



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



NILSON FERREIRA DE OLIVEIRA NETO

**EFEITO DA INSULINOTERAPIA NA ESTRUTURA
MACROSCÓPICA, NAS PROPRIEDADES MECÂNICAS E NA
MICROARQUITETURA DE TÍBIAS EM RATOS DIABÉTICOS**

UBERLÂNDIA

2017

NILSON FERREIRA DE OLIVEIRA NETO

**EFEITO DA INSULINOTERAPIA NA ESTRUTURA
MACROSCÓPICA, NAS PROPRIEDADES MECÂNICAS E NA
MICROARQUITETURA DE TÍBIAS EM RATOS DIABÉTICOS**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Faculdade de
Odontologia da Universidade Federal
de Uberlândia, como requisito parcial
para obtenção do título de Cirurgião-
dentista (graduado em Odontologia).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Paula Dechichi

Coorientador: Ms. Pedro Henrique Justino Oliveira Limírio

UBERLÂNDIA

2017

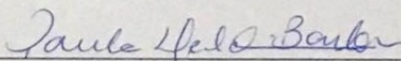


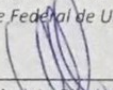
SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

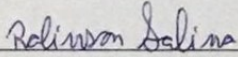
ATA DA COMISSÃO JULGADORA DA DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DO (A) DISCENTE **Nilson Ferreira de Oliveira Neto** DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA.

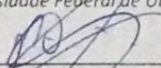
No dia **09 de novembro de 2017**, reuniu-se a Comissão Julgadora aprovada pelo Colegiado de Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para o julgamento do Trabalho de Conclusão de Curso apresentado pelo (a) aluno (a) **Nilson Ferreira de Oliveira Neto**, COM O TÍTULO: - **"EFEITO DA INSULINOTERAPIA NA ESTRUTURA MACROSCÓPICA, NAS PROPRIEDADES MECÂNICAS E NA MICROARQUITETURA DE TÍBIAS EM 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.

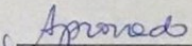
Uberlândia, 09 de novembro de 2017

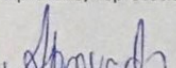

Profa. Dra. Paula Delchichi Barbar
Universidade Federal de Uberlândia – UFU

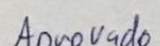

Profa. Dra. Mariete Roberto da Silva
Universidade Federal de Uberlândia – UFU

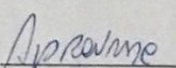

Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva
Universidade Federal de Uberlândia – UFU


Pedro Henrique Justino Oliveira Limirio
Aluno(a) de Graduação – PPGO/UFU


Aprovado/Reprovado


Aprovado/Reprovado


Aprovado/Reprovado


Aprovado/Reprovado

DEDICATÓRIA

Ao meu grande amigo **Deus**, por ter levado paz ao meu coração durante as minhas preces ansiosas e desesperadas. Por me ensinar o significado de resiliência e acreditar em mim durante a minha jornada.

Ao meu papai, **Amilton Vieira Coelho** e à minha mamãe, **Edsonia Alves de Oliveira** pelo amor ilimitado, por segurarem minhas mãos e me encorajarem a lutar, por serem a minha luz, os meus guias e melhores amigos.

Ao anjo e irmã **Bruna Vieira de Oliveira** por toda ajuda e carinho incondicional. Por me levar diariamente para caminhar, com propriedade, na rua da sensibilidade.

Aos meus padrinhos queridos, **Lucineide Vieira Coelho** e **Ailton Vieira Coelho**, e também, à minha vovó **Zenaide Vieira Ramos** e aos tios, primos e a toda minha família incrível, por cada oração e energias positivas enviadas a mim.

Ao meu namorado, **Gustavo Ferreira Rodrigues** por iluminar a minha vida com o seu sorriso, por acalmar o meu coração com um abraço nos momentos de confusão e por me incentivar a buscar o meu melhor.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, **Prof^a. Dr^a Paula Dechichi** por ter aberto portas para mim e me apresentado um mundo novo. Por ter me ensinado o significado de ética, profissionalismo e humildade. Pela confiança e por todo o carinho a mim concedidos.

Ao meu coorientador, **Ms. Pedro Henrique Justino Oliveira Limório** pela companhia, paciência, risadas e ajuda extrema na conclusão desse trabalho.

Aos companheiros do Departamento de Histologia, **Dr. Gustavo Davi Rabelo e Jéssyca Oliveira Venâncio** por toda a atenção, solicitude e parceria.

AGRADECIMENTOS

À minha amada **Liga de Odontopediatria (LiOP)** e todos os seus integrantes, os quais me renovam semanalmente a cada encontro, fortalecendo o meu amor pela área.

Ao **Departamento de Patologia Bucal da Universidade Federal de Uberlândia**, composta pelos Professores Sérgio Vitorino e Adriano Loyola, por me motivarem a seguir os meus sonhos e seguir em busca do enriquecimento do conhecimento acadêmico e de minhas virtudes.

Às professoras Vivian Alonso e Letícia Filice, às pós-graduandas Cristiane Angélico e Isabela Lemos pertencentes ao **Grupo de Pesquisa em Células-Tronco (GEP-CT)**, por terem me recebido de braços abertos e por me apresentarem à apaixonante cultura celular.

À **Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FO-UFRGS)** por ter me proporcionado uma experiência única ao lado da encantadora Prof^a. Manoela Domingues Martins e com o grupo Manoeletes.

Aos meus queridos colegas da **77ª Turma de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia**, por todos os momentos memoráveis que compartilhamos, por terem compreensão comigo enquanto representante e por marcarem o meu coração.

Às **Professoras Alessandra Castro, Karen Hiraki e Maria Antonieta Veloso** pela amizade, pelas emoções compartilhadas, pelas conversas intensas e por todo o carinho que construímos durante esses anos.

Aos **melhores amigos** que Deus me presenteou, em especial, Raquel Santos Sousa, Stephany Yasmine Andrade de Paula e Camila Raíssa Oliveira Gontijo, as quais têm todo o meu amor e admiração pelas mulheres que são. Ao Rodrigo Martins, João Marcos Machado, Yan Kleber, Rafael Correa, Paula Silva, Carolina Nunes e Clara Saraiva que transformaram todas as preocupações em música boa e longas conversas.

À **Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia (FOUFU)**, por ter sido a minha casa nos últimos anos e aos professores e funcionários, por toda a ajuda prestada.

“Eu me esforço para ser cada dia melhor, pois bondade também se aprende. Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar. Porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir.”

- *Cora Coralina*

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. MATERIAIS E MÉTODOS	14
2.1 Indução de Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1).....	14
2.2 Obtenção dos espécimes	15
2.3 Análise Macroscópica	15
2.4 Microtomografia computadorizada (μCT).....	16
2.5 Ensaio mecânico	18
2.6 Análise Estatística dos dados	19
3. RESULTADOS	20
3.1 Análise Macroscópica	20
3.2 Microtomografia computadorizada (μCT).....	24
3.3 Ensaio mecânico	25
4. DISCUSSÃO	28
5. CONCLUSÃO.....	31
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
7. ANEXOS	36
7.1 Diretrizes para publicação na revista Horizonte Científico.....	36
7.1.1 Formatação do texto	36
7.1.2 Formato do artigo	37

EFEITO DA INSULINOTERAPIA NA ESTRUTURA MACROSCÓPICA, NAS PROPRIEDADES MECÂNICAS E NA MICROARQUITETURA DE TÍBIAS EM RATOS DIABÉTICOS

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a estrutura macroscópica, a microarquitetura e as propriedades mecânicas de tíbias em ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1). Nove ratos foram divididos em três grupos (n=3): Saudável (S), Diabético (D) e Insulinizado (I). O DM1 foi induzido, nos animais dos grupos D e I, por meio de injeção endovenosa de estreptozotocina (60mg/kg) e no grupo I foi administrado insulina diariamente (4UI). Os animais foram sacrificados 35 dias após a indução do DM1. As tíbias foram removidas e realizaram-se as seguintes análises: macroscópica, microtomografia computadorizada (μ CT) e teste de flexão a três pontos. Na análise macroscópica foram medidos o comprimento (distância próximo-distal) e espessura (ântero-posterior e médio-lateral) da região central e próxima às epífises das tíbias. Na análise por μ CT os parâmetros avaliados foram: porosidade cortical, densidade mineral óssea e espessura cortical. No teste de flexão a três pontos foram analisados: força máxima, energia e rigidez. A análise macroscópica mostrou que o grupo D apresentou medidas menores de comprimento (PD) e espessura (AP e AP-P) quando comparado com S e I. Também foram observadas medidas maiores nas espessuras ML e AP-D no grupo I comparado ao grupo D. Na análise por meio de μ CT, o grupo I apresentou espessura cortical maior em relação ao grupo D. No ensaio mecânico, a força máxima foi menor no grupo D comparado aos demais grupos. Pode-se concluir que o DM1 reduz o crescimento e a resistência mecânica de tíbias, e a insulinoterapia, em ratos diabéticos, melhora o crescimento ósseo longitudinal e em espessura tornando-o semelhante ao dos animais normoglicêmicos.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus tipo 1; Tibia; Fenômenos biomecânicos; Insulina.

