone neoformation around implants of smooth and treated surface did not have statistical significance after comparison between diabetic and control groups. However, at 21 days, the bone was more immature in diabetic rats in relation to that with a mature aspect formed in control animals. When different surfaces were compared (smooth and treated), at 10 days the smooth surface apparently favored better formation of cortical and cancellous bone around the implants. On the other hand, at 21 days there was no difference in bone neoformation between both surfaces. **Conclusion:** The present data suggest that delay in bone tissue maturation was probably a result of induced diabetes and its implications in bone metabolism. In addition, smooth surface implants, also in association with diabetes, seem to be better inducers of bone neoformation.

INTRODUCTION

Diabetes, classified into type I and II, is associated with many complications that increase morbidity and mortality in affected individuals. Such complications result from an abnormal regulation of glucose metabolism, due to absence or reduction in insulin production or resistance to it (Oliver & Ternovem 1994).

There are many changes in bone metabolism associated with diabetes that can consequently affect the process of osseointegration of dental implants. Insulin acts directly or indirectly in the synthesis of bone matrix and in bone metabolism. It directly stimulates synthesis of osteoblastic matrix, and indirectly induces production of insulin growth factor (IGF-I) by the organism. IGF-I regulates synthesis of bone matrix by two mechanisms: it increases the number of osteoblasts and controls function of osteoblastic differentiation (Canalis 1980). *In vitro* experiments indicate that topic application of insulin stimulates the process of intramembranous ossification in fractures (Yano et al.1996), besides increasing osteoid area, number and survival of osteoblasts, reducing their level of apoptosis. Also, another *in vitro* study verified that hyperglycemia increased proliferation and inhibited mineralization of cultivated osteoblasts, whereas IGF-I reverted that condition (Fang et al. 2006).

Studies in which implants were inserted in tibias of streptozotocin-induced diabetic rats and markers of bone deposition were used showed that implant surface was completely adapted to the cortical bone, both in control and diabetic animals, and there was no statistical difference between groups. However, when the cancellous bone was analyzed, it was observed that the percentage of bone tissue in contact with the implant and thickness of neoformed tissue were higher in control rats than in diabetic rats, which corresponds to a percentage of osseointegration lower in the latter group in relation to the former (Takeshita et al. 1997; Iyama et al. 1997; Ottoni & Chopard 2004).

Based on the results obtained in several studies that found reduced bone-implant contact in the presence of diabetes, Shyng et al. 2006, tested the hypothesis that such lower osseointegration could be due to reduction in rate of mineral deposition. Thus, implants were installed in alveoli of rats immediately after molar extraction and it was observed that there was a significant reduction in mineral apposition rate in the test group, suggesting impaired osteoblastic function of deficient mineralization. Extrapolating to a clinical situation, the authors suggested that implant insertion immediately after extraction can be contraindicated in patients with poorly controlled blood glucose.

As an attempt to favor osteogenesis, especially in patients who have unfavorable systemic conditions, superficial topography of implants has been changed, so that it has a larger surface energy, favoring clot adhesion, organization and maturation, as well as further deposition of bone matrix. Thus, there is an increase in anchoring capacity of bone-biomaterial interface in the short-, medium- and long-term (Albrektsson & Wennerberg 2004; Lemons 2004).

According to these principles, some authors suggest use of treated surface implants for several purposes, including ability to improve load distribution, as well as increase biocompatibility and properties of bone conductivity, aiming to facilitate osseointegration and its time (Albrektsson & Wennerberg 2004b; Buser et al. 2004; Butz et al. 2006).

This study aimed at comparing bone formation around implants with smooth and treated surface, inserted in induced diabetic rats and in non-diabetic rats, investigating whether there are differences in bone formation between both metabolic conditions, improvement in osteogenesis pattern between different surfaces and their relation with diabetes.

MATERIALS AND METHOD

The procedures performed in this experiment were approved by the Animal Ethics Committee (CEUA) at Federal University of Santa Catarina, by protocol PP00094.

Animals

Twenty male Wistar rats were used, aged approximately 3 months and mean weight of 350 g, maintained at controlled temperature ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), 12:12-h light-dark cycle and free access to water and food. The animals were divided into two groups: test (10 induced diabetic rats) and control (10 non-diabetic rats).

Induction of diabetes

Diabetes mellitus was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (Streptozocin Sigma-Aldrich) at a dosage of 70 mg/kg of body weight. Diabetic animal were those whose blood glucose was above 200 mg/dL of blood and the hyperglycemic status was verified weekly throughout the whole experiment. Blood samples were collected by puncture at tail end and measured by the glucose-oxidase method using a digital glucometer (Accu-Chek Active, Roche, Germany).

Surgical protocol for implant insertion

All surgical procedures were performed using aseptic techniques, under deep anesthesia, induced by intraperitoneal injection of 7% solution of chloral hydrate (0.6 mL/100 g of body weight). Next, two implants were inserted in the femur of each animal (2 mm in diameter by 4 mm in height - Systhex, Brazil), with an approximate distance of 5 mm between them. Implant of smooth surface was inserted close to the diaphysis and treated implant (acid-etched surface) closer to the epiphysis.

In the immediate postoperative period, 0.06 mL/Kg of benzathine benzylpenicillin (Benzetacil 1.200. 000 IU, Eurofarma Laboratórios Ltda.) was administered at a single intramuscular dose and 10 mg/Kg paracetamol was used as analgesic (Paracetamol, Eurofarma Laboratórios Ltda.) in drops diluted in consumption water for three consecutive days, changed daily.

Each group (control and test) was subdivided into two other groups: a) 5 animals monitored for 10 days and b) 5 animals monitored for 21 days. Thus, at 10 or 21 days after the surgery, the rats were sacrificed by inhalation of carbon dioxide. Bone blocks containing the implants were removed and fixed in 10% formaldehyde.

Histological processing

Firstly, all 20 samples were demineralized in Morse solution (50% formic acid + 20% sodium citrate, at a proportion of 1:1) for 15 days and radiographically controlled. After demineralization, the implants were removed and bathed in alcohol and xylol solutions and included in paraffin. The samples were cut at a thickness of 5 µm and stained with hematoxylin and eosin (HE).

Histomorphometric analysis

One blade for each animal was selected, which had its most central section analyzed. Histomorphometric analysis of the blades was performed at an optical microscope attached to a system of image capture and analysis (KS300). Thus, each lateral of different implants was analyzed, establishing fields based on regions in which the screw threads of removed implants were located. Therefore, having the image projected in the computer screen, an area in each screw thread was determined. In that region, amounts of neoformed bone (NB), connective tissue (CT), inflammatory infiltrate (II), preexisting autogenous bone (AB) and bone marrow (BM) were analyzed.

Statistical Analysis

Two-way ANOVA, complemented by Bonferroni's test for multiple comparisons was used for statistical analysis of differences between surfaces (smooth and treated) and conditions (diabetic and non-diabetic). $P < 0.05$ was set as significance level.

