



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**



**STEPHANY YASMINE ANDRADE DE PAULA**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE RUNX-2 DURANTE  
O REPARO ÓSSEO DE RATOS DIABÉTICOS**

**UBERLÂNDIA**

**2017**

**STEPHANY YASMINE ANDRADE DE PAULA**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE RUNX-2 DURANTE  
O REPARO ÓSSEO DE RATOS DIABÉTICOS**

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.

Orientador (a): Profa. Dra. Karen Renata  
Nakamura Hiraki

UBERLÂNDIA

2017



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 **Stephany Yasmine Andrade de Paula** DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA.

No dia **09 de novembro de 2017**, 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) **Stephany Yasmine Andrade de Paula**, COM O TÍTULO: - **"AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE RUNX-2 DURANTE O REPARO ÓSSEO DE RATOS DIABÉTICOS"**. 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 encontra-se 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, 09 de novembro de 2017

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

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

Prof. Dr. Marco Aurélio Martins Rodrigues  
Universidade Federal de Uberlândia – UFU

Tais Alves dos Reis  
Aluno(a) de doutorado – PPGO/UFU

Aprovado/Reprovado

Aprovado/Reprovado

Aprovado/Reprovado

Aprovado/Reprovado

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente à **Deus** por ter me dado forças, e por sempre ter me mostrado o melhor caminho. Por ter iluminado todas minhas escolhas dentro da graduação, e por ter me dado a oportunidade de ter completado essa jornada com saúde, fé e ao lado das pessoas que amo.

Agradeço aos meus pais **Jeferson Luís de Paula e Patrícia Iolanda de Andrade Paula** por todo amor incondicional, e por não terem medido esforços para que eu pudesse sempre estudar, me motivando a sempre ser uma pessoa melhor. Agradeço também a toda minha família por todo amor, carinho e compreensão aos momentos de ausência.

A minha orientadora **Profa. Dra. Karen Renata Nakamura Hiraki**, por ser exemplo na docência. Uma mulher de princípios, ética e dedicação à profissão, foi e é exemplo para mim tanto na vida profissional como na vida pessoal. Agradeço toda paciência ao longo desses 5 anos que trabalhamos juntas, e por ter sido muito mais que apenas minha orientadora, ter sido amiga e conselheira.

Às minhas irmãs **Isabelly Cristine e Giovanna Camila**, por terem me proporcionado muitas risadas e momentos de descontração. Por terem me apoiado, mas muito mais que isso, por terem me cobrado as vezes que eu precisava estudar.

Ao professor **Prof. Dr. Luiz Borges Bispo da Silva** pela valiosa ajuda na análise estatística e por ter contribuído de maneira significativa na conclusão deste trabalho.

A todos os docentes da FOUFU dos quais eu tive a oportunidade de aprender um pouco mais sobre a odontologia. Que vocês nunca desistam dessa profissão linda de levar conhecimento a outras pessoas. Obrigada por todos os ensinamentos.

A todos que contribuíram no desenvolvimento dessa pesquisa, alunos, professores e técnicos de laboratórios.

A todos os **pacientes** que tive a oportunidade de atender e dar sempre o meu melhor durante a graduação. Agradeço a confiança de tentar fazer sempre o melhor para vocês.

Aos melhores amigos que a faculdade poderia me dar, **Nilson Neto e Raquel Santos**. Exemplo de amizade, companheirismo, vocês dois sempre me motivaram a seguir em frente

mesmo quando o caminho não era fácil. Estiveram comigo nos momentos de alegria, mas muito mais isso, estiveram comigo nos momentos difíceis, me incentivando a não desistir.

Aos melhores amigos que fiz antes da faculdade **Patrycia Martins, Lagila Martins, Fellipe Gurgel, Igor Kil, Daniela Cristina, Gabriela Gaião e Matheus Damata**, por terem entendido que vida acadêmica as vezes nos impede de estar sempre perto, mas que fizeram de todos os momentos juntos uma comemoração.

Ao meu companheiro, mas mais que isso grande amigo **Igor Leão** por ficar ao meu lado, e nunca ter descreditado de mim. Obrigada por ser amor, e ser moradia para o meu coração.

Aos grupos de pesquisa e projetos de extensões dos quais eu tive a oportunidade de participar. O **NEPRO** - Grupo de Ensino e Pesquisa em Reabilitação Oral onde tive a oportunidade de participar do centrinho de prótese sobre implante. A **LASFC** – Liga de saúde da família e comunidade, onde tive a oportunidade de trabalhar com uma equipe multiprofissional linda, que me proporcionou diversas experiências.

Aos demais amigos da **77a Turma de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia**, por toda paciência durante esses cinco anos de graduação, e por termos compartilhado tantos momentos de alegrias juntos.

A estes dedico meu trabalho, pois sem a ajuda, confiança e compreensão de todos, este sonho não estaria se concretizando.

# **AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE RUNX-2 DURANTE O REPARO ÓSSEO DE RATOS DIABÉTICOS.**

**STEPHANY YASMINE ANDRADE DE PAULA <sup>1</sup>**

## **RESUMO**

Diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica que se caracteriza pelo quadro crônico de hiperglicemia. Estudos recentes demonstraram alterações no tecido ósseo em pacientes diabéticos. Entretanto, poucos buscaram avaliar as vias de regulação celular importantes durante o reparo ósseo nesses pacientes. Este trabalho teve como objetivo avaliar a expressão imuno-histoquímica do fator de transcrição Runx-2 na área de reparo ósseo em ratos diabéticos, a fim de verificar se o DM influencia na diferenciação de osteoblastos. Neste estudo foram utilizados 12 ratos machos *Rattus norvegicus*, da linhagem Wistar, clinicamente saudáveis com peso entre 200 e 250g. Os animais foram separados em 2 grupos experimentais: Controle e Diabéticos. DM foi induzido com a droga estreptozotocina (STZ) que promove a destruição das células beta-pancreáticas. Após 30 dias, os animais foram 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 submetidos à análise imuno-histoquímica que foi realizada com a técnica indireta à base de polímero. Foram atribuídos *scores* quanto à intensidade de marcação e à proporção de células marcadas na área do reparo ósseo. A expressão de Runx-2 foi observada nas células osteoprogenitoras e em osteoblastos e osteócitos em ambos os grupos. Porém, após análise estatística, os resultados comprovaram menor expressão de Runx-2 na área do reparo ósseo nos animais diabéticos. Este achado permite concluir que o DM altera a diferenciação de osteoblastos durante o reparo ósseo, causando retardo deste processo.

**Palavras Chaves:** Reparo ósseo, Diabetes mellitus, Runx2, Cbfa-1

<sup>1</sup> Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Faculdade de odontologia da UFU (FOUFU) Uberlândia-MG E-mail para correspondência: Stephany.yasmine@hotmail.com

# EVALUATION OF IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF RUNX-2 DURING THE BONE REPAIR IN DIABETIC RATS.

STEPHANY YASMINE ANDRADE DE PAULA <sup>1</sup>

## ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disease characterized by chronic hyperglycemia. Recent studies have shown changes in bone tissue in diabetic patients. However, few of them evaluate important cell regulatory pathways during bone repair in these patients. This study aimed to evaluate the immunohistochemical expression of the Runx-2 transcription factor in bone repair area in diabetic rats, in order to verify if DM influences osteoblast differentiation. In this study, we used 12 male Wistar rats, *Rattus norvegicus*, clinically healthy weighing between 200 and 250g. The animals were separated into 2 experimental groups: Control and Diabetic. DM was induced with the drug streptozotocin (STZ) which promotes the destruction of beta-pancreatic cells. After 30 days, the animals were submitted to bone defect surgery in the left femurs. The bone repair process was evaluated in the experimental period of 7 days post-surgery. The histological sections of the collected femurs were submitted to immunohistochemical analysis that was performed with the indirect polymer-based technique. Scores were assigned for the labeling intensity and the proportion of labeled cells in the bone repair area. Runx-2 expression was observed in osteoprogenitor cells, osteoblasts and osteocytes in both groups. However, after statistical analysis, the results showed lower expression of Runx-2 in the area of bone repair in diabetic animals. This finding allows to conclude that DM alters the differentiation of osteoblasts during bone repair, causing delay of this process.

