



**DOUTORADO EM ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM IMPLANTODONTIA**

**CAROLINE RIBEIRO SERRÃO**

**EFEITOS DA METFORMINA NO REPARO ÓSSEO PERI-IMPLANTAR  
NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE HIPERGLICEMIA**

Guarulhos

2017

**CAROLINE RIBEIRO SERRÃO**

**EFEITOS DA METFORMINA NO REPARO ÓSSEO PERI-IMPLANTAR  
NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE HIPERGLICEMIA**

Tese apresentada à UNG Universidade para obtenção do título de

Doutor em Odontologia

Área de Concentração: Implantodontia

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Poliana Mendes Duarte

Co-Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Marta Ferreira Bastos

Guarulhos

2017

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas Fernando Gay da Fonseca**

S487e

Serrão, Caroline Ribeiro

Efeitos da metformina no reparo ósseo peri-implantar na presença e ausência de hiperglicemia. / Caroline Ribeiro Serrão. -- 2017.

86 f.; 31 cm.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Poliana Mendes Duarte

Tese (Doutorado em Odontologia) – Centro de Pós-Graduação Pesquisa e Extensão, Universidade Guarulhos, Guarulhos, SP, 2017.

1. Implantes Dentais, 2. Diabetes Melito. 3. Metformina. I. Título II. Duarte, Poliana Mendes (Orientadora). III. Universidade Guarulhos

CDD. 617.6

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, intitulada "EFEITOS DA METFORMINA SOBRE O REPARO ÓSSEO PERI-IMPLANTAR NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE HIPERGLICEMIA" em sessão pública realizada em 29 de março de 2017 considerou a candidata Caroline Ribeiro Serrão aprovada.

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

1. Profa. Dra. Poliana Mendes Duarte (UNG) Poliana Mendes Duarte
2. Profa. Dra. Cristina Cunha Villar (FOUSP) Cristina Cunha Villar
3. Profa. Dra. Klesia Pirola Madeira (UFES) Klesia Pirola Madeira
4. Prof. Dr. Jamil Awad Shibli (UNG) Jamil Awad Shibli
5. Prof. Dr. Bruno Bueno Silva (UNG) Bruno Bueno Silva

Guarulhos, 29 de março de 2017.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esses quatro anos de doutorado e os dez anos de Pós-Graduação na área da Implantodontia a Deus, que me guiou, amparou e sustentou em cada momento da minha caminhada, aos meus pais e aos meus dois grandes amores, os filhos Pedro e Isabelli.

## AGRADECIMENTOS

Pela primeira vez em minha história acadêmica eu realmente entendo o significado de agradecer a Deus. Não teria palavras para expressar com fidelidade o que é ser amparada e guiada como tenho sido nesses últimos anos. Muito obrigado Senhor pela vida, cada suspiro, cada abrir de olhos e pelo presente que nos oferece todos os dias. Obrigada pela proteção constante a mim e aos que amo. Obrigada por cada dificuldade e cada superação. Obrigada por me levantar todas as vezes. Obrigada por tudo.

Aos pais, Marielza e Eraldo, que me criaram com amor e carinho e me ensinaram a importância da sensação de dever cumprido, da responsabilidade e da independência. Mãe, a você minha gratidão especial, pois seu apoio e amizade viabilizaram a conclusão desse e dos outros trabalhos da vida acadêmica e profissional.

Aos tios que também cuidaram de mim como verdadeiros pais. Em especial as minhas tias Lucianna, Monika e Eliana - meu carinho, gratidão e amor eternos.

Aos meus avós Maisa, Elcy e Mário, presentes *in memoriam*, e a minha avó Elza, que cuida diariamente com abnegação de mim e dos meus filhos.

A Dayane e Aívila, “meus anjos da guarda do consultório” que administram com maestria a minha clínica e cuidam com amor e competência dos pacientes e de mim, principalmente durante todos esses anos em que me dividi entre os estudos e a prática da Odontologia.

Aos meus amigos e familiares, muito obrigada por nunca desistirem de mim, mesmo diante de minhas ausências.

A orientadora Professora Poliana Mendes Duarte, um exemplo de dedicação, disciplina, competência. Obrigada pela paciência, pela compreensão e por me transmitir de maneira genuína e generosa seus conhecimentos.

A todos os professores, alunos e funcionários da Pós-Graduação de Odontologia da UNG pelo convívio e aprendizado compartilhados.

A FAPESP, Fundação de amparo à pesquisa do estado de São Paulo, pelo apoio e financiamento dessa pesquisa.

#### AGRADECIMENTO ESPECIAL

Aos filhos. Bebelli, meu amor, por ser tão amorosa, inteligente, alegre e por colorir meus dias com seu sorriso. A Pedro, meu filhão, por me ensinar diariamente o que é amar abnegadamente e a despeito de tudo e por me fazer ser uma pessoa melhor a cada amadurecer. Espero que esses dias em que estive ausente para concluir esse trabalho sirvam para selar nosso amor infinito, certificar também em vocês a importância dos estudos, da dedicação e do dever cumprido.

“A cada dia que vivo, mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos,, na prudência egoísta que nada arrisca e que, esquivando nos do sofrimento, perdemos também a felicidade.. A dor é inevitável. O sofrimento é opcional.”

Carlos Drummond de Andrade



## RESUMO

**Objetivos:** Estudos anteriores demonstraram que a metformina pode exercer efeitos sobre as células ósseas. No entanto, o papel da metformina sobre o reparo ósseo em torno dos implantes de titânio na presença e ausência de hiperglicemia não foi completamente elucidado até o momento. Portanto, os objetivos da presente tese serão: Estudo 1 - Avaliar os efeitos da metformina sobre o reparo ósseo ao redor de implantes de titânio inseridos em ratos não-diabéticos. Estudo 2 - Avaliar o possível papel de metformina em reverter os efeitos negativos da hiperglicemia no reparo ósseo em torno de implantes inseridos em ratos. **Material e Métodos:** No Estudo 1, 20 ratos Wistar foram distribuídos aleatoriamente em um dos seguintes grupos experimentais: Grupo controle (n = 10): ratos sem tratamento com metformina; Grupo MT (n= 10): ratos tratados com metformina (40 mg/kg/dia por gavagem). Aos trinta dias após a colocação do implante, os animais foram sacrificados. No Estudo 2, 30 ratos foram atribuídos em um dos seguintes grupos: Grupo DM (n= 10): Ratos diabéticos tipo 2 sem tratamento com metformina (M); Grupo MDM (n= 10): Ratos diabéticos tipo 2 tratados com M (40 mg/kg/dia por gavagem, começando no 15º dia após a colocação do implante); Grupo controle (n= 10): ratos não-diabéticos sem tratamento com M. Os implantes de titânio foram inseridos nas tíbias em trinta dias após a injeção de estreptozotocina para indução do diabetes. Aos trinta dias após a colocação do implante, os animais foram sacrificados. Em ambos os estudos, o contato osso-implante (BIC), a área óssea dentro das roscas (BA) e o número de células marcadas para RANKL e OPG foram avaliados nas regiões corticais e medulares. **Resultados:** No Estudo 1, as porcentagens de BIC e BA no osso cortical foram significativamente menores no grupo MT quando comparado ao grupo controle ( $p<0,05$ ). Além disso, o osso medular ao redor dos implantes inseridos nos animais tratados com MT exibiram um aumento do número de células marcadas para RANKL em comparação ao grupo controle ( $p<0,05$ ). No Estudo 2, as porcentagens de BIC e BA foram menores no osso cortical dos grupos DM e MDM em comparação ao grupo controle ( $p<0,05$ ). Além disso, a porcentagem de BA na região medular foi menor no grupo DM em relação ao grupo de controle ( $p<0,05$ ). O grupo MDM apresentou o maior número de células marcadas para OPG, enquanto o grupo DM apresentou a maior proporção de RANKL/OPG na área medular ( $p<0,05$ ). **Conclusões:** A metformina afetou negativamente a osseointegração, reduzindo as porcentagens de BIC e BA e aumentando a expressão de RANKL ao redor de implantes de titânio inseridos em ratos não-diabéticos. Além disso, esta droga não foi capaz de reverter a influência negativa da hiperglicemia no reparo ósseo ao redor de implantes em nível histométrico, mas aumentou a expressão de OPG e diminuiu a proporção RANKL/OPG na área medular, produzindo alguns benefícios moleculares no processo de osseointegração de implantes sob um estado hiperglicêmico.

**Palavras-chave:** Implantes Dentais; Diabetes Melito; Metformina

## ABSTRACT

**Purposes:** Previous investigations have shown that metformin might exert effects on bone cells. However, the role of metformin on bone healing around titanium implants under the presence and absence of hyperglycemia has not been completely elucidated so far. Therefore, the aims of the current thesis are: Study 1 - To evaluate the effects of metformin on bone healing around titanium implants inserted in non-diabetic rats. Study 2 - To evaluate the possible role of metformin in reversing the negative effects of hyperglycemia on bone healing around implants inserted in rats. **Material and Methods:** In the Study 1, 20 Wistar rats were randomly assigned to one of the following experimental groups: Control group (n=10): rats without metformin treatment; MT group (n=10): rats treated with metformin (40 mg/kg/day by gavage). At thirty days after implant placement, animals were euthanized. In the Study 2, 30 rats were assigned to one of the following groups: DM group (n=10): type 2 diabetic rats without metformin (M) treatment; MDM group (n=10): type 2 diabetic rats treated with M (40 mg/kg/day, starting on the 15<sup>th</sup> day after implant placement); Control group (n=10): non-diabetic rats without M treatment. At thirty days after streptozotocin injection to induce diabetes, titanium implants were placed in tibiae. At thirty days after implant placement, animals were euthanized. In both Study 1 and Study 2, bone-to-implant contact (BIC), bone area (BA) and the number of RANKL- and OPG-stained cells were assessed in cortical and medullary areas. **Results:** In the Study 1, the percentages of BIC and BA in the cortical bone were significantly lower in the MT group than in the control group ( $p < 0.05$ ). Furthermore, the medullary bone around the implants inserted in the metformin-treated animals exhibited an increased number of RANKL-stained cells than that around the implants inserted in the control animals ( $p < 0.05$ ). In the Study 2, the percentages of BIC and BA in the cortical bone were lower in the DM and MDM groups than in the control group ( $p < 0.05$ ). The percentage of BA in the medullary region was reduced in the DM group, compared to control group ( $p < 0.05$ ). The MDM group presented the highest number of OPG-stained cells while the DM group presented the greatest ratio of RANKL/OPG in the medullary area ( $p < 0.05$ ). **Conclusions:** Metformin negatively affected osseointegration by reducing the percentages of BIC and BA and increasing the expression of RANKL around titanium implants inserted in non-diabetic rats. Furthermore, this drug did not modulate the negative influence of hyperglycemia on bone healing around implants at histometric levels, but increased the expression of OPG and decreased the RANKL/OPG ratio in medullary area, yielding some molecular benefits on the osseointegration of implants under hyperglycemic state.

**Key-words:** Dental Implants; Diabetes Mellitus; Metformin

## **SUMÁRIO**

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO   | 11 |
| 1.1 Implantes dentais e diabetes melito (DM)  | 11 |
| 1.1.1 Estudos pré-clínicos: reparo ósseo ao redor de implantes inseridos em animais diabéticos tratados e não-tratados com hipoglicemiantes | 13 |
| 1.1.2 Implantes dentais em pacientes diabéticos   | 22 |
| 1.2 Efeitos da metformina sobre o tecido ósseo  | 27 |
| 2. PROPOSIÇÃO   | 33 |
| 3. ARTIGO CIENTÍFICO 1  | 34 |
| 4. ARTIGO CIENTÍFICO 2  | 51 |
| 5. CONCLUSÕES GERAIS  | 77 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS  | 78 |
| ANEXO   | 85 |

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Implantes dentais e diabetes melito (DM)**

A reabilitação de pacientes total ou parcialmente edêntulos por meio de próteses suportadas por implantes osseointegráveis é atualmente uma prática clínica corriqueira. Vários estudos clínicos longitudinais clássicos e recentes, desenvolvidos em centros de diferentes continentes, demonstraram que as próteses suportadas por implantes alcançam altos índices de sucesso (aproximadamente 91-98%), durante acompanhamentos de mais de 10 anos (Adell et al. 1981, Albrektsson et al. 1988, Derks et al. 2015). Corroborando esses dados, revisões sistemáticas com meta-análises também têm indicado a elevada taxa de sucesso de reabilitações suportadas por implantes (Kwon et al. 2014, Moraschini et al. 2015, Muddugangadhar et al. 2015).

Apesar dos altos índices de sucesso dos implantes dentais, o entendimento dos motivos que levam ao insucesso dos mesmos ainda é objeto de interesse de clínicos e pesquisadores. Didaticamente, as falhas dos implantes dentais podem ser classificadas em precoces, caso ocorram antes da instalação do componente protético e colocação de carga mastigatória ou, tardias, caso aconteçam após a instalação da prótese. As falhas precoces ocorrem devido a incapacidade de estabelecimento da osseointegração e está relacionada, geralmente, à fatores externos (como, por exemplo, à experiência do operador) e fatores inerentes ao indivíduo de ordem local e sistêmica (como, por exemplo, qualidade óssea, presença de enxertos, hábito de fumar e doenças sistêmicas) que prejudiquem ou impeçam o reparo ósseo peri-implantar. Por outro lado, as falhas tardias estão relacionadas à oclusão, ao excesso de carga mastigatória após reabilitação protética e/ou à alterações patogênicas na microbiota peri-implantar (Esposito et al. 1998, Quirynen et al. 2002).

Neste contexto, pesquisadores e implantodontistas têm questionado se pacientes portadores de determinadas desordens sistêmicas ou que fazem uso de determinados medicamentos capazes de influenciar o tecido ósseo são candidatos seguros para reabilitação por meio de implantes dentais (Kotsakis et al. 2015, Chrcanovic et al. 2016).

DM é uma enfermidade metabólica de origem multifatorial influenciada por fatores como obesidade, falta de exercícios físicos e/ou predisposição genética. Essa desordem é caracterizada pela secreção inadequada de insulina, pela ação insuficiente da insulina ou por ambos (Genuth et al. 2003), que acarreta hiperglicemia crônica que, por sua vez, está associada à diversos danos em longo prazo, incluindo a falência de vários órgãos como olhos, rins, tecido nervoso, coração e vasos sanguíneos. Em 2016, a Associação Americana da Diabetes classificou o DM nas seguintes categorias: DM tipo 1, DM tipo 2, DM gestacional (diabetes diagnosticada no segundo ou terceiro trimestre de gravidez) e DM devido a outras causas (como diabetes neonatal, diabetes induzida por drogas ou por doenças pancreáticas como a fibrose cística). Os principais tipos de DM incluem o tipo 1 ou tipo 2. O DM tipo 1 acomete predominantemente crianças e jovens e atinge cerca de 5 a 10% dos indivíduos portadores da doença. O DM tipo 2, por sua vez, é a forma mais comum de DM que incide em 90 a 95% dos diabéticos e está relacionada à fatores genéticos e comportamentais. No DM tipo 1 ocorre uma deficiência absoluta na secreção da insulina que pode ser causada por um processo autoimune nas ilhotas pancreáticas ou por alterações genéticas. No DM tipo 2 ocorre resistência à utilização e/ou inadequada secreção da insulina (American Diabetes Association, 2016).

Em 2004, Wild et al. realizaram um estudo epidemiológico para estimar o aumento mundial da prevalência da DM entre 2000 e 2030, baseado em artigos e dados da Organização Mundial de Saúde. Os resultados demonstraram que o número de pessoas com DM deverá dobrar entre 2000 e 2030, devido a urbanização, aumento da expectativa de vida da população bem como ao aumento da incidência de obesidade e sedentarismo. A prevalência da DM na população em 2030 será de 4,4% em todo o mundo, totalizando 366 milhões de pessoas. Os autores ainda alertaram para o fato de que nos países em desenvolvimento esse aumento será ainda mais expressivo e que haverá uma epidemia mundial de DM que gerará aumento das mortes por doenças cardiovasculares e outras consequências associadas a essa enfermidade. De acordo com Shaw et al. (2010), a prevalência mundial de DM entre adultos com idade entre 20 e 79 anos será maior que a prevista por Wild et al. (2004), devendo totalizar 7,7% da população ou 439 milhões de pessoas até 2030. Ainda de acordo com os autores, entre 2010 e 2030, haverá um aumento de 69% no número de adultos com DM nos países em desenvolvimento e um

aumento de 20% nos países desenvolvidos. Corroborando esses dados de alta prevalência de DM, a Federação Internacional de Diabetes estimou recentemente que 415 milhões de pessoas no mundo possuem a doença, ou seja, 1 a cada 11 pessoas, e que a cada 6 segundos uma pessoa morre de DM (5 milhões de mortes). Foi estimado também que a prevalência da DM nas Américas Central e do Sul é de 9,4% (8,0-11,3%) e que o Brasil é um dos países com maiores taxas da doença ([www.idf.org/diabetesatlas](http://www.idf.org/diabetesatlas)). Um dado interessante é o fato que a mortalidade devido às complicações agudas induzidas pelo DM no Brasil diminuiu acentuadamente durante as últimas duas décadas (1991-2010), provavelmente devido ao aumento da acessibilidade ao diagnóstico da doença e ao tratamento com drogas hipoglicemiantes. Entretanto, estima-se que ao longo desse período, 694.769 mortes ocorreram por DM no Brasil, dos quais 81.208 (11,7%) foram devido às complicações agudas dessa doença (Klafke et al. 2015).

No campo da odontologia, o DM possui um papel importante e tem sido alvo de diversas pesquisas. Um amplo número de estudos pré-clínicos e clínicos tem demonstrado relação entre o DM e as doenças e complicações orais, incluindo a periodontite e as alterações no reparo ósseo ao redor de implantes (Xu et al. 2016, Luo et al. 2016; Renvert & Quirynen, 2015, Sonnenschein & Meyle, 2015; Ahdi et al. 2015; Wang et al. 2014). Por esse motivo, o cirurgião-dentista deve ser incluído na equipe multidisciplinar que cuida do paciente portador de DM e o mesmo deve estar atento aos novos conhecimentos gerados sobre o impacto do DM tanto em nível sistêmico quanto em nível bucal.

### **1.1.1 Estudos pré-clínicos: reparo ósseo ao redor de implantes inseridos em animais diabéticos tratados e não-tratados com hipoglicemiantes**

Com o objetivo de compreender os efeitos do DM sobre o processo de osseointegração, diversas pesquisas pré-clínicas analisando o reparo ósseo em torno de implantes osseointegráveis inseridos em animais diabéticos foram conduzidas nas últimas décadas. De maneira geral, a maioria dos artigos apresentaram as seguintes características metodológicas: 1) uso de estreptozotocina para a indução do DM; 2) comparação de animais diabéticos designados como “teste” com animais não-diabéticos, designados como “controle”; 3) avaliações em períodos de reparo variados compreendendo as etapas

iniciais (7 a 14 dias) e tardias (após 60 dias); 4) avaliações predominantemente histométricas, histológicas, geralmente em cortes não-descalcificados, e testes biomecânicos (torque de remoção); 5) inclusão de grupos com algum tipo de tratamento para o DM por meio de hipoglicemiantes.

Em 1998, Nevins et al. realizaram um experimento com objetivo de comparar, por meio de histometria, o reparo ósseo em torno de implantes inseridos em ratos diabéticos, em 4 e 8 semanas pós-instalação dos implantes. Os resultados demonstraram que o contato osso-implante (BIC) considerando o implante como um todo foi significativamente menor nos ratos diabéticos em 4 e 8 semanas ( $29 \pm 4\%$  e  $14 \pm 4\%$ , respectivamente) quando comparado aos ratos do grupo controle ( $50 \pm 11\%$  e  $16 \pm 11\%$ , respectivamente). Entretanto, as porcentagens de preenchimento ósseo e de BIC no espaço medular não diferiram entre os grupos. Os autores concluíram que a hiperglicemia altera a osseointegração, particularmente na região cortical, e que a osteogênese não aumenta com o passar do tempo.

