



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



IZABELLA FERNANDA FERREIRA ALMEIDA

CONTAGEM DE MASTÓCITOS NA ÁREA DE REPARO ÓSSEO DE ANIMAIS FILHOTES DE MÃES DIABÉTICAS

Uberlândia – MG

2024

IZABELLA FERNANDA FERREIRA ALMEIDA

CONTAGEM DE MASTÓCITOS NA ÁREA DE REPARO ÓSSEO DE ANIMAIS FILHOTES DE MÃES DIABÉTICAS

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Odontologia da UFU, como requisito parcial para obtenção do título de Graduado em Odontologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Karen Renata Nakamura Hiraki

Uberlândia - MG

2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** por ter me sustentado em todos os momentos durante a desafiadora fase da graduação.

Agradeço aos meus pais, **Carlos Daniel e Lilia Beatriz**, ao meu irmão **Carlos Victor** e aos meus avós **Joana Batista** (in memorian) e **José Mamede** por todo o suporte emocional e financeiro, por serem sempre tão alegres e confiantes que eu iria conseguir. Com certeza não estaria onde estou e nem seria quem sou, sem vocês.

Ao meu namorado, **Fernando Henrique** que me acompanha nessa jornada desde antes do início da graduação e compartilhou cada momento comigo, comemorou os bons e me tranquilizou nos difíceis, sendo sempre o meu porto seguro.

Agradeço ao **Willian Elias Paulino** técnico do Laboratório de Técnicas Histológicas do DBHEM/ICBIM que com sua paciência e gentileza foi imprescindível para que eu conseguisse concluir a pesquisa. Gostaria de agradecer também ao **Prof. Dr. Luiz Borges Bispo** da Silva pela valiosa contribuição na análise estatística deste trabalho.

Por fim, gostaria de agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho pudesse ser realizado, em especial a minha querida orientadora, a **Prof^a. Dr^a. Karen Renata Nakamura Hiraki**, que me acolheu de braços abertos desde nosso primeiro contato, sempre solícita e atenciosa, fazendo toda a trajetória ser mais leve. Obrigada por cumprir magistralmente seu papel como orientadora.

RESUMO

Mastócitos desempenham papel vital na defesa contra patógenos e alérgenos, além de influenciar a homeostase e a remodelação óssea. Em casos de diabetes gestacional, há repercussões intra e extra uterinas, como o crescimento fetal excessivo e possíveis efeitos na saúde óssea da prole. O objetivo deste estudo foi avaliar a quantidade de mastócitos na área de reparo ósseo de filhotes gerados em ambiente hiperglicêmico. Filhotes machos de ratas Wistar foram divididos em três grupos: controle (filhotes de mães normoglicêmicas), não diabético (filhotes de mães que foram submetidas à indução do diabetes, mas que não ficaram diabéticas) e diabético (filhotes de mães diabéticas). Após 60 dias de vida, os filhotes foram submetidos à cirurgia de confecção de defeito ósseo nos fêmures esquerdos. O processo de reparo ósseo foi avaliado no período experimental de 3 e 7 dias pós-cirurgia. Após a coleta das amostras, foram obtidos cortes histológicos que foram corados em Hematoxilina e Eosina para análise qualitativa, Tricrômico de Mallory para análise histomorfométrica e Azul de Toluidina para contagem dos mastócitos. A análise estatística dos dados foi realizada com software GraphPad Prism Version 5.00 e o nível de significância adotado foi $p < 0,05$. Após a contagem dos mastócitos, observou-se grande variação de valores entre grupos experimentais e dentro de cada grupo. Devido à falta de distribuição normal dos dados, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para a análise estatística. Observou-se uma tendência de redução no número de mastócitos no grupo diabético no período de 3 dias ($P = 0,058$), indicando um possível significado biológico neste grupo. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais no período de 7 dias. Os resultados permitem concluir que foi observada uma tendência à redução do número de mastócitos na área de reparo ósseo no período de 3 dias no grupo diabético sugerindo que este fato possa estar associado a menor porcentagem de matriz óssea neoformada e que a hiperglicemia materna tem reflexo prejudicial no reparo ósseo apresentado pela prole.

Palavras Chaves: Mastócitos; Diabetes Gestacional; Reparo Ósseo.