EFFECT OF INSULINOTHERAPY ON MACROSCOPIC STRUCTURE, MECHANICAL PROPERTIES AND MICROARCHITECTURE OF TIBIA IN DIABETIC RATS

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate macroscopic structure, mechanical properties and microarchitecture of tibiae in rats with type 1 diabetes mellitus (T1DM). Nine animals were divided into three groups (n=3): Healthy (H), Diabetic (D) and Insulinized (I). T1DM was induced in D and I groups through administration of intravenous streptozotocin (STZ) (60mg/kg) and in group I, insulin was administered daily (4UI). The animals were euthanized 35 days after T1DM induction. Then, the tibiae were removed and different analyses were performed: Macroscopic, micro-computed tomography (μ CT) and three-point bend test. In Macroscopic analysis, it was measured the length (proximal-distal) and thickness (antero-posterior and lateral-medial), in the middle of the diaphysis and near the distal and proximal epiphysis. The parameters evaluated in μ CT were: closed porosity, tissue mineral density and cortical thickness. The three-point bend test analyses: maximum strength, energy and stiffness. The macroscopic analysis showed that group D presented smaller measures of length (PD) and thicknesses (AP e AP-P) compared to S and I. Besides, larger measurements were also observed in ML and AP-D thicknesses in group I compared to group D. In the analysis of μ CT, group I presented greater cortical thickness in relation to group D. In the mechanical analyses, the strength was lower in group D compared to the other groups. According to the results, it is possible to conclude that T1DM reduces bone growth and mechanical resistance, and insulin therapy in diabetic rats improves longitudinal and thick bone growth making it similar to normoglycemic animals.

Key words: Type 1, Diabetes Mellitus; Tibiae; Biomechanical Phenomena; Insulin.

1. INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus é uma complexa desordem crônica que se caracteriza pela ausência absoluta ou relativa de insulina (IDF Diabetes Atlas, 2015). Essa situação compromete a sinalização da insulina e aumento dos níveis séricos de glicose que desencadeia a hiperglicemia (Testa et al., 2016). O Diabetes Mellitus do Tipo 1 (DM1) é causado por mecanismo autoimune, pouco conhecido, no qual células do sistema imunológico promovem a destruição das células beta das ilhotas de Langerhans do pâncreas, responsáveis pela secreção de insulina. O diagnóstico, geralmente, é feito em crianças e adultos jovens (IDF Diabetes Atlas, 2015).

Em 2015, estima-se que cinco milhões de pessoas morreram pela doença. Nos dias atuais, aproximadamente 415 milhões de pessoas possuem essa alteração metabólica e acredita-se que em 2040 esse número será de 642 milhões (IDF Diabetes Atlas, 2015). Os sinais e sintomas iniciais da doença estão relacionados ao desequilíbrio de eletrólitos e líquidos do corpo, sendo possível observar a polidipsia, poliúria, polifagia, visão turva e perda de peso (Shalaby et al., 2017). Entretanto, quando o quadro clínico se cronifica pode ser que ocorra o desenvolvimento de patologias microvasculares na retina, nos glomérulos renais, em nervos periféricos (Testa et al., 2016; Kronenberg et al., 2010) e alterações no tecido ósseo (Wang et al., 2016).

O tecido ósseo apresenta alta dinamicidade devido à atuação de células envolvidas nas diferentes fases de seu desenvolvimento. As células que exercem a função de síntese e secreção da matriz orgânica são denominadas osteoblastos, que secretam, principalmente, colágeno do tipo I. Durante a formação da matriz, alguns osteoblastos ficam retidos nesta e recebem o nome de osteócitos, os quais possuem prolongamentos citoplasmáticos conectados por junções comunicantes, responsáveis pela manutenção da matriz (Katchburian e Arana, 2012).

Por sua vez, os osteoclastos, originados de células oriundas dos tecidos hematopoiéticos, são células gigantes multinucleadas responsáveis pela reabsorção da matriz óssea em condições fisiológicas e patológicas. Dessa forma, a manutenção da homeostase tecidual e remodelação óssea são realizadas por meio da atuação conjunta dos diferentes tipos de células ósseas (Katchburian e Arana, 2012).

A formação óssea depende de dois processos biológicos de ossificação. O crescimento longitudinal dos ossos longos ocorre, principalmente, por ossificação endocondral. Esse processo tem seu início a partir de uma peça de cartilagem hialina, a qual sofre mudanças, ocorrendo hipertrofia dos condrócitos, diminuição da matriz cartilaginosa a finos tabiques, mineralização dessa matriz e apoptose dos condrócitos. Após essa fase, as cavidades antes ocupadas pelos condrócitos, são penetradas por vasos sanguíneos e células osteogênicas vindas do conjuntivo subjacente. Tais células diferenciam-se em osteoblastos, os quais secretam matriz óssea sobre os tabiques de cartilagem calcificada, dando origem ao osso primário (Junqueira e Carneiro, 2013).

O crescimento em espessura depende da ossificação intramembranosa, a qual ocorre a partir do periósteo. Com início em uma membrana de tecido conjuntivo, ocorre diferenciação de células mesenquimatosas em osteoblastos, que produzem a matriz osteóide. Esta envolve as células ósseas e esse mecanismo origina os osteócitos. Devido ao aparecimento de inúmeros grupos celulares que darão origem aos osteoblastos, ocorre confluência das traves ósseas formadas, conferindo ao osso um aspecto esponjoso, originando o tecido ósseo primário. Entre essas traves há a formação de cavidades que são invadidas por vasos sanguíneos e células mesenquimatosas indiferenciadas, que irão originar a medula óssea (Junqueira e Carneiro, 2013).

A manutenção da qualidade óssea e o crescimento dependem do processo de remodelação, que ocorre devido a dois mecanismos opostos, porém vinculados: a formação e a reabsorção da matriz óssea. O bom funcionamento desse processo depende da harmonia entre os dois fenômenos, permitindo assim, a renovação e remodelação tecidual, a qual é mantida em longo prazo por uma série de fatores, como controle hormonal, fatores físicos e fatores humorais locais (Junqueira e Carneiro, 2013). Diversas condições como idade, ação de drogas e o DM1, podem alterar o equilíbrio entre os dois processos fazendo com que um predomine sobre o outro (Rubin, 2016).

O DM compromete o fluxo sanguíneo e a neovascularização no tecido ósseo, fazendo com que ocorra diminuição na formação de osteoblastos, falhas no processo de remodelação e consequente redução da qualidade óssea; prejuízos estes intimamente associados à cronicidade da doença e que podem levar a danos relacionados à microarquitetura e às propriedades mecânicas do osso desses pacientes (Czernik, 2017).

Observa-se certa vulnerabilidade no osso de pacientes diabéticos (Paccou et al., 2016) e baixa resistência, principalmente dos ossos longos: coluna vertebral e ossos do quadril (Adami, 2009; Isidro, 2010). Acredita-se que isso esteja associado ao acúmulo de produtos de glicação avançada (AGEs) no osso e alterações na rede de fibrilas colágenas (Czernik, 2017), assim como elevados índices de porosidade cortical (Chandran, 2017) e redução da densidade mineral óssea (Xu et al., 2016).

Além de auxiliar na captação de glicose, a insulina é fundamental para o metabolismo ósseo, especialmente na diferenciação e no adequado funcionamento das células ósseas (Czernik, 2017). Esse hormônio anabólico parece estar diretamente associado ao processo de reparo tecidual e, além disso, atua incorporando aminoácidos ao osso, aumenta a síntese de nucleotídeos pelos osteoblastos e estimula a produção de colágeno (Morais, 2007).

Com a finalidade de promover níveis adequados de glicose no organismo, a insulinoterapia é utilizada como tratamento para controlar as complicações do DM1, a qual favorece o controle das complicações da doença no osso, como osteopenia, prejuízos na neoformação, reabsorção e risco de fratura (Fulzele, 2012). Estudos observaram redução da resistência mecânica de fêmures de ratos diabéticos comparada ao grupo tratado com insulina diariamente (Hou, 1993). Nyman et. al (2017) ressaltou que a insulinoterapia é dose-dependente e também influencia positivamente na preservação da microarquitetura cortical e trabecular de fêmures de ratos diabéticos.

Diante dos efeitos deletérios do DM1 no tecido ósseo e os possíveis benefícios da insulinoterapia para minimizar as alterações, esse estudo teve como objetivo analisar as alterações ósseas em diferentes níveis hierárquicos através da avaliação da estrutura macroscópica, da microarquitetura e das propriedades mecânicas de tíbias em ratos com DM1 submetidos à insulinoterapia.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo, foram utilizados nove ratos machos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, clinicamente saudáveis com peso entre 200 e 250g. Os animais foram mantidos no depósito de animais 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 (026/14).

Foram utilizadas no estudo as tíbias esquerdas e direitas, totalizando seis tíbias por grupo. Os animais foram divididos em três grupos iguais (n=3): Saudável (S); Diabético (D) e Insulinizado (I). O DM1 foi induzido, nos animais dos grupos D e I, por meio de injeção endovenosa de estreptozotocina (STZ) (60mg/kg). O grupo I recebeu 4UI/dia de insulina (1UI de manhã e 3UI à tarde) durante todo o período experimental. Os animais foram sacrificados 35 dias após a indução do DM1. Em seguida, as tíbias foram removidas e congeladas a -20°C até o momento das análises laboratoriais. As amostras foram descongeladas em PBS em geladeira 24h antes das análises. Em seguida, foi realizada avaliação macroscópica dos espécimes, microtomografia computadorizada e teste de flexão a três pontos.