Neste mesmo ano, Takeshita et al. (1998) avaliaram histologicamente o efeito do DM na formação óssea em torno de implantes de titânio inseridos em tíbias de ratos, em 7, 28, 56 e 84 dias após a instalação dos mesmos. No 7º dia, havia menor quantidade de tecido osteóide em torno dos implantes inseridos nos animais diabéticos, em comparação ao grupo controle. Em 28 e 56 dias, observou-se uma camada de tecido ósseo lamelar em contato com implantes no controle. No grupo teste, por sua vez, embora também tenha sido observada uma camada de osso lamelar, havia uma maior quantidade de adipócitos. Em 84 dias, a camada de osso lamelar se tornou mais fina no grupo teste quando comparado ao grupo controle. A avaliação quantitativa demonstrou que o contato osso-implante e a espessura óssea foram significativamente maiores no grupo controle, sugerindo que a hiperglicemia é capaz de atrapalhar o reparo ósseo peri-implantar.

Fiorellini et al. (1999) utilizaram avaliações histométricas para comparar o reparo ósseo ao redor de implantes de titânio instalados em ratos não-diabéticos (ND) e diabéticos tratados com insulina (TI), em um período de 28 dias. A densidade do osso medular foi significativamente maior no grupo TI ( $16,3\% \pm 0,2$ ) quando comparado ao grupo ND ( $9,8\% \pm 0,2$ ), enquanto o contato ósseo medular foi maior no grupo ND ( $51,3\% \pm 0,3$ ) em relação ao TI ( $42,2\% \pm 0,2$ ). Os resultados sugeriram que o controle do

DM com insulina pode melhorar a formação óssea, mas não a porcentagem de contato do osso medular com o implante.

Em 2000, McCracken et al., avaliaram o reparo ósseo em torno de implantes inseridos em tíbias de ratos diabéticos, em um período de 14 dias, utilizando mensurações de osteocalcina e fosfatase alcalina séricas bem como medidas histométricas de porcentagem de osseointegração e de volume ósseo em torno do implante. Animais diabéticos apresentaram osseointegração e níveis séricos de osteocalcina significativamente menores que os controles. Por outro lado, o volume total ósseo e os níveis séricos de fosfatase alcalina foram significativamente maiores no grupo teste comparado ao controle. Baseado nestes resultados, os autores concluíram que o reparo ósseo em torno de implantes inseridos em ratos diabéticos foi diferente daqueles inseridos em ratos não-diabéticos.

Siqueira et al. (2003) investigaram o processo de osseointegração em ratos diabéticos tratados com insulina, em 10 e 21 dias, por meio de histometria. Diferente dos estudos acima que utilizaram estreptozotocina, esse estudo utilizou aloxana. O aloxana é um análogo da glicose que possui efeito tóxico sobre as células  $\beta$  do pâncreas e é, portanto, capaz de induzir DM tipo 1. A administração de insulina no grupo tratado foi iniciada no 10º dia após a indução da DM e permaneceu diariamente durante todo período experimental. O DM não-tratado apresentou uma redução de 50% na área de osso formado e no contato osso-implante, em 21 dias após a instalação dos implantes. O tratamento dos animais diabéticos com insulina restaurou a síntese de novo osso em níveis similares aos observados nos animais controle. Os autores concluíram que o DM prejudicou o reparo ósseo peri-implantar e que o tratamento com insulina regulou positivamente esse processo.

Margonar et al. (2003) compararam, por meio do torque de remoção em 4, 8, e 12 semanas, a osseointegração de implantes inseridos em coelhos diabéticos tratados e não por insulina e coelhos saudáveis (controle). Neste estudo, o DM também foi induzido por aloxana. Os resultados demonstraram que na 4ª semana não havia diferenças estatísticas entre os grupos. Entretanto, na 8ª e 12ª semana, o torque de remoção foi significativamente maior no grupo controle e não houve diferenças entre os grupos diabéticos tratados ou não por insulina. Os autores concluíram que a hiperglicemia gerada



pelo DM prejudicou a osseointegração e que o tratamento com insulina não aumentou o torque de remoção do implante.

Kwon et al., em 2005, avaliaram histometricamente, por um período de 4 meses, os efeitos do DM e seu tratamento com insulina em implantes com osseointegração estabelecida. O DM foi induzido em 28 dias após a colocação dos implantes e, subsequentemente, alguns animais receberam tratamento com insulina. De acordo com os resultados, o contato osso-implante foi significativamente maior no grupo submetido ao controle glicêmico por insulina. Os autores concluíram que o controle glicêmico pela insulina é capaz de manter a osseointegração, entretanto, o contato osso-implante parece decrescer em ratos diabéticos não-controlados.

Neste mesmo ano, Kopman et al. (2005) avaliaram histologicamente os efeitos do DM e seu tratamento com aminoguanidina e doxíciclina no tecido ósseo ao redor de implantes instalados em ratos, durante um período de reparo de 28 dias. A justificativa para a avaliação destas duas drogas foi o fato da aminoguanidina ser um medicamento usado para pacientes diabéticos portadores de complicações como nefropatias e a doxíciclina ter efeito inibidor de metaloproteinasas, que estão em níveis elevados nos diabéticos podendo atrapalhar o reparo tecidual. Os resultados demonstraram uma média de contato osso-implante na região medular de 64,3% ( $\pm 3,7\%$ ) para o grupo controle, 22,2%  $\pm (3,9\%)$  para o grupo diabético, 33,9%  $\pm (4,0\%)$  para o grupo tratado com doxíciclina e 55,3%  $\pm (6,1\%)$  para o grupo tratado com aminoguanidina. O grupo controle diferiu significativamente de todos os outros grupos. O contato osso-implante no grupo tratado com aminoguanidina foi estatisticamente maior, enquanto o mesmo não diferiu entre o grupo doxíciclina e o grupo diabético. Os autores concluíram que o DM prejudicou a osseointegração e que a administração de aminoguanidina foi capaz de modular o reparo ósseo peri-implantar de maneira positiva.

McCracken et al. (2006) avaliaram o reparo ósseo ao redor de implantes inseridos na tíbia de ratos diabéticos e ratos diabéticos tratados com insulina. Os implantes foram instalados três dias após a indução do DM e foram realizadas avaliações histométricas nos 2°, 7°, 14°, e 24° dias. Os resultados demonstraram que o tempo foi um fator significativo para a quantidade de volume ósseo, de maneira não linear, já que o volume ósseo atingiu o pico no 7° e diminuiu até o 24° dia. As porcentagens médias de volume

total de osso para os grupos controle, diabético, e tratado com insulina foram  $12,4 \pm 9$  %;  $22,6 \pm 0$  % e  $17 \pm 7$  %, respectivamente. A quantidade óssea ao redor dos implantes inseridos nos animais diabéticos foi significativamente maior que nos animais não-diabéticos (controle). Os grupos controle e tratado por insulina, por sua vez, obtiveram resultados semelhantes em relação ao volume ósseo peri-implantar. Ao contrário da maior parte da literatura, os autores concluíram que animais diabéticos produzem maior volume ósseo em torno de implantes que ratos controle e que a insulina pode modular o reparo óssea.

Shyng et al. (2006) avaliaram a formação óssea em torno de implantes inseridos imediatamente após exodontia dental em ratos diabéticos e controles não-diabéticos. Vinte e um dias após a indução do DM, o primeiro molar direito maxilar foi extraído e um implante de titânio foi imediatamente instalado no alvéolo. Os animais foram sacrificados em 20 e 40 dias após a instalação do implante e foram obtidas espécimes descalcificadas para análise histológica. Foi observado que no 20º dia após a cirurgia, os implantes inseridos nos ratos diabéticos estavam envoltos por tecido fibroso e medula óssea, enquanto o grupo controle apresentava osso lamelar. Em 40 dias após a cirurgia, existia grande quantidade de tecido de granulação e extensa área de reabsorção óssea em torno dos implantes instalados nos ratos diabéticos, enquanto o grupo controle apresentava osso lamelar denso e bem organizado. Os resultados indicaram que o DM prejudicou significativamente o reparo ósseo ao redor de implantes imediatos.

Mais tarde, em 2008, Casap et al. compararam por meio de análises histométricas, a osseointegração de implantes inseridos em tíbias de ratos controle saudáveis e ratos diabéticos, com hiperglicemia induzida por meio de uma dieta hipercalórica. Análises histométricas de contato osso-implante e volume ósseo medular foram realizadas em 2, 4 e 8 semanas após a cirurgia. Os resultados demonstraram que não havia diferença entre os grupos controle e diabéticos. Entretanto, é importante salientar que o modelo de indução do DM não foi o mesmo utilizado pela maioria da literatura.

De acordo com Hasegawa et al. (2008), o efeito do DM tipo 2 no processo de osseointegração não tem sido investigado por modelos apropriados. Os autores avaliaram, histológica e histometricamente o reparo ósseo em torno de implantes instalados em ratos portadores de DM tipo 2 (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty-OLETF) geneticamente

modificados, após 4 e 8 semanas. De acordo com os resultados, o tecido ósseo cortical em torno dos implantes foi significativamente maior no grupo controle quando comparado ao grupo teste, enquanto não houve diferenças entre os grupos para o osso medular. Num estágio inicial de reparo (4 semanas), a porcentagem de contato osso-implante, tanto cortical quanto medular, foi significativamente maior no grupo controle (61%) quando comparado ao grupo teste (12%). Na oitava semana, a porcentagem óssea do grupo controle foi duas vezes maior. A morfogênese óssea em ratos diabéticos foi caracterizada por tecidos ósseos fragmentados e presença de tecido fibroso. Os autores verificaram que a DM tipo 2 atrapalhou o processo de osseointegração em ratos com DM tipo 2.

De Moraes et al. (2009) avaliaram o efeito do DM e seu tratamento com insulina na densidade óssea ao redor de implantes instalados em tíbias de ratos, por meio de subtração radiográfica digital. Dois meses após a instalação dos implantes um grupo controle (A) foi sacrificado e outros animais foram separados aleatoriamente em um dos seguintes grupos: ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (grupo D), ratos diabéticos tratados por insulina (grupo I) e ratos controle sacrificados em 4 meses (grupo C). Imediatamente após a confirmação do DM, a insulina foi administrada diariamente no grupo I. Quatro meses após a instalação dos implantes, os animais dos grupos D, I e C foram sacrificados. Radiografias foram realizadas no momento da instalação do implante e na eutanásia. As imagens foram digitalizadas e uma subtração digital foi realizada no tempo inicial e no final do tempo experimental para avaliação da densidade óssea. O grupo que apresentou maior densidade foi o I e o que apresentou menor densidade foi o grupo D. Os grupos A e C foram estatisticamente semelhantes entre si e com o grupo I. Os autores concluíram que a DM prejudicou a densidade óssea peri-implantar e que o tratamento com insulina melhorou a densidade para níveis semelhantes ao grupo controle sem DM.

Wang et al. (2010) avaliaram, por meio de análises histológicas e histométricas, o tecido ósseo em torno de implantes inseridos em ratos diabéticos tipo 2 modificados geneticamente denominados Goto-Kakizaki (GK), em 4 e 8 semanas. Em 4 semanas, o grupo teste apresentou os implantes envolvidos por osso medular e tecido fibroso, enquanto o grupo controle apresentou tecido ósseo lamelar. Em 8 semanas, o grupo teste

demonstrou tecido de granulação e áreas de reabsorção óssea em torno do implante, enquanto o grupo controle exibiu tecido ósseo bem organizado. Os resultados histométricos revelaram que a porcentagem de contato osso-implante para os grupos teste e controle na quarta semana foram  $27 \pm 4\%$  e  $49 \pm 6\%$  e, na oitava semana  $34 \pm 11\%$  e  $55 \pm 7\%$ , respectivamente. Os autores concluíram que a DM tipo 2, nesse modelo experimental, prejudicou a osseointegração e, sugeriram que novos estudos em nível molecular devem ser realizados para desvendar o mecanismo de ação da hiperglicemia no reparo ósseo peri-implantar.

Em 2011, Colombo et al. avaliaram os principais estágios da osseointegração, incluindo recrutamento, proliferação, diferenciação celular e produção de tecido osteóide, além de fatores de crescimento e citocinas associados ao reparo ósseo em torno de implantes instalados em alvéolos de ratos saudáveis e diabéticos GK. Análises histológicas, histoquímicas e imunohistoquímicas para localizar a presença de células mesenquimais progenitoras e vários biomarcadores (osteopontina, osteocalcina, interleucina [IL]1- $\beta$ , IL-6, fator de necrose tumoral [TNF]-alfa e fator de crescimento tumoral [TGF]- $\beta$ 1) foram realizadas em 1, 3, 6, 9 e 12 semanas. De acordo com os resultados, a formação e mineralização do tecido ósseo em torno de implantes de ratos diabéticos estava atrasada e em menor quantidade quando comparado aos animais saudáveis. Esse achado histológico e histométrico parece estar relacionado a uma menor proliferação e diferenciação de osteoblastos no osso diabético, verificado em nível molecular pelo maior número de células mesenquimais indiferenciadas marcadas por osteocalcina e osteopontina, bem como pelo maior número de células marcadas por citocinas pro-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ).

Guimarães et al. (2011) avaliaram os efeitos do DM induzido por aloxana e do tratamento com diferentes doses de aminoguanidina (10 mg/kg e 20 mg/kg) na retenção biomecânica (torque máximo de remoção) de implantes inseridos no fêmur de ratos diabéticos, em 14 dias após a instalação do implante. Os resultados revelaram que o torque necessário para remoção dos implantes nos animais diabéticos foi significativamente menor que nos não-diabéticos. Entretanto, os ratos diabéticos tratados com 20 mg/kg de aminoguanidina apresentaram torque de remoção similar aos saudáveis. Os autores concluíram que o DM gera efeitos deletérios na formação óssea em torno de

implantes e que a terapia diária com 20 mg/kg de aminoguanidina é capaz de reestabelecer o padrão normal de reparo ósseo.

Kuchler et al. (2011) compararam o reparo ósseo ao redor de implantes instalados na tíbia dos ratos sistemicamente saudáveis, sistemicamente saudáveis recebendo paratormônio (PTH; 60 mg/kg), diabéticos e diabéticos recebendo PTH (60 mg/kg). Após 4 semanas de osseointegração, os animais foram sacrificados e espécimes não-descalcificadas contendo o implante e tecido ósseo foram obtidas para análises histométricas. Os resultados mostraram que a porcentagem de contato osso-implante e a quantidade total de osso medular aumentou significativamente nos animais sistemicamente saudáveis tratados com PTH. Entretanto, a administração de PTH não afetou o contato osso-implante sob condições hiperglicêmicas. Os autores concluíram que DM afeta a osseointegração e que o PTH é capaz de melhorar o reparo ósseo apenas nos ratos saudáveis.

Von Wilmowsky et al. (2011) avaliaram o reparo ósseo em torno de implantes instalados em porcos diabéticos, comparado à animais sistemicamente saudáveis (grupo controle). Em 6 e 12 meses após a indução do DM, foram realizadas biópsias nos tecidos ósseo e gengival para verificar os danos histopatológicos causados pela hiperglicemia. Microscopia eletrônica de varredura revelou que o endotélio vascular do grupo controle apresentava-se com aspecto normal e sem sinais de desconexão celular, enquanto o grupo de animais diabéticos apresentava-se com superfície irregular e células desconectadas. A instalação dos implantes foi realizada no 15º mês e a eutanásia em dois tempos experimentais: no 1º mês após instalação do implante (5 porcos controle e 8 diabéticos) e 3º mês após instalação do implante (5 animais controle e 7 diabéticos). As seguintes avaliações peri-implantares foram realizadas: histometria para avaliação do contato osso-implante e a densidade mineral óssea peri-implantar e imunohistoquímica para avaliação da expressão de colágeno tipo I e osteocalcina. De acordo com os resultados, os parâmetros histométricos e os níveis de osteocalcina estavam significativamente reduzidos no grupo diabético quando comparado ao controle.

De Molon et al. (2013) avaliaram o efeito do DM e seu tratamento com insulina no reparo ósseo em torno de implantes com osseointegração estabelecida, por meio de histometria e torque de remoção obtidos em 4 meses após a colocação dos implantes. Os

resultados demonstraram que não houve diferenças significativas entre os grupos para o contato osso-implante. Entretanto, a área óssea peri-implantar e o torque de remoção foram significativamente maiores nos grupos controle e diabético tratados com insulina, em comparação ao grupo diabético. Os autores concluíram que o DM prejudicou o reparo ósseo ao redor de implantes com osseointegração estabelecida e que a terapia com insulina foi capaz de prevenir a ocorrência tal efeito negativo.

Ainda em 2013, Schlegel et al. investigaram o processo de formação óssea ao redor de implantes com duas diferentes superfícies (SLA<sup>®</sup> e SLActive<sup>®</sup>) inseridos na calvária de porcos portadores de DM induzido por estreptozotocina. Análises histométricas e imunohistoquímicas para colágeno tipo I e osteocalcina foram realizadas em 30 e 90 dias após a instalação dos implantes. Os resultados demonstraram que o contato osso-implante foi maior nos animais normais em comparação aos diabéticos tanto em 30 como em 90 dias. Em 90 dias, a superfície SLActive<sup>®</sup> demonstrou maior contato que a superfície SLA<sup>®</sup> nos animais diabéticos. Além disso, a superfície SLActive<sup>®</sup> demonstrou maior densidade óssea nos animais diabéticos e saudáveis quando comparados a superfície SLA<sup>®</sup>. A expressão de colágeno foi maior ao redor dos implantes com superfície SLA<sup>®</sup> inseridos nos animais diabéticos. A expressão de osteocalcina, por sua vez, aumentou com o tempo sem interferência pelo tipo de superfície usada. Os autores concluíram que o DM gera alterações histopatológicas no tecido ósseo ao redor de implantes e que o uso da superfície SLActive<sup>®</sup> promove benefícios para a osseointegração tanto nos porcos saudáveis como nos diabéticos.

Hashiguchi et al. (2014) compararam, histometricamente e por meio de torque de remoção, o processo de osseointegração em ratos diabéticos GK, ratos diabéticos GK tratados por voglibose e ratos sistemicamente saudáveis, em 3 e 9 semanas. Os resultados demonstraram que os ratos controle apresentaram maior torque de remoção e contato osso-implante que ambos grupos diabéticos, tratados ou não por voglibose, em 3 e 9 semanas. Os autores concluíram que o DM prejudicou o reparo ósseo ao redor de implantes e que o tratamento com voglibose não foi capaz de reverter os efeitos deletérios do DM no tecido ósseo peri-implantar.

Inouye et al. (2014) compararam a osseointegração em torno de implantes inseridos no alvéolo cicatrizado de ratos diabéticos tratados ou não por metformina, por

meio de microtomografia computadorizada. Os parâmetros analisados foram quantidade de hidroxilisil piridinolina, um marcador do metabolismo de colágeno, porcentagem de volume ósseo, número de trabéculas, porcentagem de contato osso-implante e densidade óssea mineral. Os níveis de hidroxilisil piridinolina e o volume ósseo apresentaram-se significativamente aumentados nos animais não-diabéticos quando comparado aos animais diabéticos na quarta semana. O contato osso-implante, na quarta semana, estava maior nos animais saudáveis quando comparados aos diabéticos não-tratados. Em conclusão, os resultados revelam que a metformina apresentou pouco benefício no reparo ósseo em torno de implantes inseridos em ratos diabéticos.

### **1.1.2 Implantes dentais em pacientes diabéticos**

Alguns estudos clínicos foram realizados nas últimas décadas com o objetivo de confirmar os dados obtidos nos estudos em animais que avaliaram os efeitos do DM na osseointegração. Entretanto, devido à grande variabilidade nos desenhos desses estudos (por exemplo, tipo de DM, nível de controle glicêmico, etc.) e às limitações dos mesmos, até o momento, não foi possível determinar exatamente a consequência clínica do estado diabético na osseointegração. De maneira geral, existe uma tendência dessa literatura em demonstrar que implantes inseridos em pacientes diabéticos bem controlados são passíveis de alto índice de sucesso.