ABSTRACT

Mast cells play a crucial role in defending against pathogens and allergens, as well as influencing homeostasis and bone remodeling. In cases of gestational diabetes, there are intrauterine and extrauterine repercussions, such as excessive fetal growth and potential effects on offspring bone health. The objective of this study was to evaluate the quantity of mast cells in the bone repair area of offspring generated in a hyperglycemic environment. Male Wistar rat pups were divided into three groups: control (pups from normoglycemic mothers), non-diabetic (pups from mothers who underwent diabetes induction but did not develop diabetes), and diabetic (pups from diabetic mothers). At 60 days of age, the puppies underwent surgery to create a bone defect in their left femurs. The bone repair process was evaluated at 3 and 7 days post-surgery. Histological sections were obtained from collected samples and stained with Hematoxylin and Eosin for qualitative analysis, Mallory's Trichrome for histomorphometric analysis, and Toluidine Blue for mast cell counting. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism Version 5.00 software, with a significance level of $p < 0.05$. Mast cell counting revealed a significant variation in values among experimental groups and within each group. Due to the lack of normal data distribution, the Kruskal-Wallis non-parametric test was used for statistical analysis. A trend towards a reduction in mast cell numbers was observed in the diabetic group over a 3-day period ($P = 0.058$), suggesting potential biological significance in this group. No statistically significant difference was found between the experimental groups over the 7-day period. These findings suggest a tendency towards reduced mast cell numbers in the bone repair area over 3 days in the diabetic group, possibly associated with a lower percentage of newly formed bone matrix and indicating a harmful effect of maternal hyperglycemia on bone repair in offspring.

Keywords: Mast Cells; Gestational Diabetes; Bone Repair.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	06
1.1 Mastócitos.....	06
1.2 <i>Diabetes Mellitus Gestacional (DMG)</i>.....	08
2 OBJETIVOS.....	10
2.1 Objetivo Geral	10
2.2 Objetivos Específicos	10
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Caracterização da amostra.....	11
3.2 Procedimento cirúrgico.....	12
3.3 Análise do reparo ósseo.....	13
3.4 Coloração com Azul de Toluidina.....	14
3.5 Análise Estatística.....	14
4 RESULTADOS.....	15
5 DISCUSSÃO	18
6 CONCLUSÃO.....	20
REFERÊNCIAS.....	21
ANEXO 1.....	23

1 INTRODUÇÃO

1.1 Mastócitos

Os mastócitos são células do sistema imunológico de origem hematopoiética que desempenham um papel importante em várias condições de saúde e doença (DA SILVA et al.; 2014). É possível observar a presença dessas células em todas as classes de vertebrados, tendo seu surgimento relatado desde muito antes da concepção da imunidade adquirida (SOLIMANDO et al.; 2022). Os mastócitos desempenham um papel crítico na defesa do organismo contra bactérias como o *Staphylococcus aureus* e outros patógenos, como helmintos. Além disso, eles também estão envolvidos na proteção contra venenos produzidos por diversos animais, incluindo cobras e abelhas. Essa importante função dos mastócitos na defesa do hospedeiro é altamente conservada ao longo da evolução, o que não é surpreendente, considerando a sua relevância na resposta imunológica e na sobrevivência das espécies (CHIA, et al.; 2023)

Quanto à sua diferenciação, sabe-se que após despontarem na medula óssea, as células progenitoras (indiferenciadas) circulam através do sistema vascular e se diferenciam a partir da influência de fatores de células-tronco produzidas localmente por células em diversos tecidos. Os mastócitos maduros (diferenciados) estão presentes apenas nos tecidos, não mais na circulação. (FONG; CRANE, 2018)

Os mastócitos exercem função fundamental durante as reações alérgicas através de sua grande afinidade com receptor de IgE (OKAYAMA; KAWAKAMI, 2006). Ademais, secretam diversos mediadores, o que inclui além da histamina, também a heparina, o fator de ativação plaquetária, a triptase, a quimase, as prostaglandinas, os leucotrienos e as citocinas (CHIAPPETTA; GRUBER, 2006). Os mastócitos podem passar por degranulação em resposta a vários estímulos, incluindo estímulos medicamentosos e produtos químicos. A degranulação mastocitária refere-se ao processo em que os grânulos dentro dos mastócitos são liberados, resultando na liberação de substâncias biologicamente ativas (HUANG; CHEN, 2012)

