



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



# **Efeitos da associação entre ácido hialurônico e doxiciclina em doses subantimicrobianas sobre o reparo ósseo alveolar em ratos diabéticos**

**Autor(a): Pamela Saporski**

**Piracicaba  
2010**



UNICAMP

Pamela Saporski



Efeitos da associação entre ácido hialurônico e doxiciclina em doses subantimicrobianas sobre o reparo ósseo alveolar em ratos diabéticos

Monografia apresentada ao Curso de Odontologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, para obtenção do Diploma de Cirurgião Dentista.

Orientador(a): Beatriz de Brito Bezerra

Co-Orientador(a): Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum

Piracicaba  
2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

**Bibliotecária: Elis Regina Alves dos Santos – CRB-8ª / 8099**

**Sa68e**      **Saporski, Pamela.**  
Efeitos da associação entre ácido hialurônico e doxiciclina em doses subantimicrobianas sobre o reparo ósseo alveolar em ratos diabéticos / Pamela Saporski. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010.  
33f. : il.

**Orientadores: Antônio Wilson Sallum, Beatriz de Brito Bezerra.**  
**Monografia (Graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.**

1. Periodontia. 2. Diabetes. I. Sallum, Antônio Wilson. II. Bezerra, Beatriz de Brito. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

**(eras/fop)**



UNICAMP



## Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais  
Hilton Saporski e Adriana Saporski, ao meu irmão Hilton Saporski Neto.  
Esses que são a razão da minha vida.



## Agradecimentos

Agradeço a Deus por iluminar o meu caminho durante estes anos.

Agradeço ao Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum pela oportunidade de desenvolver este projeto.

Agradeço as Pós Graduandas Beatriz de Brito Bezerra e Mirella Lindoso Gomes Campos pela ajuda no desenvolvimento do projeto.

Agradeço ao Felipe Ozi Bueno pelo companheirismo e carinho durante esses anos de faculdade.

Aos pacientes, pela confiança depositada e a oportunidade de aprendermos durante esses 4 anos de faculdade.

A todos os amigos que fizeram desses dias de faculdade, momentos únicos e especiais.

Agradeço à todas as pessoas que participaram, direta ou indiretamente, contribuindo para realização deste trabalho, o meu muito obrigada.

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

**Tabela 1.** Média e desvio padrão dos valores iniciais e finais de peso (g) e glicemia (mg/dL) para animais diabéticos e normais. 15

**Tabela 2.** Média e desvio padrão da densidade radiográfica (pixels) de acordo com o grupo animal e tratamento. 16

**Figura 1.** Imagem radiográfica sendo analisada no programa ImageJ®. Região quadriculada referente à área analisada para determinação da densidade radiográfica. 13

## LISTA DE ABREVIATURAS

*et al.* - e outros (abreviatura de “et lii”)

ad libitum- “à vontade”

in vitro- ambiente sem vida, em laboratório

in vivo- em ambiente vivo, organismo vivo

DOX- doxiciclina

HÁ- ácido hialurônico

dl - decilitros

ml- mililitros

l- litros

mg- miligramas

g- gramas

kg- quilogramas

stz- estreptozotocina

pxls- pixels

v.s- via subcutânea

CEEA - Comitê de Ética em Experimentação Animal

CEMIB - Instituto de Biologia da UNICAMP - Bioterismo da UNICAMP

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

## **RESUMO**

O presente estudo avaliou o efeito da associação do ácido hialurônico(HA) com a administração sistêmica de doxiciclina em doses subantimicrobianas(DOX) no reparo ósseo alveolar de ratos diabéticos. 56 ratos Wistar foram utilizados neste estudo. A diabetes foi induzida em metade dos animais com uma dose única de estreptozotocina (60mg/kg) e considerados diabéticos quando a glicemia fosse igual ou superior a 250mg/dl. Após confirmação do estado diabético, metade dos animais normais e diabéticos receberam tratamento sistêmico com DOX, iniciado 1 dia antes do procedimento cirúrgico e mantido por 10 dias após a cirurgia. Todos os animais foram submetidos a extração de ambos primeiros molares inferiores e os tratamentos (soro ou HA), distribuídos de forma randomizada nos alvéolos. Trinta dias após a cirurgia os animais foram sacrificados e as mandíbulas radiografadas para avaliação da densidade radiográfica. Os animais diabéticos tratados com DOX e DOX+HA tiveram reparo semelhante aos animais normais sem qualquer tratamento ( $p>0,05$ ). Entre os animais diabéticos, os tratamento com DOX e DOX+HA trouxeram benefícios para o reparo, quando comparados aos animais diabéticos sem tratamento ( $p<0,05$ ), no entanto os grupos anteriores comparados entre si não apresentaram diferenças significantes ( $p>0,05$ ). Dentro dos limites deste estudo, o tratamento com doxiciclina em doses subantimicrobianas é benéfico para o reparo ósseo dos animais diabéticos, mas a associação com o HA não trouxe benefícios adicionais à DOX.