RESULTS

Diabetic status (blood glucose above 200 mg/dL) was predictably induced and maintained over healing periods. In diabetic groups at 10 and 21 days, mean blood glucose was 456 ± 128 and 496 ± 174 , respectively, whereas in control groups (non-diabetic) means were 111 ± 29 and 103 ± 12 , respectively (Figure 1).

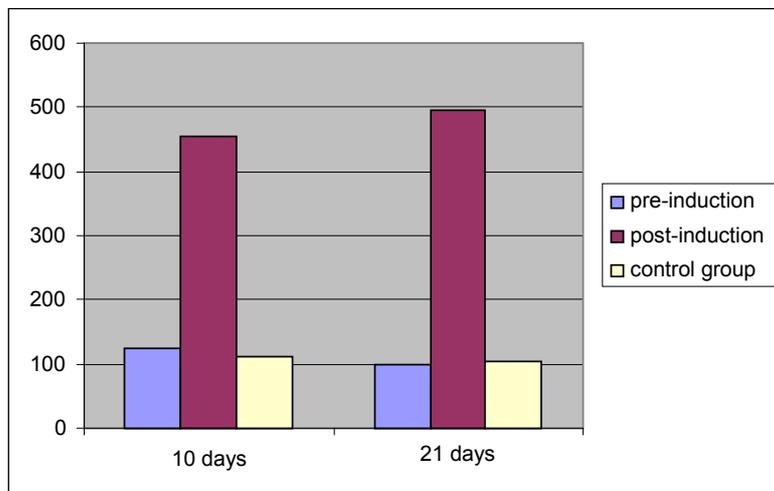


Figure 1 – Glycemic index of induced diabetic rats (n=5) and controls, in different experimental times

As expected, non-diabetic rats had an increase in body mass of approximately 5% at 10 and 21 days. On the other hand, diabetic rats had a 17% weight loss for the group of 10 days of postsurgical healing and 13% for the group of 21 days (Figure 2).

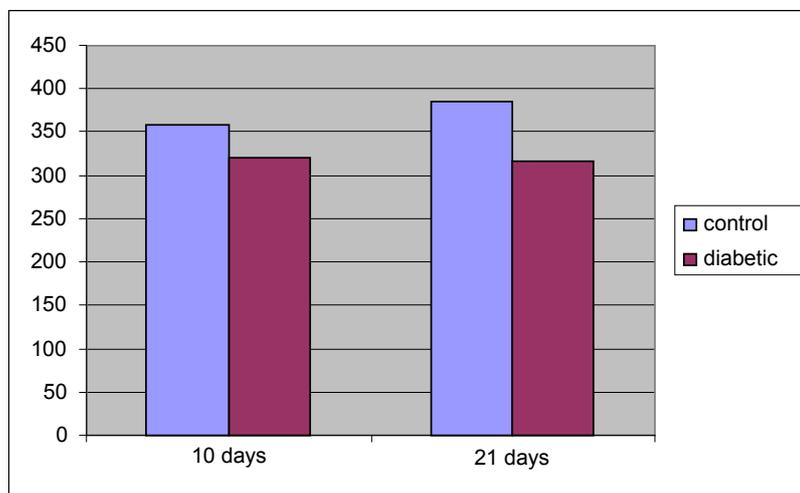


Figure 2 – Body mass of assessed animals (n=5) in relation to experimental time

Histomorphology

When induced diabetic rats were compared to non-diabetic rats, at the initial 10-day period, both apparently had the same histomorphologic status, around implants of smooth and treated surface (**Figures 3 and 4**). However, when analyzed at healing time of 21 days, the amount of neoformed bone tissue was similar, but in the induced diabetic group, that bone was more immature in relation to that of a mature aspect formed in control animals; thus there were areas of immature bone tissue associated with inflammatory infiltrate and connective tissue (**Figures 5 and 6**).

When different surfaces were compared (smooth and treated), at 10 days the smooth surface apparently favored better formation of cortical and cancellous bone around the implants (**Figures 3 and 4**). On the other hand, at 21 days there was no difference in bone neoformation between both surfaces.

However, around treated implants there was tissue necrosis that was slowly being replaced by granulation tissue and, later, by bone tissue, which favored higher interposition of connective tissue between bone and implant and lower bone neoformation close to the screw thread. In addition, an amount of inflammatory infiltrate was always present around treated surface implants (**Figures 5 and 6**).