Outrossim, essas células também são responsáveis por desempenhar um papel importante não apenas como parte do sistema imunológico, mas também em

vários processos biológicos e na manutenção do equilíbrio interno do corpo, conhecido como homeostase. Essas células estão presentes em vários tecidos, incluindo o epitélio, o endotélio e o sistema nervoso, o que lhes confere uma distribuição ampla e uma posição estratégica. Além de sua função imunomoduladora, os mastócitos estão envolvidos em muitos outros aspectos fisiológicos, desempenhando papéis reguladores e de suporte em várias funções biológicas (WELLER et al.; 2011)

Os mastócitos também desempenham um papel na manutenção da homeostase tecidual, incluindo o crescimento e remodelação de tecidos, como folículos pilosos e tecido ósseo. A histamina promove o recrutamento e diferenciação de precursores de osteoclastos para a reabsorção óssea (LESCLOUS, et al; 2004.) A triptase liberada pelos mastócitos pode ativar o receptor ativado por protease-2 (PAR-2), o qual tem a capacidade de inibir a diferenciação dos osteoclastos (SMITH et al. 2004).

Além da histamina, várias outras moléculas liberadas pelos mastócitos, como IL-1, TGF- β , IL-6 e PDGF, desempenham um papel no recrutamento e desenvolvimento dos osteoclastos, que são responsáveis pela reabsorção óssea. A osteopontina (OPN), também liberada pelos mastócitos, desempenha um papel crucial no equilíbrio e na manutenção da mineralização, desempenhando um papel importante no controle do metabolismo ósseo (CHIAPPETTA; GRUBER, 2006)

Acredita-se que a inibição dos mastócitos e a subsequente redução dos produtos liberados por eles possam ter potencial terapêutico como um complemento no tratamento de doenças ósseas, como a osteoporose. Essa abordagem mostra promessa como uma possível terapia auxiliar para melhorar o manejo dessas condições ósseas (CHIAPPETTA; GRUBER, 2006).

1.2 Diabetes Mellitus Gestacional (DMG)

O diabetes mellitus gestacional (DMG) é determinado como uma hiperglicemia observada pela primeira vez durante a gestação (HARTLING et al.; 2013). O diabetes gestacional se caracteriza pela intensificação do transporte placentário de glicose e demais nutrientes da mãe para o feto. O desenvolvimento do feto que se dá em um ambiente hiperglicêmico é caracterizado pelo aumento da secreção de insulina, o que provavelmente leva à exaustão das células beta pancreáticas fetais. Essas alterações na vida intrauterina podem levar a consequências mais tarde na vida pós-uterina, visto que 43 ciclos de divisão celular ocorrem pós fertilização até o momento do nascimento, enquanto apenas 5 ciclos são realizados pós nascimento. Isso pode esclarecer o papel crítico da vida fetal (VAN ASSCHE; HOLEMANS; AERTS, 2001).

Diversas são as repercussões intra e extrauterinas resultantes de uma gestação hiperglicêmica. A prole apresenta crescimento fetal excessivo, o que pode aumentar os riscos de complicações durante o parto. Os descendentes, em geral, demonstraram secreção reduzida de insulina, assim como apresentam maior risco de diabetes quando comparados à filhos gerados em ambiente normoglicêmico (LAMPL & JEANTY, 2004; PLAGEMANN et. Al; 1997). Visto a associação de fatores como obesidade e diabetes e o risco de doenças cardiovasculares, há ainda a suspeita que possam haver repercussões cardiovasculares na prole de mães diabéticas (HALFON et al. 2012).

A principal repercussão odontológica observada na prole de mães diabéticas está relacionada à hipoplasia de esmalte em dentes decíduos. No entanto, os mecanismos pelos quais se dá essa alteração não estão completamente elucidados, assim como, ainda é necessário avaliar se esses efeitos são momentâneos ou permanentes (SILVA-SOUSA, PERES, FOSS, 2003).

Há evidências epidemiológicas crescentes de que a osteoporose na prole também pode ser influenciada pela nutrição da mãe durante a gravidez, a nutrição pós-natal e no início da vida. Muita atenção tem sido voltada para desdobramentos cardiovasculares e metabólicos, entretanto, há evidências que sugerem que o desenvolvimento do tecido ósseo também pode ser comprometido, apesar de haver constante remodelação óssea durante a vida (BAIRD et al., 2011). Entretanto, até o

presente momento, pouco se conhece sobre os mecanismos celulares e moleculares, pelos quais a modulação ambiental intrauterina ocasiona alterações no desenvolvimento esquelético da prole (LANHAM et al., 2011).

