

EVANICE MENEZES MARÇAL VIEIRA

**REPARAÇÃO ÓSSEA NA CRANIOPLASTIA EM
COELHOS DIABÉTICOS INDUZIDOS POR ALOXANO:
análise da densidade óptica e histomorfométrica**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Biopatologia Bucal.

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

EVANICE MENEZES MARÇAL VIEIRA

**REPARAÇÃO ÓSSEA NA CRANIOPLASTIA EM
COELHOS DIABÉTICOS INDUZIDOS POR ALOXANO:**

análise da densidade óptica e histomorfométrica

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Biopatologia Bucal.

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Fernandes Gomes

**São José dos Campos
2005**

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:

BELLINI, A. B; SILVA, E. A. **Manual para elaboração de monografias: estrutura do trabalho científico.** São José dos Campos: FOSJC/UNESP, 2002. 82p.

VIEIRA, E.M.M. **Reparação óssea na cranioplastia em coelhos diabéticos induzidos por aloxano: análise da densidade óptica e histomorfométrica.** 2005. 107f. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal, Área Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos.

DEDICATÓRIA

Ao meu magnífico **Pai Celestial (DEUS)**, que, durante a execução deste trabalho, bondosamente ouviu as minhas súplicas, alimentando os meus sonhos e renovando dia após dia as minhas forças.

Ao meu inesquecível pai **Antonio** (*in memoriam*), exemplo de fé e fortaleza, cujas preces dirigidas a Deus em prol de minha vida têm me alcançado até os dias atuais, fazendo-me assim, mais uma vez, vencedora nesta grande batalha.

A minha mãe **Maria**, doce mulher, cuja grandeza está em olhar para as adversidades da vida, e ainda assim, sorrir, contagiando a todos que estão ao seu redor. Obrigada mãe querida, porque este exemplo de fé, eu pude exercitar nos momentos difíceis desta pesquisa.

Ao meu amado **Marco Antonio**, companheiro, marido e pai exemplar, co-responsável pela conclusão final deste trabalho, cujo apoio incondicional e constante extrapolou as minhas expectativas, doando o máximo de si, para a realização deste sonho.

Ao meu querido filho **João Vitor**, de apenas seis anos, pela paciente espera de meus rápidos retornos e em cujos olhos de ternura eu via a necessidade da conclusão deste trabalho.

A vocês dedico este trabalho e todo o meu amor.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora e amiga Profa. Dra. **Mônica Fernandes Gomes**, da Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos, UNESP, pela ajuda profissional na execução deste trabalho. Minha imensurável admiração pela mulher que busca idealização de seus sonhos, ainda que aos olhos humanos pareça ser impossível. Com ela, reforçou dentro de mim a certeza de que para Deus nada é impossível.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de São José dos Campos- UNESP na pessoa do Diretor Prof. Adj. **Paulo Villela Santos Júnior**, pela oportunidade de realização do curso de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal.

À Profa. Dra. **Rosilene Fernandes da Rocha**, Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP, pela calorosa receptividade.

Aos **professores e funcionários** do Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, pela riqueza de conhecimento transmitido durante a minha permanência no curso; meu respeito, admiração e sinceros agradecimentos.

A todas as **funcionárias da Biblioteca**, pelo carinho e competência no atendimento, minha gratidão.

Aos Diretores dos cursos da Universidade de Cuiabá-UNIC-MT: **Air de Carvalho** (Odontologia), **José Claudio Perecin** (Fisioterapia), **Maria Yolanda e Silva** (Enfermagem), **Ilza Martha de Souza** (Farmácia) e Coordenadora do ciclo básico **Ângela Maria Nolasco Monteiro** pela oportunidade e confiança a mim depositada, proporcionando condições para a realização deste trabalho.

A todos os meus irmãos, em especial, ao **Eduardo Pereira Menezes**, que no auge de sua juventude, prontamente se dispôs a ajudar-me, cuidando de algo precioso para mim, *meu filho*. Minha eterna e imensurável gratidão.

Aos colegas de trabalho, da disciplina de Patologia Geral e Bucodental da UNIC-MT, **Artur Aburad de Carvalhosa** e **Renata Tucci**, pelo apoio e amizade sempre presente, propiciando assim a conclusão desta dissertação.

Aos meus amados **alunos da graduação** (UNIC-MT), dos diferentes cursos, pelo respeito, carinho e por compreenderem a importância da qualificação docente, visando o avanço técnico-científico na formação acadêmica.

Ao Doutor **Roberto Honório Correa**, Diretor de qualidade e assuntos regulatórios da Johnson & Johnson, São José dos Campos, pela sua atenção, apoio e apreço de nossa pesquisa.

À Doutora **Maria das Graças Vilela Goulart**, do Centro de Biotecnologias Aplicado a Pacientes com Necessidades Especiais (CEBAPE) da Faculdade de São José dos Campos – UNESP, pela sua atenção e cuidado na realização e interpretação estatística dos resultados obtidos.

Às minhas companheiras de pesquisa **Éfani Caroline de F. Banzi** e **Maria Fernanda S. S. Destro** (Iniciação Científica-Unesp), pelo carinho, perseverança e constante dedicação, para juntas vencermos os obstáculos, chegando finalmente à conclusão deste trabalho.

Ao funcionário **Walter Cruz**, da Disciplina de Histologia da Faculdade de São José dos Campos – UNESP, por todo cuidado e atenção durante o preparo das peças para análise histológica.

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de São José dos Campos – UNESP, **Lorival Jacobs, Antônio Domingos Sávio Barbosa Maia Vasconcelos e Valdir Marques**, pela ajuda concedida durante os procedimentos operatórios realizados no Biotério.

À Sra. **Ângela de Brito Bellini**, Diretora dos Serviços de Biblioteca e Documentação, pela orientação e revisão das normas de apresentação deste trabalho.

À secretária **Sílvia Scarpel**, pelos serviços prestados na finalização desta dissertação.

Aos demais funcionários da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, pela ajuda e atenção a mim dispensada.

Às colegas **Kecymilla Sayuri Koga e Camila Satie Ferreira Ueno**, pela ajuda na execução da parte prática do experimento.

À mestranda **Aline Rose Morosolli** da Área de Radiologia Odontológica do Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal da Faculdade de São José dos Campos – UNESP, pela sua dedicação e auxílio nesta pesquisa.

Às colegas do mestrado **Francine Cristina da Silva e Cristina Werkman** e, em especial, a minha amiga **Patrícia Campos Fontes**, pelo convívio amigável durante o curso, compartilhando sonhos, anseios e conquistas.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À **UNIC - Universidade de Cuiabá** – MT por permitir a liberação parcial de minhas atividades acadêmicas, visando a minha capacitação docente e o crescimento científico da instituição.

À **Johnson & Johnson** pela doação de materiais básicos imprescindíveis para a execução deste trabalho.

Ao **CEBAPE** – Centro de Biociências Aplicado a Pacientes com Necessidades Especiais-CEBAPE da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” por fornecer espaço e equipamentos necessários para a execução desta pesquisa.

Ao **Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal** da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, por permitir a execução da parte prática deste experimento.

Ao **Departamento de Cirurgia, Periodontia e Radiologia** da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, por disponibilizar equipamentos necessários para a obtenção das imagens radiográficas.

Ao **Biotério** da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, pelo fornecimento e cuidado com os animais experimentais utilizados nesse estudo.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE QUADROS.....	15
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	16
RESUMO	18
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Diabete melito: conceito, histórico, classificação	21
2.1.1 Diabete melito em humanos	25
2.1.2 Diabete melito em animais experimentais.....	27
2.2 Metabolismo ósseo	35
2.3 Regeneração óssea guiada	36
3 PROPOSIÇÃO	43
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1 Material	44
4.1.1 Animais	44
4.1.2 Material utilizado para a indução e controle do Diabete	45
4.1.3 Barreira de politetrafluoretileno	46
4.1.4 Material cirúrgico	46
4.1.5 Reagentes, compostos e soluções	47
4.2 Métodos.....	48
4.2.1 Indução e controle do Diabete	48
4.2.2 Mensuração da glicemia	49
4.2.3 Confecção dos defeitos ósseos cirúrgicos	50
4.2.4 Períodos de observação	53
4.2.5 Análise radiográfica	53
4.2.5.1 Obtenção das imagens radiográficas digitais	54
4.2.5.2 Análise da densidade óptica	55
4.2.6 Análise estatística	55

4.2.7 Análise microscópica	55
4.2.7.1 Preparação dos espécimes para a microscopia de luz	55
4.2.7.2 Análise estatística da histomorfometria.....	55
5 RESULTADOS	58
5.1 Efeitos adversos do aloxano	58
5.2 Complicações gerais e bucais dos animais diabéticos	59
5.3 Análise radiográfica	63
5.3.1 Aspectos radiográficos.....	63
5.3.1.1 Período de 15 dias	63
5.3.1.2 Período de trinta dias	65
5.3.1.3 Período de sessenta dias	66
5.3.1.4 Período de noventa dias	67
5.3.2 Análise estatística da densidade óptica	68
5.4 Análise microscópica	72
5.4.1 Aspectos microscópicos.....	72
5.4.1.1 Período de 15 dias	72
5.4.1.2 Período de trinta dias	75
5.4.1.3 Período de sessenta dias	78
5.4.1.4 Período de noventa dias	80
5.5 Análise estatística da histomorfometria.....	82
6 DISCUSSÃO	88
7 CONCLUSÕES	95
8 REFERÊNCIAS	96
ANEXO	105
APÊNDICE A.....	106
<i>ABSTRACT</i>	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A = anterior

ADA = American Diabetes Association

AGEs = do inglês “*Advanced Glycolization Endproducts*”, traduzido como produto final da glicosilação avançada

ANOVA = Análise de Variância

C = controle

D = Diabético

dff = distância foco-filme

DM = Diabete melito

DM2 = Diabete melito tipo 2

D-DPTE = Diabético com Politetrafluoretileno

IDDM = Diabete melito insulino dependente

NIDDM = Diabete melito não insulino dependente

HE = hematoxilina e eosina

Kg = kilograma

L = lateral

M = medial

Mg/dL = miligrama por decilitro

Mg/Kg = miligrama por kilograma

ml = mililitro

mm = milímetro

NaCl = cloreto de sódio

NDDG = do inglês “*National Diabetes Data Group*”, traduzido como grupo nacional de dados de diabete.

P = posterior

p = número total de pontos

P_i = ponto do retículo

PTFE = politetrafluoretileno

PTFE-e = politetrafluoretileno expandido

RED = roedores espontaneamente diabéticos

REDi = roedores espontaneamente diabéticos imediatos

RIDCD = roedores induzidos cirurgicamente ao diabete

RIGD = roedores induzidos quimicamente ao diabete

ROG = regeneração óssea guiada

TA = terço Anterior

TM = terço Médio

TP = terço Posterior

U = unidade

% = porcentagem

α = nível de significância

β = células β das ilhotas de Langerhans

σ = desvio padrão

σ^2 = variância

μm = micrômetro

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Desenho esquemático dos grupos de estudo: a) controle-normal; b) defeito ósseo em coelhos diabéticos sem barreira de politetrafluoretileno; c) defeito ósseo em coelhos diabéticos com barreira de politetrafluoretileno.....	45
FIGURA 2 -	Drogas utilizadas para indução do diabetes e controle da glicemia: a) Aloxano monohidratado – droga hiperglicêmica; b) Insulina NPH/U-100 e insulina R/U-100 para controlar a hiperglicemia entre 200mg/dL e 350 mg/dL.....	46
FIGURA 3 -	Indução do diabetes: a) introdução do escalpe na veia auricular marginal em orelha depilada e asséptica; b) presença de sangue no interior do escalpe, confirmando que se encontra no interior da veia; c) infusão do aloxano (90mg/ml) na veia auricular; d) aspecto clínico após a infusão.....	49
FIGURA 4-	Mensuração da glicemia: a) perfuração da veia marginal da orelha do animal experimental; b) e c) obtenção do sangue periférico fora e no interior da tira teste; d) mensuração da glicemia com o auxílio de um monitor.....	50
FIGURA 5-	Procedimentos cirúrgicos: a) divulsão muscular plano a plano; b) ossos parietais expostos; c) confecção dos defeitos ósseos; d) e e) barreira de PTFE no assoalho e na superfície do defeito; f) reposicionamento do perióstio.....	52
FIGURA 6-	Desenho esquemático da vista superior do crânio do coelho.....	53
FIGURA 7-	Representação esquemática das tomadas radiográficas pelo Sistema Visualix Gx-S-HDI.....	54

FIGURA 8-	Representação esquemática da análise histomorfométrica.....	57
FIGURA 9-	Fotomicrografias de pâncreas: a) pâncreas de aspecto normal com presença de células acinosas exibindo extensa basofilia citoplasmática na porção basal do citoplasma, com numerosas vesículas secretoras apicais (setas) e agregado esferoidal de células endócrinas poligonais e claras, denominado de ilhota endócrina de Langerhans (L); b) pâncreas de coelhos diabéticos mostrando células acinares atípicas, moderada quantidade de vesículas secretoras e atrofia de ilhota de Langerhans exibindo células endócrinas pequenas em degeneração (setas), aumento original: 200X e 100X. Coloração: HE.....	59
FIGURA 10-	Lesão ulcerativa com extensa área de necrose superficial na pata posterior do coelho diabético.....	60
FIGURA 11-	Complicação da doença: a) lesão ulcerativa e descamativa, com prurido, na região submandibular, estendendo-se para o pescoço e tronco; b) 15 dias após o tratamento preconizado com associação de valerato de betametasona, sulfato de gentamicina, tolnaftato e clioquinol.....	61
FIGURA 12-	Abscesso na região do osso parietal: a) aumento volumétrico com restos necróticos sobre o defeito; b) saída de secreção purulenta; c) assepsia e drenagem; d) aplicação tópica da eritromicina gel 4%; e) e f) curativo.....	62
FIGURA 13-	Gengivite crônica na região de incisivos centrais inferiores.....	63
FIGURA 14-	Imagens radiográficas digitais dos defeitos ósseos cirúrgicos no osso parietal de coelho no período de quinze dias: a) controle; b) diabético exibindo áreas radiopacas justapostas às paredes do defeito (seta tracejada); c) diabético-PTFE mostrando áreas radiopacas extensas e homogêneas (seta contínua).....	64

FIGURA 15-	Imagens radiográficas digitais dos defeitos ósseos cirúrgicos no osso parietal de coelho no período de trinta dias: a) controle exibindo imagens radiolúcidas próximas às paredes do defeito (setas tracejadas); b) diabético; c) diabético-PTFE mostrando imagem radiopaca semelhante ao tecido ósseo normal (seta contínua).....	65
FIGURA 16-	Imagens radiográficas digitais dos defeitos ósseos cirúrgicos no osso parietal de coelho no período de sessenta dias: a) controle; b) diabético; c) diabético-PTFE.....	66
FIGURA 17-	Imagens radiográficas digitais dos defeitos ósseos cirúrgicos no osso parietal de coelho no período de noventa dias: a) controle; b) diabético; c) diabético-PTFE.....	68
FIGURA 18-	Comparação das médias de densidade óptica de formação de tecido ósseo nos defeitos cirúrgicos dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético +PTFE (D-PTFE).....	70
FIGURA 19-	Evolução das médias de densidade óptica de formação de tecido ósseo nos defeitos cirúrgicos dos períodos de observação dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético + PTFE (D-PTFE)....	71
FIGURA 20-	Fotomicrografias dos limites da região do defeito ósseo no período de 15 dias (setas): a) controle-normal, b) diabético e diabético+PTFE. H.E., aumento original: 50X.....	74
FIGURA 21-	Fotomicrografias dos limites da região do defeito ósseo no período de trinta dias (setas): a) controle-normal, b) diabético e diabético+PTFE. H.E., aumento original: 50X.....	77
FIGURA 22-	Fotomicrografias dos limites da região do defeito ósseo no período de sessenta dias (setas): a) controle-normal; b) diabético; c) diabético+PTFE. H.E., aumento original: 50X.....	79

FIGURA 23-	Fotomicrografias dos limites da região do defeito ósseo no período de noventa dias (setas): a) controle-normal; b) diabético e diabético+PTFE. H.E., aumento original: 50X.....	81
FIGURA 24-	Comparação das médias de densidade de volume de matriz óssea neoformada nos defeitos cirúrgicos dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético-PTFE (D-PTFE).....	85
FIGURA 25-	Evolução das médias de densidade de volume de matriz óssea neoformada nos períodos de observação dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético-PTFE (D-PTFE)	86

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Classificação do diabetes (NDDG/OMS).....	24
Quadro 2	Classificação etiológica para o Diabete melito.....	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Valores das médias e desvio padrão das densidades ópticas dos grupos estudados nos diferentes períodos.....	69
Tabela 2 - Análise da variância (ANOVA) entre os grupos controle, diabético e diabético-PTFE, nos diferentes períodos observados.....	72
Tabela 3- Valores das médias e desvio padrão da histomorfometria dos grupos estudados nos diferentes períodos.....	82
Tabela 4 - Média das densidades de volume de matriz óssea observada durante o processo de reparo no grupo controle	83
Tabela 5- Média das densidades de volume de matriz óssea observada durante o processo de reparo no grupo diabético.....	83
Tabela 6- Média das densidades de volume de matriz óssea observada durante o processo de reparo no grupo diabético-PTFE.....	84
Tabela 7- Análise da variância (ANOVA) entre os grupos controle (C), diabético (D) e diabético-PTFE (D-PTFE).	87

VIEIRA, E.M.M. **Reparação óssea na cranioplastia em coelhos diabéticos induzidos por aloxano**: análise da densidade óptica e histomorfométrica. 2005. 107f. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal, Área Biopatologia Bucal) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos.

RESUMO

Diabete Melito consiste em um distúrbio metabólico que se caracteriza pela alteração do metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas, devido à ausência de insulina, hormônio produzido pelas células betas pancreáticas, ou à sua incapacidade de agir na transferência de glicose do plasma para o citoplasma da célula. O presente trabalho visa avaliar a dinâmica de processo de reparação em defeitos ósseos cirúrgicos confeccionados no osso parietal de coelhos diabéticos, associada ou não à regeneração óssea guiada com o uso de barreira oclusiva (barreira de politetrafluoretileno-PTFE) e também investigar a presença e os tipos de complicações clínicas encontradas nestes animais durante o experimento. Nesta pesquisa, foram empregados 18 coelhos adultos, com peso corpóreo médio entre 3,5 a 4,5 Kg, e divididos em três grupos: grupo C (controle – defeito ósseo em coelhos sadios), grupo D (defeito ósseo em coelhos diabéticos sem barreira de politetrafluoretileno) e grupo D-PTFE (defeito ósseo em coelhos diabéticos com barreira de politetrafluoretileno). Após a confecção do defeito ósseo, no grupo D-PTFE, a barreira de politetrafluoretileno foi colocada na superfície e no assoalho da loja cirúrgica e a cavidade foi preenchida pelo coágulo sanguíneo. Nos grupos D e C, o defeito ósseo foi apenas preenchido por coágulo sanguíneo. Decorridos 15, trinta, sessenta e noventa dias, três coelhos de cada grupo foram sacrificados. As peças contendo os defeitos ósseos foram removidas em bloco, fixadas em formol a 10% e submetidas às análises radiográfica, microscópica e estatística da densidade óptica e histomorfometria. Os resultados obtidos possibilitaram concluir que o processo de reparo ósseo foi mais lento no grupo D quando comparado com os grupos C e D-PTFE. Na análise estatística da histomorfometria, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos C e D-PTFE. O aloxano monoidratado, na concentração de 90mg/kg, mostrou-se eficiente na indução do Diabete melito em coelhos.

PALAVRAS-CHAVE: Osso, reparação, Diabete melito; aloxano.

INTRODUÇÃO

Diabete melito é um distúrbio metabólico complexo e primário dos carboidratos, envolve ainda lipídeos e proteínas. Este distúrbio é caracterizado pela presença de poucas ou ausência de células β funcionais nas ilhotas de Langerhans, assim como pela redução substancial ou inexistência da secreção de insulina (GUYTON & HALL²⁶ 2002; RUBIN & FABER⁴⁹, 2002; BRASILEIRO FILHO⁶, 2004).

Animais experimentais têm sido utilizados para o estudo deste distúrbio, com a indução do diabete por meio de substâncias químicas, tais como estreptozotocina e aloxano (COLEN et al.¹⁰, 1997; ALKAN et al.², 2002; EL-HAKIM¹⁶, 1999; HOUG et al.²⁹, 1981; MOOR⁴², 1953; LERCO et al.³², 2003; SIMOPOULOS et al.⁵⁶, 2001). De acordo com a literatura, o aloxano tem sido freqüentemente utilizado em coelhos, atuando na destruição das células betas pancreáticas e promovendo a desorganização do parênquima do órgão.

Atualmente, intervenções cirúrgicas no complexo buco-maxilo-facial dos pacientes diabéticos têm sido alvo de preocupação para algumas especialidades odontológicas, uma vez que podem apresentar diversas complicações durante o processo de reparação óssea (KAYATH et al.³⁰, 1998). Esse fato ocorreria devido a uma função deficiente dos osteoblastos (RICO et al.⁴⁷, 1989), diminuição na produção de colágeno e/ou alterações no metabolismo mineral (HOUGH et al.²⁹, 1981).

Vários tipos de materiais têm sido testados como barreira física e podem ser divididos em produtos não-absorvíveis, como as membranas de politetrafluoretileno (PTFE), poliuretana, acetato-celulose, e materiais absorvíveis, como o colágeno, ácido polilático, poligalactina 910, sulfato de cálcio (SCHLIEPHAKE⁵², 2000).

Pré-requisitos ideais de uma barreira incluem biocompatibilidade, oclusividade celular, integração tecidual, resistência à pressão dos tecidos e facilidade de manuseio (SIMION et al.⁵⁵, 1998). A barreira não-absorvível de PTFE parece preencher estas necessidades, mostrando efetividade no tratamento de vários tamanhos de defeitos ósseos cirúrgicos (MACEDO et al.³⁷, 1993; DAHLIN et al.¹⁴, 1994; GOMES et al.²¹, 2002; MACEDO et al.³⁸, 2003). Entretanto, tem sido reconhecido que o uso de barreiras não-absorvíveis está limitado pela necessidade de um segundo tempo cirúrgico para sua remoção. Em contrapartida, algumas barreiras absorvíveis podem falhar na manutenção do espaço ou no tempo de permanência necessário para haver formação óssea. A remoção precoce das barreiras resulta em formação óssea reduzida e preenchimento ósseo incompleto. Assim sendo, longevidade e habilidade de manutenção do espaço são os maiores desafios das membranas absorvíveis na ROG (BECKER et al.⁶, 1994).

Atualmente, a barreira de politetrafluoretileno (PTFE) tem sido utilizada com êxito em estudos experimentais e clínicos, uma vez que por não apresentar porosidade, dificulta a colonização bacteriana permitindo a sua exposição ao meio bucal, além de apresentar biocompatibilidade, baixo custo e fácil manipulação (MACEDO et al.³⁷, 1993; GOMES et al.²¹, 2002; MACEDO et al.³⁸, 2003).

Diante do exposto, o presente trabalho tem por objetivo estabelecer uma metodologia para obtenção de coelhos diabéticos, induzidos por aloxano, bem como avaliar o processo dinâmico da reparação óssea em defeitos cirúrgicos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Diabetes melito: conceito, histórico, classificação

Diabete melito (DM) é um grupo de alterações metabólicas, heterogêneas, com etiologias diversas, apresentando perturbação crônica no metabolismo dos carboidratos, gorduras e proteínas (COTRAN et al.¹³, 2000; GUYTON & HALL²⁶, 2002). Este distúrbio é caracterizado por hiperglicemia que resulta de uma deficiente secreção de insulina pelas células β , resistência periférica à ação de insulina, ou ambas (VILAR et al.⁶¹, 2003).

O efeito básico da ausência de insulina, ou da resistência ao hormônio, sobre o metabolismo da glicose consiste em impedir sua captação e utilização eficiente pela maioria das células do corpo, à exceção das células do cérebro. Como consequência, o nível da glicemia aumenta, a utilização da glicose pelas células fica cada vez menor, enquanto a utilização das gorduras e das proteínas aumenta (GUYTON & HALL²⁶, 2002).

A evolução e o prognóstico do DM estão relacionados a quadro metabólico; lesões em outros órgãos, sobretudo as vasculares e aumento da susceptibilidade às infecções. São causas freqüentes de óbito: infarto do miocárdio, acidentes vasculares cerebrais, insuficiência renal, gangrena dos membros inferiores e infecções (BRASILEIRO FILHO⁶, 2004). Outras alterações relevantes também podem estar presentes como, microangiopatia, nefropatia, retinopatia, neuropatia e tendência ao desenvolvimento de aterosclerose (COTRAN et al.¹³, 2000; GUYTON & HALL²⁶, 2002).

A hiperglicemia prolongada é considerada a responsável pelas complicações crônicas em pacientes diabéticos. Os níveis de glicose sanguínea persistentemente elevados são tóxicos ao organismo, através de três mecanismos diferentes: mediante a promoção da glicação de proteínas, através da hiperosmolaridade e por meio do aumento dos níveis de sorbitol dentro da célula (CHACRA et al.⁸, 2003; COSTA & BETTI¹², 2003).

A automonitoração da glicose sanguínea fornece informação útil para o controle diário do diabetes. Entretanto, estes testes não são capazes de fornecer ao paciente e a equipe de atendimento de saúde uma avaliação quantitativa e confiável da glicemia durante um período de tempo prolongado. A hemoglobina glicada (A1c) é formada através de uma reação irreversível entre a glicose sanguínea e a hemoglobina, como resultado do processo de glicação. O exame de A1c demonstrou-se capaz de prognosticar o risco de desenvolvimento de muitas das complicações crônicas do diabetes, do mesmo modo que as determinações do colesterol podem predizer o risco da doença cardiovascular (SACKS et al.⁵⁰, 2002; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION³, 2003).

O DM constitui-se um dos mais sérios problemas de saúde pública na atualidade, tanto em termos de números de pessoas afetadas, morbidade, mortalidade prematura, como dos custos envolvidos no seu controle e no tratamento de suas complicações. Consideravelmente tem sido apontada como causa de morbidade e mortalidade em faixas etárias diferentes. Além disso, a prevalência mundial da doença tem tido um crescimento com proporções epidêmicas. Atualmente existem cerca de cento e vinte milhões de diabéticos no planeta, e estima-se que no ano de 2025 serão aproximadamente trezentos milhões (TORQUATO et al.⁵⁸, 2003; VILAR et al.⁶¹, 2003).

O estado catabólico, com aumento da mobilização lipídica e degradação protéica, associada às perdas hidreletrolíticas, determina o

emagrecimento do indivíduo, proporcional à deficiência insulínica presente. Nos casos mais graves, podem ocorrer cetoacidose, desidratação, cetoacidose ou coma hiperosmolar (SCHMIDT et al.⁵³,1994).

No ser humano, os níveis glicêmicos (glicemia de jejum) aceitos como normais oscilam entre 80mg/dL e 90mg/dL (GUYTON & HALL²⁶, 2002). Indivíduos com valores iguais ou superiores a 140mg/dL são considerados diabéticos.

Atualmente de acordo com a National Diabetes Data Group (NDDG), o DM pode ser classificado como primário ou secundário (Quadro 1). O DM primário engloba 97-98% dos pacientes, podendo ser dividido, de acordo com a dependência de insulina exógena, em insulino-dependente (IDDM), ou tipo I, e não insulino-dependente (NIDDM), ou tipo II, que é o tipo mais comum. O DM secundário corresponde de 2% a 3% do total de casos, e está relacionado com os casos decorrentes de agentes ou doenças identificáveis que predispõem à hiperglicemia por levarem á secreção deficiente de insulina ou defeitos na sua ação periférica (VILAR et al.⁶¹, 2003).

Em 2000, a Associação Americana de Diabetes (ADA) propôs uma nova classificação, baseando-se na etiologia do DM, e não na sua forma de tratamento (Quadro 2).

Quadro 1- Classificação do diabetes (NDDG/OMS)*

Primário
<ul style="list-style-type: none"> - Diabetes melito insulino-dependente (IDDM) ou tipo I - Diabetes melito não insulino-dependente (NIDDM) ou tipo II <ul style="list-style-type: none"> Obesos (80%) Não obesos (20%) MODY
Secundário
<ul style="list-style-type: none"> -Doenças pancreáticas (pancreatite aguda e crônica, câncer hemocromatose, etc.), pancreatectomia - Distúrbios endócrinos (acromegalia, tirotoxicose, síndrome de Cushing, glucagonoma, somatostatina, feocromocitoma, etc.) - Gestação (Diabetes gestacional) - Medicamentos (glicocorticóides, diuréticos, betabloqueadores, hidantal, anticoncepcionais, etc.) - Anormalidades dos receptores insulínicos - Síndromes genéticas - Diabetes relacionados a desnutrição, etc.

Quadro 2- Classificação etiológica para o Diabetes melito*

<p>Diabetes tipo 1 (destruição das células β, usualmente levando à deficiência absoluta de insulina)</p> <ul style="list-style-type: none"> Auto-imune Idiopático
<p>Diabetes tipo 2 (pode variar de predominância de resistência insulínica com relativa deficiência de insulina à predominância de um defeito secretório das células β associado á resistência insulínica).</p> <ul style="list-style-type: none"> Outros tipos específicos Defeitos genéticos da função da célula β Defeitos genéticos na ação da insulina Doenças do pâncreas exócrino Endocrinopatias Induzida por medicamentos ou produtos químicos Infecções Outras síndromes genéticas às vezes associadas ao diabetes Diabetes mellitus gestacional

* VILAR, L. et al. **Endocrinologia clínica**. 2.ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2003. p. 511-23.

2.1.1 Diabetes melito em humanos

Alterações ósseas importantes podem ser observadas em pacientes portadores de DM, representadas por reabsorções ósseas, retardo na formação do osso e deficiência na mineralização óssea.

Hough et al.²⁹ (1981) constatou a presença de osteopenia cortical em 22% de 206 pacientes portadores de Diabetes melito insulino-dependente, com idades variando entre sete a vinte anos de idade. O autor relacionou a osteopenia à excreção aumentada de fosfatos observada nesses pacientes, e salientou que o metabolismo do fósforo é importante na mineralização óssea, na síntese da matriz óssea, influenciando também o metabolismo do cálcio no organismo.

Alterações nas sínteses óssea e cartilaginosa de proteoglicanas foram verificadas por Weiss et al.⁶² (1981). Os autores concluíram que, parte da redução na formação óssea encontrada em pacientes portadores de DM, pode ser resultado das alterações encontradas na síntese daquelas macromoléculas.

Rico et al.⁴⁷ (1989) após constatarem níveis séricos mais baixos de osteocalcina, o maior componente não colágeno da matriz óssea, em pacientes diabéticos quando comparados a pacientes saudáveis sugeriram que o quadro de osteopenia observado naqueles pacientes seria decorrente de atividade deficiente dos osteoblastos, células responsáveis pela síntese daquela proteína.

Kayath et al.³⁰ (1998) avaliaram a densidade óssea da coluna vertebral, fêmur e o nível corporal de cálcio em pacientes diabéticos insulino-dependentes, bem como verificaram a evolução da osteopenia. Foram acompanhados 23 pacientes durante quatro anos e divididos em grupos com e sem osteopenia. Todos foram analisados quanto à presença de complicações crônicas, massa corporal, glicemia e insulina administrada. Os autores puderam concluir que a osteopenia no grupo de diabéticos insulino-dependentes (IDDM) não parecia ser

progressiva. A densitometria óssea em pacientes com IDDM mostrou-se instável durante os anos de estudo após a primeira avaliação. A diminuição da massa óssea nos pacientes IDDM parece estar presente no início da doença. Isso pode ser ainda mais deletério quando a IDDM se iniciar durante a fase de pico de desenvolvimento da massa óssea.

A fim de determinar se a osteopenia estava presente em crianças diabéticas, Gunczler et al.²⁵ (2001) avaliaram a estrutura óssea de um grupo de crianças diabéticas diagnosticadas precocemente. Foram selecionadas 23 crianças da pré-puberdade, sendo sete do sexo masculino e 16 feminino, com idade cronológica de dois a nove anos e hemoglobina glicosilada de 2,4 a 8,9%. A densidade óssea das espinhas cervical e lombar e a remodelação óssea foram avaliadas por métodos radiográficos e bioquímicos específicos. Os autores puderam concluir que crianças portadoras de Diabetes melito do tipo I apresentaram diminuição da densidade óssea na espinha lombar quatro anos após o diagnóstico clínico da doença.

Torquato et al.⁵⁸ (2003) avaliaram a prevalência do DM e a fraca tolerância à glicose em 1473 indivíduos da cidade de Ribeirão Preto, entre trinta a 69 anos. Dentre os participantes, estavam homens e mulheres não grávidas. Os indivíduos entrevistados receberam informações sobre este distúrbio metabólico, o objetivo e a relevância desse estudo. Os autores concluíram que a prevalência de diabetes, na referida cidade, mostrava-se comparável à observada em países desenvolvidos. Em relação ao estudo multicêntrico Brasileiro, verificaram maior prevalência de diabetes, mas uma prevalência semelhante de intolerância à glicose. Esses achados podem refletir o impacto dos fatores ambientais e o estilo de vida, que tem ocorrido em cidades brasileiras, como Ribeirão Preto, principalmente com as taxas crescentes de sedentarismo e obesidade.

2.1.2 Diabetes melito em animais experimentais

Animais experimentais são amplamente utilizados em trabalhos de pesquisa, para indução de DM, principalmente ratos (HOUG et al.²⁹, 1981; SPANHEIMER et al.⁵⁷, 1988; COLEN et al.¹⁰, 1997; ALKAN et al.², 2002) coelhos (BRAND et al.⁵, 1996; SIMOPOULOS et al.⁵⁶, 2001; LERCO, et al.³², 2003) porcos, cachorros, e também outros animais (MENDEZ & RAMOS⁴¹, 1994).

Existem vários agentes hiperglicêmicos que inibem a secreção de insulina, atuando diretamente na degeneração das células beta pancreáticas, localizadas nas ilhotas de Langerhans, promovendo a elevação do nível glicêmico no sangue. As substâncias químicas mais freqüentemente utilizadas são aloxano e a estreptozotocina. Estes dois produtos são agentes químicos, com citotoxicidade específica para as células betas, mais estudados. Essas drogas causam insuficiências insulínica primária do pâncreas, provocando uma resposta trifásica nos níveis glicêmicos durante as primeiras horas da administração, seguida do estabelecimento de diabetes permanente nas 24 horas subseqüentes (MOOR⁴², 1953; PINHEIRO⁴⁶, 1966; HOUG et al.²⁹, 1981; SPANHEIMER et al.⁵⁷, 1988; BRAND et al.⁵, 1996; COLEN et al.¹⁰, 1997; 2001; ALKAN et al.², 2002).

A principal desvantagem dos métodos químicos utilizados para indução do DM, é o elevado índice de mortalidade relativa que apresentam, embora sejam de fácil execução, permitindo a utilização de um grande número de animais. Uma das grandes vantagens é que as drogas utilizadas provocam destruição da parte endócrina do pâncreas, com preservação de sua função exócrina (LERCO et al.³², 2003).

Pinheiro⁴⁶ (1966), realizou um trabalho utilizando uma amostra de 107 ratos, divididos em dois grupos, onde um grupo (controle) que não recebeu nenhum tipo de tratamento especial e outro grupo que

recebeu doses de 280mg/kg de aloxano monohidratada para desenvolverem o diabetes. Neste estudo, o autor considerou diabéticos, apenas os ratos que apresentaram no final da experiência, uma glicemia acima de 250mg/ml. O osso avaliado foi o fêmur, considerando comprimento, peso e velocidade de calcificação. Para avaliação da velocidade de calcificação, foi utilizado alizarina *red S* dissolvida em solução salina (NaCl 0,45%) numa concentração de 2%. A análise utilizando o osso por desgaste mostrou que o desenvolvimento ósseo nos ratos diabéticos estava retardado em relação ao normal. O autor conclui ainda que, como o crescimento do osso longo em comprimento e espessura, depende respectivamente, da atividade das células cartilaginosas e dos osteoblastos, é provável que o metabolismo destas células esteja também alterados.

Diversos trabalhos objetivaram avaliar a relação entre as alterações no metabolismo dos tecidos ósseos e o DM, como Grandini²⁴ (1978), que observou a reparação óssea alveolar após exodontias em ratos diabéticos, induzidos por pancreatectomia parcial. No vigésimo segundo dia pós-operatório, os alvéolos já se mostravam completamente preenchidos com trabéculas ósseas bem desenvolvidas. As análises histológicas mostraram que a organização do coágulo sanguíneo, a maturação do tecido conjuntivo, a proliferação dos fibroblastos e a diferenciação dos osteoblastos foram prejudicadas no grupo de animais diabéticos.

Em 1984, Goodman & Hori²³ procuraram explicar a presença de osteopenia em ratos diabéticos. O crescimento ósseo da tíbia foi comparado por meio de marcadores ósseos, em animais saudáveis, animais diabéticos e animais diabéticos tratados com insulina. Encontraram decréscimo de 50% na formação e aposição óssea no grupo de animais diabéticos sem tratamento, quando comparados aos demais grupos. Os graus de formação e de aposição de osso periosteal e de matriz também estavam reduzidos quando comparados com o grupo controle.

Os autores concluíram que a administração de insulina pode restaurar a formação normal de matriz e osso em diabetes experimental e que as conseqüências do Diabetes melito descontrolado, tais como glicosúria, calciúria, fosfatúria e acidose sistêmica, assim como outras alterações hormonais associadas ao estado diabético, podem contribuir para perdas minerais do esqueleto. A presente investigação indicou que este distúrbio metabólico prejudica a formação óssea e da matriz no rato, e essas mudanças são prevenidas por tratamento com insulina a despeito do controle metabólico sub-ótimo. Em animais formação de osso e matriz a aposição estavam substancialmente menores do que os valores do grupo controle nos ratos diabéticos tratados, resultados estes que concordam com investigações prévias em humanos e ratos.

Spanheimer et al.⁵⁷ (1988) mensuraram *in vitro* a produção de proteínas colágenas e não colágenas, no osso parietal e em cartilagem articular de ratos portadores de diabetes, induzida pela aplicação de doses variadas de estreptozotocina. Em um subgrupo de animais com diabetes, considerada pelos autores como moderada, encontraram redução de mais de 50% na produção de proteínas colágenas pelo tecido ósseo e cartilaginoso. Não observaram alterações na produção de proteínas não colágenas nesses animais. Em outro subgrupo, com diabetes considerada severa, além do decréscimo da síntese de proteínas colágenas, observaram decréscimo de até 80% na produção de proteínas não colágenas. Ao avaliar a produção de colágeno, os autores mensuraram a produção de proteínas colágenas e não colágenas em um modelo que se assemelha a produção de proteína *in vivo*. Os resultados demonstraram que a produção de proteínas colágenas e não colágenas era significativamente reduzida nos tecidos de animais diabéticos, quando comparada a produção nos animais controles.

Devlin et al.¹⁵ (1996) estudaram a reparação de alvéolos após exodontias de molares em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina. Os animais foram divididos em três grupos: um grupo

considerado controle que não recebeu dose de estreptozotocina, portanto animal sadio; um segundo grupo que recebeu dose de estreptozotocina, tornando-se diabético, sendo controlado com doses de insulina e; um terceiro grupo que recebeu dose de estreptozotocina, tornando-se diabético, e não recebendo insulina para controle da taxa de glicemia, estando os grupos experimentais divididos em: diabéticos não controlados, controlados e não diabéticos. Os autores observaram que no grupo de ratos diabéticos não controlados, havia reabsorção óssea extensa dez dias após extração dentária, com osteoclastos mais numerosos que no grupo não diabético do que no grupo diabético controlado. Resultados da observação histológica sugeriram que no primeiro grupo pode ter havido distúrbio na formação da rede de colágeno resultando na demora da cicatrização e aumentando a destruição alveolar.

Nevins et al.⁴⁵ (1998) avaliaram a capacidade de reparação óssea ao redor de implantes de titânio inseridos em fêmures de ratos diabéticos. A doença foi induzida por aplicação única de estreptozotocina, e as análises foram feitas através da microscopia de luz e da histomorfometria. Os autores observaram diferenças no padrão e na arquitetura do osso neoformado ao redor dos implantes dos animais diabéticos, quando comparados aos animais do grupo controle, após quatro e oito semanas de implantação. As análises histomorfométricas mostraram um maior contato entre o osso e a superfície do implante nos animais normais, além de uma significativa redução na porcentagem da osteointegração nos animais diabéticos.

Em 1999, EL-Hakin¹⁶ pesquisou a influência da administração do fator estabilizador de fibrina (Fator XIII) quanto a sua capacidade de auxiliar na cicatrização de feridas de defeitos ósseos produzidos na mandíbula de ratos normais e diabéticos, induzidos pela estreptozotocina. O fator de coagulação foi aplicado em um grupo de animais, enquanto que outro grupo recebeu aplicações de solução salina.

Avaliações histológicas mostraram que o colágeno depositado nos defeitos ósseos dos animais do grupo experimental estava mais evidente e parecia mais orientado do que nos animais do segundo grupo. Mostraram ainda que neoformação óssea iniciou-se mais cedo nos animais experimentais do que nos animais do grupo controle. A administração das substâncias em animais não diabéticos não provocou alterações significativas no processo reparativo, sugerindo então que, o fator XII apenas acelera a cicatrização em ratos diabéticos.

Fiorellini et al.¹⁷ (1999) demonstraram aumento na neoformação óssea ao redor de implantes osteointegrados aplicados em fêmures de ratos diabéticos, que receberam tratamento com insulina. Entretanto, os parâmetros histomorfométricos utilizados indicaram que, apesar da quantidade total de formação óssea estar aumentada nesses animais, a porcentagem de contato entre o osso e o implante de titânio era significativamente menor do que a encontrada em animais não diabéticos. Os autores afirmaram que o produto final da glicosilação avançada (AGEs) causa mudanças qualitativas e quantitativas nos componentes da matriz extracelular, tais como colágeno, proteoglicanas e laminina e por esse motivo essa molécula tem sido relacionada com a patologia do diabetes. Também foi constatado uma diminuição no número total de proteoglicanas, assim como do tamanho das moléculas agregadas. Essas mudanças na matriz extracelular causam alterações específicas na formação e remodelação óssea.

Funk et al.¹⁹ (2000) pesquisaram a reparação de fratura óssea em fêmur de ratos diabéticos, induzidos pela estreptozotocina. Os autores indicaram diferenças distintas nas propriedades estruturais recuperadas dos ossos com fraturas cicatrizadas em ratos normais e diabéticos, após três a quatro semanas de reparo. Testes mecânicos indicaram resistência superior em fêmures intactos comparados com os fêmures com fraturas cicatrizadas de todos os grupos, pois estes eram estruturalmente mais rígidos e quebraram em tensões e ângulos

significativamente menores do que os fêmures intactos do grupo controle. Neste estudo, os autores observaram diminuição da resistência estrutural dos fêmures fraturados e retardo no período de reparação dos ratos diabético quando comparados com os animais saudáveis. A diabetes afetou também o osso intacto, pois nos níveis material e estrutural, os fêmures dos ratos diabéticos eram significativamente mais rígidos do que os fêmures de animais controle.

O efeito do diabetes experimental foi avaliado, utilizando-se quarenta ratos, que receberam dose única de streptozotocina. Dois, 12, 26 e 42 dias após a aplicação da droga, uréia, glicemia e hemoglobina plasmática foram avaliadas. Os implantes de titânio laminar foram colocados após 12 dias da indução, na tíbia direita de cada rato. Dois grupos de vinte ratos cada foram sacrificados no período de 14 e trinta dias após a colocação do implante. Os resultados demonstraram que os ratos tiveram perda significativa de peso corpóreo, valores normais de hemoglobina, uréia, aumento significativo da glicemia e diminuição da tíbia. O estudo histomorfométrico revelou baixo percentual de osteointegração em animais diabéticos comparados com o grupo controle, ambos 14 e trinta dias pós-implantação. O volume do tecido ósseo periimplantar foi maior em animais diabético do que no grupo controle, 14 dias pós-implantação e menor trinta dias pós-implantação (GIGLIO et al.²⁰, 2000).

Alkan et al.² (2002) acredita na efetividade da injeção de streptozotocina para a indução de diabetes em ratas, considerando o elevado nível de glicemia no grupo experimental quando comparado ao grupo controle. O autor estudou a reparação óssea em tíbia, utilizando dois grupos de animais: diabéticos induzidos e não diabético, embora ele acredite que este osso não seja um modelo ideal de estudo quando comparado a resultados encontrados por outros pesquisadores.

Lu et al.³⁴ (2003) estudaram dois grupos de animais diabéticos, induzidos pela streptozotocina, um dos grupos recebeu

tratamento com insulina após a indução e o outro grupo manteve-se sem tratamento. Os animais foram sacrificados nos períodos de zero, dois, quatro, seis, dez e 16 dias. Análises microscópicas demonstraram que a quantidade de tecido mesenquimal imaturo foi equivalente em ambos os grupos experimentais e controles em quatro dias. Em seis dias, uma grande quantidade de formação óssea ocorreu no grupo controle e que foi significativamente reduzida no grupo diabético. Esta deficiência foi evidente no nível molecular, demonstrado pela diminuição da expressão de osteocalcina, colágeno tipo I. Quando os fatores de transcrição foram examinados, a expressão de vários destes fatores foram substancialmente reduzidas no grupo diabético, comparado com o grupo controle de quatro e seis dias. Estes resultados indicam que animais diabéticos produzem quantidade suficiente de tecido mesenquimal imaturo, mas apresentam falha para expressar adequadamente genes que regulam a diferenciação osteoblástica. Os autores concluíram que diabete interfere com a formação óssea por afetar a expressão do fator de transcrição que regula a diferenciação osteoblástica.

Lerco et al.³², em 2003, buscando a caracterização de um modelo experimental de DM, administraram solução aquosa de aloxano a 2%, injetada por via endovenosa na dose única de 42mg/kg de peso corporal, na veia da cauda de ratos alógenos (*rattus norvegicus*, variedade *albinus*). Os animais foram divididos em dois grupos experimentais, sendo um grupo controle e outro diabético. Foi realizada avaliação clínica e laboratorial de ambos os grupos, incluindo peso, ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese, bem como dados laboratoriais referentes às dosagens de glicose plasmática, glicose urinária e glicosúria. Neste estudo os autores concluíram que o aloxano, na condição em foi utilizado, é uma droga eficaz na indução do DM de forma grave, demonstrado por alterações clínicas e laboratoriais bem definidas e que, contrastando com o que ocorre na espécie humana, alterações do perfil lipídico não foram observadas nos animais diabéticos,

o que fatalmente levaria a macroangiopatia diabética experimental do rato.

Margonar et al.³⁹ (2003) estudaram a influência do Diabetes melito e terapia de insulina na retenção biomecânica ao redor dos implantes. Utilizaram 27 coelhos (raça *New Zealand*), com 2,5 a 3,0kg de peso corpóreo, os quais foram divididos em três grupos: controle, diabético e diabético tratado com insulina. A diabetes foi induzida pela administração endovenosa de 115mg/kg de aloxano moniidratado e 12 horas após o procedimento, os animais receberam água com glicose à 5%. Os coelhos com glicemia maior que 300mg/dL foram considerados diabéticos e os animais diabéticos tratados receberam 10UI de insulina duas vezes ao dia. Concluíram que a força necessária para desequilibrar a osseointegração é dependente do tempo e a diabetes mellitus pode influenciar negativamente no mecanismo de retenção do implante. A terapia com insulina não mostrou significância estatística quando comparado com o grupo diabético. Este estudo sugere ainda que quanto mais elevado o nível de glicose no sangue, maior serão as alterações em relação a osseointegração.

Campos et al.⁷ (2004) realizaram uma ampla revisão de literatura sobre os métodos experimentais de indução para o DM do tipo 2 (DM2), abordando também as técnicas cirúrgicas, substâncias exógenas que alteram diretamente o metabolismo basal (estreptozotocina, aloxano e glutamato monossódico) e alteração no consumo de dieta do animal. Dentre as substâncias hiperglicêmicas, descritas neste estudo, o aloxano é uma substância que pode ser utilizada para indução dos dois tipos de Diabetes melito. No DM2, a referida substância lesa às células β pancreáticas e os animais adquirem sintomas no início da fase adulta (três meses de idade). Frente aos trabalhos experimentais analisados que induzem o desenvolvimento do DM2, os autores puderam classificar os modelos de indução em cinco tipos:

a) roedores espontaneamente diabéticos (RED);

- b) roedores induzidos quimicamente ao diabetes (RIQD);
- c) roedores induzido cirurgicamente ao diabetes (RICD);
- d) Roedores induzido nutricionalmente ao diabetes (RIND);
- e) misto.

Estudos experimentais sobre o Diabetes melito tem sido extremamente necessários, justificando-se, portanto, a sedimentação dos conhecimentos sobre os vários modelos animais existentes, como o apresentado neste estudo, com o uso de aloxano.

2.2 Metabolismo ósseo

A remodelação óssea é um processo complexo que envolve várias funções celulares direcionadas para a reabsorção coordenada e formação de osso novo. A remodelação óssea é regulada por hormônios sistêmicos e por fatores locais. Os hormônios regulam a síntese, ativação e efeito dos fatores locais que exercem uma ação direta sobre o metabolismo celular e eles modificam a replicação e função diferenciada das células da linhagem dos osteoclastos ou osteoblastos. É possível que o papel dos hormônios seja oferecer especificidade tecidual para um certo fator de crescimento porque a maioria destes fatores é sintetizada por uma variedade de células esqueléticas e não-esqueléticas (HILL & ORTH²⁸, 1998).

O crescimento ósseo envolve mais do que deposição de tecido ósseo. Ele depende da íntima coordenação entre dois processos opostos. Os osteoclastos compensam a adição de tecido ósseo novo através da remoção de uma quantidade similar de tecido ósseo velho de locais desnecessários, prevenindo assim a construção excessiva de tecido ósseo (COMARK¹¹, 2003).

2.3 Regeneração óssea guiada

A primeira informação que a literatura traz sobre a Regeneração Óssea Guiada (ROG) é fornecida por Murray et al.⁴⁴ (1957) que removeram um fragmento do ílio de cães e recobriram com um material plástico, rígido o suficiente para manter um espaço entre o tecido ósseo e a face interna do material quando os retalhos fossem suturados em posição. Após dez semanas, demonstraram um crescimento ósseo de 6mm acima do osso circunvizinho; o novo osso estava integrado ao osso subjacente e apresentava as mesmas características histológicas. O experimento repetido no fêmur de um cão demonstrou o crescimento ósseo de 5mm. A função do material seria impedir que o tecido mole preenchesse o espaço onde se desejasse a formação de tecido ósseo.

Com o objetivo de estudar a reparação osteogênica e a neoformação óssea no interior de um espaço, Linghorne³³ (1960) produziu uma ferida cirúrgica de aproximadamente 15mm na fíbula de um cão, deixando dois fragmentos ósseos completamente separados. A reparação nesse tipo de ferida cirúrgica ocorre normalmente pela união fibrosa dos fragmentos ósseos. Os dois fragmentos da fíbula foram unidos com um tubo de polietileno que, em alguns casos, foi preenchido com enxerto ósseo autógeno; cuidados foram tomados para assegurar que o tubo fosse sempre preenchido com coágulo sangüíneo. Após um período de estudo de 18 a 63 dias, os resultados histológicos e radiográficos mostraram que houve neoformação óssea e completa reparação da ferida cirúrgica no interior do tubo.

Melcher & Dreyer⁴⁰ (1962), utilizando o modelo experimental de Murray et al.⁴⁴ (1957), criaram defeitos no fêmur de ratos que foram cobertos por uma membrana de acetato-celulose. Os

resultados histológicos, após 18 meses de estudo, mostraram que um novo osso foi formado nas concavidades da proteção, crescendo além do contorno do fêmur. O grau de crescimento ósseo estava na dependência da adaptação da proteção à superfície femoral. Os autores concluíram que a função da membrana era proteger o coágulo da invasão por tecido conjuntivo não-osteogênico, preservando o tamanho desse coágulo e prevenindo sua distorção pela pressão dos tecidos, quando suturados em posição.

Três membranas diferentes foram testadas por Aaboe et al.¹ (1993) em defeitos unicorticais de 8mm realizados na tíbia de coelhos. Todos os defeitos experimentais e controle apresentaram completa reparação com tecido ósseo, mostrando que defeitos abaixo de 8mm repararam espontaneamente neste modelo animal. Ao redor de remanescentes da membrana de poligalactina 910 (Vicryl®) um infiltrado inflamatório difuso com células gigantes multinucleares pode ser observado, o qual não prejudicou o processo de reparação óssea. Adjacente à membrana Gore-Tex® e Alzamer® alguns linfócitos foram observados, mas nenhuma célula gigante foi notada.

Macedo et al.³⁷ (1993) em relato de um caso clínico mostraram o tratamento de uma reabsorção severa do osso alveolar devido à perda acidental do incisivo central superior direito, pela utilização dos princípios biológicos da ROG. Os autores concluíram que a ROG pode ser indicada como uma técnica cirúrgica para restaurar estética e funcionalmente as perdas localizadas do rebordo ósseo, aumentar a espessura e a altura do rebordo, para facilitar o controle e a remoção da placa bacteriana, melhorar o resultado estético em próteses parciais fixas, além de possibilitar a instalação de implantes osteointegrados.

Mundell et al.⁴³ (1993) testaram a eficácia de uma membrana de colágeno em osteotomias realizadas no arco zigomático de coelhos. Após duas e quatro semanas, a análise histológica mostrou crescimento ósseo no lado teste e tecido conjuntivo fibroso preenchendo

o defeito controle. Os autores concluíram que a membrana de colágeno foi efetiva na prevenção da invasão do coágulo por células indesejadas, especialmente em defeitos ósseos largos, sendo recomendada em casos cirúrgicos que necessitem de extensiva reposição de segmentos ósseos.

Com o objetivo de criar um modelo experimental com defeitos ósseos reproduzíveis preenchidos com tecido conjuntivo maduro e avaliar o potencial do método da membrana na restauração desses defeitos, Dahlin et al.¹⁴ (1994) realizaram um estudo onde defeitos padronizados de tamanho crítico de 5mm de diâmetro foram produzidos de lado a lado no ângulo da mandíbula de 13 ratos. Após 12 semanas, os locais revelaram crescimento maciço de tecido conjuntivo preenchendo toda a área do defeito. Na reabertura, todo o tecido mole foi removido e os defeitos ósseos, de um lado, foram recobertos com uma membrana de Politetrafluoretileno expandido (PTFE-e) (Gore-Tex) por vestibular e lingual, estendendo 2 a 3mm além das bordas dos defeitos. O lado contralateral foi deixado sem membrana servindo como grupo controle. Após seis semanas, a análise histológica revelou um preenchimento ósseo completo nos defeitos recobertos com a membrana. Os defeitos controles, sem membrana, mostraram variações na neoformação óssea e a porção central remanescente foi preenchida por tecido conjuntivo. Os resultados desse estudo levaram os autores a concluir que uma regeneração óssea previsível e bem sucedida pôde ser conseguida pelo tratamento com a técnica da ROG em defeitos preenchidos com tecido conjuntivo, nos quais encontramos um ambiente menos osteogênico que naqueles recentemente produzidos. A implicação clínica desse tratamento seria útil nos casos de cistos, lesões periapicais e pseudartroses resultantes de fraturas ósseas.

Utilizando barreiras físicas não-absorvíveis, Lang et al.³¹ (1994), em estudo clínico, avaliaram o volume ósseo regenerado em defeitos de diversos tamanhos e formatos nos ossos maxilares. Nos pacientes em que a membrana teve de ser removida entre três e cinco

meses, devido ao risco aumentado de infecção, a regeneração óssea variou entre zero e 60%. Nos pacientes nos quais as membranas foram deixadas por seis a oito meses, o osso regenerado preencheu 90-100% do volume possível. Baseado nos resultados, os autores concluíram que regeneração óssea bem sucedida ocorreu em períodos de reparo de pelo menos seis meses.

Informações detalhadas sobre a seqüência e o modelo de regeneração óssea em defeitos cirurgicamente criados e protegidos por membrana no rebordo ósseo da mandíbula de cães foram fornecidas por Schenk et al.⁵¹ (1994). A avaliação histológica mostrou que um período de reparação de quatro meses não foi suficiente para uma regeneração óssea completa nos defeitos mais largos, principalmente, nas suas porções mais superficiais pela persistência de defeitos remanescentes. Um período de reparação mais longo da ferida cirúrgica seria necessário em defeitos maiores antes de haver esforço funcional do osso regenerado. Resultados melhores poderiam ser obtidos com o uso de membranas com reforço de titânio que não sofressem colapso como as originais. Biologicamente, a cobertura dos defeitos ósseos pela membrana criou um meio ambiente aceitável para a regeneração de novo tecido ósseo. Como prováveis efeitos da membrana, citaram o suporte físico do tecido mole prevenindo o colapso do espaço necessário para a formação óssea, a criação de um espaço preenchido com coágulo sangüíneo dentro do qual as células osteogênicas pudessem migrar, a proteção do tecido de granulação e da rede vascular delicada durante a sua organização. A membrana deve também excluir as células competidoras não-osteogênicas do tecido mole, evitando a formação de uma fibrose, e permitir a possível acumulação de fatores de crescimento e outras substâncias ligadas a neoformação óssea.

Procurando avaliar um dos requisitos preconizados para uma membrana, Schmid et al.⁵⁴ (1994) realizaram um estudo experimental em oito coelhos para testar a hipótese de que, de acordo

com os princípios biológicos da ROG, a permeabilidade da membrana é uma característica necessária para a formação óssea. Os autores colocaram cilindros de titânio ancorados na calvária de coelhos, os quais foram cobertos com uma membrana Gore-Tex ou selados com um molde denso de titânio. Após oito meses de reparação da ferida cirúrgica, novo tecido ósseo preencheu todos os cilindros de titânio, independentemente do tipo de selamento realizado sobre os cilindros. Os resultados levaram à conclusão de que a permeabilidade da membrana não é um pré-requisito necessário na ROG.

Criando um espaço onde o osso seria o único tecido adjacente, Lundgren et al.³⁶ (1995) realizaram um estudo para avaliar o aumento de osso intramembranoso além do perfil esquelético após a colocação de uma barreira oclusiva. Dois domos de titânio, com 4,5mm de diâmetro e 3,0mm de altura interna, foram instalados sobre cada lado do crânio de coelhos. Após três meses, preenchimento ósseo completo em todos os domos foi observado, indicando que o uso de uma barreira com total oclusividade, resistência suficiente, estabilidade e vedamento periférico resultou em aumento ósseo nos espaços criados além do perfil ósseo.

A influência da oclusividade da barreira física sobre a regeneração óssea foi avaliada no experimento de Lundgren et al.³⁷ (1998) em crânio de ratos. A colocação de barreiras totalmente oclusivas resultou em aumento ósseo numa proporção mais vagarosa. As barreiras com perfurações maiores que 10 μ m mostraram um aumento ósseo em proporção mais rápida e com certa quantidade de crescimento de tecido conjuntivo supra-ósseo.

Em estudo clínico, Simion et al.⁵⁵ (1998) investigaram a regeneração óssea vertical com a utilização de enxertos ósseos autógeno ou alógeno, associados a uma membrana de Politetrafluoretileno (PTFE) com reforço de titânio, sobre implantes osteointegrados inseridos parcialmente e emergindo do nível da crista óssea. Sete a 11 meses após,

as medidas clínicas nos locais tratados com o osso alógeno mostraram um ganho ósseo vertical médio de 3,1mm, ao passo que, nos casos tratados com o osso autógeno, o ganho ósseo vertical médio foi de 5,02mm. A análise histológica mostrou uma correlação direta entre as densidades do osso preexistente e daquele regenerado. Os resultados clínicos e histológicos indicaram o efeito benéfico da colocação de partículas de osso alógeno ou autógeno sobre o aumento vertical do rebordo nos procedimentos de regeneração óssea com membranas em humanos.

Gomes et al.²¹ (2002) avaliaram as propriedades osteocondutivas da matriz dentinária autógena desmineralizada em defeitos realizados no osso parietal de coelhos, utilizando a técnica de ROG e barreira de PTFE. Nos períodos pós-operatórios estudados, as análises radiográficas mostraram que os defeitos no grupo experimental atingiram radiopacidade mais rapidamente que no grupo controle. Histologicamente, as fatias de dentina pareceram estimular a nova formação óssea. Os autores concluíram que o reparo ósseo foi acelerado nos defeitos ósseos tratados com a matriz quando comparado ao grupo controle.

Uma membrana absorvível derivada do ácido láctico foi utilizada por Vesala et al.⁶⁰ (2002) em defeitos de 10 x 10mm produzidos na calota de coelhos. Após seis, 24 e 48 semanas, as análises histológicas e histomorfométrica mostraram formação óssea mais abundante nos defeitos cobertos com a membrana do que no grupo controle, onde nenhum material foi utilizado.

Em estudo experimental, Macedo et al.³⁸ (2003) compararam o uso de dois tipos de barreiras físicas na regeneração óssea guiada em defeitos criados na tíbia de ratos. Quinze animais foram divididos em três grupos: grupo I (barreira não-porosa de PTFE), grupo II (blocos de hidroxiapatita) e grupo III (controle que não recebeu nenhuma barreira). A análise histológica mostrou quantidades variadas de osso neoformado com ambos os tipos de barreiras. A barreira de PTFE

mostrou melhores resultados do que a hidroxiapatita. Os resultados deste estudo sugerem que a regeneração óssea pode ser conseguida com a técnica de submersão da barreira física.

3 PROPOSIÇÃO

O presente trabalho visou avaliar quantitativa e qualitativamente a dinâmica do processo de reparação em defeitos ósseos cirúrgicos confeccionados no osso parietal de coelhos diabéticos, induzidos por aloxano, associado ou não à regeneração óssea guiada com o uso de barreira oclusiva (barreira de politetrafluoretileno-PTFE), mediante análises da densidade óssea, radiográfica, microscópica e estatística da histomorfometria, e também investigar a presença e os tipos de complicações clínicas encontradas nestes animais durante o experimento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Animais

Para o estudo da regeneração óssea guiada, foram utilizados 18 coelhos adultos, machos, *New Zealand*, com peso médio de 3,5kg, os quais foram mantidos em cativeiros individuais com dieta de ração balanceada e água *ad libitum*. Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP. Este estudo foi realizado com base nos Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOSJC-UNESP (Anexo A).

Três defeitos foram utilizados e divididos em grupos:

(Figura 1)

- a) Grupo C (controle – normal, defeito ósseo em coelhos saudáveis);
- b) Grupo D (defeito ósseo em coelhos diabéticos sem barreira de politetrafluoretileno);
- c) Grupo D-PTFE (defeito ósseo em coelhos diabéticos com barreira de politetrafluoretileno)

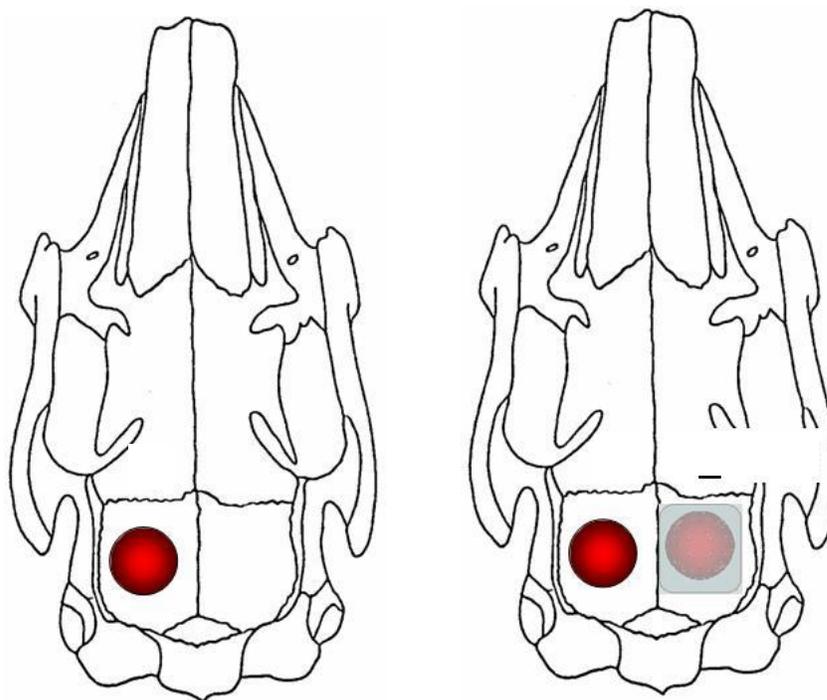


FIGURA 1 - Desenho esquemático dos grupos de estudo: a) controle-normal; b) defeito ósseo em coelhos diabéticos sem barreira de politetrafluoretileno; c) defeito ósseo em coelhos diabéticos com barreira de politetrafluoretileno.

4.1.2 Material utilizado para a indução e controle do Diabetes

Para a indução e monitoração da glicemia, utilizamos: aloxano monoidratada (Sigma Aldrich Chemical - Saint Louis, MO, USA), escalpe 27G (Wiltex, Zhejiang Med., China), monitor para glicemia (One Touch, Johnson & Johnson Company, California, USA) e tiras teste LIFESCAN (Johnson & Johnson Company, California, USA). O controle do diabetes foi realizado por meio da administração de insulina humana lenta (Humulin NPH/U-100, Eli Lilly do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) e insulina humana regular (Biohumulin R-100, Biobrás S.A., Minas Gerais, Brasil) (Figura 2)



FIGURA 2 – Substâncias utilizadas para indução do diabetes e controle da glicemia; a) Alozano monohidratado – droga hiperglicêmica; b) Insulina NPH/U-100 e insulina R/U-100 para controlar a hiperglicemia entre 200mg/dL e 350 mg/dL.

4.1.3 Barreira de politetrafluoretileno

A película não-porosa de politetrafluoretileno (PTFE) (Tecnoflon-Brasflon, Ind. & Com. Plásticos, São Paulo, S.P.), com espessura de 0,13mm apresenta características e biocompatibilidade adequadas para o uso em cirurgias com a técnica da regeneração óssea guiada. A barreira de PTFE foi colocada em embalagens individuais, seladas e esterilizadas em autoclave.

4.1.4 Material cirúrgico

Para a realização dos procedimentos cirúrgicos, utilizamos os seguintes materiais: lâmina intercambiável nº 15 montada em bisturi tipo Bard-Parker nº3, descolador de periósteo e curetas tipo Molt CM 2/4, afastadores cirúrgicos, cinzéis Ochsensbein nº 4 e mini Ochsensbein nº 1, sindesmótomo, espátula 7, porta agulha, pinça hemostática tipo mosquito curva e reta, tesouras curva e reta, brocas tipo trefina 8mm de diâmetro, pano de campo, gaze, sugador cirúrgico descartável (Indusbello), fio de sutura absorvível Vycril (ETHICON /

Johnson & Johnson 6-0) e fio de sutura montado (ETHICON / Johnson & Johnson c/ agulha seda 4-0), seringas anestésicas de 20, 5 e 1ml descartáveis (Becton Dicknson Indústrias Cirúrgicas LTDA), motor cirúrgico elétrico (AEU-707 – MGF Asseptico Inc., USA).

4.1.5 Reagentes, compostos e soluções

Para manutenção dos animais e conservação, transporte e preparação das peças cirúrgicas foram utilizados os seguintes produtos: pré-anestésico cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3 tiazina (Rompum - Bayer do Brasil), Cloridrato de (Ketamina Dopalen-Agribrands do Brasil Indústria e Comércio Ltda., Paulínia, Brasil); Gluconato de Clorexidina 0,12% (Periogard, Colgate - Palmolive, São Paulo, Brasil); antibiótico Pentabiótico veterinário pequeno porte (Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, São Paulo, Brasil) e eritromicina gel 4% (Eryacnen, Galderma Brasil LTDA, São Paulo, Brasil); antiinflamatório Celebra 100mg (Pfizer Pharmacia, São Paulo, Brasil); pomada Quadriderm 20g (Schering-Plough, Rio de Janeiro, Brasil), solução descalcificadora de Plank [Cloreto de Alumínio (126,10g), Ácido Clorídrico 10N (85ml), Ácido Fórmico á 88% (54ml) e água destilada (500ml)], formol a 10% (Merck S.A. Indústrias Químicas); ração granulada (Probiotério Moinho Primor S.A.) e hematoxilina e eosina (QEEL - Química Especializada Erich/Ltda).

4.2 Método

4.2.1 Indução e controle do Diabetes

Foram anestesiados previamente 12 animais, os quais receberam aloxano monohidratada (Alloxan monohydrate, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany), na dosagem de 90mg/kg de peso corpóreo, para indução do diabetes melito. Essa substância atua diretamente nas ilhotas de Langerhans do pâncreas, destruindo as células betas e resultando na diminuição da quantidade de insulina. O medicamento foi administrado, por via intravenosa com o auxílio de um escalpe 27G, na veia auricular marginal, após depilação e assepsia da área. Os animais considerados diabéticos apresentaram glicemia maior que 200mg/dL. A hiperglicemia foi controlada por meio da administração de 0,5 a 2U de insulina humana lenta e/ou insulina humana regular para manter o nível glicêmico entre 200mg/dL e 350mg/dL (Figura 3).



FIGURA 3- Indução do Diabetes: a) introdução do escalpe na veia auricular marginal em orelha depilada e asséptica; b) presença de sangue no interior do escalpe, confirmando que se encontra no interior da veia; c) infusão do aloxano (90mg/ml) na veia auricular; d) aspecto clínico após a infusão.

4.2.2 Mensuração da glicemia

Para verificarmos o resultado da indução do Diabetes, utilizamos amostras de sangue, obtidos de capilares periféricos da orelha, e os valores da concentração de glicose no sangue (mg/dL) foram mensurados com o auxílio de um monitor para glicemia e tiras teste (ONETOUCH ULTRA, Lifescan Johnson&Johnson Company, Califórnia, USA). A glicemia foi averiguada 24, 48 e 72 horas após a administração do aloxano e três vezes ao dia durante todos os períodos de observação

(Figura 4). Os dados obtidos e informações complementares eram registrados em fichas apropriadas (Apêndice A).



FIGURA 4 – Mensuração da glicemia: a) perfuração da veia marginal da orelha do animal experimental; b) e c) obtenção do sangue periférico fora e no interior da tira teste; d) mensuração da glicemia com o auxílio de um monitor.

4.2.3 Confecção dos defeitos ósseos cirúrgicos

Os animais foram anestesiados por via intramuscular e as substâncias preconizadas foram o pré-anestésico Rompum e anestésico Dopalen na proporção de 0,1ml/kg e 0,35ml/kg de peso corpóreo, respectivamente.

Após a depilação e assepsia com gluconato de clorexidina a 0,12% no crânio, uma incisão no plano sagital mediano foi realizada, seguida de divulsão muscular plano a plano e incisão do periósteo. Subseqüentemente, foi realizado um defeito ósseo com o auxílio de uma broca tipo trefina de 8mm acionada por um motor cirúrgico, com irrigação constante de cloreto de sódio a 0,9% estéril. O respectivo defeito ósseo apresentava profundidade igual à espessura da cortical retirada.

Nos defeitos D-PTFE, a barreira oclusiva foi posicionada no assoalho da loja cirúrgica. Imediatamente após, a sua superfície foi recoberta pelo mesmo tipo de barreira, estendendo-se por 2 a 3mm das bordas dos defeitos. Nos defeitos dos grupos controle-normal e controle-diabético, os defeitos cirúrgicos confeccionados foram preenchidos apenas por coágulo sangüíneo. Em seguida, as estruturas dos planos profundo e superficial foram suturados com fio absorvível Vycril e seda 4-0 (Figura 5).

Os cuidados pré e pós-operatórios foram realizados para cada animal, administrando-se, por via intramuscular, o antibiótico Pentabiótico e antiinflamatório Celebra 100mg nas dosagens de 0,1ml/kg e 0,6mg/kg do peso corporal, respectivamente. O antibiótico foi aplicado uma hora antes do procedimento clínico e o antiinflamatório administrado após o procedimento, prorrogando-se por três dias.

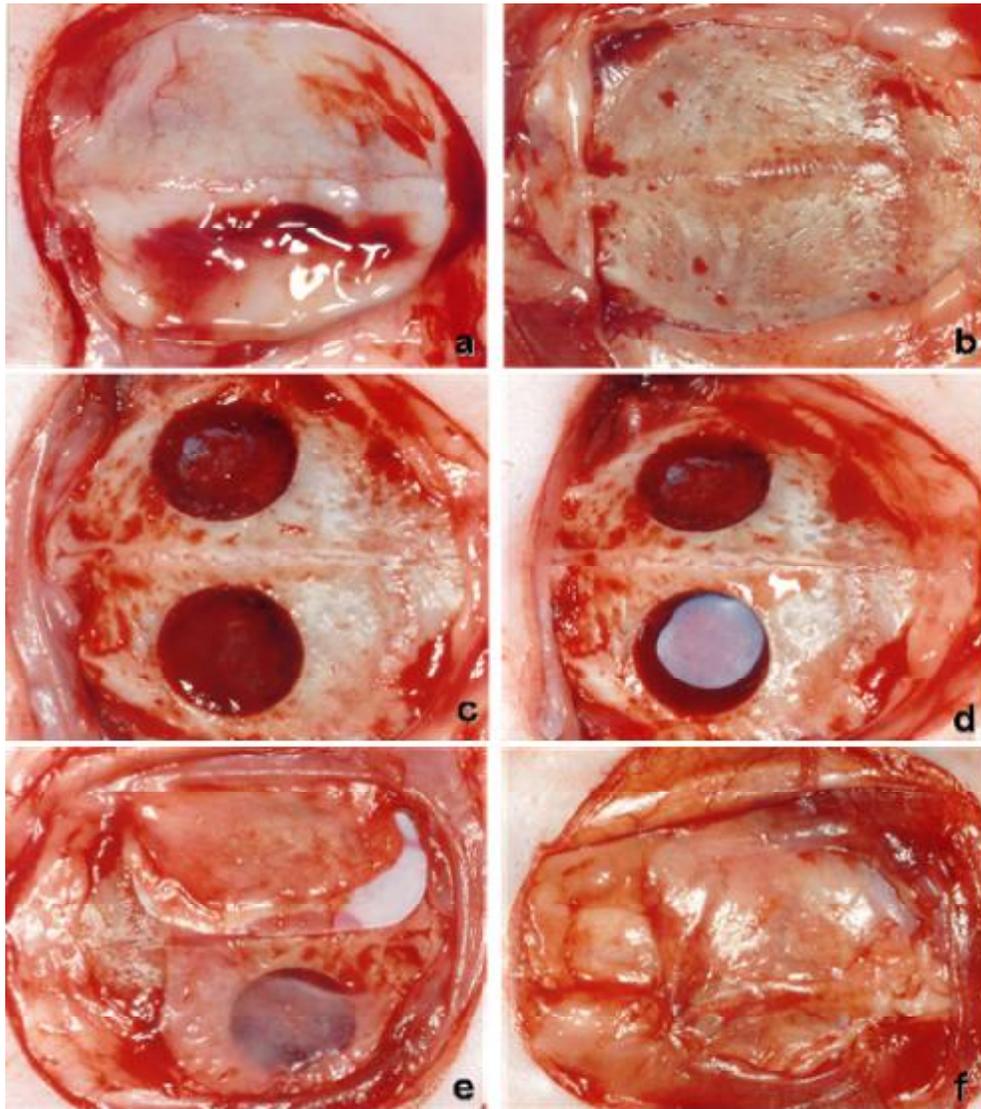


FIGURA 5 -Procedimentos cirúrgicos: a) divulsão muscular plano a plano; b) ossos parietais expostos; c) confecção dos defeitos ósseos; d) e e) barreira de PTFE no assoalho e na superfície do defeito; f) reposicionamento do periósteo.

4.2.4 Períodos de observação

Decorridos 15, trinta, sessenta e noventa dias do procedimento cirúrgico, três defeitos ósseos dos coelhos diabéticos e quatro defeitos dos coelhos normais foram obtidos após o sacrifício desses animais com uma superdose de anestésico. As peças contendo os defeitos ósseos foram removidas em bloco e fixadas em formol a 10% por 72 horas.

4.2.5 Análise radiográfica

Para facilitar a descrição do resultado obtido a partir da análise das imagens radiográficas digitais, os defeitos ósseos foram divididos em três terços: anterior (TA), médio (TM) e posterior (TP), no sentido ântero-posterior da cabeça do coelho. As paredes do defeito ósseo serão referidas em anterior (A), posterior (P), medial (M) e lateral (L) (Figura 6).

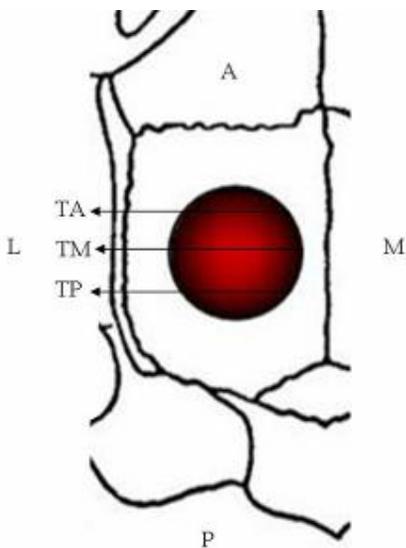


FIGURA 6 - Desenho esquemático da vista superior do crânio do coelho.

4.2.5.1 Obtenção das imagens radiográficas digitais

Para a obtenção das imagens radiográficas, utilizou-se o sistema Visualix Gx-S-HDI (Gendex Dental System, Dentisplay International, Chicago, IL, USA). Este sistema consiste de um software VixWin 1.9 (Gendex Dental System, Dentisplay International, Chicago, IL, USA) que capta a imagem radiográfica digital por meio de um sensor CCD (Charge –Coupled Device), com área ativa 20,0mm de largura por 30,0mm de comprimento. O aparelho de raios X utilizado é o Gendex 765 DC (Gendex Dental X-Ray Division, Dentistry International Inc., IL, USA), regulado para 65KVp e 7mA. As peças cirúrgicas foram colocadas sobre o referido sensor que está posicionado paralelamente ao solo e o feixe central de raios-X foi direcionado perpendicularmente a esse dispositivo. À distância foco-objeto e o tempo de exposição aos raios-X foi de 40cm e 0,02 segundos, respectivamente. As imagens radiográficas digitais obtidas foram armazenadas em arquivo de formato TIFF (Figura 7).

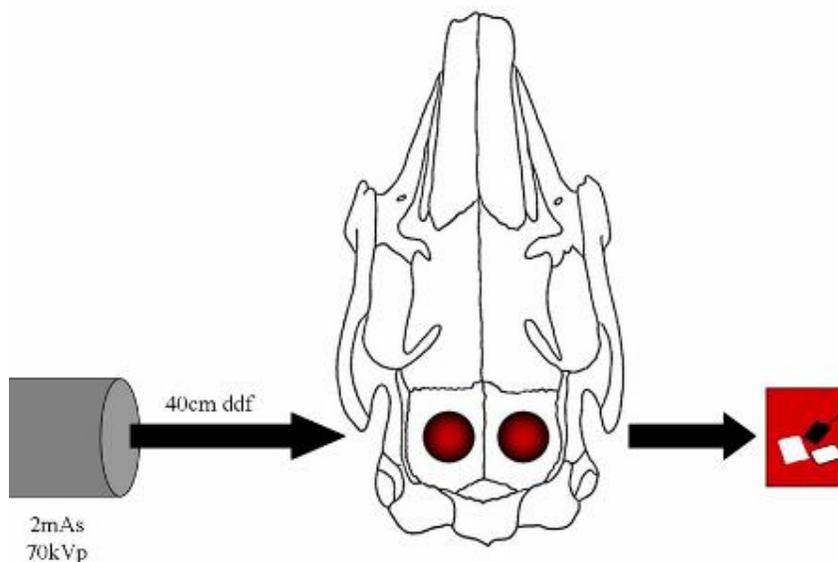


FIGURA 7 -Representação esquemática das tomadas radiográficas pelo Sistema Visualix Gx-S-HDI.

4.2.5.2 Análise da densidade óptica

A mensuração dessas imagens digitais foi realizada por um programa de computador (Kodak, Aldus Photo Styler 2.0) que possibilitou a medição de 256 tons de cinza. O observador realizou três vezes a mensuração da densidade óptica em intervalos de cinco dias e os valores obtidos da densidade óptica foram submetidos à análise estatística.

4.2.6 Análise estatística

Os resultados da densidade óptica foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey (GraphPad InStat version 3.00 for Windows 95, GraphPad Software, San Diego, California, USA). O nível de significância adotada será de $p < 0,05$.

4.2.7 Análise microscópica

4.2.7.1 Preparação dos espécimes para a microscopia de luz

Para o estudo microscópico, as peças cirúrgicas dos coelhos diabéticos e diabéticos com membrana, contendo os defeitos ósseos, foram removidas em bloco, fixadas em formol a 10% por 72 horas, descalcificadas com solução Plank, processadas e incluídas em Paraplast. Imediatamente após, foram realizados cortes microscópicos com 6 μ m de espessura. As lâminas histológicas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) e analisadas por três observadores por meio de microscopia de luz.

4.2.7.2 Análise estatística histomorfométrica

Para a realização da histomorfometria, utilizou-se o método estereológico, que consiste em determinar parâmetros quantitativos tridimensionais de estruturas anatômicas a partir de cortes histológicos por meio da geometria. A finalidade da aplicação deste método é estudar uma determinada amostra de cortes aleatórios e isotrópicos (GOMES et al.²¹, 2002).

Considerando que o princípio experimental da estereologia está na casualização das amostras, a escolha das mesmas deve ser realizada por um método que elimine a ocorrência de vícios na amostragem, consistindo na aplicação de procedimentos de casualização em todas as fases do experimento, tais como: seleção aleatória das lâminas, dos cortes histológicos presentes em cada lâmina e, principalmente, dos campos microscópicos a serem utilizados nas quantificações. A análise da histomorfometria foi realizada de acordo com o defeito ósseo que representava a média da estatística da densidade óptica obtida (GOMES et al.²¹, 2002).

O retículo ou grade de integração II Zeiss foi sobreposto à ocular de compensação KPL 8X Zeiss para avaliação da densidade óssea (DO). A imagem do retículo foi superposta aos campos histológicos desejados. Os pontos do retículo (P_i) e o número total de pontos (P) sobre o defeito ósseo foram quantificados. A densidade óssea foi calculada pela fórmula: $DO = \frac{\text{número de pontos sobre a estrutura } (P_i)}{\text{número total de pontos sobre o defeito ósseo } (P)}$.

O fragmento descalcificado, contendo o defeito ósseo, foi submetido a cortes histológicos seriados, no qual foram obtidos aproximadamente quarenta cortes. Dentre essas lâminas, foram escolhidas, aleatoriamente, oito para análise histomorfométrica. Imediatamente após, seis campos histológicos da área do defeito ósseo foram analisados com auxílio da objetiva 40X e ocular KPL 8X de um microscópio óptico, modelo Olympus CH-2. A objetiva mostrou um retículo de cem pontos, correspondente a $7840 \mu^2$, para mensuração da área de

tecido ósseo neoformado (Figura 8). Esse tecido foi registrado numericamente em ficha apropriada (Apêndice B).

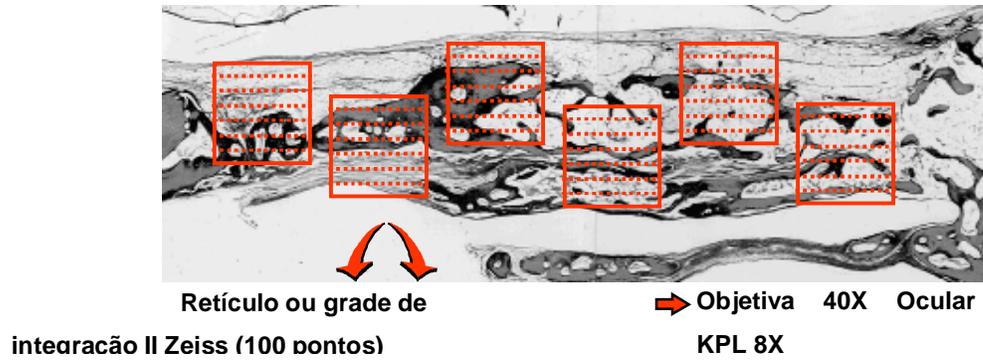


FIGURA 8 - Representação esquemática da análise histomorfométrica.

5 RESULTADOS

5.1 Efeitos adversos do aloxano

Para a obtenção dos 18 coelhos diabéticos necessários para a realização desse estudo, 24 animais foram submetidos à infusão de aloxano. Dentre esses, três animais morreram por parada cardíaca e respiratória, dois por efeitos de alta toxicidade da substância, um por hipoglicemia acentuada e convulsões de longa duração até ocorrer a parada cardíaca, um foi sacrificado devido à paralisia das patas traseiras e três apresentaram resistência à substância (euglicêmico).

Dentre os 18 animais diabéticos obtidos, dois apresentavam crises hipoglicêmicas, três desenvolveram cetoacidose devido à hiperglicemia acentuada constante (acima de 500mg/dL). Alguns animais apresentaram hiperglicemia controlável, sem expressar manifestações clínicas que comprometessem o estado geral do animal.

Após a administração do aloxano, os pâncreas dos animais diabéticos foram removidos e analisados microscopicamente para a averiguação dos efeitos da substância. Os cortes microscópicos revelaram desorganização do parênquima com presença de células acinares atípicas, escassa quantidade de vesículas secretoras, bem como atrofia e diminuição do número de ilhotas de Langerhans, em algumas regiões, notava-se a presença de células endócrinas pequenas em degeneração (Figura 9).

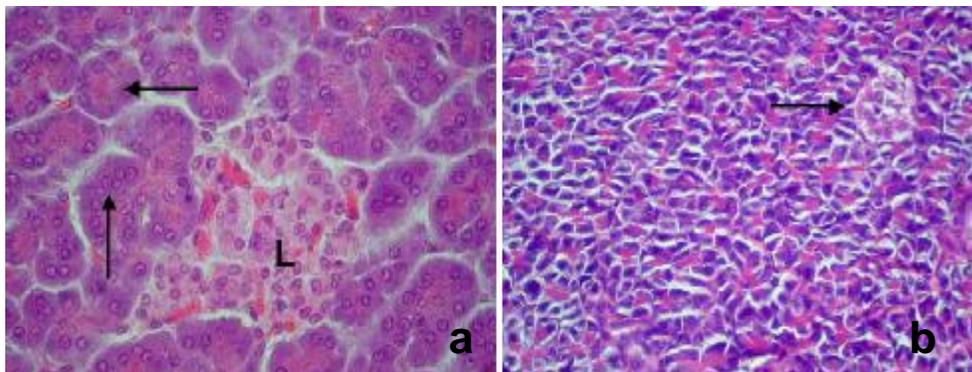


FIGURA 9 – Fotomicrografias de pâncreas: a) pâncreas de aspecto normal com presença de células acinosas exibindo extensa basofilia citoplasmática na porção basal do citoplasma, com numerosas vesículas secretoras apicais (setas) e agregado esferoidal de células endócrinas poligonais e claras, denominado de ilhota endócrina de Langerhans (L); b) pâncreas de coelhos diabéticos mostrando células acinares atípicas, moderada quantidade de vesículas secretoras e atrofia de ilhota de Langerhans exibindo células endócrinas pequenas em degeneração (setas), aumento original: 200X e 100X. Coloração-HE.

5.2 Complicações gerais e bucais dos animais diabéticos

As complicações do DM são bastante significativa e devem sempre ser consideradas no tratamento dos pacientes portadores desta doença. As mais relevantes observadas em nossos estudos foram perda de peso, poliúria e polifagia em todos os animais diabéticos (18/18). Além disso, dois animais apresentaram cetoacidose associada às convulsões (2/20) e um desenvolveu pé diabético (1/18) (Figura 10).



FIGURA 10 – Lesão ulcerativa com extensas áreas de necrose superficial na pata posterior do coelho diabético.

Na região do defeito ósseo, cinco animais (cinco/dezoito) apresentaram abscesso e um (1/18) exibiu infecções fúngica e bacteriana na região submandibular, estendendo-se para o pescoço e tronco. Na cetoacidose, o tratamento preconizado foi administração de solução de ringer com lactato de sódio (Equiplex Industria farmacêutica Ltda, Goiânia), na dosagem de 40mL/kg de peso corpóreo, por via subcutânea, durante quatro dias. As convulsões foram tratadas com benzodiazepínico (COMPAZ, Pfizer Pharmacia, São Paulo, Brasil), na dosagem 0,6mL/kg de peso corpóreo, por via intramuscular. As infecções fúngicas e bacterianas foram tratadas com a associação de valerato de betametasona, sulfato de gentamicina, tolnaftato e clioquinol (Quadriderm[®], Schering-Plough S/A, Rio de Janeiro, Brasil), com aplicação tópica de duas vezes ao dia, até o desaparecimento da lesão. Além disso, realizou-se limpeza da ferida com solução anti-séptica emoliente (Soapex[®] triclosano 0,5%, Galderma Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), uma vez ao dia, antes da aplicação da medicação eleita (Figura 11).

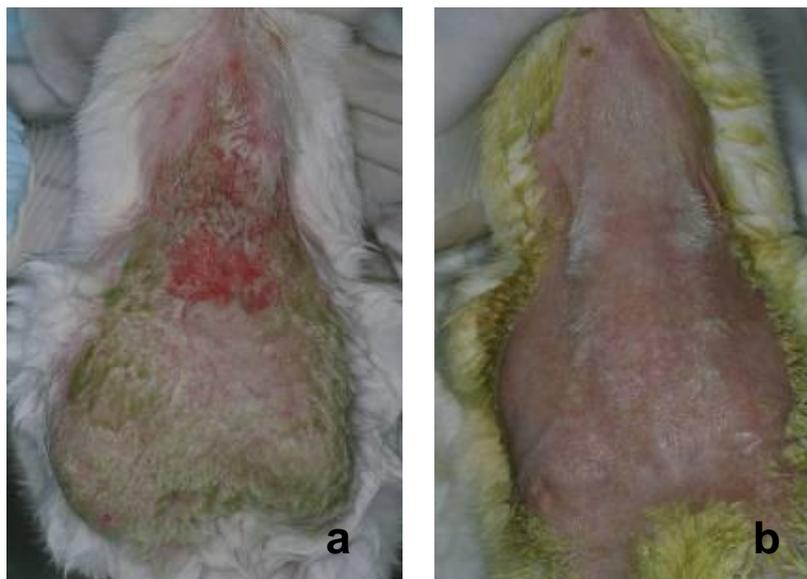


FIGURA 11 – Complicação da doença: a) Lesão ulcerativa e descamativa, com prurido, na região submandibular, estendendo-se para o pescoço e tronco; b) 15 dias após o tratamento preconizado com associação de valerato de betametasona, sulfato de gentamicina, tolnaftato e clioquinol.

A formação do abscesso ocorreu aproximadamente cinco dias após a confecção dos defeitos ósseos cirúrgicos e o tratamento preconizado foi a assepsia do local com gluconato de clorexidina 0,12% (Periogard, Colgate - Palmolive, São Paulo, Brasil), drenagem com o auxílio de peróxido de hidrogênio e aplicação tópica de antibiótico eritromicina gel 4% (Eryacnen, Galderma Brasil LTDA, São Paulo, Brasil), uma vez ao dia, durante dez dias. Além disso, foi administrado o antibiótico pentabiótico, em intervalos de três dias, durante todo o período do tratamento, bem como antiinflamatório Celebra 6mg/dia/kg por cinco dias (Figura 12).

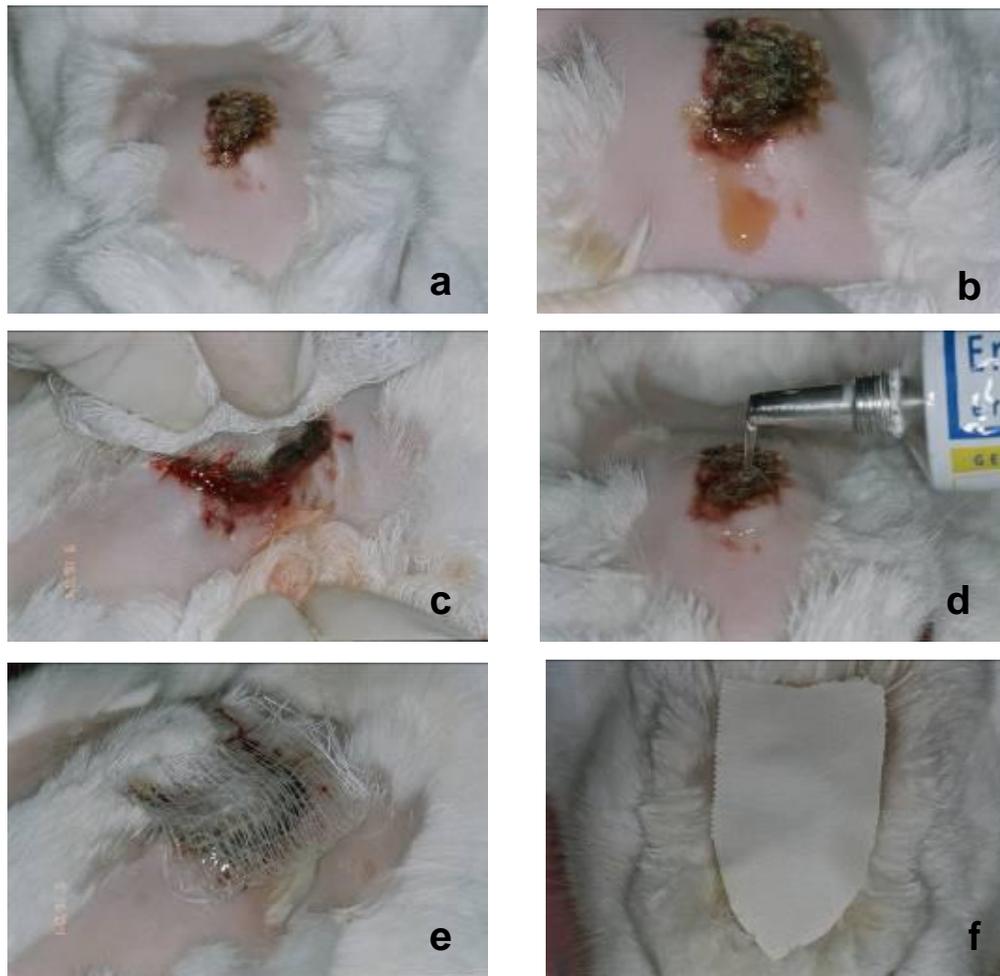


FIGURA 12- Abscesso na região do osso parietal: a) aumento volumétrico com restos necróticos sobre o defeito; b) saída de secreção purulenta; c) assepsia e drenagem; d) aplicação tópica da eritromicina gel 4%; e) e f) curativo.

Ao exame intraoral, foi identificada gengivite crônica na região de incisivos centrais inferiores nos animais diabéticos que receberam suplemento alimentar *diet* (180ml/dia - Diabetic, Novartis Consumer Health Ltda, Rio de Janeiro, Brasil), durante a sua fase de inanição (Figura 13).



FIGURA 13- Gengivite crônica na região de incisivos centrais inferiores.

5.3 Análise radiográfica

5.3.1 Aspectos radiográficos

Os achados radiográficos mais freqüentes, observados nos espécimes dos grupos controle e diabético, foram analisados em conjunto dentro de cada período considerado no experimento.

5.3.1.1 Período de 15 dias

No grupo controle-normal, observou-se que a topografia do defeito era definida, porém apresentava limites imprecisos. Em algumas regiões da parede, notou-se áreas radiopacas compatíveis com as imagens de tecido ósseo normal (Figura 14). No grupo diabético, observou-se imagens radiolúcidas, sugestivas de defeito ósseo, exibindo limites bem definidos e de maior intensidade quando comparado com os demais grupos. Em algumas regiões, foi observado ainda discretas áreas radiopacas justapostas às paredes do defeito (Figura 14). No grupo diabético-PTFE, os defeitos exibiam imagens radiolúcidas, com limites precisos e discretamente indefinidos. As áreas radiopacas, justapostas às paredes do defeito, eram mais extensas e homogêneas quando comparadas com as evidenciadas no grupo anterior (Figura 14).

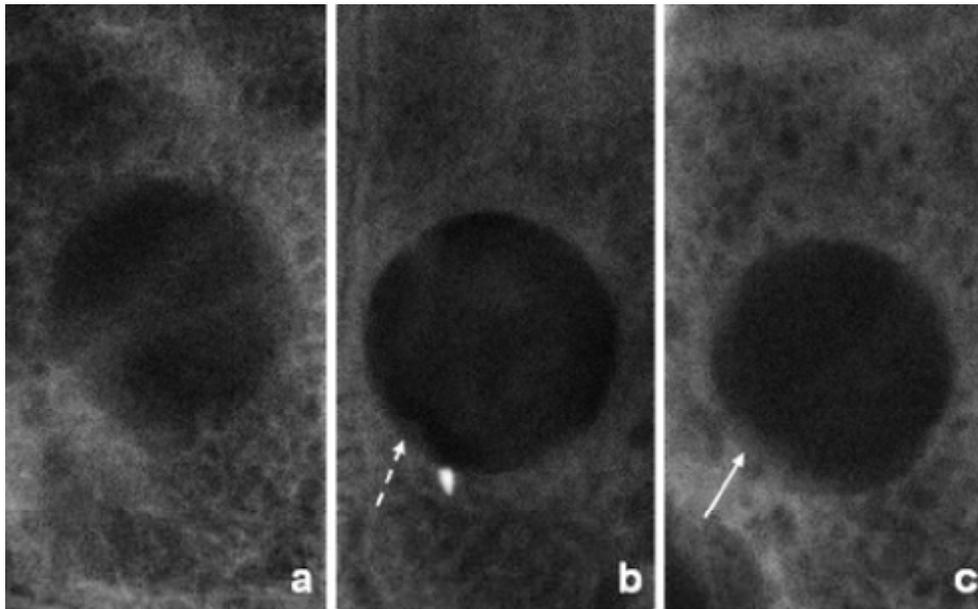


FIGURA 14 - Imagens radiográficas digitais dos defeitos ósseos cirúrgicos no osso parietal de coelho no período de 15 dias: a) controle; b) diabético exibindo áreas radiopacas justapostas às paredes do defeito (seta tracejada); c) diabético-PTFE mostrando áreas radiopacas extensas e homogêneas (seta contínua).

5.3.1.2 Período de trinta dias

No grupo controle, a região do defeito era pouco visualizada e seus limites apresentavam indefinidos. Observou-se também extensas áreas radiopacas preenchendo a porção central e discretas imagens radiolúcidas, de tamanho e forma irregular, próximas às paredes do defeito (Figura 15). No grupo diabético, notou-se que a topografia da loja cirúrgica era ainda visualizada, com limites irregulares. A radiopacidade apresentava-se aumentada da periferia para a porção central, caracterizando um crescimento ósseo centrípeto, porém se limitava às margens do defeito. Em consequência a esses achados, houve uma predominância significativa de áreas radiolúcidas neste grupo (Figura 15). No grupo diabético-PTFE, observou-se que a topografia do defeito era pouco visualizada, exibindo limites imprecisos e irregulares, com um aumento gradativo de radiopacidade em sua porção central. A região mais periférica do defeito apresentava radiopacidade semelhante ao tecido ósseo normal (Figura 15).

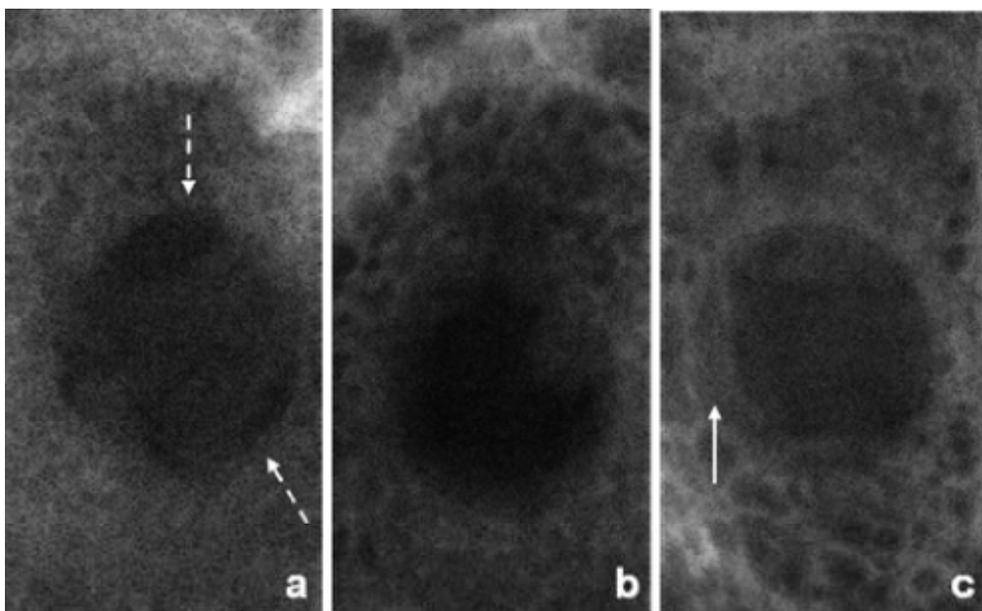


FIGURA 15- Imagens radiográficas digitais dos defeitos ósseos cirúrgicos no osso parietal de coelho no período de trinta dias: a) controle exibindo imagens radiolúcidas próximas às paredes do defeito (setas tracejadas); b) diabético e c) diabético-PTFE mostrando imagem radiopaca semelhante ao tecido ósseo normal (seta contínua).

5.3.1.3 Período de sessenta dias

No grupo controle, a imagem do defeito era pouco visualizada. Em algumas regiões, os limites das suas paredes podiam ser observados, embora houvesse evidências de aumento de radiopacidade em todo o contorno da loja cirúrgica (Figura 16). No grupo diabético, a topografia da imagem da loja cirúrgica estava bem visualizada, porém os limites de suas paredes mostravam-se imprecisos e irregulares, quando comparados com os períodos anteriores (Figura 16). No grupo diabético-PTFE, a topografia das imagens do defeito era pouco visualizada e as suas paredes mostravam-se imprecisas e irregulares. Houve um aumento gradativo de radiopacidade em sua porção central, porém de menor intensidade quando comparado com o grupo controle (Figura 16).

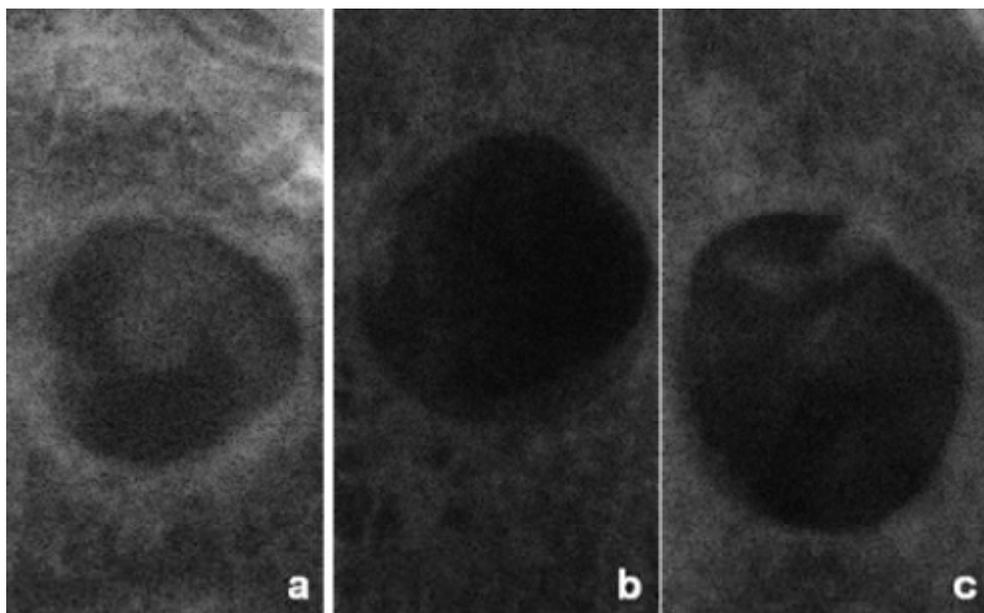


FIGURA 16 - Imagens radiográficas digitais dos defeitos ósseos cirúrgicos no osso parietal de coelho no período de sessenta dias: a) controle, b) diabético; c) diabético-PTFE.

5.3.1.4 Período de noventa dias

No grupo controle, as imagens radiolúcidas, correspondente ao defeito, continuavam evidentes, porém, mais discretas quando comparado com os períodos anteriores. Além disso, podiam ser observadas algumas regiões com imagens mais radiolúcidas quando comparadas com as outras áreas dos defeitos neste mesmo período (Figura 17). No grupo diabético, a topografia da imagem da loja cirúrgica era ainda visualizada e os limites de suas paredes eram mais imprecisos e irregulares, quando comparados com os períodos anteriores deste mesmo grupo. A porção central exibia extensas áreas radiolúcidas quando comparadas com os demais grupos de estudo (Figura 17). No grupo diabético-PTFE, a topografia das imagens do defeito não era mais visualizada e havia maior intensidade radiopaca na região periférica do que na porção central, resultante do crescimento centrípeto durante o processo de reparo ósseo. Houve um aumento gradativo de radiopacidade em toda a sua extensão quando comparado com os grupos controle e diabético-PTFE (Figura 17).

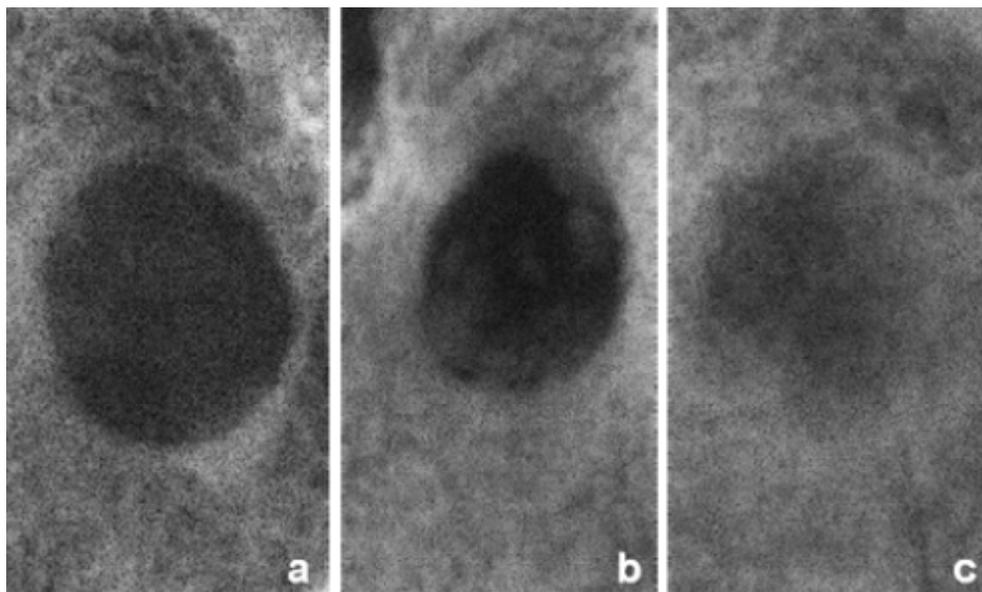


FIGURA 17- Imagens radiográficas digitais dos defeitos ósseos cirúrgicos no osso parietal de coelho no período de noventa dias: a) controle; b) diabético; c) diabético-PTFE.

5.3.2 Análise estatística da densidade óptica

O valor da média da densidade óptica obtida de seis fragmentos ósseos normais, removidos durante a confecção do defeito ósseo cirúrgico, foi de 81,21.

Os valores das médias e desvio padrão (σ) da densidade óptica, nos terços anterior, médio e posterior dos defeitos ósseos dos grupos controle (C), diabéticos (D) e diabético-PTFE (D-PTFE), com os diferentes períodos encontram-se expressos na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores das médias e desvio padrão (σ) das densidades ópticas dos grupos estudados nos diferentes períodos.

Períodos	Grupos		
	C	D	D-PTFE
15	33,33±3,42	27,70±1,30	30,63±6,00
30	36,22±2,54	21,52±1,61	38,55±6,77
60	45,67±8,36	23,33±2,62	31,85±3,55
90	50,51±11,02	40,89±6,24	56,37±18,10

A Figura 18 representa os valores das médias de densidade óptica de formação de tecido ósseo no defeito cirúrgico dos grupos controle e diabético, nos períodos de observação determinados para este estudo.

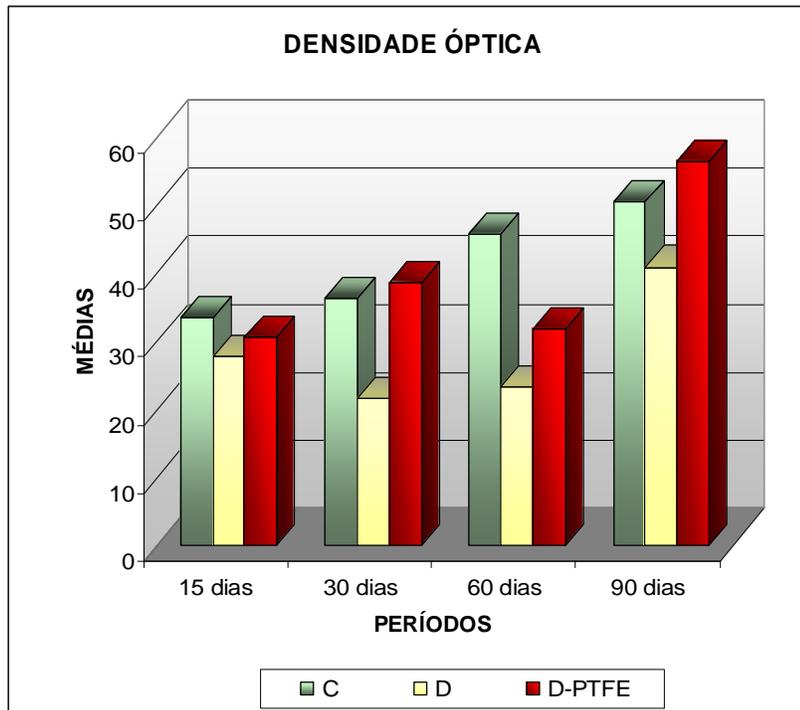


FIGURA 18- Comparação das médias de densidade óptica de formação de tecido ósseo nos defeitos cirúrgicos dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético +PTFE (D-PTFE).

A Figura 19 representa a evolução das médias das densidades ópticas, dentro de cada grupo analisado, ao longo dos períodos. De acordo com o gráfico (Figura 19), pode-se constatar a uniformidade na progressão das médias de densidade óptica, caracterizando a crescente formação de tecido ósseo, no decorrer dos períodos analisados do grupo controle. Dentre todos os grupos estudados, verificamos que nos grupos diabéticos esta progressão não foi uniforme, considerando ligeira queda nas médias de densidade óptica aos trinta e sessenta dias do grupo diabético e aos sessenta dias do grupo diabético-PTFE.

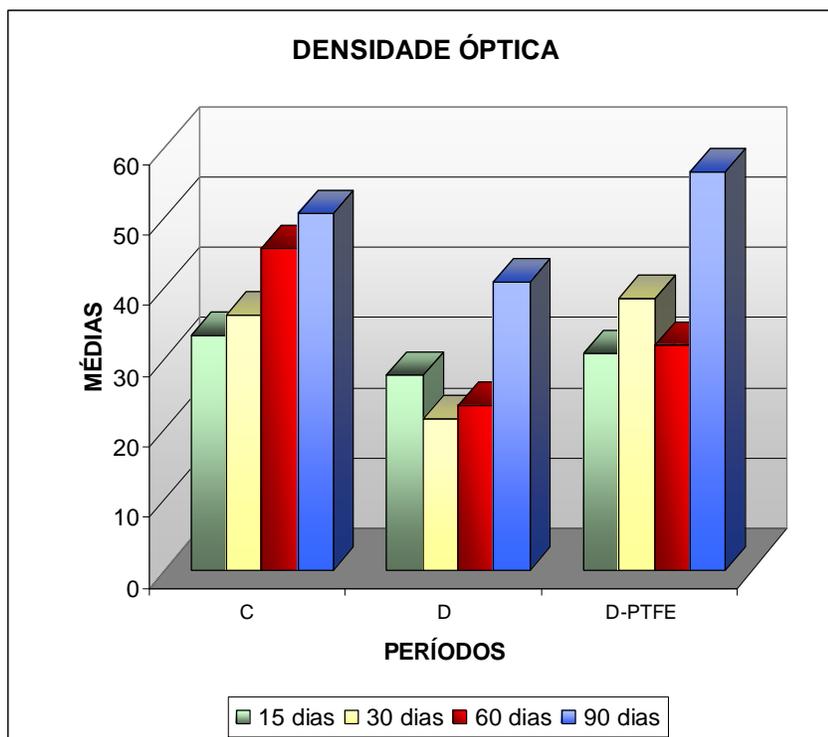


FIGURA 19- Evolução das médias de densidade óptica de formação de tecido ósseo nos defeitos cirúrgicos dos períodos de observação dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético + PTFE (D-PTFE).

Comparando os grupos dois a dois, pôde-se verificar que não houve diferença estatisticamente significativa nos períodos de 15, 30, 60 e 90 dias entre as médias dos grupos C, D e D-PTFE (Tabela 2).

Tabela 2 - Análise da variância (ANOVA) entre os grupos controle, diabético e diabético-PTFE, nos diferentes períodos observados.

Período	Grupos	p
15	C/D	p>0.05
	C/D-PTFE	p>0.05
	D/D-PTFE	p>0.05
30	C/D	p>0.05
	C/D-PTFE	p>0.05
	D/D-PTFE	p>0.05
60	C/D	p>0.05
	C/D-PTFE	p>0.05
	D/D-PTFE	p>0.05
90	C/D	p>0.05
	C/D-PTFE	p>0.05
	D/D-PTFE	p>0.05

* diferença estatisticamente significativa p<0,05

5.4 Análise microscópica

Os achados histológicos mais freqüentes observados nos espécimes foram analisados em conjunto dentro de cada período considerado no experimento.

5.4.1 – Aspectos microscópicos

5.4.1.1 – Período de 15 dias

Os cortes histológicos do grupo controle mostravam defeito ósseo preenchido por tecido conjuntivo osteogênico e por discretas trabéculas ósseas imaturas. O tecido conjuntivo era composto principalmente por células osteoprogenitoras e por fibras colágenas, dispostas paralelamente entre si, e apresentava moderado infiltrado de

células inflamatórias mononucleares. As trabéculas ósseas que preenchem a área do defeito apresentavam-se localizadas nas extremidades, estendendo-se para porção central, bem celularizadas, caracterizando-se imaturas, de aspecto delicado e irregular. Em algumas áreas, essas trabéculas mostravam arranjo irregular e forma ora globular ora fusiforme na porção periférica do defeito. Alguns cortes histológicos exibiam invasão de tecidos indesejáveis, tais como tecido muscular e adiposo, no interior do defeito (Figura 20).

No grupo diabético a área do defeito ósseo apresentava-se preenchida por tecido conjuntivo osteogênico abundantemente celularizado e por discretas trabéculas ósseas imaturas. O tecido conjuntivo era composto por células osteoprogenitoras e por fibras colágenas, dispostas paralelamente entre si, e permeado por moderado infiltrado de células inflamatórias mononucleares. As trabéculas ósseas eram imaturas, bem celularizadas, delicadas e irregulares, bem como estavam localizadas nas extremidades, estendendo-se para região central. Em alguns cortes histológicos, foi observado a invasão de tecido muscular e conjuntivo, originadas das áreas adjacentes, para o interior do defeito. A faixa de tecido neoformado apresentava menor espessura quando comparada com a cortical óssea original (Figura 20).

No grupo diabético-PTFE, a região do defeito mostrava-se preenchida por tecido conjuntivo osteogênico, bem celularizado e vascularizado, e por trabéculas ósseas imaturas. As trabéculas neoformadas se apresentaram numericamente aumentadas quando comparadas com o grupo anterior. Em alguns cortes histológicos, observou-se ainda a presença de trabéculas ósseas com arranjo ora irregular ora globular na porção central. Além disso, áreas de hemorragia intersticial e infiltrado de células inflamatórias mononucleares foram identificadas. A faixa de tecido no interior do defeito exibia a mesma espessura da cortical óssea original (Figura 20).

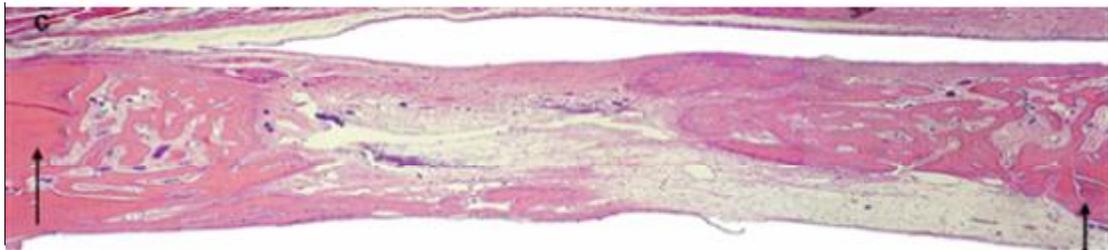


FIGURA 20 - Fatores de controle, ratos com defeitos unilaterais da mandíbula de tecido ósseo no período de 180 dias (postop): a) controle-normal; b) defeito; c) defeito+PTFE. H.E., aumento original: 50X.

5.4.1.2 Período de trinta dias

No grupo controle, a área do defeito mostrava-se preenchida por tecido ósseo imaturo e por tecido conjuntivo osteogênico. As trabéculas ósseas eram maduras e espessas nas extremidades e imaturas de arranjo irregular na porção central. Havia maior quantidade de trabéculas ósseas nas extremidades do que na porção central do defeito, caracterizando um crescimento ósseo centrípeto. O tecido conjuntivo osteogênico apresentava-se bem celularizado com moderado infiltrado de células inflamatórias mononucleares e encontrava-se em maior quantidade na porção central. O tecido recém-formado, presente no interior do defeito, mostrava-se mais delgado quando comparado com a espessura da cortical óssea original (Figura 21).

No grupo diabético, a área do defeito mostrava-se preenchido por tecido ósseo imaturo e por tecido conjuntivo osteogênico. As trabéculas ósseas eram espessas e de arranjo e forma irregular. Havia maior quantidade dessas estruturas nas extremidades do que na porção central do defeito. O tecido conjuntivo osteogênico era bem celularizado e exibia moderado infiltrado de células inflamatórias mononucleares. Além disso, foi observada delgada faixa de tecido formado, exibindo menor espessura quando comparada com a cortical óssea original (Figura 21).

No grupo diabético-PTFE, a região do defeito estava preenchido por tecido ósseo e tecido conjuntivo osteogênico. As trabéculas ósseas formadas eram maduras e imaturas, espessas e homogêneas, bem como exibiam arranjo linear. Essas estruturas estendiam-se em sentido a porção central do defeito, acompanhando o espaço virtual da membrana de PTFE. Essas características demonstraram a propriedade osteocondutora da barreira oclusiva e o crescimento centrípeto do tecido ósseo formado. Foi evidenciado aumento de quantidade de trabéculas ósseas quando comparado com grupo anterior. O tecido conjuntivo osteogênico revelava-se bem organizado e

suas fibras colágenas estavam dispostas paralelamente entre si. Além disso, foi identificado moderado e difuso infiltrado de células inflamatórias mononucleares. Em alguns cortes histológicos, foi observada medula óssea neoformada, localizada principalmente nas áreas próximas ao limites do defeito. A faixa de tecido ósseo formado mostrava-se com a mesma espessura da cortical óssea original (Figura 21).

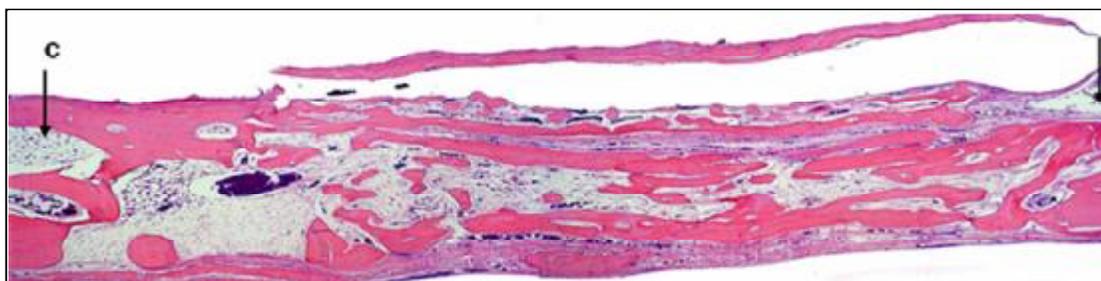


FIGURA 21 - Foto de micrografias das lâminas da região do defeito ósseo no período de 14 dias (setas); s) controle normal, b) distúrbio, c) distúrbio com PTE. H.E., aumento original 50X.

5.4.1.3 Período de sessenta dias

No grupo controle, a região do defeito era preenchida por trabéculas ósseas maduras com arranjo e forma irregular e por tecido conjuntivo osteogênico e fibroso, exibindo uma lâmina tecidual. O tecido ósseo recém-formado exibia canais de Harvers amplos e crescimento centrípeto, assim como notávamos a presença de células osteoclásticas nas áreas de remodelação óssea. A espessura da referida lâmina era menor quando comparada com a espessura das corticais ósseas originais (Figura 22).

No grupo diabético, a área correspondente ao defeito ósseo, apresentava-se preenchida por tecido conjuntivo e por discretas trabéculas ósseas. O tecido conjuntivo estava desorganizado, exibindo fibras colágenas dispostas irregularmente. As trabéculas ósseas eram imaturas na porção central e madura na periferia. A quantidade de tecido ósseo era menor quando comparado com os grupos controle e diabético-PTFE. Alguns cortes histológicos exibiam invasão de tecidos indesejáveis, tais como tecido muscular e adiposo, no interior do defeito (Figura 22)

No grupo diabético-PTFE, a região do defeito estava preenchida por tecido ósseo e tecido conjuntivo osteogênico desorganizado. As trabéculas ósseas formadas eram maduras nas extremidades e imaturas na porção central. Em ambas as porções, evidenciavam-se trabéculas espessas e homogêneas exibindo arranjo linear. Essas estruturas estendiam-se para a porção central do defeito, acompanhando o espaço virtual da barreira de PTFE. Esses aspectos caracterizam crescimento centrípeto do tecido ósseo neoformado e propriedade osteocondutora da barreira oclusiva. A faixa de tecido ósseo neoformado, próxima aos limites do defeito, apresentava espessura semelhante às corticais ósseas originais (Figura 22).

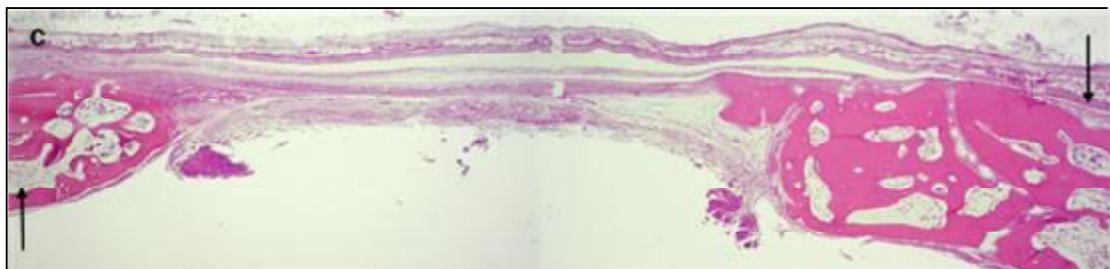
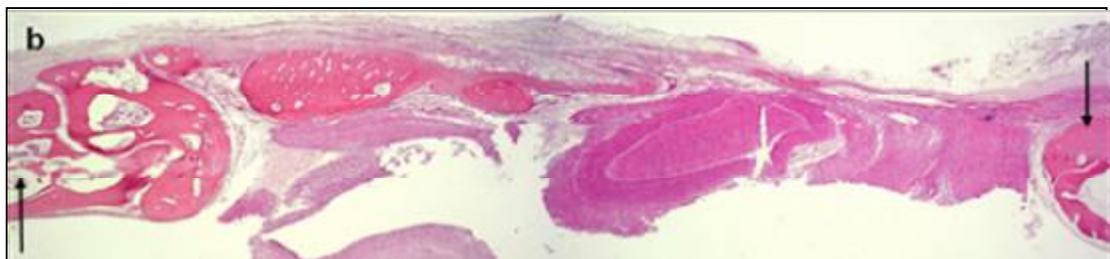
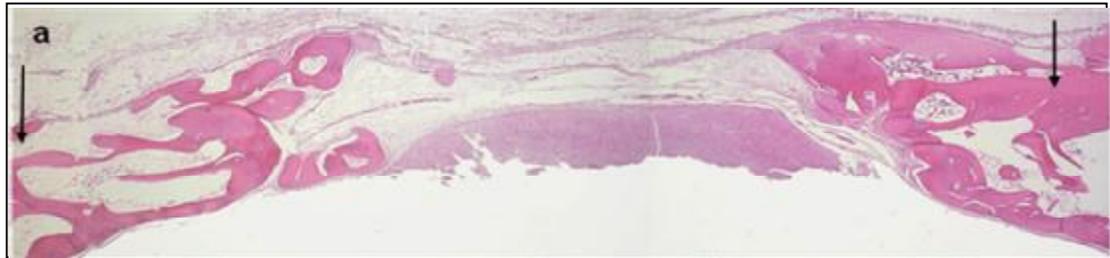


FIGURA 2A-2C - Imagens histológicas das lâminas da retina do olho do cão (cão) no período de escassez de luz (setor): a) controle normal, b) diabetes, c) diabetes + POAE. H.E., aumento original: 40X.