2.1 Indução de Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1)

A indução do DM1 nos animais foi feita a partir da administração de STZ (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA) por via intravenosa na dosagem de 60mg/kg de peso corporal diluída em tampão citrato.

O protocolo de indução de DM1 iniciou-se mantendo os ratos em jejum absoluto durante 24h. Após esse período, foi realizada a anestesia por via intraperitoneal utilizando 7mg/Kg do relaxante muscular cloridrato de xilazina 2% e 100mg/Kg do anestésico e analgésico cloridrato de cetamina 10%. Em seguida, a STZ foi administrada por via endovenosa através de punção da veia peniana.

Posteriormente, os animais foram acondicionados em caixas com maravalha em estantes climatizadas, com ração e água *ad libitum*. Para confirmação da hiperglicemia, utilizou-se um glicosímetro (AccuCheck Active, Roche, EU, Switzerland), após 24h, 7,

14, 21 e 28 dias depois da indução, coletando-se uma gota de sangue da cauda dos animais. Os ratos que apresentaram glicemia maior que 250 mg/dl foram considerados diabéticos.

2.2 Obtenção dos espécimes

Os animais foram submetidos à eutanásia 35 dias após a indução do modelo experimental de DM1, por meio de aprofundamento anestésico e deslocamento cervical, seguindo os princípios da Declaração Universal dos Direitos dos Animais. As tíbias foram removidas por desarticulação e imediatamente acondicionadas em gaze embebida em solução fisiológica e congeladas em freezer (-20°C), até o momento da realização das análises.

2.3 Análise Macroscópica

Utilizando paquímetro digital de precisão (Figura 1), foram obtidas medidas das tíbias em comprimento (próximo-distal) e em espessura (ântero-posterior e médio-lateral) da região central da diáfise e das epífises proximal e distal (Figura 2).



Figura 1: Paquímetro digital medindo comprimento próximo-distal de tíbia.

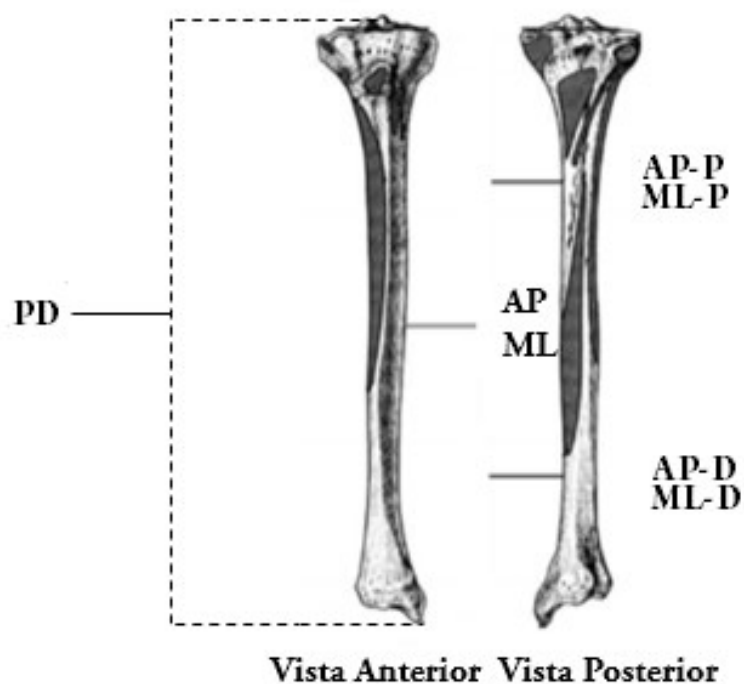


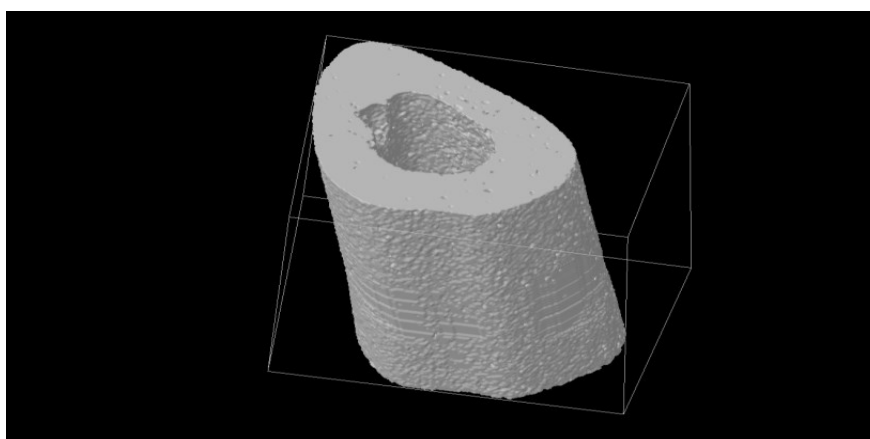
Figura 2: Parâmetros macroscópicos avaliados nos diferentes grupos: Comprimento próximo-distal (PD) e espessuras ântero-posterior (AP) e médio-lateral (ML) da diáfise, assim como, espessura ântero-posterior (AP-P) e médio-lateral (ML-P) da epífise proximal e espessura ântero-posterior (AP-D) e médio-lateral (ML-D) da epífise distal.

2.4 Microtomografia computadorizada (μ CT)

Assim que as medidas macroscópicas foram obtidas, as amostras foram posicionadas no microtomógrafo (μ CT – 1272, Bruker, Kontich, Belgium) (Figura 3). Foram utilizados os parâmetros mostrados na tabela 1, onde cada escaneamento durou aproximadamente 42 minutos, na resolução de 16 μ m. O *software CTan* gera um volume tridimensional (Figura 4) a partir de cortes microtomográficos seriados, onde cada pixel corresponde a um voxel isotrópico. A partir desse volume foi realizada análises da Porosidade Cortical (Ct.Po, %), Densidade Mineral Óssea (Ct.BMD, g/cm³) e Espessura Cortical (Ct.Th, μ m) das tíbias. Após o escaneamento, as tíbias foram mantidas em PBS em geladeira.

Tabela 1: Configurações do microtomógrafo para análise dos espécimes do estudo.

Parâmetros	Valores
Fonte de raios X	50kvp, 800 Ma
Número de cortes (slices)	200
Lower grey threshold	95
Upper grey threshold	255
Filtro	Al 0.5 + Cu 0.038
Resolução (pixels) (μm)	16

**Figura 3:** Microtomógrafo (μCT –Skyscan 1272, Bruker, Kontich, Belgium).**Figura 4:** Imagem do volume ósseo reconstruído por sobreposição dos cortes microtomográficos.

2.5 Ensaio mecânico

Quatro horas antes do ensaio mecânico, as tíbias foram retiradas da geladeira e permaneceram em temperatura ambiente até o início do teste. Cada tíbia foi submetida a ensaio mecânico de flexão a três pontos até a ruptura, usando máquina de ensaios de materiais (EMIC DL 2000, EMIC Equipamentos e Sistemas de Ensaio Ltda, São José dos Pinhais, Brasil). Cada tíbia foi posicionada horizontalmente (Figura 5) sobre dois apoios do dispositivo da máquina a uma distância de 16 mm, sendo a epífise proximal da tíbia voltada para o lado esquerdo e a distal para o lado direito. A ponta aplicadora de carga (acoplada à célula de carga EMIC com capacidade de 50kgf) foi posicionada no centro da tíbia e foi aplicada carga na direção vertical a uma taxa de carregamento constante de 1,0 mm / min até o momento de ruptura do osso.

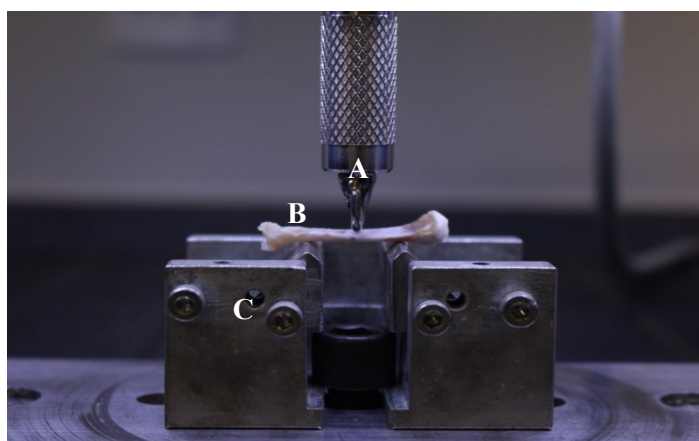


Figura 5: Posicionamento da tíbia na máquina de ensaio mecânico para realização do ensaio de flexão a três pontos, com célula de carga de 50 kgF. Observa-se a ponta aplicadora de carga (A); tíbia posicionada (B); suporte com dispositivo de assentamento da amostra (C).

Cada incremento de carga aplicada à tíbia registrou sua deformação correspondente, os quais originaram o gráfico carga X deformação. A partir dos dados provenientes do gráfico obtiveram-se as propriedades mecânicas, como força máxima (F_{max} ; N), rigidez (N/mm) e energia absorvida (mJ). O cálculo da energia absorvida equivale à área abaixo da curva carga X deformação na região elástica, delimitada pelo triângulo OAB (Figura 6).