Diante do exposto, fica evidente a relevância dos mastócitos na regulação de diversos mecanismos da homeostase humana, incluindo a sua participação nos mecanismos de remodelação óssea. Da mesma forma, a gestação em ambiente hiperglicêmico afeta inúmeros órgãos e tecidos, tanto na vida intrauterina, quanto pós-uterina. Este estudo avaliou, por meio da quantificação de mastócitos presentes na área de reparo ósseo, se há alteração na presença dessas células em filhotes que foram gerados em ambiente hiperglicêmico, podendo haver correlação entre esses fatores e o processo de regeneração óssea.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo avaliar a quantidade de mastócitos em área de reparo ósseo de filhotes de mães diabéticas

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a quantidade de mastócitos presentes em área de defeito ósseo confeccionado nos fêmures dos animais com 60 dias de idade no período experimental de 3 e 7 dias após a cirurgia.
- Comparar a quantidade de mastócitos presentes na área de reparo ósseo dos filhotes de mães diabéticas e saudáveis.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Caracterização da amostra

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

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

Para a indução do diabetes foi realizada a administração da droga 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. Para a indução do diabetes, os animais ficaram de jejum por cerca de 24 horas. Após 2 dias da indução, foi coletada 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 tiveram 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 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 Não diabético (n=5):** filhotes machos de 60 dias de mães que receberam injeção intraperitoneal de Aloxana (100 mg/kg) (*Sigma-Aldrich*), mas que não ficaram diabéticas.
- **Grupo Diabético (n=5):** filhotes machos de 60 dias de mães que ficaram diabéticas após indução com a Aloxana (100 mg/kg) (*Sigma-Aldrich*);

3.2 Procedimento cirúrgico

Os filhotes machos com 60 dias de vida foram submetidos ao procedimento cirúrgico para confecção do defeito ósseo. Estes foram submetidos à anestesia por via intraperitoneal com 0,07ml/100g do relaxante muscular cloridrato de xilazina 2%, e 0,1ml/100g do anestésico e analgésico cloridrato de quetamina 10%. Foi realizada a tricotomia da região coxofemoral esquerda seguida de 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.

Foi realizada uma incisão contínua longitudinal com 2 cm de extensão para acessar o fêmur esquerdo. Após a divulsão da musculatura até a exposição do periósteo, foi realizada a incisão e descolamento dessa membrana ao longo da área óssea a ser exposta. Com o objetivo de padronizar a área a ser manipulada, apenas de modo visual, o fêmur foi delimitado em três porções (superior, mediana e inferior), sendo a região mediana, o local de eleição para a realização do defeito ósseo (Figura 1).

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



Fonte: Félix, 2019

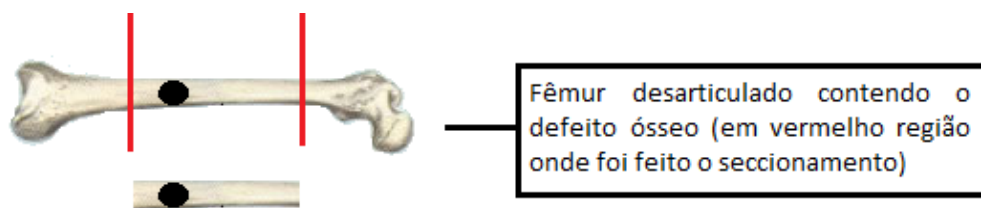
O defeito ósseo foi confeccionado com uma broca esférica nº 3 sob irrigação abundante com solução fisiológica estéril de cloreto de sódio a 0,9%. A referência de

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

Após 3 e 7 dias de cirurgia, os animais foram submetidos à eutanásia 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 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. As amostras foram desmineralizadas em solução de ácido fórmico a 10%, e, então, processadas 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.



Fonte: Félix, 2019

Foram realizados cortes histológicos de cada amostra, os quais foram corados com Hematoxilina e Eosina para análise histológica qualitativa, Tricrômico de Mallory para análise histomorfométrica e Azul de Toluidina para contagem de mastócitos.