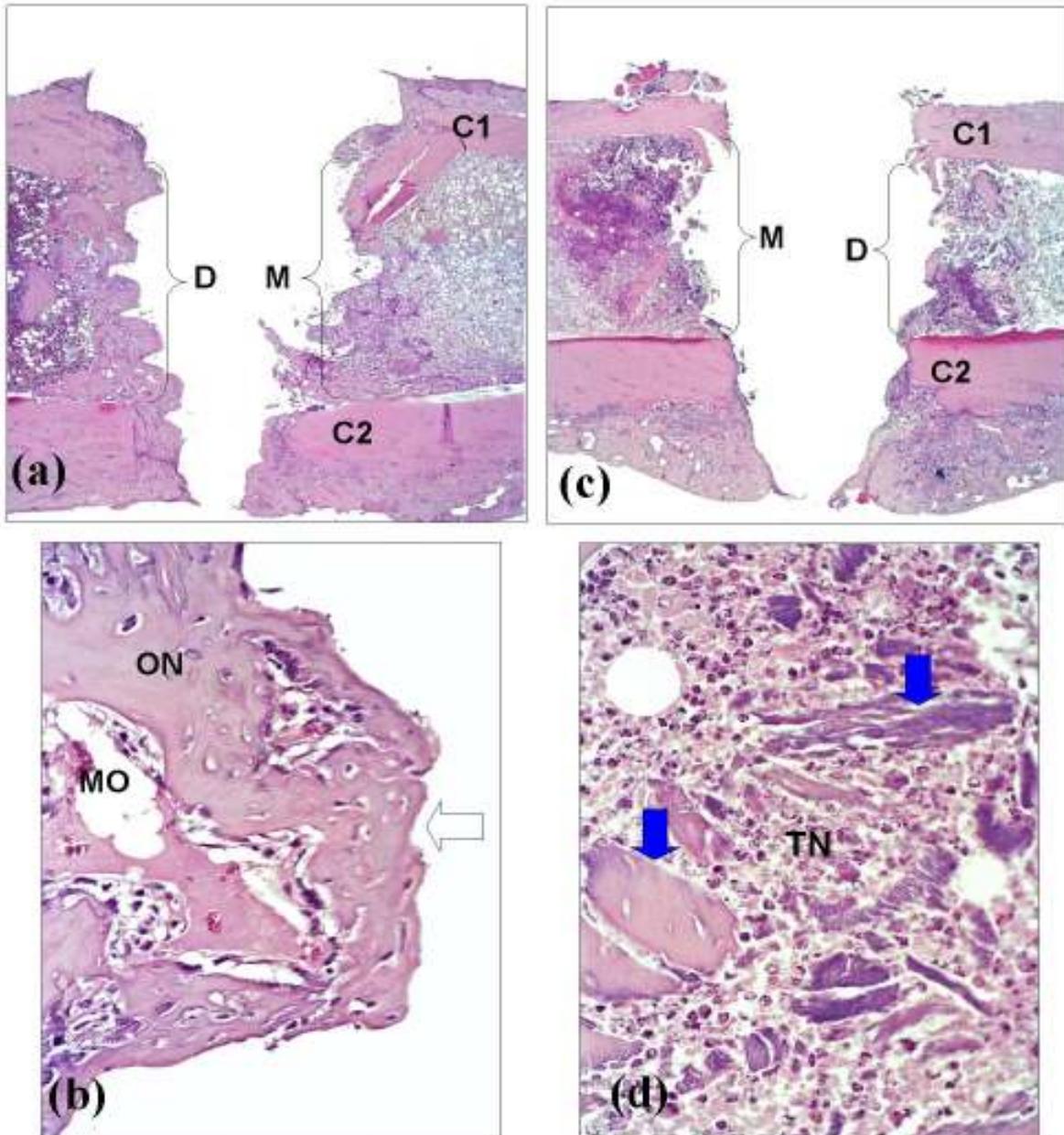


Figure 3 - Photomicrography of the femur region in the control group (10 days)

Smooth surface: a) panoramic view showing cortical facing the implant head (C1), connective tissue and rests of autogenous bone in the mesial region (M) and bone tissue in the distal region (D); b) detail of neoformed bone tissue (ON), located close to the surface of implant screw thread (white arrow), and bone marrow (MO) between trabecules.

Treated surface: c) panoramic view showing cortical facing the implant head (C1) and presence of autogenous bone and necrosed tissue both in the mesial (M) and distal surface (D); and d) detail of necrosed tissue (TN), close to the surface of implant screw thread and fragments of autogenous bone (blue arrow).
HE, magnification 4X / 40X.

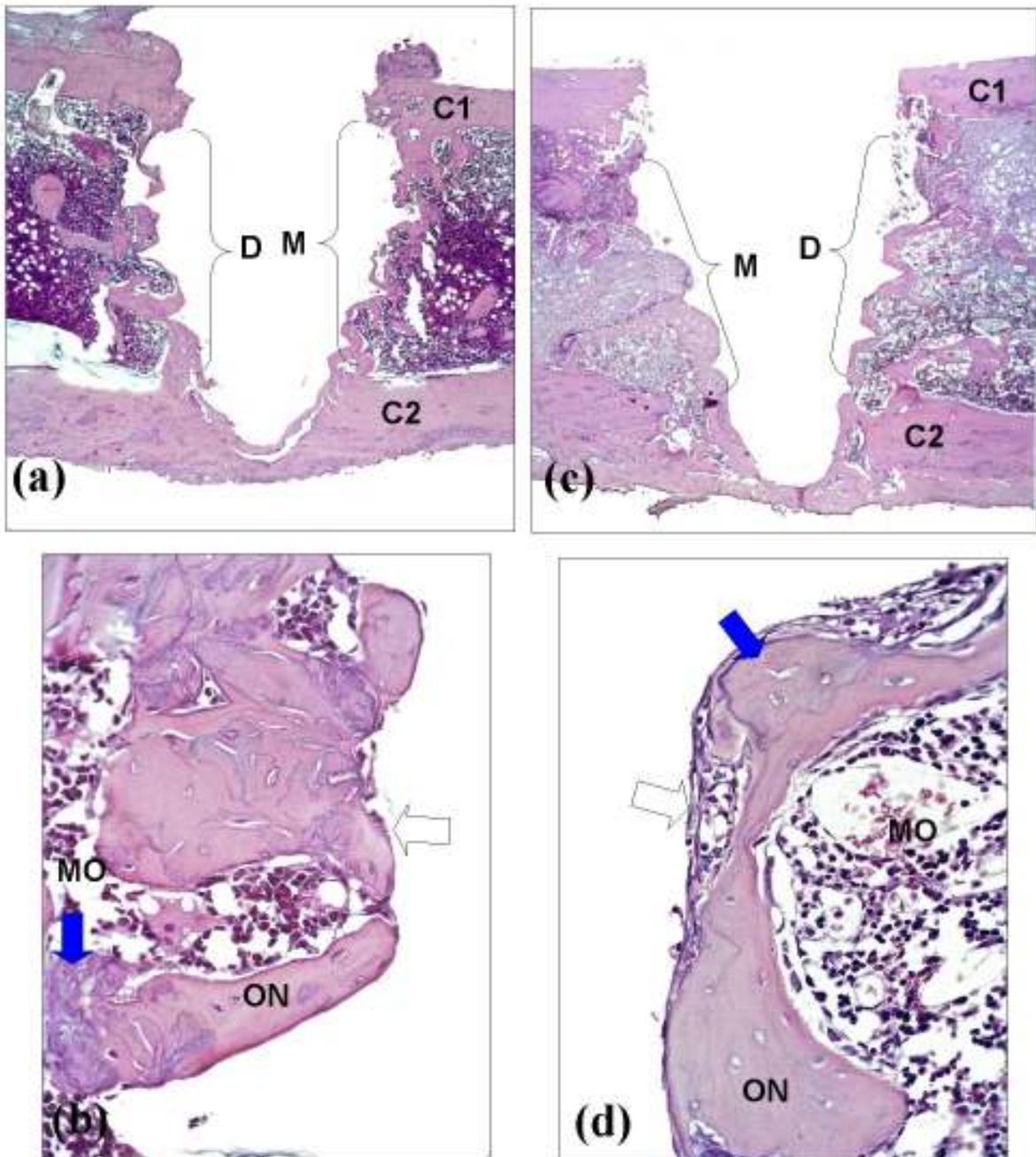


Figure 4 - Photomicrography of the femur region in the experimental group (10 days)

Smooth surface: a) panoramic view showing cortical facing the implant head (C1), mixture of connective tissue, inflammatory infiltrate and neoformed bone tissue in the distal region (D) and bone tissue in the mesial region (M); b) detail of trabecular neoformed bone tissue (ON), located close to the surface of implant screw thread (white arrow), and bone marrow (MO) between trabecules.

Treated surface: c) Panoramic view showing cortical facing the implant head (C1) and presence of autogenous bone and necrosed tissue both in the mesial (M) and distal surface (D), but with small bone neoformation in the distal region close to the cortical (C2); d) detail of connective tissue located close to the surface of implant screw thread (white arrow), bone tissue (ON) and fragments of autogenous bone (blue arrow). HE, magnification 4X / 40X.