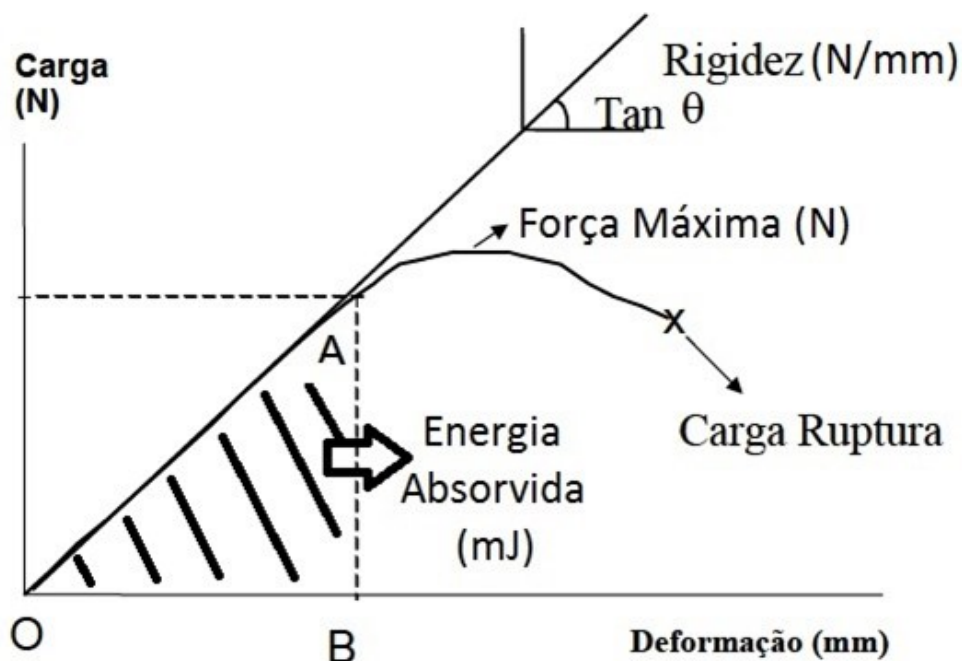


Figura 6: Gráfico carga X deformação utilizado para determinação das propriedades mecânicas, ilustrando a força máxima, a rigidez a partir do cálculo da inclinação da curva AO- ($\tan \theta$) e a área da região elástica AOB que corresponde à energia absorvida pelo material na fase elástica.

2.6 Análise Estatística dos dados

Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade (teste de Kruskal Wallis). Em seguida foi aplicado o teste ANOVA ONE-WAY seguido do teste de Tukey, sendo a diferença estatística considerada quando $\alpha < 0,05$. As análises foram realizadas com o programa estatístico Sigma Plot versão 13.1 (Systat Software Inc, San Jose, CA, EUA).

3. RESULTADOS

Os animais do grupo diabético (D) apresentaram índices glicêmicos médios de 476 mg/dl, redução de peso nas primeiras semanas, polifagia, polidipsia e poliúria, constatadas a partir do aumento no consumo de ração, água e excreção urinária, respectivamente. O grupo insulínizado apresentou média glicêmica de 224,8 mg/dl (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2: Médias das glicemias (mg/dl) relacionadas aos animais do grupo diabético (D) durante o período experimental.

Animais	Média das Glicemias (mg/dl) - Grupo D
1	486,6
2	498
3	443,5
Média	476

Tabela 3: Médias das glicemias (mg/dl) relacionadas aos animais do grupo insulínizado (I) durante o período experimental.

Animais	Média das Glicemias (mg/dl) - Grupo I
4	195,1
5	233,6
6	245,8
Média	224,8

3.1 Análise Macroscópica

Na análise macroscópica, o grupo D apresentou medidas menores de comprimento PD e espessuras AP e AP-P comparado aos grupos S e I ($P < 0,01$). Também foram observadas medidas maiores nas espessuras ML e AP-D no grupo I comparado ao grupo D ($P < 0,02$). Nesses parâmetros, não houve diferença estatística quando comparados os

grupos S e I ($P>0,09$). Não houve diferença de medidas entre os grupos nos parâmetros ML-P e ML-D ($P>0,49$) (Tabela 4) (Figuras 7-13).

Tabela 4: Medidas das tíbias em comprimento (próximo-distal) e espessura (ântero-posterior e médio-lateral) na região mediana do comprimento total, e próximo às epífises proximal e distal.

Medidas (mm)	Saudável	Diabético	Insulinizado
Comprimento Próximo-Distal (PD)	$38,52 \pm 0,85^A$	$36,46 \pm 1,03^B$	$37,97 \pm 0,60^A$
Espessura Ântero-Posterior da diáfise (AP)	$2,84 \pm 0,19^A$	$2,55 \pm 0,21^B$	$2,87 \pm 0,14^A$
Espessura Médio-Lateral da diáfise (ML)	$2,55 \pm 0,16^{A,B}$	$2,36 \pm 0,17^B$	$2,60 \pm 0,18^A$
Espessura Ântero-Posterior Proximal (AP-P)	$5,20 \pm 0,24^A$	$4,47 \pm 0,32^B$	$4,98 \pm 0,24^A$
Espessura Médio-Lateral Proximal (ML-P)	$4,27 \pm 0,38^A$	$3,99 \pm 0,24^A$	$4,30 \pm 0,50^A$
Espessura Ântero-Posterior Distal (AP-D)	$2,25 \pm 0,32^{A,B}$	$2,10 \pm 0,14^B$	$2,40 \pm 0,35^A$
Espessura Médio-Lateral Distal (ML-D)	$3,47 \pm 0,55^A$	$3,45 \pm 0,32^A$	$3,25 \pm 0,33^A$

Valores com a mesma letra sobrescrita, não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($P>0,05$).

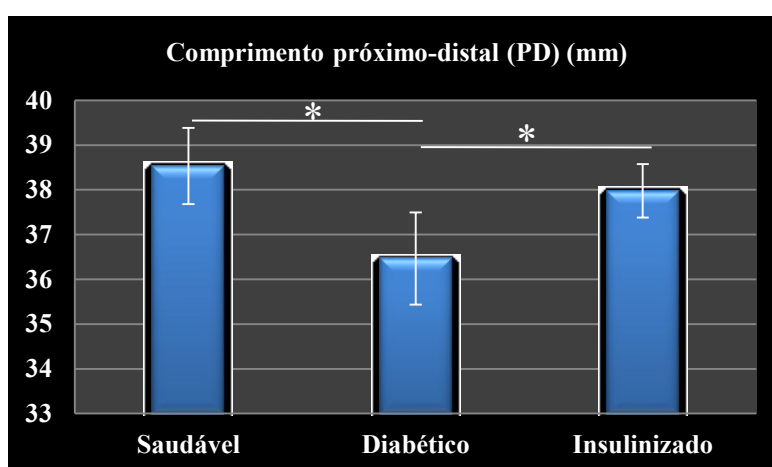


Figura 7: Gráfico referente ao comprimento próximo-distal (PD) das tíbias na análise macroscópica ($P<0,01$).

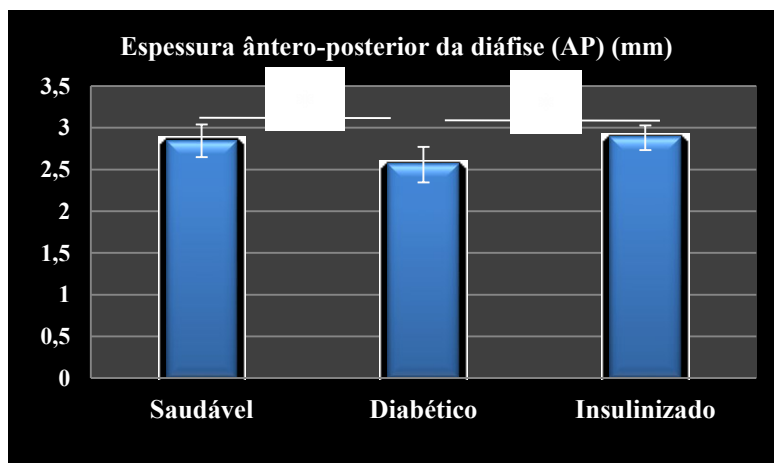


Figura 8: Gráfico referente à espeçura ântero-posterior da diáfise (AP) das tíbias na análise macroscópica $*(P<0,01)$.

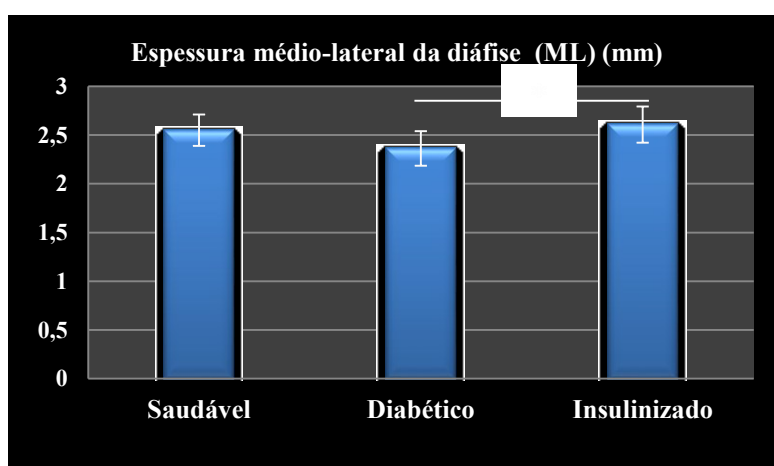


Figura 9: Gráfico referente à espeçura médio-lateral (ML) da diáfise das tíbias na análise macroscópica $*(P<0,02)$.

