



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



THALLYS RODRIGUES FÉLIX

**AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO EM
FILHOTES GERADOS EM AMBIENTE
HIPERGLICÊMICO**

UBERLÂNDIA

2019

THALLYS RODRIGUES FÉLIX

**AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO EM
FILHOTES GERADOS EM AMBIENTE
HIPERGLICÊMICO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado a Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de Cirurgião-dentista.

Orientadora: Profa. Dra. Karen Renata Nakamura Hiraki

UBERLÂNDIA

2019



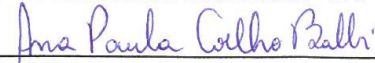
SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
 MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
 TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

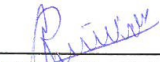
ATA DA COMISSÃO JULGADORA DA DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DO (A) DISCENTE **Thallys Rodrigues Félix** DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA.

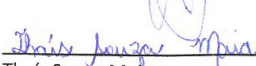
No dia **30 de maio de 2019**, reuniu-se a Comissão Julgadora aprovada pelo Colegiado de Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para o julgamento do Trabalho de Conclusão de Curso apresentado pelo(a) aluno(a) **Thallys Rodrigues Félix**, COM O TÍTULO: **"AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO EM FILHOTES GERADOS EM AMBIENTE HIPERGLICÊMICO"**. O julgamento do trabalho foi realizado em sessão pública compreendendo a exposição, seguida de arguição pelos examinadores. Encerrada a arguição, cada examinador, em sessão secreta, exarou o seu parecer. A Comissão Julgadora, após análise do Trabalho, verificou que o mesmo se encontra em condições de ser incorporado ao banco de Trabalhos de Conclusão de Curso desta Faculdade. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas da Graduação, legislação e regulamentação da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos e lavrada a presente ata, que após lida e achada conforme, foi assinada pela Banca Examinadora.

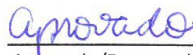
Uberlândia, 30 de maio de 2019.

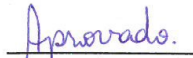

 Profª. Drª. Karen Renata Nakamura Hiraki
 Universidade Federal de Uberlândia – UFU



 Profª. Drª. Ana Paula Coelho Balbi
 Universidade Federal de Uberlândia – UFU

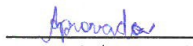

 Prof. Dr. Roberto Bernardino Júnior
 Universidade Federal de Uberlândia – UFU


 Thais Souza Maia
 Aluno(a) de doutorado – PPGO/UFU


 Aprovado/Reprovado


 Aprovado/Reprovado


 Aprovado/Reprovado


 Aprovado/Reprovado

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, **Cláudia Arantes Rodrigues Félix e Mário Félix Júnior**, por nunca medirem esforços e empenhos para que eu pudesse realizar os meus sonhos e poder alcançar meus objetivos. Agradeço também pelo amor incondicional, paciência, conselhos e por serem os melhores exemplos que alguém poderia ter. Dedico essa conquista totalmente a vocês, como forma de agradecimento por serem as pessoas mais incríveis que tenho na minha vida.

À minha orientadora **Prof. Dra. Karen Renata Nakamura Hiraki** pela paciência, orientação e ensinamentos durante esses 5 anos, sendo não só um exemplo profissional, mas se tornando uma amiga e uma referência a ser seguida, me ensinando os valores da ética, respeito e sabedoria. Agradeço da forma mais sincera pelas conversas e conselhos, os quais me moldaram e me fizeram um ser humano melhor.

Ao **Prof. Dr. Luiz Borges Bispo da Silva** pela valiosa ajuda na realização da análise estatística e à **Prof. Dra. Ana Paula Coelho Balbi** pelo suporte no manejo dos animais e indução do DM, contribuindo de maneira significativa para o meu aprendizado e conclusão deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Alberto da Silva Moraes** pela importante contribuição para a análise das imagens, me passando todos os conhecimentos necessários para o manuseio do *software ImageJ*.

A todos os **Docentes, Técnicos e demais Funcionários da FOUFU**, por me proporcionarem o aprendizado e condições necessárias para completar a minha formação profissional.

A todos os **Pacientes** que tive a oportunidade de atender, os quais se dispuseram de forma voluntária, possibilitando meu aprimoramento prático na profissão.

À minha amiga e parceira **Valquíria**, que esteve comigo desde a preparação para o ingresso na universidade, e, depois de estarmos aqui dentro, se tornou uma irmã, sempre cuidando de mim e tornando mais fácil todos os desafios da

graduação, e também aos demais amigos **Guilherme, Pedro, Júlia, Yasmin, Mariana e Suzana**, pelo companheirismo, amizade sincera e momentos incríveis durante os anos e graduação. Vocês se tornaram minha família, e vou carregá-los para sempre em meu coração.

Aos demais **amigos e alunos da 80ª Turma do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia**, pelos bons momentos ao compartilhar essa experiência juntos durante os anos da graduação.

À **FAPEMIG** pela ajuda financeira imprescindível para a realização desse projeto (Bolsa de iniciação científica FAPEMIG2017BIO048).

RESUMO

Diabetes mellitus (DM) é uma desordem metabólica caracterizada pela hiperglicemia sanguínea e causada por alterações na secreção e/ou na ação da insulina. Estudos recentes mostraram que a hiperglicemia materna durante a gestação causa alterações no desenvolvimento do tecido ósseo da prole. No entanto, existem poucos relatos na literatura sobre as implicações que essas alterações provocam no tecido ósseo no período pós-natal. O objetivo deste trabalho foi avaliar o processo de reparo ósseo em animais de 60 dias de idade que foram gerados em ambiente hiperglicêmico. Filhotes machos de ratas Wistar foram divididos em três grupos: salina (filhotes de mães normoglicêmicas), aloxana-diabéticos (filhotes de mães diabéticas) e aloxana-não diabéticos (filhotes de mães submetidas à indução do DM, mas que não ficaram diabéticas). Após 60 dias de vida, os filhotes foram pesados e submetidos à cirurgia de confecção de defeito ósseo nos fêmures esquerdos. O processo de reparo ósseo foi avaliado no período experimental de 7 dias pós-cirurgia. Os cortes histológicos dos fêmures coletados foram corados em Hematoxilina e Eosina para análise qualitativa e Tricrômico de Mallory para análise histomorfométrica. A análise estatística dos dados foi realizada com software GraphPad Prism Version 5.00 e o nível de significância adotado foi $p < 0,05$. Os resultados mostraram que os filhotes de mães diabéticas apresentaram menor peso corporal quando comparado aos filhotes de mães saudáveis. A análise qualitativa dos cortes histológicos revelou que a área da lesão óssea se encontrava preenchida por trabéculas ósseas neoformadas, porém no grupo aloxana-diabéticos essas trabéculas eram menos espessas. Além disso, nesse grupo foram encontrados focos de moderado infiltrado inflamatório mononuclear que não foram observados nos demais grupos. A análise histomorfométrica comprovou que os filhotes de mães diabéticas apresentaram menor porcentagem de matriz óssea neoformada na área da lesão quando comparados aos outros grupos. Estes dados permitem concluir que a hiperglicemia materna durante a gestação afeta o desenvolvimento físico e o processo de reparo ósseo pós-natal comprovando que as repercussões dessa hiperglicemia não se limitam apenas ao período gestacional.