**Key words:** Bone repair, Diabetes mellitus, Runx2, Cbfa-1

<sup>1</sup> Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Faculdade de odontologia da UFU (FOUFU) Uberlândia-MG E-mail para correspondência: Stephany.yasmine@hotmail.com

## LISTA DE ABREVIATURAS

|        |                                             |
|--------|---------------------------------------------|
| %      | Porcentagem                                 |
| ≤      | menor ou igual                              |
| °C     | Grau Celsius                                |
| bFGF   | Fator de crescimento de fibroblasto básico  |
| Cbfa1  | Fator de ligação central alfa1              |
| cm     | Centímetro                                  |
| CEUA   | Comissão de Ética na Utilização de Animais  |
| COBEA  | Colégio Brasileiro de Experimentação Animal |
| DAB    | Diaminobenzidina                            |
| DM     | Diabetes mellitus                           |
| EDTA   | Ácido etilenodiaminotetracético             |
| g      | Grama                                       |
| IL     | Interleucina                                |
| mg/dl  | Miligrama por decilitro                     |
| mg/kg  | Miligrama por quilograma                    |
| ml     | Mililitro                                   |
| ml/kg  | Mililitro por quilograma                    |
| Mm     | Milímetro                                   |
| PTH    | Hormônio Paratireoidiano                    |
| RANKL  | Ligante do receptor ativador nuclear NFκB   |
| Runx-2 | Fator de transcrição relacionado à Runt-2   |
| STZ    | Estreptozotocina                            |
| TNF    | Fator de Necrose Tumoral                    |
| UI     | Unidade Internacional                       |
| VEGF   | Fator de crescimento endotelial vascular    |
| μm     | Micrômetro                                  |

## SUMÁRIO

|                                                |    |
|------------------------------------------------|----|
| RESUMO .....                                   | 6  |
| ABSTRACT .....                                 | 7  |
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....                      | 9  |
| 1.1 Diabetes Mellitus .....                    | 9  |
| 1.2 Reparo ósseo .....                         | 10 |
| 1.3 Fator de transcrição Runx-2 .....          | 12 |
| <b>2 OBJETIVOS</b> .....                       | 13 |
| 2.1 Objetivo Geral .....                       | 13 |
| 2.2 Objetivos Específicos .....                | 13 |
| <b>3 METODOLOGIA</b> .....                     | 14 |
| 3.1 Caracterização da amostra .....            | 14 |
| 3.3 Procedimento cirúrgico .....               | 15 |
| 3.4 Obtenção dos espécimes para análise .....  | 16 |
| 3.5 Imuno-Histoquímica .....                   | 17 |
| 3.6 Análise da reação imuno-Histoquímica ..... | 17 |
| 3.7 Análise Estatística .....                  | 18 |
| <b>5 RESULTADOS</b> .....                      | 19 |
| <b>6 DISCUSSÃO</b> .....                       | 22 |
| <b>7 CONCLUSÃO</b> .....                       | 25 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....               | 26 |
| ANEXOS .....                                   | 32 |

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus (DM) corresponde a um grupo heterogêneo de doenças que se caracterizam pelo quadro de hiperglicemia decorrente de alterações na secreção e/ou na ação da insulina. Estima-se que cerca de 415 milhões de pessoas em todo o mundo sejam portadoras dessa doença. Em uma estimativa dos próximos 20 anos, esse número aumentará para 642 milhões de casos. No Brasil calcula-se que aproximadamente 13 milhões de pessoas sejam diabéticas (WILD et al., 2004; IDF, 2015).

Dentre as diversas formas de DM, a maioria dos casos são DM tipo 1 e DM tipo 2. Quando a síndrome é causada pela deficiência na secreção de insulina, esta é classificada como DM tipo 1 (DM1) e corresponde a cerca de 20% dos casos acometendo principalmente pacientes jovens. O mecanismo envolvido no desenvolvimento do DM1 inclui reações autoimunes, em que ocorre a destruição das células beta, nas ilhotas de Langerhans do pâncreas, que são responsáveis pela secreção de insulina (ATKINSON, MACLAREN, 1994). Já o DM tipo 2 (DM2) caracteriza-se pela combinação de resistência dos tecidos à ação da insulina com a redução de secreção das células beta das ilhotas pancreáticas. Representa cerca de 80% dos casos de DM e geralmente está relacionada à obesidade (ADA, 2004; GUYTON; HALL, 2002).

DM2 é provocado pela diminuição na resposta dos receptores de insulina à insulina presentes no tecido periférico, levando ao fenômeno de resistência à esse hormônio (IDF, 2015). Acredita-se que este fenômeno ocorra devido ao acúmulo de tecido adiposo central presente na maioria dos pacientes. Logo, costuma-se associar a DM2 à obesidade. Dentre as faixas etárias mais afetadas, existe uma prevalência em adultos e idosos. Hoje, apesar desse grupo etário ainda ser maioria, com a mudança no perfil de jovens que passaram a ter maus hábitos alimentares, associado ao sedentarismo, a incidência de DM2 tem aumentado nessa faixa etária (GABBAY M et al., 2003).

De acordo com Leite et al. 2013, dentre as complicações sistêmicas decorrentes do DM, as quatro principais são: retinopatia, neuropatia, nefropatia e complicações cardiovasculares (doença arterial coronariana, acidente vascular encefálico e doença vascular periférica). Além

disso, atualmente, a doença periodontal é destacada como a quinta complicação decorrente do DM, de ampla relevância para os profissionais da saúde.

No entanto, há evidências de que existe um aumento do risco de fraturas em pacientes diabéticos devido às alterações na remodelação óssea e na atividade das células que participam desse processo. Esses estudos são baseados em marcadores de formação de tecido ósseo que identificaram a presença reduzida de osteocalcina, além de alterações no hormônio paratireoidiano (PTH). A hiperglicemia leva a uma ligeira diminuição na ionização do cálcio, aumentando os níveis de PTH, interferindo assim, no processo de remodelação óssea, tendo em vista que promove a ativação de osteoclastos (ARDAWI et al., 2013; CLOWES et al., 2003; YAMAMOTO et al., 2012).

Assim, outros fatores como a saturação de gordura da medula óssea, glicosilação avançada, idade e alterações da microarquitetura também relacionam a atividade de células que atuam no processo de reparo com o risco de fratura em pacientes diabéticos. A hiperglicemia causada pela DM parece afetar a função de osteoblastos, osteoclastos, bem como de osteócitos, prejudicando sua função celular. Essa disfunção foi identificada por estudos que demonstraram a redução de marcadores bioquímicos que estimulam esse tipo de diferenciação, interferindo assim, no processo de remodelação óssea (RUBIN, 2015).