3.4 Coloração com Azul de Toluidina

Os cortes histológicos foram submetidos a 3 banhos de xilol com duração de 15 minutos cada. Posteriormente, foi realizada a reidratação dos cortes com banhos sequenciais de álcool absoluto (3 vezes), 95%, 85% e 70%, sendo 1 minuto em cada. Depois os cortes foram lavados em água corrente durante 10 minutos, seguido de banho em água destilada durante 5 minutos.

Os cortes foram colocados em solução tampão fosfato citrato com pH 3,0 durante 5 minutos, seguido de banho com corante azul de toluidina 0,5% durante 3 minutos. Procedeu-se o enxágue no tampão fosfato citrato pH 3,0 para retirada do excesso de corante.

Foi realizada a desidratação dos cortes em banhos sequenciais de álcool 95%, álcool absoluto (3 vezes) durante 2 segundos em cada. Em seguida foram realizados 3 banhos de xilol durante 10 minutos em cada. As lâminas foram montadas com lamínula usando goma de damar e colocadas em estufa para secagem.

Os cortes histológicos foram avaliados por um observador calibrado e o mesmo procedeu a contagem dos mastócitos em cada amostra.

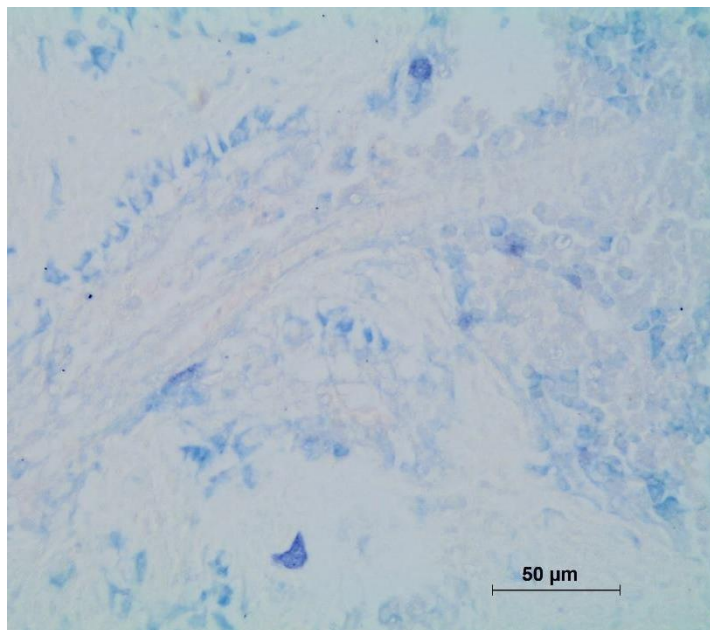
3.5 Análise Estatística

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 Kruskal – Wallis. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

Os cortes histológicos foram satisfatoriamente corados pelo azul de toluidina que evidenciou os mastócitos na coloração púrpura, devido a propriedade de metacromasia dos seus grânulos citoplasmáticos (Figura 3).

Figura 3 – Corte histológico corado com azul de toluidina evidenciando mastócitos corados em púrpura (aumento 40x).



Fonte: A autora.

Após a contagem dos mastócitos presentes na área de reparo ósseo de cada amostra, foi observada uma grande variação dos valores entre os grupos experimentais e também dentro do mesmo grupo. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 1.

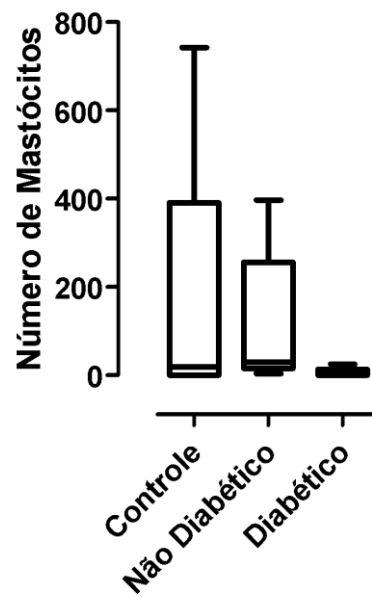
Tabela 1 – Quantidade de mastócitos nos animais dos grupos diabéticos, não diabéticos e controle nos períodos de 3 e 7 dias.