Palavras Chaves: Reparo ósseo. Diabetes mellitus. Hiperglicemia gestacional.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disorder characterized by blood hyperglycemia and caused by changes in insulin secretion and/or action. Recent studies have shown that maternal hyperglycemia during pregnancy causes changes in the development of the bony tissue of the offspring. However, there are few reports in the literature about the implications of these changes on bone tissue in the postnatal period. The objective of this study was to evaluate the bone repair process in 60-day-old animals that were generated in a hyperglycemic environment. Male pups of Wistar rats were divided into three groups: saline (pups of normoglycemic mothers), alloxan-diabetics (pups of diabetic mothers) and alloxan non-diabetic (pups of mothers who underwent DM induction but did not become diabetic). After 60 days of life, the pups were weighed and submitted to bone defect surgery in the left femurs. The bone repair process was evaluated in the 7-day postoperative period. The histological sections of the collected femurs were stained in Hematoxylin and Eosin for qualitative analysis and Mallory's trichrome for histomorphometric analysis. Statistical analysis of the data was performed using GraphPad Prism Version 5.00 software and the significance level adopted was $p < 0.05$. The results showed that the pups of diabetic mothers presented lower body weight when compared to the pups of healthy mothers. The qualitative analysis of the histological sections revealed that the area of the bone lesion was filled by neoformed bone trabeculae, but in the alloxan-diabetic group these trabeculae were less thick. In addition, in this group, focus of moderate mononuclear inflammatory infiltrate was found that were not observed in the other groups. The histomorphometric analysis proved that the pups of diabetic mothers had a lower percentage of neoformed bone matrix in the lesion area when compared to the other groups. These data allow concluding that maternal hyperglycemia during pregnancy affects the physical development and the process of postnatal bone repair proving that the repercussions of this hyperglycemia are not limited only to the gestational period.

Key words: Bone repair. Diabetes mellitus. Gestational hyperglycemia.

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
1 INTRODUÇÃO	9
1.1 TECIDO ÓSSEO	9
1.2 <i>DIABETES MELLITUS (DM)</i>	10
1.3 HIPERGLICEMIA MATERNA.....	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 METODOLOGIA	15
3.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	15
3.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	16
3.3 ANÁLISE DO REPARO ÓSSEO	17
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	18
4 RESULTADOS.....	19
5 DISCUSSÃO	22
6 CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
ANEXO 1.....	34

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tecido ósseo

O tecido ósseo caracteriza-se por ser um tecido conjuntivo de suporte com matriz extracelular mineralizada. Dividida em duas porções, orgânica e inorgânica, a matriz é composta em 67% pela porção inorgânica, que é representada pelos cristais de hidroxiapatita, e 33% pela porção orgânica. A porção orgânica é estruturada de forma que o colágeno do tipo I representa 95% dessa composição e outros 5% por proteínas não colágenas (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2017; KATCHBURIAN, ARANA, 2012; NANJI, 2013).

Os osteoblastos são as células responsáveis pela síntese das porções orgânica e inorgânica da matriz óssea. Adjacentes aos osteoblastos existem células osteogênicas ou osteoprogenitoras que se diferenciam em osteoblastos quando necessário. À medida que os osteoblastos sintetizam a matriz óssea, algumas dessas células ficam aprisionadas na matriz, sendo então denominadas osteócitos. Estas células são responsáveis pela manutenção da matriz óssea e constituem uma rede celular que permite a comunicação entre elas, e destas com os osteoblastos da superfície. Os osteoclastos são células gigantes multinucleadas sendo responsáveis pela reabsorção óssea (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2017; KATCHBURIAN, ARANA, 2012; NANJI, 2013).

Apesar da rigidez e aparente inatividade, o tecido ósseo é muito dinâmico apresentando um processo combinado de formação e reabsorção, denominado de remodelação óssea. Este processo é contínuo e fisiológico permitindo que o tecido ósseo se renove constantemente, responda aos estímulos externos e também sofra reparação (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2017; KATCHBURIAN, ARANA, 2012; NANJI, 2013).

O tecido ósseo geralmente sofre reparo por regeneração (KHAN *et al.*, 2005). O reparo ósseo é um processo complexo com eventos celulares e extracelulares, sendo influenciado por vários fatores tais como tipo de osso (cortical ou trabecular), local e severidade da lesão, presença de infecção, fixação durante o reparo, idade, estado de saúde geral e nutricional dos indivíduos. O reparo bem-sucedido é aquele

com reconstituição da continuidade e função tecidual original (DAVIES, 2000; NANCI, 2013).

O periósteo, endósteo, vasos na cortical óssea, medula óssea e tecidos moles circundantes sofrem danos estruturais quando o tecido ósseo é lesionado, promovendo um sangramento nas margens desses tecidos, o que implicará na formação de um coágulo sanguíneo na região da lesão (GARTNER, HIAT, 2007). Logo após, essa região será invadida por macrófagos, os quais removerão os restos celulares e da matriz óssea. Concomitante a esse processo, os macrófagos liberam quimiocinas e citocinas que irão atrair células mesenquimais, que posteriormente irão se diferenciar em osteoblastos (LIEBERMAN, DALUISKI, EINHORN, 2002).

1.2 *Diabetes Mellitus (DM)*

DM é uma desordem metabólica que se caracteriza pela hiperglicemia decorrente de alterações na secreção e/ou na ação da insulina no sangue. Essas alterações ocorrem devido à destruição, mediada por uma reação autoimune e também causas idopáticas, das células beta-pancreáticas secretoras de insulina, e também pela resistência periférica a esse hormônio (GONG; MUZUMDAR, 2012; MOSELEY, 2012; YAN; LI, 2013).

Esse grupo de doenças pode ser dividido em Tipo 1, Tipo 2, gestacional e outros tipos específicos. O tipo 1 consiste em uma doença autoimune que causa a destruição das células β das ilhotas pancreáticas ocasionando uma deficiência total de insulina. É responsável por 5-10% dos casos de DM sendo o tipo mais comum em pacientes jovens (ADA, 2019).

O tipo 2 caracteriza-se pela resistência dos tecidos à insulina e pela deficiência relativa de sua secreção pelo pâncreas (ADA, 2019). É o tipo mais prevalente e é responsável por cerca de 90% dos casos, tendo como causa fatores relacionados à obesidade, sedentarismo e má alimentação (YAN; LI, 2013). O comprometimento da secreção e os defeitos na ação da insulina frequentemente coexistem no mesmo paciente, e muitas vezes não está claro qual anormalidade, se sozinha, é a principal causa da hiperglicemia (ADA, 2019).

Em longo prazo, a hiperglicemia causada pelo DM está associada a danos como disfunção e insuficiência de diferentes órgãos, especialmente os olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (ROSHOLT, HEGARTY, 1981). Existem danos também no reparo de feridas em pacientes diabéticos, decorrente da alteração nas células progenitoras endoteliais e interferência no processo de neovascularização (KESWANI *et al.*, 2004). Um estudo com camundongos diabéticos mostrou uma redução do fluxo sanguíneo e da densidade microvascular na medula óssea (OIKAWA *et al.*, 2010).

Todas essas alterações estão diretamente relacionadas com os processos de inflamação do organismo, os quais também são alterados nos pacientes com DM. Estudos mostraram que os principais mediadores pró-inflamatórios apresentam-se em maior concentração nas reações inflamatórias desses pacientes, o que implica na dificuldade de regulação e conseqüente atraso nos processos de reparo tecidual e formação de novos tecidos no organismo (ANDRIANKAJA *et al.*, 2012; GRAVES; KAYAL, 2008; NIKOLAJCZYK *et al.*, 2011; PACIOS, 2012).

Pacientes com DM tem redução na formação e na quantidade de tecido ósseo, e a hiperglicemia sanguínea ocasiona um aumento da reabsorção óssea e das chances de osteopenia em fases mais tardias da vida. Nesses pacientes o tempo de reparo de fraturas e o tempo de hospitalização são aumentados (KRAKAUER *et al.*, 1995; RETZEPI; DONOS, 2010). Esse desequilíbrio entre os processos de formação e reabsorção óssea podem ser explicados pelas alterações que o DM causa nas vias de sinalização molecular que regulam esse tecido. Conseqüentemente, pode provocar alterações na conformação da matriz óssea e quadros de osteoporose devido a danos na mineralização do tecido ósseo (KHAN, FRASER, 2015; KEMINK *et al.*, 2000; SALLER, 2008).