## **1.2 Reparo ósseo**

O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo capaz de se auto reparar, resultando na produção de um novo tecido exibindo as características morfológicas e funcionais normais. Esse processo de regeneração é resultado de interação entre células osteogênicas, citocinas, matriz condutora e um microambiente mecanicamente estável com um bom suprimento de sangue (GIANNOUDIS et al., 2007). O início do reparo ósseo ocorre com um processo inflamatório. A lesão tecidual desencadeia a liberação de citocinas (IL-1, IL-6, TNF) que atraem células que atuam no processo de inflamação pelo mecanismo de quimiotaxia (MANOLAGAS, 1995).

Nesse contexto, o reparo ósseo é definido como processo biológico em que a estrutura e a função do tecido lesado ou perdido são completamente restaurados (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). Trata-se de um processo dinâmico com eventos celulares e extracelulares, sendo influenciado por diversos fatores tais como tipo de osso, local e graus de

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 em que reabsorção e neoformação ocorrem para que o tecido ósseo neoformado retome as características morfológicas, biomecânicas e funcionais que possuíam antes da lesão, reconstituição da continuidade e função tecidual original (DAVIES; HOSSEINI, 2000; TEN CATE, 2013).

Estudos clínicos relataram atraso na consolidação das fraturas e aumento no tempo de reparo ósseo em pacientes diabéticos quando comparados com pacientes normoglicêmicos (LODER, 1988). Embora sejam conhecidos os efeitos do DM no tecido ósseo, o mecanismo exato não está bem esclarecido. Acredita-se que a hiperglicemia e os produtos finais de glicosilação avançada estejam relacionados com a inibição da função dos osteoblastos e redução da formação de matriz mineralizada *in vitro* (OGAWA et al., 2007).

Sabe-se que o DM altera o metabolismo ósseo, interferindo tanto na neoformação, quanto na reabsorção óssea, potencialmente dificultando e prolongando o processo de reparo ósseo (SHYNG et al., 2001; MISHIMA et al., 2002; LIU et al., 2001; HAMADA et al., 2007). Os mecanismos que envolvem essa disfunção são determinados por fatores adversos como redução da proliferação de condrócitos (OGASAWARA et al., 2008), expressão reduzida de osteopontina (OPN) e colágeno (OGASAWARA et al., 2008), elevação do estresse oxidativo (HAMADA et al., 2007) e redução da expressão de receptores envolvidos na processo de osteoclastogênese (AMORIM et al., 2008).

Modelos experimentais com ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ), mostrou que o DM pode causar alterações no tecido ósseo por meio de mecanismos que promovem redução dos fatores de crescimento, como o bFGF (fator de crescimento de fibroblasto básico). O retardo no reparo de tecido ósseo de animais diabéticos pode ser atribuído à baixa expressão desse fator nas regiões de fratura (KAWAGUCHI et al., 1994). Além disso, também ocorre alteração na expressão de genes responsáveis pela regulação da diferenciação dos osteoblastos na área de reparo de fratura, mostrando uma redução de Runx-2 em animais diabéticos quando comparado a animais saudáveis. Este resultado pode explicar a neoformação óssea limitada em diabéticos (LU et al., 2003).

### 1.3 Fator de transcrição Runx-2

Os osteoblastos são células cubóides pós-proliferativas que expressam a fosfatase alcalina e sintetizam as proteínas da matriz óssea, receptores de hormônio, citocinas e fatores de crescimento. A diferenciação celular dos osteoblastos segue o seguinte estágio: célula-tronco mesenquimal, células osteoprogenitoras, pré-osteoblastos, osteoblastos e osteócitos. Cerca de 10-20% dos osteoblastos são incorporados na matriz óssea neoformada, atingindo o último estágio de diferenciação da linhagem osteoblástica, os osteócitos. (AUBIN, 1998; LONG, 2001).

O fator de transcrição Runx-2 (*Runt-related Transcription Factor 2*), também conhecido como Cbfa-1 (*Core-binding factor alpha 1*), é necessário para que ocorra a diferenciação das células osteoprogenitoras. Este fator de transcrição interage com diversas proteínas resultando em regulação positiva ou negativa de acordo com seus genes-alvo. Durante a proliferação celular, Runx-2 regula a expressão de genes que codificam a osteocalcina, VEGF, RANKL e esclerostina (ERICKSEN, 2010).

Além de funcionar como um regulador na diferenciação dos osteoblastos em fase inicial, Runx-2 desempenha um papel importante na morfogênese do esqueleto, desenvolvimento dental, condrogênese e vasculogênese. Tem sido apontada a importância da presença desse fator na linhagem osteoprogenitora (VIMALRAJ et al., 2015).

Estudos com camundongos modificados geneticamente para não expressar Runx-2 mostraram ausência total de osteoblastos e, conseqüentemente, de tecido ósseo (DUCY et al., 1997; KOMORI et al., 1997).

A análise da expressão do fator de transcrição Runx2 na área do reparo ósseo em animais diabéticos permitirá verificar a influência da hiperglicemia na diferenciação de osteoblastos e suas repercussões. Vale ressaltar a importância de estudar as vias reguladoras da osteogênese, que podem contribuir para o desenvolvimento de terapias relacionadas à promoção do reparo ósseo.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Este trabalho teve como objetivo avaliar a expressão imuno-histoquímica do fator de transcrição Runx-2 na área de reparo ósseo em ratos diabéticos no período experimental de 7 dias.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Analisar a expressão imuno-histoquímica de Runx-2 nos diferentes tipos celulares na área do reparo ósseo.
- Verificar se o quadro de DM influencia na diferenciação de osteoblastos no período de 7 dias pós-cirurgia.

### 3 METODOLOGIA

A metodologia do trabalho consistiu em avaliar a expressão imuno-histoquímica do fator de transcrição Runx-2 que regula a diferenciação da linhagem osteoblástica. Essa análise foi feita em fêmures de ratos saudáveis e diabéticos que foram submetidos a uma cirurgia para confecção de um defeito ósseo. Os animais foram submetidos à cirurgia 30 dias após a indução do DM e eutanasiados 7 dias após a cirurgia.

#### 3.1 Caracterização da amostra

Neste estudo, foram utilizados 12 ratos machos *Rattus norvegicus*, da linhagem Wistar, clinicamente sadios com peso entre 200 e 250g. Os animais foram mantidos no depósito de animais da área de Ciências Fisiológicas (ARFIS) do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) em estantes climatizadas a temperatura de 22°C e ciclo claro-escuro de 12 horas, com ração e água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com aprovação prévia do CEUA-UFU sob protocolo nº 026/14 (Anexo 1). Em todos os animais, foram criados defeitos ósseos nos fêmures esquerdos para avaliação do reparo ósseo. Os animais foram divididos em 2 grupos experimentais (Tabela 1) e foram sacrificados no período experimental de 7 dias após a cirurgia.

| Condição experimental (Grupos) | Descrição          |
|--------------------------------|--------------------|
| Controle (n=6)                 | Animais saudáveis  |
| DM (n=6)                       | Animais diabéticos |

**Tabela 1:** Distribuição dos animais nos grupos avaliados para cada período experimental.

#### 3.2 Indução de Diabetes Mellitus (DM)

A indução do DM nos animais foi feita com a administração de estreptozotocina (STZ) (Sigma Aldrich) por via intravenosa na dosagem de 60mg/kg de peso corporal diluída em tampão citrato. Esta droga produz um efeito tóxico sobre as células beta-pancreáticas, induzindo um modelo de DM1 (DELFINO, 2002). O protocolo de indução de DM se iniciou mantendo os ratos em jejum absoluto durante 24h. Após este período, foi realizada a 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%. Em seguida, a STZ foi administrada por via endovenosa através de punção da veia peniana, na dosagem de 60 mg/kg de peso corporal, diluído em tampão citrato. Posteriormente, os animais ficaram acondicionados em caixas com maravalha em estantes climatizadas, com ração e água *ad libitum*. Para confirmação da hiperglicemia, foi utilizado um glicosímetro (Accu Check Active, Roche), após 24h e 48h de indução, coletando-se uma gota de sangue da cauda dos animais. Os ratos que apresentaram glicemia maior que 200mg/dL foram considerados diabéticos. Após este período, aqueles que não atingiram a meta glicêmica, foram sacrificados, meio de aprofundamento anestésico e deslocamento cervical. Para o grupo DM, foi realizada aplicação subcutânea de uma unidade da insulina NPH (Humulin N<sup>®</sup>, Lilly), em dias alternados, visando manter a hiperglicemia, mas diminuindo os riscos de morte dos animais. Após 30 dias da confirmação do DM, os animais foram submetidos a procedimento cirúrgico para confecção de defeito ósseo no fêmur esquerdo.

### 3.3 Procedimento cirúrgico

Os animais foram 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 antisepsia 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 periósteo, 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. Nesta região foi realizado um defeito ósseo com uma broca esférica nº 8 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 (Figura 1).

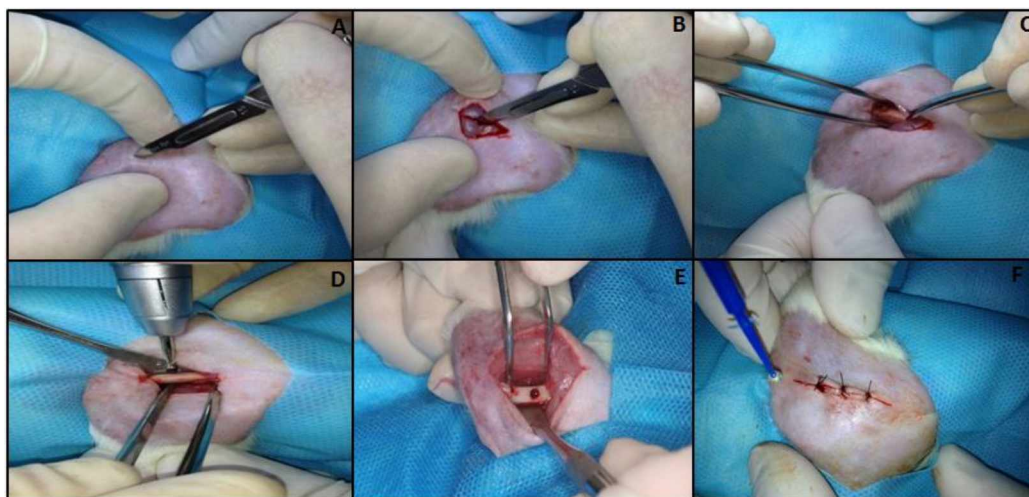


**Figura 1:** Cirurgia para criação de defeito ósseo padronizado em fêmur de rato. A – Incisão contínua em pele na região lateral do fêmur. B – Incisão muscular C – Divulsão da musculatura até a exposição do periósteo. D – Rompimento da cortical óssea sob irrigação constante. E – Defeito ósseo criado. F – Sutura em planos. Imagens cedidas pelo Prof. Dr. Jonas Dantas Batista.

### 3.4 Obtenção dos espécimes para análise

Os animais foram submetidos à eutanásia após intervalo de 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 2), sob irrigação com soro fisiológico e posteriormente fixados em paraformaldeído 4% em Tampão Fosfato 0,1M por 48 horas. Em seguida, os fragmentos ósseos foram desmineralizados em solução de EDTA a 10% pH 7,4, e ,então, processados para inclusão em parafina pela técnica convencional para a análise histológica.

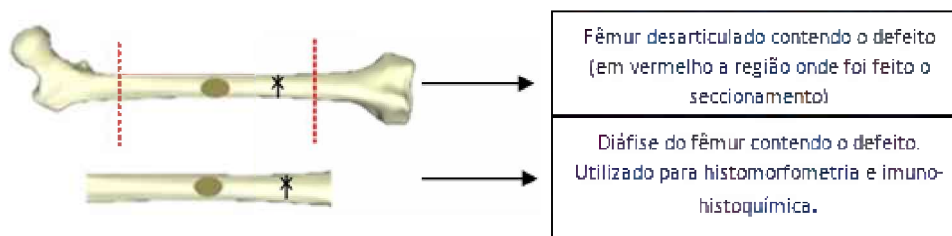


**Figura 2:** Esquema demonstrando o seccionamento do fêmur e região de confecção do defeito ósseo

### 3.5 Reação imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica usada para avaliar a expressão de Runx-2 foi a técnica indireta baseada em polímero.

Os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de álcool (absoluto, 95%, 85% e 70 %). Para a remoção do pigmento formólico foi realizado banho com solução de hidróxido de amônio. O bloqueio da peroxidase endógena tecidual foi procedida com solução de peróxido de hidrogênio 3%. Foi realizada a incubação *overnight* do anticorpo primário anti-Runx-2 (Abcam EPR14334 ab192256) na concentração de 1:100 em geladeira e ambiente escuro.

Após desincubação do anticorpo primário, procedeu-se a aplicação do polímero universal anti-camundongo e anti-coelho conjugado à peroxidase (*Simple Stain Max PO Multi Universal Imuno-Peroxidase Polymer Anti-mouse Anti-rabbit Histofine*). A revelação da reação foi realizada com aplicação do cromógeno DAB (Diaminobenzidina) em ambiente escuro. Para contra coloração, as lâminas foram mergulhadas em hematoxilina por 15 segundos. Em seguida, os cortes foram desidratados em banhos de álcool de concentração crescente (70 %, 85%, 95% e absoluto) e diafanizados. Foi realizada a montagem da lamínula com goma de damar.

### 3.6 Análise da reação imuno-histoquímica

As reações imuno-histoquímicas foram avaliadas em microscópio de luz convencional por dois observadores calibrados em estudo cego. Considerando apenas a área do reparo ósseo, cada corte histológico foi avaliado quanto à presença ou não de reatividade, a intensidade de reação, a proporção de células marcadas.

Foi utilizado um índice semiquantitativo para avaliação da reatividade, denominado Quickscore (QS), que foi calculado segundo os critérios apresentados na Tabela 2, consistindo na multiplicação dos valores de intensidade de reação e proporção de células positivas (DETRE et al., 1995).

| Índice | Intensidade          | Proporção de células positivas |
|--------|----------------------|--------------------------------|
| 0      | Ausência de marcação | Ausência de marcação           |
| 1      | Fraca                | 0 a 4%                         |
| 2      | Moderada             | 5 a 19%                        |
| 3      | Forte                | 20 a 39%                       |
| 4      | -                    | 40 a 59%                       |
| 5      | -                    | 60 a 79%                       |
| 6      |                      | 80 a 100%                      |

**Tabela 2** – Análise da imunomarcção de acordo com os parâmetros intensidade de marcação e proporção de células positivas (DETRE et al., 1995).

### 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 Mann Whitney. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando  $P \leq 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

Foi possível observar nos animais do grupo DM, sinais e sintomas clássicos da DM1. As caixas dos animais diabéticos eram trocadas com mais frequência, devido à umidade causada pela poliúria. E apesar dos dados não serem apresentados, a maioria dos animais diabéticos fazia maior consumo de água, havendo maior necessidade de reposição da mesma. Esses dados, juntamente com a glicemia, mostraram que a indução do DM foi eficiente.

A análise qualitativa dos cortes histológicos dos grupos analisados em microscopia de luz revelou que a área da lesão óssea encontrava-se parcialmente preenchida por trabéculas ósseas neoformadas constituídas de tecido ósseo primário. Essas trabéculas estendiam-se desde a cortical óssea lesionada até a cortical oposta íntegra, porém sem preencher completamente a área da lesão.

A expressão de Runx-2 foi observada nas células da linhagem osteoblástica incluindo células osteoprogenitoras, osteoblastos e osteócitos. Comparando os grupos analisados, observou-se que os animais do grupo DM apresentavam visualmente menor expressão de Runx-2 que os animais do grupo controle.

Os dados de intensidade de marcação, proporção de células positivas e QS dos grupos controle e DM estão apresentados na Tabela 3.

| Animal                | Intensidade | Proporção de células | Quickscore |
|-----------------------|-------------|----------------------|------------|
| <b>GRUPO CONTROLE</b> |             |                      |            |
| 1                     | 3           | 4                    | 12         |
| 2                     | 2           | 3                    | 6          |
| 3                     | 2           | 4                    | 8          |
| 4                     | 3           | 4                    | 12         |
| 5                     | 0           | 0                    | 0          |
| 6                     | 2           | 3                    | 6          |
| <b>GRUPO DM</b>       |             |                      |            |
| 7                     | 1           | 1                    | 1          |
| 8                     | 1           | 1                    | 1          |
| 9                     | 1           | 1                    | 1          |
| 10                    | 1           | 1                    | 1          |
| 11                    | 0           | 0                    | 0          |
| 12                    | 1           | 2                    | 2          |

**Tabela 3** - Valores de I, P e QS nas células da linhagem osteoblástica (osteoprogenitoras, osteoblastos e osteócitos) (I: Intensidade; P: Proporção de células reativas; QS: Quickscore).

A expressão de Runx-2 de intensidade fraca (Figura 3) foi predominante na área do reparo ósseo em animais do grupo DM. Os mesmos apresentaram QS menores quando comparados aos animais do grupo controle.

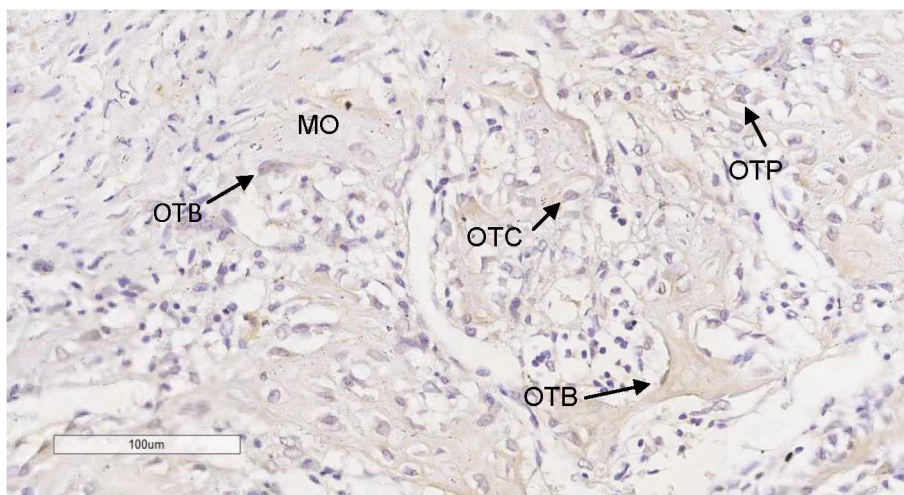


Figura 3 – Expressão de Runx-2 de intensidade fraca (grupo DM) (MO: Matriz óssea, OTC: Osteócito, OTP: Osteoprogenitora, OTB: Osteoblasto)

A expressão de Runx-2 de intensidades moderada (Figura 4) e forte (Figura 5) foram predominantes na área do reparo ósseo em animais do grupo controle. Os mesmos apresentaram QS mais elevados quando comparados aos animais do grupo DM.

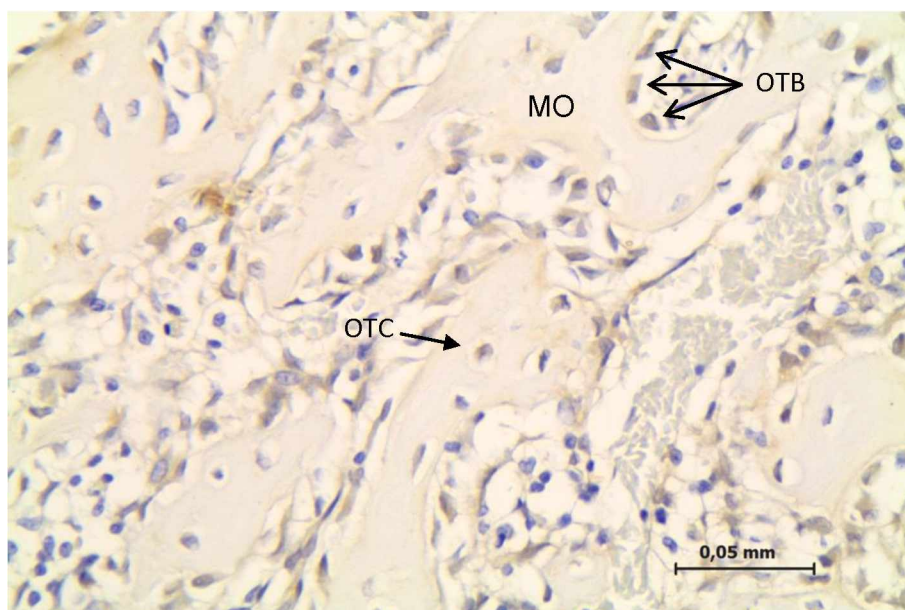


Figura 4 – Expressão de Runx-2 de intensidade moderada (grupo controle) (MO: Matriz óssea, OTC: Osteócito, OTB: Osteoblasto)

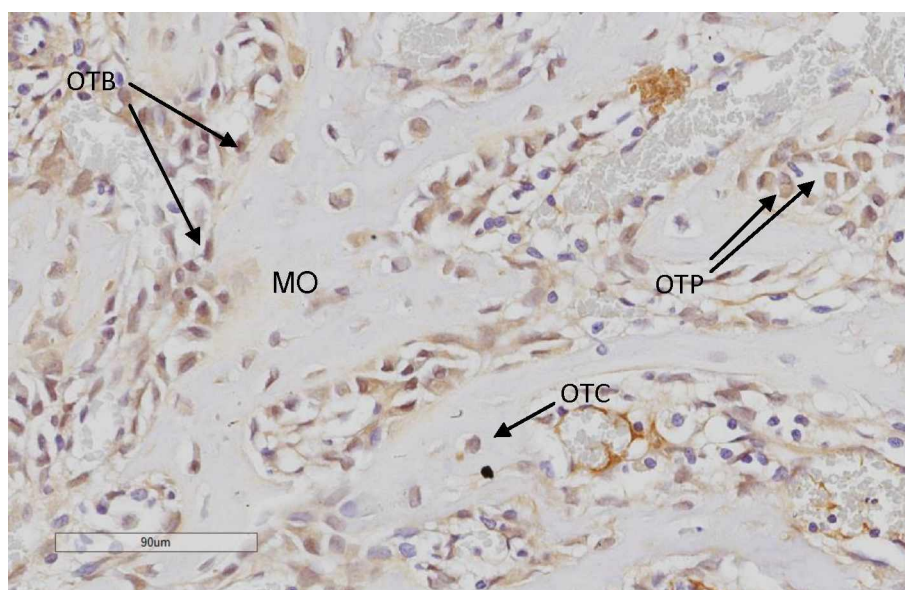


Figura 5 – Expressão de Runx-2 de intensidade forte (grupo controle) (MO: Matriz óssea, OTC: Osteócito, OTP: Osteoprogenitora, OTB: Osteoblasto)

Os QS de ambos os grupos não apresentavam distribuição normal (Gaussiana) sendo, assim, submetidos ao teste não paramétrico. Após o teste de Mann Whitney para os QS analisados, foi obtido valor de  $p=0,05$  que comprova diferença estatisticamente significativa na expressão imuno-histoquímica de Runx-2 entre os grupos controle e DM (Gráfico 1).

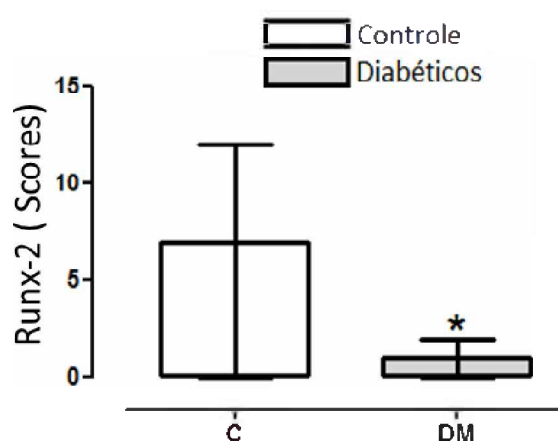


**Gráfico 1** - Os dados foram analisados utilizando-se o teste de Mann Whitney. Considerado estatisticamente significativo para  $*P \leq 0,05$ .

## 6 DISCUSSÃO

O modelo de estudo mais usado para pesquisas que envolvem mecanismos de reparo ósseo é o modelo experimental em animais. Estudos demonstraram que os animais diabéticos induzidos experimentalmente pela STZ apresentam alterações semelhantes aos observados em humanos: susceptibilidade aumentada à infecção e doenças cardiovasculares, retinopatia, alterações na angiogênese, cicatrização tardia de feridas, quadros de cetoacidose e formação óssea reduzida (MOSCI et al., 1993; KUNJATHOOR et al., 1996).

Metodologias que envolvem a indução de DM em ratos com uso da STZ são bem estabelecidas na literatura. A STZ induz um modelo de DM1, gerando um modelo experimental diabético insulino-dependente (LENZEN, 2008). Neste estudo, a administração da droga foi feita por via endovenosa, por meio da punção da veia peniana. Todos os animais submetidos à indução desenvolveram o quadro de DM, mantendo elevados níveis de glicemia (dado não apresentado).

Uma unidade (1UI) de insulina foi aplicada nos animais diabéticos em dias alternados a fim de manter altas taxas de glicose e evitar que o animal viesse a óbito. Essa abordagem não é considerada insulino-terapia, uma vez que a glicemia não era aferida diariamente e nem era realizada a administração de insulina para controlar o nível glicêmico. O modelo experimental usado neste estudo visou manter animais com taxa glicêmica acima de 500 mg/dl (dado não apresentado).

Os defeitos ósseos confeccionados com broca esférica com tamanho de 1,2 mm de diâmetro foram suficientes para causar alterações significantes que permitisse a comparação do reparo ósseo entre grupos controle e DM. De acordo com a literatura, defeitos maiores de 1,2 mm promovem desordens na mineralização nos primeiros 14 dias de reparo ósseo em modelos de animais diabéticos (FOLLAK et al., 2003).

Este estudo, realizado com modelo experimental de DM induzido pela STZ e defeitos ósseos de 2,8mm de diâmetro, demonstrou que os animais diabéticos apresentaram atraso no processo de reparo, bem como reduzida expressão de Runx-2. O modelo experimental escolhido é bem aceito na literatura e os resultados encontrados neste estudo foram considerados estatisticamente significantes ( $p=0,05$ ). Tais achados estão de acordo com os dados relatados na literatura.

Na literatura o trabalho que mais se aproximou deste estudo foi o de Haufei *et al* (2013). Os referidos autores utilizaram modelo animal de DM induzido pela STZ e submeteram os animais a uma ablação na tíbia. Foi observada menor expressão imuno-histoquímica de Runx-2 nos animais diabéticos quando comparado ao grupo controle. A análise foi realizada nos períodos de 4, 6, 10 e 16 dias e o grupo diabético apresentou, além da redução da expressão desse fator de transcrição, atraso no processo de remodelação óssea. A avaliação histomorfométrica também comprovou redução na quantidade de tecido ósseo neoformado no grupo DM. Assim, os animais diabéticos apresentaram menor expressão de Runx-2 que leva a uma redução na diferenciação osteoblástica. Esse quadro, por sua vez, pode reduzir a expressão de genes relacionados à deposição de matriz óssea e limitar a produção de um novo tecido ósseo. Apesar de terem usado uma metodologia diferente, os resultados descritos por Haufei *et al* (2013) foram semelhantes aos encontrados neste trabalho.

Estudos com pacientes diabéticos demonstraram que, além de alterar a estrutura do tecido ósseo, o DM compromete a formação e a função dos osteoblastos, levando à redução de deposição da matriz óssea e da mineralização, além de atraso no tempo de mineralização (SANTANA *et al.*, 2003; FOLLAK *et al.*, 2005; GRAVES *et al.*, 2011). Esse atraso pode estar relacionado a vários fatores, como expressão prolongada de citocinas e quimiocinas inflamatórias, destruição da matriz que está associada a um desequilíbrio entre as enzimas líticas e seus inibidores, diminuição na produção de fatores angiogênicos e de crescimento, diminuição na taxa de proliferação celular e aumento na taxa de apoptose (WETZLER *et al.*, 2000; LOBMANN *et al.*, 2002; GRAVES, KAYAL, 2008).

Diversos autores mostraram que, especialmente o DM1, altera significativamente a taxa de proliferação dos osteoblastos, bem como das células progenitoras, e as vias de expressão gênica envolvida na atividade destes tipos celulares. Com as vias de sinalização osteoblástica comprometidas, a taxa de osteoclastos aumenta, e gera como consequência, uma menor densidade mineral óssea (DMO), aumentando os riscos de fraturas ósseas (FOWLKES, *et al.*, 2011; ROY, 2013; THRAIKIL, *et al.*, 2005).

DM inibe a atividade dos osteoblastos e reduz o potencial de formação do tecido ósseo, levando a um desequilíbrio no processo de reparo ósseo (RETZEPI, DONOS, 2010). Além disso, também reduz o volume de osso trabecular e a taxa de aposição óssea mineral (VERHAEGHE *et al.*, 1990), além de diminuir a formação óssea durante o reparo de fraturas

em decorrência de um aumento na reabsorção da cartilagem hialina e maior atividade dos osteoclastos (KAYAL et al., 2007).

Estudo prospectivo de 12 anos comprovou que a neoformação óssea em humanos diabéticos encontra-se reduzida, sugerindo assim, que a atividade osteoblástica desses indivíduos estaria comprometida quando comparado a indivíduos saudáveis (KRAKAUER et al., 1995).

A maioria das proteínas secretadas pelos osteoblastos também são sintetizadas por outras células, como fibroblastos e condrócitos. Porém, a osteocalcina, uma proteína não colagenosa encontrada no tecido ósseo e na dentina, é considerada a proteína mais específica quando se trata da linhagem osteoblástica (HAUSCHKA et al., 1989; DESBOIS et al., 1994; DUCY et al., 1996). Estudos têm mostrado que os marcadores séricos de remodelação óssea, especialmente os marcadores de formação específicos como a osteocalcina, estão em concentrações reduzidas em pacientes portadores de DM (RUBIN, 2015; DOBNIG et al., 2006).

O colágeno tipo I é a proteína na matriz extracelular mais abundante no tecido ósseo. Sintetizada por osteoblastos, é muitas vezes considerada, um biomarcador de formação óssea (VUORIO, 1990). Estudo *in vitro* mostrou que, Runx-2 pode aumentar o nível da atividade de uma região promotora de colágeno tipo 1 e, *in vivo*, a expressão Runx2 está associada a síntese desse colágeno em osteoblastos (KERN et al., 2001).

Estudo com camundongos que apresentavam deficiência do fator de transcrição Runx-2 demonstrou completa ausência de tecido ósseo, inclusive de osteoblastos e matriz óssea. Essa deficiência também acarretou a ausência da expressão de proteínas como osteopontina, sialoproteína óssea e osteocalcina (KOMORI et al., 1997; OTTO et al., 1997; HOSHI, et al., 1999).

Estudo histomorfométrico realizado previamente pelo nosso grupo de pesquisa, demonstrou alterações significativas no processo de reparo ósseo em animais diabéticos no período de 7 dias. Foi observado presença de trabéculas ósseas mais finas, menores áreas de remodelação e reduzida neoformação óssea nos animais diabéticos quando comparado aos animais normoglicêmicos (DIAS, 2016).

A menor expressão imuno-histquímica de Runx-2 observada neste estudo comprova que o DM interfere na expressão deste fator considerado fundamental na regulação da

diferenciação dos osteoblastos, resultando assim, em interferência no processo de reparo ósseo.

## **7 CONCLUSÃO**

Os resultados deste trabalho demonstraram que o quadro de DM reduz a expressão imuno-histoquímica do fator de transcrição Runx-2 na área de reparo ósseo no período de 7 dias, demonstrando que o DM influencia negativamente na diferenciação de osteoblastos causando atraso no processo de reparo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADA. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 37 Suppl 1:81-90. 2014.

ALBIN, J.E. Advances in the osteoblast lineage. *Biochem. Cell Biol.*; 76: 899-910. 1998.

AMORIM, F.P.; ORNELAS, S.S.; DINIZ, S.F.; BATISTA, A.C.; DA SILVA, T.A. Imbalance of RANK, RANKL and OPG expression during tibial fracture repair in diabetic rats. *J Mol Histol.*;39:401-408. 2008.

ARDAWI, M.S.; AKHBAR, D.H.; ALSHAIKH, A., et al. Increased serum sclerostin and decreased serum IGF-1 are associated with vertebral fractures among postmenopausal women with type-2 diabetes. *Bone*. 56(2):355–62. 2013.

ATKINSON, M.A.; MACLAREN, N.K. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes melitus (review article). *N Engl J Med*; 331: 1.428-36. 1994.

CLOWES, J.A.; ALLEN, H.C.; PRENTIS, D.M.; EASTELL, R.; BLUMSOHN, A. Octreotide abolishes the acute decrease in bone turnover in response to oral glucose. *J Clin Endocrinol Metabolism*.88(10):4867– 73. 2003.

DAVIES, J.E.; HOSSEINI, M.M. Histodynamics of endosseous. Wound healing. In: Davies JE, ed. *Bone engineering*. Toronto: em squared Inc; p. 435-40. 2000.

DELFINO, V.; FIGUEIREDO, J.F.; MATSUO, T.; FAVERO, M.E.; MATNI, A.M. Diabetes mellitus induzido por estreptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*. v. 24, n. 1, p. 31-36, 2002.

DESBOIS, C.; HOGUE, D.A.; KARSENTY,G. The mouse osteocalcin gene cluster contains three genes with two separate spatial and temporal patterns of expression. *J. Biol. Chem*. 269: 1183–1190. 1994.

DETRE, S.; SACLANI JOTTI, G.; DOWSETT, M. A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in 57 breast carcinomas. *J Clin Pathol.*; 48(9):876-8. 1995.

DIAS, P.C. *Efeito da oxigenação hiperbárica no reparo ósseo de ratos diabéticos*. 2016. 73 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.

DOBNIG, H.; PISWANGER-SÖLKNER, J.C.; ROTH, M.; OBERMAYER-PIETSCH, B.; TIRAN, A.; STRELE, A.; et al. Type 2 diabetes mellitus in nursing home patients: effects on bone turnover,  $\beta$ , and fracture risk. *J Clin Endocrinol Metab*; 91:3355-63. 2006.

DUCY, P.; DESBOIS, C.; BOYCE, B.; PINERO, G.; STORY, B.; DUNSTAN, C.; et al. A. Bradley, and G. Karsenty. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382: 448–452. 1996.

DUCY, P.; ZHANG, R.; GEOFFROY, V.; RIDALL, A.; KARSENTY, G. *Osf2/Cbfa1*: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89: 747–754. 1997.

ERICKSEN, E. F. Cellular Mechanism os Bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord* 11:219–227. 2010.

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.; KLOTING, L.; MERK, H. Influence of diabetic metabolic state on fracture healing in spontaneously diabetic rats. *Diabetes Metab Res Rev* 21:288-296. doi: 10.1002/dmrr.537, 2005.

FOWLKES, J.L.; BUNN, R.C.; THRAILKIL, K.M. Contributions of the insulin/insulin-like growth factor-1 axis to diabetic osteopathy. *J Diabetes Metab* 1:S1–S003 4. 2011.

GABBAY, M.; et al. Diabetes melito do tipo 2 na infância e adolescência. *Jornal de Pediatria* - Vol. 79, Nº3, 2003.

GIANNOUDIS, P.V.; EINHORN, T.A.; MARSH, D. Fracture healing: the diamond concept. *Jornal Injury*; 38(Suppl. 4):S3–6. 2007.

GRAVES, D.T.; KAYAL, R.A. Diabetic complications and dysregulated innate immunity. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*. v. 13, p. 1227, 2008.

GRAVES, D.T.; ALBLOWI, J.; PAGLIA, D.N.; O'CONNOR, J.P.; LIN, S. Impact of diabetes on fracture healing. *Journal of Experimental & Clinical Medicine*. v. 3, n. 1, p. 3-8, 2011.

GUYTON, A. C. ; HALL, J. E. Insulina, glucagon e diabetes mellitus. In: \_\_\_\_\_. *Tratado de fisiologia médica*. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002. p. 827-840.

HAMADA, Y.; KITAZAWA, S.; KITAZAWA, R.; FUJII, H.; KASUGA, M.; FUKAGAWA, M. Histomorphometric analysis of diabetic osteopenia in streptozotocin-induced diabetic mice: a possible role of oxidative stress. *Bone*. 40(5):1408–14. doi:10.1016/j.bone.2006.12.057. 2007.

HAUSCHKA, P.; LIAN, J.; COLE, D., GUNDBERG, C. Osteocalcin and matrix Gla protein: Vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol. Rev.* 69: 990–1047. 1989.

HOSHI, K.; KOMORI, T.; OZAWA, H. Morphological characterization of skeletal cells in cbfa1-deficient mice. *Bone*. 1999;25:639–651.

HUAFEI, L.U., et al. Diabetes Alters Gene Expression during Bone Formation *Endocrinology*, 144(1): 346–352. 2003.

*IDF Diabetes Atlas*, Sixth Edition. Bruxelas, Bélgica. Disponível em: [http://www.idf.org/sites/default/files/EN\\_6E\\_Atlas\\_Exec\\_Sum\\_1.pdf](http://www.idf.org/sites/default/files/EN_6E_Atlas_Exec_Sum_1.pdf)> Acesso em: 18 Mar. 2016.

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

KAWAGUCHI, H.; KUROKAWA, T.; HANADA, K.; HIYAMA, Y.; TAMURA, M.; OGATA, E.; et al. Stimulation of fracture repair by recombinant human basic fibroblast growth factor in normal and streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinology*;135(2):774-81. 1994.

KAYAL, R. A.; TSATSAS, D.; BAUER, M. A.; ALLEN, B.; et al. Diminished bone formation during diabetic fracture healing is related to the premature resorption of cartilage associated with increased osteoclast activity. *Journal of Bone Mineral Research*. New York, v.22, n.4, p.560-568, 2007.

KERN, B., SHEN, J., STARBUCK, M.;KARSENTY, G. Cbfa1 contributes to the osteoblast-specific expression of type I collagen genes. *J. Biol. Chem.* 276, 7101–7107. 2001.  
KRAKAUER, J.; MCKENNA, M.; BURDERER, N.; RAO, D.; WHITEHOUSE, F.; PAFITT, A. Bone loss and bone turnover in diabetes. *Diabetes* 44:775–782. 1995.

KOMORI, T.; YAGI, H.; NOMURA, S.; YAMAGUCHI, A.; SASAKI, K. ; DEGUCHI, K.; et al. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89. 755–764. 1997.

KUNJATHOOR, V.; WILSON, D.; LEBOEUF, R. Increased atherosclerosis in streptozotocin-induced diabetic mice. *J Clin Invest* 97:1767–1773. 1996.

LEE, J.S.; LEE, J.M. *Biomaterials* 32 760–768. 697. 2011.

LEITE, R.S., FERNANDES, J.K. Oral Health and Type 2 Diabetes. *Symposium Article* 2013

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008;51(2):216-26.

LOBMANN, R.; AMBROSCH, A.; SCHULTZ, G.; WALDMANN, K.; SCHIWECK, S.; LEHNERT, H. 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.

LODER, J.W.,ROSS, C.K.; SMITH, P.C. A space- and time-scale characterization of the circulation and mixing over submarine banks, with applications to the northwestern Atlantic continental shelf. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 45:1860-1885. 1988.

LONG, M.W. Osteogenesis and bone- Marrow-Derived cells. *Blood Cells.Molecules and diseases.*; 27(3) 677-690. 2001.

LU, H.; KRAUT, D.; GERSTENFELD, L.C.; GRAVES, D.T. Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation. *Endocrinology*.144(1):346-52. 2003.

MANOLAGAS, S. C. Role of cytokines in bone resorption. *Bone*, v. 17, n. 2, suppl., p. 63-7, 1995.

MISHIMA, N.; SAHARA, N.; SHIRAKAWA, M.; OZAWA, H. Effect of streptozotocin-induced diabetes mellitus on alveolar bone deposition in the rat. *Arch Oral Biol*. 2002;47(12):843-9.

MOSCI, P.; VECCHIARELLI, A.; CENCI, E.; PULITI, M.A.; BISTONI, F. Low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice. *Cell Immunol* 150:27–35 17. 1993.

OGAWA, N.; YAMAGUCHI, T.; YANO, S.; YAMAUCHI, M.; YAMAMOTO, M. SUGIMOTO, T. The combination of high glucose and advanced glycation end-products (AGEs) inhibits the mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells through glucose-induced increase in the receptor for AGEs. *Horm Metab Res.*;39(12):871–5. 2007.

OGASAWARA, A.; NAKAJIMA, A.; et al. Molecular basis for affected cartilage formation and bone union in fracture healing of the streptozotocin-induced diabetic rat. *Bone*, v. 43, n. 5, p. 832-839. 2008.

OTTO, F.; THORNELL, A.P.; CROMPTON, T.; et al. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89:765–771. 1997.

RETZEPI, M.; DONOS, N. Guided Bone Regeneration: biological principle and therapeutic applications. *Clin Oral Implants Res* . 21: 567–576. 2010.

ROY, B. Biomolecular basic of the role of diabetes mellitus in osteoporosis and bone fractures. *World J Diabetes* 15:101–113 5. 2013.

RUBIN, M.R. *Bone Cells and bone turnover in Diabetes mellitus*. Springer Science business Media York 2015

SANTANA, R.B.; XU, L.; CHASE, H.B.; AMAR, S.; GRAVES, D.T.; TRACKAMAN, P.C. A role for advanced glycation end products in diminished bone healing in type 1 diabetes. *Diabetes*. v. 52, n. 6, p. 1502-1510, 2003.

SHYNG, Y.C.; DEVLIN, H.; SLOAN, P. The effect of streptozotocin-induced experimental diabetes mellitus on calvarial defect healing and bone turnover in the rat. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 30(1):70-4. 2001.

TEN CATE, A. R. *Histologia Oral - Desenvolvimento, Estrutura e Função*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2013.

THRAILKIL, K.M.; LUMPKIN, C.K. JR.; BUNN, R.C.; KEMP, S.F.; FOWLKES, J.L. Is insulin an anabolic agent in bone? Dissecting the diabetic bone for clues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:E735–E745. 2005.

VERHAEGHE, J.; VAN HERCK, E.; VISSER, W.J.; SUIKER, A.M.; THOMASSET, M.; EINHORN, T.A.; FAIERMAN, E.; BOUILLON, R. Bone and mineral metabolism in BB rats

with long-term diabetes. Decreased bone turnover and osteoporosis. *Diabetes*. 39:477–482. 1990.

VIMALRAJ, S.; ARUMUGAM, B.; MIRANDA, P.J.; SELVAMURUGAN, N. Runx2: Structure, function, and phosphorylation in osteoblast differentiation. *Int J Biol Macromol* 78: 202-208, 2015

VUORIO, E.; DE CROMBRUGGHE, B. The family of collagen genes. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 837–872. 1990.

WETZLER, C.; KAMPFER, H.; STALLMEYER, B.; PFEILSCHIFTER, J.; FRANK, S. 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.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREENE, A.; et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 27: 1047-1053. 2004.

YAMAMOTO, M.; YAMAGUCHI, T.; NAWATA, K.; YAMAUCHI, M.; SUGIMOTO, T. Decreased PTH levels accompanied by low bone formation are associated with vertebral fractures in postmenopausal women with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 97(4):1277–84. 2012.

## ANEXO 1



Universidade Federal de Uberlândia

- Comissão de Ética na Utilização de Animais -



## CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 026/14, sobre o projeto de pesquisa intitulado "Efeito da oxigenação hiperbárica e do laser de baixa potência no reparo e biomecânica em osso de ratos diabéticos", sob a responsabilidade da **Prof. Dr. Paula Dechichi** está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal conforme regulamentações do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) – UFU em reunião de 29 de Agosto de 2014.

(We certify that the protocol nº 026/14, about "Efeito da oxigenação hiperbárica e do laser de baixa potência no reparo e biomecânica em osso de ratos diabéticos", agrees with the ETHICAL PRINCIPLES ON ANIMAL RESEARCH as regulations of National Advice of Control and Animal Experimentation (CONCEA) and approved by Ethics Commission on Use of Animals (CEUA) – Federal University of Uberlândia in 29/08/2014).

Uberlândia, 29 de Agosto de 2014.

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