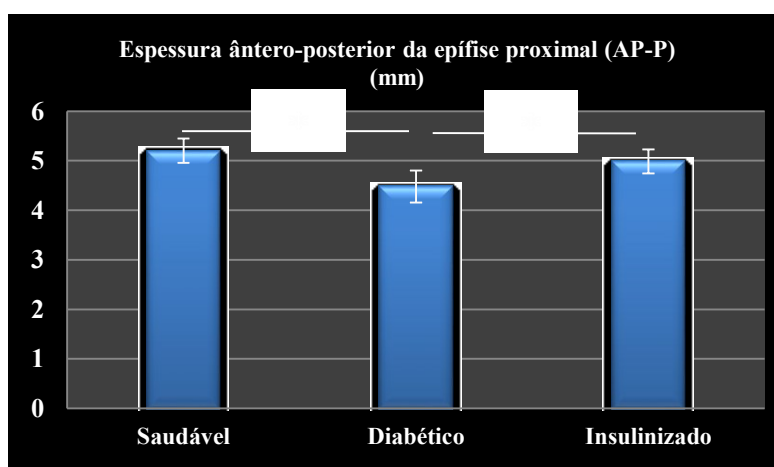


Figura 10: Gráfico referente à espeçura ântero-posterior da epífise proximal (AP-P) da diáfise das tíbias na análise macroscópica $*(P<0,01)$.

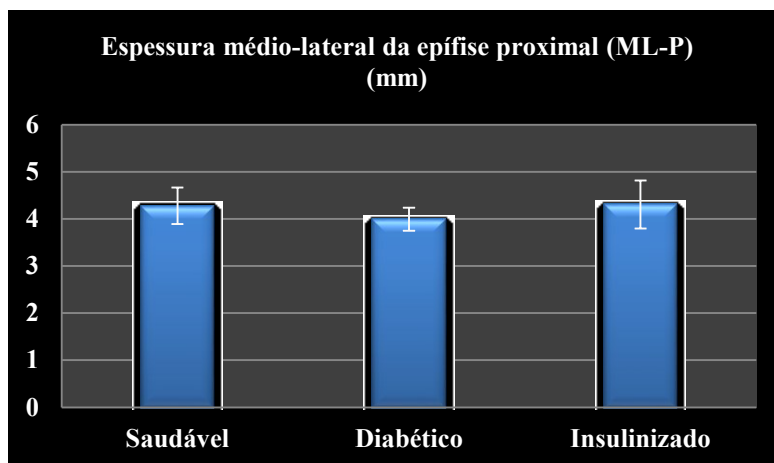


Figura 11: Gráfico referente à espessura médio-lateral da epífise proximal (ML-P) da diáfise das tíbias na análise macroscópica ($P>0,49$).

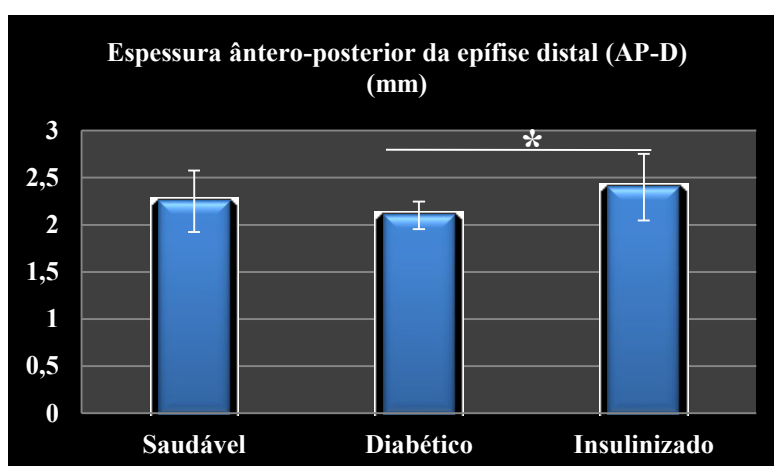


Figura 12: Gráfico referente à espessura ântero-posterior da epífise distal (AP-D) das tíbias na análise macroscópica $*(P<0,02)$.

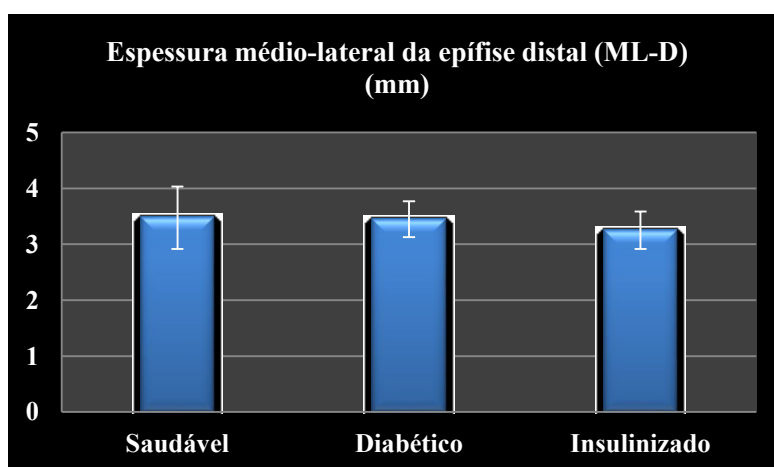


Figura 13: Gráfico referente à espessura médio-lateral da epífise distal (ML-D) das tíbias na análise macroscópica ($P>0,49$).

3.2 Microtomografia computadorizada (μ CT)

Na análise por meio de μ CT, o grupo I apresentou espessura cortical maior em relação ao grupo D ($P < 0,01$). Não houve diferença estatística entre os grupos nos outros parâmetros analisados: Porosidade cortical e Densidade Mineral Óssea ($P > 0,66$ e $P > 0,96$, respectivamente) (Tabela 5) (Figuras 14-16).

Tabela 5: Média e desvio padrão da análise microtomográfica, cujos parâmetros avaliados foram Porosidade Cortical, Densidade Mineral Óssea e Espessura Cortical.

Medidas\Grupos	Saudável	Diabético	Insulinizado
Porosidade Cortical (Ct.Po, %)	$0,20 \pm 0,09^A$	$0,11 \pm 0,20^A$	$0,19 \pm 0,33^A$
Densidade Mineral Óssea (Ct.BMD/g/cm ³)	$0,77 \pm 0,01^A$	$0,80 \pm 0,06^A$	$0,77 \pm 0,05^A$
Espessura Cortical (Ct.Th, μ m)	$0,68 \pm 0,02^{A,B}$	$0,63 \pm 0,03^B$	$0,69 \pm 0,05^A$

Valores com a mesma letra sobrescrita, não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$).

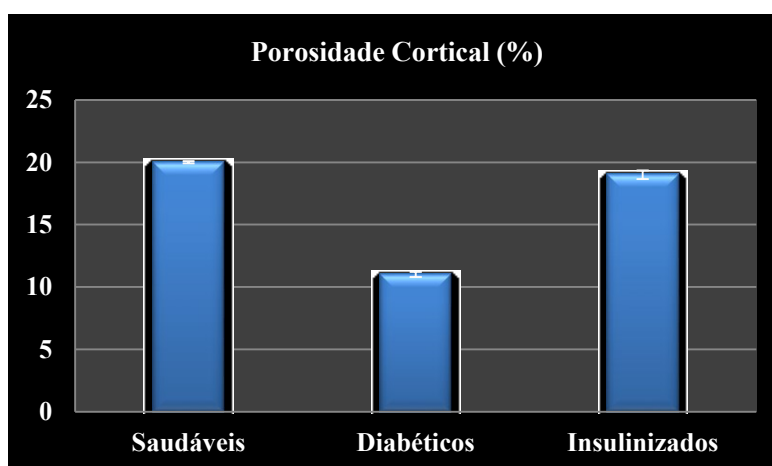


Figura 14: Gráfico referente à porosidade cortical obtida por meio da análise microtomográfica ($P > 0,66$).

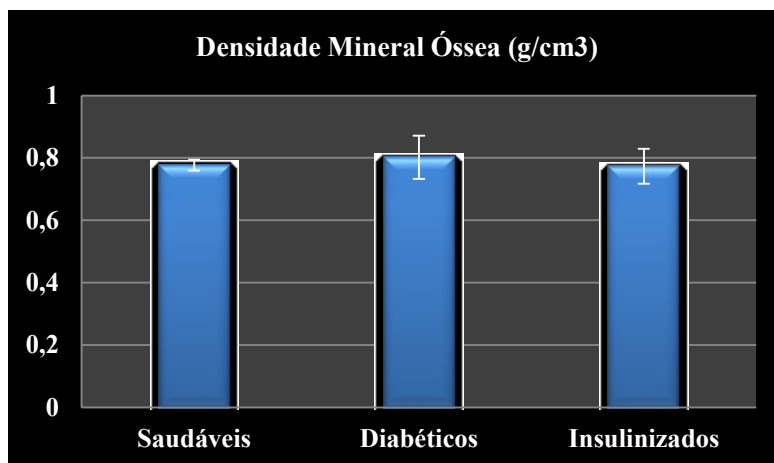


Figura 15: Gráfico referente à densidade mineral óssea obtida por meio da análise microtomográfica ($P>0,96$).