A regeneração óssea depende diretamente da formação de novos vasos sanguíneos na lesão. Em organismos onde a glicemia não é regulada, como no caso do DM, ocorre uma alteração na quantidade dos fatores de crescimento de estimulam o processo de angiogênese, contribuindo assim para o atraso dos processos de reparo tecidual (DIB *et al.*, 1992; YAN *et al.*, 2014).

A hiperglicemia causa alterações no mecanismo de síntese do colágeno, podendo alterar sua estrutura, o que pode reduzir a resistência óssea. Os baixos

níveis de insulina associados ao DM tipo 1 e a progressão do DM tipo 2 podem causar reduções na densidade mineral óssea, o que também acontece nos casos de obesidade, prevalente no DM tipo 2 (SCHWARTZ, 2003; TUOMINEN *et al.*, 1999). Essas alterações afetam principalmente os ossos longos, alterando sua funcionalidade biomecânica, os tornando facilmente susceptíveis a fraturas (REDDY *et al.*, 2001).

No organismo de uma pessoa diabética ocorre o aumento da glicação proteica não enzimática, levando a formação de proteínas modificadas, as quais acumulam nos tecidos, acarretando diversas doenças como, por exemplo, a periodontite (FOLLAK; KLOTING; MERK, 2005; SANTANA *et al.*, 2003). Essas mudanças também interferem nos processos de comunicação celular, prolongando a expressão de citocinas e quimiocinas, causando desequilíbrio na função de células tais como os osteoblastos e osteoclastos (LOBMANN *et al.*, 2002; WETZLER *et al.*, 2000).

1.3 Hiperglicemia materna

Durante a gestação o feto produz hormônios e fatores de crescimento que irão proporcionar o seu desenvolvimento. Esses processos são mediados pela genética do próprio feto, mas seu sucesso depende de fatores ambientais, como por exemplo, a nutrição materna. Todos os nutrientes necessários para um correto desenvolvimento do embrião são fornecidos pelo organismo da mãe através da placenta, sendo assim, qualquer alteração na saúde materna tem influência sobre a formação do feto. O quadro de hiperglicemia materna também influencia o desenvolvimento pós-uterino do feto, visto que logo após o nascimento se inicia o período de amamentação, crucial para um correto desenvolvimento e saúde do recém-nascido. Assim, a amamentação feita por mães diabéticas pode alterar o desenvolvimento físico do recém-nascido, devido a alterações na composição nutricional e na quantidade na produção de leite (VAN ASSCHE; HOLEMANS; AERTS, 2001; VILLARINO *et al.*, 2005).

Desse modo, a hiperglicemia materna provocada pelo quadro de DM pode comprometer o desenvolvimento do recém-nascido durante e após a gestação, o qual, mesmo não sendo diabético, sofre consequências diretas do ambiente

hiperglicêmico no qual foi gerado (CRICHTON, SILVERTON, 1985; ORNOY, 2012). Dentre as principais alterações relatadas na literatura estão a macrossomia, má-formação congênita, imaturidade pulmonar, icterícia, hipoglicemia, hipocalcemia, comprometimento do desenvolvimento de vários órgãos e tecidos (AERTS, VAN ASSCHE, 2001; FETITA *et al.* 2006; MOORE & PERSAUD, 2013; PERSAUD, 2007). Estudos mostraram que fetos expostos à hiperglicemia materna provocada pelo quadro de DM tipo 2 tem redução da sensibilidade à insulina, diminuindo a sua ação e aumentando, assim, as chances de desenvolver o quadro de DM na vida adulta (AERTS, VAN ASSCHE, 2006; FETITA *et al.*, 2006). Na área odontológica, as alterações mais relatadas causadas pela DM são a hipoplasia de esmalte e distúrbio na cronologia da erupção dentária (SILVA-SOUSA, PERES, FOSS, 2003; VILLARINO *et al.*, 2005).

A formação adequada do tecido ósseo depende diretamente da estabilidade fisiológica do ambiente em que o feto foi gerado e de um correto suprimento nutricional. O desequilíbrio desses fatores pode resultar em danos diretos à fisiologia desse tecido, comprometendo sua capacidade de reparo, pois altera o *programming* das células ósseas e seus precursores, e, em casos mais graves, pode evoluir para quadros de osteoporose (LANHAM *et al.*, 2011; MOORE & PERSAUD, 2013).

Existem poucos relatos na literatura sobre os efeitos do DM no desenvolvimento ósseo pós-natal. Assim, este trabalho avaliou as repercussões que o ambiente hiperglicêmico provoca no tecido ósseo e que podem causar alterações no processo de reparo ósseo pós-natal.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo avaliar as repercussões do ambiente hiperglicêmico no processo de reparo ósseo pós-natal.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o processo de reparo ósseo, por meio da porcentagem de matriz óssea neoformada, em defeitos confeccionados nos fêmures dos animais com 60 dias de idade no período experimental de 7 dias após a cirurgia.
- Comparar os aspectos histológicos da área de reparo ósseo dos filhotes de mães diabéticas e saudáveis.
- Avaliar a consequência da hiperglicemia materna no desenvolvimento do corpo dos filhotes por meio do peso aos 60 dias de idade.

3 METODOLOGIA

3.1 Caracterização da amostra

Este projeto foi submetido e aprovado pelo CEUA (Comissão de Ética na Utilização de Animais) da UFU sob protocolo 027/16 (Anexo 1).

Foram utilizados para acasalamento 15 ratos *Wistar* machos de 300g e 30 fêmeas de 180g, separados em caixas por sexo, com água e ração *ad libitum*. No final da tarde de cada dia, as fêmeas foram colocadas nas caixas dos machos na proporção de 2 a 3 fêmeas para cada macho. No início da manhã do dia seguinte realizou-se o esfregaço vaginal de cada rata para verificação de uma possível gravidez pela presença de espermatozóides no esfregaço.

A indução do DM nos animais diabéticos foi feita com a administração de Aloxana (100mg/kg) (*Sigma-Aldrich*) por via intraperitoneal diluída em solução salina 0,9% no primeiro dia da provável gestação. Essas ratas receberam injeções de insulina NPH (*Humulin N®*, *Lilly*) com dosagem de uma unidade subcutânea, em dias alternados até o final do período de desmame (21 dias), visando manter uma hiperglicemia, mas diminuindo os riscos de morte dos animais. Esses animais ficaram de jejum por cerca de 24 horas para a indução do DM. Após 2 dias da indução, coletou-se uma gota de sangue da cauda de cada rata para verificação da glicemia, realizada com o auxílio de um glicosímetro. Foram consideradas diabéticas as fêmeas grávidas que tiverem glicemia maior ou igual a 150 mg/dL. Uma vez grávidas, as fêmeas foram postas em caixas individuais e seus filhotes divididos nos seguintes grupos:

- **Grupo 1 – Salina (Controle) (n=5):** filhotes machos de 60 dias de mães que receberam injeção intraperitoneal de solução salina 0,9% no primeiro dia da gestação;
- **Grupo 2 – Aloxana-diabético (n=5):** filhotes machos de 60 dias de mães diabéticas que foram induzidas com a Aloxana (100 mg/kg) (*Sigma-Aldrich*);
- **Grupo 3 – Aloxana-não diabético (n=7):** filhotes machos de 60 dias de mães que receberam injeção intraperitoneal de Aloxana (100 mg/kg) (*Sigma-Aldrich*), mas não ficaram diabéticas.