GRUPO / PERÍODO	3 DIAS	7 DIAS
CONTROLE	0	0
	16	0
	19	18
	39	94
	742	134
NÃO DIABÉTICOS	03	01
	29	02
	30	58
	116	131
	396	590
DIABÉTICOS	0	0
	0	0
	0	03
	01	04
	35	21

Como os dados não apresentaram distribuição normal, a análise estatística foi realizada com o teste não paramétrico de Kruskal – Wallis.

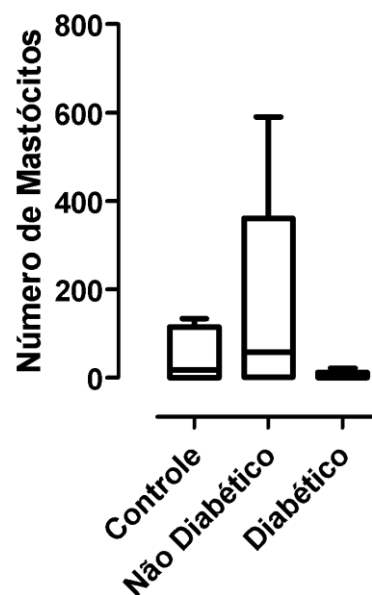
Houve uma tendência à redução do número de mastócitos no grupo diabético em 3 dias em relação aos demais grupos ($P = 0,058$), o que sugere possível significado biológico no grupo diabético (Figura 4).

Figura 4. Diagramas de caixa (*boxplots* ou *box and whisker plot*) do número de mastócitos na área do reparo ósseo dos grupos controle, não diabético e diabético após 3 dias de lesão. $P = 0,058$ (teste de Kruskal-Wallis).



Já no período de 7 dias não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais ($P = 0,36$) (Figura 5).

Figura 5. Diagramas de caixa (boxplots ou box and whisker plot) do número de mastócitos na área do reparo ósseo dos grupos controle, não diabético e diabético após 7 dias da lesão. $P = 0,36$ (teste de Kruskal-Wallis).



5 DISCUSSÃO

Compreender o papel dos mastócitos na remodelação óssea é crucial para desvendar os mecanismos subjacentes a condições como osteoporose e outras enfermidades ósseas. Apesar da acumulação de mastócitos ao redor dos vasos sanguíneos ser amplamente documentada, o processo exato pelo qual influenciam a remodelação óssea ainda é em grande parte desconhecido.

Estudos indicam que essas células desempenham um papel fundamental no recrutamento de células da circulação para os tecidos conjuntivos, incluindo os progenitores osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea. Esta complexa interação entre mastócitos e células circulantes pode oferecer perspectivas valiosas sobre os mecanismos reguladores da homeostase óssea e possíveis alvos terapêuticos para condições associadas à desregulação da remodelação óssea (CHIAPPETTA; GRUBER, 2006; JOHANSSON et al., 1996).

De acordo com a literatura, há uma possível associação entre mastócitos e osteoblastos, fundamentada em evidências que demonstram a produção de Fator de Crescimento de Células-Tronco (SCF) pelos osteoblastos. O SCF é reconhecido como um fator de crescimento crucial para a diferenciação e proliferação de mastócitos. No entanto, apesar dessas observações, o papel exato dos mastócitos na osteogênese permanece incompletamente compreendido (MAXIMINIANO, 2014).

Estudos sugerem que o diabetes mellitus tem um impacto nos processos inflamatórios do corpo, afetando os mecanismos de reparo tecidual, o que inclui o tecido ósseo, pois este se remodela constantemente (KRAUSE et al., 2003; RETZEPI & DONOS, 2010). Os filhos gerados em ambiente hiperglicêmico partilham dessas características visto que a glicose presente no sangue tem a capacidade de atravessar a placenta e constituir a matriz que será fonte de nutrição para as células fetais (PERSAUD, 2007). Este presente estudo utilizou amostras de áreas de reparo ósseo em filhotes que foram gerados em ambiente hiperglicêmico a fim de realizar a avaliação da quantidade de mastócitos presente nessas amostras, e verificar possível associação entre a quantidade de mastócitos, o reparo ósseo e o ambiente hiperglicêmico.