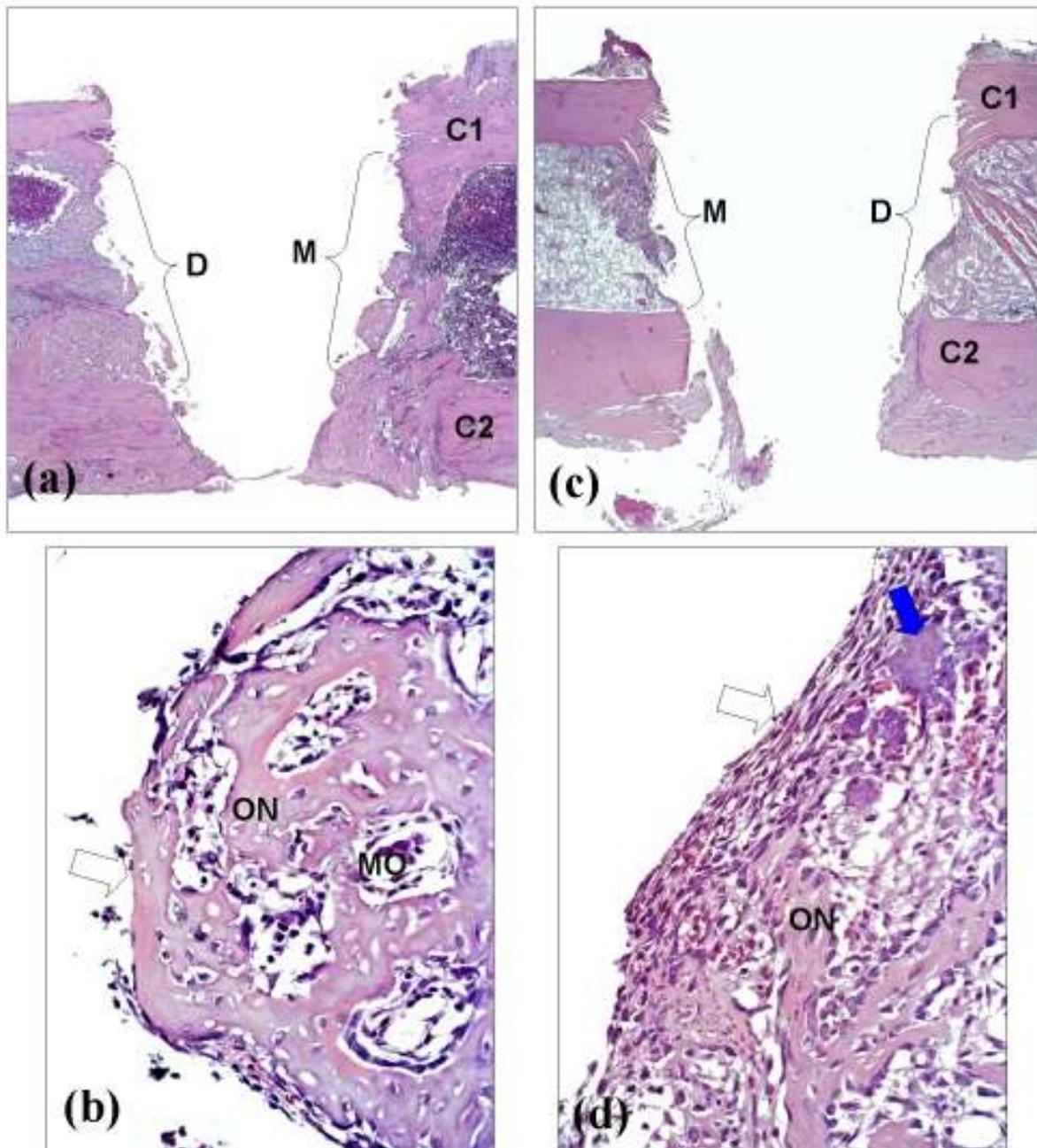


Figure 5 - Photomicrography of the femur region in the control group (21 days)

Smooth surface: a) Panoramic view showing cortical facing the implant head (C1), cortical and cancellous bone tissue in the mesial (M) and distal region (D); b) detail of the surface (white arrow) close to the implant showing more mature neofomed bone tissue (ON), with some fragments of autogenous bone (blue arrow) fixed inside it and the bone marrow (MO);

Treated surface: c) Panoramic view showing cortical facing the implant head (C1), prevalence of connective tissue in the mesial region (M) and presence of bone tissue in the distal region (D), close to the implant screw thread surface; b) detail of more mature neofomed bone tissue (ON), with some fragments of autogenous bone (blue arrow) fixed inside it, bone marrow (MO) and thin layer of connective tissue (white arrow) interposed between the implant and the neofomed bone tissue.

HE, magnification 4X / 40X.