3.2 Procedimento cirúrgico

Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para confecção do defeito ósseo ao completarem 60 dias de vida. Os filhotes foram pesados e submetidos à anestesia por via intraperitoneal, utilizando 0,07ml/100g do relaxante muscular cloridrato de xilazina 2%, e 0,1ml/100g do anestésico e analgésico cloridrato de quetamina 10%. Após tricotomia da região coxofemoral esquerda, foi realizada a antissepsia da região com solução de álcool iodado 0,5%. A área operatória foi limitada com campo cirúrgico fenestrado de tecido esterilizado, adaptado para o procedimento.

O acesso cirúrgico ao fêmur esquerdo foi obtido por meio de uma incisão contínua longitudinal com 2 cm de extensão. A musculatura foi divulsionada até a exposição do perióstio, que foi incisado e descolado ao longo da área óssea a ser exposta. O fêmur foi delimitado em três porções (superior, mediana e inferior), com o objetivo de padronizar a área a ser manipulada, sendo a região mediana, o local de eleição para a realização do experimento (Figura 1).

Figura 1. Procedimento cirúrgico com confecção de defeito ósseo no fêmur esquerdo do rato.

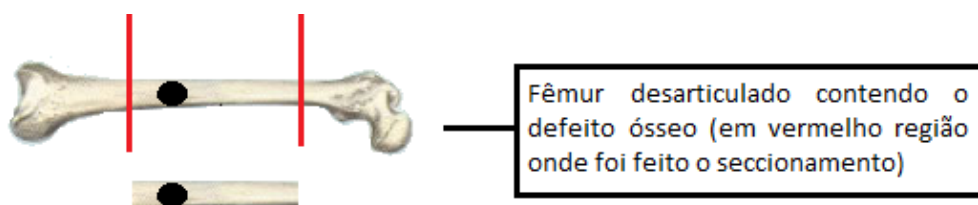


Nesta região foi realizado um defeito ósseo com uma broca esférica nº 3 sob irrigação abundante com solução fisiológica estéril de cloreto de sódio a 0,9%. A referência de profundidade da perfuração foi o rompimento da cortical óssea até a medula óssea. A sutura foi realizada por planos com fio cirúrgico monofilamento *nylon* 4-0. Foi administrado 2 mg/kg do peso corporal de morfina por via intramuscular 1 hora após a recuperação da cirurgia e durante 4 dias.

3.3 Análise do reparo ósseo

Os animais foram submetidos à eutanásia 7 dias após a cirurgia, por meio de aprofundamento anestésico e deslocamento cervical, seguindo os princípios da Declaração dos Direitos dos Animais. Foi realizada uma incisão longitudinal acompanhando a cicatriz cutânea existente, e os fêmures foram removidos por desarticulação. Os fêmures esquerdos (contém o defeito ósseo) foram seccionados utilizando brocas número 8 em alta rotação (Figura 1), sob irrigação com soro fisiológico, e posteriormente fixados em solução de formaldeído 4% em Tampão Fosfato 0,1M por 48 horas. Em seguida, os fragmentos ósseos foram desmineralizados em solução de ácido fórmico a 10%, e, então, processados para inclusão em parafina pela técnica convencional para a análise histológica e histomorfométrica.

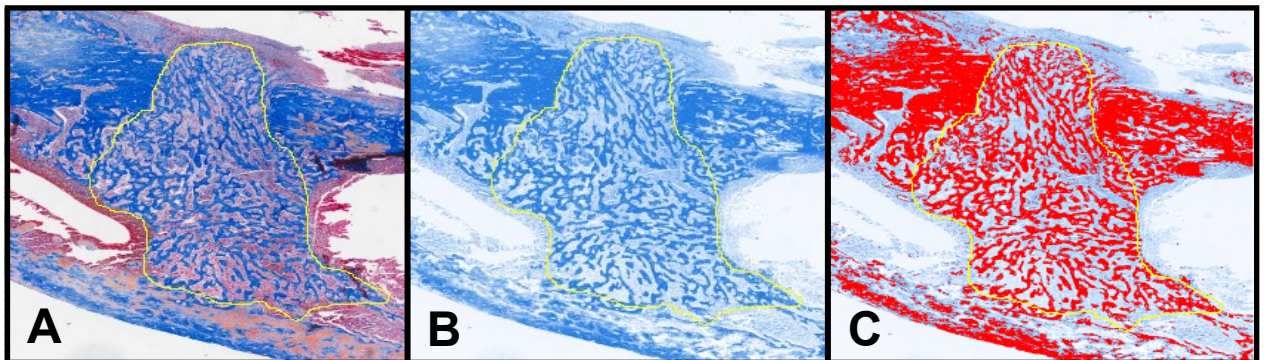
Figura 2. Esquema demonstrando o seccionamento do fêmur e região de confecção do defeito ósseo.



Foram realizados cortes histológicos de cada amostra, os quais foram corados com Hematoxilina e Eosina para análise histológica qualitativa e Tricrômico

de Mallory para análise histomorfométrica. Foram avaliados os aspectos morfológicos da área do reparo ósseo na área da lesão, considerando o infiltrado inflamatório, a organização e a espessura das trabéculas ósseas neoformadas, o tipo de tecido ósseo e a regeneração completa da cortical óssea. A análise histomorfométrica foi realizada com o *software ImageJ*, por meio do recurso de decomposição e análise de cor, onde foi possível isolar apenas a matriz óssea neoformada e medir a proporção (em porcentagem) que esta ocupava na área da lesão.

Figura 3. Imagens de cortes histológicos corados em Tricrômico de Mallory para análise histomorfométrica da área da lesão óssea com o uso do *software ImageJ* (A: Corte histológico com área da lesão delimitada pela linha amarela; B: Aplicação do recurso de decomposição de cor; C: Análise da porcentagem de matriz óssea neoformada).



3.7 Análise Estatística

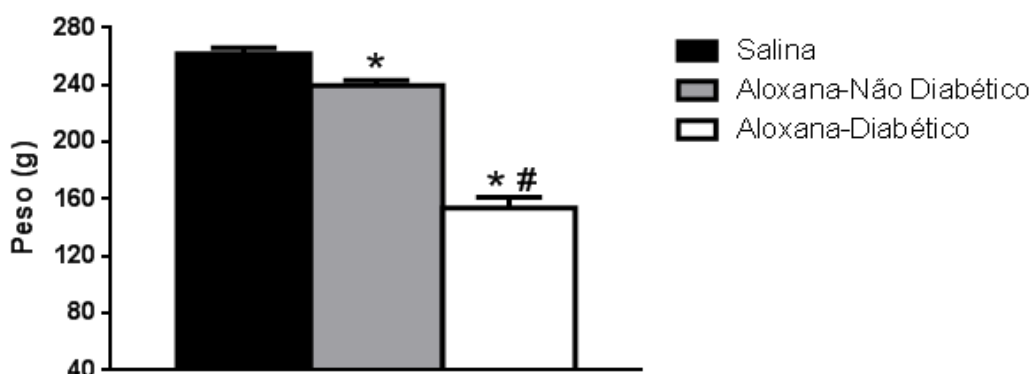
Foi utilizado o *software GraphPad Prism Version 5.00* empregando o teste de Kolmogorov-Sminorv para identificar se os dados apresentavam ou não distribuição normal (Gaussiana). Dados com distribuição normal foram submetidos ao teste Anova e para os que não apresentaram, utilizou-se o teste de Tukey. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

As ratas consideradas diabéticas apresentaram glicemia de 122 a 537 mg/dl enquanto as ratas consideradas saudáveis apresentaram glicemias entre 96 e 99 mg/dl. Após a indução do DM, as ratas diabéticas apresentaram sinais clínicos característicos do quadro como poliúria, polidipsia, polifagia e perda de peso. Tais sinais não foram quantificados tendo sido apenas observados clinicamente.