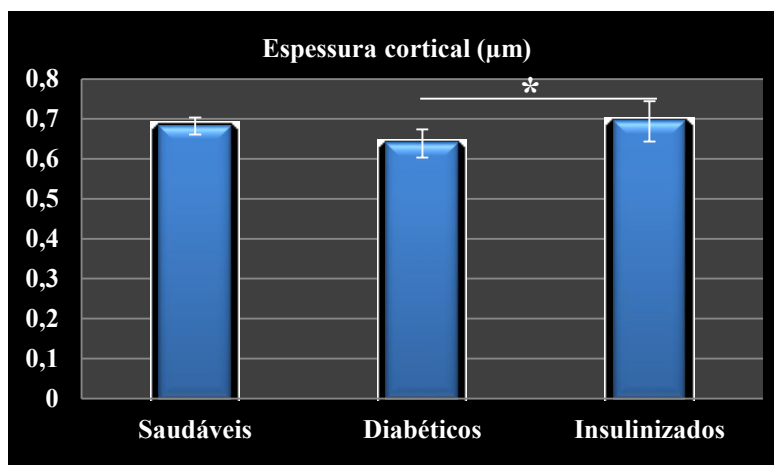


Figura 16: Gráfico referente à espessura cortical obtida através da análise microtomográfica * ($P<0,01$).

3.3 Ensaio mecânico

Na análise de flexão de três pontos, a força máxima foi menor no grupo D ($P<0,04$) comparado com os grupos S e I. Nos parâmetros energia e rigidez não houve diferença estatística entre os grupos ($P>0,24$) (Tabela 6) (Figuras 17-19).

Tabela 6: Média e desvio padrão do teste de flexão a três pontos cujos parâmetros analisados foram: força máxima energia e rigidez.

Medidas\Grupos	Saudável	Diabético	Insulinizado
Força Máxima (N)	$57,2 \pm 5,6^A$	$50,1 \pm 4,9^B$	$59,2 \pm 2,8^A$
Energia (mJ)	$22 \pm 3,7^A$	$20,9 \pm 2,5^A$	$23,9 \pm 2,6^A$
Rigidez (N/mm)	$103,3 \pm 11,6^A$	$95,6 \pm 12^A$	$100 \pm 13,7^A$

Valores com a mesma letra sobrescrita, não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$).

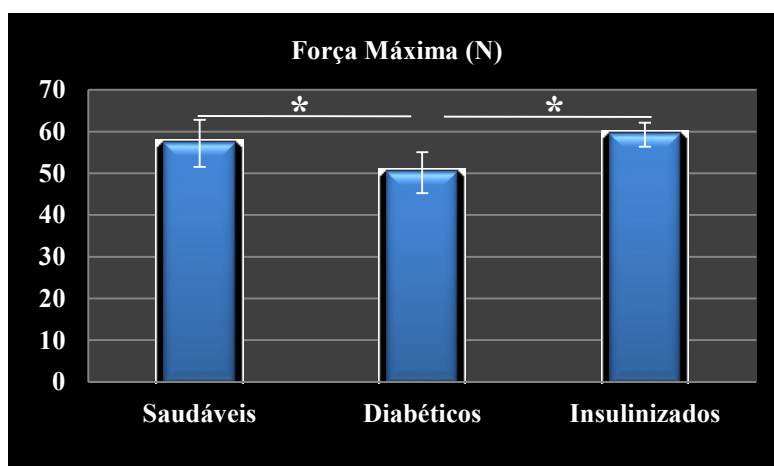


Figura 17: Gráfico referente à Força máxima obtida através do teste mecânico * ($P < 0,04$).

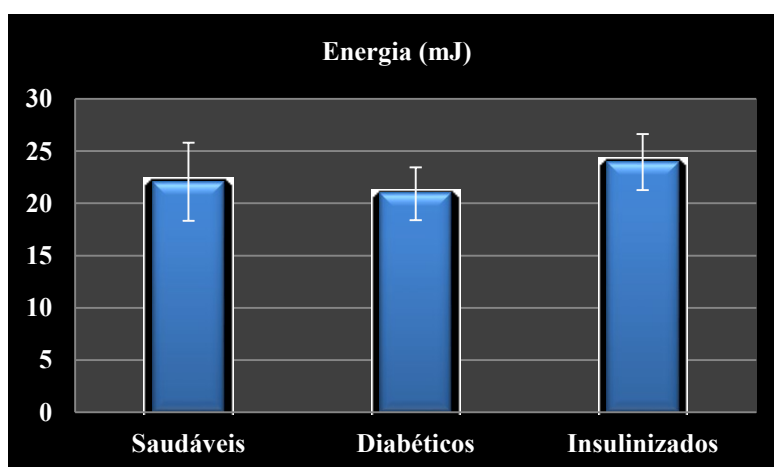


Figura 18: Gráfico referente à Energia obtida através da análise mecânica ($P > 0,24$).

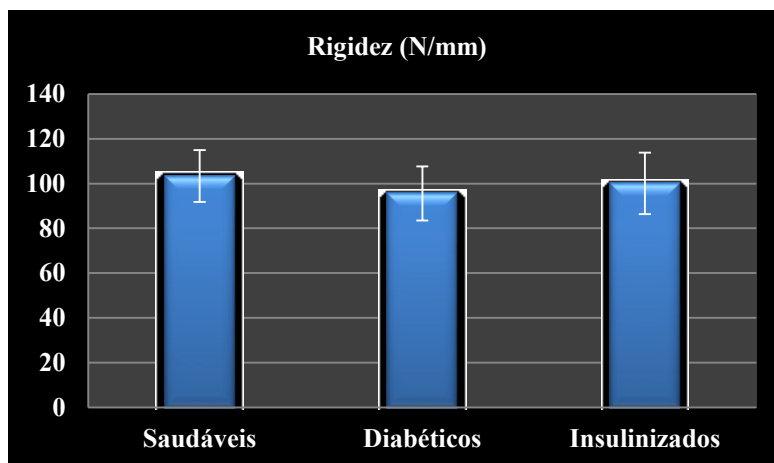


Figura 19: Gráfico referente à rigidez obtida através da análise mecânica ($P>0,24$).

4. DISCUSSÃO

No presente estudo foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, pois apresentam menor custo, são de fácil manuseio e possuem semelhanças fisiológicas e genéticas com humanos (Foundation for biomedical research, 2016; Melina, 2016). A droga utilizada no estudo foi a Estreptozotocina (STZ), usada amplamente na indução de DM1 em modelos experimentais, com boas taxas de sucesso em diferentes espécies de roedores e vias de administração (Delfino, 2002). Não houve perda significativa de animais no estudo em virtude da indução e/ou estabelecimento da doença.

O DM1 promoveu alterações no crescimento ósseo, na espessura cortical e na resistência à fratura das tíbias, e a insulino terapia auxiliou na diminuição dos prejuízos causados pela doença. Na análise macroscópica foi observada redução do crescimento longitudinal das tíbias do grupo D, em relação aos demais grupos. Esse fato sugere influência da hiperglicemia crônica ou ausência de insulina no processo de ossificação endocondral das tíbias, o qual é dependente do disco epifisário (Aeimlapa et. al., 2014). Estudos indicam que o DM1 promove apoptose precoce dos condrócitos localizados na zona de cartilagem hipertrófica do disco epifisário (Aeimlapa et al.; Roszer et al., 2014), provocando assim, danos ao crescimento dos ossos longos por desequilíbrio das etapas seguintes da ossificação endocondral (Aeimlapa et. al., 2014).

O DM1 influenciou, também, para que o grupo D apresentasse menores valores de espessura (AP e AP-P), indicando comprometimento do processo de ossificação intramembranosa, o qual depende dos osteoblastos originados a partir do periósteo. Provavelmente, esse fato é devido à influência negativa da doença sobre a função, formação e desenvolvimento dos osteoblastos (Katitayan et al., 2013; McCarthy et al., 2001; Sanguineti et al., 2008) prejudicando assim, o processo de ossificação intramembranosa e acarretando em ossos mais frágeis.

Na análise por micro-CT o grupo I apresentou maior espessura cortical em relação ao grupo D, demonstrando que a insulino terapia melhorou a condição sistêmica favorecendo o processo de ossificação intramembranosa, coerente ao observado na análise macroscópica. Isto pode ter ocorrido devido ao efeito anabólico da insulina no tecido ósseo. Tal hormônio aumenta a captação de glicose, a síntese de matriz colágena, a proliferação celular e a expressão da fosfatase alcalina, favorecendo a formação de

matriz óssea (Fulzele et al., 2010). Essas funções são realizadas devido à presença de receptores de insulina (IRs), presentes na membrana plasmática dos osteoblastos (Fulzele et al., 2010).