## **PALAVRAS-CHAVE**

Reparo ósseo, diabetes, doxiciclina, ácido hialurônico

## **ABSTRACT**

The present study evaluated the effects of associating hyaluronic acid (HA) with systemic treatment of subantimicrobial dose doxycycline (DOX) on alveolar bone repair in diabetic rats. Fifty-six Wistar rats were included in this study. Diabetes was induced in half of the animals with a single dose of streptozotocin (60mg/kg) and were taken as diabetics when blood glucose levels were 250mg/dL or higher. After diabetic state was confirmed half of the normal and diabetic animals underwent systemic treatment with DOX starting 1 day before and following for 10 days after surgery. All animals had both lower first molars removed and the sockets were randomly treated with saline or HA. Thirty days post-surgery the animals were sacrificed and the mandibles radiographed for analysis of radiograph bone density. Diabetic animals treated with DOX and DOX+HA showed similar healing when compared to normal animals with no treatment ( $p<0.05$ ). Among diabetic animals, DOX and DOX+HA treatments showed improved healing when compared to untreated diabetic animals ( $p<0.05$ ), the comparison between DOX and DOX+HA showed no significant differences ( $p>0.05$ ). Within the limits of this study subantimicrobial dose doxycycline treatment benefits osseous repair in diabetic animals, but its association with HA did not provide additional benefits to DOX treatment.

## **KEYWORDS**

Bone repair, diabetes, doxycycline, hyaluronic acid.

# SUMÁRIO

|                            |    |
|----------------------------|----|
| INTRODUÇÃO                 | 1  |
| REVISÃO DE LITERATURA      | 4  |
| OBJETIVO                   | 10 |
| MATERIAIS E MÉTODOS        | 11 |
| RESULTADOS                 | 15 |
| DISCUSSÃO                  | 17 |
| CONCLUSÃO                  | 19 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 20 |
| ANEXOS                     | 23 |

# 1. INTRODUÇÃO

A Diabetes Mellitus é uma doença metabólica caracterizada pela hiperglicemia que leva a complicações agudas e crônicas no organismo. Alguns sintomas comuns da diabetes são: sede excessiva, aumento do volume da urina e micções, fadiga, tontura, visão borrada, aumento do apetite, perda de peso.

A diabetes mellitus é uma síndrome complexa que na cavidade oral se associa a xerostomia, aumento de níveis salivares de glicose, com aumento de incidência de cárie (Baishi & Wolfinger, 1999), além de alterações nos tecidos periodontais de suporte.

O metabolismo ósseo dos diabéticos é prejudicado, através do efeito direto da hiperglicemia ou do efeito da doença vascular que aparece ao longo do tempo (Shyng *et al.*, 2001). O colágeno é principal componente protéico do tecido conjuntivo e sua produção está reduzida nos diabéticos. Complicações crônicas surgem envolvendo defeitos no tecido conjuntivo, como cicatrização deficiente e formação óssea reduzida (Spanheimer *et al.*, 1988).

O reparo do osso alveolar é considerado por completo quando o alvéolo se encontra totalmente preenchido por trabéculas ósseas bem definidas e a crista óssea remodelada. Nessa etapa final existe um equilíbrio dinâmico osteoclástico-osteoblástico e esse tecido ósseo se encontra em condições de suportar novos estímulos (Okamoto *et al.*, 2002).

É importante considerar que o processo de reparo alveolar em ratos exhibe, microscopicamente, a mesma seqüência evolutiva observada nos humanos. Assim sendo, podemos transportar esses resultados para o ser humano, lembrando, contudo,

que a cronologia do reparo no rato é aproximadamente três vezes mais rápida (Carvalho, 1980).

Extrações dentais, implantes dentais e enxertos ósseos, são alguns dos procedimentos odontológicos que muito dependem de um bom reparo ósseo, e que são bastante frequentes na atualidade.

O ácido hialurônico, também conhecido como hialuronato ou hialuronan, é um componente essencial da matriz extracelular e exerce muitos papéis importantes na formação e reparo dos tecidos (Laurent & Fraser, 1992; Fraser *et al.*, 1997). Sasaki & Watanabe (1995) verificaram que o ácido hialurônico aumenta a atividade osteoblástica *in vitro* através do aumento da diferenciação e migração das células mesenquimais. A aplicação local também mostrou estimular a diferenciação e migração de células mesenquimais e musculares *in vivo*. Ele apresenta papel bastante importante na morfogênese, migração e diferenciação celulares. Muitos estudos têm indicado que a utilização de ácido hialurônico exógeno pode ser benéfica na cicatrização (King *et al.*, 1991; Aslan *et al.*, 2006).