Em 2000, Fiorellini et al. realizaram um estudo retrospectivo em dois centros clínicos para avaliar o índice de sucesso de implantes inseridos em pacientes diabéticos. Os prontuários médicos desses pacientes foram acessados para obtenção de dados incluindo o tipo de DM (1 ou 2), tempo desde o diagnóstico da doença até a instalação do implante, história de tabagismo, idade e gênero. Um total de 40 pacientes diabéticos, sendo 29 homens e 11 mulheres, e um total de 215 implantes foram documentados. Desses pacientes, 6 eram portadores de DM tipo 1 e 34 de DM tipo 2. Trinta e seis desses 40 pacientes estavam com a glicemia controlada durante a cirurgia. Os resultados demonstraram que um total de 31 implantes falharam, resultando em um índice de sucesso de 85,6%. Dessas falhas 24 ocorrem no primeiro ano após reabilitação protética e nenhum ocorreu antes da osseointegração. Ainda em 2000, Olson et al., em estudo clínico prospectivo, avaliaram o sucesso de implantes inseridos em pacientes diabéticos tipo 2

acompanhados por 60 meses após a colocação de carga protética. Um total de 178 implantes foram instalados em 89 pacientes diabéticos controlados. O índice de falha foi de 9% (16 implantes) em 14 pacientes. Dentre as variáveis avaliadas nos cinco anos de acompanhamento incluindo glicemia, hemoglobina glicada (HbA1c), idade, duração e tratamento do DM, tabagismo e altura do implante, a análise de regressão revelou que apenas a duração do DM e altura de implante estavam relacionadas com a falha dos implantes. Os autores concluíram que a reabilitação de pacientes diabéticos tipo 2 controlados com implantes pode ser um tratamento previsível.

Farzad et al., em 2002, realizaram um estudo retrospectivo com objetivo de determinar o sucesso de 136 implantes inseridos em 25 pacientes diabéticos (36% portadores de DM tipo 1 e 64% portadores de DM tipo 2) que receberam reabilitação para edentulismo parcial e total pelo sistema Brånemark. Durante o período de osseointegração, o índice de sucesso nesses pacientes foi de 96,3% (5 implantes). Após 1 ano da cirurgia, 3 implantes adicionais falharam, resultando em um aumento de fracasso para 5,9%. Os autores concluíram que pacientes portadores de DM tipo 2 controlada podem ser candidatos à colocação de implantes dentais e apresentam índices de sucesso similares aos não-diabéticos.

Peled et al. (2003) determinaram o índice de sucesso de implantes inseridos em pacientes com DM tipo 2 e descreveram a satisfação do paciente, a melhora da função, a saúde da mucosa peri-implantar e o nível de tecido ósseo ao redor desses implantes. A amostra foi constituída de 41 pacientes, sendo 141 implantes instalados na região intermentoniana para confecção de *overdenture*. O índice de sucesso foi de 97,2% e 94,4% no 1º e 5º ano de acompanhamento, respectivamente. Os níveis de glicose foram monitorados ao longo do estudo e nenhuma correlação foi encontrada entre a glicemia e a falha de implantes. A maioria dos pacientes demonstram satisfação com o tratamento, relataram melhora da função e apresentaram saúde da mucosa peri-implantar. Devido aos resultados positivos desse estudo longitudinal, os autores concluíram que a reabilitação suportada por implantes em pacientes diabéticos tipo 2 compensados é uma opção de tratamento que deve ser encorajada.

Em 2007, Alssadi et al., em um estudo retrospectivo, avaliaram a influência de desordens sistêmica, da qualidade do tecido ósseo local e de fatores intra-orais na



ocorrência de falha precoce de implantes dentais. Os dados cirúrgicos de prontuários de 2004 pacientes foram acessados, totalizando uma avaliação de 6.946 implantes do sistema Brånemark (Nobel Biocare, Gothenburg, Suécia). Um total de 252 implantes em 178 pacientes foram perdidos nos primeiros 6 meses, totalizando 3,6% de falhas. Os fatores locais identificados e relacionados ao maior número de falha de implantes foram: dimensões dos implantes (plataforma de 5 mm e altura menor que 10 mm), localização dos implantes (regiões posterior das arcadas superior e inferior), quantidade e qualidade ósseas e tipo de edentulismo. A osteoporose, a doença de Crohn e o tabagismo foram os únicos fatores sistêmicos associados às falhas dos implantes enquanto o DM tipo 2 controlado, os distúrbios de coagulação, a hipertensão, o hipotireoidismo e o hipertireoidismo não estavam relacionadas ao aumento do insucesso dos implantes.

Dowell et al. (2007), por meio de um estudo prospectivo coorte, relacionaram o controle glicêmico em pacientes diabéticos tipo 2 e o sucesso precoce de implantes e complicações clínicas. Com base nos níveis de HbA1c, os pacientes foram alocados em um dos seguintes grupos: não-diabéticos (nível de HbA1c < 6%; 10 pacientes), pacientes com DM bem-controlado (nível de HbA1c entre 6% e 8%; 10 pacientes), com DM moderadamente controlada (nível de HbA1c entre 8% e 10%; 12 pacientes), ou com DM mal-controlada (nível de HbA1c > 10%; 3 pacientes). Um total de 50 implantes foram distribuídos nesses 35 pacientes e o sucesso do implante e complicações foram aferidos. Os autores identificaram pequenas complicações em três pacientes com nível de HbA1c entre 7,4 e 8,3%, mas sem afetar o sucesso dos casos. Os autores concluíram que o sucesso precoce de implantes inseridos nesses diferentes grupos foi similar e que o controle glicêmico de pacientes diabéticos não parece estar associado à falhas e complicações precoces de implantes dentais.

Tawil et al. (2008) realizaram um estudo clínico prospectivo do tipo caso-controle para comparar o sucesso de implantes e o índice de complicação entre pacientes diabéticos tipo 2 tratados (255 implantes) e não-diabéticos (244 implantes). Em acompanhados de 1 a 12 anos, o índice de sucesso entre os dois grupos foi similar, sendo 97,2% no grupo teste e 98,8% no controle. Entretanto, foi observada uma correlação positiva entre as complicações e os níveis HbA1c. É importante salientar que a média de HbA1c no grupo diabético controlado foi de 7,2% no período pré-operatório. Logo, de

acordo com os autores, o controle glicêmico satisfatório pode ter contribuído para o alto índice de sucesso dos implantes no grupo diabético.

Oates et al. (2009), em estudo clínico prospectivo, avaliaram o efeito do nível glicêmico na osseointegração de implantes dentais. A amostra foi constituída de 30 pacientes, sendo 10 pertencentes ao grupo não-diabético ( $HbA1c < 6\%$ ; 12 implantes) e 20 pertencentes ao grupo diabético tipo 2 (30 implantes). A estabilidade do implante foi aferida por meio de análise de frequência de ressonância (Osstel®), durante quatro meses de reparo. Os portadores de DM tipo 2 estavam sob tratamento médico e foram alocados em três subgrupos: DM bem-controlados ( $HbA1c$  entre 6,1% e 8%), moderadamente controlados ( $HbA1c$  entre 8,1% e 10%), e pobremente controlado ( $HbA1c \geq 10,1\%$ ). Os resultados demonstraram que pacientes com  $HbA1c > 8,1\%$  apresentaram menor estabilidade do implante na 2ª e 4ª semana. Logo, os autores concluíram que o DM tipo 2 pode prejudicar a osseointegração, principalmente nas primeiras semanas de reparo.

Anner et al. (2010), em um estudo retrospectivo, identificaram os fatores de risco relacionados à falha de implantes dentais, em acompanhamentos de 1 a 114 meses. Foram coletados dados dos arquivos dos pacientes relativos a hábitos de fumar, condição periodontal, DM, sobrevivência de implantes e tempo que ocorreu a falha nos implantes. Os pacientes foram também divididos em dois grupos: aqueles que participaram de um programa de manutenção (51,7%) e os que apenas compareceram ao exame anual intra-oral (47,3%). Tabagismo foi relatado em 63 (13,2%) dos pacientes e DM em 49 (10,3%). Um total de 77 (4,7%) implantes foram perdidos em 58 (12,2%) pacientes. O tabagismo e falta de adesão à um programa de manutenção foram os principais fatores relacionados à falha dos implantes, enquanto o DM não apresentou associação com o insucesso de implantes. Neste mesmo ano, Turkyilmaz (2010) determinou o sucesso de implantes inseridos em uma série de 10 casos (23 implantes) em diabéticos tipo 2 com  $HbA1c < 10\%$  e doença periodontal controlada. Um valor de  $HbA1c < 8,0\%$  representou DM bem controlada enquanto um valor de  $HbA1c$  entre 8,1% e 10,0% representou DM moderadamente controlada. Nenhum implante foi perdido em um ano após a colocação da prótese. Todos os implantes apresentavam-se estáveis, sem sinais de mucosite e com média de perda óssea marginal de  $0,3 \pm 0,2$  milímetros. Os autores concluíram que a DM com níveis de  $HbA1c < 10\%$  não é contraindicação para instalação de implantes.

Zupnik et al. (2011) realizaram um estudo retrospectivo para estabelecer os fatores de risco relacionados à falha de implantes (341 implantes), caracterizada por implantes removidos ou que apresentavam mais de 0,2mm de perda óssea por ano. Dentre os dados demográficos e de saúde dos pacientes, 3 fatores foram identificados como contribuintes para falhas dos implantes: DM, gênero masculino e superfície dos implantes. Em 2013, Souza et al. realizaram um estudo clínico retrospectivo com objetivo de determinar o impacto de fatores locais (tipo de plataforma e prótese, diâmetro, localização, tempo em função, etc) e sistêmicos (DM, tabagismo, etc) na perda óssea ao redor de 722 implantes, instalados em 93 pacientes. Os resultados revelaram que nenhum fator sistêmico apresentou relação com a perda óssea. Dentre os fatores locais, o tempo de função da prótese e tipo de prótese (próteses fixas parciais ou totais) estavam relacionados com uma maior perda óssea peri-implantar.

Erdogan et al. (2014) realizaram um estudo clínico longitudinal controlado para determinar os resultados do tratamento com implantes e regeneração óssea em pacientes portadores de DM tipo 2. Um total de 24 pacientes foram incluídos no estudo, sendo 12 portadores de DM tipo 2 controlados e 21 sistemicamente saudáveis. Rebordos edêntulos com altura adequada mas com espessura menor que 5mm foram regenerados e, posteriormente, os implantes foram instalados e acompanhados por um período mínimo de 12 meses. O índice de sucesso foi de 95% no grupo teste e 100% no grupo controle. Os autores concluíram que o aumento horizontal da maxila e o tratamento com implantes podem ser indicados para pacientes portadores de DM tipo 2, com altos índices de sucesso. Em 2015, Gomez-Moreno et al. realizaram um estudo prospectivo com objetivo de avaliar possíveis alterações na mucosa e osso peri-implantar em pacientes portadores de DM tipo 2, apresentando diferentes níveis de glicemia. A amostra foi constituída por 67 pacientes alocados nos seguintes grupos: não-diabéticos (nível de HbA1c < 6,0%), pacientes com DM bem controlado (nível de HbA1c entre 6,1 e 8,0%), DM moderadamente controlada (nível de HbA1c entre 8,1 e 10,0%), e DM pobremente controlada (nível de HbA1c > 10,0%). Os critérios de inclusão foram ausência de outras doenças sistêmicas que pudessem influenciar a osseointegração e presença de rebordo alveolar com espessura e alturas adequadas. De acordo com os resultados, não houve diferenças estatísticas entre os grupos em relação a profundidade de sondagem e perda

óssea, enquanto que o sangramento a sondagem foi maior nos indivíduos com DM pobremente controlada.

Conte et al. (2015) avaliaram os efeitos do DM tipo 2 na expressão gênica de fatores relacionados ao tecido ósseo (TNF-alfa, TGF- $\beta$ , ligante do receptor ativador do fator nuclear kapa B [RANKL], osteoprotegerina, fosfatase alcalina, sialoproteína óssea, colágeno tipo I e osteocalcina) em biópsias de tecido ósseo alveolar em regiões designadas para implantes dentários. A população de estudo foi constituída de pacientes sistemicamente saudáveis (controle), pacientes com DM tipo 2 apresentando HbA1c  $\leq$ 8% e pacientes com DM tipo 2 com HbA1c  $>$  8%. Os resultados demonstraram que o DM associado à níveis de HbA1c  $>$  8% aumentou os níveis de RANKL e a proporção RANKL/OPG e, diminuiu a expressão de colágeno tipo I e sialoproteína óssea. Em conclusão, foi observado que a expressão de alguns genes relacionados ao tecido ósseo foi negativamente afetado pela hiperglicemia.

Os estudos clínicos e em animais descritos acima são suportados por algumas revisões sistemáticas. De maneira geral, essas revisões demonstraram que animais diabéticos exibem menor formação óssea peri-implantar, que pacientes diabéticos descompensados apresentam maior chances de insucesso de implantes enquanto que os diabéticos compensados apresentam taxas de sucesso de implantes similar à população sistemicamente saudável (Javed & Romanos 2009, Glösel et al. 2010, Naujokat et al. 2016, Annibali et al. 2016).

## **1.2 Efeitos da metformina sobre o tecido ósseo**

Mais de 400 plantas e extratos de plantas têm sido descritos como agentes capazes de tratar o DM. Metformina é um derivado da guanidina, um composto ativo da *Gallega officinalis*, erva medicinal muito utilizada no tratamento dessa doença na Europa desde 1920, também conhecida por Lilac francês (Bailey & Day, 1989). Atualmente, a metformina tem sido um dos principais agentes hipoglicemiantes orais utilizados para tratamento do DM tipo 2 no mundo. Essa droga aumenta a sensibilidade e diminui a resistência à utilização da insulina, reduzindo a hiperglicemia e suas consequências no organismo humano (Bailey & Turner, 1990). Mais recentemente, a metformina foi também sugerida como um medicamento eficaz no tratamento de outras condições

sistêmicas como ovário policístico e suas consequências (por exemplo, acne e hirsutismo), neoplasias e síndrome metabólica (Zhou et al. 2015, Abu Hashim 2016, Farooq et al. 2016, Gong et al. 2016).

Estudos clínicos têm demonstrado que o DM está associado ao aumento do risco de fraturas, embora os mecanismos subjacentes aos efeitos negativos do DM no tecido ósseo não tenham sido totalmente elucidados. Assim, o impacto dos diferentes agentes hipoglicemiantes sobre o risco de fraturas em pacientes diabéticos tem sido alvo de diversos trabalhos científicos (Meier et al. 2016). Neste contexto, investigações *in vitro*, em animais e em humanos têm avaliado os efeitos da metformina sobre as células e tecido ósseo.

Em 2006, Cortizo et al. avaliaram, em estudos realizados em cultura celular, os efeitos de diferentes doses de metformina (25-500  $\mu$ M) no crescimento e diferenciação de osteoblastos. Os resultados demonstraram que a metformina promoveu a diferenciação e proliferação osteoblástica de maneira dose-dependente, além de aumentar a produção de colágeno tipo I, estimular a atividade da fosfatase alcalina e aumentar os nódulos de calcificação. Esses achados levaram os autores a concluir que a metformina possui efeito osteogênico direto em cultura de osteoblastos.

Nesta mesma linha de pesquisa, Kanazawa et al. (2008), por meio de um estudo *in vitro*, avaliaram os possíveis efeitos da metformina na concentração de 50  $\mu$ M sobre a diferenciação e mineralização de células osteoblásticas, bem como sua respectiva sinalização intracelular. Os resultados demonstraram que essa droga aumentou significativamente a expressão gênica de osteocalcina e colágeno tipo I, estimulou a atividade da fosfatase alcalina e proteína morfogenética (BMP)-2 e aumentou a mineralização. Além disso, ativou de maneira dose-dependente a proteína quinase ativada por AMP (AMPK). Os autores concluíram que a metformina é capaz de induzir a diferenciação e mineralização de osteoblastos via ativação de AMPK, apresentando benefícios não só para o tratamento do DM como também para a formação óssea.

Outro grupo avaliou os efeitos da metformina em diferentes concentrações (50 e 100 mg/kg/dia) sobre a densidade e qualidade óssea em tíbias de ratas ovariectomizadas (estrógeno-deficientes), por meio de raio X de dupla energia (DXA), tomografia micro-

computadorizada e histologia. Além disso, a expressão gênica de fatores relacionados aos osteoblastos foram acessados por meio do PCR quantitativo. Os resultados revelaram que a administração de metformina melhorou a densidade óssea nos animais ovariectomizados e aumentou a expressão dos genes *Cbfa1* e *Lrp5*. Os autores concluíram que a administração de metformina, em ambas concentrações, regulou a expressão de genes envolvidos na osteogênese e, dessa forma, inibiu a perda óssea em ratas ovariectomizadas (Gao et al., 2010).

Molinuevo et al. (2010) avaliaram, por meio de um estudo *in vitro*, os mecanismos de ação da metformina em células mesenquimais indiferenciadas de medula óssea (BMPCs). Nesse estudo, também foi avaliado o efeito da administração de metformina (100 mg/kg/dia) na regeneração de tecido ósseo em ratos não-diabéticos e diabéticos. Os resultados revelaram que a administração de metformina tanto *in vitro* quanto *in vivo* causou aumento da atividade de fosfatase alcalina, síntese colágeno tipo I, expressão de osteoclastina, e deposição de cálcio extracelular nas BMPCs. Além disso, *in vivo*, a metformina aumentou a expressão gênica do fator de transcrição específico para osteoblasto denominado *RUNX2/Cbfa1*, ativou a AMPK de maneira tempo dependente e melhorou a regeneração óssea em ratos controle e diabéticos.

Também em 2010, Zhen et al. investigaram os efeitos de diferentes concentrações de glicose associado ou não à diferentes concentrações de metformina (10-640  $\mu$ M) em osteoblastos de ratos cultivados em meio osteogênico. De acordo com os resultados, doses mais baixas de glicose aumentaram enquanto doses mais altas reduziram a expressão de *RUNX2*, a proliferação celular, a atividade de fosfatase alcalina e a formação de nódulos de mineralização. A metformina, por sua vez, aumentou a osteogênese e estimulou a expressão de *RUNX2* além de diminuir a apoptose e a formação de espécies reativas de oxigênio. Os autores concluíram que doses elevadas de glicose inibem a osteogênese enquanto que a metformina apresenta efeito osteogênico na presença de glicose.

Jang et al. (2011) examinaram mais profundamente o mecanismo molecular de ação da metformina na diferenciação de osteoblastos em cultura de células por meio do PCR em tempo real. Os autores demonstraram que a metformina (100  $\mu$ M) aumentou de

maneira significativa a expressão de genes relacionados à osteogênese, como fosfatase alcalina, osteocalcina e sialoproteína osséa, assim como da proteína *small heterodimer partner* (um homólogo da família de receptores nucleares). Esse estudo sugeriu que a metformina possivelmente regula a osteogênese pelo aumento da expressão de proteínas *small heterodimer partner* (SHP). Além disso, a metformina aumentou a fosforilação da proteína AMPK (proteína quinase ativada por AMP), responsável pela homeostasia energética celular, enquanto a atividade de indução de SHP foi suprimida pela ação do supressor de AMPK (DN-AMPK) e pelo composto C (inibidor de AMPK), sugerindo ação osteogênica da metformina pela via de sinalização AMPK-SHP. Tal via, dentre outras ações, suprime a glicogênese por hepatócitos e eleva os níveis de fosfatase alcalina e osteocalcina, aumentando a osteogênese. A elevação de AMPK também aumentou a expressão de RNAm para RUNX2 que, por sua vez, estimulou a osteogênese. A expressão do fator de transcrição USF -1 aumentou proporcionalmente a do AMPK; entretanto, o sistema USF-1-SHP não foi relacionado ao aumento da expressão de RUNX2. Em suma, os resultados desse estudo sugeriram que a metformina é capaz de estimular a diferenciação osteoblástica por duas vias: via indução de AMPK-USF-1-SHP, que por sua vez estimula a expressão de RUNX2 e a produção de osteocalcina; e por meio da fosforilação de AMPK, que por sua vez estimula a expressão direta de RUNX2.