Em estudo realizado com a mesma base de amostras deste presente estudo, se observou, a partir da análise histomorfométrica da área da lesão óssea após 7 dias, uma redução na porcentagem de matriz óssea neoformada nos filhotes cujas mães eram diabéticas, em comparação com os demais grupos (FÉLIX, 2019). A tendência à redução do número de mastócitos no grupo diabético, observada no presente estudo, pode estar associada à essa redução de formação de matriz óssea. No entanto, vale ressaltar que a análise estatística mostrou uma tendência ($P = 0,058$) à redução do número de mastócitos no grupo diabético, apenas no período de 3 dias. Isso sugere que os mastócitos são células importantes no período inicial do processo de reparo ósseo, já que em 7 dias não houve diferença no número de mastócitos entre os grupos analisados. Provavelmente isso esteja relacionado ao processo inflamatório no período inicial do reparo ósseo. A literatura aponta que devido à sua alta sensibilidade aos sinais de alerta gerados após o trauma, como DAMPs (Padrões Moleculares Associados ao Dano), e anafilatoxinas do complemento, os mastócitos desempenham um papel crucial na resposta inflamatória precoce e na cicatrização de fraturas induzidas por trauma, sendo importantes mediadores na orquestração inicial da resposta inflamatória após lesões traumáticas. (RAGIPOGLU et al.; 2022). No presente estudo, o valor de P próximo à significância no período de 3 dias provavelmente sugere a necessidade de aumentar o n amostral.

Em outro estudo realizado em modelo animal, com análise realizada após 7 dias da lesão, foi observado que o diabetes afetou negativamente a função dos osteoblastos, resultando em uma redução na neoformação óssea. Isso foi evidenciado pela observação de que no grupo diabético, a estrutura óssea trabecular apresentava-se mais fina em comparação com os grupos não diabéticos. Além disso, houve redução do número de mastócitos nos grupos que apresentaram menor percentual de neoformação da matriz óssea, assim como o aumento da quantidade de mastócitos no grupo com a evidência de uma regeneração óssea mais avançada sugerindo que essas células desempenharam um papel ativo no processo de regeneração óssea (LINHARES et al. 2019).

Tal evidência também corrobora o resultado do presente estudo, no entanto, vale a ressalva de que o estudo supracitado, foi realizado em animais diabéticos, diferente deste estudo que avaliou a prole de mães diabéticas. Não foram encontrados

trabalhos semelhantes nas bases de dados, que avaliaram o reparo ósseo em filhotes de mães diabéticas, o que limita a análise comparativa.

6 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos, foi observada uma tendência à redução do número de mastócitos na área de reparo ósseo no período de 3 dias no grupo diabético sugerindo que este fato possa estar associado a menor porcentagem de matriz óssea neoformada e que a hiperglicemia materna tem reflexo prejudicial no reparo ósseo apresentado pela prole. No entanto, são necessários outros estudos a fim de elucidar os mecanismos pelos quais se dá essa associação.

REFERÊNCIAS

1. CHIA, Shin Li et al. Mast cell ontogeny: From fetal development to life-long health and disease. **Immunological reviews**, 2023.
2. CHIAPPETTA, N.; GRUBER, B. The Role of Mast Cells in Osteoporosis. Seminars In Arthritis and Rheumatism, **Stony Brook New York**, v. 36, n. 1, p.32-36, mar. 2006.
3. DA SILVA, Elaine Zayas Marcelino; JAMUR, Maria Célia; OLIVER, Constance. Mast cell function: a new vision of an old cell. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 62, n. 10, p. 698-738, 2014.
4. FONG, Michael; CRANE, Jonathan S. Histology, mast cells. 2018.
5. HUANG, S.; LU, F.; CHEN, Y.; HUANG. B.; LIU M. Mast Cell Degranulation in Human periodontitis. **J Periodontol.** 2013 Feb;84(2):248-55. doi:10.1902/jop.2012.120066. Epub 2012 Apr 17.
6. LESCLOUS, Ph et al. Histamine participates in the early phase of trabecular bone loss in ovariectomized rats. **Bone**, v. 34, n. 1, p. 91-99, 2004.
7. OKAYAMA, Y.; KAWAKAMI, T. Development, migration, and survival of mast cells. **Immunologic Research, Yokohama, Japan**, v. 34, n. 2, p.97-115, jul. 2006.
8. SMITH, Rosealee et al. Activation of protease-activated receptor-2 leads to inhibition of osteoclast differentiation. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 19, n. 3, p. 507-516, 2004.
9. SOLIMANDO, Antonio Giovanni; DESANTIS, Vanessa; RIBATTI, Domenico. Mast Cells and Interleukins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 22, p. 14004, 2022.
10. WELLER, Charlotte L. et al. Mast cells in health and disease. **Clinical science**, v. 120, n. 11, p. 473-484, 2011
11. HARTLING, Lisa et al. Benefícios e malefícios do tratamento do diabetes mellitus gestacional: uma revisão sistemática e meta-análise para a Força-Tarefa de Serviços Preventivos dos EUA e o Escritório de Aplicações Médicas de Pesquisa dos Institutos Nacionais de Saúde. **Anais de medicina interna**, v. 159, n. 2, pág. 123-129, 2013.
12. VAN ASSCHE, Frans A.; HOLEMANS, Kathleen; AERTS, Leona. Consequências a longo prazo para os filhos do diabetes durante a gravidez. **Boletim médico britânico** , v. 60, n. 1, pág. 173-182, 2001.
13. Plagemann, A., Harder, T., Kohlhoff, R. et al. Tolerância à glicose e secreção de insulina em filhos de mães com DMID pré-gestacional ou diabetes gestacional. **Diabetologia** 40, 1094–1100 (1997)