Estudos prévios demonstraram que animais com ausência de IR apresentaram comprometimento da microarquitetura óssea (Nyman et. al., 2017) e menor espessura cortical e trabecular (Thraillkill et al., 2014). A insulina melhora a atividade osteoblástica, aumentando significativamente a neoformação óssea, o que reflete diretamente na melhoria da qualidade, volume e espessura do osso cortical e trabecular (Nyman et. al., 2017; Thraillkill et al., 2014).

A porosidade cortical e a densidade mineral óssea não foram alteradas nas tíbias do grupo D. A resolução empregada (16 μ m) na análise por μ CT pode ter sido insuficiente para identificação de canais ósseos de diâmetros menores, uma vez que outros estudos sugerem comprometimento da microarquitetura óssea em indivíduos diabéticos. Esses estudos observaram aumento de porosidade cortical e alterações na densidade mineral, o que corrobora para uma maior suscetibilidade a fraturas ósseas (Osima et. al., 2017; Rubin, 2017).

No ensaio mecânico de flexão a três pontos, o grupo D mostrou-se menos resistente, pois apresentou valores de força máxima, menores em relação aos outros grupos. Essa redução na resistência se deve, provavelmente, ao acúmulo de produtos finais de glicação avançada (AGEs) na matriz orgânica do tecido ósseo, sendo um achado comum em condição de hiperglicemia crônica (Hernandez et al., 2010). No osso, essas alterações influenciam na redução da resistência à fratura (Saito et al., 2006) devido à liberação de radicais livres no meio, os quais promovem estresse oxidativo, expressão aumentada de mediadores da inflamação (Huebschmann et al., 2006), alterações funcionais nos osteoblastos, danos à mineralização (Sanguineti et al., 2008) e possível estímulo na formação de inter e intra ligações cruzadas entre fibras colágenas da matriz, sugerindo mudanças na composição química do tecido ósseo (Czernik, 2017).

A ausência de diferenças entre os grupos S e I nos parâmetros avaliados demonstrou que a insulinoterapia reduziu significativamente os prejuízos do DM no desenvolvimento das tíbias, sugerindo que o controle da doença está intimamente associado à integridade do tecido ósseo. Estudos mostram (Goodman, 1984; Miedany, 1999) que roedores, em modelo experimental de DM1, apresentaram ossos com qualidade

superior, na presença de insulino terapia, isto é, a terapia atuou melhorando as taxas de remodelação óssea, o processo de mineralização, a microarquitetura e as propriedades mecânicas teciduais (Follak, 2004).

Certamente, a somatória dos achados encontrados contribuiu para que o grupo diabético se apresentasse mais suscetível à fratura em comparação aos demais grupos. As alterações celulares e microestruturais reduziram o tamanho e espessura das tíbias dos animais diabéticos observadas na análise macroscópica e microtomográfica do presente estudo. Também, a ausência do controle da doença com a utilização da insulina pode ter levado as tíbias do grupo D a se apresentarem frágeis (Thraillkill et al., 2014).

Considerando que a proposta do presente estudo foi explorar diferentes metodologias convergentes para análise da repercussão do diabetes mellitus tipo 1, em tíbias de ratos Wistar, bem como os efeitos da insulino terapia para minimizar os efeitos deletérios causados pela doença. Sendo assim, o mesmo caracteriza-se como um estudo piloto, fazendo-se necessário aumentar o tamanho da amostra, testar outros níveis de resolução no microtomógrafo e avaliar potenciais mudanças que poderiam ocorrer no osso trabecular.

5. CONCLUSÃO

O Diabetes Mellitus do tipo 1 reduz o crescimento e a resistência mecânica óssea, e a insulino-terapia, em ratos diabéticos, melhora o crescimento ósseo longitudinal e em espessura tornando-o semelhante ao dos animais normoglicêmicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMI, S. Bone health in diabetes: considerations for clinical management. *Current Medical Research and Opinion*, v. 25, p. 1057–1072, 2009.

AEIMLAPA, R. et al. Premature chondrocyte apoptosis and compensatory upregulation of chondroregulatory protein expression in the growth plate of Goto–Kakizaki diabetic rats. *Biomechanical and Biophysical Research Communications*, v. 452, p. 395-401, 2014.

CARNEIRO, J.; JUNQUEIRA, L.C. Histologia Básica: Texto Atlas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 2012. 487 p. Cap. 8: Tecido ósseo, p. 136-149.

CHANDRAN, M. Diabetes Drug Effects on the Skeleton. *Calcified Tissue International*, v. 100, p. 133-149, 2017.

CZERNIK, B.L. Diabetes, bone and glucose-lowering agents: basic biology. *Diabetologia*, v. 60, p. 1163-1169, 2017.

DELFINO, V.D.A. et al. Diabetes mellitus induzido por estreptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração. *Brazilian Journal of Nephrology*, v.24(1), p. 31-6, 2002.

FOLLAKE, N. Delayed remodeling in the early period of fracture healing in spontaneously diabetic BB/OK rats depending on the diabetic metabolic state. *Histology and Histopathology*, v. 19, p. 473–486, 2004.

Foundation for biomedical research. Animals in research. Disponível: <<https://fbresearch.org/biomedical-research/lab-animals/>>. Acesso: 22 de Jul. 2017.

FULZELE, K. et al. Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition. *Cell*, v. 142 (2), p. 309-319, 2010.

FULZELE, K.; CLEMENS, T.L. Novel functions for insulin in bone. *Bone*, v. 50, p. 452-456, 2012.

GOODMAN, W.G.; HORI, M.T. Diminished bone formation in experimental diabetes. Relationship to osteoid maturation and mineralization. *Diabetes*, v.33, p. 825–831, 1984.

HERNADEZ, C.J. et al. Trabecular microfracture and the influence of pyridinium and non-enzymatic glycation-mediated collagen cross-links. *Bone*, v. 37, p. 825-832, 2005.

HOU, J.C. Effects of Severe Diabetes and Insulin on the Femoral Neck of the Immature Rat. *Journal of Orthopaedics*, v. 11, p. 263–271, 1993.

HUEBSCHMANN, A.G. et al. Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes*, v. 29, p. 1420-32, 2006.

IDF Diabetes Atlas, Edition. Bruxelas, Bélgica. Disponível: <<http://www.diabetesatlas.org>> Acesso: 17 Ago. 2017.

ISIDRO, M.L.; RUANO, B. Bone disease in diabetes. *Current Diabetes Review*, v. 6, p. 144–155, 2010.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. Histologia e Embriologia Oral. São Paulo: Guanabara Koogan. 3ª Edição, 381 p, 2012.

KATITAYAN, M.; KATYTAYAN, P. A.; SHAH, R. J. Rehabilitative Considerations for Dental Implants in the Diabetic Patient. *Journal of Indian Prosthodontic Society*, 13(3), p.175–183, 2013.

MCCARTHY, A.D.; ETCHEVERRY, S.B.; CORTIZO, A.M. Effect of advanced glycation end products on the secretion of insulin-like growth Factor-I and its binding proteins: role in osteoblast development. *Acta Diabetologica*, v. 38, p. 113–122, 2001.

MELINA, R. Why Do Medical Researchers Use Mice? Disponível: <<http://www.livescience.com/32860-why-do-medical-researchers-use-mice.html>>. Acesso: 22 de Jul. 2017.

MIEDANY, Y.M.; GAAFARY, S.; BADDINI, M.A. Osteoporosis in older adults with non-insulin dependent diabetes mellitus: is it sex related? *Clinical and Experimental Rheumatology*, v.17, p. 561–567, 1999.

MORAIS, J.A.N.D. Efeito do Diabetes Mellitus e da insulinoaterapia na osseointegração estabelecida ao redor de implantes instalados em tíbia de ratos [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2007.

NYMAN, J.S. et al. Preserving and restoring bone with continuous insulin infusion therapy in a mouse model of type 1 diabetes. *Bone Reports*, v. 7, p. 1-8, 2017.

OSIMA, M. et al. Women with type 2 diabetes mellitus have lower cortical porosity of the proximal femoral shaft using low-resolution CT than non-diabetic women, and increasing glucose is associated with reduced cortical porosity. *Bone*, v. 97, p. 252-260, 2017.

PACCOU, J. et al. Bone Microarchitecture in Men and Women with Diabetes: The Importance of Cortical Porosity. *Calcified Tissue International*, v. 98, p. 465-473, 2016.

ROSZER, T. et al., Leptin receptor deficient diabetic (db/db) mice are compromised in postnatal bone regeneration, *Cell Tissue Research*, v.356, p. 195–206, 2014.

RUBIN, M.R. Skeletal fragility in diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1402, p. 18-30, 2017.

RUBIN, M.R.; PATSCH, J.M. Assessment of bone turnover and bone quality in type 2 diabetic bone disease: current concepts and future directions. *Bone Research*, v. 4, p. 1-9, 2016.

SAITO, M. et.al. Reductions in degree of mineralization and enzymatic collagen cross-links and increases in glycation-induced pentosidine in the femoral neck cortex in cases of femoral neck fracture. *Osteoporosis International*, v. 17, p. 986- 995, 2006.

SANGUINETI, R. et. al. Pentosidine effects on human osteoblasts in vitro. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1126, p. 166-72, 2008.