A doxiciclina é uma substância medicamentosa do grupo dos antibacterianos, e é resultante de uma modificação química da molécula de tetraciclina. Além dos seus efeitos antibacterianos a doxiciclina tem sido usada em subdoses, as quais não apresentam efeitos antimicrobianos. Estudos demonstram que em subdoses a doxiciclina é capaz de inibir a collagenase e o colapso de colágeno, incluindo o colapso que ocorre durante a reabsorção óssea. A maioria dos estudos *in vivo* e *in vitro* executados nos últimos anos mostrou que as tetraciclinas com propriedades anticolagenolíticas têm um efeito positivo no reparo ósseo (Alkan *et al.*, 2002)

A habilidade das tetraciclinas, e da doxiciclina em particular, em inibir a atividade das MMPs (metaloproteinases da matriz) foi identificada primeiramente no princípio dos anos 80 (Golub *et al.*, 1983,1985; Ramamurthy & Golub, 1983). A principal função das MMPs é catalisar a destruição das proteínas das células das membranas plasmáticas ou da matriz extracelular (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993; Ryan & Golub, 2000), que é formada por proteínas colágenas e não-colágenas (Salvi & Lang, 2005). Os mecanismos não-antimicrobianos diretos e indiretos das tetraciclinas inibem a atividade das MMPs, impedindo a destruição do tecido conjuntivo e reabsorção do osso (Ryan & Golub, 2000).

Como é sabida, a capacidade de reparo em diabéticos encontra-se reduzida, desta maneira supomos que o uso da doxiciclina em doses subantimicrobianas, um modulador da resposta inflamatória, associado à ação tópica do gel de ácido hialurônico possa promover uma melhora no reparo ósseo alveolar de um modelo animal de diabetes melitus.

A avaliação do processo de cicatrização dos alvéolos dentais pode ser feita pela avaliação radiográfica (Bodner *et al.*, 1993) e histológica e histométrica (Pereira *et al.*, 2007). Avaliações radiográficas da densidade óssea de alvéolos têm sido utilizadas (Bodner *et al.*, 1993) e trazem as vantagens de serem mais baratas e rápidas que a avaliação histológica, considerada padrão ouro (Pryor *et al.*, 2005).

Desta maneira, o presente estudo se propoem a avaliar os efeitos da associação entre o gel de ácido hialurônico a 1% e o tratamento sistêmico com doxiciclina em dose subantimicrobianas no reparo ósseo alveolar em um modelo animal de diabetes.

## 2.REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Reparo ósseo alveolar

Vários estudos que têm avaliado tratamentos diversos em tecidos ósseos com objetivo de acelerar o processo de reparo ósseo (Bodner *et al.*,1993; Baishi & Wolfinger, 1999; Shyng *et al.*, 2001, Pereira *et al.*, 2007), Estes tratamentos podem se concentrar em uma ou mais das seguintes fases do processo de cicatrização: inflamação no pós-operatório, a proliferação e migração de células mesenquimais com produção de matriz óssea e remodelação óssea.

Após a extração dental, a formação do coágulo sanguíneo é um passo fundamental para as fases seguintes do reparo alveolar. A formação de uma rede de fibrina fornece uma matriz para a migração e organização dos linfócitos, macrófagos e neutrófilos, caracterizando a fase aguda da resposta inflamatória.

A migração de células inflamatórias e fibroblastos é observada no alvéolo dental de ratos, principalmente no terço apical. Os fibroblastos sintetizam fibras de colágenos finas que se unem aos capilares neo-formados para dar origem ao tecido de granulação. As células mesenquimais, que se originam de remanescente de ligamento periodontal e osso medular, diferenciam-se em células osteoblásticas que secretam a matriz óssea. E finalmente,o reparo alveolar resulta em uma rede espessa de osso trabecular, contendo pequenos espaços medulares.

Um estudo realizado por Pereira *et al.*, (2007), mostrou que o processo de reparo alveolar em ratos pode ser dividido em três fases: fase inicial (1 a 5 dias), durante o qual a organização do coágulo é concluída e o alvéolo está parcialmente coberto por epitélio; fase de formação óssea (5 a 20 dias); e fase de remodelação do

osso (20 a 60 dias), onde o osso jovem amadurece e o rebordo alveolar é remodelado.

## **2.2 Diabetes**

Diabetes mellitus é uma doença metabólica caracterizada por um aumento anormal de açúcar no sangue. A glicose é a fonte principal de energia do organismo, mas quando em excesso, pode trazer várias complicações à saúde. As complicações crônicas do diabetes mellitus envolvem defeitos no tecido conjuntivo, tais como má cicatrização e diminuição da formação óssea (Friedman *et al.*, 1994).

Ramamurthy & Golub (1983) concluíram em seu estudo que os tecidos conjuntivos dos seres humanos diabéticos e dos animais experimentais apresentam anormalidades no metabolismo do colágeno, incluindo um aumento da produção de enzimas colagenolíticas. Após a indução da diabetes com estreptozotocina em ratos, extratos de tecidos foram avaliados quanto a atividade da collagenase. Observou-se que houve aumento na atividade da collagenase nos extratos da gengiva e da pele destes animais.

Spanheimer *et al.*, (1988) realizaram um estudo em que a diabetes foi induzida em ratos, pelo modelo da estreptozotocina, e a produção de proteínas colágenas e não colágenas foi avaliada nos ossos parietais e na cartilagem articular dos mesmos. Houve menor produção de proteínas colágenas nos ossos e na cartilagem articular dos ratos diabéticos quando comparados ao grupo controle. Em contrapartida não houve redução na produção de proteínas não colágenas. Assim concluíram que a diabetes está associada com uma diminuição acentuada na produção do colágeno.

Shyng *et al.*, (2001) avaliaram o efeito da diabetes mellitus sobre a cicatrização óssea. A formação óssea foi medida no fêmur, na tíbia e na calota craniana dos ratos. O volume do osso esponjoso e a formação óssea no fêmur foram reduzidas no grupo dos ratos diabéticos, indicando um defeito na mineralização óssea ou na formação do osteóide.

O metabolismo ósseo é prejudicado na diabetes, a longo prazo, através do efeito direto da hiperglicemia ou através do efeito da doença vascular, (Shyng *et al.*, 2001).

Tem sido proposto como causas da cicatrização desorganizada de feridas nos ratos diabéticos a deficiente formação de colágeno, o espessamento da membrana basal capilar, e mecanismos de defesa do hospedeiro deficientes resultando em invasão bacteriana (Shyng *et al.*, 2001).

O reparo ósseo alveolar é atrasado na diabetes mellitus devido à insuficiência do processo de cicatrização. Uma das razões para a má cicatrização pode ser uma resposta avascular anormal (Shyng *et al.*, 2001).

### **2.3. Doxiciclina**

Doxiciclina é uma substância medicamentosa do grupo dos antibacterianos, sub-grupo cloranfenicol e tetraciclinas. Recentemente, as tetraciclinas têm sido usadas para tratar defeitos ósseos experimentais, pois apresentam propriedades anticolagenolíticas e efeitos positivos sobre o processo de cicatrização (Alkan *et al.*, 2002).

Estes antibacterianos inibem diretamente a atividade da collagenase (e

possivelmente outras enzimas colagenolíticas) presente nos tecidos do hospedeiro, resultando em uma taxa reduzida de ruptura de colágeno (Golub *et al.*, 1983).

As metaloproteinases da matriz (MMPs) têm sido associadas como as responsáveis pela degradação do colágeno durante a reabsorção óssea mediada por osteoclastos. Por isso a importância terapêutica de se controlar o nível de inibidores de MMPs. Inibir as MMPs resulta diretamente num bloqueio ou retardo da destruição de proteínas do tecido conjuntivo. (Ryan & Golub, 2000).

A capacidade das tetraciclinas, e em particular da doxiciclina, em inibir a atividade das MMPs foi identificada pela primeira vez no início dos anos 1980 (Golub *et al.* 1983, 1985; Ramamurthy & Golub, 1983).

Golub *et al.*, (1983) observaram no experimento com ratos diabéticos que a administração de minociclina (também do grupo das tetraciclinas) retardou a perda de colágeno da pele e do osso alveolar. Os dados da pesquisa sugerem que a terapia com a tetraciclina inibe a atividade colagenolítica nos tecidos resultando em menor degradação do colágeno.

Golub *et al.*, (1985) analisaram o efeito das tetraciclinas (minociclina e doxiciclina) sobre a atividade da colagenase em bolsas periodontais humanas e animais diversos. Ambas tetraciclinas reduziram em 70% a atividade colagenolítica no fluido gengival, durante as semanas iniciais do tratamento. Este estudo continuou apoiando a hipótese de que as tetraciclinas podem ser terapêuticamente úteis no tratamento das doenças periodontais, caracterizadas por excesso da quebra de colágeno.

Alkan *et al.*, (2002) avaliaram histomorfometricamente o efeito da administração

sistêmica da doxíciclina sobre a cicatrização de defeitos ósseos em tíbia de ratos. Aos trinta dias de pós-operatório não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos diabético e controle quanto a quantidade de osso neoformado. Ou seja conseguiu-se manter uma proximidade histomorfométrica entre o reparo ósseo dos ratos diabéticos e dos normais.

Salvi & Lang (2005) fizeram uma revisão dos mecanismos biológicos e da utilidade clínica das terapias que modulam as respostas dos hospedeiros nas doenças periodontais. Estudos clínicos demonstraram que o uso da doxíciclina em doses subantimicrobianas teve resultados promissores no tratamento da periodontite crônica.

#### **2.4. Ácido hialurônico e seus benefícios na cicatrização**

Ácido hialurônico (HA) é um polissacarídeo encontrado em todos os tecidos e fluidos corporais dos vertebrados, e em algumas bactérias. É um polímero linear de alto peso molecular, abundante no tecido conjuntivo. Várias funções fisiológicas têm sido atribuídas ao HA incluindo a lubrificação, a homeostase da água, efeitos de filtragem e regulação da distribuição de proteínas plasmáticas (Fraser *et al.*, 1997).

Estudos têm demonstrado que o HA auxilia no processo de reparação de tecidos moles e ósseos. Entre as propriedades de reparo, encontra-se a facilitação da migração e diferenciação celular durante a formação e reparação tecidual (Aslan *et al.*, 2006).

Os dados disponíveis na literatura indicam que o HA atua principalmente localmente, em combinação com a ferida, promovendo a cicatrização e estimulando a formação de calos ósseos (Aslan *et al.*, 2006). Alguns relatos clínicos afirmam que o

HA tem papel de regular as reações inflamatórias (Laurent & Fraser, 1992).

King *et al.* (1991) testaram a influência da HA na cicatrização de feridas feitas na mucosa jugal de ratos. Neste estudo foi demonstrado que o HA exógeno melhorou a perfusão da microcirculação no local do reparo tecidual e acelerou o fechamento da ferida .

Sasaki e Watanabe (1995) utilizando defeitos na cortical do fêmur de ratos, obtiveram resultados que sugerem que o HA é capaz de acelerar a neoformação óssea por meio da diferenciação das células mesenquimais.

Aslan *et al.* (2006) confeccionaram defeitos na tíbia de coelhos e avaliaram a associação do HA com enxerto ósseo. No grupo controle apenas o enxerto ósseo foi colocado no defeito, já no grupo teste, o enxerto ósseo era previamente combinado ao HA. Concluíram que os defeitos preenchidos com HA e enxerto ósseo tiveram maior neoformação óssea que o grupo controle.

Mendes *et al.* (2008) avaliaram os efeitos do HA no processo de cicatrização alveolar de ratos. Os primeiros molares superiores foram extraídos e tratados com gel de HA a 1% ou não tratados. A análise histológica mostrou que o tratamento com HA induziu uma deposição óssea trabecular precoce, resultando em uma matriz óssea mais organizada em 7 e 21 dias após a extração dental. Esses resultados sugerem que o HA acelera o processo de cicatrização nos alvéolos dos ratos, estimulando a expressão de proteínas osteogênicas.

### **3. OBJETIVO**

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da associação entre a aplicação tópica do gel de ácido hialurônico a 1% e o tratamento sistêmico com doxiciclina em doses subantimicrobianas no reparo ósseo alveolar em um modelo animal de diabetes.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Característica da Amostra**

Foram utilizados 56 ratos adultos, machos, da raça Wistar, pesando entre 250 e 350g. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com acesso a comida e água *ad libitum* durante todo o período experimental. Todos os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram submetidos à aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia da UNICAMP - Bioterismo da UNICAMP (CEMIB). sob o número de protocolo: 1808-1

### **4.2. Indução a Diabetes**

Os animais, com 4 semanas de idade, foram pesados para o cálculo do volume correto da solução de estreptozotocina. Após um período de 16 horas de jejum, exceto água *ad libitum*, os animais receberam, por via intraperitoneal, uma dose única de estreptozotocina (STZ) dissolvida em tampão citrato (0,01M; pH 4,5), na concentração de 50-60mg/Kg do animal. A alimentação foi restituída aos animais 1 hora após a administração da droga e da solução salina.

Após 48 horas foi avaliada a glicemia dos animais com o uso de um glicosímetro (Accu-Chek Blood Glucose Meter). Os animais foram considerados diabéticos no caso da glicemia ultrapassar 250 mg/dl.

### **4.3. Procedimento Cirúrgico**

Antes da cirurgia, os animais foram pesados e de acordo com seu peso corpóreo foram anestesiados com solução de ketamina (1ml/Kg/IM) e cloridrato de xylasina (0,3 ml/kg/IM). Cada animal foi posicionado em aparato de Doku e com um

holleback infantil o tecido gengival ao redor dos primeiros e segundos molares inferiores foi divulgionado e um espaçador digital endodôntico foi introduzido entre os 2 molares inferiores para a luxação do 1º molar. Uma pinça Kelly curva foi utilizada para a extração dentária. Não foi necessária odontosseccção. Após a extração o gel de HA foi aplicado e o animal, durante o restante do efeito da anestesia, permaneceu em decúbito ventral, o que permitiu um tempo de aproximadamente 30 minutos, de contato do gel com o alvéolo.

Os animais foram divididos em 8 grupos :

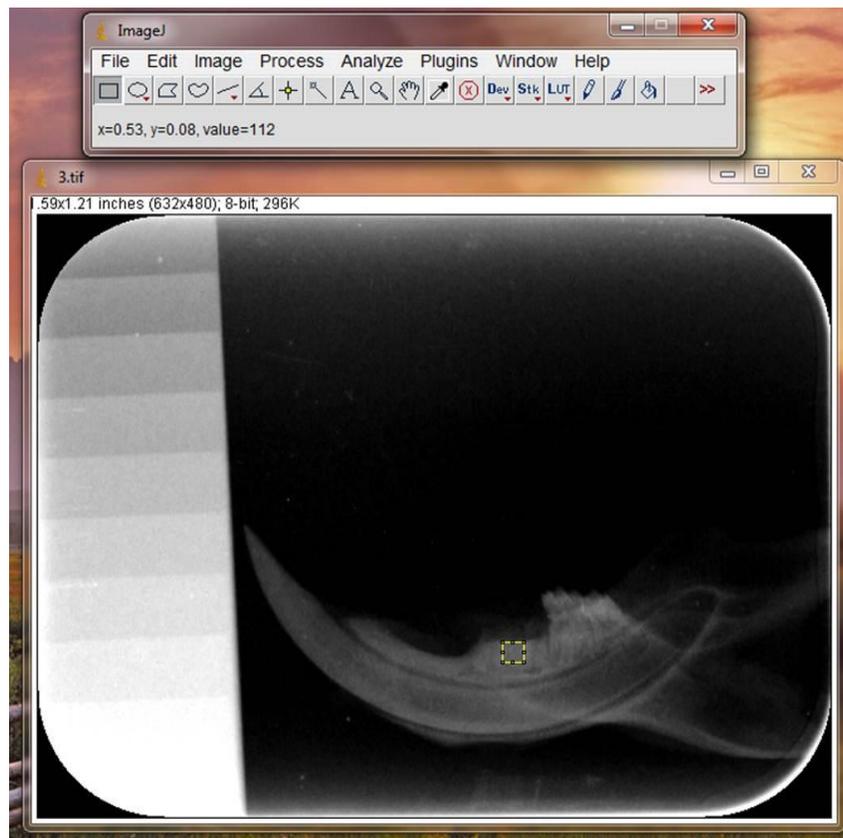
- 1) Diabético com doxiciclina e soro no alvéolo
- 2)Diabético com doxiciclina e ácido hialurônico(AH) no alvéolo
- 3)Diabético sem doxiciclina e com soro no alvéolo
- 4)Diabético sem doxiciclina e com AH no alvéolo
- 5)Normal com doxiciclina e soro no alvéolo
- 6)Normal com doxiciclina e AH no alvéolo
- 7)Normal sem doxiciclina e com soro no alvéolo
- 8)Normal sem doxiciclina e com AH no alvéolo

O tratamento com doxiciclina teve inicio um dia antes do procedimento cirúrgico, onde uma dose de 30mg/kg, via subcutânea (v.s.), foi administrada. O tratamento teve continuidade por 10 dias, com uma dose diária de 15mg/kg (v.s).

Decorridos 30 dias após o procedimento cirúrgico, os animais foram pesados e sacrificados através de aprofundamento da anestesia com ketamina e cloridrato de xylasina. Após tal procedimento, as mandíbulas foram dissecadas e divididas pela sínfise mandibular em hemi-mandíbulas. As peças coletadas foram fixadas em

formalina neutra a 4% em tampão fosfato (pH 7,2).

As mandíbulas foram, então, radiografadas com o sistema de radiografia digital direta, Digora<sup>®</sup> (Soredex, Tuusula, Finland). As imagens obtidas foram avaliadas quanto a densidade óssea presente na região do alvéolo, com o auxílio do programa ImageJ<sup>®</sup> 1.38 (NIH, USA) e os resultados obtidos foram comparados estatisticamente entre os grupos. Dois avaliadores, cegos para os diferentes tratamentos, avaliaram a densidade radiográfica dos defeitos, e os resultados obtidos foram comparados para avaliar a consistência dos resultados.



**Figura 1.** Imagem radiográfica sendo analisada no programa ImageJ<sup>®</sup>. Região quadriculada referente à área analisada para determinação da densidade radiográfica.

#### **4.4 Análise estatística**

O teste T de Student foi utilizado para comparar os parâmetros glicemia e peso, entre os animais diabéticos e os normais.

Para análise do parâmetro densidade radiográfica, o teste ANOVA one-way foi utilizado para comparação das médias entre os tratamentos dentro do mesmo grupo animal, e quando diferenças estatísticas foram detectadas o teste de Tukey foi utilizado para detectar as diferenças.

Os diferentes tratamentos no grupo dos animais diabéticos foram comparados ao tratamento controle dos animais normais por meio do teste T de Student.

Para todas as análises o nível de significância utilizado foi de 5%. Todas as análises foram realizadas com ajuda do software GraphPad Prism 5 for Windows (GraphPad Software Inc, California, USA). Os valores encontram-se descritos como média  $\pm$  desvio padrão.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Peso e Glicemia

Os animais diabéticos, no início do experimento, apresentaram valores menores para o parâmetro peso, em comparação aos animais normais, uma das indicações da condição diabética dos mesmos (Tabela 1). Ao final do experimento a mesma diferença foi observada.

Quanto ao parâmetro glicemia, os animais diabéticos apresentaram valores significativamente maiores que os animais normais ( $p \leq 0,05$ ), uma das principais indicações do estado diabético destes animais (Tabela 1).

**Tabela 1.** Média e desvio padrão dos valores iniciais e finais de peso (g) e glicemia (mg/dL) para animais diabéticos e normais.

|           | Peso Inicial     | Peso Final      | Glicemia Inicial | Glicemia Final   |
|-----------|------------------|-----------------|------------------|------------------|
| Diabético | 200,7 ± 34 Bb    | 268,1 ± 46,9 Ba | 398,5 ± 49,7 Bb  | 479,9 ± 103,3 Ba |
| Normal    | 297,27 ± 68,2 Aa | 410,27 ± 47 Aa  | 148,75 ± 36,3 Aa | 143,3 ± 44,3 Aa  |

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na vertical diferem entre si pelo teste t de student ( $p < 0,0001$ ). Valores seguidos de letras minúsculas na horizontal diferem entre si pelo teste t de student ( $p < 0,0001$ ).

### 5.2. Densidade Radiográfica

Entre os animais normais, a aplicação tópica de ácido hialurônico (HA) não resultou em densidade radiográfica maior que os animais sem tratamento (controle) ( $p > 0,05$ ). O tratamento sistêmico com doxiciclina foi capaz de aumentar a densidade radiográfica da área em cicatrização em relação tanto ao grupo controle quanto ao HA ( $p < 0,05$ ). A aplicação tópica do HA associada ao tratamento sistêmico com doxiciclina também mostrou valores significativamente maiores em comparação aos grupos

controle e HA, no entanto tal tratamento não mostrou diferenças em relação ao tratamento único com doxiciclina ( $p>0,05$ ), mostrando que a adição do ácido hialurônico não trouxe benefícios para os animais normais.

Os animais diabéticos se beneficiaram do tratamento com o HA quando comparados aos animais não tratados ( $p>0,05$ ). O tratamento sistêmico com doxiciclina e sua associação com o ácido hialurônico foram superiores aos grupos controle e HA ( $p<0,05$ ), no entanto a associação doxiciclina-HA não mostrou diferenças significativas em relação ao grupo com tratamento único com doxiciclina ( $p>0,05$ ), demonstrando, semelhante aos animais normais, que o HA não trouxe benefícios adicionais ao tratamento com a doxiciclina.

Quando os diferentes tratamentos nos animais diabéticos foram comparados ao grupo de animais normais sem tratamento observamos que apenas o grupo diabético sem tratamento apresentou diferença significativa ( $p<0,05$ ), mostrando que os tratamentos testados nos animais diabéticos trouxeram benefícios para estes animais.

**Tabela 2.** Média e desvio padrão da densidade radiográfica (pixels) de acordo com o grupo animal e tratamento.

| TRATAMENTO | GRUPO         |                |
|------------|---------------|----------------|
|            | NORMAL        | DIABÉTICO      |
| CONTROLE   | 92,87 ± 1,6 C | 81,2 ± 1,4 C * |
| HA         | 92,75 ± 1,7 C | 88,76 ± 1,9 B  |
| DOX        | 110,3 ± 3,5 A | 96,8 ± 2 A     |
| DOX+HA     | 108 ± 6,6 A   | 94,57 ± 1,8 A  |

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas, na vertical, diferem entre si pelo teste ANOVA one-way ( $p\leq 0,05$ ). Médias seguidas por \* diferem em relação ao tratamento controle do grupo normal pelo teste t de Student não-pareado ( $p\leq 0,05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

O objetivo do presente foi avaliar os possíveis benefícios da associação do ácido hialurônico em gel com a administração sistêmica de baixas doses de doxiciclina. Devido aos diferentes estudos na literatura reportarem efeitos positivos no reparo ósseo do tratamento tópico com ácido hialurônico (Mendes *et al*, 2008) bem como o uso de doses subantimicrobianas de doxiciclinas (Alkan *et al*, 2002) supomos que a associação destes dois agentes beneficiaria o reparo nos animais diabéticos.

O reparo ósseo é prejudicado na diabetes mellitus, particularmente devido ao aumento do colapso do colágeno. Recentemente, a tetraciclina tem sido usada para tratamentos experimentais em defeitos ósseos porque têm propriedades anti-colagenolíticas, e efeitos positivos no processo de reparo foram obtidos (Alkan *et al.*, 2002). Resultados semelhantes foram obtidos no presente estudo, onde observamos diferenças significativas entre o grupo diabético tratado com a doxiciclina ( $96,8 \pm 2$  pxls) e o grupo sem tratamento ( $81,2 \pm 1,4$  pxls).

O ácido hialurônico (HA) é um componente essencial da matriz extracelular e auxilia na formação e reparo dos tecidos (Laurent & Fraser, 1992; Fraser *et al*, 1997). Aslan *et al.* (2006) mostraram efeitos positivos no reparo de defeitos ósseos em tíbias de coelhos.

Os resultados encontrados para os animais normais quanto ao tratamento com o HA não corroboram com os resultados obtidos no estudo de Mendes *et al* (2008), no qual o tratamento com o ácido hialurônico foi benéfico para o reparo ósseo alveolar. No entanto, os autores do estudo anterior realizaram avaliação histológica, diferentemente do presente estudo que realizou apenas avaliação radiográfica. Pelo fato da avaliação

radiográfica não ser o método mais sensível para detectarmos diferenças no reparo ósseo entre os grupos devemos realizar a avaliação histológica para definirmos o real padrão de cicatrização resultante dos diferentes tratamento testados.

Estudos na literatura avaliando a aplicação do ácido hialurônico em defeitos ósseos em animais diabéticos não são encontrados desta maneira nos cabe caracterizar o padrão de cicatrização destes defeitos tanto com a avaliação radiográfica quanto com a avaliação histológica.