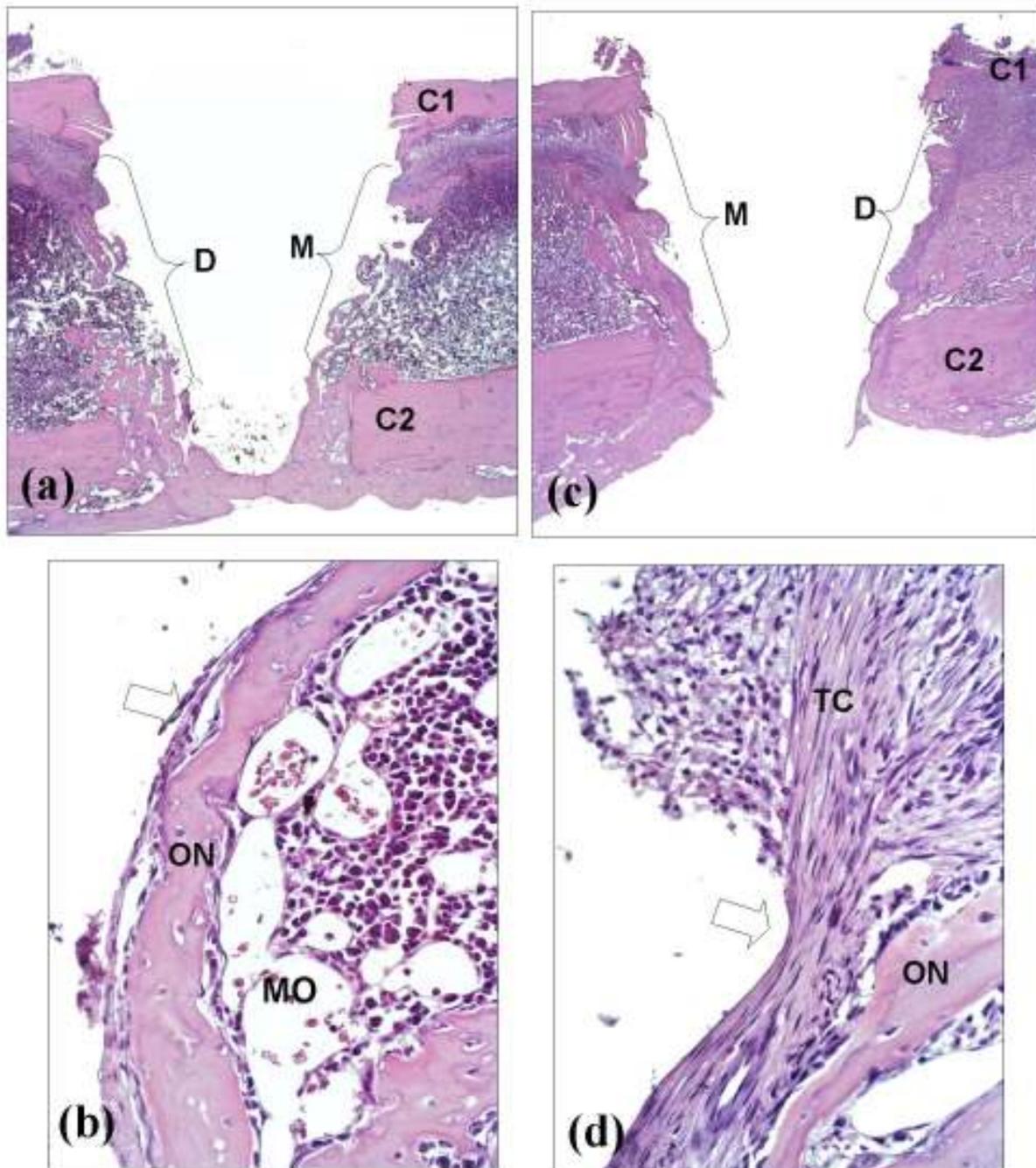


Figure 6 - Photomicrography of the femur region in the experimental group (21 days)
Smooth surface: a) Panoramic view showing presence of connective tissue, rests of autogenous bone and inflammatory infiltrate in the middle of the mesial (M) and distal surface (D), close to the cortical facing the implant head (C1) and bone and marrow neoformation close to the apical cortical (C2); b) detail of neoformed bone tissue (ON), bone marrow (MO) and thin capsule of connective tissue (white arrow) interposed between the implant and the neoformed bone tissue.
Treated surface: c) panoramic view showing presence of thick capsule of connective tissue covering the whole mesial (M) and distal (D) surface facing the implant, reabsorption of cortical C1 and neoformed bone tissue close to the apical cortical (C2); d) detail of neoformed bone tissue (ON) and thick capsule of connective tissue (TC) interposed between the implant and the neoformed bone tissue.
 HE, magnification 4X / 40X.

Histomorphometry

When comparing smooth and treated surfaces of the implants in each groups individually, we observed that 10 days after insertion of implants there was higher bone neoformation around smooth surfaces in both groups (control and induced diabetic); the amount of formed cancellous bone was significantly higher only in the control group. In the period of 21 days, bone neoformation around different types of surface was not statistically significant. However, smooth surface favored formation of cancellous bone, especially in the control group. In relation to presence of inflammatory infiltrate, there was a significantly higher amount around treated surface implants inserted in both groups and assessed during both times (Table 3).

Table 1 – Mean and Standard Deviation of percentage (%) of the structures observed between bone tissue and implant. Comparison between **different implant surfaces** in control and diabetic rats

Parameters	Control group		Significance level (P)	Experimental Group		Significance level (P)
	Smooth	Treated		Smooth	Treated	
10-day period						
Neoformed bone	23.74 ± 3.83	12.87 ± 3.51	p<0.05	20.96 ± 7.92	6.22 ± 4.95	p<0.05
Bone marrow	16.29 ± 4.91	5.34 ± 1.02	p<0.05	17.68 ± 7.65	15.58 ± 4.30	p>0.05
Necrosis/Connective Tissue	28.52 ± 9.64	30.58 ± 8.49	p>0.05	33.02 ± 4.64	26.28 ± 2.67	p>0.05
Inflammatory infiltrate	14.54 ± 4.66	31.47 ± 6.09	p<0.05	14.47 ± 11.24	31.54 ± 8.57	p<0.05
Autogenous bone	16.90 ± 3.93	21.74 ± 4.07	p>0.05	13.88 ± 4.74	20.08 ± 10.56	p>0.05
21-day period						
Neoformed bone	20.39 ± 2.48	19.44 ± 7.09	p>0.05	17.10 ± 4.77	16.88 ± 8.62	p>0.05
Bone marrow	36.02 ± 9.22	19.35 ± 1.68	p<0.05	22.93 ± 10.40	15.07 ± 6.66	p>0.05
Necrosis/Connective Tissue	18.52 ± 3.00	33.01 ± 5.96	p<0.05	26.99 ± 6.58	31.27 ± 4.99	p>0.05
Inflammatory infiltrate	6.81 ± 3.51	15.96 ± 4.46	p<0.05	19.17 ± 5.29	22.15 ± 6.96	p<0.05
Autogenous bone	18.26 ± 12.37	12.25 ± 4.75	p>0.05	13.81 ± 5.35	14.62 ± 5.55	p>0.05

Histomorphometric measures, when induced diabetic and control groups were compared, were not statistically significant for the amount of bone neoformation around implants of smooth and treated surface, assessed at healing periods of 10 and 21 days. However, as to amount of inflammatory infiltrate at 21 days, the induced diabetic group had a significantly higher amount in relation to the control group around smooth surface implants. Furthermore, when compared to the control group, amount of cancellous bone was significantly higher around treated surface implants inserted in induced diabetic rats at 10 days. For that reason, in the same area there was higher cortical bone neoformation for the control group (**12.87 ± 3.51**) in relation to the test group (**6.22 ± 4.95**), but without statistical significance (Table 2).

Table 2 – Mean and Standard Deviation of percentage (%) of the structures observed between bone tissue and implant. Comparison between different conditions (control and diabetic rats) for smooth and treated implant surfaces

Parameters	Smooth		Significance level (P)	Treated		Significance level (P)
	Control	Experimental		Control	Experimental	
10-day period						
Neoformed bone	23.74 ± 3.83	20.96 ± 7.92	p>0.05	12.87 ± 3.51	6.22 ± 4.95	p>0.05
Bone marrow	16.29 ± 4.91	17.68 ± 7.65	p>0.05	5.34 ± 1.02	15.58 ± 4.30	p<0.05
Necrosis/Connective Tissue	28.52 ± 9.64	33.02 ± 4.64	p>0.05	30.58 ± 8.49	26.28 ± 2.67	p>0.05
Inflammatory infiltrate	14.54 ± 4.66	14.47 ± 11.24	p>0.05	31.47 ± 6.09	31.54 ± 8.57	p>0.05
Autogenous bone	16.90 ± 3.93	13.88 ± 4.74	p>0.05	21.74 ± 4.07	20.08 ± 10.56	p>0.05
21-day period						
Neoformed bone	20.39 ± 2.48	17.10 ± 4.77	p>0.05	19.44 ± 7.09	16.88 ± 8.62	p>0.05
Bone marrow	36.02 ± 9.22	22.93 ± 10.40	p>0.05	19.35 ± 1.68	15.07 ± 6.66	p>0.05
Necrosis/Connective Tissue	18.52 ± 3.00	26.99 ± 6.58	p>0.05	33.01 ± 5.96	31.27 ± 4.99	p>0.05
Inflammatory infiltrate	6.81 ± 3.51	19.17 ± 5.29	p<0.05	15.96 ± 4.46	22.15 ± 6.96	p>0.05
Autogenous bone	18.26 ± 12.37	13.81 ± 5.35	p>0.05	12.25 ± 4.75	14.62 ± 5.55	p>0.05

DISCUSSION

Diabetic symptoms presented by streptozotocin-induced rats are well established (Wong 1993). In this study, diabetic rats had weight loss, whereas control rats kept gaining body mass during the experiment. These results are in accordance with other studies (Nevins et al. 1998; McCracken et al. 2000; Siqueira et al. 2003; Kwon et al. 2005).

Induction of diabetes offers an adverse systemic environment, characterized by high levels of blood glucose. That results in impaired healing that is associated with microvascular and cellular disorders (Mealey & Moritz 2003). Also, there are typical changes in bone healing, including reduction in osteogenesis, less cell renewal, neoformed bone with low mineral density and delay in healing of fractures (Canalis 1980; Glajchen et al. 1988; Yano et al. 1996; Fang 2006).

This study reports the effects of experimental diabetes on bone healing around smooth and treated surface implants. Thus, it was possible to observe that there was bone formation for both diabetic and control groups at healing periods of 10 and 21 days. Histomorphometric analysis showed differences in bone formation only between implant surfaces. Thus, the amount of neoformed bone at 10 days was significantly higher around smooth implants both in the control and induced diabetic group. In addition, inflammatory infiltrate was always present around treated implants, both in diabetic and in control animals. Therefore, such unfavorable bone neoformation found

around treated implants can be justified by large presence of inflammation, as well as for being inserted closer to the diaphysis. At 21 days, there was tissue necrosis around treated implants, which was slowly being replaced by granulation tissue and, later, by bone tissue. This justifies the similar percentage of bone tissue for both surfaces, since the primary tissue (immature) is more trabecular, less organized and more voluminous in relation to the mature cortical bone formed around smooth implants at 21 days.

In this study, despite the amount of neoformed bone around the implants not being different between control and diabetic groups, it was possible to observe that, at 21 days, maturity of bone tissue in the induced diabetic group was lower, presenting areas of immature bone associated with an intense inflammatory infiltrate and connective tissue.

Thus, high levels of inflammatory infiltrate surrounding implants in diabetic animals found in this study can be due to increased monocyte/macrophage response, present in diabetic cases, which results in a dramatic increase in production of pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor- α (TNF- α). Therefore, formation of collagen glycosylation endproducts (AGEs) plays a major role in the regulation of monocyte/macrophage lineage. Accumulation of AGEs stimulates migration of monocytes for the site and, once they reach the tissue, AGEs interact with their respective receptors in the surface of monocyte cells. That interaction results in mobilization of monocytes until the inflammation site, which induces change in monocytic phenotype, growth in cellular population and consequently significant increase in inflammatory infiltrate and in production of cytokines, resulting in more tissue destruction (Schmidt et al.1996).

Similarly to the results found in this study in relation to amount of neoformed bone not being different between control and diabetic groups and to existence of differences in bone maturation pattern, Nevins et al. 1998 by inducing diabetes in rats using streptozotocin, claimed that osseointegration occurred similarly in both groups; however, analysis by light microscopy revealed differences in bone formation pattern, since in diabetic rats the neoformed bone seemed immature and disorganized.

In studies using markers of bone deposition, with the aim of quantifying neoformed bone around implants inserted in normal and diabetic rats, bone neoformation around the implant did not show statistical difference between both groups. However, it was significant when the spinal canal was assessed (Iyama et al. 1997; Ottoni & Chopard 2004). Siqueira et al 2003, aiming to investigate the histological course and ultra-structural changes in the process of osseointegration, inserted implants in induced diabetic, non-diabetic and insulin-treated rats.

The animals were sacrificed at 10 and 21 days after the surgery. Induced diabetic rats showed a 50% reduction in formed bone area 21 days after implant insertion, with delay in the process of bone neoformation. However, there were no statistical differences between groups when assessed 10 days after the surgery. These results are very similar to those found in our study. Opposed to our observations in relation to absence of differences in amount of neoformed bone, a recent study found that the amount of neoformed bone adjacent to implants was significantly higher in diabetic rats than in control animals.

One of the justifications for that finding was that, due to healing abnormalities associated with diabetes, there was a delay in remodeling and maturation of the bone adjacent to the implant, therefore diabetic animals had higher bone volume associated with implants due to impaired healing, since osteoclastic activity and osteoblastic differentiation are inhibited (McCracken et al. 2006).

Therefore, most investigations indicate that a high level of glucose, due to insulin absence, has a negative effect on the process of bone maturation. It is known that insulin is a hormone essential not only for glucose control, but also for skeletal growth, since it acts directly or indirectly on the synthesis of bone matrix and on bone metabolism. It directly stimulates synthesis of osteoblastic matrix, and indirectly induces production of IGF-I by the organism (Canalis 1980). However, differences in bone formation pattern in this study and in those involving non-controlled diabetes can also result from interaction of endproducts of collagen glycosylation (AGEs) with implant surface.

Perhaps the presence of AGEs in the bone tissue produces a less favorable environment for bone regeneration. These molecules can competitively inhibit adhesion of bone-forming proteins to implant surface, blocking normal start of osteogenesis and causing a delay in tissue maturation (Fiorellini et al. 1999).

CONCLUSION

Despite not having any difference in amount of neoformed bone between induced diabetic rats and controls, it was possible to observe, for the healing period of 21 days, that the neoformed bone tissue was more immature in relation to that of a mature aspect formed in control animals. Thus, we can conclude that such delay in tissue maturation was probably due to induced diabetes and its implications in bone metabolism, but this does not seem to represent a definite contraindication to oral implantology. In addition, smooth surface implants, also in association with diabetes, were better inducers of bone neoformation.

REFERENCES

1. Albrektsson, T. & Wennerberg, A. (2004) Oral implant surfaces: Part 1- review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *International Journal Prosthodontic* **17**:536-43.
2. Albrektsson, T. & Wennerberg, A. (2004) Oral implant surfaces: Part 2-review focusing on clinical knowledge of different surfaces. *International Journal Prosthodontic* **17**:544-64.
3. Buser, D., Brogini, N., Wieland, M., Schenk, R.K., Denzer, A.J., Cochran, D.L., Hoffmann, B., Lussi, A. & Steinemann, S.G. (2004) Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *Journal Dental Research* **83**:529-33.
4. Butz, F., Aita, H., Wang, C.J. & Ogawa, T. (2006) Harder and stiffer bone osseointegrated to roughened titanium. *Journal Dental Research* **85**:560-5.
5. Canalis E. (1980) Effect of insulin-like growth factor I on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria. *Journal Clinical Investigation* **66**: 709–719.
6. Fang, Y., Wang, Z.Y., Mao, Y., Xin, H.T., Ren, G.L. & Fan, X.B. (2006) Effects of insulin-like growth factor I on the development of osteoblasts in hyperglycemia. *Diabetes Research Clinical Practice* **73**: 95-7.
7. Fiorellini, J.P., Nevins, M.L., Norkin, A., Weber, H.P. & Karimbux, N.Y. (1999) The effect of insulin therapy on osseointegration in a diabetic rat model. *Clinical Oral Implant Research* **10**: 362-8.
8. Glajchen, N., Epstein, S., Ismail, F., Thomas, S., Fallon, M. & Chakrabarti, S. (1988) Bone mineral metabolism in experimental diabetes mellitus: osteocalcin as a measure of bone remodeling. *Endocrinology* **123**: 290-5.
9. Hill, P.A., Tumber, A & Meikle, M.C. (1997) Multiple extracellular signals promote osteoblast survival and apoptosis. *Endocrinology* **138**: 3849-58.
10. Iyama, S., Takeshita, F., Ayukawa, Y., Kido, M.A., Suetsugu, T. & Tanaka, T.(1997) 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. *Journal of Periodontology* **68**:1169-75.
11. Kwon, P.T., Rahman, S.S., Kim, D.M., Kopman, J.A., Karimbux, N.Y. & Fiorellini, J.P. (2005) Maintenance of osseointegration utilizing insulin therapy in a diabetic rat model. *Journal of Periodontology* **76**:621-6.
 12. Lemons, J.E. (2004) Biomaterials, biomechanics, tissue healing, and immediate-function dental implants. *The Journal of Oral Implantology* **30**:318-24.
 13. Mealey, B.L. & Moritz, A. J. (2003) Hormonal influences: effects of diabetes mellitus and endogenous female sex steroid hormones on the periodontium. *Periodontology 2000* **32**: 59-81.
 14. McCracken, M., Lemons, J.E., Rahemtulla, F., Prince, C.W. & Feldman, D. (2000) Bone response to titanium alloy implants placed in diabetic rats. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **15**: 345-54.
 15. McCracken, M.S., Aponte-Wesson, R., Chavali, R. & Lemons, J.E. (2006) Bone associated with implants in diabetic and insulin-treated rats. *Clinical Oral Implants Research* **17**: 495-500.
 16. Nevins, M.L., Karimbux, N.Y., Weber, H.P., Giannobile, W.V. & Fiorellini, J.P. (1998) Wound healing around endosseous implants in experimental diabetes. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **13**:620-9.
 17. Oliver, R.C. & Ternovem, T. (1994) Diabetes- A risk factor for periodontitis in adults. *Journal Periodontology* **65**: 30-8.
 18. Ottoni, C.E.C. & CHOPARD, R.P. (2004) Histomorphometric Evaluation of New Bone Formation in Diabetic Rats Submitted to Insertion of Temporary Implants. *Brazilian Dental Journal* **15**:87-92.
 19. Schmidt, A.M., Weidman, E., Lalla, E., Yan, S.D., Hori, O., Cao, R., Brett, J.G. & Lamster, I.B. (1996) Advanced glycation endproducts (AGEs) induce oxidant

- stress in the gingiva: a potential mechanism underlying accelerated periodontal disease associated with diabetes. *Journal of Periodontal Research* **31**: 508–515.
20. Shyng, Y.C., Devlin, H. & Liang, K.O. (2006) Bone formation around immediately placed oral implants in diabetic rats. *International Journal Prosthodontic* **19**: 513-4.
21. Siqueira, J.T., Cavalher-Machado, S.C., Arana-Chavez, V.E. & Sannomiya, P. (2003) Bone formation around titanium implants in the rat tibia: role of insulin. *Implant Dentistry* **12**: 242-8.
22. Takeshita, F., Iyama, S., Ayukawa, Y., Kido, M.A., Murai, K. & Suetsugu, T. (1997) The effects of diabetes on the interface between hydroxyapatite implants and bone in rat tibia. *Journal of Periodontology* **68**: 180-5.
23. Yano, Y., Ohya, K. & Amagasa, T. (1996) Insulin enhancement of in vitro wound healing in fetal rat parietal bones. *Journal Oral Maxillofacial Surgery* **54**: 182-6.
24. Wong, K.K. & Tzeng, E.S. (1993) Appearance of different diabetic symptoms after streptozotocin administration: A comparison study. *Biochemistry and Molecular Biology International* **30**:1035-1041.

REFERÊNCIAS GERAIS

1. Abdulwassie H, Dhanrajani PJ. Diabetes mellitus and dental implants: a clinical study. *Implant Dent.* 2002; 11(1):83-6.
2. Accursi GE. Treatment outcomes with osseointegrated Branemark implants in diabetic patients: a retrospective study [thesis]. 2000; Toronto (ON): University of Toronto.
3. Adell R, Lekholm U, Rockler B, Branemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg.* 1981; 10:387-16.
4. Albrektsson T. Bone Tissue Response. In: Branemark, P.I.; Zarb, G.A.; Albrektsson, T. *Tissue-Integrated Prosthesis, osseointegration in Clinical Dentistry.* Chicago, Illinois: Quintessence; 1985.
5. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 1- review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont.* 2004; 17(5):536-43.
6. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 2-review focusing on clinical knowledge of different surfaces. *Int J Prosthodont.* 2004; 17(5):544-64.
7. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes.* 1991; 40: 405–412.

8. Brånemark PI, Breine U, Adell R, Hansson BO, Lindstrom J, Olsson A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1969; 3:81–100.
9. Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med*. 1988; 318: 1315–1321.
10. Brunette DM. The effect of surface topography on cell migration and adhesion. In: Ratner BD, editor. *Surface characterization of biomaterials*. New York: Elsevier Science Publishers B. V. 1988. p. 203-18.
11. Bucala R, Makita Z, Koschinsky T, Cerami A, Vlassara H. Lipid advanced glycosylation: pathways for lipid oxidation *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90: 6434–6438.
12. Buser D et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res*. 2004; 83(7):529-33.
13. Butz F, Aita H, Wang CJ, Ogawa T. Harder and stiffer bone osseointegrated to roughened titanium. *J Dent Res*. 2006; 85(6):560-5.
14. Canalis E. Effect of insulin-like growth factor I on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria. *J Clin Invest*. 1980; 66: 709–719.
15. Canalis E., McCarthy, T.; Centrella, M. Growth factors and cytokines in bone cell metabolism. *Ann Rev Med*. 1991; 42: 17-24,

16. Cohick WS, Clemmons DR. The insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol.* 1993; 55:131-53.
17. Davis SN, Granner, D.K. Insulin, oral agents, and the pharmacology of the endocrine pancreas. In: HARDMAN, JG; LIMBIRD, LE, editors. *Goodman & Gilman's – The Pharmacological Basis of Therapeutics.* New York: McGraw, 1996. p.1487-517.
18. Eriksson RA, Albrektosson, T. Temperature threshold levels for heat-induced bone tissue injury: a vital-microscopic study in the rabbit. *J Prosthet Dent.* 1983; 50: 101-7.
19. Fang Y, et al. Effects of insulin-like growth factor I on the development of osteoblasts in hyperglycemia. *Diab Res Clin Pract.* 2006; 73(1): 95-7.
20. Fiorellini JP et al. The effect of insulin therapy on osseointegration in a diabetic rat model. *Clin Oral Implan Res.* 1999; 10: 362-68.
21. Fiorellini J P & Nevins S M L. *Periodontol* 2000. 2000; 23:73-77.
22. Glajchen N et al. Bone mineral metabolism in experimental diabetes mellitus: osteocalcin as a measure of bone remodeling. *Endocrinology.* 1988; 123: 290-5.
23. Grizon et al. Enhanced bone integration of implants with increased surface roughness: a long term study in the sheep. *J Dent.* 2002; 30(5-6):195-203.

24. Hill PA, Reynolds JJ, Meikele, MC. Osteoblasts mediate insulin-like growth factor-I and II stimulation of osteoclast formation and function. *Endocrinology*. 1995;136:124-32.
25. Hill PA, Tumber A, Meikle M.C. Multiple extracellular signals promote osteoblast survival and apoptosis. *Endocrinology*. 1997; 138: 3849-58.
26. Iyama S. et al. 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*. 1997; 68(12):1169-75.
27. Junqueira LC & Carneiro J. *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Kooga; 1995. p.108-26.
28. Kopman JA et al. Modulating the effects of diabetes on osseointegration with aminoguanidine and doxycycline. *J Periodontol*. 2005; 76(4): 614-20.
29. Kotsovilis S, Karoussis, IK, Formousis I. A comprehensive and critical review of dental implant placement in diabetic animals and patients. *Clin Oral Impl Res*. 2006; 17: 587-99.
30. Kwon PT et al. Maintenance of osseointegration utilizing insulin therapy in a diabetic rat model. *J Periodontol*. 2005;76(4):621-6.

- 31.Lalla E et al. Hyperglycemia, glycoxidation and receptor for advanced glycation endproducts: potential mechanisms underlying diabetic complications, including diabetes-associated periodontitis. *Periodontol 2000*. 2000; 23: 50–62.
- 32.Lacefield WR. Current status of ceramic coatings for dental implants. *Implant Dent*. 1998; 7(4):315-22.
- 33.Lemons JE. Biomaterials, biomechanics, tissue healing, and immediate-function dental implants. *J Oral Implantol*. 2004; 30(5):318-24.
- 34.Lindquist LW, Carlsson GE, Jemt T. A prospective 15-year follow-up study of mandibular fixed prostheses supported by osseointegrated implants. Clinical results and marginal bone loss. *Clin Oral Implants Res*. 1996; 7: 329-36.
- 35.Listgarten M. Soft and hard tissue response to endosseous dental implants. *Anat Rec*. 1996; 245: 410-25.
- 36.Mealey BL. Diabetes mellitus. In: Rose LF, Genco RJ, Mealey BL, Cohen DW, editors. *Periodontal medicine*. Hamilton, Ontario, BC: Decker Inc; 2000. p.122–150.
- 37.Mealey BL, Moritz AJ. Hormonal influences: effects of diabetes mellitus and endogenous female sex steroid hormones on the periodontium. *Periodontol 2000*. 2003; 32: 59-81.
- 38.McCracken MS. et al. Bone response to titanium alloy implants placed in diabetic rats. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2000; 15(30): 345-54.

39. McCracken MS. et al. Bone associated with implants in diabetic and insulin-treated rats. *Clin Oral Impl Res.* 2006; 17: 495-500.
40. Molvig J et al. Endotoxin-stimulated human monocyte secretion of interleukin 1, tumor necrosis factor alpha, and prostaglandin E2 shows stable inter individual differences. *Scand J Immunol* 1988; **27**: 705–716.
41. Nevins L. M. et al. Wound healing around endosseous implants in experimental diabetes. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1998; 13(5):620-9.
42. Oliver, RC, Ternovem T. Diabetes- A risk factor for periodontitis in adults. *J Periodontol.* 1994; 65: 30-8.
43. Olson JW et al. Dental endosseous implant assessments in a type 2 diabetic population: a prospective study. *Int J Oral Maxillofac Implant.* 2000; 15(6): 811-8.
44. Otha Y. Comparative changes in microvasculature and bone during healing of implant and extractions sites. *J Oral Implantol.* 1993; 19:184-98.
45. Ottoni CEC, CHOPARD RP. Histomorphometric Evaluation of New Bone Formation in Diabetic Rats Submitted to Insertion of Temporary Implants. *Braz Dent J.* 2004; 15(2):87-92.

46. Owen WF Jr et al. Beta 2-microglobulin modified with advanced glycation end products modulates collagen synthesis by human fibroblasts. *Kidney Int* 1998; 53: 1365–1373.
47. Ramamurthy NS, Golub LM. Diabetes increases collagenase activity extracts of rat gingiva and skin. *J Periodontal Res.* 1983; 18: 23–30.
48. Sasaki T, Ramamurthy NS, Yu Z, Golub LM. Tetracycline administration increases protein (presumably procollagen) synthesis and secretion in periodontal ligament fibroblasts of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Periodontal Res.* 1992; 27: 631–639.
49. Schmidt AM 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* 1996; 31: 508–515.
50. Shyng YC, Devlin, H, Liang, KO. Bone formation around immediately placed oral implants in diabetic rats. *Int J Prosthodont.* 2006; 19(5): 513-4.
51. Siqueira JT et al. Bone formation around titanium implants in the rat tibia: role of insulin. *Implant Dent.* 2003; 12(3): 242-8.
52. Takeshita F et al. The effects of diabetes on the interface between hydroxyapatite implants and bone in rat tibia. *J Periodontol.* 1997; 68: 180-5.

53. Yano Y, Ohya K, Amagasa, T. Insulin enhancement of in vitro wound healing in fetal rat parietal bones. *J Oral Maxillofac Surg.* 1996, 54: 182-6.
54. Waynforth HB. General aspects of the administration of drugs and other substances. In: TUFFERY, A.A (editors). *Laboratory animals: An introduction for new experiments.* New York, A. Wiley: Interscience Publication; 1988. p.179-202.
55. Wong KK, Tzeng ES. Appearance of different diabetic symptoms after streptozotocin administration: A comparison study. *Biochem Mol Biol Int.* 1993; 30:1035-1041.