O peso corporal dos animais filhos de mães diabéticas (grupo aloxana-diabético) variou entre 141 a 182 gramas, enquanto o peso dos animais filhos das mães que não ficaram diabéticas (grupos aloxana-não diabético) variou entre 228 a 258 gramas, e, dos animais filhos de mães saudáveis (grupos salina), entre 252 a 272 gramas. A análise estatística dos pesos corporais mostrou que o grupo aloxana-diabético apresentou menor peso quando comparado com os filhotes dos grupos salina e aloxana-não diabético. Observou-se que o peso dos animais do grupo aloxana-não diabético também foi menor quando comparado com os do grupo salina (Figura 4).

Figura 4. Peso dos filhotes de ratas controles (tratadas com solução salina – NaCl 0,9%), tratadas com aloxana, mas que não ficaram diabéticas e tratadas com aloxana, mas que ficaram diabéticas, com 60 dias de idade.

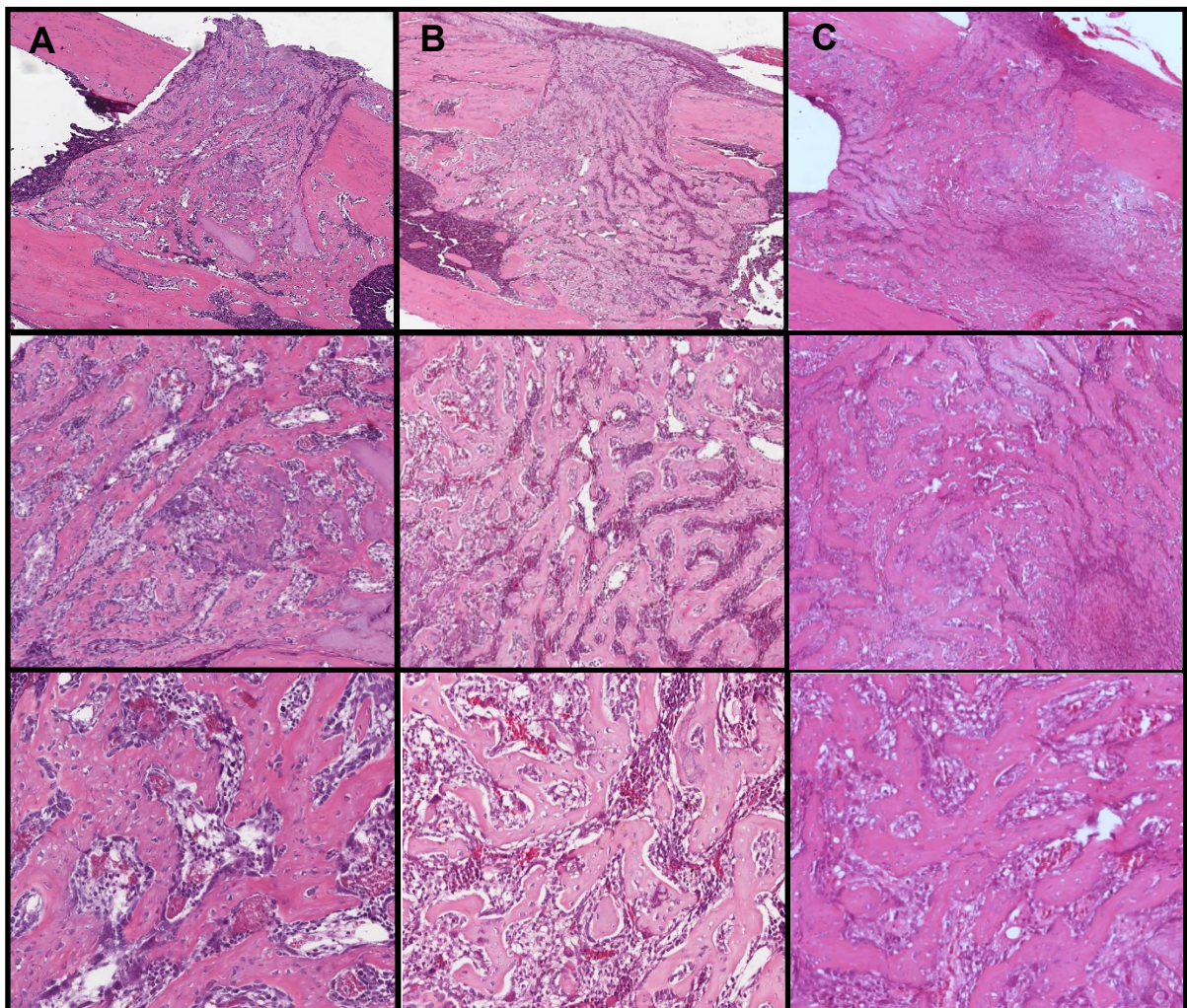


* Os dados representam a média \pm EPM de 5-7 animais. *P<0,05 vs. Salina; #P<0,05 vs. Aloxana-Não Diabético (ANOVA/Tukey).

A análise qualitativa dos cortes histológicos corados em HE revelou que no grupo salina (controle) todas as amostras apresentavam a área da lesão óssea com

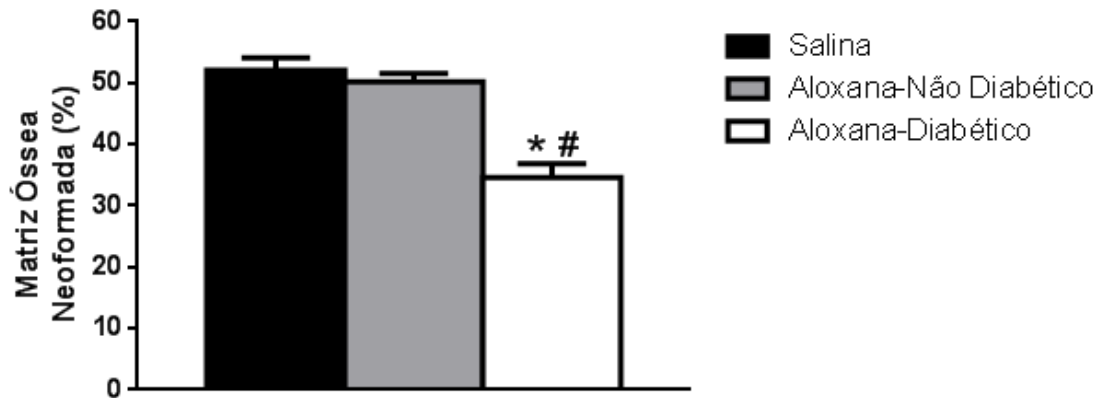
intensa proliferação de células indiferenciadas e osteoprogenitoras, e totalmente preenchida por trabéculas ósseas neoformadas ocupando o canal medular. Essas trabéculas eram espessas e constituídas por tecido ósseo primário. Osteoblastos e osteócitos apresentavam aspectos usuais e poucos osteoclastos foram observados na área. Foram encontradas poucas células inflamatórias mononucleares na área da lesão. O mesmo aspecto histológico foi observado nas amostras do grupo aloxana-não diabético. Já no grupo aloxana-diabético a área da lesão também se encontrava preenchida por células indiferenciadas e osteoprogenitoras, além de trabéculas ósseas neoformadas, porém estas eram mais finas. Em 1 (um) caso desse grupo a área da lesão óssea estava preenchida apenas por células sem a presença de trabéculas ósseas. Foram encontradas áreas focais de moderado infiltrado inflamatório mononuclear em todas amostras do grupo aloxana-diabético (Figura 5).

Figura 5. Cortes longitudinais de fêmur corados com hematoxilina e eosina para análise qualitativa, respectivamente, nos aumentos 2x, 5x e 10x (no *software ImageScope*) (A: Grupo salina; B: Grupo aloxana-diabético; C: Grupo aloxana-não diabético).