Mai et al. (2011) avaliaram a ação regulatória da metformina sobre a expressão de OPG e RANKL em osteoblastos e em ratas ovariectomizadas. Para isso, realizaram estudo *in vitro* com células osteoblásticas e *in vivo* em tíbias de ratas ovariectomizadas. Os resultados revelaram que o tratamento com metformina induziu ao aumento da expressão de RNAm de OPG em cultura de células de maneira dose- e tempo-dependentes (0-800 µM administrada de 0-72 horas). A inibição de AMPK e CaM quinase quinase (CaMKK) também inibiu a formação de OPG. Além disso, a metformina inibiu a ação de RANKL de maneira direta, inibindo a expressão dessa proteína e, indireta, estimulando a produção de seu inibidor intrínseco OPG. A metformina também aumentou a expressão TRAP e catepsina K em células multinucleadas. *In vivo*, a metformina (100mg/kg/dia) aumentou os níveis séricos de OPG e suprimiu a expressão de RANKL em células de medula óssea de ratas ovariectomizadas, além de aumentar a

densidade mineral óssea, prevenir a perda óssea e diminuir as células positivas para TRAP nas tíbias desses animais.

Jeyabalan et al. (2013) avaliaram o potencial osteogênico e de reparo de fratura em ratas ovariectomizadas, submetidas a tratamento com metformina. A medicação foi administrada nas seguintes formas: 100 mg/kg/dia via gavagem (quatro semanas) e 2 mg/ml via água de beber (oito semanas). Uma osteotomia foi realizada no fêmur dos animais para simular fratura e após 4 semanas o tecido ósseo foi analisado por meio de microtomografia computadorizada e histometria. Os resultados demonstraram que a metformina não apresentou efeito sobre a perda e massa óssea, bem como sobre o reparo de fratura.

Tolosa et al. (2013) avaliaram o efeito deletério do DM no tecido ósseo e na redução do potencial osteogênico de BMPC, assim como o papel da metformina na prevenção dessas alterações. Análises histométricas demonstram uma redução no número de trabéculas e na densidade óssea e um aumento da expressão de TRAP nos ratos diabéticos. Além disso, o DM também diminuiu o índice de RUNX2/PPRA, e aumentou a expressão de RAGE, um receptor dos produtos da glicação avançada. O tratamento com metformina melhorou os parâmetros ósseos e a expressão de genes relacionados a osteogênese.

Recentemente, La Fontaine et al (2016) avaliaram, por meio de avaliações radiográficas e testes de resistência (teste de rigidez e carga de fratura), o efeito do tratamento com metformina (300 mg/kg/dia) no reparo ósseo de ratos Zucker obesos portadores de DM tipo 2 submetidos à fratura óssea experimental. Os resultados demonstraram que o DM retardou o reparo ósseo e que, apesar da metformina reduzir a hiperglicemia, não foi efetiva em melhorar o reparo das fraturas ósseas. Neste mesmo ano, Marycz et al. (2016) realizaram estudo *in vitro* e *in vivo* para investigar os efeitos da metformina sobre o potencial de diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais multipotentes e sobre a densidade óssea e mineralização em ratos saudáveis. *In vitro*, os resultados demonstram que a metformina aumentou o potencial de diferenciação osteogênica das células cultivadas, o que resultou numa elevada expressão e secreção de BMP-2, osteocalcina e osteopontina e reduziu significativamente o estresse



oxidativo, além de induzir o desenvolvimento de nódulos de mineralização. *In vivo*, a medicação aumentou a densidade óssea.

No campo da periodontia, o papel da metformina sobre o tecido ósseo alveolar foi testado em defeitos ósseos causados pela periodontite. Um estudo em ratos demonstrou que a metformina diminuiu a perda óssea alveolar induzida por ligadura e estimulou a diferenciação de osteoblastos e a mineralização (Bak et al. 2010). Em humanos, a aplicação tópica de metformina em diferentes concentrações (0,5%, 1% e 1,5%) dentro das bolsas periodontais em regiões de defeitos infra-ósseos melhorou a redução da profundidade de sondagem e o ganho de inserção clínica, em comparação à aplicação de placebo (Pradeep et al. 2013, Pradeep et al. 2016). Os benefícios clínicos da aplicação local de metformina a 1% como adjunto à raspagem e alisamento radicular também foram observados em fumantes por Rao et al., em 2013.

## **2. PROPOSIÇÃO**

Os objetivos deste estudo em ratos foram avaliar os efeitos da metformina no reparo do tecido ósseo peri-implantar na ausência de hiperglicemia bem como a capacidade dessa medicação reverter os possíveis prejuízos gerados pela hiperglicemia durante o processo de reparo ósseo peri-implantar.

### **3. ARTIGO CIENTÍFICO 1**

#### **Short-communication**

**Effects of metformin on bone healing around titanium implants inserted in non-diabetic rats.**

**Short running title:** Impact of metformin on osseointegration

Bastos MF, Serrão CR, Miranda TS, Cruz DF, de Souza Malta F, Duarte PM. Effects of metformin on bone healing around titanium implants inserted in non-diabetic rats. Clin Oral Implants Res. 2016 Aug 29.

## **Abstract**

**Objective:** To evaluate the effects of metformin on bone healing around titanium implants inserted in non-diabetic rats. **Methods:** Twenty Wistar rats were randomly assigned to one of the following groups: control group (n=10): rats without metformin treatment; MT group (n=10): rats treated with metformin (40 mg/kg/day by gavage). At thirty days after implant placement, animals were euthanized. Histometric measurements of bone-to-implant contact (BIC) and bone area (BA), in addition to immunohistochemical analysis of the number of cells stained for RANKL and OPG, were assessed in the cortical and medullary areas around implants. **Results:** The percentages of BIC and BA in the cortical bone were significantly lower in the MT group than in the control group ( $p<0.05$ ). Furthermore, the medullary bone around the implants inserted in the metformin-treated animals exhibited an increased number of RANKL-stained cells than that around the implants inserted in the control animals ( $p<0.05$ ). **Conclusions:** Metformin negatively affected osseointegration by reducing the percentages of BIC and BA and increasing the expression of RANKL around titanium implants inserted in non-diabetic rats.

**Key Words:** dental implants, osseointegration, diabetes mellitus, metformin, RANK ligand, osteoprotegerin.

## **Introduction**

Dental implants generally provide high success rates in the rehabilitation of missing teeth, but some patients experience early or late implant failure (Jung et al. 2012; Derks et al. 2015). Therefore, there is an increasing interest in identifying factors that can hinder or help the process of bone healing around dental implants.

Metformin is a biguanide derivative that has been available for over 50 years and is considered the first-line of treatment for type 2 diabetes mellitus (DM), due to its hypoglycaemic, insulin-sensitizing and vascular protective effects. More recently, metformin has been recognized as a potential preventive and therapeutic agent for other medical conditions, including polycystic ovary syndrome (PCOS) and its related symptoms (e.g. hirsutism and acne) and, several forms of neoplasias, extending its indication to the non-diabetic population (Morgante et al. 2015; He et al. 2015). According to the guidelines to the best practices proposed by the American Association of Clinical Endocrinologists, by the American College of Endocrinology and by the Androgen Excess and PCOS Society, metformin is successfully used in young girls and adolescents with PCOS as first-line monotherapy or in combination with oral contraceptives and anti-androgen medications (Bridger et al. 2006; Goodman et al. 2015). In relation to cancer treatment, pre-clinical studies have demonstrated numerous anticancer molecular mechanisms of metformin, including the cytotoxicity and the immunomodulation of cancer cells and, the inhibition of the mammalian target of rapamycin, a protein kinase that controls cell growth, proliferation, and survival (Chae et al. 2016). Meta-analysis of retrospective studies comparing metformin users and non-users reported significant evidence on the association of the use of metformin with the decrease in cancer related mortality (Zhang et al. 2013; Chae et al. 2016). Phase I and II randomized clinical trials conducted to evaluate the use of metformin in the treatment of cancers (e.g. breast, endometrial, pancreatic, prostate, lung cancers) as monotherapy or in combination with chemotherapy and/or radiotherapy have provided overall preliminary results that this drug might impact on markers of tumor proliferation and inhibit the growth of tumor cells (Chae et al. 2016).

Over the past decade, several studies have investigated the effects of metformin on bone, providing evidence for pro- and anti-osteogenic activities of this medication. The pro-osteogenic mechanisms of action of metformin on bone involve the differentiation and proliferation of osteoblastic cells, the increase in the expression of bone morphogenetic protein-2 and osteoprotegerin (OPG), the decrease in the expression of receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL), the stimulation of alkaline phosphatase activity and bone matrix synthesis, the formation of mineralized nodules and the prevention of bone loss (Cortizo et al. 2006; Schurman et al. 2008; Lee et al. 2010; Molinuevo et al. 2010; Mai et al. 2011; Liu et al. 2012; Śmieszek et al. 2015; McCarthy et al. 2016; Marycz et al. 2016). On the other hand, the anti-osteogenic actions of metformin on bone include the inhibition of genes related to osteoblast differentiation, the decrease of osteogenesis of mesenchymal stem cells and the reduction of bone mineralization (Kasai et al. 2009; Wu et al. 2011; Jeyabalan et al. 2013; Salai et al. 2013). A single study has evaluated the effects of metformin on the osseointegration process around titanium implants inserted in diabetic rats (Inouye et al. 2014). Results demonstrated that metformin slightly reversed the negative impact of DM on osseointegration in these animals. However, the effects of metformin on bone tissue around titanium implants, under non-diabetic conditions, have not been evaluated so far. Therefore, the aim of this study is to evaluate the effects of metformin on bone-to-implant contact (BIC), bone area (BA) and number of cells stained for RANKL and OPG around titanium implants inserted in non-diabetic rats.

## **Materials and Methods**

### **Animals**

The University of Guarulhos Institutional Animal Care and Use Committee approved this study protocol. During the experimental period, twenty male Wistar rats (120 days of age; mean weight of  $310 \pm 22$  g) were housed in individual plastic cages with food and drinking water *ad libitum*, in a room with a 12-hour light/dark cycle and a temperature  $\sim 24^{\circ}\text{C}$ .

### **Implant placement and experimental groups**

The animals were anesthetized by intraperitoneal administration of xylazine (0.3 mL/kg of weight) and ketamine (0.5 mL/kg of weight) for implant placement. The skin was cleaned with iodine surgical soap and an incision of ~1 cm in length was made in the superior extremity of the tibiae, in the direction of the femoral joint. A full-thickness flap was reflected and the bone surface exposed. Under saline solution irrigation, a bicortical implant bed was drilled on the metaphyseal area of the tibiae with a 2 mm wide bur at a rotary speed of 800 rpm. A screw-shaped commercially available titanium implant of 4.0 mm in length and 2.2 mm in diameter (AS Technology, Titanium Fix Dental Implants, São José dos Campos, São Paulo, Brazil) was placed until the screw thread had been completely introduced into the bone. The soft tissues were sutured to achieve the primary closure. The animals received antibiotic and analgesic given as a single intramuscular injection. The same operator performed all surgeries.

Subsequently, the rats were randomly assigned to one of the following groups: control group (n=10): rats without metformin treatment that received water by gavage; MT group (n=10): rats treated with 40 mg/kg/day of metformin (Liu et al. 2012) by gavage. Thirty days after implant placement, the animals were euthanized by CO<sub>2</sub> inhalation. The tibia were removed and fixed in 10% buffered formalin for 24 hours. Five of the 10 animals per group received implants in both tibia, of which one was designated to histometric analysis while the other one was designated to immunohistochemical analysis.

### **Histometric and immunohistochemical analyses**

Two most central undecalcified sections (20-30µm of thickness) were obtained in a longitudinal direction from 10 specimens per group, as previously described (Nociti et al. 2002), and stained with Masson's Trichrome. The percentages of BIC and BA within the limits of the threads of the implants were obtained using 200x magnification images, using image analysis software (NIS Elements Br, Nikon Instruments Inc, Melville, EUA). BIC and BA were assessed for all implant threads and arranged separately in cortical and medullary bone.

Five specimens per group were decalcified in 10% ethylene-diamine tetraacetic acid for 30 days, dehydrated in ascending series of ethanol solutions and embedded in paraffin. After removal of the implants, three sections from the cortical and three

sections from the medullary bone (5 $\mu$ m of thickness and 20 $\mu$ m apart) were obtained in a transversal direction. The immunohistochemical procedures were performed as previously described (Bezerra et al. 2013), using polyclonal antibodies against RANKL and OPG. The numbers of cells stained for RANKL and OPG were counted in 400x magnification images in a quarter of the circumference of each implant image, using image analysis software (NIS Elements Br, Nikon Instruments Inc, Melville, EUA). The data were expressed as the number of cells stained for RANKL, OPG and the ratio of RANKL/OPG per mm<sup>2</sup> of cortical and medullary bone, separately.

The same trained, calibrated and blinded examiner (DFC) performed all histometric and immunohistochemistry analysis. After examining ten non-study sections twice, with an interval of 48 hours, an intra-examiner reproducibility of all measurements reached  $\geq 90\%$  by intra-class correlation.

The primary outcome variable was BIC while the secondary outcome variables were BA and the number of cells stained for RANKL, OPG and the ratio of RANKL/OPG per mm<sup>2</sup> in the cortical and medullary bone.

### **Statistical analysis**

Because no previous data regarding the impact of metformin on the bone around titanium implants inserted in non-diabetic rats exists, no formal sample size calculation could be previously performed. Therefore, a post hoc analysis was conducted to determine the actual power of the histometric analysis presented in this paper. Considering differences of at least 19.5 percentage point (pp) between the experimental groups for the cortical BIC (primary outcome variable) and a standard deviation of 13.5 pp, it was estimated that 10 rats per group would provide 90% power with an  $\alpha$  of 0.05.

The percentage of BIC and BA, the number of cells stained for RANKL, OPG and the ratio of RANKL/OPG were computed for the cortical and medullary regions of each section separately, averaged within implants/rats and then, across the experimental groups. The Mood's median test was used to detect differences between groups for the histometric and immunohistochemical parameters at a level of significance of 0.05.



## Results

All surgeries were uneventful and no animals were lost during the implant placement. All animals gained weight during the study and, the final mean body weights did not differ between groups ( $p > 0.05$ ;  $438 \pm 18\text{g}$  and  $446 \pm 15\text{g}$  for MT and control groups, respectively).

The percentages of BIC and BA in the cortical region were significantly lower in the MT group than in the control group ( $p < 0.05$ ; Table 1 and Fig. 1). Furthermore, the medullary bone around the implants inserted in the metformin-treated animals exhibited an increased number of RANKL-stained cells than that around the implants inserted in the control animals ( $p < 0.05$ ; Table 1 and Fig. 2).

## Discussion

Based on the increasing number of medical indications for the use of metformin and the potential effects of this drug on bone cells, this study assessed, for the first time, the effects of metformin on bone healing around titanium implants under a non-diabetic condition. The BIC and the BA in the cortical region were lower and the number of RANKL-stained cells in the medullary region was higher in the metformin-treated rats than in the control rats. Altogether, these findings indicate that metformin might negatively interfere with the bone repair around titanium implants under a non-diabetic state, damaging to some extent the osseointegration process.

Several pre-clinical and clinical studies have tried to elucidate the role of metformin on bone. However, results remain controversial and inconclusive, probably because of differences in the type of studies as well as in the dose and duration of metformin treatment. In contrast to the current findings, previous *in vitro* investigations have reported that metformin presents osteogenic effects. This drug might stimulate the differentiation of osteoblastic cells, the formation of nodules of mineralization, the activity of alkaline phosphatase, the synthesis of type I collagen, and the expression of osteocalcin, amongst other pro-osteogenic activities (Cortizo et al. 2006; Gao et al. 2008; Kanazawa et al. 2008; Bak et al. 2010; Molinuevo et al. 2010; Jang et al. 2011;

Sedlinsky et al. 2011, Marycz et al. 2016). Furthermore, metformin might also suppress osteoclastogenesis in a dose-dependent manner in cell cultures, by stimulating the expression of OPG and reducing the expression of RANKL (Lee et al. 2010; Mai et al. 2011). On the other hand, supporting the present findings, other previous *in vitro* studies (Kasai et al. 2009; Wu et al. 2011; Salai et al. 2013; Śmieszek et al. 2015) have reported adverse effects of metformin on bone. Kasai et al. (2009) have showed that metformin constrained the expression of osteoblast differentiation-related genes in osteoblastic cell lines, further reducing osteoblast differentiation. Furthermore, metformin compromised the osteogenesis of mesenchymal stem cells (Wu et al. 2011) and inhibited mineralization in culture of human osteoblastic cells (Salai et al. 2013). Recently, Śmieszek et al. (2015) reported that metformin inhibited/decreased the proliferative activity of bone marrow stromal cells, increased the incidence of cell death, and induced morphological and ultrastructural changes in these cells. According to these authors, these effects might be related to its cytotoxic properties of metformin, which have been previously observed in various cancer cell lines.

Opposing the findings of the current study, some studies in animals have observed that metformin is able to increase bone mineral density, prevent bone loss and decrease the number of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)-positive cells (a marker of osteoclast activity) in rats with estrogen deficiency, in addition to improving bone repair in diabetic and non-diabetic rats and to reducing ligature induced-alveolar bone loss (Gao et al. 2010; Bak et al. 2010; Molinuevo et al. 2010; Mai et al. 2011). On the other hand, there is also evidence that metformin had no effect on bone loss, bone mass or fracture healing in rats with and without estrogen deficiency and did not regulate the expression of osteoblast-specific transcription factors, but decreased mineralizing surfaces and the rate of bone formation in estrogen-deficient animals (Jeyabalan et al. 2013). Furthermore, clinical evidence has shown that treatment of postmenopausal women with DM with metformin increased the number of circulating TRAP-stained cells (Rubin et al. 2014). Moreover, metformin did not alter any marker of bone turnover in postmenopausal diabetic women, suggesting that this medication has neither osteogenic nor anti-osteoporotic effects (Hegazy 2015).

The main strength of this study is to be the first investigation to demonstrate that the daily administration of metformin during the osseointegration process in non-diabetic rats negatively affected BIC and BA and, significantly induced an upregulation of RANKL, a recognized regulator of osteoclast differentiation and activation. These preliminary findings on the impact of metformin on bone around titanium implants corroborate those from all above-mentioned studies reporting certain detrimental effects of this medication on bone cell/tissue (Kasai et al. 2009; Wu et al. 2011; Salai et al. 2013; Jeyabalan et al. 2013; Rubin et al. 2014; Śmieszek et al. 2015).

This study has also some limitations. First, a single dose of metformin (40 mg/kg) in a single time-point (30 days after implant placement) was assessed. Further studies evaluating other doses and programs of metformin administration as well as later and earlier stages of bone healing are needed. Furthermore, immunohistochemical analyses were limited to RANKL and OPG that are primarily osteoclastogenesis-related factors. The evaluation of bone healing-related factors would be very important to better elucidate the molecular mechanisms of action of metformin on the osseointegration. In addition, further studies should also be performed to evaluate the effects of metformin on bone healing around implants under DM challenge, because only one study has focused on this topic so far (Inouye et al 2014). Finally, clinical studies comparing the success of implants in metformin users and non-users are essential to confirm the clinical implication of the current findings in rats.

In conclusion, metformin negatively affected osseointegration by reducing the percentages of BIC and BA and increasing the expression of RANKL around titanium implants inserted in non-diabetic rats.

### **Funding**

São Paulo State Research Foundation (São Paulo, São Paulo, Brazil; #2013/09628-2; #2014/22074-9)

### **Acknowledgements**

The authors thank the São Paulo State Research Foundation (São Paulo, São Paulo, Brazil; #2013/09628-2; #2014/22074-9) for financial support, the AS Technology,

Titanium Fix Dental Implants (São José dos Campos, São Paulo, Brazil) for donating the implants and Paulo César Simões Silva (lab technician) for helping with the histological procedures. There is no conflict of interest to declare.

## References

Bak, E.J., Park, H.G., Kim, M., Kim, S.W., Kim, S., Choi, S.H., Cha, J.H. & Yoo, Y.J. (2010) The effect of metformin on alveolar bone in ligature-induced periodontitis in rats: a pilot study. *Journal of Periodontology* **81**:412-419.

Bezerra, J.P., de Siqueira, A., Pires, A.G., Marques, M.R., Duarte, P.M. & Bastos, M.F. (2013) Effects of estrogen deficiency and/or caffeine intake on alveolar bone loss, density, and healing: a study in rats. *Journal of Periodontology* **84**:839-849.

Bridger, T., MacDonald, S., Baltzer, F. & Rodd, C. (2006) Randomized placebo-controlled trial of metformin for adolescents with polycystic ovary syndrome. *Archives of pediatrics & adolescent medicine* **160**:241-246.

Chae, Y.K., Arya, A., Malecek, M.K., Shin, D.S., Carneiro, B., Chandra, S., Kaplan, J., Kalyan, A., Altman, J.K., Plataniias, L. & Giles, F. (2016) Repurposing metformin for cancer treatment: current clinical studies. *Oncotarget* Mar 19. doi: 10.18632/oncotarget.8194.

Cortizo, A.M., Sedlinsky, C., McCarthy, A.D., Blanco, A. & Schurman, L. (2006) Osteogenic actions of the anti-diabetic drug metformin on osteoblasts in culture. *European Journal of Pharmacology* **24**:38-46.

Derks, J., Håkansson, J., Wennström, J.L., Tomasi, C., Larsson, M. & Berglundh, T. (2015) Effectiveness of implant therapy analyzed in a Swedish population: early and late implant loss. *Journal of Dental Research* **94**: 44-51.

Gao, Y., Li, Y., Xue, J., Jia, Y. & Hu, J. (2010) Effect of the anti-diabetic drug metformin on bone mass in ovariectomized rats. *European Journal of Pharmacology* **10**: 231-236.

Gao, Y., Xue, J., Li, X., Jia, Y. & Hu, J. (2008) Metformin regulates osteoblast and adipocyte differentiation of rat mesenchymal stem cells. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* **60**: 1695-1700.

Goodman, N.F., Cobin, R.H., Futterweit, W., Glueck, J.S., Legro, R.S. & Carmina, E. (2015) American Association of Clinical Endocrinologists, American College of Endocrinology, and Androgen Excess and PCOS Society Disease State Clinical Review: guide to the best practices in the evaluation and treatment of polycystic ovary syndrome - Part 1. *Endocrine practice* **21**:1291-1300.

He, H., Ke, R., Lin, H., Ying, Y., Liu, D. & Luo, Z. (2015) Metformin, an old drug, brings a new era to cancer therapy. *The Cancer Journal* **21**:70-74.

Hegazy, S.K. (2015) Evaluation of the anti-osteoporotic effects of metformin and sitagliptin in postmenopausal diabetic women. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* **33**:207-212.

Inouye, K.A., Bisch, F.C., Elsalanty, M.E., Zakhary, I., Khashaba, R.M. & Borke, J.L. (2014) Effect of metformin on periimplant wound healing in a rat model of type 2 diabetes. *Implant Dentistry* **23**:319-327.

Jang, W.G., Kim, E.J., Bae, I.H., Lee, K.N., Kim, Y.D, Kim, D.K., Kim, S.H., Lee, C.H., Franceschi, R.T., Choi, H.S. & Koh, J.T. (2011) Metformin induces osteoblast differentiation via orphan nuclear receptor SHP-mediated transactivation of Runx2. *Bone*. **48**:885–893.

Jeyabalan, J., Viollet, B., Smitham, P., Ellis, S.A., Zaman, G., Bardin, C., Goodship, A., Roux, J.P., Pierre, M. & Chenu, C. (2013) The anti-diabetic drug metformin does not affect bone mass in vivo or fracture healing. *Osteoporosis International* **24**:2659-2670.

Jung, R.E., Zembic, A., Pjetursson, B.E., Zwahlen, M. & Thoma, D.S. (2012) Systematic review of the survival rate and the incidence of biological, technical, and aesthetic complications of single crowns on implants reported in longitudinal studies with a mean follow-up of 5 years. *Clinical Oral Implants Research*. **23** suppl 6:2-21.

Kanazawa, I., Yamaguchi, T., Yano, S., Yamauchi, M. & Sugimoto, T. (2008) Metformin enhances the differentiation and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells via AMP kinase activation as well as eNOS and BMP-2 expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **375**:414-419.

Kasai, T., Bandow, K., Suzuki, H., Chiba, N., Kakimoto, K., Ohnishi, T., Kawamoto, S., Nagaoka, E. & Matsuguchi, T. (2009) Osteoblast differentiation is functionally associated with decreased AMP kinase activity. *Journal of Cellular Physiology* **221**:740-749.

Lee, Y.S., Kim, Y.S., Lee, S.Y., Kim, G.H., Kim, B.J., Lee, S.H., Lee, K.U., Kim, G.S., Kim, S.W. & Koh, J.M. (2010) AMP kinase acts as a negative regulator of RANKL in the differentiation of osteoclasts. *Bone* **47**:926-937.

Liu, L., Zhang, C., Hu, Y. & Peng, B. (2012) Protective effect of metformin on periapical lesions in rats by decreasing the ratio of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin. *Journal of Endodontics* **38**:943-947.

Marycz, K., Tomaszewski, K.A., Kornicka, K., Henry, B.M., Wroński, S., Tarasiuk, J. & Maredziak, M. (2016) Metformin Decreases Reactive Oxygen Species, Enhances Osteogenic Properties of Adipose-Derived Multipotent Mesenchymal Stem Cells In Vitro, and Increases Bone Density In Vivo. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2016**:9785890.

McCarthy, A.D., Cortizo, A.M. & Sedlinsky, C. (2016) Metformin revisited: Does this regulator of AMP-activated protein kinase secondarily affect bone metabolism and prevent diabetic osteopathy. *World Journal of Diabetes* **7**:122-33.

Mai, Q.G., Zhang, Z.M., Xu, S., Lu, M., Zhou, R.P., Zhao, L., Jia, C.H., Wen, Z.H., Jin, D.D. & Bai, X.C. (2011) Metformin stimulates osteoprotegerin and reduces RANKL expression in osteoblasts and ovariectomized rats. *Journal of Cellular Biochemistry* **112**:2902-2909.

Molinuevo, M.S., Schurman, L., McCarthy, A.D., Cortizo, A.M., Tolosa, M.J., Gangoiti, M.V., Arnol, V. & Sedlinsky, C. (2010) Effect of metformin on bone marrow progenitor

cell differentiation: in vivo and in vitro studies. *Journal of Bone and Mineral Research* **25**:211-221.

Morgante, G., Cappelli, V., Di, Sabatino, A., Massaro, M. & De Leo, V. (2015) Polycystic ovary syndrome (PCOS) and hyperandrogenism: the role of a new natural association. *Minerva Ginecologica* **67**:457-463.

Nociti, F.H Jr, Sallum, A.W., Sallum, E.A. & Duarte, P.M. (2002) Effect of estrogen replacement and calcitonin therapies on bone around titanium implants placed in ovariectomized rats: a histometric study. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **17**:786-792.

Rubin, M.R., Manavalan, J.S., Agarwal, S., McMahon, D.J., Nino, A., Fitzpatrick, L.A. & Bilezikian, J.P. (2014) Effects of rosiglitazone vs metformin on circulating osteoclast and osteogenic precursor cells in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **99**:1933-1942.

Salai, M., Somjen, D., Gigi, R., Yakobson, O., Katzburg, S. & Dolkart, O. (2013) Effects of commonly used medications on bone tissue mineralisation in SaOS-2 human bone cell line: an in vitro study. *The Bone & Joint Journal* **95-B**:1575-1580.

Schurman, L., McCarthy, A.D., Sedlinsky, C., Gangoiti, M.V., Arnol, V., Bruzzone, L. & Cortizo, A.M.(2008) Metformin reverts deleterious effects of advanced glycation end-products (AGEs) on osteoblastic cells. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* **116**:333-340.

Sedlinsky, C., Molinuevo, MS., Cortizo, AM., Tolosa, M.J., Felice, J.I., Sbaraglini, M.L., Schurman, L. & McCarthy, A.D. (2011) Metformin prevents anti-osteogenic in vivo and ex vivo effects of rosiglitazone in rats. *European Journal of Pharmacology* **668**:477-485.

Śmieszek, A., Czyrek, A., Basinska, K., Trynda, J., Skaradzińska, A., Siudzińska, A., Marędziak, M. & Marycz, K. (2015) Effect of Metformin on Viability, Morphology, and Ultrastructure of Mouse Bone Marrow-Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cells

and Balb/3T3 Embryonic Fibroblast Cell Line. *BioMed Research International* **2015**: 769402.

Wu, W., Ye, Z., Zhou, Y. & Tan, WS. (2011) AICAR, a small chemical molecule, primes osteogenic differentiation of adult mesenchymal stem cells. *The International Journal of Artificial Organs* **34**:1128-1136. Zhang, P., Li, H., Tan, X., Chen, L. & Wang, S. (2013) Association of metformin use with cancer incidence and mortality: a meta-analysis. *Cancer Epidemiology* **37**:207-218.



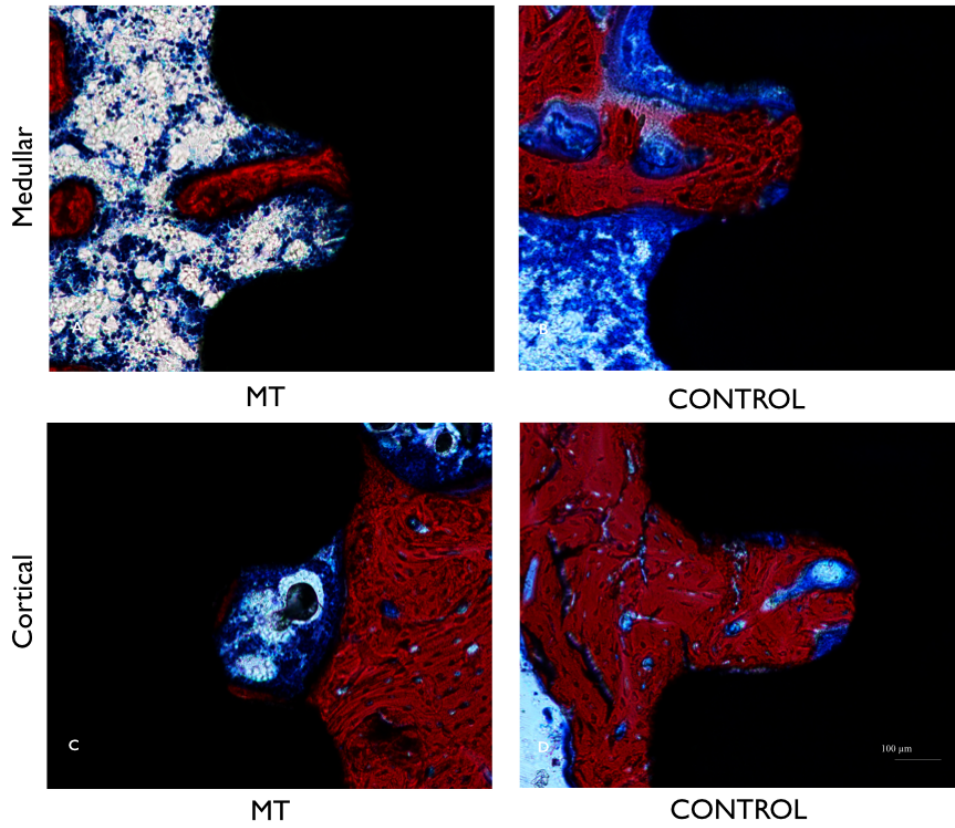
Table 1- Percentages of BIC and BA and number of cells stained for OPG and RANKL and RANKL/OPG ratio (median; max/min) in the medullary and cortical regions of the MT and control groups.

| Bone Region | Parameters                            | Groups            |                  | p-value |
|-------------|---------------------------------------|-------------------|------------------|---------|
|             |                                       | MT                | Control          |         |
| Medullary   | BA (%)                                | 9.9 (1.3/15.9)    | 19.4 (1.6/31.2)  | 0.31    |
|             | BIC (%)                               | 17.6 (5.9/39.7)   | 26.5 (6.7/48.2)  | 1.0     |
|             | OPG (cells/mm <sup>2</sup> )          | 3737 (2714/6300)  | 2308 (1414/3167) | 0.20    |
|             | RANKL (cells/mm <sup>2</sup> )        | 3868 (3082/5618)  | 2240 (1685/3388) | 0.02    |
|             | RANKL/OPG<br>(cells/mm <sup>2</sup> ) | 1.1 (0.5/2.1)     | 1.1 (0.9/1.2)    | 1.0     |
| Cortical    | BA (%)                                | 48.1 (30.1/59.0)  | 59.6 (54.5/69.5) | 0.04    |
|             | BIC (%)                               | 49.4 (31.8 /73.8) | 69.8 (64.0/76.4) | 0.0014  |
|             | OPG (cells/mm <sup>2</sup> )          | 1960 (1387/2260)  | 1818 (1265/2370) | 1.0     |
|             | RANKL (cells/mm <sup>2</sup> )        | 2047 (1738/2479)  | 1773 (1440/2169) | 1.0     |
|             | RANKL/OPG<br>(cells/mm <sup>2</sup> ) | 1.0 (0.9/1.8)     | 1.0 (0.9/1.1)    | 1.0     |

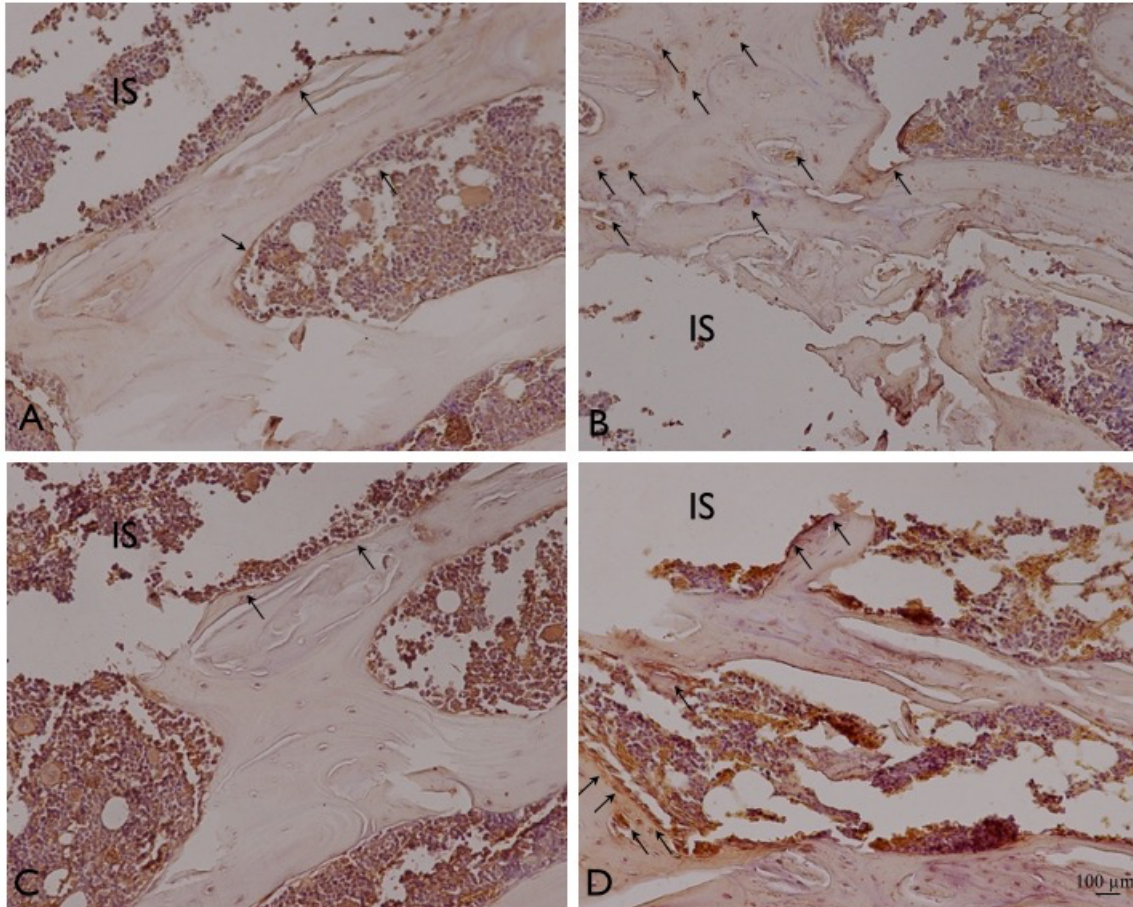
A p-value <0.05 indicates differences between groups by the Mood's median test.

BA: bone area; BIC: bone-to-implant contact; OPG: osteoprotegerin; RANKL: receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand; MT: metformin.

**Figure 1.** Photomicrographs illustrating the histological findings in the medullary and cortical areas of the MT and control groups (Figures A-D) (100x magnification). Note that the MT group presents lower BA and BIC within the limits of the implant threads, especially in the cortical region. MT: metformin.



**Figure 2.** Photomicrographs illustrating the immunohistochemical staining of OPG (Figures A and B) and RANKL (Figures C and D) in the medullary bone of the MT (Figures B and D) and control groups (Figures A and C) (200x magnification). Note increased RANKL-stained for the MT group. The arrows exemplify the stained cells. IS: space implant.



#### **4. ARTIGO CIENTÍFICO 2**

**Role of metformin in reversing the negative impact of hyperglycemia on bone healing around implants inserted in type 2 diabetic rats.** – Aceito para publicação no

*The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*

**Short running title:** Hyperglycemia, metformin and osseointegration.

## **Abstract**

**Purpose:** There is interest in establishing hypoglycemic agents able to contain/revert the impact of DM on osseointegration. The purpose of this study was to assess the possible effect of metformin in reversing the negative effects of hyperglycemia on the healing of bone surrounding implants inserted in rats. **Material and Methods:** Rats (10 per group) were assigned to one of the following groups: DM group: type 2 diabetic rats deprived of metformin (M) treatment; MDM group: type 2 diabetic rats under M treatment (40 mg/kg/day, starting on the 15<sup>th</sup> day after implant placement); Control group: non-diabetic rats without M treatment. At thirty days after STZ injection, titanium implants were placed in tibiae. Animals were euthanized at thirty days after implant surgery. Bone-to-implant contact (BIC), bone area (BA) and the number of RANKL- and OPG-stained cells were assessed in cortical and medullary areas. **Results:** The percentages of BIC and BA in the cortical bone were reduced in the DM and MDM groups compared to the control group ( $p < 0.05$ ). The percentage of BA in the medullary region was reduced in the DM group, compared to control group ( $p < 0.05$ ). MDM group showed the greatest number of OPG-stained cells while the DM group presented the greatest ratio of RANKL/OPG in the medullary area ( $p < 0.05$ ). **Conclusions:** Metformin did not modulate the damaging effect of hyperglycemia on bone healing around implants at histometric levels, but increased the expression of OPG and decreased the RANKL/OPG ratio in medullary area, yielding some molecular benefits on the osseointegration of implants under hyperglycemic state.

**Key Words:** dental implants, diabetes mellitus, metformin, RANK ligand, osteoprotegerin.

## Introduction

Classical and current clinical studies and systematic reviews have confirmed high long-term dental implant survival rates<sup>1-5</sup>. However, despite the overall high levels of implant-supported rehabilitation success, early and late implant losses are still challenges for clinicians and researchers. Among the several causes related to implant failures, lifestyle (e.g. smoking) and systemic diseases (e.g. osteoporosis, diabetes) have been suggested to be important risk factors affecting osseointegration<sup>6-7</sup>.

Diabetes (DM) is a highly prevalent chronic disease that has been predicted to increase in prevalence from 382 million in 2013 to 592 million in 2035, worldwide. Type 2 DM comprises the majority of total DM cases (>85%)<sup>8</sup> and, is characterized by pancreatic  $\beta$ -cell failure to secrete insulin and/or decreased insulin action, which leads to hyperglycemia and long-term damage, dysfunction and failure of various organs and tissues<sup>9</sup>. Poorly-controlled DM may negatively impact bone turnover, quality and healing because of the deleterious action of advanced glycation end products (AGEs) in the metabolism of collagen and in the differentiation of osteogenic cells<sup>10-11</sup>. The majority of studies in animals, using different methods of DM induction and implant types, have shown that DM adversely affects bone healing around implants<sup>12-14</sup>. However, the actual clinical impact of DM on implant survival rates remains controversial. Some clinical studies<sup>15-17</sup> have demonstrated that DM presents minor or no association with implant failures, particularly in patients with good glycemic control. On the other hand, other investigations<sup>18-19</sup> have observed higher implant failure rates in patients with DM than non-diabetic patients.

Metformin is a biguanide drug, typically used for type 2 DM treatment, which has hypoglycemic effects that are mediated by a reduction in hepatic glucose production and an increase in peripheral insulin sensitivity<sup>20</sup>. Metformin has been also used clinically off-label in the management of hirsutism, acne and polycystic ovary syndrome and may be a potential chemopreventative or adjuvant treatment for some types of neoplasias<sup>21-22</sup>. Recent advances have revealed that this drug can also affect bone metabolism, acting on osteoblast and osteoclast differentiation, by stimulating osteoprotegerin (OPG) and reducing receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL) expressions<sup>23-24</sup>.

The effects of several anti-hypoglycemic agents, including insulin, aminoguanidine and voglibose, on osseointegration of implants inserted in diabetic rats have been tested<sup>13-14,25</sup>. However, to date, evidence on the effects of metformin, a first line therapy for type 2 DM, on bone tissue around titanium implants is scarce and uncertain<sup>26</sup>. Therefore, the purpose of this study was to assess the possible effect of metformin in reversing the negative effects of hyperglycemia on the healing of bone surrounding implants inserted in rats.

## **Materials and Methods**

The University of Guarulhos Institutional Animal Care and Use Committee previously approved this experimental protocol. Thirty rats (Wistar male), acquired in the Butantan Institute (São Paulo, Brazil), were entered in the study. The animals were 90 days of age and weighed about  $330 \pm 30$ g at baseline. During the 5 days of acclimatization and during the experimental period (74 days) (Fig.1), the rats were kept alone in plastic cages with feed (Labina, Purina®, Paulinia, SP, Brazil) and water *ad*

*libitum* at the Bioscience Laboratory of Guarulhos University, with a temperature of 22°C to 24°C and light cycles of 12-hours light followed by 12-hours dark.

### ***Experimental groups***

The rats (10 per group) were randomly allocated into one of the following groups: DM group: diabetic rats deprived of metformin administration; MDM group: diabetic rats treated with metformin (40 mg/kg/day<sup>27</sup> by gavage, starting on the 15<sup>th</sup> day after implant placement; Fig.1); Control group: non-diabetic rats deprived of metformin administration.

### ***DM induction***

Rats from the DM and MDM groups were submitted to type 2 DM induction using a combination of fructose feeding and streptozotocin (STZ) injection, as previously described<sup>28</sup>. The animals initially received a 10% fructose solution in drinking water *ad libitum* during 14 days. After these 14 days, they were injected intraperitoneally with STZ (40 mg/kg) in citrate vehicle buffer (pH 4.4) (Fig. 1). Animals from the control group were not supplemented with fructose and were injected with citrate vehicle buffer (pH 4.4) intraperitoneally. The blood was collected from the animals' tail tips and the plasma glucose levels were measured just before 7 days after the administration of vehicle or STZ. Glucose levels were measured by means of the dextrotest method. Only animals achieving non-fasting plasma glucose levels of  $\geq 300$  mg/dl were selected for the DM and MDM groups.



### ***Implant placement***

Thirty days after STZ/ citrate vehicle buffer administration the animals were submitted to the implant placement. The rats were anesthetized by intraperitoneal injections of 0.3 mL/kg of xylazine (Virbaxil; Virbac Brazil Industry and Trade, Roseira, SP, Brazil) and 0.5 mL/kg of ketamine (Francotar; Virbac Brazil Industry and Trade, Roseira, SP, Brazil). The skin was previously prepared with a solution of iodine. An incision of ~1cm in length was made in the extremity of the tibiae close to the femoral joint. A full-thickness flap was performed to expose bone surface. Under continuous irrigation with saline solution, a bicortical implant bed was created on the metaphyseal region of the tibiae using a bur of 2 mm in diameter at a rotary speed of 1,000 rpm. A screw-shaped implant (4.0 mm in length and 2.2 mm in diameter) made out of commercially pure titanium (grade 4) (AS Technology-Titanium Fix Dental Implants, São José dos Campos, SP, Brazil) was placed until the screw thread had been totally inserted into the bone. The implants had rough surface achieved by sand-blasted with aluminum oxide beads and acid-etched with nitric acid. The soft tissues were sutured to achieve primary closure. Intramuscular injection of antibiotic and analgesic was given for each animal immediately after surgery. No immobilization of the legs and no movement restrictions were imposed for the animals after implant placement.

Thirty days following implant placement, the animals were euthanized by breathing of CO<sub>2</sub>. The tibia were removed and fixed in 10% buffered formalin for 24 hours. Five of the 10 animals per group received implants in both tibia of which one was designated for histometric analysis while the other one was designated for immunohistochemistry analysis.

### ***Examiner calibration***

The same trained, calibrated and blinded examiner (DFC) performed all histometric and immunohistochemistry analyses. Intra-examiner calibration exercise was performed by assessing ten non-study sections twice, with an interval of 48 hours between measurements. According to the intra-class correlation, the examiner achieved  $\geq 90\%$  of intra-examiner reproducibility for the histometric and immunohistochemistry measurements.

### ***Undecalcified section and histometric analysis***

Undecalcified sections were obtained from 10 specimens per group, as previously described<sup>29</sup>. The specimens were dehydrated using gradual concentrations of ethanol from 60% to 100%. After dehydration, the specimens were infiltrated with glycolmethacrylate (Technovit 7200®; Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Germany). Afterward, 20-30 $\mu$ m sections were taken in a longitudinal direction and stained with Masson's Trichrome. The percentages of bone-to-implant contact (BIC) and bone area (BA) within the limits of the implant threads were obtained using 200x magnification images employing image analysis software (NIS Elements Br, Nikon Instruments Inc, Melville, NY, EUA). For BIC analysis, the total perimeter (mm) of each thread was delimited using a specific tool of the software. Subsequently, the perimeter of the bone with direct contact to the implant surface was also delimited in each thread. BIC was expressed as the relationship of the amount of bone in direct contact with the implant to the total perimeter of the thread. For BA analysis, a checkered drawing was superimposed on image of the implants. The total number of intersections of the checkered diagram was counted within the limits of the threads using a specific tool of

the software. Then, the number of intersections under which the presence of bone was detected was also counted. BD was expressed as the relationship of the number of intersections with bone to the whole number of intersections. BIC and BA were assessed for all implant threads and organized independently in the cortical and medullary areas.

### ***Immunohistochemical analysis***

For immunohistochemical evaluations of OPG and RANKL, five specimens per group were decalcified in 10% ethylenediaminetetraacetic acid during 30 days, dehydrated in ascending concentrations of ethanol solutions and imbedded in paraffin. After removal of the implants, three sections from the cortical and three sections from the medullary areas of 5  $\mu\text{m}$  each, 20  $\mu\text{m}$  apart, were obtained in a transversal direction and fixed on glass slides pre-treated with 3-aminopropyltriethoxy-silane (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). These histological sections received 3% hydrogen peroxide for 30 minutes to remove the endogenous peroxidase and were treated with PBS-1% bovine serum albumin for 30 minutes at room temperature. At room temperature, the slides were incubated with polyclonal antibodies against RANKL (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or OPG (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) for 18 hours, with the biotinylated secondary antibody for 45 minutes at room temperature and with streptavidin peroxidase conjugate (Goat ImmunoCruz<sup>TM</sup> Staining System, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 30 minutes. The specific reaction for the antibodies was detected using 3,3'-diaminobenzidine. The slides were counter-stained with Mayer's hematoxylin, dehydrated in ethanol, cleared in xylene, and mounted with the aid of Permount mounting media (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). Negative controls were acquired by the exclusion of the primary antibodies. The number

of cells staining for OPG and RANKL were obtained in 400x magnification images in a quarter of the circumference of the implants, using image analysis software (NIS Elements Br, Nikon Instruments Inc, Melville, NY, EUA). The data were presented as the number of cells staining for RANKL, OPG and RANKL/OPG ratio per mm<sup>2</sup> of cortical and medullary areas, separately.

### ***Statistical analysis***

The sample size to ensure satisfactory power for this study was estimated considering differences of 20% between diabetic and non-diabetic groups for BIC at 4 weeks after implant placement and a standard deviation of 11%<sup>30</sup>. Based on this calculation, 5 rats per group would be enough to achieve a 95% power with an alpha of 0.05. However, pondering the risk of losing some animals during the anesthesia and gavage, 10 rats were included per group.

The percentage of BIC and BA were computed for each implant thread separately for cortical and medullary regions. Subsequently, these measurements were averaged within implants and then across the experimental groups. The number of cells staining for RANKL, OPG and the RANKL/OPG ratio were computed for each section for cortical and medullary regions. Subsequently, the cell counts of the three sections of cortical and medullary regions were separately averaged within implants and then across the experimental groups. Firstly, the normality of the data was examined by the Shapiro-Wilk test. The One-Way ANOVA and the post-hoc Turkey's test were used to detect differences among groups for the final body weight, glycemia and histometric and immunohistochemical parameters. The significance level determined for the current analyses was 0.05.

## **Results**

### ***Body weight and glycemia***

Two rats from DM group were lost during the implant placement procedure. All rats gained weight from the baseline to the end of the study. The mean body weights in the end of the experiment were  $456 \pm 39\text{g}$ ,  $452 \pm 22\text{g}$ , and  $435 \pm 18\text{g}$  for MDM, DM and control, respectively, and did not differ among the experimental groups ( $p > 0.05$ ). The initial glycemic levels did not vary among groups ( $p > 0.05$ ) ( $125 \pm 12.6\text{ mg/dl}$ ,  $110 \pm 17.0\text{ mg/dl}$  and  $112 \pm 13.0\text{ mg/dl}$  for MDM, DM and control, respectively). At the day of implant placement, the glycemic levels were higher in the MDM and DM groups than in the control group ( $322 \pm 8.0\text{ mg/dl}$ ,  $367 \pm 45.0\text{ mg/dl}$  and  $125 \pm 12.6\text{ mg/dl}$  for MDM, DM and control, respectively) ( $p < 0.05$ ). At the end of the experiment, the glycemic levels were higher in the DM group than in the MDM and control groups ( $154 \pm 27\text{mg/dl}$ ,  $330 \pm 13.0\text{ mg/dl}$  and  $104 \pm 8.0\text{ mg/dl}$  for MDM, DM and control, respectively) ( $p < 0.05$ ).

### ***Histometry***

Table 1 shows the percentage of BA and BIC for cortical and medullary regions for all experimental groups. The measurements of BA and BIC in the cortical bone were lower in the DM and MDM groups than in the control group ( $p < 0.05$ ). The percentage of BA in the medullary region was lower in the DM group, compared to the control ( $p < 0.05$ ). The MDM group did not differ from the DM and control groups in relation to the percentage of BA in the medullary region ( $p > 0.05$ ). There were no differences among groups for the percentage of BIC in the medullary area ( $p > 0.05$ ). Fig. 2 shows the

histological results, showing reduced BIC and BA in implants of the DM and MDM groups, especially in the cortical region.

### ***Immunohistochemistry***

There were no differences among groups for the number of RANKL- and OPG-stained cells, as well as the RANKL/OPG in the cortical bone ( $p>0.05$ ). The medullary bone around the implants of the MDM group presented the highest number of OPG-stained cells ( $p<0.05$ ). The medullary bone around the implants of the control group presented the lowest quantity of RANKL-stained cells ( $p<0.05$ ). Furthermore, the medullary bone around the implants of the DM group presented the greatest RANKL/OPG ratio ( $p<0.05$ ). Fig. 3 shows the immunological findings of the above-mentioned results for the medullary area.

### **Discussion**

This study evaluated the possible effect of metformin in reversing the impact of hyperglycemia on bone healing around implants. Results showed that hyperglycemia induced harmful effects on the cortical bone and medullary bone, when considering the histometric and immunohistochemical analyses. Furthermore, the administration of metformin from the middle to the latest stages of the bone repair had a slight protective action against the effects of DM on medullary bone around implants, specifically when observing that this drug was able to increase the levels of OPG and reduce the ratio of RANKL/OPG in the medullary area.

In this study, the DM group exhibited lower BIC and BA in the cortical region, as well as lower BA in the medullary region, when compared to the control group. These

findings are in agreement with previous investigations in animals that also showed that DM-induced hyperglycemia has detrimental effects on the osseointegration process<sup>12,14,30-37</sup>. On the other hand, these results are in contrast to those of previous studies that observed no differences<sup>38</sup> or an increase<sup>32,39</sup> in the BA and BIC around implants inserted in diabetic animals. These divergences among studies, in relation to the effects of DM on bone healing around implants, could be explained by differences in the protocol of DM induction (e.g. STZ, alloxan, genetically-modified rats, diet), threshold of plasma glucose levels determined for DM, moment of DM induction in relation to implant placement, phases of bone repair evaluated, and methods used for measurement of osseointegration (e.g. histometry, biomechanical tests).

Pre-clinical and clinical studies from the medical field have long demonstrated that DM may induce mechanical, histological, cellular and molecular alterations in bone structure and healing<sup>40-42</sup>. General alterations, most of which related to the advanced glycation end-products, include: poor mineral and mechanical properties<sup>43</sup>, increased risk of fracture<sup>44</sup>, collagen deterioration<sup>42</sup>, reduced expression of growth factors (GFs) (e.g. transforming growth factor [TGF]- $\beta$ , platelet derived growth factor [PDGF]- $\beta$ , insulin-like growth factor [IGF]-1),<sup>45</sup> and regulators of osteoblast differentiation (e.g. Cbfa1/Runx-2 and Dlx5)<sup>46</sup>, diminished neovascularization<sup>45</sup> and increased osteoclast differentiation and activity due to the upregulation of bone resorbing-related molecules (e.g. RANKL and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ )<sup>47</sup>. Identifying the molecular and cellular changes during bone healing around implants in an hyperglycemic state is an important step for targeted intervention to prevent implant failure and accelerate healing under the challenge of DM. Nevertheless, the cellular and molecular mechanisms that could explain the negative

impact of DM, specifically on bone around titanium implants, have been poorly investigated so far<sup>36-37</sup>. Colombo et al.<sup>36</sup> showed an altered number of cells positive for osteopontin (OPN), osteocalcin (OCN) and pro-inflammatory cytokines during bone repair around implants placed in diabetic rats, when compared to the non-diabetic animals. According to the authors, these findings may explain mechanistically the decreased osteoblast proliferation and differentiation and the consequent delay of bone repair around the implants of the diabetic animals. Instead, von Wilmowsky et al.<sup>37</sup> demonstrated no differences in the percentage of cells staining for collagen type-I and OCN during bone formation around implants inserted in diabetic and non-diabetic pigs, although the diabetic animals presented greater BIC than the healthy animals. To the authors' knowledge, this study is the first to evaluate the number of cells expressing RANKL and OPG around implants inserted in rats with type 2 DM. The results revealed higher number of RANKL positive cells, as well as an increased ratio of RANKL/OPG in the medullary bone around implants placed in the DM group, when compared to the control group. These molecular results may support, to some extent, our histometric findings showing detrimental effects of DM on bone around implants. RANKL and OPG are, respectively, positive and negative controllers of osteoclast formation. The imbalance of RANKL and OPG induces differentiation of bone marrow hematopoietic precursor cells into bone-resorbing osteoclasts and is supposed to affect bone healing and contribute to poor osseointegration.

The current study mainly focused on the evaluation whether the introduction of daily administration of metformin from the middle to latest stages of the osseointegration process would modulate or reverse the harmful impact of DM on bone around implants.



According to the histometric results, BIC and BA in the cortical region of the MDM group were similar to those of the DM group and significantly lower than those of the control group. Furthermore, DM animals treated with metformin had only a tendency to exhibit an increased BA in the medullary region. These findings indicate that metformin was not effective in reversing the alterations caused by DM around implants at the histometric level. One other study also assessed the influence of metformin on bone around implants inserted in Goto-Kakizaki spontaneously diabetic rats, a genetic model of type 2 DM<sup>26</sup>. In agreement with our histometric findings, the authors<sup>26</sup> revealed that metformin had no benefits on bone repair around implants inserted in diabetic animals after 4 weeks. In addition, studies have observed that other anti-diabetic therapies, including insulin and voglibose, also failed to abolish the negative effects of DM on osseointegration<sup>14,34</sup>. On the other hand, other previous investigations have demonstrated that anti-diabetic drugs, including aminoguanidine<sup>13,35</sup> and insulin<sup>33,48</sup>, are able to control the deleterious effects of DM on bone around implants. Therefore, the potential benefits of anti-diabetic drugs during the osseointegration of implants in diabetic animals may be related to their pharmacokinetics/pharmacodynamics, dose, period and via of drug administration, as well as the moment of starting their administration with relation to the implant placement.

Notably, while metformin provided no benefits at the histometric level, animals treated with this medication presented increased levels of OPG, as well as a decreased ratio of RANKL/OPG in the medullary bone around implants, when compared to the untreated animals with DM. In support of these findings, Shao et al.<sup>49</sup> observed that metformin was able to increase the expression of OPG in osteoblast-like cells, cultured in

the presence of high levels of glucose. Moreover, metformin was also able to inhibit periapical lesions in rats by lowering the ratio of RANKL/OPG<sup>27</sup>, and stimulating OPG expressions in osteoblastic cells, further inhibiting osteoclast differentiation and preventing bone loss in rats with estrogen deficiency<sup>23</sup>. The current findings suggest that metformin may regulate, at least at the molecular level, the process of bone repair around implants inserted in rats with DM, in an attempt to constrain osteoclast differentiation and activity. Therefore, a longer follow-up of the bone repair around implants inserted in the metformin-treated animals, with and without continuous administration of this drug, would be important to observe if, and to what extent, metformin would provide additional effects on medullary and cortical bones at molecular and histometric levels. Further studies evaluating the effects of other doses and programs of metformin administration on bone tissue around implants under diabetic conditions are required to better elucidate the possible benefits of this hypoglycemic for osseointegration.

Some features of this study should be taken into consideration when interpreting the results of the current study. First, although the magnitude of the glycemia was significantly lower in the MDM group than in the DM group ( $154 \pm 27$  mg/dl against  $330 \pm 13.0$  mg/dl), the proposed treatment protocol yielded some residual hyperglycemia when compared to control ( $154 \pm 27$  mg/dl against  $104 \pm 8.0$  mg/dl). The ineffectiveness of anti-diabetic drugs in totally controlling hyperglycemia in experimental models of DM has been also demonstrated by several studies evaluating bone repair around implants<sup>13,26,39</sup>. Secondly, metformin administration was introduced from the middle to the latest stages of bone healing, i.e., after the early stages of the osseointegration process. Thus, information regarding the impact of metformin administration when

introduced before implant placement or at other phases of bone healing was missed with the experimental design of the present study. Third, the used implants were made with commercially pure titanium (grade 4) and rough surface prepared by sand-blasted with aluminum oxide beads and acid-etched with nitric acid. Although this is one of the most used implant surfaces worldwide, the current findings cannot be generalized to other types of implant materials and surfaces. Finally, histometric and immunohistochemistry pictures were obtained at only a given point in time, limiting the assessment of the dynamics of bone healing around the implants.

## **Conclusion**

Metformin did not restore the damaging effects of DM on bone repair around implants at histometric levels, but provided molecular benefit by increasing the expression of OPG and decreasing the ratio of RANKL/OPG in the medullary bone around implants inserted in diabetic rats.

## **Acknowledgements**

The authors thank São Paulo State Research Foundation (São Paulo, São Paulo, Brazil; #2013/09628-2) and Guarulhos University Undergraduate Research Program for financial support and the AS Technology-Titanium Fix Dental Implants (São José dos Campos, São Paulo, Brazil) for funding the implants.

## **Conflict of Interest**

The authors state no conflict of interest.

## **Funding**

This study was supported by the São Paulo State Research Foundation (São Paulo, São Paulo, Brazil; #2013/09628-2) and by the Guarulhos University Undergraduate Research Program.

## **Ethical approval:**

The University of Guarulhos Institutional Animal Care and Use Committee previously approved this study protocol.

## References

1. Adell R, Lekholm U, Rockler B, Brånemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg* 1981;10:387-416.
2. Albrektsson T, Dahl E, Enbom L et al. Osseointegrated oral implants. A Swedish multicenter study of 8139 consecutively inserted Nobelpharma implants. *J Periodontol* 1998;59:287-296.
3. Jung RE, Zembic A, Pjetursson BE, Zwahlen M, Thoma DS. Systematic review of the survival rate and the incidence of biological, technical, and aesthetic complications of single crowns on implants reported in longitudinal studies with a mean follow-up of 5 years. *Clin Oral Implants Res* 2012;23:2-21.
4. Pjetursson BE, Thoma D, Jung R, Zwahlen M, Zembic A. A systematic review of the survival and complication rates of implant-supported fixed dental prostheses (FDPs) after a mean observation period of at least 5 years. *Clin Oral Implants Res* 2012;23:22-38.
5. Derks J, Håkansson J, Wennström JL, Tomasi C, Larsson M, Berglundh T. Effectiveness of implant therapy analyzed in a Swedish population: early and late implant loss. *J Dent Res* 2015;94:44S-51S.
6. Mombelli A, Cionca N. Systemic diseases affecting osseointegration therapy. *Clin Oral Implants Res* 2006;17:97-103.
7. Chrcanovic BR, Albrektsson T, Wennerberg A. Smoking and dental implants: A systematic review and meta-analysis. *J Dent* 2015;43:487-498.
8. Forouhi NG, Wareham NJ. Epidemiology of diabetes. *Medicine (Abingdon)* 2014;42:698-702.
9. American Diabetes Association. Standards of medical care for patients with diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003;26:S33-50.
10. Yamamoto M. Insights into bone fragility in diabetes: the crucial role of bone quality on skeletal strength. *Endocr J* 2015;30:62:299-308.
11. Wukich DK. Diabetes and its negative impact on outcomes in orthopaedic surgery. *World J Orthop* 2015;6:331-339.
12. Hasegawa H, Ozawa S, Hashimoto K, Takeichi T, Ogawa T. Type 2 diabetes impairs implant osseointegration capacity in rats. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2008; 23:237-246.
13. Guimarães RP, de Oliveira PA, Oliveira AM. Effects of induced diabetes and the administration of aminoguanidine in the biomechanical retention of implants: a study in rats. *J Periodontal Res* 2011; 46:691-696.

14. Hashiguchi C, Kawamoto S, Kasai T, Nishi Y, Nagaoka E. Influence of an antidiabetic drug on biomechanical and histological parameters around implants in type 2 diabetic rats. *Implant Dent* 2014; 23:264-269.
15. Alsaadi G, Quirynen M, Komárek A, van Steenberghe D. Impact of local and systemic factors on the incidence of late oral implant loss. *Clin Oral Implants Res* 2008; 19:670-676.
16. Morales-Vadillo R, Leite FP, Guevara-Canales J et al. Retrospective study of the survival and associated risk factors of wedge-shaped implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2013;28:875-82.
17. Hurst D. Evidence unclear on whether Type I or II diabetes increases the risk of implant failure. *Evid Based Dent* 2014;15:102-103.
18. Moy PK, Medina D, Shetty V, Aghaloo TL. Dental implant failure rates and associated risk factors. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005; 20:569-577.
19. Daubert DM, Weinstein BF, Bordin S, Leroux BG, Flemming TF. Prevalence and predictive factors for peri-implant disease and implant failure: a cross-sectional analysis. *J Periodontol* 2015;86:337-347.
20. Krentz AJ, Bailey CJ. Oral antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus. *Drugs* 2005;65:385-411
21. Nathan N, Sullivan SD. The Utility of Metformin Therapy in Reproductive-Aged Women with Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). *Curr Pharm Biotechnol* 2014;15:70-83.
22. Stine JE, Bae-Jump V. Metformin and gynecologic cancers. *Obstet Gynecol Surv* 2014;69:477-489.
23. Mai QG, Zhang ZM, Xu S et al. Metformin stimulates osteoprotegerin and reduces RANKL expression in osteoblasts and ovariectomized rats. *J Cell Biochem* 2011;112:2902-2909.
24. Meier C, Schwartz AV, Egger A, Lecka-Czernik B. Effects of diabetes drugs on the skeleton. *Bone* 2015;S8756-3282(15)00139-00138.
25. Fiorellini JP, Nevins ML, Norikin A, Weber HP, Karimbux NY. The effect of insulin therapy on osseointegration in a diabetic rat model. *Clin Oral Implants Res* 1999;10:362-368.
26. Inouye KA, Bisch FC, Elsalanty ME, Zakhary I, Khashaba RM, Borke JL. Effect of metformin on periimplant wound healing in a rat model of type 2 diabetes. *Implant Dent* 2014;23:319-327.

27. Liu L, Zhang C, Hu Y, Peng B. Protective effect of metformin on periapical lesions in rats by decreasing the ratio of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin. *J Endod* 2012;38:943-947.
28. Wilson RD, Islam MS. Fructose-fed streptozotocin-injected rat: an alternative model for type 2 diabetes. *Pharmacol Rep.* 2012;64(1):129-39.
29. Nociti FH Jr, Sallum AW, Sallum EA, Duarte PM. Effect of estrogen replacement and calcitonin therapies on bone around titanium implants placed in ovariectomized rats: a histometric study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002;17:786-792.
30. Nevins ML, Karimbux NY, Weber HP, Giannobile WV, Fiorellini JP. Wound healing around endosseous implants in experimental diabetes. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998;13:620-629.
31. Takeshita F, Murai K, Iyama S, Ayukawa Y, Suetsugu T. Uncontrolled diabetes hinders bone formation around titanium implants in rat tibiae. A light and fluorescence microscopy, and image processing study. *J Periodontol* 1998;69:314-320.
32. McCracken M, Lemons JE, Rahemtulla F, Prince CW, Feldman D. Bone response to titanium alloy implants placed in diabetic rats. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000;15:345-54.
33. Siqueira JT, Cavalher-Machado SC, Arana-Chavez VE, Sannomiya P. Bone formation around titanium implants in the rat tibia: role of insulin. *Implant Dent* 2003;12:242-351.
34. Margonar R, Sakakura CE, Holzhausen M, Pepato MT, Alba JR, Marcantonio JE. The influence of diabetes mellitus and insulin therapy on biomechanical retention around dental implants: a study in rabbits. *Implant Dent* 2003;12:333-339.
35. Kopman JA, Kim DM, Rahman SS, Arandia JA, Karimbux NY, Fiorellini JP. Modulating the effects of diabetes on osseointegration with aminoguanidine and doxycycline. *J Periodontol* 2005;76:614-620.
36. Colombo JS, Balani D, Sloan AJ, Crean SJ, Okazaki J, Waddington RJ. Delayed osteoblast differentiation and altered inflammatory response around implants placed in incisor sockets of type 2 diabetic rats. *Clin Oral Implants Res* 2011;22:578-586.
37. von Wilmsowky C, Stockmann P, Harsch I et al. Diabetes mellitus negatively affects peri-implant bone formation in the diabetic domestic pig. *J Clin Periodontol* 2011;38:771-779.
38. Casap N, Nimri S, Ziv E, Sela J, Samuni Y. Type 2 diabetes has minimal effect on osseointegration of titanium implants in *Psammomys obesus*. *Clin Oral Implants Res* 2008;19:458-464.

39. McCracken MS, Aponte-Wesson R, Chavali R, Lemons JE. Bone associated with implants in diabetic and insulin-treated rats. *Clin Oral Implants Res* 2006;17:495-500.
40. Retzeqi M, Donos N. The effect of diabetes mellitus on osseous healing. *Clin Oral Implants Res* 2010;21:673-681.
41. Yamaguchi T. Bone fragility in type 2 diabetes mellitus. *World J Orthop* 2010;18;1:3-9.
42. Carnevale V, Romagnoli E, D'Erasmus L, D'Erasmus E. Bone damage in type 2 diabetes mellitus. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2014;24:1151-1157.
43. Einhorn TA, Boskey AL, Gundberg CM, Vigorita VJ, Devlin VJ, Beyer MM. The mineral and mechanical properties of bone in chronic experimental diabetes. *J Orthop Res* 1988;6: 317-323.
44. Blakytyn R, Spraul M, Jude EB. Review: The diabetic bone: a cellular and molecular perspective. *Int J Low Extrem Wounds* 2011;10:16-32.
45. Coords M, Breitbart E, Paglia D et al. effects of low-intensity pulsed ultrasound upon diabetic fracture healing. *J Orthop Res* 2011;29:181-188.
46. Lu H, Kraut D, Gerstenfeld LC, Graves DT. Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation. *Endocrinology* 2003;144:346-352.
47. Kayal RA, Tsatsas D, Bauer MA et al. Diminished bone formation during diabetic fracture healing is related to the premature resorption of cartilage associated with increased osteoclast activity. *J Bone Miner Res* 2007;22:560-568.
48. Kwon PT, Rahman SS, Kim DM, Kopman JA, Karimbux NY, Fiorellini JP. Maintenance of osseointegration utilizing insulin therapy in a diabetic rat model. *J Periodontol* 2005;76:621-626.
49. Shao X, Cao X, Song G, Zhao Y, Shi B. Metformin rescues the MG63 osteoblasts against the effect of high glucose on proliferation. *J Diabetes Res* 2014;2014:453940.



**Table 1** - Percentage of bone-implant contact (BIC) and bone area (BA) for the cortical and medullary regions.

| Bone region | Parameter (%) | Groups                    |                            |                           | ANOVA p-value |
|-------------|---------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------|
|             |               | DM<br>n=8                 | MDM<br>n=10                | Control<br>n=10           |               |
| Cortical    | BIC           | 50.85 ± 6.26 <sup>a</sup> | 48.58 ± 12.41 <sup>a</sup> | 70.17 ± 5.36 <sup>b</sup> | 0.0004        |
|             | BA            | 40.31 ± 8.74 <sup>a</sup> | 46.22 ± 8.41 <sup>a</sup>  | 61.34 ± 5.04 <sup>b</sup> | 0.0002        |
| Medullary   | BIC           | 16.47 ± 4.56              | 15.33 ± 11.16              | 24.93 ± 16.39             | 0.24          |
|             | BA            | 7.67 ± 4.56 <sup>a</sup>  | 12.96 ± 8.58 <sup>ab</sup> | 18.87 ± 7.49 <sup>b</sup> | 0.04          |

DM: diabetic rats without metformin administration.

MDM: diabetic rats treated with metformin.

Different letters indicate significant differences over time by repeated measures ANOVA and Tukey's tests ( $p < 0.05$ ).

**Table 2** - Number of OPG- and RANKL-stained cells and ratio of RANKL/OPG per mm<sup>2</sup> for the cortical and medullary regions.

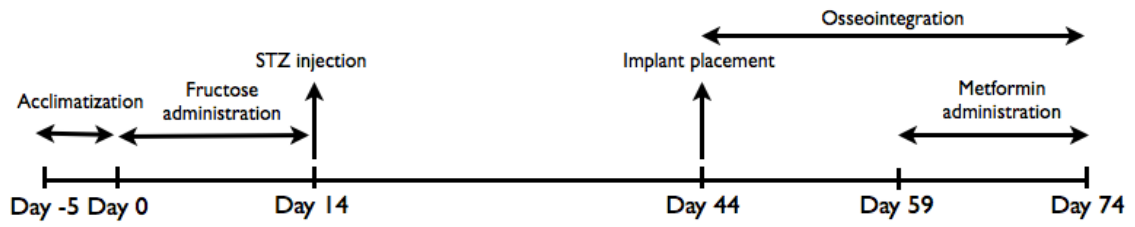
| Bone region | Biomarker | Groups                   |                         |                         | ANOVA p-value |
|-------------|-----------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------|
|             |           | DM<br>n=5                | MDM<br>n=5              | Control<br>n=5          |               |
| Cortical    | OPG       | 2034 ± 592               | 2321 ± 588              | 1815 ± 374              | 0.51          |
|             | RANKL     | 2367 ± 560               | 2574 ± 645              | 1808 ± 273              | 0.14          |
|             | RANKL/OPG | 1.2 ± 0.2                | 1.1 ± 0.2               | 1.0 ± 0.1               | 0.25          |
| Medullary   | OPG       | 3317 ± 481 <sup>a</sup>  | 4600 ± 731 <sup>b</sup> | 2265 ± 572 <sup>a</sup> | 0.001         |
|             | RANKL     | 4522 ± 1142 <sup>a</sup> | 4989 ± 638 <sup>a</sup> | 2372 ± 587 <sup>b</sup> | 0.020         |
|             | RANKL/OPG | 1.4 ± 0.5 <sup>a</sup>   | 1.1 ± 0.5 <sup>b</sup>  | 1.1 ± 0.1 <sup>b</sup>  | 0.035         |

DM: diabetic rats without metformin administration.

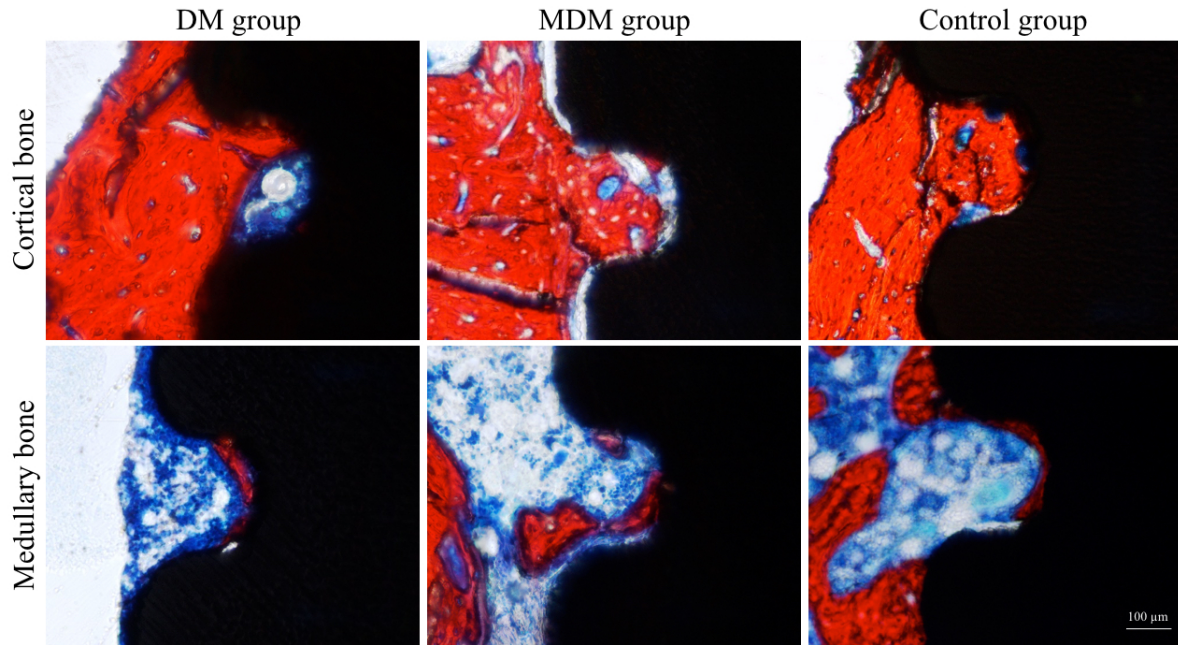
MDM: diabetic rats treated with metformin.

Different letters indicate significant differences over time by repeated measures ANOVA and Turkey's tests (p<0.05).

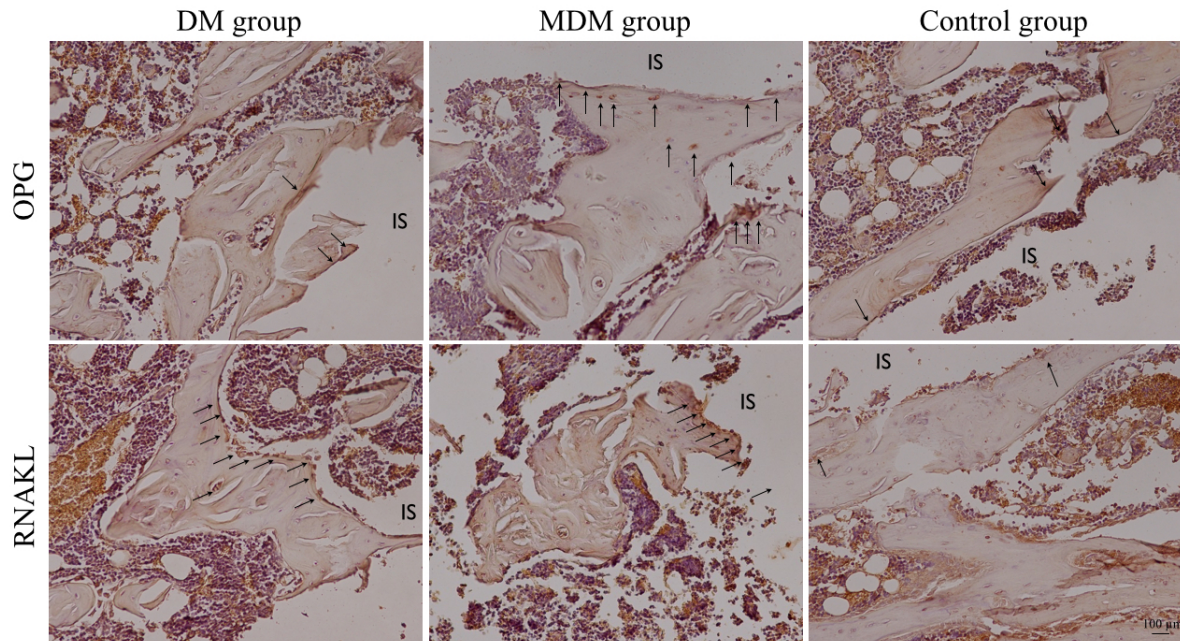
**Figure 1** - Experimental design of the study.



**Figure 2** - Photomicrographs illustrating BIC and BA in the medullary and cortical areas of the DM, MDM and control groups (200x magnification; Masson's Trichrome). Note that the DM and MDM groups present lower BA and BIC within the limits of the implant threads.



**Figure 3** - Photomicrographs illustrating immunohistochemical staining for OPG and RANKL in the medullary bone of the DM, MDM and control groups (400x magnification; Mayer's hematoxylin). Note reduced RANKL-stained cells in the medullary bone of the control group and increased OPG-stained cells in the MDM group. The arrows exemplify stained cells. IS: space implant.



## **5. CONCLUSÕES GERAIS**

A metformina afetou negativamente a osseointegração, reduzindo as percentagens de BIC e BA e aumentando a expressão de RANKL ao redor de implantes de titânio inseridos em ratos não-diabéticos. Além disso, esta droga não foi capaz de reverter a influência negativa da hiperglicemia no reparo ósseo ao redor de implantes em nível histométrico, mas aumentou a expressão de OPG e diminuiu a proporção RANKL/OPG na área medular, produzindo alguns benefícios moleculares no processo de osseointegração de implantes sob um estado hiperglicêmico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abu Hashim H. Twenty years of ovulation induction with metformin for PCOS; what is the best available evidence? *Reprod Biomed Online*. 2016 Jan;32(1):44-53.

Adell R, Lekholm U, Rockler B, Brånemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg*. 1981 Dec;10(6):387-416.

Ahdi M, Teeuw WJ, Meeuwissen HG, Hoekstra JB, Gerdes VE, Loos BG, Meesters EW. Oral health information from the dentist to the diabetologist. *Eur J Intern Med*. 2015 Sep;26(7):498-503.

Alsaadi G, Quirynen M, Komárek A, van Steenberghe D. Impact of local and systemic factors on the incidence of oral implant failures, up to abutment connection. *J Clin Periodontol*. 2007 Jul;34(7):610-7.

American Diabetes Association.. Erratum. Classification and diagnosis of diabetes. Sec. 2. In *Standards of Medical Care in Diabetes-2016*. *Diabetes Care* 2016;39(Suppl. 1):S13-S22. *Diabetes Care*. 2016 Sep;39(9):1653.

Anner R, Grossmann Y, Anner Y, Levin L. Smoking, diabetes mellitus, periodontitis, and supportive periodontal treatment as factors associated with dental implant survival: a long-term retrospective evaluation of patients followed for up to 10 years. *Implant Dent*. 2010 Feb;19(1):57-64.

Annibali S, Pranno N, Cristalli MP, La Monaca G, Polimeni A. Survival Analysis of Implant in Patients With Diabetes Mellitus: A Systematic Review. *Implant Dent*. 2016 Oct;25(5):663-74.

Bailey CJ, Day C. Traditional plant medicines as treatments for diabetes. *Diabetes Care*. 1989 Sep;12(8):553-64.

Bailey CJ, Turner RC. Metformin. *N Engl J Med*. 1996 Feb 29;334(9):574-9.

Bak EJ, Park HG, Kim M, Kim SW, Kim S, Choi SH, Cha JH, Yoo YJ. The effect of metformin on alveolar bone in ligature-induced periodontitis in rats: a pilot study. *J Periodontol*. 2010 Mar;81(3):412-9.

Casap N, Nimri S, Ziv E, Sela J, Samuni Y. Type 2 diabetes has minimal effect on osseointegration of titanium implants in *Psammomys obesus*. *Clin Oral Implants Res*. 2008 May;19(5):458-64.

Chrcanovic BR, Albrektsson T, Wennerberg A. Bisphosphonates and dental implants: A meta-analysis. *Quintessence Int*. 2016 Apr;47(4):329-42.

Colombo JS, Balani D, Sloan AJ, Crean SJ, Okazaki J, Waddington RJ. Delayed osteoblast differentiation and altered inflammatory response around implants placed in incisor sockets of type 2 diabetic rats. *Clin Oral Implants Res.* 2011 Jun;22(6):578-86.

Conte A, Ghiraldini B, Casarin RC, Casati MZ, Pimentel SP, Cirano FR, Duarte PM, Ribeiro FV. Impact of type 2 diabetes on the gene expression of bone-related factors at sites receiving dental implants. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015 Oct;44(10):1302-8.

Cortizo AM, Sedlinsky C, McCarthy AD, Blanco A, Schurman L. Osteogenic actions of the anti-diabetic drug metformin on osteoblasts in culture. *Eur J Pharmacol.* 2006 Apr 24;536(1-2):38-46.

Cortizo AM. Insulin-deficient diabetes-induced bone microarchitecture alterations are associated with a decrease in the osteogenic potential of bone marrow progenitor cells: preventive effects of metformin. *Diabetes Res Clin Pract.* 2013 Aug;101(2):177-86.

de Molon RS, Morais-Camilo JA, Verzola MH, Faeda RS, Pepato MT, Marcantonio E Jr. Impact of diabetes mellitus and metabolic control on bone healing around osseointegrated implants: removal torque and histomorphometric analysis in rats. *Clin Oral Implants Res.* 2013 Jul;24(7):831-7.

de Morais JA, Trindade-Suedam IK, Pepato MT, Marcantonio E Jr, Wenzel A, Scaf G. Effect of diabetes mellitus and insulin therapy on bone density around osseointegrated dental implants: a digital subtraction radiography study in rats. *Clin Oral Implants Res.* 2009 Aug;20(8):796-801.

Derks J, Håkansson J, Wennström JL, Tomasi C, Larsson M, Berglundh T. Effectiveness of implant therapy analyzed in a Swedish population: early and late implant loss. *J Dent Res.* 2015 Mar;94(3 Suppl):44S-51S.

Dowell S, Oates TW, Robinson M. Implant success in people with type 2 diabetes mellitus with varying glycemic control: a pilot study. *J Am Dent Assoc.* 2007 Mar;138(3):355-61.

Erdogan Ö, Uçar Y, Tatlı U, Sert M, Benlidayı ME, Evlice B. A clinical prospective study on alveolar bone augmentation and dental implant success in patients with type 2 diabetes. *Clin Oral Implants Res.* 2015 Nov;26(11):1267-75.

Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (II). Etiopathogenesis. *Eur J Oral Sci.* 1998 Jun;106(3):721-64.

Farooq R, Amin S, Hayat Bhat M, Malik R, Wani HA, Majid S. Type 2 diabetes and metabolic syndrome - adipokine levels and effect of drugs. *Gynecol Endocrinol.* 2016 Oct 5:1-4.



Farzad P, Andersson L, Nyberg J. Dental implant treatment in diabetic patients. *Implant Dent.* 2002;11(3):262-7.

Fiorellini JP, Chen PK, Nevins M, Nevins ML. A retrospective study of dental implants in diabetic patients. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2000 Aug;20(4):366-73.

Fiorellini JP, Nevins ML, Norkin A, Weber HP, Karimbux NY. The effect of insulin therapy on osseointegration in a diabetic rat model. *Clin Oral Implants Res.* 1999 Oct;10(5):362-8

Gao Y, Li Y, Xue J, Jia Y, Hu J. Effect of the anti-diabetic drug metformin on bone mass in ovariectomized rats. *Eur J Pharmacol.* 2010 Jun 10;635(1-3):231-6.

Genuth S, Alberti KG, Bennett P, Buse J, Defronzo R, Kahn R, Kitzmiller J, Knowler WC, Lebovitz H, Lernmark A, Nathan D, Palmer J, Rizza R, Saudek C, Shaw J, Steffes M, Stern M, Tuomilehto J, Zimmet P; Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2003

Gómez-Moreno G, Aguilar-Salvatierra A, Rubio Roldán J, Guardia J, Gargallo J, Calvo-Guirado JL. Peri-implant evaluation in type 2 diabetes mellitus patients: a 3-year study. *Clin Oral Implants Res.* 2015 Sep;26(9):1031-5.

Glösel B, Kuchler U, Watzek G, Gruber R. Review of dental implant rat research models simulating osteoporosis or diabetes. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2010 May-Jun;25(3):516-24.

Gong J, Kelekar G, Shen J, Shen J, Kaur S, Mita M. The expanding role of metformin in cancer: an update on antitumor mechanisms and clinical development. *Target Oncol.* 2016 Aug;11(4):447-67.

Guimarães RP, de Oliveira PA, Oliveira AM. Effects of induced diabetes and the administration of aminoguanidine in the biomechanical retention of implants: a study in rats. *J Periodontal Res.* 2011 Dec;46(6):691-6.

Hasegawa H, Ozawa S, Hashimoto K, Takeichi T, Ogawa T. Type 2 diabetes impairs implant osseointegration capacity in rats. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2008 Mar-Apr;23(2):237-46.

Hashiguchi C, Kawamoto S, Kasai T, Nishi Y, Nagaoka E. Influence of an antidiabetic drug on biomechanical and histological parameters around implants in type 2 diabetic rats. *Implant Dent.* 2014 Jun;23(3):264-9.

Inouye KA, Bisch FC, Elsalanty ME, Zakhary I, Khashaba RM, Borke JL. Effect of metformin on periimplant wound healing in a rat model of type 2 diabetes. *Implant Dent.* 2014 Jun;23(3):319-27.

Javed F, Romanos GE. Impact of diabetes mellitus and glycemic control on the osseointegration of dental implants: a systematic literature review. *J Periodontol*. 2009 Nov;80(11):1719-30.

Jeyabalan J, Viollet B, Smitham P, Ellis SA, Zaman G, Bardin C, Goodship A, Roux JP, Pierre M, Chenu C. The anti-diabetic drug metformin does not affect bone mass in vivo or fracture healing. *Osteoporos Int*. 2013 Oct;24(10):2659-70.

Kanazawa I, Yamaguchi T, Yano S, Yamauchi M, Sugimoto T. Metformin enhances the differentiation and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells via AMPkinase activation as well as eNOS and BMP-2 expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Oct 24;375(3):414-9.

Klafke A, Duncan BB, Stevens A, Rosa Rdos S, de Moura L, Malta D, Schmidt MI. The decline in mortality due to acute complications of diabetes mellitus in Brazil, 1991-2010. *BMC Public Health*. 2015 Aug 11;15:772.

Kopman JA, Kim DM, Rahman SS, Arandia JA, Karimbux NY, Fiorellini JP. Modulating the effects of diabetes on osseointegration with aminoguanidine and doxycycline. *J Periodontol*. 2005 Apr;76(4):614-20.

Kotsakis GA, Ioannou AL, Hinrichs JE, Romanos GE. A systematic review of observational studies evaluating implant placement in the maxillary jaws of medically compromised patients. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2015 Jun;17(3):598-609.

Kuchler U, Spilka T, Baron K, Tangl S, Watzek G, Gruber R. Intermittent parathyroid hormone fails to stimulate osseointegration in diabetic rats. *Clin Oral Implants Res*. 2011 May;22(5):518-23.

Kwon PT, Rahman SS, Kim DM, Kopman JA, Karimbux NY, Fiorellini JP. Maintenance of osseointegration utilizing insulin therapy in a diabetic rat model. *J Periodontol*. 2005 Apr;76(4):621-6.

Kwon T, Bain PA, Levin L. Systematic review of short- (5-10 years) and long-term (10 years or more) survival and success of full-arch fixed dental hybrid prostheses and supporting implants. *J Dent*. 2014 Oct;42(10):1228-41.

La Fontaine J, Chen C, Hunt N, Jude E, Lavery L. Type 2 Diabetes and Metformin Influence on Fracture Healing in an Experimental Rat Model. *J Foot Ankle Surg*. 2016 Sep-Oct;55(5):955-60.

Luo S, Yang X, Wang D, Ni J, Wu J, Xu Z, Xuan D, Zhang J. Periodontitis contributes to aberrant metabolism in type 2 diabetes mellitus rats by stimulating the expression of adipokines. *J Periodontal Res*. 2016 Aug;51(4):453-61.

Mai QG, Zhang ZM, Xu S, Lu M, Zhou RP, Zhao L, Jia CH, Wen ZH, Jin DD, Bai XC. Metformin stimulates osteoprotegerin and reduces RANKL expression in osteoblasts and ovariectomized rats. *J Cell Biochem.* 2011 Oct;112(10):2902-9.

Margonar R, Sakakura CE, Holzhausen M, Pepato MT, Alba jR, Marcantonio jE. The influence of diabetes mellitus and insulin therapy on biomechanical retention around dental implants: a study in rabbits. *Implant Dent.* 2003;12(4):333-9.

McCracken M, Lemons JE, Rahemtulla F, Prince CW, Feldman D. Bone response to titanium alloy implants placed in diabetic rats. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2000 May-Jun;15(3):345-54.

McCracken MS, Aponte-Wesson R, Chavali R, Lemons JE. Bone associated with implants in diabetic and insulin-treated rats. *Clin Oral Implants Res.* 2006 Oct;17(5):495-500.

Meier C, Schwartz AV, Egger A, Lecka-Czernik B. Effects of diabetes drugs on the skeleton. *Bone.* 2016 Jan;82:93-100.

Molinuevo MS, Schurman L, McCarthy AD, Cortizo AM, Tolosa MJ, Gangoiti MV, Arnol V, Sedlinsky C. Effect of metformin on bone marrow progenitor cell differentiation: in vivo and in vitro studies. *J Bone Miner Res.* 2010 Feb;25(2):211-21.

Moraschini V, Poubel LA, Ferreira VF, Barboza Edos S. Evaluation of survival and success rates of dental implants reported in longitudinal studies with a follow-up period of at least 10 years: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015 Mar;44(3):377-88.

Muddugangadhar BC, Amarnath GS, Sonika R, Chheda PS, Garg A. Meta-analysis of Failure and Survival Rate of Implant-supported Single Crowns, Fixed Partial Denture, and Implant Tooth-supported Protheses. *J Int Oral Health.* 2015 Sep;7(9):11-7.

Naujokat H, Kunzendorf B, Wiltfang J. Dental implants and diabetes mellitus-a systematic review. *Int J Implant Dent.* 2016 Dec;2(1):5.

Nevins ML, Karimbux NY, Weber HP, Giannobile WV, Fiorellini JP. Wound healing around endosseous implants in experimental diabetes. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1998 Sep-Oct;13(5):620-9.

Oates TW, Dowell S, Robinson M, McMahan CA. Glycemic control and implant stabilization in type 2 diabetes mellitus. *J Dent Res.* 2009 Apr;88(4):367-71.

Olson JW, Shernoff AF, Tarlow JL, Colwell JA, Scheetz JP, Bingham SF. Dental endosseous implant assessments in a type 2 diabetic population: a prospective study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2000 Nov-Dec;15(6):811-8.

Peled M, Ardekian L, Tagger-Green N, Gutmacher Z, Machtei EE. Dental implants in patients with type 2 diabetes mellitus: a clinical study. *Implant Dent.* 2003;12(2):116-22.

Pradeep AR, Patnaik K, Nagpal K, Karvekar S, Ramamurthy BL, Naik SB, Suke D, Singh P, Raju A. Efficacy of locally-delivered 1% metformin gel in the treatment of intrabony defects in patients with chronic periodontitis: a randomized, controlled clinical trial. *J Investig Clin Dent*. 2016 Aug;7(3):239-45.

Pradeep AR, Rao NS, Naik SB, Kumari M. Efficacy of varying concentrations of subgingivally delivered metformin in the treatment of chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol*. 2013 Feb;84(2):212-20.

Quirynen M, De Soete M, van Steenberghe D. Infectious risks for oral implants: a review of the literature. *Clin Oral Implants Res*. 2002 Feb;13(1):1-19.

Renvert S, Quirynen M. Risk indicators for peri-implantitis. A narrative review. *Clin Oral Implants Res*. 2015 Sep;26 Suppl 11:15-44.

Scheller H, Urgell JP, Kultje C, Klineberg I, Goldberg PV, Stevenson-Moore P, Alonso JM, Schaller M, Corria RM, Engquist B, Toreskog S, Kastenbaum F, Smith R. A 5-year multicenter study on implant-supported single crown restorations. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1998 Mar-Apr;13(2):212-8.

Schlegel KA, Prechtel C, Möst T, Seidl C, Lutz R, von Wilmsowky C. Osseointegration of SLActive implants in diabetic pigs. *Clin Oral Implants Res*. 2013 Feb;24(2):128-34.

Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010 Jan;87(1):4-14.

Shyng YC, Devlin H, Ou KL. Bone formation around immediately placed oral implants in diabetic rats. *Int J Prosthodont*. 2006 Sep-Oct;19(5):513-4.

Siqueira JT, Cavalher-Machado SC, Arana-Chavez VE, Sannomiya P. Bone formation around titanium implants in the rat tibia: role of insulin. *Implant Dent*. 2003;12(3):242-51.

Sonnenschein SK, Meyle J. Local inflammatory reactions in patients with diabetes and periodontitis. *Periodontol 2000*. 2015 Oct;69(1):221-54.

Takeshita F, Murai K, Iyama S, Ayukawa Y, Suetsugu T. Uncontrolled diabetes hinders bone formation around titanium implants in rat tibiae. A light and fluorescence microscopy, and image processing study. *J Periodontol*. 1998 Mar;69(3):314-20.

Tawil G, Younan R, Azar P, Sleilati G. Conventional and advanced implant treatment in the type II diabetic patient: surgical protocol and long-term clinical results. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2008 Jul-Aug;23(4):744-52.

Tolosa MJ, Chuguransky SR, Sedlinsky C, Schurman L, McCarthy AD, Molinuevo MS, Turkyilmaz I. One-year clinical outcome of dental implants placed in patients with type 2 diabetes mellitus: a case series. *Implant Dent*. 2010 Aug;19(4):323-9.

Turkyilmaz I. One-year clinical outcome of dental implants placed in patients with type

2 diabetes mellitus: a case series. *Implant Dent.* 2010 Aug;19(4):323-9.

von Wilmsky C, Stockmann P, Harsch I, Amann K, Metzler P, Lutz R, Moest T, Neukam FW, Schlegel KA. Diabetes mellitus negatively affects peri-implant bone formation in the diabetic domestic pig. *J Clin Periodontol.* 2011 Aug;38(8):771-9.

Wang TF, Jen IA, Chou C, Lei YP. Effects of periodontal therapy on metabolic control in patients with type 2 diabetes mellitus and periodontal disease: a meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2014 Dec;93(28):e292.

Wang TF, Jen IA, Chou C, Lei YP. Effects of periodontal therapy on metabolic control in patients with type 2 diabetes mellitus and periodontal disease: a meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2014 Dec;93(28):e292.

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 2004 May;27(5):1047-53

[www.idf.org/diabetesatlas](http://www.idf.org/diabetesatlas), acesso em 01 de novembro de 2016.

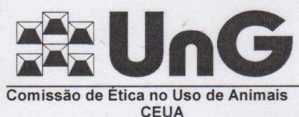
Xu JL, Meng HX, He L, Wang XE, Zhang L. The Effects of Initial Periodontal Therapy on the Serum Receptor Activator of Nuclear Factor- $\kappa$ B Ligand/Osteoprotegerin System in Patients With Tpe 2 Diabetes Mellitus and Periodontitis. *J Periodontol.* 2016 Mar;87(3):303-11.

Zhen D, Chen Y, Tang X. Metformin reverses the deleterious effects of high glucose on osteoblast function. *J Diabetes Complications.* 2010 Sep-Oct;24(5):334-44.

Zhou JY, Xu B, Li L. A New Role for an Old Drug: Metformin Targets MicroRNAs in Treating Diabetes and Cancer. *Drug Dev Res.* 2015 Sep;76(6):263-9.

Zupnik J, Kim SW, Ravens D, Karimbux N, Guze K. Factors associated with dental mplant survival: a 4-year retrospective analysis. *J Periodontol.* 2011 Oct;82(10):1390-5.

## ANEXO



Guarulhos, 10 de Fevereiro de 2014.

Exmo(a). Sr(a).  
Profa Poliana Mendes Duarte

Referência: **Aprovação de Projeto**

**Título** - "Impacto do diabetes melito tipo 2 e do tratamento com metformina no reparo ósseo e no tecido ósseo ao redor de implantes osseointegráveis: estudo em ratos"

**PROTOCOLO Nº 007/13**

**Comissão De Ética No Uso De Animais Da Universidade Guarulhos – Ceua** analisou o Plano de ensino de sua autoria - "Impacto do diabetes melito tipo 2 e do tratamento com metformina no reparo ósseo e no tecido ósseo ao redor de implantes osseointegráveis: estudo em ratos", e no uso das competências, considerou o Plano de ensino acima **aprovado**.

Prof. Dr. Fabio Futema  
Comissão De Ética No Uso De Animais da  
Universidade Guarulhos – CEUA  
Coordenador

## INFORMATIVO

A metformina é uma medicação utilizada em larga escala no Brasil e em todo o mundo atualmente. É a droga de primeira escolha para tratamento da diabetes tipo 2 e também é utilizada para tratamento de outros processos patológicos como: ovário policístico; hirsutismo; como coadjuvante no tratamento de alguns cânceres; para redução do peso corporal e, mais recentemente, anti-idade. Algumas pesquisas têm demonstrado que essa substância possui efeito no metabolismo de todo organismo, incluindo o tecido ósseo e consequentemente na osseointegração de implantes dentais. Baseado nisso, realizamos esse estudo que teve o objetivo de avaliar o efeito da metformina sobre o tecido ósseo peri-implantar em condições de hiperglicemia e não hiperglicemia. Os resultados demonstraram que essa medicação afeta negativamente o tecido ósseo em condições de não hiperglicemia, que a hiperglicemia altera negativamente a osseointegração e que a metformina usada nos estágios tardios do reparo ósseo ao redor dos implantes promove benefícios discretos, apenas em nível molecular.