14. M. Lampl e P. Jeanty, “A exposição ao diabetes materno está associada a padrões alterados de crescimento fetal: uma hipótese sobre a alocação metabólica para o crescimento sob condições hiperglicêmicas-hipoxêmicas”, **American Journal of Human Biology**, vol. 16, não. 3, pp. 237–263, 2004
15. N. Halfon, PA Verhoef e AA Kuo, “Antecedentes da infância para doenças cardiovasculares em adultos”, **Pediatrics in Review**, vol. 33, não. 2, pp. 51–60, 2012.
16. 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.
17. Baird J, Kurshid M, Kim M, Harvey N, Dennison E, Cooper C (2011) O peso ao nascer prevê a massa óssea na idade adulta? Uma revisão sistemática e meta-análise. *Osteoporos International* 22: 1323-1334.
18. 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.
19. MAXIMILIANO, W. M. A. Caracterização do papel dos mastócitos na osteogênese. (Doutorado), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Brasil, 2011.
20. KRAKAUER, J. C. *et al.* Bone loss and bone turnover in diabetes. **Diabetes**, v. 44, n. 7, p. 775-782, 1995.
21. PERSAUD, O. DD. Maternal diabetes and the consequences for her offspring. **J Devel Disabilities**, v. 13, n. 1, p. 101-133, 2007.
22. FÉLIX, Thallys Rodrigues. Avaliação do reparo ósseo em filhotes gerados em ambiente hiperglicêmico. 2019.
23. RAGIPOGLU, Deniz et al. Mast cells drive systemic inflammation and compromised bone repair after trauma. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 883707, 2022.
24. LINHARES, Camila Rodrigues Borges et al. Melhoria da regeneração óssea em ratos diabéticos tipo I submetidos à oxigenoterapia hiperbárica. 2019.

ANEXO 1



Universidade Federal de Uberlândia

– Comissão de Ética na Utilização de Animais –

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado “Avaliação do desenvolvimento e reparo ósseo em filhotes de ratas Wistar diabéticas.”, protocolo nº 027/16, sob a responsabilidade de **Karen Renata Nakamura Hiraki** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião de **29 de Março de 2019**.

(We certify that the project entitled “Avaliação do desenvolvimento e reparo ósseo em filhotes de ratas Wistar diabéticas”, protocol 027/16, under the responsibility of Karen Renata Nakamura Hiraki - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of March 29th, 2019).

Vigência do Projeto	Início: 03/10/2016 Término: 31/12/2019
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Ratos Wistar
Número de animais	312
Peso / Idade	200g-350g adultos / 8g-250g filhotes/ 80g-150g filhotes
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem / Local	Biotério
Número da Autorização SISBIO	-
Atividade(s)	-

Alteração realizada: Ampliação do prazo de execução do projeto. Foi aprovado a alteração do prazo de término do projeto para 31/12/2019.

Uberlândia, 08 de Abril de 2019.

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro GirãoCoordenador da CEUA/UFU
Coordenador da CEUA/UFU