A análise histomorfométrica da área da lesão óssea mostrou que a porcentagem de matriz óssea neoformada foi menor nos filhotes de mães diabéticas (grupo aloxana-diabético) quando comparados com os outros grupos. Entre os filhotes dos grupos salina (controle) e aloxana-não diabético não houve diferença estatisticamente significativa na porcentagem de matriz óssea neoformada (Figura 6).

Figura 6. Matriz óssea neoformada (%) em fêmures de filhotes de ratas controles (tratadas com solução salina – NaCl 0,9%), tratadas com aloxana, mas que não ficaram diabéticas e tratadas com aloxana, mas que ficaram diabéticas, 7 dias após lesão óssea.



* Os dados representam a média±EPM de 5-7 animais. *P<0,05 vs. Salina; #P<0,05 vs. Aloxana-Não Diabético (ANOVA/Tukey).

5 DISCUSSÃO

Diversos estudos mostram que o quadro de DM interfere diretamente nos processos inflamatórios do organismo, afetando assim os mecanismos que envolvem o reparo tecidual. O tecido ósseo, por estar em constante remodelação, é diretamente influenciado por esse quadro, apresentando severas alterações na sua fisiologia e capacidade de reparo (KRAKAUER *et al.*, 1995; RETZEPI; DONOS, 2010). Fetos gerados por mães que apresentaram o quadro de DM durante a gestação também sofrem com essas consequências, uma vez que as altas concentrações de glicose no sangue materno atravessam a placenta, constituindo assim o sangue que irá nutrir as células fetais em desenvolvimento (PERSAUD, 2007). O presente trabalho avaliou o efeito do ambiente hiperglicêmico no reparo ósseo pós-natal e no desenvolvimento da prole avaliando o peso dos filhotes com 60 dias de vida.

Neste estudo o DM foi induzido experimentalmente pela administração da droga aloxana, a qual é comumente utilizada devido à sua fácil acessibilidade e eficácia. É uma droga que causa a destruição parcial das células β -pancreáticas através da quebra do DNA, implicando na diminuição da secreção de insulina criando um modelo de estudo insulino dependente que apresenta um quadro clínico compatível com o DM tipo 1. Esses animais apresentam alterações sistêmicas semelhantes às observadas em humanos como perda de peso, poliúria, polidipsia e polifagia (IGHODARO; ADEOSUN; AKINLOYE, 2017; ZHOU, 2017).

Apesar de existirem diversos estudos relatados na literatura, que utilizam a aloxana, o seu protocolo de administração não é unificado. As vias podem variar em intraperitoneal, intravenosa ou subcutânea, sendo a intraperitoneal a mais utilizada e a intravenosa a mais efetiva, e as doses mais utilizadas variam de 90 a 200 mg/kg (FEDERIUK, 2004; IGHODARO; ADEOSUN; AKINLOYE, 2017).

Neste estudo, a indução do DM nos animais foi feita com a administração de aloxana 100mg/kg (*Sigma-Aldrich*) por via intraperitoneal diluída em solução salina 0,9% no primeiro dia de gestação. As ratas receberam injeções de insulina NPH (*Humulin N®*, *Lilly*) com dosagem de uma unidade subcutânea, em dias alternados até o final do período de desmame (21 dias), visando manter o quadro de

hiperglicemia, mas diminuindo os riscos de morte dos animais. O modelo de indução do DM foi efetivo, porém ocorreram alta taxa de insucesso e mortalidade nos primeiros dias após a indução. O alto índice de insucesso do quadro hiperglicêmico causado pela aloxana, quando aplicado em doses abaixo de 150 mg/kg, é comumente relatado na literatura (IGHODARO; ADEOSUN; AKINLOYE, 2017; KATSUMATA; KATSUMATA; OZAWA, 1993; SZKUDELSKI, 2001). Após 3 dias de indução, o quadro se apresentou estável, não ocorrendo mortes dos animais devido à hiperglicemia.

No entanto, durante o procedimento cirúrgico para confecção da lesão óssea, houve uma grande taxa de mortalidade dos animais. Não é possível estabelecer uma causa direta para estas mortes, provavelmente estão relacionadas com a reação dos animais aos anestésicos utilizados. A alta taxa de insucesso da indução do DM proporcionou um grande número de ratas que não ficaram diabéticas, conseqüentemente, houve uma maior prole desses animais. Conseqüentemente, o grupo dos animais filhos dessas ratas (grupo aloxana – não diabético), apresentou maior n que os demais grupos.

Neste estudo foi observado que os filhotes de mães diabéticas apresentaram peso menor no momento do nascimento quando comparados com os filhotes de mães saudáveis (dado não apresentado). No organismo da mãe, a redução na secreção de insulina provocada pelo quadro de DM impede que a glicose seja processada. Sendo essa a principal fonte de energia do organismo, essa alteração provoca um consumo excessivo de carboidratos e lipídios, na tentativa de suprir essa perda energética, o que provoca uma acentuada perda de peso do indivíduo (GUYTON, 2008). Além dessas alterações, existem diversos processos fisiológicos da mãe que sofrem conseqüências do quadro de DM. Essas alterações ocasionam um ambiente uterino deficiente, o qual não oferece as condições básicas para que as células do feto se diferenciem e se desenvolvam da maneira esperada. A correta diferenciação das células musculares, dos adipócitos e das células pancreáticas é fundamental para um correto desenvolvimento do feto. Uma vez que esse processo não ocorre de forma correta, é possível notar graves problemas no desenvolvimento físico da prole, implicando em um menor peso ao nascimento (VAN ASSCHE; HOLEMANS; AERTS, 2001).

Os animais foram pesados aos 60 dias de vida antes da confecção do defeito ósseo, e os respectivos valores foram comparados a fim de verificar a diferença de desenvolvimento físico entre os animais provenientes de mães saudáveis e mães diabéticas. Os filhotes de mães diabéticas apresentaram peso corporal significativamente menor quando comparados com os filhotes de mães saudáveis, evidenciando que a hiperglicemia materna comprometeu o desenvolvimento corpóreo pós-natal dos animais (GORRAY; BASKIN; FUJIMOTO, 1986; RADENKOVIĆ; STOJANOVIĆ; PROSTRAN, 2016). Existem poucos estudos que analisaram as alterações de desenvolvimento por meio do peso de proles de ratas diabéticas induzidas com aloxana. Sharma *et al.* (2009) também relataram peso menor ao nascimento dos filhotes de mães diabéticas em um modelo de estudo semelhante ao deste trabalho. Em modelos de estudo onde o quadro de DM foi induzido com estreptozotocina, os filhotes não apresentaram diferença de peso ao nascimento. Porém, os mesmos acabaram apresentando menor peso nos períodos de 7 dias e 12 semanas pós-natal (BLONDEAU *et al.*, 2011; DONG *et al.*, 2017).

Entre os animais considerados filhotes saudáveis (não diabéticos) também houve diferença de peso corporal entre os grupos. Os filhotes das ratas que receberam a droga aloxana, mas não ficaram diabéticas, apresentaram peso menor que os filhotes das ratas do grupo controle. Este fato não era esperado, uma vez que apesar de terem recebido a droga aloxana, esses animais apresentaram condições fisiológicas iguais a de um animal saudável. No entanto, os dados apresentados neste estudo comprovam que a aloxana, embora não tenha induzido o quadro de DM nestes animais, causou alguma alteração que se manifestou em menor peso corporal da prole.