## **7. CONCLUSÃO**

Dentro dos limites do presente estudo, podemos concluir que a associação da doxiciclina sistêmica com a aplicação tópica do ácido hialurônico trouxe benefícios ao reparo ósseo alveolar dos animais diabéticos com resultados comparáveis aos animais não-diabéticos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alkan A, Erdem E, Günhan O, Karasu Ç. Histomorphometric Evaluation of the Effect of Doxycycline on the Healing of Bone Defects in Experimental Diabetes Mellitus: A Pilot Study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002; 60:898-904.
2. Aslan M, Simsek G, Dayi E. The effect of hyaluronic acid-supplemented bone graft in bone healing: experimental study in rabbits. *J Biomater Appl.* 2006; 20(3): 209-20.
3. Baishi TJ, Wolfinger GJ. Dental Implants in the Diabetic Patient: A Retrospective Study. *Implant Dent.* 1999; 8(4): 355-359.
4. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993; 4: 197–250.
5. Bodner L, Kaffe I, Cohen Z, Dayan D. Long-term effect of desalivation on extraction wound healing: a densitometric study in rats. *Dentomaxillofac Radiol.* 1993; 22(4):195-8.
6. Carvalho PSP. Influência da curetagem e da irrigação intra-alveolares na cronologia do processo de reparo em feridas de extração dental: estudo histológico em ratos. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, 1980.
7. Carvalho PSP, Okamoto T. Cirurgia bucal. Fundamentos experimentais aplicados à clínica. Ed. Panamericana: São Paulo, 1987.

---

\* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviaturas dos periódicos em conformidade com o Medline.

8. Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med.* 1997; 242(1): 27-33.
9. Friedman J, Pauly R, Stern D, Schmidt A-M, Monticone R, Crow M. Advanced glycation end products activate the expression of monocyte and smooth muscle cell chemoattractants by vascular smooth muscle cells. *Circulation.* 1994; 90 (part 2): 1567.
9. Golub LM, Lee HM, Lehrer G, Nemiroff A, McNamara TF, Kaplan R, Ramamurthy NS. Minocycline reduces gingival collagenolytic activity during diabetes. Preliminary observations and a proposed new mechanism of action. *J Periodontal Res.* 1983; 18: 516-526.
10. Golub LM, Wolff M, Lee HM, McNamara TF, Ramamurthy NS, Zambon JJ, Ciancio S. Further evidence that tetracyclines inhibit collagenase activity in human crevicular fluid and from other mammalian source. *J Periodontal Res.* 1985; 20: 12-23.
11. King SR, Hickerson WL, Proctor KG. Beneficial actions of exogenous hyaluronic acid on wound healing. *Surgery.* 1991; 109(1): 76-84.
12. Laurent TC, Fraser JR. Hyaluronan. *FASEB J.* 1992; 6(7): 2397-404.
13. Mendes RM, Silva GAB, Lima FM, Calliari MV, Almeida AP, ALves JB, Ferreira AJ. Sodium hyaluronate accelerates the healing process in tooth sockets of rats. *Arch Oral Biol.* 2008, 53: 1115-1162.
14. Okamoto T, Claudio CC, Aranega A. Gingival mucosa and dental socket healing using siliconized silk and siliconized poluester sutures after tooth extraction. A histological comparative study in rats. *Rev Int Ciênc Saúde.* 2002; 20(2): 145-150.

15. Pereira MC, Zecchin KG, Campagnoli EB, Jorge J. Ovariectomy delays alveolar wound healing after molar extractions in rats. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65(11):2248-53.
16. Pryor ME, Yang J, Polimeni G, Koo KT, Hartman MJ, Gross H, Agelan A, Manns JM, Wikesjo UM. Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: radiographic observations. *J Periodontol.* 2005; 76(8): 1287-92.
17. Ramamurthy NS, Golub LM. Diabetes increases collagenase activity in extracts of rat gingiva and skin. *J Periodontal Res.*1983; 18: 23–30.
18. Ryan ME, Golub LM. Modulation of matrix metalloproteinases activities in periodontitis as a treatment strategy. *Periodontology* 2000. 2000; 24: 226–238.
19. Salvi GE, Lang NP. Host response modulation in the management of periodontal diseases. *J. Clin Periodontol* 2005; 32 (Suppl. 6): 108–129.
20. Sasaki T, Watanabe C. Stimulation of osteoinduction in bone wound healing by high-molecular hyaluronic acid. *Bone.* 1995; 16(1): 9-15.
21. Shyng YC, Devlin H, Sloan P. The effect of streptozotocin induced experimental diabetes mellitus on calvarial defect healing and bone turnover in the rat. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2001; 30: 70–74
22. Spanheimer RG, Umpierrez GE, Stumpf V. Decreased collagen production in diabetic rats. *Diabetes.* 1988; 37(4): 371-6



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA/Unicamp

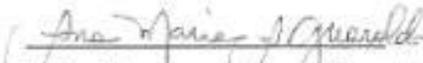
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1808-1, sobre "Efeitos da associação entre ácido hialurônico e doxicilina em doses subantimicrobianas sobre o reparo ósseo alveolar em ratos diabéticos", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum / Beatriz de Brito Bezerra, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 06 de abril de 2009.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1808-1, entitled "Effects of the association between hyaluronic acid and subantimicrobial dose doxycycline on alveolar bone repair in diabetic rats", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on April 6, 2009.

Campinas, 06 de abril de 2009.

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Fátima Afonso  
Secretária Executiva