SHALABYA, D. et al. The Expression of Activating Receptor Gene of Natural Killer Cells (*KLRC3*) in Patients with type 1 Diabetes Mellitus (T1DM). *Oman Medical Journal*, v.32, n.4, p. 316-321, 2017.

TESTA, R. et al. The Possible Role of Flavonoids in the Prevention of Diabetic Complications. *Nutrients*, v.8, p. 31-40, 2016.

THRAILKILL, K. et al. Loss of Insulin Receptor in Osteoprogenitor Cells Impairs Structural Strength of Bone. *Journal of Diabetes Research*, p. 1-9, 2014.

WANG, L.X.; JIANG, H.L.; DU, S.L. Observed impacts of insulin therapy on callus

cell transforming growth factor-beta 1 expression in diabetic rats. *Genetics and Molecular Research*, v. 14(2), p. 5076-5084, 2015.

WANG, L.X.; JIANG, H.L.; DU, S.L. Observed impacts of insulin therapy on callus cell transforming growth factor-beta 1 expression in diabetic rats. *Genetics and Molecular Research*, v. 14(2), p. 5076-5084, 2015

XU, M.T. et al. Diabetes mellitus affects the biomechanical function of the callus and the expression of TGF-beta1 and BMP2 in an early stage of fracture healing. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 49(1), p. 1-8, 2016.

7. ANEXOS

7.1 Diretrizes para publicação na revista Horizonte Científico

A revista Horizonte Científico é uma publicação eletrônica, semestral, da Diretoria de Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia, que publica em português os artigos científicos resultantes de pesquisas de iniciação científica como dos apoiados pelo CNPq, FAPEMIG e UFU - e do Programa Institucional de Apoio à Iniciação Científica - PIAIC.

7.1.1 Formatação do texto

Margens de 2,5 cm, espaçamento 1,5 cm, fonte Times New Roman 12, Espaçamento 1,5. Cada página deverá ser numerada consecutivamente com algarismos arábicos no canto superior direito;

O artigo deverá conter no máximo 30 páginas e deve estar em formato DOC (versão 97-2003 do WORD). A formatação deve ser em uma coluna.

Os nomes dos autores devem constar somente na Submissão de Metadados, devendo ser excluídos do corpo do texto.

OBS: os nomes dos autores serão incluídos no processo de Editoração de Texto, logo após a avaliação dos pareceristas.

As ilustrações (mapas, fotos (colorido ou preto e branco) devem fazer parte do corpo do texto em formato digital GIF ou JPEG. Os gráficos também devem fazer parte do corpo do texto;

Notas de rodapé: serão aceitas quando forem absolutamente necessárias para explicações que não possam ser incluídas no texto ou nas tabelas, tais como: a) nome da instituição onde foi realizado o trabalho; b) consignação de bolsas e outros auxílios financeiros; c) comunicação pessoal. As notas de rodapé deverão ser anunciadas no texto mediante número sobrescrito e devem figurar na página em que o número aparece;

Os nomes científicos devem ser escritos, no texto, na íntegra (Ex.: *Vellozia caruncularis* e não *V. caruncularis*);

Quando o texto contiver fórmulas editadas no módulo de Equações do Word, o tamanho deve ser o seguinte: Interno – 12 pts; Subscrito/Subrescrito – 10pts; Sub-Subscrito/Sobrescrito – 8 pts; Símbolo – 12 pts e Sub-Símbolo – 10 pts;

O texto é de inteira responsabilidade dos autores. A redação deve ser clara, concisa e objetiva e a linguagem correta, precisa, coerente e simples. Adjetivos supérfluos devem ser evitados, assim como, a forma excessivamente compacta, que pode prejudicar a compreensão do texto. O texto deve passar por uma criteriosa correção de português antes de ser enviado para a publicação; A Revista Horizonte Científico se resguarda o direito a pequenas adequações textuais para melhor compreensão do texto.

Os autores concedem os direitos autorais para futuras publicações desde que a fonte seja referenciada.

7.1.2 Formato do artigo

Título: em letra maiúscula e negrito. Deve ser conciso e informativo.

Nome dos autores: os nomes completos dos autores (em letra maiúscula) deverão estar posicionados entre o título em português e o Resumo, alinhados à esquerda, colocados em sequência horizontal, identificados com número sobrescrito e caracterizado no rodapé da primeira página, conforme a seguinte sequência: unidade acadêmica, instituição, endereço, cidade, CEP e endereço eletrônico do autor para correspondência.

OBS: Lembrando que os nomes serão inseridos no corpo do texto somente após a avaliação dos pareceristas, no processo de Editoração de Texto.

O Resumo deve conter, no máximo, 250 palavras.

Abstract, Résumé ou Resumen: O artigo deverá ser encaminhado com o resumo em português e em uma segunda língua, que poderá ser o inglês, francês ou Espanhol. **OBS:** O resumo e o abstract devem constar em página exclusiva do texto. Exceção: nos casos em que o resumo e o abstract couberem na mesma página.

Palavras-chave: até 5, em espanhol, inglês, francês e português. O abstract, résumé, resumen e o Resumo devem conter, no máximo, 250 palavras.

Texto: O texto deverá iniciar logo a seguir, colocando sequencialmente: INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS; RESULTADOS; DISCUSSÃO; CONCLUSÃO; AGRADECIMENTOS (se necessário) e REFERÊNCIAS.

OBS: Ficarão a critério dos autores os itens Resultados, Discussão e Conclusão, poderão aparecer em separado ou Resultados e Discussão juntos e ainda as Conclusões poderão aparecer junto com a Discussão. Citar cada figura e tabela no texto em ordem numérica crescente. Todas as citações, no decorrer do texto, devem ser incluídas na lista de Referências Bibliográficas, em ordem alfabética, de acordo com as normas ABNT (NBR-6023/89), conforme alguns exemplos abaixo:

Livros completos: LACAZ, C. da S.; BARUZZI, R.G.; SIQUEIRA JÚNIOR, W. Introdução a geografia médica no Brasil. São Paulo: Blucher, 1972. 568 p.(se houver número do volume, indicar também).

Parte de Livro com autoria específica: FLEURY, J. A. Análise a nível de empresa dos impactos da automação sobre a organização da produção de trabalho. In: SOARES, R.M.S.M. Gestão da empresa. Brasília: IPEA/IPLAN, 1980. p. 149-159. Parte de Livros sem autoria específica: MARTIN, L.C.T. Confinamento de bovino de corte. São Paulo: Nobel, 1986. 124p. Cap.3: Nutrição de corte em confinamento, p.29-89. Folheto: PRATES, H.S.; PELEGRINETTI, J.R. Controle sanitário e cultural: legislação e relação de defensivos para citros. Campinas: Fundação Cargill, 1985. 40p.

Artigos de revistas e outros periódicos: MATOS, A. P. de. Epidemiologia da fusariose do abacaxi. Informe Agropecuário, Campinas, v. 11, n. 130, p 46-49, 1985. BAILEY, I.W. - The use and abuse of anatomical data in the study of phylogeny and classification. Phytomorphology v. 1, p. 67-69, 1951.

Artigos apresentados em congresso – Impresso: SILVA, J.N.M. Possibilidades de produção sustentada de madeira em floresta densa de terra firme da Amazônia brasileira. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 6., 1990, Campos do Jordão. Anais... Campos do Jordão: SBS/SbEF, 1990. P..39-45.

CD-ROOM: MUNIZ, C. A. de; QUEIRÓZ, S. A. de - Avaliação do desempenho até a desmama de bezerros cruzados, no Mato Grosso do Sul. In: REUNIÃO ANUAL

DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 34., 1997, Juiz de Fora. Anais...
Geratec, 1997. 1 CD-ROOM.

Internet: SILVA, N.M. - The chemotaxonomy of plants. Disponível: (colocar o endereço completo da página de onde foi retirada a informação): Acesso em: (data da captura). SILVA, M.M.L. Crimes na era digital. Net, Rio de Janeiro, nov. 1998. Disponível: (colocar o endereço completo da página de onde foi retirada a informação): Acesso em: (data da captura).

Dissertações e Teses: QUEIRÓZ FILHO, E.S. Análise da indústria de beneficiamento primário de madeira do Estado do Pará. Curitiba. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal do Paraná, 1983. 103 p. Apostila: SILVA, C.E. Elaboração de trabalhos acadêmicos. Lavras: ESAL, 1990. 3p. Apostila.

Publicações Institucionais (sem autores): FAO El eucalipto en la repoblación forestal. Roma, 1981. 303p. Como fazer as citações no texto: Ex: Steel (1960) ou (Steel, 1960); Resende & Andrade (1992) ou (Resende & Andrade, 1992); Silva, Cardoso, Pereira (1990) ou (Silva, Cardoso, Pereira, 1990);

Obras com mais de três autores poderá ser indicado apenas o primeiro autor, seguido da expressão "et al."; os dois primeiros autores seguido da expressão "et al." ou ainda os três primeiros autores seguidos da expressão "et al.", na ordem em que aparecem na publicação. Ex.: SOUZA, P.R. et al.; SILVA, J.P.; MELO, P.N. et al. ou FERREIRA, L.C.; SOUSA, T.R.; ANDRADE, M. et al.

Citações Longas (mais de três linhas): Devem constituir um parágrafo independente, recuado 4 cm da margem esquerda, com linhas separadas por espaço simples, letra menor que a do texto utilizado e sem aspas.