Em humanos, os bebês nascidos de mães diabéticas apresentam aumento de tamanho quando comparado com filhos de mães saudáveis, condição denominada macrossomia fetal. Essa condição está relacionada com o fato da hiperglicemia materna provocar uma estimulação anormal das células pancreáticas do feto, tendo como consequência um aumento na secreção de insulina. Essa estimulação anormal é temporária e provoca desorganização e insuficiência das células pancreáticas em desenvolvimento, o que irá resultar em um futuro quadro de hipoinsulinemia no feto. (VAN ASSCHE; HOLEMANS; AERTS, 2001). O tempo de

gestação das ratas Wistar é consideravelmente menor que a dos humanos e, talvez, este fato poderia justificar a ocorrência de macrossomia mais rara nos animais.

Um estudo realizado com modelo animal observou que filhotes de ratas diabéticas apresentaram alterações na densidade mineral óssea e conteúdo mineral dos ossos do esqueleto, e alterações de desenvolvimento em ossos como a tíbia e o fêmur. As análises foram realizadas com 4, 8 e 12 semanas de vida e os resultados mostraram que a hiperglicemia materna tem efeitos em curto e longo prazos na formação e no desenvolvimento ósseo dos fetos, sugerindo que estes apresentam um padrão de crescimento alterado que acarretaria em ossos mais longos que o normal, os quais são mais susceptíveis a fraturas (ZHAO; WEILER, 2010).

Bond *et al.* (2005) realizaram um estudo com modelo animal semelhante ao deste trabalho, mostrando que os animais filhos de mães diabéticas apresentam um distúrbio na reabsorção renal de cálcio e magnésio. Essa alteração tem início na vida intrauterina e acarreta consequências durante a vida pós-natal, interferindo na composição, formação e fisiologia do tecido ósseo. As análises foram realizadas com 8, 12 e 16 semanas e mostraram uma diminuição do volume ósseo trabecular e consequente aumento de osso cortical, ocasionando uma diminuição do diâmetro interno dos ossos analisados. Esses achados sugerem que, em longo prazo, esses ossos são mais susceptíveis a fraturas quando comparado com ossos de filhos gerados em ambiente normoglicêmico.

Outro estudo, este realizado com crianças geradas por mães portadoras de DM tipo 1, também relatou o padrão de ossos mais longos que o normal. Os resultados mostraram que as crianças possuíam maior peso ao nascimento que os valores considerados normais, além de apresentarem alterações morfológicas nos ossos caracterizadas por ossos mais longos que o normal e menor densidade mineral óssea trabecular do esqueleto (MUGHAL *et al.*, 2010).

Villarino *et al.* (2005) realizaram um estudo para analisar as consequências da amamentação de mães diabéticas no desenvolvimento ósseo mandibular e na erupção dentária de seus filhotes. O quadro de DM foi induzido nas ratas mães no dia do parto, para analisar as consequências apenas do período de amamentação (21 dias). Os animais que foram amamentados por mães diabéticas apresentaram significativa diminuição no crescimento mandibular, aumento dos espaços

medulares e atrasos significativos na erupção dentária. O estudo também mostrou que os animais amamentados pelas mães diabéticas apresentaram menor ganho de peso durante o período da amamentação. Outro estudo realizado com ratas diabéticas induzidas com aloxana mostrou alterações morfológicas no órgão do esmalte nos filhos de mães diabéticas, o que sugere que o quadro de DM pode causar alterações estruturais no esmalte dos dentes da prole (SILVA-SOUSA; PERES; FOSS, 2003).

Neste estudo para a análise do reparo ósseo foram confeccionados defeitos nos fêmures aos 60 dias de vida dos animais. Os defeitos ósseos foram confeccionados com broca esférica de 1,6 mm de diâmetro, o que de acordo com a literatura, está dentro dos parâmetros ideais para análise da neoformação óssea no período de 7 dias, sem que haja interferências do tamanho da lesão nos processos de reparo (FOLLAK *et al.*, 2003).

As alterações no tecido ósseo da prole causadas pelo DM durante a gestação e relatadas na literatura respaldam os resultados encontrados neste estudo. Foi observado que os filhotes de mães diabéticas apresentaram uma porcentagem de matriz óssea neoformada significativamente menor na área da lesão quando comparados com os animais filhos de mães saudáveis. Isso comprova que as alterações no tecido ósseo provocadas pelo DM durante a gestação e amamentação repercutem na prole no período pós-natal em longo prazo. Tais consequências provavelmente envolvem alterações no *programming* das células ósseas e seus precursores (LANHAM *et al.*, 2011; MOORE & PERSAUD, 2013). Não foi encontrado na literatura nenhum trabalho semelhante que avaliou o processo de reparo ósseo pós-natal em animais gerados em ambiente hiperglicêmico.

6 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho demonstraram que a hiperglicemia materna durante a gestação e amamentação afeta o desenvolvimento físico dos fetos, implicando em menor peso corporal, além de comprometer o processo de reparo ósseo pós-natal, reduzindo a porcentagem de matriz óssea neoformada na área da lesão. Esses achados comprovam que as repercussões do quadro de DM para a prole não se limitam apenas ao período gestacional ocasionando alterações ósseas em longo prazo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRIANKAJA, O. M. et al. Gene expression dynamics during diabetic periodontitis. **Journal of dental research**, v. 91, n. 12, p. 1160-1165, 2012.

AERTS, L.; VAN ASSCHE, F. A. Animal evidence for the transgenerational development of diabetes mellitus. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 38, n. 5-6, p. 894-903, 2006.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION *et al.* Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes care**, v. 37, n. Supplement 1, p. S81-S90, 2019.

BLONDEAU, B. et al. Exposure in utero to maternal diabetes leads to glucose intolerance and high blood pressure with no major effects on lipid metabolism. **Diabetes & metabolism**, v. 37, n. 3, p. 245-251, 2011.

BOND, H. *et al.* Diabetes in rat pregnancy alters renal calcium and magnesium reabsorption and bone formation in adult offspring. **Diabetologia**, v. 48, n. 7, p. 1393-1400, 2005.

CRICHTON, M. A.; SILVERTON, L. I. The sweeter side of life: A review of diabetes and its effects on pregnancy. **Midwifery**, v. 1, n. 4, p. 195-206, 1985.

DAVIES, J. E.; HOSSEINI, M. M. **Histodynamics of endosseous wound healing**. Bone engineering, v. 1, p. 1, 2000.

DIB, S.A.; RUSSO, E.M.K.; CHACRA, A.R. **Tratado de endocrinologia clínica**. Ed. Rocca, São Paulo, 1992.

DONG, H. P. et al. The study on the effect of hyperglycemia on offspring fatty tissue metabolism during pregnancy. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 21, p. 3658-3664, 2017.

FEDERIUK, I. F. et al. Induction of type-1 diabetes mellitus in laboratory rats by use of alloxan: route of administration, pitfalls, and insulin treatment. **Comparative medicine**, v. 54, n. 3, p. 252-257, 2004.

FETITA, L. *et al.* Consequences of fetal exposure to maternal diabetes in offspring. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 10, p. 3718-3724, 2006.

FOLLAK, N.; KLOTING, L.; WOLF, E. *et al.* Delayed remodeling in the early period of fracture healing in spontaneously diabetic BB/OK rats depending on the diabetic metabolic state. **Histol Histopathol** 19:473-486, 2003

FOLLAK, N.; KLÖTING, I.; MERK, H. Influence of diabetic metabolic state on fracture healing in spontaneously diabetic rats. **Diabetes/metabolism research and reviews**, v. 21, n. 3, p. 288-296, 2005.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Tratado de Histologia em cores**. 3 ed. Elsevier: Rio de Janeiro. p. 133-159. 2007.

GONG, Z.; MUZUMDAR, R. Pancreatic function, type 2 diabetes, and metabolism in aging. **International journal of endocrinology**, v. 2012, 2012.