5.4.1.4 Período de noventa dias

No grupo controle, a região do defeito era preenchida por trabéculas ósseas maduras com arranjo e forma irregular e por tecido conjuntivo fibroso, formando uma lâmina tecidual. A espessura dessa lâmina mostrava-se maior nesse período estudado do que no período anterior. O tecido conjuntivo fibroso era permeado por trabéculas ósseas recém-formadas (Figura 23).

No grupo diabético, observava-se a presença de tecido conjuntivo fibroso ou cicatricial, principalmente, localizado na região central do defeito ósseo, a qual, algumas vezes, estava entremeado por finas trabéculas ósseas maduras e irregulares. A região periférica exibia um trabeculado maduro e espesso, estendendo-se para o centro da loja cirúrgica. Neste grupo, a formação de tecido óssea era significativamente menor quando comparada com os grupos anteriores. O referido tecido mostrava-se desorganizado com poucos sistemas de Harvers. Em todos os defeitos, evidenciou-se a invasão de tecidos indesejados no seu interior (Figura 23).

No grupo diabético-PTFE, observou-se que o defeito foi preenchido por trabéculas ósseas maduras, com arranjo mais regular e mais espessas quando comparado com o grupo controle, e entremeado por tecido conjuntivo fibroso. Pequena quantidade de tecido conjuntivo osteogênico estava presente e a espessura da cortical óssea estava preservada na maioria dos defeitos estudados. Foram identificados espaços medulares amplos preenchidos com medula hematopoiética. Além disso, foi observado o deslocamento da barreira de PTFE na maioria dos fragmentos examinados. Havia melhor qualidade estrutural óssea neste grupo, caracterizado pelo maior grau de organização do tecido ósseo, bem como de apresentar trabeculado espesso e numeroso com distribuição regular e uniforme, tanto na extensão quanto na profundidade do defeito cirúrgico (Figura 23).

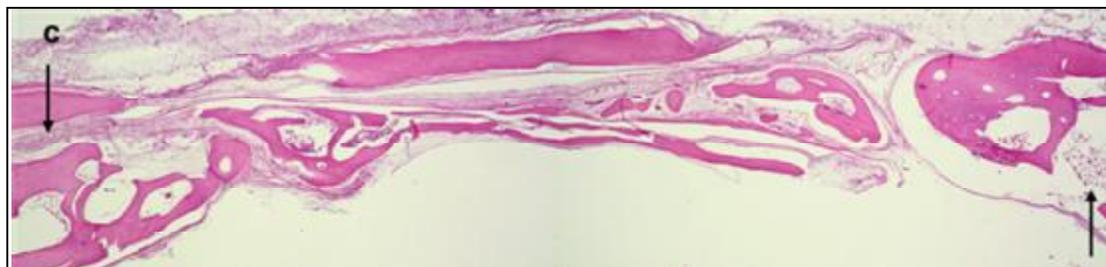
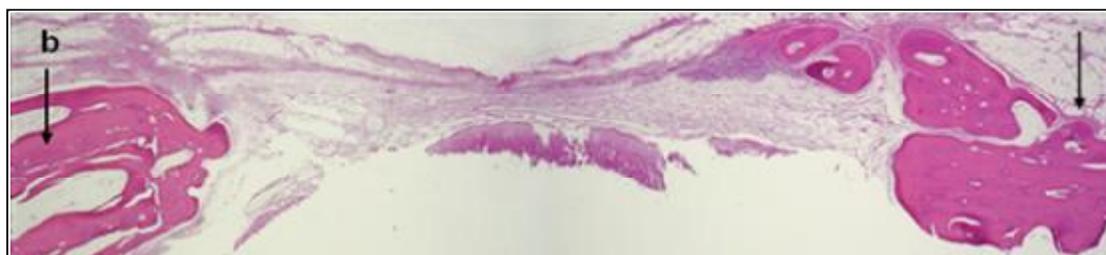
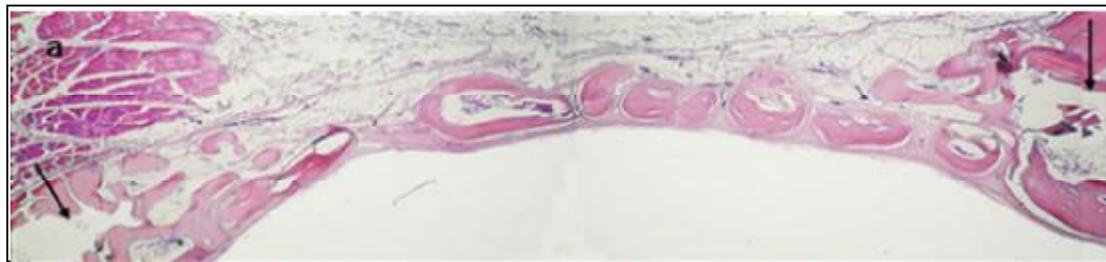


FIGURA 29 - Histomorfopatólogia das interfaces da regulação óssea em pontos de injeção (postos): a) controle normal; b) dia 30; c) dia 30+PTBE. H.E, aumento original: 20X.

5.5 Análise estatística da histomorfometria

A análise histomorfométrica teve como finalidade mensurar a densidade de volume da matriz óssea neoformada nos defeitos ósseos dos grupos controle, diabético e diabético-PTFE, bem como fornecer os dados necessários à análise estatística destas medições.

Os valores das médias e desvio padrão da histomorfometria da região dos defeitos ósseos dos grupos controle (C), diabéticos (D), diabético-PTFE (D-PTFE), com os diferentes períodos, encontram-se expressos na Tabela 3.

Tabela 3- Valores das médias e desvio padrão da histomorfometria dos grupos estudados nos diferentes períodos.

Períodos	Grupos		
	C	D	D-PTFE
15	31.66±2.478	18.48±4.843	17.60±0.208
30	39,96±0.430	30.43±15.06	36.70±4.107
60	45.60±4.095	36.44±7.937	32.74±0.924
90	53.24±5.090	44.10±17.52	51.93±1.204

C- Controle; D- Diabético; D-PTFE- Diabético com politetrafluoretileno

As médias das densidades de volume de matriz óssea durante o processo de reparo ósseo dos diferentes grupos estudados, expressas em números absolutos, encontradas nos oito campos histológicos de cada animal avaliado, foram demonstradas nas Tabela 4, 5, e 6.

Tabela 4 – Média das densidades de volume de matriz óssea observada durante o processo de reparo nos defeitos cirúrgicos do grupo controle.

Grupo Controle				
Defeitos	1ª Leitura	2ª Leitura	3ª Leitura	Média
D1-15 dias	28,78	28,64	29,03	28,81
D2-15 dias	32,39	35,56	31,97	33,30
D3-15 dias	33,43	32,14	33,05	32,87
D1-30 dias	41,37	40,14	39,68	40,39
D2-30 dias	39,78	39,58	40,01	39,53
D3-30 dias	40,57	39,86	39,84	39,96
D1-60 dias	41,85	41,80	40,89	41,51
D2-60 dias	52,20	49,10	47,81	49,70
D3-60 dias	47,02	45,45	44,35	45,60
D1-90 dias	51,58	63,12	60	58,33
D2-90 dias	50,37	49,76	44,32	48,15
D3-90 dias	50,97	56,44	52,16	53,24

Tabela 5 – Média das densidades de volume de matriz óssea observada durante o processo de reparo nos defeitos cirúrgicos do grupo diabético.

Grupo Diabético				
Defeitos	1ª Leitura	2ª Leitura	3ª Leitura	Média
D1-15 dias	19,01	16,55	14,79	16,78
D2-15 dias	16,28	14,33	13,53	14,71
D3-15 dias	29,41	21,85	13,33	23,94
D1-30 dias	23,89	23,66	24,53	24,02
D2-30 dias	19,70	19,30	19,89	19,63
D3-30 dias	47,32	48,60	46,97	47,63
D1-60 dias	42,05	41,39	38,89	40,77
D2-60 dias	42,35	40,30	41,16	41,27
D3-60 dias	28,10	26,37	27,37	27,28
D1-90 dias	30,72	25,06	24,68	26,82
D2-90 dias	44,27	44,89	41,76	43,64
D3-90 dias	59,03	63,83	62,70	61,85

Tabela 6 – Média das densidades de volume de matriz óssea observada durante o processo de reparo nos defeitos cirúrgicos do grupo diabético-PTFE

Grupo Diabético-PTFE				
Defeitos	1ª Leitura	2ª Leitura	3ª Leitura	Média
D1-15 dias	17,37	17,87	17,68	17,84
D2-15 dias	17,93	16,87	17,32	17,37
D3-15 dias	17,85	17,43	18,05	17,78
D1-30 dias	40,90	36,92	36,20	38,00
D2-30 dias	49,70	36,50	33,80	40,00
D3-30 dias	32,45	30,28	33,55	32,10
D1-60 dias	32,47	33,22	30,89	32,19
D2-60 dias	32,37	32,45	31,87	32,23
D3-60 dias	34,78	34,00	32,66	33,81
D1-90 dias	49,68	50,91	51,18	50,59
D2-90 dias	54,68	51,93	50,24	52,28
D3-90 dias	56,12	52,44	50,22	52,92

A Figura 24 representa os valores das densidades de volume de matriz óssea neoformada dos grupos controle (C), diabéticos (D) e diabético-PTFE (D-PTFE), nos períodos de observação determinados para este estudo. De acordo com o gráfico pôde-se constatar, a uniformidade na progressão das médias da quantidade de matriz óssea neoformada no decorrer dos períodos analisados dos grupos C e D. Nos grupos, Diabético-PTFE, entretanto, esta progressão não foi uniforme, considerando a ligeira queda na média de densidade de matriz óssea neoformada aos sessenta dias. Este declínio, porém, não foi estatisticamente significativo.

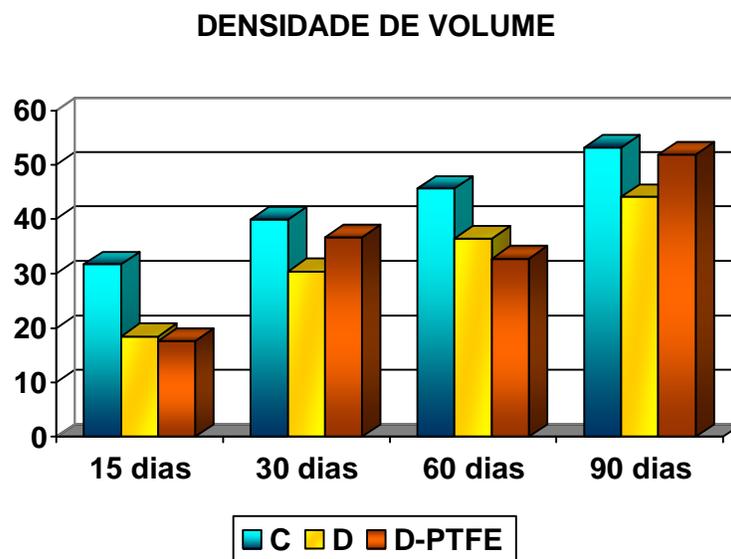


FIGURA 24 - Comparação das médias de densidade de volume de matriz óssea neoformada nos defeitos cirúrgicos dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético-PTFE (D-PTFE)

A Figura 25 representa a evolução dos valores das densidades de volume de matriz óssea dentro de cada grupo analisado, ao longo dos períodos. De acordo com o gráfico, pode-se constatar que não houve uma uniformidade na progressão das médias de densidade de volume, caracterizando uma queda na formação de tecido ósseo, no decorrer dos períodos de sessenta dias analisados do grupo D-PTFE.

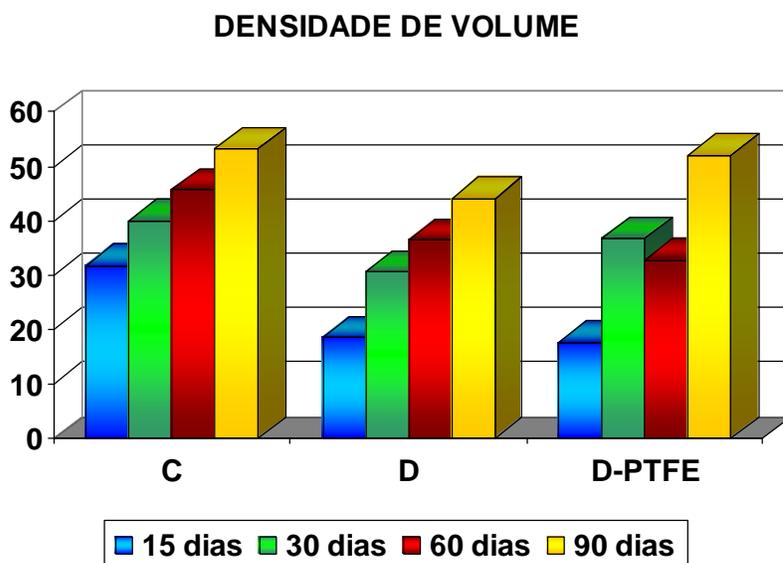


FIGURA 25- Evolução das médias de densidade de volume de matriz óssea neoformada nos períodos de observação dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético-PTFE (D-PTFE).

De acordo com os valores expressados na Tabela 7, os grupos foram comparados de dois a dois, o que nos permitiu averiguar que não houve acentuada diferença significativa nos grupos C,D e D-PTFE durante os períodos estudados.

Tabela 7- Análise da variância (ANOVA) entre os grupos controle (C), diabético (D) e diabético-PTFE (D-PTFE).

Período	Grupos	p
15	C/D	p>0.05
	C/D-PTFE	p>0.05
	D/D-PTFE	p>0.05
30	C/D	p>0.05
	C/D-PTFE	p>0.05
	D/D-PTFE	p>0.05
60	C/D	p>0.05
	C/D-PTFE	p>0.05
	D/D-PTFE	p>0.05
90	C/D	p>0.05
	C/D-PTFE	p>0.05
	D/D-PTFE	p>0.05

* diferença estatisticamente significativa p<0,05

6 DISCUSSÃO

A reparação óssea ausente ou incompleta é um problema clínico relevante representando problemas de difícil solução na Medicina e Odontologia. Exemplos no esqueleto facial incluem cistos ou lesões periapicais, avulsões dentárias por traumatismos, fratura radicular, doenças periodontais avançadas, extrações com osteotomia (SIMION et al.⁵⁵ 1998). Em locais onde a perda óssea tenha comprometido a função e estética do indivíduo, freqüentemente há a necessidade de criar novo osso.

Dentre os diversos distúrbios causados pelo Diabete melito (DM) sobre o metabolismo ósseo, estão as alterações da síntese de proteoglicanas (WEISS⁶², 1981), diminuição da atividade osteoblástica (RICO et al.⁴⁷, 1989), resultando no retardo da formação dos tecidos ósseo e osteóide (GOODMAN & HORI²³, 1984), e o desequilíbrio na homeostase mineral, reduzindo a resistência estrutural óssea (FUNK et al.¹⁹, 2000). O descontrole dessas alterações pode provocar quadros agudos de osteopenia (GOODMAN & HORI²³, 1984; HOUGH et al.²⁹, 1981; KAYATH et al.³⁰, 1998) e, conseqüentemente, osteoporose (WEISS et al.⁶², 1981; TSUCHIDA et al.⁵⁹, 2000).

Outras evidências relevantes que poderiam justificar o retardo na reparação óssea seriam as mudanças nos componentes da matriz extracelular e do metabolismo ósteo-mineral, causadas pelos produtos finais da glicolização avançada (AGEs-Advanced Glycolization Endproducts). Esse AGEs é caracterizado pelo resultado de uma reação entre os produtos Amidore (interação reversível entre os metabólitos da glicose com as proteínas responsáveis pela formação das bases de Schiff ou Amidore) com as outras moléculas. O aumento das AGEs ocorre concomitantemente com o aumento da glicemia, sendo um fenômeno patognomônico em indivíduos portadores de diabetes (FIORELLINI et al.¹⁷, 1999). De acordo com FIORELLINI et al. (1999), o AGEs causa mudanças qualitativas e quantitativas nos componentes da matriz extracelular, tais como colágeno, proteoglicanas e laminina, comprovando a sua relação com a patologia do diabetes. Além disso, foi constatado uma diminuição no número total de proteoglicanas, assim como do tamanho das moléculas agregadas. Portanto, essas mudanças, na matriz extracelular, causam alterações específicas na formação e remodelação óssea.

O Diabetes melito caracteriza-se por alterações dos metabolismos de carboidratos, gorduras e proteínas, devido à falta de insulina ou à sua incapacidade de agir na transferência de glicose do plasma para o citoplasma das células. A insulina exerce efeitos nos tecidos adiposos, muscular e ósseo, provocando alterações nas características da membrana celular, na permeabilidade da glicose, no transporte de aminoácidos e no fluxo de potássio (GOODMAN & GILMAN²², 1996; FUCHS & WANNMACHER¹⁸, 1998; GUYTON & HALL²⁶, 2002; LU et al.³⁴, 2003). O seu mecanismo de ação consiste em facilitar o transporte dos monossacarídeos e aminoácidos através da membrana celular dos tecidos sensíveis a essa proteína (GUYTON & HALL²⁶, 2002; CLARO⁹, 2004). Além disso, a sua ausência ou deficiência no organismo altera a modulação do crescimento

esquelético normal, uma vez que exerce efeitos diretos e indiretos sobre o metabolismo ósseo, regulando a reabsorção e estimulando a síntese de matriz e a mineralização óssea (MARGONAR et al.³⁹, 2003).

Diversas formas de indução experimental do Diabetes melito (DM) foram descritas na literatura, tais como pancreatectomia parcial (GRANDINI²⁴, 1978) e administração de aloxano (PINHEIRO⁴⁶, 1966; LERCO et al.³², 2003) ou de estreptozotocina (WEISS et al.⁶², 1981; GOODMAN & HORI²³, 1984; SPANHEIMER et al.⁵⁷, 1988; DEVLIN et al.¹⁵, 1996; EL-HAKIM¹⁶, 1999; FIORELLINI et al.¹⁷, 1999; FUNK et al.¹⁹, 2000; TSUCHIDA et al.⁵⁹, 2000; GIGLIO et al.²⁰, 2000; MARGONAR et al.³⁹, 2003; CLARO et al.⁹, 2004). Em nossos estudos, optamos pelo aloxano decorrente da sua eficiente ação citotóxica seletiva sobre as células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas. A referida droga e os procedimentos de indução empregados nesta pesquisa estão de acordo com a maioria dos autores da literatura que utilizaram coelhos como modelo experimental (MENDEZ & RAMOS⁴¹, 1994; BRAND⁵, 1996; MARGONAR et al.³⁹, 2003).

De acordo com Lerco et al.³² (2003), o aloxano causa citotoxicidade nas células β das ilhotas de Langerhans, resultando na redução e, conseqüentemente, diminuição na produção de insulina, ratificando os nossos achados histológicos que revelaram degeneração das células β , causando atrofia e diminuição do número de ilhotas de Langerhans. Além disso, foi observado em nossos estudos a desorganização do parênquima com presença de células acinares atípicas e escassa quantidade de vesículas secretoras. Segundo os estudos de Roth et al.⁴⁸ (2003) com coelhos diabéticos, induzidos por aloxano, as células endócrinas das ilhotas de Langerhans apresentaram hipergranulação quando comparado com coelhos normais, o que não foi evidenciado em nossos estudos.

Para comprovar a citotoxicidade do aloxano, Moor⁴² (1953) realizou um trabalho utilizando ratos que receberam a dose de aloxano de

40mg/Kg de peso. No estágio inicial de intoxicação pela droga, não foi evidenciado morte dos animais. Entretanto, 65% desses animais morreram após alguns dias, 1% não apresentou diabetes transitório e 25% apresentaram diabetes. Pelo que podemos observar, a obtenção de ratos diabéticos, por meio da administração do aloxano, é um procedimento complicado e com alto índice de mortes. Em nosso experimento, apesar de utilizarmos coelhos, como modelo experimental, verificamos que alguns animais foram a óbito imediatamente após a aplicação do aloxano, apresentando parada cardio-respiratória, cianose e hipoglicemia acentuada, atingindo 20mg/dL em menos de 24 horas (normal: 75 a 120mg/dL). Acreditamos que esse tipo de morte imediata pode estar associado à velocidade de aplicação da droga, proporção da dose específica para o animal e concentração da droga no interior da veia, com pouca diluição pelo soro fisiológico.

Em muitos trabalhos encontrados na literatura, as doses, utilizadas para coelhos, variavam de 100mg/Kg até 150mg/Kg, porém desencadearam graves efeitos adversos (LERCO et al.³², 2003; MARGONAR et al.³⁹, 2003). Com base nesses dados, procuramos utilizar uma dose menor (90 mg/Kg), que pudesse garantir a indução e a manutenção do quadro diabético durante os períodos desejados, sem provocar reversão do diabetes e sofrimento e/ou morte dos animais. Mesmo assim, seis animais não resistiram às complicações e morreram imediatamente ou algumas semanas após a aplicação da droga. Em relação ao procedimento de indução do aloxano, o método mais eficaz encontrado foi a sua administração por infusão na veia auricular marginal, o que propiciou boas condições de sobrevivência para o animal.

A metodologia aplicada em nosso trabalho para indução do diabetes, mostrou-se ineficaz em relação aos animais obesos, os quais apresentavam resistência ao aloxano, tornando-se necessário outras induções. Acreditamos que o tecido gorduroso dificulta a ação de citotoxicidade da droga nas células endócrinas das ilhotas de Langerhans.

Em nossos resultados clínicos, as complicações gerais dos animais diabéticos caracterizavam-se por fraqueza, prostração, poliúria, polifagia, polidipsia, evacuação freqüente, hipoglicemia acentuada associada às crises de convulsões, perda de elasticidade da pele, alteração na textura da pelagem e distensão abdominal, que provavelmente foi decorrente da retenção de fluídos no estômago do animal, independente da ingestão de água. Esses achados clínicos também foram observados nos estudos de Margonar et al.³⁹ (2003) e Claro⁹ (2004).

Outras manifestações relevantes, que ocorreram em nossos animais, foram o quadro de cetoacidose diabética e pé diabético. A cetoacidose foi caracterizada pela desidratação, respiração acidótica, alteração do sensório e acidose metabólica e cetonemia. Esse quadro foi possível de ser revertido em alguns animais, após o tratamento intensivo com a administração de solução de ringer com lactato de sódio. O pé diabético provocou luxações e subluxações dos dedos e metatarsos, causando zonas de pressão anômalas, que evoluíram para calosidades e úlceras. Acreditamos que havia menor sensibilidade dolorosa e térmica no local, portanto, o animal não se defendia de ações externas traumáticas, resultando na diminuição das resistências às infecções da pele. Provavelmente, esse fato corroborou para a disseminação dos microorganismos, que, em animais saudáveis, essas condições seriam facilmente controladas.

As taxas glicêmicas em coelhos diabéticos, encontradas na literatura, utilizando-se o aloxano, variavam de 200 mg/dL a 400 mg/dL (GOODMAN & HORI²³, 1984; GIGLIO et al.²⁰, 2000; SIMOPOULOS et al.⁵⁶, 2001; MARGONAR et al.³⁹, 2003). Nesta pesquisa, a glicemia média verificada nos grupos estudados, durante todos os períodos de observação foi de 350mg/dL.

Durante todos os períodos de observação no grupo controle, constatou-se que a média da densidade óptica e da

histomorfometria aumentavam de forma gradativa e progressiva. Além disso, observou-se que a barreira PTFE promoveu propriedade osteocondutora, auxiliando positivamente para o crescimento ósseo. Todos esses achados foram também evidenciados por Gomes et al.²¹ (2002). Entretanto, um fato relevante em todos os grupos diabéticos era a variação discrepante das médias de densidade óptica, principalmente, nos períodos de trinta e sessenta dias, onde foram observadas quedas significativas. Esse fato poderia ser explicado devido à ocorrência das complicações crônicas da doença em nosso experimento, causada pela hiperglicemia constante, as quais, muitas vezes, eram difíceis de serem controladas, mesmo utilizando diariamente a insulina humana.

Foi observado no grupo D-PTFE que durante a evolução do processo de reparação óssea, houve discreta queda da média histomorfométrica no período de 15 e sessenta dias. Esse fato poderia ser justificado devido à ocorrência dos efeitos das complicações crônicas da doença em nosso experimento, causados pelas variações constante e exacerbadas da glicemia (hiperglicemia/hipoglicemia) durante os períodos de estudo, as quais, muitas vezes, eram difíceis de serem controladas, mesmo utilizando diariamente a insulina humana.

Sabe-se que as barreiras físicas apresentam vantagens por serem colocadas sobre os defeitos e adaptadas às superfícies ósseas adjacentes, criando um espaço adequado para estabilização e permanência do coágulo sangüíneo (MURRAY et al.⁴⁴, 1957; LINGHORNE³³, 1960; MELCHER & DREYER⁴⁰, 1962; DAHLIN et al.¹⁴, 1994; AZEVEDO et al, 1997; LUDGREN et al., 1998; GUNCZLER, 2001). Além disso, dão preferências às células osteogênicas e angiogênicas originárias das cavidades medulares adjacentes, criando um compartimento para possibilitar que as células repovoem e regenerem esses defeitos com novo tecido ósseo (DAHLIN et al.¹⁴, 1994), prevenindo a invasão de células competidoras não-osteogênicas dos tecidos moles circunvizinhos. De acordo com HÄMMERLE et al.²⁷ (2003) e MACEDO et

al.³⁸ (2003), os defeitos sem barreira física mostram, normalmente, formação óssea incompleta e são caracterizados pela presença de um tecido conjuntivo cicatricial no seu interior, impedindo a migração de células osteogênicas.

Portanto, considerando essas propriedades da barreira PTFE, foi observado que essa estrutura promoveu atividade osteocondutora quando aplicada em alguns defeitos ósseos confeccionados nos animais diabéticos, porém, em outros, verificou-se que havia ocorrido o seu deslocamento, dificultando o crescimento ósseo no interior da loja cirúrgica. Acreditamos que esse fato também poderia justificar as médias da densidade de volume da matriz óssea do grupo diabético-PTFE serem discretamente menor quando comparado com o grupo diabético nos períodos de 15 e sessenta dias.

Frente ao exposto, sugerimos a utilização de materiais osteoindutores e osteocondutores para auxiliar no processo de reparação óssea de indivíduos portadores do Diabetes melito, uma vez que este estudo está em concordância com a literatura em relação aos efeitos deste distúrbio sobre o metabolismo ósseo.

1 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos e dentro das condições experimentais deste trabalho, foi possível concluir que:

- a) o processo de reparo ósseo foi mais lento no grupo diabético quando comparado com os grupos controle e diabético associado à barreira de politetrafluoretileno;
- b) na análise estatística da histomorfometria, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e diabético associado à barreira de politetrafluoretileno;
- c) o aloxano monoidratado, na dose de 90mg/kg, mostrou-se eficiente na indução do Diabete melito em coelhos;
- d) é necessário tratamento específico das complicações clínicas, imediatamente após seu aparecimento.

8 REFERÊNCIAS*

- 1 AABOE, M. et al. Guided tissue regeneration using degradable and nondegradable membranes in rabbit tibia. **Clin Oral Impl Res**, v.4, n.4, p.172-6, Dec. 1993.
- 2 ALKAN, A. et al. Histomorphometric evaluation of the effect of doxycycline on the healing of bone defects in experimental diabetes mellitusot : a pilot study. **J Oral Maxillofac Surg**, v.60, n.8, p.898-904, 2002.
- 3 AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Tests of glicemy in diabetes: position statement. **Diabetes Care**, v.26, p.S106-8, 2003.
- 4 AZEVEDO, P.E.S. et al. Uso de membrana de polímero de mamona em regeneração óssea guiada em defeitos ao redor de implantes ossointegrados. **Rev Bras Implant**, v.3, n.6, p.8-12, nov./dez. 1997.
- 5 BRAND, C. L. et al. Evidence for a major role for glucagon in regulation of plasma glucose in conscious, nondiabetic, and alloxan-induced diabetic rabbits. **Diabetes**, v.45, n.8, p.1076-83, Aug. 1996. Disponível em <http://gateway.ut.ovid.com.gw2/ovidweb.cgi>. Acesso em 17.Fev. 2005.

* * Baseado em:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Informação e documentação:**
referências, elaboração NBR 6023. Rio de Janeiro. 2002. 23p

- 6 BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo**: patologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 367p.
- 7 CAMPOS, K.E. et al. Classificação dos métodos experimentais de indução para o Diabetes mellitus tipo 2. **Diabetes Clin**, v.1, p.64-8, 2004.
- 8 CHACRA, A.R. et al. A importância da hemoglobina glicada (Ac1) para a avaliação do controle glicêmico em pacientes diabéticos : aspectos clínicos e laboratoriais. **Diabetes Clín**, v.4, p.291-300, 2003.
- 9 CLARO, F.A.; SA LIMA, J.R.; GOMES, M.F. Implantes de polietileno poroso em modelo de animal diabético: estudo histomorfométrico. **Rev Int Cir Traumatol Bucomaxilofac**, v.2, n.7, p.177-83, 2004.
- 10 COLEN, L.B. et al. Microvascular anastomotic thrombosis in experimental diabetes mellitus. **Plast Reconstr Surg**, v.99, n.1, p.156-62, Jan.1997. Disponível em <http://gateway.ut.ovid.com/gw1/ovidweb.cgi>. Acesso em :12 Set.2004.
- 11 COMARK, D.H. **Fundamentos de histologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 371p.
- 12 COSTA, A.A.; BETTI, R.T. Hiperglicemia e as complicações crônicas do diabetes mellitus. **Diabetes Clín**, v.1, p.63-9, 2003.
- 13 COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Pâncreas. In: _____. **Robbins patologia estrutural e funcional**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.817-30.

- 14 DAHLIN, C. et al. Restoration of mandibular nonunion bone defects: an experimental study in rats using an osteopromotive membrane method. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v.23, n.4, p.237-42, Aug. 1994.
- 15 DEVLIN, H.; GARLAND, H.; SLOAN, P. Healing of tooth extraction sockets in experimental diabetes mellitus. **J Oral Maxillofac Surg**, v.54, n.9, p.1087-91, Sept. 1996.
- 16 EL-HAKIN, I.E. The effect of fibrin stabilizing factor (FXIII) on healing of bone defects in normal and uncontrolled diabetic rats. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v.28, n.4, p.304-8, 1999.
- 17 FIORELLINI, J.P. et al. The effect of insulin therapy on osseointegration in a diabetic rat model. **Clin Oral Implants Res**, v.10, n.5, p.362-8, Oct, 1999. Disponível em <http://gateway.ut.ovid.com/gw2ovidweb.cgi>. Acesso em: 17 Fev. 2005.
- 18 FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L. **Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional**. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1998. 678p.
- 19 FUNK, J.R. et al. Biomechanical evaluation of early fracture healing in normal and diabetic rats. **J Orthop Res**, v.18, n.1, p.126-32, 2000.
- 20 GIGLIO, M.J. et al. Histomorphometric study of bone healing around laminar implants in experimental diabetes. **Implant Dent**, v.9, n.2, p.143-9, 2000.

- 21 GOMES, M.F. et al. Autogenous demineralized dentin matrix for tissue engineering applications: radiographic and histomorphometric studies. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.17, n.4, p.488-97, July/Aug. 2002.
- 22 GOODMAN, S.; GILMAN, L. **The pharmacological basics of therapeutics**. 9.ed. México:Mc Grawhill, 1996. 1487p.
- 23 GOODMAN, W.G.; HORI, M.T. Diminished bone formation in experimental diabetes: relationship to osteoid maturation and mineralization. **Diabetes**, v.33, n.9, p.825-31, 1984.
- 24 GRANDINI, S.A. The effect of partial-pancreatectomy-induced diabetes on wound healing subsequent to tooth extraction: histologic study in rats. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.45, n.2, p.190-9, Feb. 1978.
- 25 GUNCZLER, P. et al. Decreased bone mineral density and bone formation markers- shortly after diagnosis of clinical type 1 diabetes mellitus. **J Endocrinol Metabol**, v.14, p.525-8, 2001.
- 26 GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 10.ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2002. 973p.
- 27 HÄMMERLE, C.H.F.; JUNG, R.E. Bone augmentation by means of barrier membranes. **Periodontol 2000**, v.33, p.36-53, 2003.
- 28 HILL, P.A.; ORTH, M. Bone remodelling. **Br J Orthod**, v.25, n.2, p.101-7, 1998.

- 29 HOUGH, S. et al. Correction of abnormal bone and mineral metabolism in chronic streptozotocin-induced diabetes mellitus in the rat by insulin therapy. **Endocrinol**, v.108, n.6, p.2228-34, June 1981.
- 30 KAYATH, M.J. et al. Prospective bone mineral density evaluation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **J Diabetes Complications**, v.12, n.3, p.133-9,1998.
- 31 LANG, N.P. et al. Guided tissue regeneration in jawbone defects prior to implant placement. **Clin Oral Impl Res**, v.5, n.2, p.92-7, June 1994.
- 32 LERCO, M. M. et al. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos: estudo clínico e laboratorial. **Acta Cir Bras**, v.18, n.2, p.132-42 mar./abr. 2003. Disponível em <http://www.scielo.br>. Acesso em : 21 Ago.2004.
- 33 LINGHORNE, W.J. The sequence of events in osteogenesis as studied in polyethylene tubes. **Ann NY Acad Sci**, v.85, n.29, p.445-60, Mar. 1960.
- 34 LU H. et al. Diabetes interfere with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation. **Endocrinol**, v.144, n.1, p. 346-52, Jan. 2003.
- 35 LUNDGREN, A.K.; LUNDGREN, D.; TAYLOR, A. Influence of barrier occlusiveness on guided bone augmentation: an experimental study in the rat. **Clin Oral Implants Res**, v.9, n.4, p.251-60, Aug. 1998.

- 36 LUNDGREN, D. et al. Augmentation of intramembraneous bone beyond the skeletal envelope using an occlusive titanium barrier: an experimental study in the rabbit. **Clin Oral Implants Res**, v.6, n.2, p.67-72, June 1995.
- 37 MACEDO, N.L. et al. Regeneração tecidual dirigida na reconstrução da atrofia localizada do rebordo alveolar. **Rev Gaucha Odontol**, v.41, n.6, p.365-7, Nov./Dez. 1993.
- 38 MACEDO N. L., et al. Guided bone regeneration with subperiosteal implants of PTFE and hydroxyapatite physical barriers in rats. **Braz Dent J**, v.14, n.2, p.119-24, 2003.
- 39 MARGONAR R. et al. The influence of diabetes mellitus and insulin therapy on biomechanical retention around dental implants: a study in rabbits. **Implant Dent**, v.12, n.4, p.333-38, 2003. Disponível em <http://gateway.ut.ovid.com>. Acesso em 5 de Mar.2005.
- 40 MELCHER, A.H.; DREYER, C.J. Protection of the blood clot in healing circumscribed bone defects. **J Bone Joint Surg**, v.44, n.2, p.424-30, May 1962.
- 41 MENDEZ, J.D.; RAMOS, H.G. Animals models in Diabetes research. **Arch Med Res**, v.25, n.4, p.367-75,1994.
- 42 MOOR, P. **Le diabete alloxanique**: contribution a l'etude de la pathogenie du syndrome. Paris: Masson et Cie,1953. 207p.
- 43 MUNDELL, R.D. et al. Osseous guided tissue regeneration using a collagen barrier membrane. **J Oral Maxillofac Surg**, v.51, n.9, p.1004-12, 1993.

- 44 MURRAY, G.; HOLDEN, R.; ROSCHLAU, W. Experimental and clinical study of new growth of bone in a cavity. **Am J Surg**, v.93, n.3, p.385-7, Mar. 1957.
- 45 NEVINS, M. et al. Implants in regenerated bone: long-term survival. **Int J Periodont Restor Dent**, v.18, n.1, p.35-45, Feb. 1998.
- 46 PINHEIRO, C.E. Estudos sobre a influência de hormônios no processo de ossificação. I: Desenvolvimento ósseo no rato diabético aloxânico. **Rev Bras Biol**, v.26, n.4, p. 413-6, dez. 1966.
- 47 RICO, H. et al. Suggestion of a deficient osteoblastic function in diabetes mellitus: the possible cause of osteopenia in diabetics. **Calcif Tissue Int**, v.45, n.2, p.71-3, 1989.
- 48 ROTH, S.I. et al. Spontaneous diabetes mellitus in the New Zealand white rabbit: preliminary morphologic characterization. **Lab Invest**, v.42, n.5, p.571-9, 2003. (Abstract). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>. Acesso em: 4 de Mar. de 2005..
- 49 RUBIN, E.; FABER, J.L. **Patologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1381p.
- 50 SACKS, D.B. et al. Guidelines an recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus – the national academy of clinical biochesmitry – laboratóry medicine practice guidelines, 2002. Disponível em: http://www.nacb.org/lmpg/diabetes_lmpg_pub.stm

- 51 SCHENK, R.K. et al. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histological study in the canine mandible. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.9, n.1, p.13-29, Jan./Feb. 1994.
- 52 SCHLIEPHAKE, H. International news. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v.28, n.2, p.158-9, Apr. 1999.
- 53 SCHMID, J. et al. Membrane permeability is unnecessary for guided generation of new bone: an experimental study in the rabbit. **Clin Oral Implants Res**, v.5, n.3, p.125-30, Sept. 1994.
- 54 SCHMIDT, M.I. et al. Variation in glucose tolerance with ambient temperature. **Lancet**, v.344, n.8929, p.1054, Oct. 1994. (Abstract) Disponível em <http://gateway.ut.ovid.com/gw2/ovidweb.cgi>. Acesso em: 17 Fev.2005.
- 55 SIMION, M. et al. Vertical ridge augmentation around dental implants using a membrane technique and autogenous bone or allografts in humans. **Int J Periodont Restor Dent**, v.18, n.1, p.9-23, Feb. 1998.
- 56 SIMOPOULOS, D.N. et al. Corporeal structural and vascular micro architecture with x-ray micro computerized tomography in normal and diabetic rabbits: histopathological correlation. **J Urology**; n.165, v.5, p.1776-82, May 2001.<http://gateway.ut.ovid.com>. Acesso em 4 de Mar. 2005.
- 57 SPANHEIMER, R.G.; UMPIERREZ, G.E.; STUMPF V. Decreased collagen production in diabetic rats. **Diabetes**, v.37, n.4, p.371-6, 1988.

- 58 TORQUATO, M.T.C.G. et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban population aged 30-69 years in Ribeirão Preto (São Paulo), Brazil. **Med J**, v.121, n.6, p.224-30, 2003.
- 59 TSUCHIDA, T. et al. Histomorphometric evaluation of the recovering effect of human parathyroid hormone (1-34) on bone structure and turnover in streptozotocin-induced diabetic rats. **Calcif Tissue Int**, v. 66, n.3, p.229-33, 2000.
- 60 VESALA, A.L. et al. Bone tissue engineering: treatment of cranial bone defects in rabbits using self-reinforced poly-L,D-lactide 96/4 sheets. **J Craniofac Surg**, v.13, n.5, p.607-13, Sept. 2002.
- 61 VILAR, L. et al. **Endocrinologia clínica**. 2.ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2003. p. 511-23.
- 62 WEISS, R.E.; GORN, A.H.; NIMNI, M.E. Abnormalities in the biosynthesis of cartilage and bone proteoglycans in experimental diabetes. **Diabetes**, v.30, n.8, p.670-7, Aug. 1981.

Anexo A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**CERTIFICADO**

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **022/2004-PA/CEP**, sobre **“Estudo da reparação óssea em defeitos cirúrgicos de coelhos diabéticos”**, sob a responsabilidade de **EVANICE MENEZES MARÇAL VIEIRA**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 14 de setembro de 2004.

Prof. Dra. Suely Carvalho Mutti Naressi
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-Local

VIEIRA, E.M.M. **Bone repair in cranioplasty of alloxan-induced diabetic rabbits: histomorphometric and optical density analyses.** 2005. 107f. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal, Área Biopatologia Bucal) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2005.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a metabolic disturbance that is characterized by the alteration of the carbohydrates metabolism, fats and proteins, due to the insulin absence, hormone produced by the pancreatic β cells, or to its inability of acting in the transfer of glucose of the plasma for the cytoplasm of the cell. The present work seeks to evaluate the dynamics of repair process in surgical bony defects made in the diabetic, associated parietal bone of rabbits or not to the bony regeneration guided with the use of occlusive barrier (polytetrafluoroethylene -PTFE). In this research, eighteen adult rabbits were used, with an average weight of 3.5kg to 4,5Kg, and divided into three groups: group C (control - bony defect in healthy rabbits), group D (bony defect in diabetic rabbits without polytetrafluoroethylene barrier) and group D-PTFE (bony defect in diabetic rabbits with polytetrafluoroethylene barrier). After the making of the bony defect, in the group D-PTFE, the polytetrafluoroethylene barrier was placed in the surface and in the parietal of the surgical store and the cavity was filled by the blood clot. In the groups D and C, the bony defect was just filled by blood clot. Elapsed 15, thirty, sixty and ninety days, three rabbits of each group were sacrificed. The pieces containing the bony defects they were removed in block, fixed in 10% formalin and submitted to the analyses radiographic and microscopic analyses. It was also accomplished optical density statistical analysis checked by the complementary histomorphometry. It was possible to conclude that the process of bony repair was slower in the group D when compared with the groups C and D-PTFE. In the statistical analysis histomorphometry, there was not statistically significant difference between the C and D-PTFE groups. The alloxan monohydrate, in the concentration of 90mg/kg, was shown efficient in the induction of the Diabetes mellitus in rabbits.

KEY WORDS: Bone, repair, Diabetes mellitus; alloxan monohydrate.

Autorizo a reprodução deste trabalho.

São José dos Campos, 13 de maio de 2005.

Evanice Menezes Marçal Vieira

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)