GRAVES, D.; KAYAL, R. Diabetic complications and dysregulated innate immunity. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, v. 13, p. 1227, 2008.

GORRAY, K. C.; BASKIN, D. G.; FUJIMOTO, W. Y. Physiological and morphological changes in islet B cells following treatment of the guinea pig with alloxan. **Diabetes research (Edinburgh, Scotland)**, v. 3, n. 4, p. 187-191, 1986.

GUYTON, A. C. **Fisiologia Humana**. 6^aed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 481p. 2008.

IGHODARO, O. M.; ADEOSUN, A. M.; AKINLOYE, O. A. Alloxan-induced diabetes, a common model for evaluating the glycemic-control potential of therapeutic compounds and plants extracts in experimental studies. **Medicina**, v. 53, n. 6, p. 365-374, 2017.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica: texto-atlas**. 13^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 528 p. 2017.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e Embriologia Oral**. 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 388 p.

KATSUMATA, K.; KATSUMATA, Y.; OZAWA, T. Potentiating effects of combined usage of three sulfonylurea drugs on the occurrence of alloxan diabetes in rats. **Hormone and metabolic research**, v. 25, n. 02, p. 125-126, 1993.

KEMINK, S. A. G. *et al.* Osteopenia in insulin-dependent diabetes mellitus; **prevalence and aspects of pathophysiology**. Journal of endocrinological investigation, v. 23, n. 5, p. 295-303, 2000.

KESWANI, S. G. *et al.* Adenoviral mediated gene transfer of PDGF-B enhances wound healing in type I and type II diabetic wounds. **Wound repair and regeneration**, v. 12, n. 5, p. 497-504, 2004.

KHAN, S. N. *et al.* The biology of bone grafting. **JAAOS-Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 13, n. 1, p. 77-86, 2005.

KHAN, T. S.; FRASER, L. Type 1 diabetes and osteoporosis: from molecular pathways to bone phenotype. **Journal of osteoporosis**, v. 2015, 2015.

KRAKAUER, J. C. *et al.* Bone loss and bone turnover in diabetes. **Diabetes**, v. 44, n. 7, p. 775-782, 1995.

LANHAM, S. A. *et al.* Animal models of maternal nutrition and altered offspring bone structure—bone development across the lifecourse. **Eur Cell Mater**, v. 22, p. 321-332, 2011.

LIEBERMAN, J. R.; DALUISKI, A.; EINHORN, T. A. The role of growth factors in the repair of bone: biology and clinical applications. **JBJS**, v. 84, n. 6, p. 1032-1044, 2002.

LOBMANN, R. *et al.* Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients. **Diabetologia**, v. 45, n. 7, p. 1011-1016, 2002.

MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. **Embriologia Clínica**. 9^a ed. Elsevier. 2013. 560p.

MOSELEY, K. Type 2 diabetes and bone fractures. **Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity**, v. 19, n. 2, p. 128, 2012.

MUGHAL, M. Z. *et al.* Body composition and bone status of children born to mothers with type 1 diabetes mellitus. **Archives of disease in childhood**, v. 95, n. 4, p. 281-285, 2010.

NANCI, A. **Ten Cate Histologia Oral – desenvolvimento, estrutura e função**. 8^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 400p. 2013. ISBN-10:85-3526452-3.

NIKOLAJCZYK, B. S. *et al.* State of the union between metabolism and the immune system in type 2 diabetes. **Genes and immunity**, v. 12, n. 4, p. 239, 2011.

OIKAWA, A. *et al.* Diabetes mellitus induces bone marrow microangiopathy. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 30, n. 3, p. 498-508, 2010.

ORNOY, A. Biomarkers of maternal diabetes and its complication in pregnancy. **Reproductive Toxicology**, v. 34, n. 2, p. 174-179, 2012.

PACIOS, S. *et al.* Diabetes aggravates periodontitis by limiting repair through enhanced inflammation. **The FASEB Journal**, v. 26, n. 4, p. 1423-1430, 2012.

PERSAUD, O. DD. Maternal diabetes and the consequences for her offspring. **J Devel Disabilities**, v. 13, n. 1, p. 101-133, 2007.

RADENKOVIĆ, M.; STOJANOVIĆ, M.; PROSTRAN, M. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 78, p. 13-31, 2016.

REDDY, G. K. *et al.* The biomechanical integrity of bone in experimental diabetes. **Diabetes research and clinical practice**, v. 54, n. 1, p. 1-8, 2001.

RETZEPI, M.; DONOS, N. The effect of diabetes mellitus on osseous healing. **Clinical oral implants research**, v. 21, n. 7, p. 673-681, 2010.

ROSHOLT, M. N.; HEGARTY, P. V. J. Mineralization of different bones in streptozotocin-diabetic rats: study on the concentration of eight minerals. **The American journal of clinical nutrition**, v. 34, n. 9, p. 1680-1685, 1981.

SALLER, A. *et al.* Diabetes and osteoporosis. **Aging clinical and experimental research**, v. 20, n. 4, p. 280-289, 2008.

SANTANA, R. B. *et al.* A role for advanced glycation end products in diminished bone healing in type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 52, n. 6, p. 1502-1510, 2003.

SCHWARTZ, A. V. Diabetes mellitus: does it affect bone?. **Calcified tissue international**, v. 73, n. 6, p. 515-519, 2003.

SHARMA, R.; KAUR, J.; MAHMOOD, A. Effect of maternal diabetes on postnatal development of brush border enzymes and transport functions in rat intestine. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 49, n. 1, p. 8-15, 2009.

SILVA-SOUSA, Y. T. C.; PERES, L. C.; FOSS, M. C. Are there structural alterations in the enamel organ of offspring of rats with alloxan-induced diabetes mellitus?. **Brazilian dental journal**, v. 14, n. 3, p. 162-167, 2003.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological research**, v. 50, n. 6, p. 537-546, 2001.

TUOMINEN, Jussi T. *et al.* Bone mineral density in patients with type 1 and type 2 diabetes. **Diabetes care**, v. 22, n. 7, p. 1196-1200, 1999.

VAN ASSCHE, F. A.; HOLEMANS, K.; AERTS, L. Long-term consequences for offspring of diabetes during pregnancy. **British medical bulletin**, v. 60, n. 1, p. 173-182, 2001.

VILLARINO, M. E. *et al.* Alterations of tooth eruption and growth in pups suckling from diabetic dams. **Pediatric research**, v. 58, n. 4, p. 695, 2005.

WETZLER, C. *et al.* Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 115, n. 2, p. 245-253, 2000.

YAN, W.; LI, X.. Impact of diabetes and its treatments on skeletal diseases. **Frontiers of medicine**, v. 7, n. 1, p. 81-90, 2013.

YAN, H.; SU, G. Expression and significance of HIF-1 α and VEGF in rats with diabetic retinopathy. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 7, n. 3, p. 237-240, 2014.

ZHAO, J.; WEILER, H. A. Long-term effects of gestational diabetes on offspring health are more pronounced in skeletal growth than body composition and glucose tolerance. **British journal of nutrition**, v. 104, n. 11, p. 1641-1649, 2010.

ZHOU, W. *et al.* Diabetogenic agent alloxan is a proteasome inhibitor. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 488, n. 2, p. 400-406, 2017.

ANEXO 1



Universidade Federal de Uberlândia

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Rua Ceará, S/N - Bloco ZT, sala 113 – CEP 38405-315
Campus Umuarama – Uberlândia/MG – Ramal (VoIP) 3423;
e-mail: caua@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 170/16 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 027/16

Projeto Pesquisa: "Avaliação do desenvolvimento e reparo ósseo em filhotes de ratos Wistar diabéticos"

Pesquisador Responsável: Karen Renata Nakamura Hiraki

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

Situação: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 05 de setembro de 2016.

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU