**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

BRUNA BARROS BIGHETTI

**Avaliação das citocinas TNF- α , RANKL e OPG e
do número de osteoclastos no reparo de defeito
ósseo em calvária de ratos diabéticos tratados
com Matriz Óssea Desmineralizada**

Versão corrigida

**BAURU
2016**

BRUNA BARROS BIGHETTI

**Avaliação das citocinas TNF- α , RANKL e OPG e do
número de osteoclastos no reparo de defeito
ósseo em calvária de ratos diabéticos tratados
com Matriz Óssea Desmineralizada**

Versão corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Estomatologia e Biologia Oral.

Orientador: Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis

Versão Corrigida

BAURU

2016

B484a Bighetti, Bruna Barros
Avaliação das citocinas TNF- α , RANKL e OPG e do número de osteoclastos no reparo de defeito ósseo em calvária de ratos diabéticos tratados com Matriz Óssea Desmineralizada / Bruna Barros Bighetti. - Bauru, 2015.
165 p. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo número: CEEPA 016/2012
Data: 23 de maio de 2012

DEDICATÓRIA

*Este trabalho de doutorado é dedicado aos meus pais **Anicir e João**, assim como aos meus irmãos **Thiago, João Victor e Pedro**. Dedico, também, a **todos os meus amigos do Laboratório de Histologia!***

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ter me dado forças para enfrentar os obstáculos, permitindo, assim, o meu amadurecimento.

Ao **Professor Doutor Gerson Francisco de Assis**, meu orientador, por abrir, mais uma vez, as portas do Laboratório de Histologia e contribuir com seus conhecimentos e experiências para minha formação acadêmica.

Aos Professores Doutores do Laboratório de Histologia (FOB/USP), **Rumio Taga, Gustavo Pompermaier Garlet e Camila de Oliveira Rodini Pegoraro**, pelo incentivo ao trabalho científico e produção de conhecimento.

À minha “co-orientadora”, **Tania Mary Cestari**, não só pela dedicação, competência e experiências compartilhadas, mas principalmente pela amizade e por fazer eu acreditar em minhas capacidades! Agradeço por todos os ensinamentos científicos, bem como por todas as risadas divididas comigo!

Às funcionárias do Laboratório de Histologia, **Danielle, Patricia, Divina e Teresa**, por todo o auxílio e amizade demonstrados durante a realização deste.

Aos alunos de Pós-Graduação do Laboratório de Histologia, especialmente à **Paulinha, Dani, Ever, Carol R., Suelen e Ricardo** por toda a ajuda prestada durante as induções e cirurgias! À **Claudinha, Elcia, Andreia, Franco, Carol F., Rafa e Angélia** pelos conhecimentos divididos e incentivo a pesquisa. Mas agradeço, principalmente, pela amizade e pelos momentos de alegria e muitas risadas!

À **CAPES**, pela bolsa de doutorado e à **FAPESP** pela bolsa de auxílio a pesquisa.

À **FOB-USP** como instituição acolhedora.

*“Há uma força motriz mais poderosa que o vapor,
a eletricidade e a energia atômica: a vontade.”*

— Albert Einstein

RESUMO

Neste trabalho, foi avaliado a participação dos osteoclastos bem como a ação das citocinas RANKL, OPG e TNF- α durante a formação e remodelação óssea em defeitos ósseos de tamanho crítico em ratos normoglicêmicos e diabéticos tratados ou não com a MAOD. Para isso, foram utilizados 250 ratos machos *Wistar*. Trinta ratos foram utilizados para coleta dos fêmures e tíbias, os quais foram processados para obtenção da MAOD. Os demais 220 ratos foram divididos em Grupo Não Diabético (CTL, n=110) e Grupo Diabético (DIAB, n= 110) induzido pela aplicação de uma dose única de 47 mg/Kg de massa corporal de estreptozotocina. Um defeito transósseo de 8 mm de diâmetro foi realizado nos ossos parietais dos ratos, sendo que, nos subgrupos CTL MAOD e DIAB MAOD, os defeitos foram preenchidos com MAOD e nos grupos CTL COAG e DIAB COAG apenas com coágulo sanguíneo. Após 0, 7, 14, 21 e 42 dias, as calotas cranianas foram coletadas para determinação da densidade de volume, número de osteoclastos/mm² na área do defeito, quantificação por imunistoquímica e expressão do RNAm para as proteínas RANKL, OPG e TNF- α . Os resultados para volume do tecido ósseo neoformado foi maior nos grupos CTL COAG e CTL MAOD, bem como no grupo DIAB MAOD quando comparado com DIAB COAG (CTL MAOD > CTL COAG e DIAB MAOD > DIAB COAG). O número de osteoclastos nos grupos CTL aumentaram significativamente (3,69 osteoclasto/mm²), enquanto que nos grupos MAOD aumentaram gradualmente até os 42 dias (2,8 osteoclasto/mm²). Os resultados para imunomarcagem mostraram que a MAOD promove 1,28 vezes maior expressão de OPG, bem como de TNF- α tanto no grupo CTL (1,59 vezes) como no DIAB (1,76 vezes). Os resultados para expressão do RNAm para OPG mostrou que a média dos valores do grupo COAG comparado com a do grupo MAOD foi 1,91 vezes maior no grupo COAG. Já os valores para expressão de RANKL permaneceram constantes no grupo DIAB MAOD, com aumento significativo de 2,57 vezes aos 42 dias, sendo 4,3 vezes maior, quando comparado com a média dos outros grupos no mesmo período. Conclui-se que nos animais normoglicêmicos, o tratamento com a MAOD aumenta a expressão de OPG, RANKL e TNF- α , assim como a atividade osteoclástica, promovendo reabsorção da MAOD e formação de tecido ósseo, enquanto que nos animais diabéticos, a atividade osteoclástica foi reduzida, sem alteração nos níveis de OPG e RANKL, reduzindo a reabsorção da MAOD e consequentemente da formação óssea.

Palavras chave: Diabetes Mellitus Experimental. Matriz Óssea. Citocinas. Osteoclastos

ABSTRACT

Evaluation of cytokines TNF- α , RANKL and OPG and the number of osteoclasts on repair of bone defects in skulls of diabetic rats treated with Demineralized Bone Matrix

Participation of osteoclasts was evaluated in reabsorption process of demineralized allogenic bone matrix (DABM) as well as the activity of cytokines RANKL, OPG and TNF- α during formation and bone remodeling in critical size defect of normoglycemic and diabetic rats treated or not with DABM. Therefore, 250 male Wistar rats were used. Thirty rats had femurs and tibias collected and processed to obtain DABM. 220 rats were divided into control group (CTL, n=110) and diabetic group (DIAB, n= 110) injected by a single dose of 47 mg/Kg of body weight streptozotocin. Were made 8mm bone defect on skulls of rats, in subgroups CTL DABM and DIAB DABM, defects were filled with DABM and subgroups CTL CLOT and DIAB CLOT were filled with blood clot. After 0, 7, 14, 21 and 42 days, the skulls were collected to determine the volume density, number of osteoclasts/mm² into defects area, quantification by immunohistochemistry and RNAm expression of RANKL, OPG and TNF- α cytokines. The results of volume density of newly formed bone was higher in CTL CLOT and CTL DABM, as well as in DIAB DABM compared to DIAB CLOT (CTL DABM > CTL CLOT and DIAB DABM > DIAB CLOT). The number of osteoclasts in CTL groups increased to 3,69 osteoclasts/mm², while in subgroups treated with DABM gradually increased up until 42 days (2,8 osteoclasts/mm²). Immunohistochemistry showed that DABM promotes an increase of 1.28-fold of OPG expression, as well as TNF- α expression in CTL group (1.59-fold) and DIAB group (1.76-fold). The results of RNAm expression of OPG showed that the average values of the CLOT subgroup compared to the average values of DABM subgroup was 1.91-fold higher in CLOT subgroup. The values of RANKL RNAm expression increase 2.57-fold at 42 days, being 4.3-fold higher than the average as the other groups in the same period. In conclusion, in the normoglycemic animals (CTL group), the treatment with DABM increase the expression of OPG, RANKL and TNF- α as the activity of osteoclasts, leading to DABM resorption and bone tissue formation, while in diabetic animals, the osteoclast activity was reduced, without changes in the levels of OPG and RANKL, decreasing DABM resorption and bone formation.

Keywords: Experimental Diabetes Mellitus. Bone Matrix. Cytokines. Osteoclasts.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Área do defeito ósseo
A_{Ai}	Fração de área
ADP	Adenosina difosfato
AGE	Produtos finais da glicação avançada
ATP	Adenosina trifosfato
BMD	<i>Bone Mass Density</i> (densidade da massa de tecido ósseo)
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i> (Proteína morfogenética óssea)
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (albumina do soro bovino)
cDNA	DNA complementar
CEEPA	Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais
cGMP	<i>Cyclic guanosine monophosphate</i> (Guanosina monofosfato cíclico)
COAG	Subgrupo tratado com coágulo
CT	<i>Cicle threshold</i> (ciclo limiar)
CTL COAG	Grupo controle tratado com coágulo
CTL MAOD	Grupo controle tratado com MAOD
CTL	Grupo controle
d	Diâmetro do defeito ósseo
DAB	<i>Diaminobenzidine</i> (Diaminobenzidina)
DBM	<i>Demineralized Bone Matrix</i> (matriz óssea desmineralizada)
DFDBA	<i>Demineralized Freeze-Dried Bone Allograft</i> (enxerto alogênico ósseo desmineralizado criodissecado)

DIAB COAG Grupo diabético tratado com coágulo

DIAB MAOD Grupo diabético tratado com MAOD

DIAB Grupo diabético

Dlx-5 *Distal less homeobox*

DNA Ácido desoxirribonucleico

dNTPs Hexadeoxinucleotídeos

DTT 1,4-dithiothreitol

EDTA Ácido tetracético etilenodiamino

FDBA *Freeze-Dried Bone Allograft* (enxerto alogênico ósseo criodissecado)

FFB *Fresh Frozen Bone* (enxerto alogênico ósseo congelado)

FGF Fator de crescimento de fibroblasto

FOB Faculdade de Odontologia de Bauru

FOXO1 *Forkhead box protein O1*

g Grama

GLUT 2 Transportador de glicose 2

HA Hidroxiapatita

HE Hematoxilina-Eosina

IGF Fator de crescimento *insulin-like*

IL-11 Interleucina 11

IL-17 Interleucina 17

IL-18 Interleucina 18

IL-1 β Interleucina 1 beta

IL-6 Interleucina 6

kDa	Quilodalton
MAOD	Matriz alogênica óssea desmineralizada
MBB	<i>Mixed Bovine Bone</i>
M-CSF	Fator estimulatório de colônia de macrófago
mEq/g	Miliequivalente por grama
mg/dl	Miligrama por decilitro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimol
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NF-κB	Fator nuclear <i>kappa</i> -B
ng/μL	Nanograma por microlitro
nm	Nanômetro
Nm	Número de células imunomarcadas
NO	Oxido nítrico
OPG	Osteoprotegerina
Osx	Osterix
PARP	Poli-ADP-ribose polimerase
PBS	<i>Phosphate buffered salin</i> (Tampão fosfato-salino)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia polimerase)
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
PINP	Pro-peptídeo N-terminal do procólgeno I
PTH	<i>Parathyroid Hormone</i> (hormônio da paratireoide)

RAGE	Receptor para AGE
RANK	Receptor ativador do fator de necrose- kB
RANKL	Ligante do RANK
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
ROS	Espécies de oxigênio reativo
RPL13	<i>Ribosomal protein L13</i> (proteína ribossomal L13)
RT-PCR	<i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>
Runx2	Fator de transcrição com domínio Runt
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
T	Espessura vertical
TGF-β	Fator de crescimento tumoral beta
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TRAP	<i>Tartrate Resistant Acid Phosphatase</i> (fosfatase ácida resistente ao tartarato)
USP	Universidade de São Paulo
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
V_{ti}	Volume total de cada estrutura estudada
V_{tre}	Volume total da região enxertada
V_{vi}	Densidade de volume ou percentual do volume
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)
Wnt	Fusão entre o nome do gene <i>wingless</i> da Drosófila com o nome do gene homólogo humano <i>integrated or int-1</i>
μl	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	A DIABETES.....	21
2.2	ESTREPTOZOTOCINA E A DIABETES.....	22
2.3	A DIABETES E SUA INFLUENCIA NO TECIDO ÓSSEO.....	24
2.4	DEFEITOS ÓSSEOS E A UTILIZAÇÃO DE ENXERTOS NAS CIRURGIAS CRANIOMAXILOFACIAIS.....	29
2.5	OS TIPOS DE ENXERTOS ÓSSEOS.....	32
3	PROPOSIÇÃO	39
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1	ANIMAIS UTILIZADOS.....	45
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	46
4.3	OBTENÇÃO DO BIOMATERIAL UTILIZADO – MAOD.....	47
4.4	PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	49
4.5	MORTE DOS ANIMAIS E COLETA DAS CALOTAS CRANIANAS.....	52
4.6	PROCEDIMENTOS HISTOTÉCNICOS.....	52
4.7	DETERMINAÇÃO DO VOLUME TOTAL DE TECIDO ÓSSEO NA ÁREA DO DEFEITO.....	53
4.8	DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE DE VOLUME (VVi) E DO NUMERO DE OSTEOCLASTOS/MM ² NOS CORTES TECIDUAIS CORADOS COM HE	54
4.9	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEINAS RANKL, TNF-α E OPG POR METODOS IMUNOISTOQUIMICOS.....	55
4.10	PROCEDIMENTO PARA ANALISE DO RANKL, TNF-α E OPG POR RT-PCR	56
4.11	TRATAMENTO ESTATISTICO DOS DADOS	58

5	RESULTADOS	59
5.1	MASSA CORPORAL E GLICEMIA.....	61
5.2	RESULTADOS MORFOMETRICOS PARA VOLUME TOTAL DE TECIDO ÓSSEO	67
5.3	RESULTADOS MORFOMETRICOS PARA A DENSIDADE DE VOLUME E NÚMERO DE OSTEOCLASTOS	69
5.4	RESULTADOS MORFOLÓGICOS DOS CORTES IMUNOMARCADOS PARA OPG, RANKL E TNF- α	73
5.5	NÚMERO DE CÉLULAS IMUNOMARCADAS PARA OPG/MM ² , RANKL/MM ² E TNF- α /MM ²	91
5.6	EXPRESSÃO DO RNAm PARA AS PROTEÍNAS OPG, RANKL E TNF- α POR RT-PCR.....	99
6	DISCUSSÃO	105
6.1	A DIABETES INDUZIDA PELA ESTREPTOZOTOCINA E SUA INFLUENCIA NO DESENVOLVIMENTO CORPORAL.....	107
6.2	A DIABETES E SUA INFLUENCIA NO REPARO ÓSSEO	109
6.3	A DIABETES E SUA INFLUENCIA SOBRE AS PROTEÍNAS RANKL, OPG E TNF- α NO REPARO ÓSSEO	113
7	CONCLUSÕES	119
	REFERÊNCIAS	123
	APÊNDICES	145
	ANEXOS	161

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo possui a capacidade para se reparar de lesões ou defeitos em virtude de estímulos fisiológicos adequados que levam ao fechamento da lesão (Gomes e Fernandes, 2011). Porém, os defeitos de tamanho crítico no tecido ósseo, resultantes de doenças metabólicas, de traumas ou câncer constituem grandes desafios para os cirurgiões, pois são defeitos que em virtude de sua extensão, não se fecham (Breitbart *et al.*, 2010).

De acordo com Praemer *et al.* (1999), mais de um milhão de cirurgias ortopédicas são realizadas nos Estados Unidos a cada ano para corrigir tais defeitos ósseos que não se fecham, sendo que para isso são necessários grandes volumes de enxerto autógeno, ou como alternativa enxerto alógeno (Yaszemski *et al.*, 1996).

A técnica padrão utilizada para acelerar a neoformação óssea consiste no emprego do enxerto ósseo autógeno, pois este apresenta os três elementos necessários para a neoformação óssea: osteogênese, devido as células ósseas transplantadas junto com o tecido enxertado sem risco de rejeição (Delloye *et al.*, 2007), osteocondução exercida pela matriz óssea enxertada (Cestari *et al.*, 2009) e osteoindução, em virtude dos fatores de crescimento e morfógenos presentes na matriz óssea enxertada (Urist, 2009). De acordo com a literatura, a utilização de enxerto ósseo obtido da porção esponjosa da epífise da crista ilíaca contendo células da medula óssea é considerado o *gold standard*, pois possui as células, a matriz e os fatores de crescimento (Damien e Parsons, 1991; Arinzeh *et al.*, 2003).

Entretanto, a obtenção do enxerto autógeno vem acompanhada de desvantagens, como risco de morbidade na área doadora e perda da função, bem como dor, formação de cicatriz, necessidade de uma cirurgia adicional para obtenção do enxerto, aumento no tempo de cirurgia, prolongado tempo de hospitalização, atraso na reabilitação, grande perda sanguínea, aumento no risco de infecção, risco de complicações cirúrgicas. Além disso, geralmente a quantidade de material necessário para a cirurgia é maior que a porção óssea que pode ser coletada da área doadora, tornando difícil a obtenção da quantidade ideal de enxerto ósseo para a cirurgia de reparo de defeito, sendo muitas vezes necessário complementar o enxerto autógeno com enxerto alógeno (Laurie *et al.*, 1984;

Younger e Chapman, 1989; Keating e Mcqueen, 2001; Mankin, 2003; Carson e Bostrom, 2007). É por esta razão que o enxerto autógeno tem sido utilizado com sucesso em cirurgias de reconstrução cuja área do defeito é pequena (Graziani *et al.*, 2004) enquanto os enxertos alógenos e xenogenos são muito empregados na reconstrução de defeitos cuja área é extensa, pois ambos os enxertos não apresentam limitações para a obtenção da quantia necessária (Issa *et al.*, 2015).

Terapias que objetivam promover ou restaurar a habilidade de reparo ósseo sob certas condições adversas tem sido alvo de estudos. Primeiramente, o enxerto alógeno, obtido de indivíduos doadores da mesma espécie, são muito empregados nas cirurgias ortopédicas (Carson e Bostrom, 2007) ou mesmo na área da odontologia, para reparo de defeitos ósseos na região craniofacial ou para corrigir a perda de osso alveolar resultante de doenças periodontais (Bosch *et al.*, 1995). Pois possuem a vantagem de apresentar tanto a atividade osteocondutora como a osteoindutora (Wood e Mealey, 2012), sendo possível combinar o enxerto alógeno com células osteoprogenitoras aspiradas do próprio receptor, possibilitando a ocorrência da osteogênese e o aumento da neoformação óssea (Fitzgibbons *et al.*, 2011).

Já os xenoenxertos, obtidos de doadores de espécies diferentes da receptora, apresentam somente a atividade osteocondutora. O mais utilizado é o xenoenxerto bovino, sendo composto somente por hidroxiapatita e colágeno, que por serem semelhantes entre os mamíferos, são biocompatíveis e não levam a resposta imune exacerbada ou rejeição do enxerto (Accorsi-Mendonca *et al.*, 2011). Além disso, os xenoenxertos podem ser combinados com fatores de crescimento, como proteínas ósseas morfogenéticas, responsáveis por induzir a diferenciação de células mesenquimais presentes na área do defeito, conferindo ao xenoenxerto a capacidade de osteoindução (Stevens, 2008), favorecendo sua integração ao osso autógeno que faz limite com a área receptora do enxerto. Porém, Stevens (2008) alerta que a administração exógena de fatores de crescimento associados aos xenoenxertos pode resultar em ossificação heterotrópica.

Outro fator que influencia fortemente a incorporação do enxerto na área receptora são as doenças sistêmicas, como a *Diabetes mellitus*. Segundo a literatura, a prevalência mundial de diabetes foi estimada a crescer de 2,8% em 2000 para 4.4% em 2030, sendo que o número total de pessoas diabéticas no

mundo está prevista para aumentar de 171 milhões para 366 milhões de pessoas (Wild *et al.*, 2004). De acordo com a Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia, o número de pessoas diabéticas no Brasil gira em torno de 12 milhões (<http://www.endocrino.org.br/numeros-do-diabetes-no-brasil/>).

O quadro de diabetes resulta em complicações como osteopenia associada a diminuição da densidade mineral (Jehle *et al.*, 1998; Tuominen *et al.*, 1999), redução na formação e aumento da reabsorção óssea, bem como osteopenia (Krakauer *et al.*, 1995), aumentando, dessa forma, o risco de fraturas, sendo a mais recorrente a fratura no quadril (Forsen *et al.*, 1999; Vestergaard *et al.*, 2005) e em ossos longos (Nicodemus e Folsom, 2001). Segundo trabalhos publicados, os quadros de diabetes tipo 1 e 2 estão associados ao aumento no risco de fraturas, sugerindo que fatores como a hiperglicemia ou alterações na pressão vascular sejam os responsáveis por tal aumento (Strotmeyer e Cauley, 2007; Khazai *et al.*, 2009). Pesquisas envolvendo animais diabéticos tipo 1 induzidos pela administração de estreptozotocina constataram que houve diminuição na densidade mineral óssea dos animais diabéticos, redução no conteúdo mineral ósseo, assim como nos níveis de osteocalcina no soro, além de diminuição da força biomecânica nos ossos longos (Botolin *et al.*, 2005).

O quadro de diabetes acelera a destruição do tecido através da ação de leucócitos polimorfonucleados, alteração no metabolismo do colágeno e na permeabilidade vascular. A hiperglicemia resulta em estresse celular, aumentando a glicação não enzimática e oxidação de proteínas e lipídios, levando a formação de produtos finais da glicação avançada (Advanced Glycation End Products - AGE) os quais podem modificar as ligações cruzadas das moléculas que constituem a matriz, impedir a ação dos fatores de crescimento, elevar o estresse oxidativo e induzir a elevada produção de citocinas pró inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), e interleucina 18 (IL-18), através da interação do AGE com o seu receptor celular, RAGE (Chang *et al.*, 2012). De acordo com o trabalho de Chang *et al.* (2012), a diabetes afeta o reparo do tecido ósseo, ocorrendo a diminuição na formação de osteóide, aposição imperfeita de mineral no osso, bem como diminuição do recrutamento dos osteoblastos e aumento no recrutamento dos osteoclastos.

Além disso, Pacios *et al.* (2013) mostrou que no quadro de diabetes, os elevados níveis de TNF- α responsáveis por inibir a capacidade de regulação dos fatores pró inflamatórios, levam ao aumento da apoptose celular através da ativação da caspase (família de enzimas que possuem uma cisteína em sua estrutura molecular e atuam como proteinases), afetando diretamente e de forma negativa a união do tecido ósseo durante o processo de reparo em animais diabéticos. Além de aumentar a apoptose celular, Boyce *et al.* (2005) explica que a presença de TNF- α no local do defeito ósseo contribui para a osteoclastogênese de forma indireta, atuando nos linfócitos T, linfócitos B e células endoteliais, induzindo a produção e liberação de ativador do fator de necrose- kB ligante (RANKL) por tais células. O RANKL, por sua vez, liga-se ao seu receptor RANK localizado na superfície da célula precursora de osteoclasto, levando a sua diferenciação, o que resulta em aumento na reabsorção óssea e atraso no reparo do defeito. Trabalhos envolvendo humanos diabéticos também mostraram que as taxas de RANKL/OPG (Osteoprotegerina) e TNF- α estavam elevadas nos indivíduos cuja glicemia não era controlada (Santos *et al.*, 2010; Bastos *et al.*, 2012), levando ao aumento de doenças periodontais, fraturas ósseas e osteoporose, concluindo dessa forma, a importância da diminuição dos fatores inflamatórios, com o objetivo de limitar a reabsorção do tecido ósseo (Pacios *et al.*, 2013).

Para explicar o desequilíbrio fisiológico da formação óssea em virtude da diabetes durante o processo de reparo são necessários estudos moleculares que identifiquem a presença e a quantidade das principais proteínas envolvidas no reparo.

Diante do exposto, o atual trabalho teve como objetivo avaliar o reparo ósseo em defeitos de tamanho crítico tratados com matriz alogênica óssea desmineralizada frente ao quadro de diabetes através das análises das citocinas TNF- α , RANKL e OPG, relacionadas com o processo de reparo ósseo. Tal avaliação incluiu análises moleculares de PCR, *Western blotting* e imunistoquímica para cada uma das citocinas já citadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A DIABETES

Diabetes melitus é uma desordem metabólica caracterizada pelo elevado índice glicêmico, cujo tipo 1 origina-se de uma deficiência de insulina comumente devido a problemas autoimunes contra as células β pancreáticas; enquanto no tipo 2 o tecido muscular, adiposo e outras células alvo tornam-se resistentes a ação da insulina, induzindo as células β a produzirem quantidades elevadas desse hormônio, como um mecanismo compensatório até que a quantidade excessiva de insulina é insuficiente para manter os níveis fisiológicos normais de glicemia no sangue (Wu *et al.*, 2015).

Segundo a literatura, os países com os maiores índices de pessoas diabéticas até 2025 serão a Índia, a China e os Estados Unidos. Quanto a diabetes tipo 1, ela representa de 5 a 10 % do total de casos espalhados pelo mundo (Diagnosis and classification of diabetes mellitus, 2009) e é o tipo de diabetes mais comum entre os jovens, representando aproximadamente 85 % dos casos de diabetes entre os jovens com idade abaixo de 20 anos (Liese *et al.*, 2006), sendo que em média, homens e mulheres são afetados igualmente pela diabetes tipo 1 (Soltesz *et al.*, 2007). Já a diabetes tipo 2 afeta até 90 % da população mundial (Zimmet *et al.*, 2001) sendo considerada atualmente não somente uma desordem metabólica característico de adulto, mas também de jovens, adolescentes e crianças (Pinhas-Hamiel e Zeitler, 2005).

Embora ambos os tipos de diabetes estejam associados com o elevado risco de fraturas ósseas, Khan e Fraser (2015) defendem que a diabetes tipo 1 está associada a um aumento de 6,9 vezes no risco de fratura de quadril quando comparado com pessoas não diabéticas, além do aumento dos casos de osteoporose devido a fragilidade óssea relacionada ao quadro de diabetes tipo 1. Por esta razão, é importante entender os mecanismos celulares por traz da diabetes responsáveis por alterar o metabolismo do tecido ósseo.

2.2 ESTREPTOZOTOCINA E A DIABETES

A estreptozotocina é largamente utilizada para a indução do quadro de diabetes em animais, podendo ser administrada em diversas doses e concentrações (Motyl e McCabe, 2009; Rosa *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015; Xing *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016), devido a sua citotoxicidade sobre as células β das ilhotas pancreáticas. Segundo a literatura, a estreptozotocina, por ser uma molécula análoga a glicose (Eleazu *et al.*, 2013), é captada pela célula β através do transportador de glicose GLUT2, resultando em alquilação do DNA e reduzindo o conteúdo de ATP e NAD^+ (Szkudelski e Szkudelska, 2002).

Derivada da bactéria *Streptomyces achromogenes*, a estreptozotocina ($\text{C}_8\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_7$) apresenta peso molecular de 265 g/mol, sendo sua estrutura composta por uma molécula da classe das nitrosúreas (formado por um grupo nitroso e uma uréia) ligado a um grupo metil de um lado da molécula e uma glicose na outra extremidade (Eleazu *et al.*, 2013).

Adaptado de Eleazu *et al.*, (2013) Journal of Diabetes & Metabolic Disorders 2013, 12:60 - <http://www.jdmdonline.com/content/12/1/60>

A ação citotóxica da estreptozotocina é intracelular, sendo necessário atravessar a membrana plasmática da célula alvo. Embora a nitrosurea seja lipofílica e atravesse com facilidade a membrana citoplasmática das células, a molécula de estreptozotocina pelo contrário, é hidrofílica, limitando sua entrada nas células de um organismo. É dessa forma que a seletividade tóxica da estreptozotocina atua sobre a célula beta pancreática, pois a glicose em sua estrutura molecular apresenta baixa afinidade com o transportador GLUT 2, presente na superfície das células β , suficiente para possibilitar sua entrada nesta célula que, por sua vez, apresenta intensa captação de glicose, sendo mais sensível a hexose presente na estrutura molecular da estreptozotocina (Elsner *et al.*, 2000; Lenzen, 2008). Entretanto, outras células que expressam GLUT 2 também são vulneráveis a ação da estreptozotocina, como os hepatócitos e as células dos túbulos renais, explicando os resultados observados em experimentos que utilizam animais que receberam estreptozotocina apresentavam problemas no funcionamento do fígado e dos rins (Eleazu *et al.*, 2013).

Segundo Eleazu *et al.* (2013), uma vez no interior da célula, a estreptozotocina levava a célula β a apoptose através de três mecanismos: 1) metilação do DNA, 2) produção de óxido nítrico e 3) liberação de radicais livres como o peróxido de hidrogênio. Primeiramente, a metilação do DNA ocorre através da ação da metilnitrosurea presente na molécula de estreptozotocina. A metilnitrosurea doa um grupo metil, provocando, dessa forma, danos na molécula de DNA, levando a ativação da poli-ADP-ribose polimerase (PARP), numa tentativa de reparar os danos no DNA, esgotando com NAD^+ e consequentemente com os estoques de ATP devido a super estimulação dos mecanismos para tentar reparar o DNA, resultando na morte celular por esgotamento de suas fontes de energia (Lenzen, 2008).

A estreptozotocina também atua como doadora de óxido nítrico (NO), levando a alquilação e dano na molécula de DNA. Além disso, ocorre aumento na atividade da guanilil ciclase e formação de guanosina monofosfato cíclico (*cyclic guanosine monophosphate* – cGMP), característicos do efeito do óxido nítrico sobre a célula (Eleazu *et al.*, 2013).

E por fim, a estreptozotocina é responsável por diminuir a ação de enzimas antioxidantes, tais como catalase, glutathione antioxidante e superóxido dismutase, sendo produzidas espécies de oxigênio reativo (ROS), que causam danos aos tecidos, em especial à célula β pancreática. Um dos resultados do estresse oxidativo

provocado pelo ROS é a produção de ácido úrico como produto final da degradação do ATP pela xantina oxidase, gerando mais ROS, tais como supeóxidos e radicais hidroxila a partir do peróxido de hidrogênio (Lenzen, 2008; Eleazu *et al.*, 2013). Além disso, a produção de ROS inibe a ação da aconitase, proteína responsável por proteger o DNA mitocondrial da degradação (Vergani *et al.*, 2004).

Dessa forma, a estreptozotocina induz a apoptose das células β através de diversos mecanismos descritos neste tópico, sendo, por esta razão, utilizada nos animais desta tese para a indução do quadro de diabetes tipo 1.

2.3 A DIABETES E SUA INFLUENCIA NO TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo apresenta um equilíbrio entre a reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos e a formação óssea mediada pelos osteoblastos, contribuindo para a remodelação óssea (Zhang *et al.*, 2011; Coe *et al.*, 2013). Quando esse equilíbrio é prejudicado, favorecendo a reabsorção óssea, é comum o aparecimento de doenças como a osteoporose (Fujii *et al.*, 2015), que são acompanhadas de um atraso no reparo de possíveis defeitos ósseos. Tal quadro de desequilíbrio no metabolismo ósseo é característico de indivíduos que apresentam diabetes (Parajuli *et al.*, 2015; Yamamoto, 2015). Por tanto, a fragilidade do tecido ósseo no quadro de diabetes está relacionada principalmente a alterações nas atividades dos osteoblastos e osteoclastos.

Primeiramente, os osteoblastos são afetados pela diabetes devido a elevada formação de produtos finais da glicosilação avançada (AGE) e pela elevada expressão de seus receptores RAGE nos osteoblastos e pré-osteoblastos (Santana *et al.*, 2003), que ativam a via MAPKinase (*Mitogen Activated Protein Kinases*), aumentando assim a apoptose dos osteoblastos (Alikhani *et al.*, 2007), além de interferir na expressão dos fatores de transcrição que regulam a diferenciação das células indiferenciadas em osteoblastos (Lu *et al.*, 2003; Santana *et al.*, 2003). De acordo com o experimento de Santana *et al.* (2003), após administrar moléculas de AGE em defeitos ósseos, verificou que o reparo foi reduzido pela metade, sugerindo que as moléculas de AGE, as quais estão presentes em elevada quantidade na diabetes, prejudicaram o reparo ósseo.

Além do aumento no processo apoptótico diretamente dos osteoblastos, Khan e Fraser (2015) defendem que uma das razões que explicam a deficiência na quantidade destas células frente a diabetes é a incapacidade de manter células mesenquimais indiferenciadas capazes de se diferenciar em osteoblastos, já que estas também sofrem apoptose quando o quadro de diabetes está instalado. Segundo o estudo realizado por Lu *et al.* (2003) com células mesenquimais retiradas da medula óssea de camundongos normoglicêmicos e diabéticos (induzidos por estreptozotocina), ao utilizar marcadores para diferenciação de osteoblastos – Runx-2 e Dlx-5 – verificou que o grupo diabético apresentava menor marcação quando comparados com o grupo normoglicêmico. Além de observarem também uma redução na expressão de osteocalcina, proteína produzida por osteoblastos (um marcador da atividade de osteoblastos maduros) que é expresso ao final da cascata de reações relacionadas com RUNX-2 (Qi *et al.*, 2003), a qual além de ser responsável por regular a homeostase, é importante também na interação entre o osso e o metabolismo da glicose, através da promoção da proliferação de células β e o consequente estímulo a liberação de insulina (Neve *et al.*, 2013).

De acordo com a literatura, AGE também inibe a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas, através do aumento do ROS (Kume *et al.*, 2005; Stolzing *et al.*, 2010). Notsu *et al.* (2014) demonstrou em células mesenquimais indiferenciadas humanas e de camundongos que a molécula AGE inibe a diferenciação osteogênica através da expressão de fator de crescimento tumoral beta (TGF- β), proteína responsável por controlar a divisão celular (antiproliferativa). Assim, elevados níveis de TNF- α e do AGE afetam a diferenciação e atividade dos osteoblastos, dificultando a produção de matriz óssea e o reparo do tecido ósseo frente a uma fratura.

Segundo pesquisas, animais diabéticos apresentam elevados níveis de mediadores inflamatórios, como o TNF, que contribui para o aumento da apoptose das células ósseas (Liu *et al.*, 2006; Alblowi *et al.*, 2009) e a diabetes promove a indução de mais de 70 genes responsáveis por regular a apoptose durante a inflamação induzida pela injúria óssea, e aumenta a atividade da caspase 8, 9 e 3, responsáveis por regular a apoptose (Al-Mashat *et al.*, 2006). Segundo Kayal *et al.* (2010), após realizar uma fratura no fêmur de camundongos diabéticos induzidos pela estreptozotocina, demonstrou que o RNAm originados dos genes relacionados com o processo apoptótico são significativamente expressos, resultando em

elevados níveis de TNF- α e aumento na atividade do fator de transcrição proapoptótico, FOXO1. Segundo Chang *et al.* (2013), o processo inflamatório afeta também as células mesenquimais indiferenciadas através da ativação NF-kB, cuja atividade interfere com a diferenciação celular estimulada pela Wnt. Além disso, TNF- α inibe a ativação do fator de transcrição osterix (Osx) (Lu *et al.*, 2003) interferindo, dessa forma com a diferenciação dessas células em osteoblastos, pois Osx é essencial durante as primeiras etapas da diferenciação.

Quanto aos efeitos da diabetes sobre os osteoclastos, pode ser resultado de um aumento de diversas citocinas (Walsh *et al.*, 2005; Kitami *et al.*, 2010). Os osteoclastos apresentam sua origem da linhagem monócito/macrófago e são formados através da fusão de células precursoras mononucleares. Durante o processo de formação dos osteoclastos, é necessário que ocorra contato entre as células precursoras de osteoclastos e as células estromais da medula óssea ou osteoblastos, ou ainda, interação entre as células precursoras de osteoclastos e fatores produzidos e liberados pelas células estromais da medula óssea e os osteoblastos (Suda *et al.*, 1992). Segundo a literatura, o “receptor para ativador do fator de necrose- $\kappa\beta$ ” (RANK) e seu ligante (RANKL) bem como o “fator estimulante para colônia de macrófago” (M-CSF) são citocinas essenciais para o desenvolvimento e diferenciação dos osteoclastos (Vaananen e Laitala-Leinonen, 2008), sendo que os osteoblastos expressam e liberam ambas as citocinas (Lacey *et al.*, 1998; Yasuda *et al.*, 1998). A expressão de RANKL pelos osteoblastos depende de fatores osteotrópicos, tais como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-11 e IL-17, resultando no aumento da formação de osteoclastos (Feldmann *et al.*, 1996; Kotake *et al.*, 1999; Vaananen e Laitala-Leinonen, 2008), enquanto que a diferenciação de pré-osteoclastos em osteoclastos maduros depende da presença de RANKL e M-CSF (Lacey *et al.*, 1998; Yasuda *et al.*, 1998).

Segundo Boyce *et al.* (2005), uma das principais citocinas, o TNF- α induz os linfócitos T, linfócitos B, células endoteliaise osteoblastos a produzirem e liberarem RANKL, que por sua vez, liga-se ao seu receptor RANK expresso na superfície da célula precursora, levando a sua diferenciação em osteoclasto. O TNF- α também é capaz de ligar-se diretamente ao seu receptor localizado na superfície da célula precursora, atuando diretamente na diferenciação desta célula em osteoclasto, levando a um aumento na expressão de receptores RANK, contribuindo, dessa forma, para a diferenciação de osteoclastos via RANKL. Para contrabalancear a

osteoclastogenese, a molécula osteoprotegerina (OPG) liga-se diretamente ao RANKL, impedindo sua ligação ao seu receptor RANK, bloqueando a diferenciação da célula precursora em osteoclasto (Boyle *et al.*, 2003). Segundo trabalho desenvolvido pela equipe de De Amorim *et al.* (2008), verificou-se que um desequilíbrio na expressão de RANKL/OPG pode resultar em atraso no reparo de fratura óssea em animais diabéticos.

De acordo com a literatura, animais diabéticos apresentam elevada expressão de TNF- α , fator estimulador de colônia de macrófago (M-CSF), RANKL e VEGF, resultando em aumento na diferenciação e ativação de osteoclastos (Jeffcoate *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2005; Kayal *et al.*, 2007). Segundo Ha *et al.* (2004), pacientes com diabetes tipo 2 apresentavam elevados níveis de espécies de oxigênio reativos (ROS) nas mitocôndrias, o qual promove a diferenciação de osteoclastos mediada por RANKL. Além disso, a presença de AGE e RAGE também estão relacionados com o aumento na atividade dos osteoclastos através da elevada ativação do fator de transcrição NF- κ B (Lalla *et al.*, 2000), resultando na expressão de IL-6, também responsável por iniciar a diferenciação de células progenitoras em osteoclastos (Ding *et al.*, 2006). De acordo com Ding *et al.* (2006), ao trabalhar com camundongos que não expressavam RAGE, verificou elevada massa óssea e reduzido número de osteoclastos, comparado com o grupo controle.

Somando-se a isso, pesquisas desenvolvidas com humanos diabéticos tipo 2 mostraram elevados níveis de fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP), indicando intensa atividade osteoclástica (Suzuki *et al.*, 2005; Takizawa *et al.*, 2008), aumentando, dessa forma, a reabsorção óssea. Além do TRAP, Hie *et al.* (2009), ao trabalhar com ratos diabéticos tipo 1 induzidos por estreptozotocina, mostrou que a expressão de catepsina K (protease expressa por osteoclastos, essencial para a reabsorção óssea) foi maior no grupo diabético que a observada no grupo normoglicêmico. Tais resultados corroboram com a pesquisa de Liu *et al.* (2006), cujos ratos diabéticos tipo 2 apresentaram elevada reabsorção óssea por osteoclastos.

Como consequência pela diabetes afetar as atividades dos osteoblastos e osteoclastos, responsáveis pela remodelação da matriz óssea, sua constituição e estrutura também é prejudicada por esta doença (Khan e Fraser, 2015). Estudos envolvendo humanos e animais com diabetes tipo 1 tem documentado baixa

deposição de matriz óssea, resultando em ossos com tamanho reduzido, bem como matriz óssea alterada com aumento da porosidade cortical (Rosenbloom e Silverstein, 1996; Saito *et al.*, 2006; Bechtold *et al.*, 2007; Melton *et al.*, 2008; Saha *et al.*, 2009; Burghardt *et al.*, 2010). Além disso, como já visto em parágrafos anteriores, a hiperglicemia e alterações hormonais presentes no quadro de diabetes levam a uma diminuição da proliferação e diferenciação das células precursoras da matriz óssea em osteoblastos (Mccarthy *et al.*, 1997), reprimem as funções dos osteoblastos já existentes (Bouillon *et al.*, 1995; Botolin e McCabe, 2006) e aumentam a nanoglicosilação do colágeno constituinte da matriz óssea (Rosenbloom e Silverstein, 1996; Saito *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2009).

De acordo com Yamamoto (2015), o colágeno tipo 1 é a principal proteína constituinte da matrix óssea devido as ligações entre proteínas colágenas vizinhas, formando uma fibra colágena de estrutura estável, conferindo ao tecido ósseo resistência mecânica. Porém, Saito e sua equipe observaram em ratos espontaneamente diabéticos (WBN/Kob) que nos estágios iniciais do quadro de diabetes ocorreu um aumento de pentosidina (um dos produtos finais da glicosilação avançada – AGE) presente no colágeno ósseo, comprometendo, dessa forma, a resistência mecânica do tecido ósseo (Saito *et al.*, 2006; Saito e Marumo, 2013).

Corroborando com os resultados obtidos por Saito e sua equipe, o estudo desenvolvido por Neumann *et al.* (2014), mostrou elevados níveis de pentosidina no sangue de pacientes diabéticos tipo 1, sendo associado ao grande número de fraturas que tais pacientes sofreram. Um quadro patológico de hiperglicemia resulta na glicosilação excessiva das fibras de colágeno ósseo, levando a formação de ligações cruzadas entre as fibras de colágeno através de um mecanismo não enzimático, sendo essa uma das razões para deterioração das propriedades mecânicas do tecido ósseo (Yamamoto, 2015). Isto foi demonstrado pela experiência realizada por Silva *et al.* (2009) cujos resultados mostraram um aumento nas ligações cruzadas não enzimáticas em ratos diabéticos tipo 1. Além disso, a diminuição do colágeno, observada em indivíduos diabéticos, pode estar relacionada com distúrbios na mineralização, comprometendo o reparo de defeitos ósseos.

Além dos osteoblastos e osteoclastos, os osteócitos também são muito importantes na manutenção e remodelação da matriz óssea, já que são abundantes e formam uma rede, comunicando-se por canalículos, formando um princípio mecanosensor da matriz óssea (Bonewald e Johnson, 2008). Segundo pesquisa de

Villarino *et al.* (2006), a análise histomorfométrica mostrou uma redução nos marcadores de atividade dos osteócitos, bem como redução na densidade lacunar total e densidade dos osteócitos em ratos diabéticos tipo 1, corroborando com os resultados obtidos por Portal-Nunez *et al.* (2010) cujos camundongos diabéticos tipo 1 exibiram uma redução no número de osteócitos devido ao aumento da apoptose.

Outro ponto interessante a ser abordado sobre os osteócitos é a produção e liberação de esclerostina, importante regulador negativo da via de sinalização intracelular associada a proliferação celular Wnt (sigla resultante da fusão entre o nome do gene *wingless* da *Drosófila* com o nome do gene homólogo humano *integrated or int-1*), relacionado com a diferenciação dos osteoblastos (Khan e Fraser, 2015). Segundo a pesquisa de Hie *et al.* (2011), foi detectado aumento de esclerostina nos ratos diabéticos tipo 1 e sua atividade inibiu a via Wnt de diferenciação dos osteoblastos. Tal aumento na produção de esclerostina também foi observado em humanos diabéticos tipo 1 e 2 (Gennari *et al.*, 2012; Catalano *et al.*, 2014; Neumann *et al.*, 2014).

2.4 DEFEITOS ÓSSEOS CRANIANOS E A UTILIZAÇÃO DE ENXERTOS NAS CIRURGIAS CRANIOMAXILOFACIAIS

Em virtude dos efeitos da diabetes sobre as células e a matriz do tecido ósseo, este apresenta suas propriedades alteradas (Oikawa *et al.*, 2010), com reduzida quantidade de proteínas na matriz, como o colágeno, osteocalcina, proteoglicanas e do íon cálcio, além da diminuição da atividade da fosfatase alcalina, com reduzida formação de cristais de hidroxiapatita, resultando em baixa mineralização (Hie *et al.*, 2009), conferindo ao tecido ósseo baixa qualidade e maior vulnerabilidade a fraturas, além de atraso e complicações no processo de reparo ósseo, como foi observado na dissertação de mestrado de Bighetti (2011).

Além disso, um trauma pode levar a grande perda de tecido ósseo, resultando em um defeito de tamanho crítico, impossibilitando seu reparo de forma espontânea tanto em condições de normoglicemia como em um quadro de diabetes. No caso de defeitos de tamanho crítico ocorridos na região craniofacial, estes apresentam complexas necessidades estruturais tridimensionais como, por exemplo, defeitos no crânio onde o cérebro subjacente necessita de proteção, ou um defeito na

mandíbula, onde é necessário manter a integridade mecânica da articulação temporomandibular, além da importância de preservar a estética facial durante o tratamento do defeito (Elsalanty e Genecov, 2009).

Nesses casos, pesquisas e testes envolvendo diferentes tipos de enxertos ósseos são fundamentais para o desenvolvimento e aprimoramento dos materiais utilizados nas cirurgias, contribuindo para o reparo ósseo, mesmo em condições adversas, como a presença de um quadro de diabetes (Bosch *et al.*, 1998; Chow e Rabie, 2000; Boyan *et al.*, 2006; Cestari *et al.*, 2009; Accorsi-Mendonça *et al.*, 2011; Belfrage *et al.*, 2011; Conz *et al.*, 2011; Qu *et al.*, 2015; Saltzman *et al.*, 2015; Sarikaya e Aydin, 2015). Para isso, muitas espécies tem sido usadas para reproduzir defeitos ósseos, como camundongos, ratos, coelhos, porcos, ovelhas e cabras, mas a maioria dos estudos tem utilizado roedores devido a reprodutibilidade e por ser um modelo mais econômico (Gomes e Fernandes, 2011).

De acordo com Gomes e Fernandes (2011), o modelo animal de defeitos na calvaria de tamanho crítico vem sendo muito aplicado nas pesquisas envolvendo enxertos ósseos devido a estrutura da calvaria que permite a reprodução do defeito de forma uniforme nos animais e que podem ser facilmente avaliados por radiografia ou análise histológica, além da anatomia da calvaria permitir fácil acesso durante os procedimentos cirúrgicos e a presença da dura-máter, que estabelece um suporte para o enxerto implantado. De acordo com a literatura, a dura-máter e o perióstio da borda do defeito são capazes de fornecer suprimento sanguíneo bem como células osteoprogenitoras para a cortical óssea neoformada, contribuindo para o reparo do defeito ósseo (Wang e Glimcher, 1999; Gosain *et al.*, 2003).

Schmitz e Hollinger (1986), definem o defeito de tamanho crítico como “ferida intraóssea de menor tamanho em um determinado osso e espécie de animal, que não cicatrizará espontaneamente durante o tempo de vida do animal”. Dessa forma, foi determinado que o tamanho crítico para defeitos em calvária de ratos é de 8 mm (Schmitz *et al.*, 1990) e para camundongos é de 5 mm (Krebsbach *et al.*, 1998). Por outro lado, Gosain *et al.* (2000) explica que o tempo que leva de uma pesquisa é menor que o tempo de vida do animal, concluindo que um defeito ósseo é considerado de tamanho crítico quando este não for capaz de se reparar espontaneamente durante o período de duração do experimento.

Segundo o experimento de Cestari *et al.* (2009), defeitos com 9 milímetros de diâmetro na calvária de cobaias tratados somente com coágulo não repararam de forma espontânea dentro dos períodos experimentais (0, 30, 90 e 180 dias), sendo observada neoformação óssea somente nas bordas do defeito, enquanto o centro do defeito foi invadido e ocupado por tecido conjuntivo. Accorsi-Mendonça *et al.* (2011), após utilizar o mesmo modelo de defeito em calvaria de ratos tratados somente com coágulo verificou que não houve reparo ósseo espontaneamente nem mesmo até o período de 270 dias. Dessa forma, segundo os resultados desses trabalhos mencionados, o defeito ósseo com 8 milímetros de diâmetro em calvaria de ratos não apresentam a capacidade de se reparar espontaneamente, constituindo um bom modelo experimental para estudar enxertos ósseos.

Segundo Spicer *et al.* (2012), a calvaria do rato permite reproduzir um defeito que pode ser realizado de forma rápida e não requer fixação para estabilizar o osso, como geralmente acontece em defeitos realizados em fêmur. Além disso, a calvaria é uma área que anatomicamente não sofre pressão ou ação mecânica do tecido muscular (Bosch *et al.*, 1998), como acontece nos ossos longos, além da relevância na resposta fisiológica, pois o enxerto ocorre em sítio ortotópico (Cooper *et al.*, 2010).

Assim, os defeitos nas calvarias de ratos servem como método rápido e de alto rendimento *in vivo* para avaliar a regeneração do tecido ósseo. Dessa forma, o defeito na calvaria de rato pode ser utilizado para avaliar o reparo ósseo e testar diferentes biomateriais e a bioengenharia de tecidos antes de ser testado em animais maiores ou mesmo transplantados na região craniofacial de humanos (Muschler *et al.*, 2010).

Outra questão sobre defeitos na calvaria é o número de defeitos e a posição em que são realizados, pois a regeneração óssea em áreas de sutura cranial em indivíduos em fase de crescimento é questionável (Mardas *et al.*, 2002). Para resolver esse impasse, Bosch *et al.* (1998) explicam que após a realização de dois defeitos bilaterais na calvária de ratos Wistar de 6 meses, com 5 mm de diâmetro cada, criou um *design* pareado para o experimento, evitando a sutura sagital, minimizando a morbidade e protegendo o sino médio-sagital. Entretanto várias pesquisas utilizaram um modelo que consistiu em um único defeito de 8 mm de diâmetro localizado na região sagital-média do crânio com o objetivo de evitar a co-

influencia entre os defeitos e o risco de dois defeitos realizados muito próximos se confluírem em um único defeito com o dobro do tamanho esperado (De Oliveira *et al.*, 2008; Patel *et al.*, 2008; Cestari *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009; Accorsi-Mendonça *et al.*, 2011).

Diante do que foi exposto nos parágrafos anteriores sobre o modelo de defeito ósseo, para este trabalho optou-se pelo modelo de um único defeito crítico de 8 mm na calvaria de ratos, sendo este o modelo de defeito padronizado e utilizado nos trabalhos desenvolvidos no nosso laboratório.

2.5 OS TIPOS DE ENXERTOS ÓSSEOS

Quanto aos tipos de enxertos mais estudados e utilizados nas cirurgias ortopédicas e ortognáticas, temos primeiramente, o enxerto **autógeno**, obtido do próprio receptor. Este enxerto apresenta três propriedades essenciais para que ocorra a integração deste ao sítio receptor: 1) osteogenia, pois possui células que são capazes de responder às moléculas bioativas osteoindutoras, proliferando e sintetizando matriz óssea (Pinto *et al.*, 2007); 2) osteocondução, pois atuam como suporte para a formação de vasos sanguíneos e para as células mesenquimais migrarem até a região do defeito, aderirem e proliferarem (Cestari, 2009); 3) osteoindução, pois ao serem reabsorvidas pelos osteoclastos, liberam morfógenos aprisionados na matriz, como BMPs que atuam na diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos (Urist, 2009).

Segundo Elsalanty e Genecov (2009), o enxerto ósseo autógeno pode ser obtido de osso esponjoso, da cortical óssea vascularizada, da cortical óssea não vascularizada, bem como da medula óssea. A formação de osso neoformado ocorre em duas fases: na primeira fase, com duração de 4 semanas, a formação óssea ocorre pelas células presentes no próprio enxerto; na segunda fase, células oriundas do sítio receptor contribuem com a neoformação de matriz óssea, já as células do endóstio e do estroma da medula óssea são responsáveis por produzir mais da metade da matriz neoformada, enquanto que os osteócitos contribuem com aproximadamente 10% (Elsalanty e Genecov, 2009).

As maiores vantagens de se trabalhar com enxerto autógeno, seja cortical ou esponjoso são as elevadas chances de sucesso de integração do enxerto ao sítio receptor, baixo risco de transmissão de doenças e pela histocompatibilidade (Elsalanty e Genecov, 2009). Entretanto, o enxerto autógeno apresenta também algumas desvantagens, pois há a necessidade de uma intervenção cirúrgica a mais para a obtenção do enxerto, podendo levar a morbidade no local doador e risco de infecção, além da dificuldade de obtenção do enxerto autógeno na quantidade necessária, pois geralmente a quantidade obtida não é suficiente para preencher toda a área receptora (Carson e Bostrom, 2007; Pinto *et al.*, 2007). Segundo Tang *et al.* (1998), ao trabalhar com trinta e nove pacientes cujo enxerto ósseo foi obtido da fíbula para tratamento de necrose avascular na cabeça do fêmur, 42% apresentaram instabilidade ao ficarem em pé e 37% apresentaram sensação de fraqueza.

Como alternativa para o enxerto autógeno, os cirurgiões vem utilizando o enxerto **alógeno**, obtido de um doador da mesma espécie que o receptor, em diferentes preparações: como uma matriz óssea desmineralizada, triturada ou em pó, como um enxerto obtido de osso cortical ou de uma mistura de osso cortical e esponjoso, ou mesmo um segmento ósseo ou osteocondral (Elsalanty e Genecov, 2009). Segundo a literatura, o enxerto alógeno pode ser classificado em 3 tipos: **1) congelado** (Fresh-Frozen Bone - FFB), cujo processo de congelamento leva a morte das células presentes no material, diminuindo o risco de reação imunológica, porém sua osteointegração acaba sendo afetada devido a sua baixa atividade biológica (Stevenson *et al.*, 1996); **2) liofilizado ou criodissecado** (mialized Freeze-Dried Bone Allograft - FDBA), cujo processo de obtenção além de garantir que não ocorra reação imunológica para o receptor, preserva suas estruturas minerais e orgânicas, permitindo primeiramente sua ação osteocondutora e posteriormente a sua reabsorção por parte dos osteoclastos, sua atividade osteoindutora, com liberação de fatores de crescimento (Wood e Mealey, 2012); **3) desmineralizado** (Demineralized Bone Matrix - DBM) e o desmineralizado criodissecado (Demineralized Freeze-Dried Bone Allograft - DFDBA), que também não acarreta reação imunológica para o receptor e seu processo de obtenção preserva somente as estruturas orgânicas, como proteínas colágenas e não colágenas, como BMPs e fatores de crescimento, tais como TGF- β e FGF (Ozdemir e Kir, 2011; Wood e Mealey, 2012).

Devido à crescente demanda na utilização de enxerto alógeno, surgiram diversos bancos de ossos espalhados por diferentes países, inclusive o Brasil, sendo que tais bancos de ossos seguem um método padronizado para eliminação de microrganismos e evitar contaminação ou deterioração do osso alógeno: primeiramente realiza-se a triagem dos doadores, emprego de assepsia durante a obtenção do enxerto e esterilização com raio gama por métodos químicos ou térmicos (Nguyen *et al.*, 2007) e armazenamento dos ossos congelados a -80°C (Holzmann *et al.*, 2010).

Dentre os modelos citados anteriormente, a matriz óssea desmineralizada tem ganhado destaque por ser facilmente reabsorvida pelos osteoclastos, liberando, dessa forma, BMPs e fatores de crescimento, como o VEGF que resultará na formação de novos vasos em meio ao material aloigenico desmineralizado enxertado (Wood e Mealey, 2012). A matriz óssea desmineralizada pode ser obtida em blocos, lâminas ou mesmo particulado, sendo geralmente este último modelo o mais empregado nas cirurgias pois é o material que melhor preenche a área do defeito, por se adaptar ao seu formato (Elsalanty e Genecov, 2009). Atuando como osteocondutor e osteoindutor, também permite uma rápida vascularização da área enxertada e seu potencial no reparo ósseo pode ser aumentado ao adicionar no enxerto alógeno desmineralizado células da medula óssea do próprio receptor (Elsalanty e Genecov, 2009).

De acordo com a literatura (Burg *et al.*, 2000; Finkemeier, 2002; Elsalanty e Genecov, 2009), os pioneiros que desenvolveram um processo padrão para obtenção da matriz óssea desmineralizada foi Urist e sua equipe (Urist *et al.*, 1968), sendo aprimorado por Reddi e Huggins (1972), no qual o osso aloigenico é triturado ou pulverizado em partículas de aproximadamente 74 a 420 microns e logo em seguida é desmineralizado em ácido clorídrico 0,5N mEq/g durante três horas, sendo o ácido removido através da lavagem com água, etanol e éter etílico, sendo esta técnica utilizada nos dias de hoje pelas empresas e bancos de ossos.

Outra característica da matriz óssea desmineralizada que exerce influência na atividade osteoindutora é o tamanho da partícula, bem como seus níveis de cálcio, como mostrou o trabalho de Zhang *et al.* (1997), que obteve os melhores resultados envolvendo formação óssea ao implantar em tecido muscular de camundongo partículas entre 500 e 700 microns com resíduo de 2% de cálcio.

Segundo a explicação dos autores, a porcentagem de cálcio presente no enxerto é baixa, facilitando a liberação de BMPs, sendo, porém, suficiente para atuar como arcabouço para a formação de cristais de hidroxiapatita (Zhang *et al.*, 1997).

A atividade biológica da matriz óssea desmineralizada consiste na presença das proteínas e fatores de crescimento presentes na matriz extracelular que estão acessíveis devido ao processo de desmineralização, resultando na diferenciação de células mesenquimais em condroblastos e osteoblastos, iniciando a neoformação óssea (Urist e Strates, 2009). Segundo Urist e Dawson (1981), o osso cortical é o mais escolhido para a obtenção de matriz óssea desmineralizada devido a elevada atividade osteoindutora com baixo potencial antigênico quando comparado com osso trabecular. Urist em seu trabalho, descreveu histologicamente o processo pelo qual ocorre a formação de osso na presença de matriz óssea desmineralizada em sítio ectópico (Urist *et al.*, 1967). Inicialmente, ocorre a infiltração de células inflamatórias e mesenquimais. Então, aproximadamente na terceira semana de reparo é possível visualizar a formação de novos vasos sanguíneos, a presença de células progenitoras e condrócitos. Logo em seguida, osteoblastos, osteócitos e condroblastos dão início a síntese de cartilagem a qual será transformada em tecido ósseo. Na quarta semana osteoclastos estão presentes no local e é visível o início da organização da medula óssea.

Cestari (2009), após estudar o reparo ósseo em calvaria de ratos, explica que o reparo ósseo inicia-se com elevada expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) pelas células endoteliais presentes nos tecidos adjacentes ao defeito, podendo ser verificado logo aos 7 dias. Atuam também no início do processo de reparo fatores quimiotáticos para precursores de osteoclastos (Engsig *et al.*, 2000) e a ativação destes (Niida *et al.*, 1999), através da ação das citocinas TNF- α , RANKL e OPG, regulando a osteoclastogênese na região do defeito. Na dissertação de Bighetti (2011), após utilizar partículas de uma matriz alogênica óssea desmineralizada em defeitos de tamanho crítico em calvaria de ratos, foi concluído que primeiramente ocorre a ação dos osteoclastos sobre o material enxertado, e conforme este material é reabsorvido, são liberadas proteínas de crescimento e transformação, que resultam na diferenciação de células mesenquimais, presentes no tecido conjuntivo que passou a ocupar a área do defeito, em osteoblastos e condroblastos (este último somente nas áreas do defeito

com menor vascularização). Após a mineralização do tecido neoformado e sua reabsorção pelos osteoclastos (remodelação óssea), inicia-se a organização do tecido ósseo medular.

Russell e Block (1999) demonstraram que o processamento da matriz óssea desmineralizada pode influenciar sua capacidade osteoindutora. O óxido de etileno, o principal agente esterilizador para muitos biomateriais sintéticos absorvíveis (Gogolewski e Mainil-Varlet, 1997) pode destituir a matriz óssea desmineralizada de seu potencial osteoindutor, embora seu potencial osteocondutor permaneça (Russell e Block, 1999). Além disso, afirmam que o etanol é seletivo para reduzir as colônias de bactérias sem alterar a capacidade osteoindutora da matriz (Burg *et al.*, 2000).

Além dos enxertos autógenos e alógenos, os enxertos xenógenos, oriundos de um doador e espécie diferente do receptor, também são empregados nas cirurgias de reparo ósseo, sendo o mais utilizado o xenoenxerto de osso bovino, por apresentar em sua constituição estrutural a hidroxiapatita e o colágeno, semelhantes entre os mamíferos, sendo por isso biocompatíveis (Accorsi-Mendonça *et al.*, 2011). O xenoenxerto de osso bovino pode ser **inorgânico**, cuja estrutura é composta por hidroxiapatita (Zambuzzi *et al.*, 2006); **orgânico**, cuja estrutura preservada é constituída somente por estruturas colagenosas e não colagenosas, como BMPs (Kawai e Urist, 1989) e a **mistura de orgânico e inorgânico** (mixed bovine bone - MBB) (Accorsi-Mendonça *et al.*, 2011).

Por fim, os enxertos aloplásticos, que apresentam origem sintética, como hidroxiapatitas (HA), fosfato tricalcio e biovidros (Carson e Bostrom, 2007) vem sendo cada vez mais empregados nas cirurgias de reparo ósseo, pois são sintetizados em diversos tamanhos e formatos, facilitando seu manuseio na área a ser enxertada. Entretanto, os enxertos aloplásticos apresentam somente atividade osteocondutora, podendo ser acrescentado moléculas indutoras em sua estrutura (Kuboki *et al.*, 1998), como BMPs e fatores de crescimento, conferindo-lhe a atividade osteoindutora (Granjeiro *et al.*, 2005).

Após o exposto nesta revisão de literatura e dando continuidade ao trabalho de mestrado de Bighetti (2011), optamos pela utilização de uma matriz alogênica óssea desmineralizada (MAOD) particulada (no tamanho de 1 a 2 mm³) devido a suas atividades osteoindutoras e osteocondutoras descrita em parágrafos anteriores, bem como pela facilidade de preparo e obtenção desta matriz (item 3.3 – Materiais e

Métodos). Embora pesquisas mostrem que o reparo ósseo é mais acelerado com a utilização de MAOD obtida de osso intramembranoso (Rabie *et al.*, 2000), utilizamos a MAOD obtida de fêmur e tíbia de ratos, cuja ossificação é endocondral devido a quantidade de enxerto que pode ser obtida, que foi suficiente para suprir sua necessidade durante as cirurgias desta pesquisa.

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do trabalho foi verificar a participação dos osteoclastos no processo de reparo de defeitos críticos em calvária de ratos normoglicêmicos e diabéticos e se o tratamento com a MAOD é capaz de modular a resposta osteoclástica em favor da reabsorção da MAOD, bem como da formação e remodelação óssea.

Assim avaliamos:

- 1) pela análise imunoistoquímica e RT-PCR a expressão das principais proteínas envolvidas na osteoclastogenese $\text{TNF-}\alpha$, RANKL e OPG durante o reparo ósseo, a fim de verificar se ocorre alterações quanto a doença e o tratamento;
- 2) pela análise histomorfométrica o número de osteoclastos/ mm^2 em ambas as condições (diabéticos e normoglicêmicos) e tratamento (não tratado e o tratado com MAOD), correlacionando com a expressão das proteínas $\text{TNF-}\alpha$, RANKL e OPG e a reabsorção da matriz.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS UTILIZADOS

No total foram utilizados 250 ratos (*Rattus norvegicus*) linhagem *Wistar* machos, com aproximadamente 60 dias de idade, oriundos do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru, aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Odontologia de Bauru/ FOB – USP: processo CEEPA. nº 015/2009 (Anexo A) referente aos materiais obtidos durante o mestrado da aluna Bruna Barros Bighetti, e o processo CEEPA. nº 016/2012 (Anexo C) para o material e método utilizados durante na atual Tese de doutorado da mesma aluna.

Na Figura 1 apresentamos apenas a subdivisão dos animais que compuseram a nossa amostra final.

Figura 1: Cronograma de utilização dos animais (* Os materiais obtidos no Mestrado da aluna Bruna Barros Bighetti e utilizados para a obtenção dos cortes teciduais para a avaliação da densidade e número de osteoclastos, bem como para determinação do número de células imunomarcadas para as proteínas alvos).

Todos os animais foram alimentados com água e ração para ratos e camundongos da marca Purina, *ad libitum* durante todo o experimento e mantidos em gaiolas de poliuretano em grupos de 5 animais (para os animais não diabéticos) e em grupos de 3 animais (para os animais diabéticos), em ambiente com controle de luz (ciclo de 12 horas claro/escuro) e temperatura (22°C). Os animais diabéticos tiveram a maravalha trocada todos os dias, além da utilização de uma grade no fundo de cada gaiola, evitando o contato direto e intenso com a urina e o aparecimento de feridas na pele.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Grupo Diabético: Para indução do diabetes foi utilizado uma injeção intraperitoneal de estreptozotocina (Sigma Aldrich, ver Figura 2) numa concentração de 47 mg/Kg de massa corporal. Decorridos 7 dias, os animais tiveram sua massa corpórea aferida em balança de precisão Mettler Toledo PG5002-5 e o índice glicêmico verificado por meio do kit Accu-ChekAdvantage (Roche Diagnóstica Brasil Ltda). Foram considerados para o grupo diabético os animais que apresentarem glicemia acima de 200 mg/dL. Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), valores acima de 200mg/dL confirmam o diagnóstico de diabetes e valores acima de 400mg/dL aumentam a probabilidade da ocorrência de coma glicêmico.

Figura 2 - Estreptozotocina utilizada para indução do diabetes

Grupo não-diabético: Foi aplicada uma injeção intraperitoneal de solução fisiológica a 0,9%. Decorrido uma semana, os animais tiveram sua massa corpórea aferida e o índice glicêmico verificado como realizado no grupo anterior.

4.3 OBTENÇÃO DO BIOMATERIAL UTILIZADO – MAOD

Para obtenção da matriz óssea, os ossos dos fêmures e as tíbias de 30 animais normais foram mecanicamente coletados e processados segundo a técnica de Urist, Mikulski e Boyd (1975), seguindo o seguinte protocolo:

- a) os fêmures e as tíbias foram limpos e armazenados sob refrigeração (-18°C) por um período máximo de 3 meses;
 - b) desmineralizados em solução de ácido clorídrico a 0,6M por 24 horas, sendo a solução trocada a cada 2 horas, (Cestari, 2009) (ver Figura 3);
 - c) lavados exaustivamente com soro fisiológico até a neutralização do ácido clorídrico;
-

- d) com o auxílio de uma navalha, foram retiradas as epífises dos fêmures e tíbias;
- e) removido todo o material que constituía a medula óssea, restando somente as diáfises desmineralizadas;
- f) as diáfises foram fragmentados com auxílio de uma navalha de micrótomo em pequenas partículas de 1-2mm³ (ver Figura 4);
- g) e armazenados em álcool etílico a 70% por um período máximo de 3 dias, sendo retirados do álcool e mantidos em soro fisiológico 2 horas antes da utilização.

Figura 3 - Imagens radiográficas do fêmur (seta vermelha) após 16 horas (a) e 24 horas (b) em solução desmineralizadora e os respectivos controle em solução fisiológica (Cestari, 2009)

Figura 4 - Imagens das diáfises após serem fragmentadas em partículas (Cestari, 2009)

4.4 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

As cirurgias de calvária, padronizadas pelo Laboratório da Disciplina de Histologia, foram realizadas com animais sob anestesia geral intramuscular, com a associação do sedativo cloridrato de ketamina (Dopalen[®] Sespo Indústria e Comércio Ltda – Divisão Vetbrands Saúde Animal, Jacareí – São Paulo, Brasil) na dosagem de 100mg/Kg de massa corporal e do relaxante muscular cloridrato de xilazina (Anasedan[®] Sespo Indústria e Comércio Ltda – Divisão Vetbrands Saúde Animal, Paulínea – São Paulo, Brasil) também na dosagem de 100mg/Kg de massa corporal (ver Figura 5).

Figura 5 - Anestésico Geral (Cloridrato de Ketamina - Dopalen[®]) e relaxante muscular (Cloridrato de Xilazina - Anasedan[®])

Após anestesia, realizamos a tricotomia da região fronto-parietal da cabeça do animal com auxílio de lâmina de barbear e a assepsia com solução de alcoólica de iodo 0,1%. Após o isolamento da área cirúrgica, com auxílio de um bisturi número dez, realizamos uma incisão em formato de meia-lua no tegumento de revestimento do crânio (ver Figura 6 a e b). Em seguida, com a espátula “Molt”, levantamos o retalho posteriormente, expondo amplamente a cortical óssea da região (ver Figura 7 a). Posteriormente, com a trefina cirúrgica de 8 mm de diâmetro e com uma irrigação abundante e contínua com solução fisiológica, foi realizada uma perfuração nos ossos parietais transpassando toda espessura da díploe, expondo a dura-máter no fundo da lesão (ver Figura 7 b, c, d e e).

Figura 6 - Procedimentos cirúrgicos: a) tricotomia da região fronto-parietal e isolamento da área cirúrgica; b) incisão em formato de meia-lua no tegumento de revestimento do crânio (Bighetti, 2011)

Figura 7 - Procedimentos cirúrgicos: a) levantamento do retalho e exposição da cortical óssea craniana, com auxílio da espátula "Molt"; b) realização do defeito utilizando a trefina cirúrgica de 8 mm; c) delineamento do defeito; d) remoção do bloco e e) defeito ósseo com exposição da duramater (Bighetti, 2011)

Imediatamente após a abertura, as lesões do Subgrupo tratado com MAOD foram preenchidas com matriz óssea particulada, homogeneizada com sangue do próprio animal oriundo da própria lesão, enquanto que, lesões dos Subgrupos não tratados foram preenchidas apenas com coágulo sanguíneo (ver Figura 8 a e b).

Figura 8 - Procedimentos cirúrgicos: a) preenchimento do defeito com coágulo sanguíneo (grupo sem tratamento) e b) preenchimento do defeito com a MOAD em partículas homogeneizada com sangue (grupo tratado) (Bighetti, 2011)

Os retalhos de tegumento foram em seguida recolocados em sua posição e suturados com linha de seda preta para odontologia número 4.0 (Ethicon-Johnson & Johnson) (ver Figura 9 a e b). Após os procedimentos cirúrgicos, cada animal foi mantido em gaiola individual durante todo o período experimental no Biotério Central da FOB-USP.

Figura 9 - Procedimentos cirúrgicos: a) tegumento recolocado em sua posição e b) realização da sutura com linha de seda para odontologia nº 4 (Bighetti, 2011)

4.5 EUTANASIA DOS ANIMAIS E COLETA DAS CALOTAS CRANIANAS

Decorridos os períodos experimentais de 0, 7, 14, 21 e 42 dias, os animais foram mantidos em jejum por doze horas e mensurado a glicemia por meio do kit Accu-ChekAdvantage (Roche Diagnóstica Brasil Ltda). A eutanasia dos animais foi realizada com dose excessiva de anestésico, e a região do defeito foi cuidadosamente removida. As peças destinadas para a análise imunoistoquímica foram fixadas em formol neutro à 10% em tampão fosfato por 24 horas e para as análises moleculares foram recortadas e armazenadas igualmente em criotubos de microcentrífugas de 2 mL para avaliação pelo RT-PCR (contendo 1 mL de trizol, agitadas por 30 segundos e deixadas em temperatura ambiente por 5 minutos). Os criotubos foram, subseqüentemente, congelados a -80°C.

4.6 PROCEDIMENTOS HISTOTÉCNICOS

Os cortes teciduais corados em hematoxilina e eosina, bem como os cortes imunomarcados contra as proteínas alvos são oriundos das amostras coletadas e processadas histologicamente durante o mestrado da aluna Bruna Barros Bighetti, conforme descrito abaixo.

As peças histológicas coletadas foram fixadas em formalina neutra tamponada a 10% por 72 horas. Em seguida, as peças foram desmineralizadas em solução de EDTA (solução contendo 4,13% de Tritriplex III Merck® e 0,44 % de hidróxido de sódio) à temperatura ambiente, por um período aproximado de quarenta dias.

Após a desmineralização, as peças foram submetidas a procedimentos histológicos padronizados, com desidratação em álcool etílico, diafanização em xilol e inclusão em Histosec - Merck® (parafina + resina sintética). Finalmente, cortes semi-seriados de 4µm de espessura, no sentido latero-lateral da calvária, foram obtidos em um micrótomo Jung-Leica® RM2045 e aderidas sobre lâminas de vidro os quais foram corados pela Hematoxilina-Eosina (HE), bem como em lâminas silanizadas os quais foram submetidas aos procedimentos de imunoperoxidase.

4.7 DETERMINAÇÃO DO VOLUME TOTAL DE TECIDO ÓSSEO NA ÁREA DO DEFEITO

Primeiramente, determinamos o **volume total da região do enxerto (V_{tre})**, ou seja, o volume do enxerto mais o tecido reacional para cada defeito. A espessura vertical (T) dos defeitos ósseos preenchidos com MAOD ou com coágulo foram determinadas no sistema de análise KS300 (Kontron Elektronik GmbH, Eching, Munique, Alemanha), usando uma objetiva de 4X. Para tanto, imagens de 2 cortes frontais semi-seriados da região do enxerto foram obtidos de cada animal. A espessura de cada corte foi medida a 0,5 mm de intervalo e a média da espessura vertical (T) foi calculada para cada defeito.

A partir da medida do diâmetro (d) inicial do defeito e da espessura vertical (T) da região enxertada com MAOD ou com coágulo, o volume total da região enxertada (V_{tre}) foi calculado usando a fórmula para o volume do cilindro: $V_{tre} = A_{enxerto} \times T_{enxerto}$; onde: $A_{enxerto} = \pi \cdot (d/2)^2$

Em seguida, a **densidade de volume (V_{vi}) ou o percentual do volume** ocupado pelo tecido ósseo neoformado foi baseado na relação fundamental de estereologia, denominada de princípio de Delesse, no qual a fração de volume (V_{vi}) de um dado componente no material é, em média, igual a fração de área (AA_i) de transecções do componente nos cortes do material, portanto $V_{vi} = AA_i$ (Weibel, 1969). Esse parâmetro histológico foi avaliado com auxílio de uma objetiva de imersão de 40X e um graticulo de integração II Zeiss® colocado em uma ocular Kpl 8X, composta de 10 linhas paralelas e de 100 pontos numa área quadrangular. A imagem do graticulo foi superposta, sucessivamente, a 100 campos histológicos escolhidos por amostragem sistemática (Weibel, 1969), e os seguintes dados foram anotados: a) número de pontos (P_i) que caíram sobre cada estrutura (i) e sobre o defeito preenchido com coágulo ou área enxertada preenchida com MAOD (P). A densidade de volume (V_{vi}) foi calculada a partir da relação: $V_{vi} (\%) = (P_i/P) \cdot 100$.

A conversão dos dados relativos (densidades de volume em percentual) em dimensões morfométricas absolutas (mm^3) para o tecido ósseo (V_{ti}) foi obtida pela seguinte fórmula:

$$(V_{ti} = V_{vi} \times V_{tre})$$

4.8 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE DE VOLUME (V_{Vi}) E DO NÚMERO DE OSTEOCLASTOS/ mm^2 NOS CORTES TECIDUAIS CORADOS COM HE

Os osteoclastos, por serem multinucleados e variarem muito de tamanho, foram avaliados quanto à densidade de volume, ou seja, o percentual da região do enxerto ocupado pelos osteoclastos e o número de célula/ mm^2 , utilizando o programa de análise de imagem KS300.

A densidade de volume (V_{Vi}) ou a fração do volume da área do enxerto ocupado pelos osteoclastos segue a mesma relação fundamental de estereologia explicado no item anterior (ver item 4.7), no qual a fração de volume (V_v) de um dado componente no material é, em média, igual a fração de área (AA) de transecções do componente nos cortes do material, portanto $V_v = AA$ (Weibel, 1969). De cada amostra foram obtidos 15 cortes semi-seriados. Em 5 cortes escolhidos aleatoriamente, 100 imagens (20 campos histológicos por corte) foram selecionadas por amostragem sistemática foram capturadas utilizando um sistema de análise digital composta pelo Microscópio Axioscope 2 (Carl Zeiss GmbH, Eching, Germany), câmera Sony CCD-IRIS-RGB (Sony Corporation, Tóquio, Japão) e o Kontron software KS-300 (Kontron Elektronik GmbH, Eching, Munique, Alemanha) conectado a um computador IBM, usando as objetivas de imersão de 100x. Nestas imagens, a área preenchida pelos osteoclastos (A_i) e o total de área analisada (A) foram determinadas. A densidade de volume dos osteoclastos (V_{Vi}) foi calculada pelo software de acordo com a relação $V_{Vi} = A_{Ai} = A_i/A$ (Weibel, 1969).

Para determinação do número de osteoclastos/ mm^2 , foram selecionados 20 campos por amostragem sistemática (Weibel, 1969), onde em cada campo, com o auxílio do programa de análise de imagem KS300, foram marcados os osteoclastos, sendo que o programa fornecia o número total de osteoclastos e cada campo. Sabendo-se do valor da área total analisada juntamente com os valores fornecidos pelo programa para o número de osteoclasto por campo amostral, foi determinado o número de osteoclastos por mm^2 .

4.9 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RANKL, TNF- α E OPG POR MÉTODOS IMUNOISTOQUÍMICOS

a) Anticorpos utilizados

RANKL: cabra anti-mouse RANKL (N-19): sc-7628, Santa Cruz Biotechnology. Ligante membro do fator de necrose tumoral que interage com moléculas sinalizadoras do fator associado ao receptor de TNF que ativa as rotas do NF κ B e JNK, essencial a diferenciação dos osteoclastos com peso molecular de 35-40 kDa (transmembrana) e (20-30 kDa solúvel).

OPG: cabra anti-human OPG (N-10): sc-8468, Santa Cruz Biotechnology, glicoproteína secreta membro da família de receptores de TNF capaz de inibir a osteoclastogênese impedindo a sinalização célula-célula entre as células estromais e os precursores de osteoclastos com peso molecular de 60 kDa (monômero) e 120 kDa (dímero).

TNF- α : mouse anti-human TNF- α (52B83): sc-52746, Santa Cruz Biotechnology, citocina pleiotrópica produzido por inúmeros tipos celulares, modulando a resposta inflamatória com peso molecular de 26 kDa (transmembrana) e 17 kDa (solúvel).

b) Procedimentos para imunomarcação

Os cortes de 4 μ m obtidos em lâminas silanizadas foram colocados na estufa a 56°C para o início da desparafinização e adesão na lâmina. Em seguida, foram acomodadas em cubas de coopler com ranhuras, onde passaram por três banhos de xilol, dois banhos de etanol absoluto e um de álcool 95% de 5 minutos cada. Por fim, as lâminas foram lavadas e deixadas em dois banhos de PBS (Solução fosfato tamponada, pH 7,2) por 5 minutos. Subsequentemente, foi realizada a inativação da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% por 15 minutos e após a lavagem em PBS foi realizada a recuperação dos epítomos por aquecimento em solução de tampão citrato de sódio 10 mM. Os cortes foram lavados em PBS e realizado o bloqueio das proteínas sorológicas com leite em pó desnatado (Molico, Nestlé Brasil Ltda) por 20 minutos. Após este período, o excesso da solução

bloqueadora foi aspirado e os cortes foram incubados com os anticorpos primários específicos para RANKL, OPG, TNF- α diluídos em 1:250 em diluidor de anticorpo Spring (Spring Bioscience, Inc., Pleasanton, CA 94566, ADS-125) - pH 7,4, contendo BSA (albumina do soro bovino) a 1% por 1 hora em câmara úmida e temperatura ambiente. Para controle negativo, um dos cortes foi incubado apenas com o diluidor de anticorpo. Em seguida, os cortes foram lavados com PBS e incubados com N-Histofine (Nichirei Biosciences Inc., Tokyo - Japan) por 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, os cortes foram incubados na solução do DAB (solução líquida de 3,3'-diaminobenzidina, *Dakocytomation*) por 2-3 minutos e contra-coradas por Hematoxilina de MAYER por 3 minutos.

c) Determinação do número de células imunomarcadas por mm² de tecido:

O número de células imunomarcadas/mm² de tecido foi determinado em um sistema de análise de imagem AxioVision Release 4.8.2 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH). Em 20 campos selecionados por amostragem sistemática (Weibel, 1969), foram determinados o número de células imunomarcadas (Nm) e a área total analisada (A). Conhecendo-se a área total analisada e obtendo-se o número total de marcação, determinamos o índice de marcação por mm².

4.10 PROCEDIMENTO PARA ANÁLISE DO RANKL, TNF- α E OPG POR RT-PCR

a) Extração de RNA: as amostras foram descongeladas e homogenizadas (homogenizador PRO 200 – PRO Scientific Inc) por 30 segundos, e em seguida foram deixadas à temperatura ambiente por 5 minutos e adicionado 0,2 mL de clorofórmio (Sigma). Os tubos foram agitados por 15 segundos, sendo em seguida incubados em temperatura ambiente por 2-3 minutos e posteriormente, centrifugados a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante (em torno de 400 μ L) foi colocado em tubos de microcentrífuga (1,5 mL) contendo 400 μ L álcool 70% e agitado por 10 segundos. Essa mistura foi transferida para colunas de purificação do kit (PureLink – Micro-to-Midi, Total RNA Purification System,

Invitrogen) as quais foram centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente. Nesse momento, as amostras de RNA foram tratadas com DNase, o que consisti na incubação das amostras com 1U da DNase por 15 minutos em temperatura ambiente. Após o tratamento com DNase, foi adicionado à coluna 700µL da solução Wash buffer I e centrifugados a 12.000 rpm por 15 segundos em temperatura ambiente. O mesmo procedimento foi feito com a solução Wash buffer II, até o último passo da extração de RNA que consistiu na eluição do RNA com 30µL com água livre de RNase.

b) Quantificação e qualificação do RNA total: A concentração de RNA total nas amostras foi determinada por meio de um espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Este equipamento de posse de dois valores de absorbância, 260 e 280 nm, fornece a quantidade (ng/µL) e qualidade do RNA total. A garantia de uma boa qualidade de RNA total é alcançada quando a razão obtida entre as absorbâncias 260 e 280 nm estejam entre 1,9 e 2,1.

c) Transcrição reversa (RNA em cDNA): Foram utilizados 1µg de RNA total para a transcrição em DNA complementar (cDNA) por meio da enzima transcriptase reversa (Kit de transcrição reversa - Superscript III, Invitrogen®, EUA). Em seguida, foi adicionada 1 µL de hexadeoxinucleotídeos (dNTPs) e 1µL de Oligo dT primer, sendo essa mistura incubada a 65°C por 5 minutos e colocada em gelo por 1 minuto, sendo o volume final de 14 µL. Subseqüentemente, foram colocados 1µL de DTT, 1µL da enzima transcriptase reversa e 4µL de tampão e incubado a 50°C por 1 hora, seguido de outra incubação a 70°C por 15 minutos, sendo o volume final de 20 µL.

d) Reações em cadeia da polimerase em tempo real: A quantificação da expressão de RNAm foi realizada por meio do RT-PCR, utilizando-se o sistema Taqman (Life Technology®, EUA) em um aparelho Vii7 (Applied Biosystems, EUA). Os ensaios utilizados foram fabricados e padronizados pela empresa Life Technology (Ver tabela 1). Para todas as reações de RT-PCR, foram utilizados 2,5µL do reagente Taqman Gene Expression Master Mix (Life Tecnology®, EUA), 1µL do cDNA, 0,25µL do ensaio adquirido e 1,25µL de água ultrapura. Uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com controle negativo.

Os resultados foram analisados com base no valor de CT (cycle threshold – ou ciclo limiar), ponto correspondente ao número de ciclos em que a amplificação atinge o limiar exponencial da PCR, permitindo a análise quantitativa do nível de expressão do fator avaliado em relação ao de um gene constitutivo RPL13.

Tabela 1 - Primers utilizados no RT- PCR em tempo real para os alvos

ENSAIO	Número Catálogo
LOC100359922 (RPL13)	Rn00821258_g1
tnfsf11 (RANKL)	Rn00589289_m1
Tnfrsf11b (OPG)	Rn00563499_m1
Tnf (TNF- α)	Rn01525859_g1

Para possível conferência é fornecido o site http://bioinfo.invitrogen.com/genome-database/browse/gene-expression/keyword/Rn00821258_G1?ICID=search-gex-Rn00821258_G1

4.11 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Todos os resultados morfométricos de densidade e número de osteoclastos/mm², número de células imunomarcadas para cada proteína/mm² e os valores de densidade óptica obtidos para expressão de RNAm das proteínas alvos em relação ao RNAm do gene constitutivo RPL13 passaram pelo teste de homogeneidade das variâncias. Em seguida foram submetidas à análise de variância (ANOVA) 3 critérios para comparação entre os grupos e períodos, sendo as médias contrastadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Para tanto, utilizamos o software Statistica 10 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, EUA) para Windows, com um nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 MASSA CORPORAL E GLICEMIA:

Os resultados de massa corporal e glicemia (antes da indução e no dia da coleta) dos animais nos diferentes grupos e períodos experimentais estão apresentados nas Tabelas 2, 3, 4 e 5, bem como nas Figuras 10 e 11.

Tabela 2 - Comparação entre a **massa corporal inicial (antes da indução)** dos animais dos grupos CTL COAG, CTL MAOD, DIAB COAG e DIAB MAOD nos diferentes períodos experimentais pela ANOVA a três critérios e o *post-hoc* teste de Tukey. Letras diferentes $p < 0.05$

MASSA CORPORAL INICIAL	ANOVA		
Variáveis	F	Df	p
Período	0,48	3	0,694725
Doença	1,04	1	0,311639
Tratamento	0,06	1	0,811377
Período*Doença	0,83	3	0,480815
Período*Tratamento	2,33	3	0,082674
Doença*Tratamento	2,93	1	0,091943
Período*Doença*Tratamento	0,84	3	0,476655

Tabela 3 - Comparação entre a **massa corporal final (sacrifício)** dos animais dos grupos CTL COAG, CTL MAOD, DIAB COAG e DIAB MAOD nos diferentes períodos experimentais pela ANOVA a três critérios e o *post-hoc* teste de Tukey. Letras diferentes $p < 0.05$

MASSA CORPORAL FINAL		ANOVA		
Variáveis		F	Df	p
Período		31,94	3	0,000000
Doença		476,49	1	0,000000
Tratamento		0,17	1	0,678138
Período*Doença		10,79	3	0,000008
Período*Tratamento		2,71	3	0,052474
Doença*Tratamento		1,37	1	0,246987
Período*Doença*Tratamento		1,60	3	0,197236

Período	CTL	DIAB
7	258,5 ^a	196,2 ^b
14	316,0 ^c	213,3 ^b
21	335,8 ^c	209,7 ^b
42	359,5 ^c	226,5 ^b

Figura 10 – Gráfico da média e desvio padrão da **massa corporal (mg)** dos animais durante o processo de reparo de defeito ósseo nos diferentes grupos e períodos experimentais.

A análise dos resultados estatísticos (Tabela 2 e 3) e do gráfico (Fig. 10) mostraram que a massa corporal antes da indução (Inicial) foi similar para todos os grupos e períodos, sendo em média de 242,6 mg. Após 14 dias da indução, isto é, no período experimental de 7 dias (massa corporal média de 196,2 mg), a massa corporal dos animais diabéticos diminuiu 1,24 vezes e mantiveram-se constante nos períodos subsequentes, enquanto que, nos animais do grupo controle aumentam 1,30 vezes até o período de 14 dias (massa corporal média de 316 mg) mantendo-se constante nos demais períodos experimentais.

Tabela 4 - Comparação entre a **glicemia de Jejum 7 dias após a indução (Glicemia Inicial)** dos animais dos grupos CTL COAG, CTL MAOD, DIAB COAG e DIAB MAOD dos diferentes períodos experimentais pela ANOVA a três critérios e o *post-hoc* teste de Tukey. Letras diferentes $p < 0.05$

GLICEMIA INICIAL		ANOVA		
Variáveis		F	df	p
Período		1,887	3	0,140619
Doença		1521,635	1	0,000000
Tratamento		3,460	1	0,067462
Período*Doença		2,584	3	0,060926
Período*Tratamento		2,171	3	0,100049
Doença*Tratamento		2,364	1	0,129117
Período*Doença*Tratamento		2,213	3	0,095097

Doença	Média
DIAB	407,35 ^a
CTL	87,02 ^b

Tabela 5 - Comparação entre a **glicemia de Jejum após as cirurgias (Glicemia Final)** dos animais dos grupos CTL COAG, CTL MAOD, DIAB COAG e DIAB MAOD nos diferentes períodos experimentais pela ANOVA a três critérios e o *post-hoc* teste de Tukey. Letras diferentes $p < 0.05$

GLICEMIA FINAL		ANOVA		
Variáveis		F	df	p
Período		4,373	3	0,007296
Doença		575,495	1	0,000000
Tratamento		0,193	1	0,661893
Período*Doença		1,653	3	0,185989
Período*Tratamento		0,804	3	0,496053
Doença*Tratamento		0,005	1	0,944621
Período*Doença*Tratamento		1,475	3	0,229677

Doença	Média
DIAB	446,75 ^a
CTL	102,75 ^b

Figura 11 – Gráfico da média e desvio padrão da **glicemia em jejum** (mg/dL) dos animais durante o processo de reparo de defeito ósseo nos diferentes grupos e períodos experimentais.

A análise dos resultados estatísticos (Tabela 4 e 5) e do gráfico (Fig. 11) mostraram que a glicemia de jejum 7 dias após a indução foi de 87,02mg/dL nos animais do grupo controle e de 407,35 mg/dL nos animais diabéticos. Esses valores foram constantes durante todo os períodos experimentais.

5.2 RESULTADOS MORFOMÉTRICOS PARA VOLUME TOTAL DE TECIDO OSSEO

Os resultados de volume total de tecido ósseo nos defeitos obtidos dos diferentes grupos e períodos experimentais estão apresentados na Tabela 6 e na Figura 12.

Tabela 6- Comparação entre o **volume total de tecido ósseo** dos grupos CTL COAG, CTL MAOD, DIAB COAG e DIAB MAOD nos diferentes períodos experimentais pela ANOVA a três critérios e o *post-hoc* teste de Tukey. Letras diferentes $p < 0.05$

ANOVA			
VOLUME TOTAL DE TECIDO ÓSSEO			
Variáveis	F	df	p
Período	1523,499	3	0,000000
Doença	529,522	1	0,000000
Tratamento	200,188	1	0,000000
Período*Doença	362,557	3	0,000000
Período*Tratamento	328,074	3	0,000000
Doença*Tratamento	21,083	1	0,041301
Período*Doença*Tratamento	146,156	3	0,000017

Período	CTL COAG	CTL MAOD	DIAB COAG	DIAB MAOD
7	1,983 ^{ab}	0,235 ^a	0,086 ^a	0,070 ^a
14	5,451 ^b	3,778 ^{ab}	1,577 ^a	2,771 ^a
21	6,125 ^b	11,739 ^c	2,060 ^a	5,767 ^b
42	11,114 ^c	25,683 ^d	4,476 ^{a,b}	8,139 ^{b,c}

Figura 12 – Gráfico da média e desvio padrão do **volume total de tecido ósseo (mm²)** dos animais durante o processo de reparo de defeito ósseo nos diferentes grupos e períodos experimentais.

A análise dos resultados estatísticos (Tabela 6) e do gráfico (Fig. 12) mostram que a formação óssea foi similar entre os grupos aos 7 dias. Entre 14 e 42 dias a formação óssea aumentou significativamente nos grupos CTL COAG e CTL MAOD, bem como no grupo DIAB MAOD, sendo maior nos defeitos do grupo CTL tratados com MAOD. Já, no grupo DIAB COAG, a formação óssea não apresentou diferenças estatísticas entre os períodos de 7 dias até o período final de 42 dias.

5.3 RESULTADOS MORFOMÉTRICOS PARA A DENSIDADE DE VOLUME E NÚMERO DE OSTEOCLASTOS:

Os resultados de densidade de volume (%) bem como número de osteoclastos (mm^2) obtidos durante o processo de reparo ósseo no defeito nas calvárias de ratos de cada grupo, nos diversos períodos analisados, encontram-se apresentados nas Tabelas 7 e 8 e nas Figuras 13 e 14.

Tabela 7 - Comparação entre **densidade de volume de osteoclastos (%)** dos grupos CTL COAG, CTL MAOD, DIAB COAG e DIAB MAOD nos diferentes períodos experimentais pela ANOVA a três critérios e o *post-hoc* teste de Tukey. Letras diferentes $p < 0.05$

DENSIDADE DE VOLUME DE OSTEOCLASTOS	ANOVA		
Variáveis	F	df	p
Período	0,037883	3	0,057912
Doença	0,006040	1	0,266617
Tratamento	0,006888	1	0,235798
Período*Doença	0,081241	3	0,001728
Período*Tratamento	0,054639	3	0,014500
Doença*Tratamento	0,000292	1	0,806136
Período*Doença*Tratamento	0,043291	3	0,036941

Período	CTL COAG	CTL MAOD	DIAB COAG	DIAB MAOD
7	0,085 ^{ab}	0,012 ^a	0,044 ^a	0,096 ^{ab}
14	0,139 ^{ab}	0,084 ^{ab}	0,207 ^b	0,051 ^a
21	0,060 ^{ab}	0,118 ^{ab}	0,123 ^{ab}	0,092 ^{ab}
42	0,152 ^{ab}	0,162 ^{ab}	0,006 ^a	0,052 ^{ab}

Figura 13 – Gráfico da média e desvio padrão da **densidade de volume dos osteoclastos (%)** dos animais durante o processo de reparo de defeito ósseo nos diferentes grupos e períodos experimentais.

A análise dos resultados estatísticos (Tabela 7) e do gráfico (Fig. 13) mostram que o percentual de osteoclastos foi similar entre os diferentes grupos e períodos, exceto aos 14 dias no grupo diabético que apresentou um pico no percentual de osteoclasto.

Tabela 8- Comparação entre **número de osteoclastos/mm²** dos grupos CTL COAG, CTL MAOD, DIAB COAG e DIAB MAOD nos diferentes períodos experimentais pela ANOVA a três critérios e o *post-hoc* teste de Tukey. Letras diferentes $p < 0.05$.

VARIÁVEIS	ANOVA		
	F	df	p
Período	19,9332	3	0,001625
Doença	11,9696	1	0,002136
Tratamento	0,0975	1	0,773659
Período*Doença	31,0928	3	0,000053
Período*Tratamento	10,3656	3	0,038932
Doença*Tratamento	2,3754	1	0,158794
Período*Doença*Tratamento	4,5579	3	0,282076

Período	CTL	DIAB
7	0,902 ^a	1,554 ^{ab}
14	2,721 ^b	2,329 ^b
21	2,519 ^b	1,940 ^{ab}
42	3,692 ^c	0,918 ^a

Período	COAG	MAOD
7	1,210 ^a	1,245 ^a
14	3,031 ^b	2,018 ^{ab}
21	2,101 ^{ab}	2,358 ^{ab}
42	1,805 ^{ab}	2,805 ^b

Figura 14 – Gráfico da média e desvio padrão do número de osteoclastos/mm² dos animais durante o processo de reparo de defeito ósseo nos diferentes grupos e períodos experimentais.

A análise dos resultados estatísticos (Tabela 8) e do gráfico (Fig. 14) mostram que o número de osteoclastos aos 7 dias foi similar entre os grupos (média de 1,12 osteoclasto/mm²), porém, nos grupos CTL aumentaram significativamente até 42 dias, passando para 3,69 osteoclasto/mm². Já, nos grupos DIAB os níveis mantiveram-se constante com 0,918 osteoclasto/mm². Com relação ao tratamento, foi observado nos grupos COAG um pico aos 14 dias (3,03 osteoclasto/mm²) reduzindo aos níveis iniciais aos 42 dias, enquanto que, nos grupos MAOD aumentaram gradualmente até os 42 dias (2,8 osteoclasto/mm²).

5.4 RESULTADOS MORFOLÓGICOS DOS CORTES IMUNOMARCADOS PARA OPG, RANKL e TNF- α

a) Imunomarcção para OPG

Os resultados morfológicos das imunomarcações para o OPG dos grupos controle e diabético tratados com coágulo ou MAOD estão representados nas Figuras 15 e 16.

No período de **7 dias** (Figura 15A e 15B), em ambos os grupos controle (CTL COAG, Figura 16A) e diabético (DIAB COAG, Figura 16B), ocorreu invasão de células do tecido conjuntivo em meio a área preenchida por coágulo, sendo que diversas células estavam imunomarcadas para OPG. Além disso, observou-se já a neoformação de matriz osteóide. Nos grupos tratados com MAOD aos **7 dias** (Figura 16A e 16B) observou-se células imunomarcadas do tecido conjuntivo no interior do defeito, invadindo canalículos das partículas de MAOD (detalhe para a Figura 16B). Nesse período, o grupo CTL MAOD (Figura 16A) apresentou osteoblastos altamente ativos imunomarcados para OPG, bem como osteócitos também imunomarcados. Em ambos os grupos controle e diabético, tratados com coágulo ou MAOD (Figura 15A e 15B; Figura 16A e 16B), o tecido conjuntivo/granulação presente no interior do defeito apresentava diversas células tipo fibroblastos imunomarcadas para OPG.

Aos **14 e 21 dias**, nos grupos tratados com coágulo (Figura 15C e 15D; 15E e 15F) houve a formação de tábua óssea, partindo das bordas do defeito em direção ao centro, porém essa tábua óssea mostrou-se mais organizada no grupo controle do que no grupo diabético. Em ambos os grupos citados observa-se a presença de osteoblastos imunomarcados para OPG, com núcleo circular e citoplasma abundante no limite central da tábua óssea (detalhe para a Figura 16C – 14 dias e 16F – 21 dias), bem como osteoblastos com núcleo fusiforme e menos imunomarcados, cobrindo a superfície de toda a extensão da tábua óssea, constituindo seu perióstio (detalhe para a Figura 16D – 14 dias e 16E – 21 dias). Nos grupos tratados com MAOD, tanto aos **14** como aos **21 dias** (Figura 8C e 8D; 16E e 16F) observou-se a presença de osteoblastos intensamente imunomarcados para OPG envolvendo a matriz óssea recém sintetizada, bem como osteócitos imunomarcados. O tecido conjuntivo nos grupos tratados com coágulo ou MAOD, em ambos os grupos controle ou coágulo, aos 14 e 21 dias (Figura 15C e 15D; 15E e

15F/Figura 16C e 16D; Figura 16E e 16F) apresentavam algumas células imunomarcadas para OPG.

No período de **42 dias**, em ambos os grupos tratados com coágulo, controle (Figura 15G) e diabético (Figura 15H), ocorreu redução na intensidade da marcação para OPG, observada nos osteoblastos que ocupavam a região terminal da tábua óssea no centro do defeito, bem como dos osteoblastos fusiformes do periósteo, sendo essa redução mais evidente no grupo diabético. Raras células do tecido conjuntivo e algumas células ocupando o espaço de medula óssea (detalhe para a Figura 15G) apresentam-se imunomarcadas. Aos **42 dias**, no grupo controle tratado com MAOD (Figura 16G), houve ligeira redução na intensidade da imunomarcação nos osteoblastos ativos, osteoblastos fusiformes, osteócitos e células do conjuntivo. Porém, no grupo diabético tratado com MAOD (Figura 16H), a intensidade da marcação permaneceu evidente nos tipos celulares já citados.

Figura 15 - Fotomicrografias das áreas dos defeitos nas calvárias preenchidas com **coágulo** e imunomarcadas para **OPG** aos **7 dias**, **14 dias**, **21 dias** e **42 dias** após a realização do defeito. Observar aos 7 dias tanto no grupo CTL COAG (A) como no DIAB COAG (B) a presença de fibroblastos (setas verdes) em meio ao coágulo (*). Aos 14 dias (C e D), 21 dias (E e F) e 42 dias (G e H) é possível observar osteoblastos (setas vermelhas) na superfície do osso neoformado (ON) e osteócitos (setas amarelas) aprisionados no interior da matriz óssea após sua síntese. Aos 42 dias no grupo CTL COAG é possível visualizar medula óssea (M) em processo de organização. Objetiva de 100X.

Figura 16 - Fotomicrografias das áreas dos defeitos nas calvárias preenchidas com **MAOD** e imunomarcadas para **OPG** aos **7 dias**, **14 dias**, **21 dias** e **42 dias** após a realização do defeito. Observar aos 7 dias tanto no grupo CTL MAOD (A) como no DIAB MAOD (B) a presença de fibroblastos (setas verdes) invadindo a área do defeito, sendo que no grupo CTL MAOD (A) já é possível observar osteoblastos (seta vermelha) sintetizando matriz óssea neoformada (ON) e no DIAB MAOD (B) fibroblastos em meio ao coágulo (*). Aos 7 dias (A), 14 dias (C e D), 21 dias (E e F) e 42 dias (G e H) notar os osteócitos (setas amarelas) aprisionados no interior da matriz óssea após sua síntese. Objetiva de 100X.

b) Imunomarcção para RANKL

Os resultados morfológicos das imunomarcações para RANKL dos grupos controle e diabético tratados com coágulo ou MAOD estão representados nas Figuras 17 e 18.

No período de **7 dias**, os grupos controle e diabético tratados com coágulo (Figura 17A e 17B, respectivamente) apresentaram diversas células tipo fibroblastos imunomarcadas contra RANKL em meio ao coágulo que preenchia o defeito. No grupo CTL COAG (detalhe para a Figura 17A) houve síntese de matriz osteóide, porém, não é possível discriminar osteoblastos e fibroblastos neste estágio de desenvolvimento. Nos grupos controle e diabético tratados com MAOD (Figura 18A e 18B), diversas células do tecido conjuntivo estavam imunomarcadas para RANKL (detalhe para a Figura 18B, mostrando tais células invadindo os canalículos existentes nas partículas de MAOD). No grupo CTL MAOD (Figura 18A) observa-se osteoblastos e osteócitos, ambos, em sua maioria, apresentando apenas o citoplasma marcado para RANKL, enquanto seus núcleos não apresentaram marcação.

No período de **14 dias** em ambos os grupos controle e diabético tratados com coágulo (Figura 17C e 17D), ocorreu gradual aumento das tabuas ósseas recém formadas a partir do osso cortical em direção ao centro do defeito, além da invasão de células do tecido conjuntivo para o interior de canais existentes na tábua óssea. Observou-se ligeira redução na quantidade de células imunomarcadas presentes no tecido conjuntivo. Tanto no grupo CTL COAG como no DIAB COAG, é notável a presença de osteoblastos ativos com citoplasma abundante imunomarcado para RANKL, enquanto que somente os osteócitos recém aprisionados apresentavam-se imunomarcados. Nos grupos controle e diabético tratados com MAOD (Figura 18C e 18D), observa-se diversos osteoblastos imunomarcados para RANKL, bem como osteócitos imunomarcados recém aprisionados.

No período de **21 dias** em ambos os grupos, controle (Figura 17E) e diabético (Figura 17F) tratados com coágulo, os osteoblastos ativos presentes no limite da tábua óssea no centro do defeito apresentaram-se imunomarcados, enquanto os osteoblastos fusiformes no periósteo não apresentaram imunomarcção. Houve redução na quantidade de células imunomarcadas presentes no tecido conjuntivo.

Nos grupos controle e diabético tratados com MAOD (Figura 18E e 18F), a imunomarcção permaneceu evidente nos osteoblastos ativos, bem como nos osteócitos recém-aprisionados, além de diversas células no tecido conjuntivo.

Aos **42 dias**, em ambos os grupos tratados com coágulo (Figura 17G e 17H) houve redução na marcação dos osteoblastos ativos e fusiformes do periósteo, bem como dos osteócitos e das células presentes no conjuntivo. Em ambos os grupos tratados com MAOD (Figura 18G e 18H) os osteoblastos apresentaram-se imunomarcados, bem como diversas células presentes no conjuntivo e medula (detalhe para Figura 18G), sendo que somente os osteócitos apresentaram pouco marcados.

Figura 17 - Fotomicrografias das áreas dos defeitos nas calvárias preenchidas com **coágulo** e imunomarcadas para **RANKL** aos **7 dias**, **14 dias**, **21 dias** e **42 dias** após a realização do defeito. Observar aos 7 dias tanto no grupo CTL COAG (A) como no DIAB COAG (B) a presença de fibroblastos (setas verdes) em meio ao coágulo (*). Aos 14 dias (C e D), 21 dias (E e F) e 42 dias (G e H) é possível observar osteoblastos (setas vermelhas) na superfície do osso neoformado (ON) e osteócitos (setas amarelas) aprisionados no interior da matriz óssea. Objetiva de 100X.

Figura 18 - Fotomicrografias das áreas dos defeitos nas calvárias preenchidas com **MAOD** e imunomarcadas para **RANKL** aos **7 dias**, **14 dias**, **21 dias** e **42 dias** após a realização do defeito. Observar aos 7 dias tanto no grupo CTL MAOD (A) como no DIAB MAOD (B) a presença de fibroblastos (setas verdes) invadindo a área do defeito, sendo que no grupo CTL MAOD (A) já é possível observar osteoblastos (seta vermelha) sintetizando matriz óssea neoformada (ON) e no DIAB MAOD (B) fibroblastos invadindo os espaços entre as partículas de MAOD. Aos 7 dias (A), 14 dias (C e D), 21 dias (E e F) e 42 dias (G e H) notar os osteócitos (setas amarelas) aprisionados no interior da matriz óssea após sua síntese. Vaso sanguíneo (V). Objetiva de 100X.

c) Imunomarcção para TNF- α

Os resultados morfológicos das imunomarcações para TNF- α dos grupos controle e diabético tratados com coágulo ou MAOD estão representados nas Figuras 19 e 20.

No período de **7 dias**, os grupos controle e diabético tratados com coágulo (Figura 19A e 19B) apresentaram células do tecido conjuntivo imunomarcadas para TNF- α , sendo que no grupo CTL COAG (Figura 19A) houve síntese de matriz osteóide, enquanto que no grupo DIAB COAG (Figura 19B) os fibroblastos estão em meio ao coágulo. Nos grupos tratados com MAOD (Figura 20A e 20B), houve invasão de células imunomarcadas do tecido conjuntivo em meio às partículas de MAOD, sendo que no grupo CTL MAOD houve neoformação óssea por osteoblastos que se apresentaram fortemente imunomarcados.

No período de **14 dias**, em ambos os grupos tratados com coágulo (Figura 19C e 19D) ocorreu gradual aumento das tábuas ósseas recém formadas a partir da cortical óssea em direção ao centro do defeito, apresentando osteoblastos ativos imunomarcados para TNF- α , embora observe-se redução na intensidade da marcação de tais células. Houve redução na quantidade de osteócitos e células do tecido conjuntivo imunomarcados. Em ambos os grupos tratados com MAOD observa-se a presença de osteoblastos ativos, diversas células do tecido conjuntivo e osteócitos recém-aprisionados imunomarcados para TNF- α .

Aos **21 dias** no grupo controle tratado com coágulo (Figura 19E) houve redução na marcação dos osteoblastos e células do tecido conjuntivo, enquanto que no grupo diabético (Figura 19F) tais células permaneceram imunomarcadas para TNF- α . Nos grupos controle e diabético tratados com MAOD observa-se a presença de osteoblastos na superfície na matriz óssea sintetizada, bem como diversas células no tecido conjuntivo e poucos osteócitos recém-aprisionados na matriz óssea, todos imunomarcados contra TNF- α .

Aos **42 dias**, no grupo controle tratado com coágulo (Figura 19G), observa-se ainda poucos osteoblastos ativos imunomarcados para TNF- α , enquanto que no grupo diabético tratado com coágulo (Figura 19H) há osteoblastos fusiformes e pouco imunomarcados. Em ambos os grupos houve redução na marcação de

células do tecido conjuntivo. Nos grupos tratados com MAOD (Figura 20G e 20H), observa-se a presença de osteoblastos imunomarcados envolvendo a matriz óssea, além de células imunomarcadas do tecido conjuntivo. Somente os osteócitos recém-aprisionados apresentavam-se imunomarcados.

Figura 19 - Fotomicrografias das áreas dos defeitos nas calvárias preenchidas com **coágulo** e imunomarcadas para **TNF- α** aos **7 dias, 14 dias, 21 dias e 42 dias** após a realização do defeito. Observar aos 7 dias no grupo CTL COAG (A) a síntese de uma matriz óssea neoformada (ON) em meio as células do conjuntivo e no DIAB COAG (B) a presença de fibroblastos (setas verdes) em meio ao coágulo (*). Aos 14 dias (C e D), 21 dias (E e F) e 42 dias (G e H) é possível observar osteoblastos (setas vermelhas) na superfície do osso neoformado (ON) e osteócitos (setas amarelas) aprisionados no interior da matriz óssea. Objetiva de 100X.

Figura 20 - Fotomicrografias das áreas dos defeitos nas calvárias preenchidas com **MAOD** e imunomarcadas para **TNF- α** aos **7 dias**, **14 dias**, **21 dias** e **42 dias** após a realização do defeito. Observar aos 7 dias no grupo CTL MAOD (A) a presença de osteoblastos (seta vermelha) sintetizando matriz óssea neoformada (ON) e no DIAB MAOD (B) fibroblastos (setas verdes) invadindo os espaços entre as partículas de MAOD. Aos 14 dias (C e D), 21 dias (F) e 42 dias (G e H) notar os osteócitos (setas amarelas) aprisionados no interior da matriz óssea após sua síntese. Vaso sanguíneo (V). Objetiva de 100X.

5.5 NÚMERO DE CÉLULAS IMUNOMARCADAS PARA OPG/mm², RANKL/mm² E TNF- α /mm²

a) OPG

Os resultados do número de células imunomarcadas para OPG por mm² no processo de reparo ósseo na região da calvária dos grupos CTL e DIAB nos diferentes períodos analisados, bem como os resultados obtidos da análise estatística dos dados encontram-se apresentados na Tabela 9 e Figura 21.

Tabela 9 - Comparação entre o número de células imunomarcadas para o **OPG** por mm² dos grupos CTL COAG, CTL MAOD, DIAB COAG e DIAB MAOD nos diferentes períodos experimentais pela ANOVA a três critérios e o *post-hoc* teste de Tukey. Letras diferentes p<0.05

IMUNO OPG Variáveis	ANOVA		
	F	df	p
Período	7,1216	3	0,000335
Doença	0,9954	1	0,322178
Tratamento	6,2097	1	0,015306
Período*Doença	1,1297	3	0,343776
Período*Tratamento	0,6138	3	0,608518
Doença*Tratamento	1,6292	1	0,206423
Período*Doença*Tratamento	1,5740	3	0,204300

Período	Média
7	106,517 ^a
14	117,083 ^a
21	88,152 ^{a,b}
42	61,496 ^b

Tratamento	Média
COAG	81,944 ^a
MAOD	104,679 ^b

Figura 21 – Gráfico da Média e desvio padrão do número de células imunomarcadas para OPG por mm² durante o processo de reparo de defeito ósseo nos diferentes grupos e períodos experimentais.

A análise do gráfico (Fig. 21) e dos resultados estatístico mostraram que, a expressão do OPG mantém-se constante entre 7 e 21 dias, diminuindo significativamente apenas aos 42 dias (1,82 vezes menor que a média dos valores de 7 e 14 dias) e que o tratamento com a MAOD promove 1,28 vezes maior expressão de OPG durante o processo de reparo ósseo na calvária de rato.

b) RANKL

Os resultados do número de células imunomarcadas para RANKL por mm² no processo de reparo ósseo na região da calvária dos grupos CTL e DIAB nos diferentes períodos analisados, bem como os resultados obtidos das análises estatística dos dados encontram-se apresentados na Tabela 10 e Figura 22.

Tabela 10 - Comparação entre o número de células imunomarcadas para o **RANKL** por mm² dos grupos CTL COAG, CTL MAOD, DIAB COAG e DIAB MAOD nos diferentes períodos experimentais pela ANOVA a três critérios e o *post-hoc* teste de Tukey. Letras diferentes p<0.05

IMUNO RANKL Variáveis	ANOVA		
	F	df	p
Período	26,0154	3	0,000000
Doença	3,4576	1	0,067558
Tratamento	3,6934	1	0,059083
Período*Doença	1,3040	3	0,280832
Período*Tratamento	9,3896	3	0,000031
Doença*Tratamento	0,6017	1	0,440795
Período*Doença*Tratamento	0,6876	3	0,562913

Período	COAG	MAOD
7	109,0812 ^a	62,1154 ^b
14	56,8409 ^b	52,5269 ^b
21	44,5513 ^{b,c}	45,1923 ^{b,c}
42	24,0385 ^c	41,2821 ^{b,c}

Figura 22 – Gráfico da Média e desvio padrão do número de células imunomarcadas para RANKL por mm² durante o processo de reparo de defeito ósseo nos diferentes grupos e períodos experimentais.

A análise do gráfico (Fig. 22) e dos resultados estatísticos mostraram que o número de células imunomarcadas para RANKL foi significativamente maior (1,76 vezes) aos 7 dias no grupo COAG em relação ao MAOD, diminuindo a partir dos 14 dias (4,54 vezes maior aos 7 dias quando comparado aos 42 dias) e não apresentando diferenças com relação ao MAOD.

c) TNF- α

Os resultados do número de células imunomarcadas para TNF- α por mm² no processo de reparo ósseo na região da calvária dos grupos CTL e DIAB nos diferentes períodos analisados, bem como os resultados obtidos das análises estatística dos dados encontram-se apresentados na Tabela 11 e Figura 23.

Tabela 11 - Comparação entre o número de células imunomarcadas para o **TNF- α** por mm² dos grupos CTL COAG, CTL MAOD, DIAB COAG e DIAB MAOD nos diferentes períodos experimentais pela ANOVA a três critérios e o *post-hoc* teste de Tukey. Letras diferentes p<0.05

IMUNO TNF- α		ANOVA		
Variáveis		F	df	p
Período		10,4876	3	0,000011
Doença		69,6677	1	0,000000
Tratamento		46,1541	1	0,000000
Período*Doença		6,5001	3	0,000658
Período*Tratamento		2,8191	3	0,045923
Doença*Tratamento		7,4510	1	0,008179
Período*Doença*Tratamento		0,9751	3	0,410114

Período	CTL	DIAB
7	50,235 ^{a,c}	118,953 ^b
14	54,530 ^{a,c}	66,239 ^a
21	28,697 ^c	75,534 ^a
42	36,688 ^c	67,671 ^a

Período	COAG	MAOD
7	99,103 ^a	113,932 ^a
14	101,175 ^a	132,991 ^a
21	84,722 ^{a,b}	91,581 ^{a,b}
42	42,778 ^b	80,214 ^{a,b}

	COAG	MAOD
CTL	32,906 ^c	52,169 ^a
DIAB	59,530 ^a	104,669 ^b

Figura 23 – Gráfico da Média e desvio padrão do número de células imunomarcadas para TNF- α por mm^2 durante o processo de reparo de defeito ósseo nos diferentes grupos e períodos experimentais.

A análise do gráfico (Fig. 23) e dos resultados estatísticos mostrou que a expressão do TNF- α foi em média 1,93 vezes maior no grupo DIAB em relação ao CTL. Com relação ao tratamento, a expressão do TNF- α foi similar entre 7 e 21 dias e significativamente menor no grupo COAG aos 42 dias (2,32 vezes menor quando comparado aos 7 dias). Além disso, o tratamento com MAOD aumenta a expressão do TNF- α tanto no grupo CTL (1,59 vezes) como no DIAB (1,76 vezes).

5.6 EXPRESSÃO DO RNAm PARA AS PROTEÍNAS OPG, RANKL e TNF- α POR RT-PCR

a) OPG

Os resultados obtidos para a expressão do RNAm do OPG em relação a expressão do gene constitutivo Beta actina dos grupos controle e diabético estão apresentados nas e na Tabela 12 e Figura 24.

Tabela 12 - Comparação entre a expressão de RNAm do OPG em relação ao RNAm da RPL13 dos grupos CTL COAG, CTL MAOD, DIAB COAG e DIAB MAOD nos diferentes períodos experimentais pela ANOVA a três critérios e o *post-hoc* teste de Tukey. Letras diferentes $p < 0.05$

PCR OPG Variáveis	ANOVA		
	F	df	p
Período	11,5582	3	0,000030
Doença	1,1851	1	0,284707
Tratamento	9,9854	1	0,003511
Período*Doença	1,2748	3	0,300227
Período*Tratamento	3,2922	3	0,033453
Doença*Tratamento	1,6331	1	0,210763
Período*Doença*Tratamento	0,9664	3	0,421008

Período	COAG	MAOD
7	0,9397 ^{a,b}	0,7726 ^a
14	2,1716 ^{a,b}	1,9323 ^{a,b}
21	3,6712 ^{b,c}	0,8431 ^{a,b}
42	5,8752 ^c	3,0736 ^{a,c}

Figura 24 – Expressão de RNAm do OPG em relação ao RNAm da RPL13 durante o processo de reparo de defeito ósseo nos diferentes grupos e períodos experimentais.

A análise do gráfico (Fig. 24) e dos resultados estatísticos mostrou que houve aumento significativo de 6,25 vezes na expressão de OPG no grupo COAG entre 7 e 42 dias, enquanto que no grupo MAOD, embora ocorresse oscilações nos valores com pequena queda aos 21 dias, conclui-se que houve aumento na expressão de OPG ao fim de 42 dias. Quando comparados a média dos valores do grupo COAG com a do grupo MAOD, a expressão de OPG foi 1,91 vezes maior no grupo COAG.

b) RANKL

Os resultados obtidos para a expressão do RNAm do RANKL em relação a expressão do gene constitutivo Beta actina dos grupos controle e diabético estão apresentados nas Tabela 13 e Figura 25.

Tabela 13 - Comparação entre a expressão de RNAm do RANKL em relação ao RNAm da RPL13 dos grupos CTL COAG, CTL MAOD, DIAB COAG e DIAB MAOD nos diferentes períodos experimentais pela ANOVA a três critérios e o *post-hoc* teste de Tukey. Letras diferentes $p < 0.05$

PCR RANKL		ANOVA		
Variáveis		F	df	p
Período		7,3365	3	0,000790
Doença		30,9299	1	0,000005
Tratamento		30,9184	1	0,000005
Período*Doença		8,6267	3	0,000280
Período*Tratamento		10,3954	3	0,000075
Doença*Tratamento		8,4899	1	0,006688
Período*Doença*Tratamento		13,6928	3	0,000008

Período	CTL COAG	CTL MAOD	DIAB COAG	DIAB MAOD
7	1,093413 ^a	1,096686 ^{a,c}	1,619250 ^{a,c}	2,524056 ^{a,c}
14	1,816453 ^{a,c}	2,107535 ^{a,c}	3,096700 ^c	2,487016 ^{a,c}
21	1,610886 ^{a,c}	3,190423 ^c	1,824166 ^{a,c}	2,770442 ^{a,c}
42	1,512221 ^{a,c}	1,637749 ^{a,c}	1,493061 ^{a,c}	6,653409 ^b

Figura 25 – Expressão de RNAm do RANKL em relação ao RNAm da RPL13 durante o processo de reparo de defeito ósseo nos diferentes grupos e períodos experimentais.

A análise do gráfico (Fig. 25) e dos resultados estatísticos mostrou que no grupo CTL COAG a expressão de RANKL manteve-se constante, enquanto que no CTL MAOD e DIAB COAG houve um discreto aumento aos 21 dias e 14 dias, respectivamente. Os valores para expressão de RANKL permaneceram constantes no grupo DIAB MAOD, com aumento significativo de 2,57 vezes aos 42 dias, sendo significativamente 4,3 vezes maior quando comparado com a média dos outros grupos no mesmo período. A expressão de RANKL foi em média 1,6 vezes maior no grupo DIAB que no grupo CTL.

c) TNF- α

Os resultados obtidos para a expressão do RNAm do TNF- α em relação a expressão do gene constitutivo Beta actina dos grupos controle e diabético estão apresentados nas e Tabela 14 e Figura 26.

Tabela 14 - Comparação entre a expressão de RNAm do TNF- α em relação ao RNAm da RPL13 dos grupos CTL COAG, CTL MAOD, DIAB COAG e DIAB MAOD nos diferentes períodos experimentais pela ANOVA a três critérios e o *post-hoc* teste de Tukey. Letras diferentes $p < 0.05$

PCR TNF- α Variáveis	ANOVA		
	F	df	p
Período	3,4674	3	0,029332
Doença	1,2390	1	0,275126
Tratamento	2,1596	1	0,152831
Período*Doença	6,2187	3	0,002258
Período*Tratamento	0,6922	3	0,564483
Doença*Tratamento	0,1163	1	0,735593
Período*Doença*Tratamento	2,4093	3	0,088070

Período	CTL	DIAB
7	0,909543 ^a	1,471664 ^a
14	2,311943 ^{a,b}	1,014318 ^a
21	2,245897 ^{a,b}	1,336304 ^a
42	1,293438 ^a	3,763236 ^b

Figura 26 – Expressão de RNAm do TNF- α em relação ao RNAm da RPL13 durante o processo de reparo de defeito ósseo nos diferentes grupos e períodos experimentais.

A análise do gráfico (figura 26) e dos resultados estatísticos mostrou que a expressão de TNF- α manteve-se constante no grupo CTL entre 7 e 42 dias, enquanto que entre o grupo DIAB houve um significativo aumento de 2,95 vezes aos 42 dias, sendo que a expressão de TNF- α no grupo DIAB foi 2,91 vezes maior em relação ao grupo CTL.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Com o objetivo de facilitar a compreensão dos resultados obtidos durante a realização deste trabalho, serão discutidos: a) a diabetes e sua influência na glicemia e massa afetando o desenvolvimento corporal; b) a diabetes e sua influência no desenvolvimento e no reparo ósseo; c) a diabetes e sua influência sobre as proteínas RANKL, OPG E TNF- α no reparo ósseo natural; d) a atuação da MAOD no processo de reparo ósseo em indivíduos normoglicêmicos, e e) a utilização da MAOD e sua atuação sobre o reparo ósseo frente ao quadro de diabetes.

6.1 A DIABETES INDUZIDA PELA ESTREPTOZOTOCINA E SUA INFLUÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO CORPORAL

A Organização Mundial da Saúde (World Health Organization - WHO) e a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), defendem que valores para glicemia em jejum acima de 126 mg/dl são suspeitas do quadro de diabetes, enquanto que valores acima de 200 mg/dl já levam ao diagnóstico do estabelecimento do quadro de diabetes. Dessa forma, pesquisas envolvendo animais diabéticos vêm adotando valores para glicemia de jejum acima de 200 mg/dl para garantir o quadro de diabetes (Beam *et al.*, 2002; Santana *et al.*, 2003; Follak *et al.*, 2004; Botolin *et al.*, 2005; Martin e McCabe, 2007; Kayal *et al.*, 2009; Kalaivanan e Pugalendi, 2011; Ozcan *et al.*, 2012; Gul *et al.*, 2015; Maciel *et al.*, 2015; Rosa *et al.*, 2015). Durante a realização deste trabalho, a aplicação de uma única dose de estreptozotocina na concentração de 47 mg/kg de massa corporal, injetada no peritoneo de ratos com 60 dias de idade, levou a indução do diabetes cujo índice de glicemia de jejum entre os animais diabéticos foi em média de 429,07 mg/dL após 7 dias de administração da droga. Dos 173 animais induzidos, 43,35% ficaram diabéticos, 17,34% morreram durante o período de 7 dias após a indução e 39,31% não ficaram diabéticos. A glicemia sanguínea dos animais dos grupos CTL COAG e CTL MAOD foi em média de 88,23 mg/dL, mantendo-se dentro dos padrões de normalidade. Diferente dos valores obtidos nesta tese, Wang *et al.* (2014), após induzir 90 ratos machos (Wistar)

com uma única dose de estreptozotocina na concentração de 65 mg/kg, obteve 58,89% de sucesso para a indução de diabetes, enquanto que 43,33% morreram durante o experimento. Porém nossos resultados estão próximos aos obtidos por Hie *et al.* (2009) e Meneghetti (2010), que utilizaram uma dose única de 45 mg/kg e 50 mg/kg (respectivamente) de massa corporal de estreptozotocina para induzir o quadro de diabetes em seus ratos.

Os valores obtidos para massa corporal antes da indução (Inicial) foram similares para todos os grupos e períodos, sendo em média de 242,6 mg. No período experimental de 7 dias, isto é, aos 14 dias após a indução a massa corporal média dos animais diabéticos (DIAB COAG e DIAB MAOD) diminuiu 1,24 vezes, sendo em média de 196,2 mg, enquanto que, nos animais do grupo controle (CTL COAG e CTL MAOD) aumentou 1,30 vezes. Após este período a massa corporal manteve-se constante em todos os grupos. Segundo o trabalho de (Andreollo *et al.*, 2012), que comparou as idades de ratos e humanos, concluiu que os ratos atingem seu desenvolvimento final aos 6 meses de idade. Sendo assim, o aumento na massa corporal observada nos grupos normoglicêmicos (CTL COAG e CTL MAOD) indica que houve continuidade no desenvolvimento corporal destes animais, já que apresentavam somente 60 dias (aproximadamente 2 meses) no início do experimento (dia da indução dos animais diabéticos). Já os grupos diabéticos (DIAB COAG e DIAB MAOD) apresentaram seu desenvolvimento corporal prejudicado, mostrando diminuição na massa corporal.

Tal diminuição nos valores de massa corporal observada nos grupos diabéticos pode ser devido a perda na massa óssea, bem como perda na massa adiposa, relacionada com a deficiência de insulina (Szkudelski e Szkudelska, 2002), ambos os fatores acentuados pela presença do quadro de diabetes.

De acordo com a literatura, é durante a infância e a adolescência que ocorre acelerada deposição e desenvolvimento de tecido ósseo e é por volta dos trinta anos que observa-se um pico na massa óssea, sendo considerado um fator determinante para a saúde do tecido ósseo ou a propensão ao risco de fraturas ósseas futuras (Bianchi, 2007). Com o diagnóstico cada vez mais precoce de diabetes tipo 1 em crianças e adolescentes, é de se esperar que o desenvolvimento ósseo seja comprometido. Segundo Coe *et al.* (2013), após estudar os efeitos da diabetes tipo 1 no desenvolvimento da massa óssea em modelos de camundongos juvenis (seis semanas de idade) que desenvolvem diabetes tipo 1 espontaneamente, bem como

em camundongos na mesma faixa etária induzidos pela estreptozotocina (concentração de 40 µg/g de massa corporal), verificou que ambos os grupos diabéticos apresentaram grande perda óssea, afetando o crescimento e formação das trabéculas ósseas e do osso cortical, acarretando na redução no comprimento do fêmur. Além disso a diabetes levou a diminuição da osteocalcina no sangue e desenvolvimento de células adiposas na medula óssea, resultando em problemas na síntese e crescimento do tecido ósseo.

Quanto a perda de massa adiposa, Szkudelski e Szkudelska (2002), após trabalharem com cultura de adipócitos (obtidos de ratos Wistar), mencionam que nas culturas que receberam estreptozotocina foi observada a ocorrência da lipólise, podendo ser resultado da ação direta da droga sobre o hormônio-sensitivo-lipase ou um resultado da influência da droga sobre a ação das enzimas no interior da célula. Uma vez que a molécula de estreptozotocina apresenta propriedades alquilantes, é capaz de gerar espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, resultando na alquilação de algumas estruturas celulares ou no dano dessas estruturas pelos radicais livres, levando a lipólise (Szkudelski e Szkudelska, 2002).

6.2 A DIABETES E SUA INFLUENCIA NO REPARO OSSEO

Após a realização dos procedimentos cirúrgicos e decorridos os respectivos períodos experimentais de 07; 14; 21 e 42 dias, foi constatado morfológicamente que nos animais normoglicêmicos tratados com coágulo bem como com MAOD, houve aumento significativo do volume de tecido ósseo neoformado na área do defeito, enquanto que nos animais diabéticos (principalmente nos animais diabéticos tratados somente com coágulo) o volume de tecido ósseo manteve-se constante em alguns animais, sendo que em outros houve redução do volume ósseo, sugerindo perda óssea ou osteopenia. A avaliação morfométrica confirmou o atraso na formação de tecido ósseo observado na área do defeito nos animais diabéticos, quando comparamos os grupos que receberam o mesmo tratamento, como CTL COAG que aos 42 dias apresentou 2,48 vezes mais tecido ósseo neoformado que o grupo DIAB COAG, bem como CTL MAOD que produziu 3,16 vezes mais tecido ósseo neoformado que o grupo DIAB MAOD (observar tabela 6 e gráfico 4).

Para discutir sobre a redução do volume ósseo ocorrida nos animais diabéticos, Shyng *et al.* (2001), após trabalhar com animais diabéticos induzidos pela estreptozotocina, também constataram que a formação e o volume ósseo foram reduzidos no fêmur dos animais diabéticos, podendo estar relacionado com um defeito na mineralização ou na formação do osteóide, já o defeito ósseo na calvaria foi beneficiado com a utilização de uma membrana Gore-Tex que protegeu a área do defeito contra a invasão de tecido conjuntivo, permitindo a formação de tecido ósseo, apesar da presença da diabetes. Segundo a dissertação de mestrado de Bighetti (2011), foi observado que a formação e o reparo ósseo na calvaria dos animais diabéticos estava atrasada em relação ao normoglicêmico e independente do tratamento (DIAB COAG < CTL COAG e DIAB MAOD < CTL MAOD). Porém, quando comparamos os tratamentos, a formação óssea nos defeitos tratados apenas com coágulo foi comprometida em ambos os grupos diabéticos e normoglicêmicos comparativamente aos tratados com MAOD (DIAB COAG < DIAB MAOD e CTL COAG < CTL MAOD). O comprometimento do reparo nos defeitos tratados com o coágulo deve-se a sua rápida reabsorção, permitindo o colapso do tegumento no defeito, atuando como uma barreira física, impedindo/bloqueando o crescimento ósseo a partir das bordas do defeito.

Além disso, Yan e Li (2013) explicam em seu trabalho que a insulina exerce um efeito anabólico no tecido ósseo, contribuindo para a manutenção da densidade da massa de tecido ósseo (BMD - *Bone Mass Density*). Consequentemente, a produção insuficiente de insulina bem como de outros peptídeos que contribuem com a síntese de matriz óssea (polipeptídeo amiloide e preptina) produzidos e secretados pelas células β pancreáticas resultam em baixa densidade óssea, observada nos indivíduos diabéticos tipo 1 (Hamann *et al.*, 2012).

A diabetes pode afetar a qualidade do tecido ósseo durante o reparo por diferentes mecanismos. Primeiramente, a hiperglicemia afeta as células mesenquimais indiferenciadas, comprometendo sua diferenciação e função (Yan e Li, 2013). Segundo o experimento de Barbagallo *et al.* (2010) que trabalhou com cultura de células mesenquimais derivadas da medula óssea humana, foi constatado que elevadas concentrações de glicose inibiram a diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos, levando essas células a se diferenciarem em adipócitos. Tais resultados corroboram com os obtidos por Keats e Khan (2012), mostrando que a hiperglicemia alterou o potencial de diferenciação das células

mesenquimais em favor da linhagem de adipócitos, prejudicando o crescimento ósseo. Além disso, a hiperglicemia leva ao aumento do estresse oxidativo através das espécies de oxigênios reativos (ROS), responsável por reduzir a osteoblastogenese e estimular a apoptose entre os osteoblastos (Manolagas, 2000) além de levar a maior produção e liberação de TNF- α , contribuindo para a perda óssea (Grassi *et al.*, 2007). Por último, a hiperglicemia também leva ao aumento das moléculas AGE, como a pentosidina, responsável por alterar as propriedades mecânicas do tecido ósseo, levando a redução de sua qualidade (Saito *et al.*, 2006). Além disso, a hiperglicemia está relacionada com a redução da marcação do turnover ósseo, dificultando a formação de áreas de ossificação, comprometendo a atividade dos osteoblastos em humanos (Sanguineti *et al.*, 2008).

O segundo mecanismo pelo qual a diabetes influencia o reparo de um defeito no tecido ósseo é através da osteocalcina. Segundo a literatura, a osteocalcina está relacionada com o metabolismo ósseo bem como com a homeostase da glicose (Clemens e Karsenty, 2011). Quando a insulina ativa seu receptor na superfície da membrana celular dos osteoblastos, induz a produção de osteocalcina, a qual atua sobre o pâncreas, levando a proliferação de células β , aumentando a secreção de insulina e a sensibilidade das células alvo a este hormônio, aumentando o consumo de glicose com produção de energia (Lee *et al.*, 2007; Lee e Karsenty, 2008). Em pacientes diabéticos tipo 1, a falta de insulina diminui a produção de osteocalcina pelos osteoblastos, agravando a escassez de insulina. De acordo com Hamann *et al.* (2012), a osteocalcina também atua nos testículos, levando a produção de testosterona e regulando a fertilidade masculina, sendo que a testosterona, por sua vez, atua na regulação do acúmulo de massa óssea e na remodelação do tecido ósseo. Sendo assim, nos quadros de diabetes tipo 1, a falta de insulina afeta a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos, reduzindo a produção de osteocalcina e sua ação sobre os testículos, diminuindo a secreção de testosterona, diminuindo sua atuação sobre o tecido ósseo como fator osteogênico (Hamann *et al.*, 2012; Yan e Li, 2013).

Por fim, a diabetes prejudica o reparo ósseo ao inibir o hormônio da paratireoide (*Parathyroid Hormone* - PTH), já que este hormônio é responsável por regularizar a remodelação óssea (Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy, 2001). Segundo alguns trabalhos, a hiperglicemia inibe a secreção de PTH (Polymeris *et al.*, 2011) bem como a expressão de seu receptor nos osteoblastos

(Picton *et al.*, 2000), prejudicando a remodelação óssea (Yan e Li, 2013), fundamental para o reparo de defeitos ósseos.

Além da ação dos osteoblastos estar comprometida no quadro de hiperglicemia, os osteoclastos também tem sua atividade alterada, afetando o *turnover* ósseo. Como já é conhecido, os osteoblastos secretam RANKL, o qual se liga ao seu receptor expresso na membrana plasmática das células precursoras de osteoclastos, levando a sua diferenciação e maturação (Boyce *et al.*, 2005). Para equilibrar a diferenciação de osteoclastos, os osteoblastos também secretam OPG (osteoprotegerina), que se liga ao RANKL, impossibilitando sua ligação ao RANK e impedindo sua ação sobre a célula precursora, inibindo sua diferenciação em osteoclasto (Loureiro *et al.*, 2014). Porém, frente ao quadro de diabetes, mediadores inflamatórios como TNF- α (responsável por estimular a liberação de RANKL pelos osteoblastos) encontra-se em excesso no organismo, atuando sobre os osteoblastos, levando a maior liberação de RANKL e diferenciação de pré osteoclastos, aumentando o número de osteoclastos absorvendo a matriz óssea (Jiao *et al.*, 2015).

Dessa forma, Blakytyn *et al.* (2011) explica que no quadro de diabetes é observado um desequilíbrio no *turnover* ósseo, devido ao aumento dos fatores osteoclastogênicos, como elevada expressão TNF- α , RANKL e RANK, aumento da liberação das moléculas AGE e sua interação com seus receptores RAGE, além da diminuição dos fatores que contribuem para a osteoblastogenese, como IGF (fator de crescimento *insulin-like*), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), TGF- β (fator de crescimento tumoral β) e VEGF (fator de crescimento endotelial vascular).

Porém, os resultados referentes ao número de osteoclastos obtidos nesta tese vão contra as informações que os pesquisadores tem apresentado, pois após analisar morfometricamente o número de osteoclastos na área do defeito ósseo (calvaria), ficou constatado nesta tese que os grupos CTL (tratados com COAG e MAOD) apresentaram aumento significativo até o período final do experimento (3,69 osteoclasto/mm² – ver tabela 8 e gráfico 6), enquanto que o grupo DIAB (tratados com COAG e MAOD) não apresentaram aumento, mantendo o número de osteoclastos constante até o final do experimento (0,92 osteoclasto/mm² – ver tabela 8 e gráfico 6). Quando comparamos os diferentes tipos de tratamentos, o grupo COAG apresentou um pico aos 14 dias (3,03 osteoclasto/mm²), retornando aos

níveis iniciais aos 42 dias (1,81 osteoclasto/mm²), diferente do grupo tratado com MAOD, que apresentou aumento gradual até o período final de 42 dias (2,8 osteoclasto/mm² – ver tabela 8 e gráfico 6).

Uma possível explicação para os resultados obtidos para o número reduzido de osteoclastos encontrado nos grupos DIAB, bem como no atraso da reabsorção da matriz alogênica, vem da pesquisa realizada por Singh *et al.* (2007). Esses autores após trabalhar com ratos diabéticos induzidos pela estreptozotocina observaram que, além do aumento nos fatores osteoclastogênicos no quadro de diabetes, ocorre também a redução de VEGF, comprometendo a angiogênese na área do defeito, dificultando a quimioatração de células precursoras de osteoclastos.

Além disso, Wittrant *et al.* (2008) desenvolveram um trabalho utilizando cultura de células da linhagem dos monócitos, bem como células obtidas da medula óssea de camundongos, incubando tais culturas em concentrações crescentes de D-glicose. Constataram que elevadas concentrações deste açúcar atuam inibindo a diferenciação e função dos osteoclastos mediada pelo RANKL, sugerindo que a D-glicose interfere na sinalização do RANKL pela redução na produção de espécies de oxigênio reativos (ROS), de caspase-3 e redução na ativação de NF-κβ. Complementando os resultados do trabalho anterior, Valcourt *et al.* (2007) após trabalharem com diferentes culturas de células, constataram que os meios modificados com a presença de AGE tinham a osteoclastogenese inibida. Isto sugeriu que a molécula AGE deva interferir na diferenciação e atividade de osteoclastos pela interação com seu receptor na membrana plasmática dessas células, já que células precursoras de osteoclastos e osteoclastos maduros expressam receptores AGE diferentes.

6.3 A DIABETES E SUA INFLUÊNCIA SOBRE AS PROTEÍNAS RANKL, OPG E TNF-α NO REPARO ÓSSEO

A análise morfológica e morfométrica dos cortes histológicos imunomarcados para OPG nesta tese mostraram que no decorrer dos períodos de 07, 14, 21 e 42 dias, os valores de OPG foram decaindo, sendo o valor de 42 dias 1,82 vezes menor do que a média dos grupos de 07 e 14 dias (ver tabela 9 e gráfico 13), independente do tratamento recebido ou dos valores de glicemia. Entretanto, quando comparamos

somente os tipos de tratamentos (COAG ou MAOD), verificou-se que os animais tratados com MAOD apresentavam 1,28 vezes maior imunomarcacão para OPG, do que o observado no grupo tratado com COAG. Já os resultados para expressão de OPG pelo RT-PCR mostraram aumento significativo de 6,25 vezes nos grupos tratados com coágulo entre 7 e 42 dias, quando comparados com os grupos tratados com MAOD. Embora ocorressem oscilações nos valores com pequena queda aos 21 dias, conclui-se que houve aumento na expressão de OPG ao final de 42 dias (ver tabela 09 e gráfico 13). Quando comparados a média dos valores dos grupos tratados com coágulo com a dos grupos tratados com MAOD, a expressão de OPG foi 1,91 vezes maior nos grupos COAG. É possível inferir destes resultados que, independente da presença do quadro de diabetes, mais uma vez a questão para o aumento da expressão de OPG está relacionada com o tratamento: coágulo ou MAOD. Além disso, foi observado que ambos os grupos tratados com coágulo ou MAOD apresentaram aumento na expressão de OPG, diferenciando apenas na intensidade desse aumento, já que a média dos grupos tratados apenas com coágulo foi maior estatisticamente que média dos grupos tratados com MAOD.

Embora muitos trabalhos defendam que os valores para OPG diminuem frente ao quadro de diabetes (Motyl e McCabe, 2009; Lamster *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2012; Pacios *et al.*, 2013; Jiao *et al.*, 2015; Khan e Fraser, 2015; Wu *et al.*, 2015), os resultados apresentados nesta tese mostram que a presença da diabetes não influenciou significativamente a imunomarcacão para OPG, mas sim a presença da MAOD. De La Piedra *et al.* (2008), após trabalhar com osso alo gênico implantado em cultura de osteoblastos humanos, constataram que houve diminuição na proliferação destas células na primeira semana do experimento e um aumento no RNAm para interleucina 6 (IL6), produzida pelos linfócitos T, macrófagos e também pelos osteoblastos, responsável por induzir a reabsorção óssea através da estimulação da osteoclastogênese (Ishimi *et al.*, 1990; Tamura *et al.*, 1993; Gao *et al.*, 1998), bem como aumento na liberação desta citocina no meio de cultura logo nos dois primeiros dias do experimento, acompanhado da diminuição na liberação de OPG, sugerindo um aumento na reabsorção e diminuição na formação óssea. Porém, a partir da segunda semana de experimento houve aumento na proliferação de osteoblastos e liberação de pro-peptídeo N-terminal do procólgeno I (PINP) – que atua como biomarcador por ser sintetizado e liberado pelos osteoblastos durante a síntese de matriz óssea (Veidal *et al.*, 2010) – no meio de cultura,

indicando aumento na formação óssea, bem como aumento na liberação de OPG e diminuição de IL6, indicando redução na reabsorção óssea. Segundo o autor, esta elevação nos valores de OPG deve-se ao aumento no número de osteoblastos devido a presença do osso alogênico implantado.

Além disso, Loureiro *et al.* (2014) ao trabalhar com crianças e adolescentes diabéticos tipo 1, verificou um aumento na expressão do RNAm para OPG, enquanto que a densidade mineral óssea desses pacientes, bem como a expressão de osteocalcina estavam baixas, sendo este quadro estava associado ao controle insatisfatório das taxas de glicose no organismo. Segundo o autor, o aumento na expressão de OPG observado no grupo de pacientes diabéticos sugere uma forma do organismo de proteger a formação óssea inibindo a osteoclastogenese através da competição entre as moléculas de OPG e RANKL pela ligação ao RANK. Segundo Ururahy *et al.* (2012), pacientes diabéticos tipo 1 apresentam elevada expressão de citocinas pro-inflamatórias, tais como IL1B, IL6 e TNF- α , liberadas pelos leucócitos presentes no sangue, levando a disfunções renais, cuja presença em pacientes jovens resultaria em progressiva perda óssea. Segundo Wongdee e Charoenphandhu (2011), as moléculas pro-inflamatórias citadas anteriormente regulam a diferenciação e atividade dos osteoclastos, sendo que longos períodos de hiperglicemia resultariam em liberação de ROs, o que levaria ao aumento na expressão de tais citocinas pro-inflamatórias relacionadas com a osteoclastogenese, e, por conseguinte, rápida progressão na perda óssea que pode ser refletida pela diminuição da osteocalcina circulante.

Já os resultados obtidos para o número de células imunomarcadas para RANKL foi 1,76 vezes maior aos 7 dias nos grupos tratados com COAG, diminuindo aos 14 dias e mantendo-se similar ou inferior ao do grupo MAOD (ver tabela 10 e gráfico 14). A expressão do RNAm para RANKL com relação a doença foi constante e similar entre os diabéticos e normoglicêmicos, porém nos defeitos tratados com a MAOD apresentaram maiores valores de RNAm para RANKL comparado aos do CTL, principalmente aos 42 dias, sugerindo que a longo prazo o tratamento com a MAOD aumenta a expressão de RANKL independentemente do estado glicêmico. Com relação ao TNF- α , o número de células marcadas e a expressão do RNAm foram maior nos diabéticos e mais expressivas nos períodos mais longos (21 e 42 dias), sugerindo maior atividade desta proteína nos animais diabéticos no período de maior remodelação óssea.

Vários os trabalhos sugerem que na diabetes ocorra maior expressão de RANKL e TNF- α , culminando com aumento da osteoclastogenese e excessiva reabsorção óssea (Kayal *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2010; Bastos *et al.*, 2012; Jiao *et al.*, 2015). Porém, no atual trabalho, a atividade osteoclástica e o processo de remodelação óssea foram reduzidas nos animais diabéticos sugerindo que outras vias de sinalização podem estar influenciando negativamente no processo de reparo. Uma das vias de sinalização que pode interferir negativamente no processo de reparo, alterando a expressão de RANKL e a reabsorção de matriz óssea é a via relacionada ao AGE, presente em quantidades elevadas no quadro de diabetes. Segundo o trabalho de Li *et al.* (2016), foi verificado em cultura de células progenitoras de osteoclastos, que a presença de AGE resultou em redução do número de osteoclastos maduros, diminuição da expressão de RANKL, de catepsina K, de células TRAP+, do número de núcleos por osteoclasto, bem como redução na quantidade de podossomos, demonstrando a influencia do AGE até mesmo na estrutura dos osteoclastos, alterando assim sua função de reabsorção da matriz óssea.

De acordo com Cestari (2009), após trabalhar com animais normoglicêmicos, verificou que o reparo ósseo em calvaria de ratos inicia-se com elevada expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) por parte das células endoteliais localizadas na periferia do defeito. Também ocorre a ação quimiotática para células precursoras de osteoclastos (Engsig *et al.*, 2000) e a ativação destas células pelas citocinas em questão – RANKL, TNF- α e OPG – responsáveis por regular a formação de osteoclastos na área do defeito. Bighetti (2011), após utilizar a mesma metodologia empregada nesta tese, verificou que com a reabsorção das partículas de MAOD pelos osteoclastos na área do defeito, são liberadas proteínas, como fatores de crescimento e transformação, que atuam sobre as células mesenquimais indiferenciadas presente no tecido conjuntivo e periósteo do osso autógeno na borda do defeito, resultando na diferenciação destas células em osteoblastos e condroblastos. Dessa forma, ocorre síntese de matriz óssea próxima às bordas do defeito, rente à dura-mater, enquanto que nas áreas próximas ao tegumento, onde há pouca vascularização, ocorre formação de tecido cartilaginoso, com posterior mineralização deste. Assim que houver a reabsorção de todo esse tecido ósseo produzido inicialmente, ocorrerá a organização de tecido ósseo medular. Entretanto,

no quadro de diabetes, os processos envolvendo o reparo ósseo ficam comprometidos, devido ao aumento dos fatores osteoclastogênico, envolvendo alterações na expressão de RANK/RANKL/OPG, aumento na interação das moléculas AGE e RAGE, além da diminuição dos fatores osteoblastogênicos, tais como IGF, PDGF, TGF- β e VEGF (Blakytyn *et al.*, 2011).

Como explicado na revisão de literatura, o sistema RANK/RANKL/OPG tem sido estudado como uma ferramenta para o diagnóstico de alterações ósseas por estar relacionado com a regulação do metabolismo ósseo (Loureiro *et al.*, 2014), sendo que a diabetes leva a um desequilíbrio entre estas citocinas, aumentando a relação entre RANKL/OPG e aumentando a expressão de TNF- α , contribuindo, dessa forma, com a perda óssea (De Amorim *et al.*, 2008; Blakytyn *et al.*, 2011; Pacios *et al.*, 2013). Pacios *et al.* (2013), após trabalhar com ratos diabéticos tipo 2 explica que elevados valores de TNF- α , ROS e AGE (que acompanham o quadro de diabetes) limitam a capacidade do animal diabético de reduzir a expressão de sinais pro-apoptóticos, ocorrendo aumento da apoptose e redução da integração óssea nos animais diabéticos. Além disso, as moléculas AGE inibem a diferenciação de osteoblastos, sendo que segundo o experimento de (Ogawa *et al.*, 2007), verificou que nos animais diabéticos houve elevada expressão de RAGE nos osteoblastos, afetando a mineralização do tecido ósseo. Somando-se a isso, a interação entre a molécula AGE e seu receptor RAGE resulta em elevada ativação do fator de transcrição NF- κ B (Lalla *et al.*, 2000), aumentando a expressão de IL-6, que atua sobre as células progenitoras, induzindo sua diferenciação em osteoclastos (Ding *et al.*, 2006).

Com base nos resultados obtidos a expressão de OPG e RANKL bem como o reparo e a remodelação de defeitos ósseos cranianos são favorecidos com a utilização da MAOD tanto em indivíduos normoglicêmicos como diabéticos, porém o ganho ósseo a maturação tecidual e a reabsorção da MAOD são reduzidos nos animais diabéticos e está associada a maior expressão de TNF- α .

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesta pesquisa levam a concluir que:

- a) A aplicação de uma única dose de estreptozotocina na concentração de 47 mg/kg de massa corporal, injetada no peritoneo de ratos com 60 dias de idade induz ao quadro de diabetes severa apresentando em média 429 mg/dL de glicemia de jejum, elevada perda de massa corporal e poliúria;
- b) A capacidade de formação óssea nos defeitos ósseos cranianos é reduzida nos animais diabéticos comparativamente aos normoglicêmicos;
- c) O tratamento com a MAOD aumenta a marcação de OPG, RANKL e TNF- α e a atividade osteoclástica, promovendo reabsorção da MAOD e formação de tecido ósseo nos animais normoglicêmicos;
- d) Nos animais diabéticos a atividade osteoclástica foi reduzida sem alteração nos níveis de OPG e RANKL, reduzindo a reabsorção da MAOD e consequentemente da formação óssea;
- e) A MAOD contribui positivamente com a formação óssea tanto nos animais normoglicêmicos como nos diabéticos, atuando na manutenção do espaço físico para que ocorra a neoformação óssea, induzindo a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos e servindo de suporte para migração, proliferação e síntese de MEC das células ósseas em sua superfície.

Ao final deste trabalho, fica evidente a importância de se pesquisar detalhadamente a diabetes e seus efeitos sobre as citocinas envolvidas no *turn over* ósseo e a consequente influência da diabetes sobre a atividade das células ósseas, como foi visto neste trabalho com os osteoclastos. Tais alterações podem influenciar na recuperação de um paciente que passou por uma cirurgia para implante na clínica odontológica ou mesmo após uma cirurgia ortopédica, além da importância de se estudar os materiais para enxerto ósseo e entender seu comportamento biológico durante o processo de integração ao tecido ósseo, assim como o aprimoramento dos biomateriais já existentes, aumentando assim, as chances de sucesso nas cirurgias envolvendo enxerto ósseo tanto na odontologia como na ortopedia.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

ACCORSI-MENDONÇA, T. et al. Biological monitoring of a xenomaterial for grafting: an evaluation in critical-size calvarial defects. **J Mater Sci Mater Med**, v. 22, n. 4, p. 997-1004, Apr 2011. ISSN 0957-4530.

AL-MASHAT, H. A. et al. Diabetes enhances mRNA levels of proapoptotic genes and caspase activity, which contribute to impaired healing. **Diabetes**, v. 55, n. 2, p. 487-95, Feb 2006. ISSN 0012-1797.

ALBLOWI, J. et al. High levels of tumor necrosis factor-alpha contribute to accelerated loss of cartilage in diabetic fracture healing. **Am J Pathol**, v. 175, n. 4, p. 1574-85, Oct 2009. ISSN 0002-9440.

ALIKHANI, M. et al. Advanced glycation end products stimulate osteoblast apoptosis via the MAP kinase and cytosolic apoptotic pathways. **Bone**, v. 40, n. 2, p. 345-53, Feb 2007. ISSN 8756-3282.

ANDREOLLO, N. A. et al. Rat's age versus human's age: what is the relationship? **Arq Bras Cir Dig**, v. 25, n. 1, p. 49-51, Jan-Mar 2012. ISSN 0102-6720.

ARINZEH, T. L. et al. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. **J Bone Joint Surg Am**, v. 85-a, n. 10, p. 1927-35, Oct 2003. ISSN 0021-9355.

BARBAGALLO, I. et al. Overexpression of heme oxygenase-1 increases human osteoblast stem cell differentiation. **J Bone Miner Metab**, v. 28, n. 3, p. 276-88, May 2010. ISSN 0914-8779.

BASTOS, A. S. et al. Lipid peroxidation is associated with the severity of periodontal disease and local inflammatory markers in patients with type 2 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 97, n. 8, p. E1353-62, Aug 2012. ISSN 0021-972x.

BEAM, H. A.; PARSONS, J. R.; LIN, S. S. The effects of blood glucose control upon fracture healing in the BB Wistar rat with diabetes mellitus. **J Orthop Res**, v. 20, n. 6, p. 1210-6, Nov 2002. ISSN 0736-0266.

¹ De acordo com NBR 6023 – Informação e Documentação – Referências – Elaboração (ago./2002) da ABNT

BECHTOLD, S. et al. Bone size normalizes with age in children and adolescents with type 1 diabetes. **Diabetes Care**, v. 30, n. 8, p. 2046-50, Aug 2007. ISSN 0149-5992.

BELFRAGE, O. et al. Local treatment of cancellous bone grafts with BMP-7 and zoledronate increases both the bone formation rate and bone density: a bone chamber study in rats. **Acta Orthop**, v. 82, n. 2, p. 228-33, Apr 2011. ISSN 1745-3674.

BIANCHI, M. L. Osteoporosis in children and adolescents. **Bone**, v. 41, n. 4, p. 486-95, Oct 2007. ISSN 8756-3282.

BIGHETTI, B. B. **Avaliação do reparo de defeito ósseo em calvária de ratos diabéticos tratados com Matriz Óssea Desmineralizada**. 2011. 166 (Mestrado). Laboratório de Histologia, Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru.

BLAKYTNY, R.; SPRAUL, M.; JUDE, E. B. Review: The diabetic bone: a cellular and molecular perspective. **Int J Low Extrem Wounds**, v. 10, n. 1, p. 16-32, Mar 2011. ISSN 1534-7346.

BONEWALD, L. F.; JOHNSON, M. L. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. **Bone**, v. 42, n. 4, p. 606-15, Apr 2008. ISSN 8756-3282.

BOSCH, C.; MELSEN, B.; VARGERVIK, K. Guided bone regeneration in calvarial bone defects using polytetrafluoroethylene membranes. **Cleft Palate Craniofac J**, v. 32, n. 4, p. 311-7, Jul 1995. ISSN 1055-6656.

Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. **J Craniofac Surg**, v. 9, n. 4, p. 310-6, Jul 1998. ISSN 1049-2275.

BOTOLIN, S. et al. Increased bone adiposity and peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma2 expression in type I diabetic mice. **Endocrinology**, v. 146, n. 8, p. 3622-31, Aug 2005. ISSN 0013-7227.

BOTOLIN, S.; MCCABE, L. R. Chronic hyperglycemia modulates osteoblast gene expression through osmotic and non-osmotic pathways. **J Cell Biochem**, v. 99, n. 2, p. 411-24, Oct 1 2006. ISSN 0730-2312.

BOUILLON, R. et al. Influence of age, sex, and insulin on osteoblast function: osteoblast dysfunction in diabetes mellitus. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 80, n. 4, p. 1194-202, Apr 1995. ISSN 0021-972X.

BOYAN, B. D. et al. Osteoinductive ability of human allograft formulations. **J Periodontol**, v. 77, n. 9, p. 1555-63, Sep 2006. ISSN 0022-3492.

BOYCE, B. F. et al. TNF-alpha and pathologic bone resorption. **Keio J Med**, v. 54, n. 3, p. 127-31, Sep 2005. ISSN 0022-9717.

BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 337-42, May 15 2003. ISSN 0028-0836.

BREITBART, E. A. et al. Mesenchymal stem cells accelerate bone allograft incorporation in the presence of diabetes mellitus. **J Orthop Res**, v. 28, n. 7, p. 942-9, Jul 2010. ISSN 0736-0266.

BURG, K. J.; PORTER, S.; KELLAM, J. F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 21, n. 23, p. 2347-59, Dec 2000. ISSN 0142-9612.

BURGHARDT, A. J. et al. High-resolution peripheral quantitative computed tomographic imaging of cortical and trabecular bone microarchitecture in patients with type 2 diabetes mellitus. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 95, n. 11, p. 5045-55, Nov 2010. ISSN 0021-972x.

CARSON, J. S.; BOSTROM, M. P. Synthetic bone scaffolds and fracture repair. **Injury**, v. 38 Suppl 1, p. S33-7, Mar 2007. ISSN 0020-1383.

CATALANO, A. et al. Gender differences in sclerostin and clinical characteristics in type 1 diabetes mellitus. **Eur J Endocrinol**, v. 171, n. 3, p. 293-300, Sep 2014. ISSN 0804-4643.

CESTARI, T. M. **Aspectos celulares, teciduais e moleculares da osteogênese ectópica e ortotópica induzida pela matriz alogênica óssea e dentinária**. 2009. (Doutorado). Laboratório de Histologia, Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru.

CESTARI, T. M. et al. Bone repair and augmentation using block of sintered bovine-derived anorganic bone graft in cranial bone defect model. **Clin Oral Implants Res**, v. 20, n. 4, p. 340-50, Apr 2009. ISSN 0905-7161.

CHANG, J. et al. NF-kappaB inhibits osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by promoting beta-catenin degradation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 23, p. 9469-74, Jun 4 2013. ISSN 0027-8424.

CHANG, P. C. et al. Patterns of diabetic periodontal wound repair: a study using micro-computed tomography and immunohistochemistry. **J Periodontol**, v. 83, n. 5, p. 644-52, May 2012. ISSN 0022-3492.

CHOW, K. M.; RABIE, A. B. Vascular endothelial growth pattern of endochondral bone graft in the presence of demineralized intramembranous bone matrix--quantitative analysis. **Cleft Palate Craniofac J**, v. 37, n. 4, p. 385-94, Jul 2000. ISSN 1055-6656.

CLEMENS, T. L.; KARSENTY, G. The osteoblast: an insulin target cell controlling glucose homeostasis. **J Bone Miner Res**, v. 26, n. 4, p. 677-80, Apr 2011. ISSN 0884-0431.

COE, L. M.; ZHANG, J.; MCCABE, L. R. Both spontaneous Ins2(+/-) and streptozotocin-induced type I diabetes cause bone loss in young mice. **J Cell Physiol**, v. 228, n. 4, p. 689-95, Apr 2013. ISSN 0021-9541.

CONZ, M. B.; GRANJEIRO, J. M.; SOARES GDE, A. Hydroxyapatite crystallinity does not affect the repair of critical size bone defects. **J Appl Oral Sci**, v. 19, n. 4, p. 337-42, Aug 2011. ISSN 1678-7757.

COOPER, G. M. et al. Testing the critical size in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-size defect. **Plast Reconstr Surg**, v. 125, n. 6, p. 1685-92, Jun 2010. ISSN 0032-1052.

DAMIEN, C. J.; PARSONS, J. R. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. **J Appl Biomater**, v. 2, n. 3, p. 187-208, Fall 1991. ISSN 1045-4861.

DE AMORIM, F. P. et al. Imbalance of RANK, RANKL and OPG expression during tibial fracture repair in diabetic rats. **J Mol Histol**, v. 39, n. 4, p. 401-8, Aug 2008. ISSN 1567-2379.

DE LA PIEDRA, C. et al. Osteoinductive effect of bone bank allografts on human osteoblasts in culture. **J Orthop Res**, v. 26, n. 2, p. 200-7, Feb 2008. ISSN 0736-0266.

DE OLIVEIRA, R. C. et al. Morphometric evaluation of the repair of critical-size defects using demineralized bovine bone and autogenous bone grafts in rat calvaria. **Clin Oral Implants Res**, v. 19, n. 8, p. 749-54, Aug 2008. ISSN 0905-7161.

DELLOYE, C. et al. Bone allografts: What they can offer and what they cannot. **J Bone Joint Surg Br**, v. 89, n. 5, p. 574-9, May 2007. ISSN 0301-620X.

Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 32 Suppl 1, p. S62-7, Jan 2009. ISSN 0149-5992.

DING, K. H. et al. Disordered osteoclast formation in RAGE-deficient mouse establishes an essential role for RAGE in diabetes related bone loss. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 340, n. 4, p. 1091-7, Feb 24 2006. ISSN 0006-291X.

ELEAZU, C. O. et al. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. **J Diabetes Metab Disord**, v. 12, n. 1, p. 60, 2013. ISSN 2251-6581.

ELSALANTY, M. E.; GENECOV, D. G. Bone grafts in craniofacial surgery. **Cranio-maxillofac Trauma Reconstr**, v. 2, n. 3, p. 125-34, Oct 2009. ISSN 1943-3875.

ELSNER, M. et al. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. **Diabetologia**, v. 43, n. 12, p. 1528-33, Dec 2000. ISSN 0012-186X.

ENGSG, M. T. et al. Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. **J Cell Biol**, v. 151, n. 4, p. 879-89, Nov 13 2000. ISSN 0021-9525.

FELDMANN, M.; BRENNAN, F. M.; MAINI, R. N. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. **Annu Rev Immunol**, v. 14, p. 397-440, 1996. ISSN 0732-0582.

FINKEMEIER, C. G. Bone-grafting and bone-graft substitutes. **J Bone Joint Surg Am**, v. 84-a, n. 3, p. 454-64, Mar 2002. ISSN 0021-9355.

FITZGIBBONS, T. C. et al. Bone grafting in surgery about the foot and ankle: indications and techniques. **J Am Acad Orthop Surg**, v. 19, n. 2, p. 112-20, Feb 2011. ISSN 1067-151x.

FOLLAK, N. et al. Histomorphometric evaluation of the influence of the diabetic metabolic state on bone defect healing depending on the defect size in spontaneously diabetic BB/OK rats. **Bone**, v. 35, n. 1, p. 144-52, Jul 2004. ISSN 8756-3282.

FORSEN, L. et al. Diabetes mellitus and the incidence of hip fracture: results from the Nord-Trøndelag Health Survey. **Diabetologia**, v. 42, n. 8, p. 920-5, Aug 1999. ISSN 0012-186x.

FUJII, T. et al. Effect of SI-591, a new class of cathepsin K inhibitor with peptidomimetic structure, on bone metabolism in vitro and in vivo. **Bone**, v. 81, p. 427-34, Dec 2015. ISSN 1873-2763.

GAO, Y. et al. Expression of IL-6 receptor and GP130 in mouse bone marrow cells during osteoclast differentiation. **Bone**, v. 22, n. 5, p. 487-93, May 1998. ISSN 8756-3282.

GENNARI, L. et al. Circulating sclerostin levels and bone turnover in type 1 and type 2 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 97, n. 5, p. 1737-44, May 2012. ISSN 0021-972x.

GOGOLEWSKI, S.; MAINIL-VARLET, P. Effect of thermal treatment on sterility, molecular and mechanical properties of various polylactides. 2. Poly(L/D-lactide) and poly(L/DL-lactide). **Biomaterials**, v. 18, n. 3, p. 251-5, Feb 1997. ISSN 0142-9612.

GOMES, P. S.; FERNANDES, M. H. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. **Lab Anim**, v. 45, n. 1, p. 14-24, Jan 2011. ISSN 0023-6772.

GOSAIN, A. K. et al. Osteogenesis in calvarial defects: contribution of the dura, the pericranium, and the surrounding bone in adult versus infant animals. **Plast Reconstr Surg**, v. 112, n. 2, p. 515-27, Aug 2003. ISSN 0032-1052.

Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF-beta isoforms. **Plast Reconstr Surg**, v. 106, n. 2, p. 360-71; discussion 372, Aug 2000. ISSN 0032-1052.

GRANJEIRO, J. M. et al. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. **Braz J Med Biol Res**, v. 38, n. 10, p. 1463-73, Oct 2005. ISSN 0100-879x.

GRASSI, F. et al. Oxidative stress causes bone loss in estrogen-deficient mice through enhanced bone marrow dendritic cell activation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 38, p. 15087-92, Sep 18 2007. ISSN 0027-8424.

GRAZIANI, F. et al. Comparison of implant survival following sinus floor augmentation procedures with implants placed in pristine posterior maxillary bone: a systematic review. **Clin Oral Implants Res**, v. 15, n. 6, p. 677-82, Dec 2004. ISSN 0905-7161.

GUL, M. et al. Histopathological, Ultrastructural and Apoptotic Changes in Diabetic Rat Placenta. **Balkan Med J**, v. 32, n. 3, p. 296-302, Jul 2015. ISSN 2146-3123.

HA, H. et al. Oxidative stress and chronic allograft nephropathy. **Yonsei Med J**, v. 45, n. 6, p. 1049-52, Dec 31 2004. ISSN 0513-5796.

HAMANN, C. et al. Bone, sweet bone--osteoporotic fractures in diabetes mellitus. **Nat Rev Endocrinol**, v. 8, n. 5, p. 297-305, May 2012. ISSN 1759-5029.

HIE, M. et al. Insulin-dependent diabetes mellitus decreases osteoblastogenesis associated with the inhibition of Wnt signaling through increased expression of Sost and Dkk1 and inhibition of Akt activation. **Int J Mol Med**, v. 28, n. 3, p. 455-62, Sep 2011. ISSN 1107-3756.

HIE, M.; YAMAZAKI, M.; TSUKAMOTO, I. Curcumin suppresses increased bone resorption by inhibiting osteoclastogenesis in rats with streptozotocin-induced diabetes. **Eur J Pharmacol**, v. 621, n. 1-3, p. 1-9, Oct 25 2009. ISSN 0014-2999.

HOLZMANN, P. et al. Investigation of bone allografts representing different steps of the bone bank procedure using the CAM-model. **Altex**, v. 27, n. 2, p. 97-103, 2010. ISSN 1868-596x.

ISHIMI, Y. et al. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. **J Immunol**, v. 145, n. 10, p. 3297-303, Nov 15 1990. ISSN 0022-1767.

ISSA, J. P. et al. Bone repair of critical size defects treated with autogenic, allogenic, or xenogenic bone grafts alone or in combination with rhBMP-2. **Clin Oral Implants Res**, Aug 11 2015. ISSN 0905-7161.

JEFFCOATE, W. J.; GAME, F.; CAVANAGH, P. R. The role of proinflammatory cytokines in the cause of neuropathic osteoarthropathy (acute Charcot foot) in diabetes. **Lancet**, v. 366, n. 9502, p. 2058-61, Dec 10 2005. ISSN 0140-6736.

JEHLE, P. M. et al. Serum levels of insulin-like growth factor system components and relationship to bone metabolism in Type 1 and Type 2 diabetes mellitus patients. **J Endocrinol**, v. 159, n. 2, p. 297-306, Nov 1998. ISSN 0022-0795.

JIAO, H.; XIAO, E.; GRAVES, D. T. Diabetes and Its Effect on Bone and Fracture Healing. **Curr Osteoporos Rep**, v. 13, n. 5, p. 327-35, Oct 2015. ISSN 1544-1873.

KALAIVANAN, K.; PUGALENDI, K. V. Antihyperglycemic effect of the alcoholic seed extract of *Swietenia macrophylla* on streptozotocin-diabetic rats. **Pharmacognosy Res**, v. 3, n. 1, p. 67-71, Jan 2011. ISSN 0974-8490.

KAWAI, T.; URIST, M. R. Bovine tooth-derived bone morphogenetic protein. **J Dent Res**, v. 68, n. 6, p. 1069-74, Jun 1989. ISSN 0022-0345.

KAYAL, R. A. et al. Diabetes causes the accelerated loss of cartilage during fracture repair which is reversed by insulin treatment. **Bone**, v. 44, n. 2, p. 357-63, Feb 2009. ISSN 1873-2763.

TNF-alpha mediates diabetes-enhanced chondrocyte apoptosis during fracture healing and stimulates chondrocyte apoptosis through FOXO1. **J Bone Miner Res**, v. 25, n. 7, p. 1604-15, Jul 2010. ISSN 0884-0431.

Diminished bone formation during diabetic fracture healing is related to the premature resorption of cartilage associated with increased osteoclast activity. **J Bone Miner Res**, v. 22, n. 4, p. 560-8, Apr 2007. ISSN 0884-0431.

KEATING, J. F.; MCQUEEN, M. M. Substitutes for autologous bone graft in orthopaedic trauma. **J Bone Joint Surg Br**, v. 83, n. 1, p. 3-8, Jan 2001. ISSN 0301-620x.

KEATS, E.; KHAN, Z. A. Unique responses of stem cell-derived vascular endothelial and mesenchymal cells to high levels of glucose. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e38752, 2012. ISSN 1932-6203.

KHAN, T. S.; FRASER, L. A. Type 1 diabetes and osteoporosis: from molecular pathways to bone phenotype. **J Osteoporos**, v. 2015, p. 174186, 2015. ISSN 2090-8059.

KHAZAI, N. B.; BECK, G. R., JR.; UMPIERREZ, G. E. Diabetes and fractures: an overshadowed association. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v. 16, n. 6, p. 435-45, Dec 2009. ISSN 1752-296x.

KITAMI, S. et al. IL-17A suppresses the expression of bone resorption-related proteinases and osteoclast differentiation via IL-17RA or IL-17RC receptors in RAW264.7 cells. **Biochimie**, v. 92, n. 4, p. 398-404, Apr 2010. ISSN 0300-9084.

KOTAKE, S. et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. **J Clin Invest**, v. 103, n. 9, p. 1345-52, May 1999. ISSN 0021-9738.

KRAKAUER, J. C. et al. Bone loss and bone turnover in diabetes. **Diabetes**, v. 44, n. 7, p. 775-82, Jul 1995. ISSN 0012-1797.

KREBSBACH, P. H. et al. Repair of craniotomy defects using bone marrow stromal cells. **Transplantation**, v. 66, n. 10, p. 1272-8, Nov 27 1998. ISSN 0041-1337.

KUBOKI, Y. et al. BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis. **J Biomed Mater Res**, v. 39, n. 2, p. 190-9, Feb 1998. ISSN 0021-9304.

KUME, S. et al. Advanced glycation end-products attenuate human mesenchymal stem cells and prevent cognate differentiation into adipose tissue, cartilage, and bone. **J Bone Miner Res**, v. 20, n. 9, p. 1647-58, Sep 2005. ISSN 0884-0431.

LACEY, D. L. et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. **Cell**, v. 93, n. 2, p. 165-76, Apr 17 1998. ISSN 0092-8674.

LALLA, E. et al. Blockade of RAGE suppresses periodontitis-associated bone loss in diabetic mice. **J Clin Invest**, v. 105, n. 8, p. 1117-24, Apr 2000. ISSN 0021-9738.

LAMSTER, I. B.; KUNZEL, C.; LALLA, E. Diabetes mellitus and oral health care: time for the next step. In: (Ed.). **J Am Dent Assoc**. United States, v.143, 2012. p.208-10. ISBN 1943-4723 (Electronic)

0002-8177 (Linking).

LAURIE, S. W. et al. Donor-site morbidity after harvesting rib and iliac bone. **Plast Reconstr Surg**, v. 73, n. 6, p. 933-8, Jun 1984. ISSN 0032-1052.

LEE, N. K.; KARSENTY, G. Reciprocal regulation of bone and energy metabolism. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, v. 8, n. 4, p. 351, Oct-Dec 2008. ISSN 1108-7161.

LEE, N. K. et al. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. **Cell**, v. 130, n. 3, p. 456-69, Aug 10 2007. ISSN 0092-8674.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 216-26, Feb 2008. ISSN 0012-186x.

LI, Z. et al. Advanced glycation end products biphasically modulate bone resorption in osteoclast-like cells. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 310, n. 5, p. E355-66, Mar 1 2016. ISSN 0193-1849.

LIESE, A. D. et al. The burden of diabetes mellitus among US youth: prevalence estimates from the SEARCH for Diabetes in Youth Study. **Pediatrics**, v. 118, n. 4, p. 1510-8, Oct 2006. ISSN 0031-4005.

LIU, R. et al. Diabetes enhances periodontal bone loss through enhanced resorption and diminished bone formation. **J Dent Res**, v. 85, n. 6, p. 510-4, Jun 2006. ISSN 0022-0345.

LOUREIRO, M. B. et al. Low bone mineral density is associated to poor glycemic control and increased OPG expression in children and adolescents with type 1 diabetes. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 103, n. 3, p. 452-7, Mar 2014. ISSN 1872-8227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24529565> >.

LU, H. et al. Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation. **Endocrinology**, v. 144, n. 1, p. 346-52, Jan 2003. ISSN 0013-7227.

MACIEL, F. R. et al. Immunomodulation and nitric oxide restoration by a probiotic and its activity in gut and peritoneal macrophages in diabetic rats. **Clin Nutr**, Aug 4 2015. ISSN 0261-5614.

MANKIN, H. J. The changes in major limb reconstruction as a result of the development of allografts. **Chir Organi Mov**, v. 88, n. 2, p. 101-13, Apr-Jun 2003. ISSN 0009-4749.

MANOLAGAS, S. C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. **Endocr Rev**, v. 21, n. 2, p. 115-37, Apr 2000. ISSN 0163-769x.

MARDAS, N.; KOSTOPOULOS, L.; KARRING, T. Bone and suture regeneration in calvarial defects by e-PTFE-membranes and demineralized bone matrix and the impact on calvarial growth: an experimental study in the rat. **J Craniofac Surg**, v. 13, n. 3, p. 453-62; discussion 462-4, May 2002. ISSN 1049-2275.

MARTIN, L. M.; MCCABE, L. R. Type I diabetic bone phenotype is location but not gender dependent. **Histochem Cell Biol**, v. 128, n. 2, p. 125-33, Aug 2007. ISSN 0948-6143.

MCCARTHY, A. D. et al. Effects of advanced glycation end-products on the proliferation and differentiation of osteoblast-like cells. **Mol Cell Biochem**, v. 170, n. 1-2, p. 43-51, May 1997. ISSN 0300-8177.

MELTON, L. J., 3RD et al. A bone structural basis for fracture risk in diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 93, n. 12, p. 4804-9, Dec 2008. ISSN 0021-972x.

MENEGHETTI, I. C. **Efeito terapêutico do chá verde na morfologia das glândulas submandibulares de ratos com diabetes induzido pela estreptozotocina**. 2010. (Mestrado). Laboratório de Histologia, Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru.

MOTYL, K.; MCCABE, L. R. Streptozotocin, type I diabetes severity and bone. **Biol Proced Online**, v. 11, p. 296-315, 2009. ISSN 1480-9222.

MUSCHLER, G. F. et al. The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine. **Tissue Eng Part B Rev**, v. 16, n. 1, p. 123-45, Feb 2010. ISSN 1937-3368.

NEUMANN, T. et al. Clinical and endocrine correlates of circulating sclerostin levels in patients with type 1 diabetes mellitus. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 80, n. 5, p. 649-55, May 2014. ISSN 0300-0664.

NEVE, A.; CORRADO, A.; CANTATORE, F. P. Osteocalcin: skeletal and extra-skeletal effects. **J Cell Physiol**, v. 228, n. 6, p. 1149-53, Jun 2013. ISSN 0021-9541.

NGUYEN, H.; MORGAN, D. A.; FORWOOD, M. R. Sterilization of allograft bone: is 25 kGy the gold standard for gamma irradiation? **Cell Tissue Bank**, v. 8, n. 2, p. 81-91, 2007. ISSN 1389-9333.

NICODEMUS, K. K.; FOLSOM, A. R. Type 1 and type 2 diabetes and incident hip fractures in postmenopausal women. **Diabetes Care**, v. 24, n. 7, p. 1192-7, Jul 2001. ISSN 0149-5992.

NIIDA, S. et al. Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. **J Exp Med**, v. 190, n. 2, p. 293-8, Jul 19 1999. ISSN 0022-1007.

NOTSU, M. et al. Advanced glycation end product 3 (AGE3) suppresses the mineralization of mouse stromal ST2 cells and human mesenchymal stem cells by increasing TGF-beta expression and secretion. **Endocrinology**, v. 155, n. 7, p. 2402-10, Jul 2014. ISSN 0013-7227.

OGAWA, N. et al. 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**, v. 39, n. 12, p. 871-5, Dec 2007. ISSN 0018-5043.

OIKAWA, A. et al. Diabetes mellitus induces bone marrow microangiopathy. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 30, n. 3, p. 498-508, Mar 2010. ISSN 1079-5642.

Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. **Jama**, v. 285, n. 6, p. 785-95, Feb 14 2001. ISSN 0098-7484.

OZCAN, F. et al. Beneficial effect of myricetin on renal functions in streptozotocin-induced diabetes. **Clin Exp Med**, v. 12, n. 4, p. 265-72, Dec 2012. ISSN 1591-8890.

OZDEMIR, M. T.; KIR, M. C. Repair of long bone defects with demineralized bone matrix and autogenous bone composite. **Indian J Orthop**, v. 45, n. 3, p. 226-30, May 2011. ISSN 0019-5413.

PACIOS, S. et al. Bacterial infection increases periodontal bone loss in diabetic rats through enhanced apoptosis. **Am J Pathol**, v. 183, n. 6, p. 1928-35, Dec 2013. ISSN 0002-9440.

PARAJULI, A. et al. Bone's responses to mechanical loading are impaired in type 1 diabetes. **Bone**, v. 81, p. 152-60, Dec 2015. ISSN 1873-2763.

PARK, J. W. et al. Bone formation with various bone graft substitutes in critical-sized rat calvarial defect. **Clin Oral Implants Res**, v. 20, n. 4, p. 372-8, Apr 2009. ISSN 0905-7161.

PATEL, Z. S. et al. Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. **Bone**, v. 43, n. 5, p. 931-40, Nov 2008. ISSN 8756-3282.

PICTON, M. L. et al. Down-regulation of human osteoblast PTH/PTHrP receptor mRNA in end-stage renal failure. **Kidney Int**, v. 58, n. 4, p. 1440-9, Oct 2000. ISSN 0085-2538.

PINHAS-HAMIEL, O.; ZEITLER, P. The global spread of type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. **J Pediatr**, v. 146, n. 5, p. 693-700, May 2005. ISSN 0022-3476.

PINTO, J. G. S. et al. Autogenous bone graft x biomaterials in the treatment of facial fractures and deformities – a review of current concepts. **Revista da Faculdade de Odontologia - RFO - Universidade do Passo Fundo (UPF)**, v. 12, n. 3, p. 79-84, 2007.

POLYMERIS, A. D. et al. Effect of an oral glucose load on PTH, 250HD3, calcium, and phosphorus homeostasis in postmenopausal women. **Endocr Res**, v. 36, n. 2, p. 45-52, 2011. ISSN 0743-5800.

PORTAL-NUNEZ, S. et al. Alterations of the Wnt/beta-catenin pathway and its target genes for the N- and C-terminal domains of parathyroid hormone-related protein in bone from diabetic mice. **FEBS Lett**, v. 584, n. 14, p. 3095-100, Jul 16 2010. ISSN 0014-5793.

PRAEMER, A.; FURNER, S.; RICE, D. P. **Musculoskeletal conditions in the United States**. 1st. United States of America, Rosemont, IL: Amer Acad of Orthopaedic Surgeons, 1999. 182 ISBN 0892032340.

QI, H. et al. Identification of genes responsible for osteoblast differentiation from human mesodermal progenitor cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 6, p. 3305-10, Mar 18 2003. ISSN 0027-8424.

QU, Z. et al. Cell therapy for bone nonunion: a retrospective study. **Minerva Med**, v. 106, n. 6, p. 315-21, Dec 2015. ISSN 0026-4806.

RABIE, A. B.; CHAY, S. H.; WONG, A. M. Healing of autogenous intramembranous bone in the presence and absence of homologous demineralized intramembranous bone. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 117, n. 3, p. 288-97, Mar 2000. ISSN 0889-5406.

REDDI, A. H.; HUGGINS, C. Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 69, n. 6, p. 1601-5, Jun 1972. ISSN 0027-8424.

ROSA, C. V. et al. Supplementation with L-Glutamine and L-Alanyl-L-Glutamine Changes Biochemical Parameters and Jejunum Morphophysiology in Type 1 Diabetic Wistar Rats. **PLoS One**, v. 10, n. 12, p. e0143005, 2015. ISSN 1932-6203.

ROSENBLOOM, A. L.; SILVERSTEIN, J. H. Connective tissue and joint disease in diabetes mellitus. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 25, n. 2, p. 473-83, Jun 1996. ISSN 0889-8529.

RUSSELL, J. L.; BLOCK, J. E. Clinical utility of demineralized bone matrix for osseous defects, arthrodesis, and reconstruction: impact of processing techniques and study methodology. **Orthopedics**, v. 22, n. 5, p. 524-31; quiz 532-3, May 1999. ISSN 0147-7447.

SAHA, M. T. et al. Bone mass and structure in adolescents with type 1 diabetes compared to healthy peers. **Osteoporos Int**, v. 20, n. 8, p. 1401-6, Aug 2009. ISSN 0937-941x.

SAITO, M. et al. Role of collagen enzymatic and glycation induced cross-links as a determinant of bone quality in spontaneously diabetic WBN/Kob rats. **Osteoporos Int**, v. 17, n. 10, p. 1514-23, Oct 2006. ISSN 0937-941x.

SAITO, M.; MARUMO, K. Bone quality in diabetes. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 4, p. 72, 2013. ISSN 1664-2392.

SALTZMAN, B. M. et al. Humeral Head Reconstruction With Osteochondral Allograft Transplantation. **Arthroscopy**, v. 31, n. 9, p. 1827-34, Sep 2015. ISSN 0749-8063.

SANGUINETI, R. et al. Pentosidine effects on human osteoblasts in vitro. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1126, p. 166-72, Apr 2008. ISSN 0077-8923.

SANTANA, R. B. et al. A role for advanced glycation end products in diminished bone healing in type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 52, n. 6, p. 1502-10, Jun 2003. ISSN 0012-1797.

SANTOS, V. R. et al. Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand/osteoprotegerin ratio in sites of chronic periodontitis of subjects with poorly and well-controlled type 2 diabetes. **J Periodontol**, v. 81, n. 10, p. 1455-65, Oct 2010. ISSN 0022-3492.

SARIKAYA, B.; AYDIN, H. M. Collagen/Beta-Tricalcium Phosphate Based Synthetic Bone Grafts via Dehydrothermal Processing. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 576532, 2015.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. A simple instrument for achieving accurate alignment and pre-insertion stability with mandibular bone plates. **Plast Reconstr Surg**, v. 78, n. 6, p. 822-3, Dec 1986. ISSN 0032-1052.

SCHMITZ, J. P. et al. Characterization of rat calvarial nonunion defects. **Acta Anat (Basel)**, v. 138, n. 3, p. 185-92, 1990. ISSN 0001-5180.

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**, v. 30, n. 1, p. 70-4, Feb 2001. ISSN 0901-5027.

SILVA, J. A. et al. Periodontal disease-associated compensatory expression of osteoprotegerin is lost in type 1 diabetes mellitus and correlates with alveolar bone destruction by regulating osteoclastogenesis. **Cells Tissues Organs**, v. 196, n. 2, p. 137-50, 2012. ISSN 1422-6405.

SILVA, M. J. et al. Type 1 diabetes in young rats leads to progressive trabecular bone loss, cessation of cortical bone growth, and diminished whole bone strength and fatigue life. **J Bone Miner Res**, v. 24, n. 9, p. 1618-27, Sep 2009. ISSN 0884-0431.

SINGH, A. K. et al. Impaired integration of endothelial progenitor cells in capillaries of diabetic wounds is reversible with vascular endothelial growth factor infusion. **Transl Res**, v. 149, n. 5, p. 282-91, May 2007. ISSN 1931-5244.

SOLTESZ, G.; PATTERSON, C. C.; DAHLQUIST, G. Worldwide childhood type 1 diabetes incidence--what can we learn from epidemiology? **Pediatr Diabetes**, v. 8 Suppl 6, p. 6-14, Oct 2007. ISSN 1399-543x.

SPICER, P. P. et al. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. **Nat Protoc**, v. 7, n. 10, p. 1918-29, Oct 2012. ISSN 1750-2799.

STEVENS, M. M. Biomaterials for bone tissue engineering. **Materials Today**, v. 11, n. 5, p. 18-25, 5// 2008. ISSN 1369-7021. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369702108700865> >.

STEVENSON, S.; EMERY, S. E.; GOLDBERG, V. M. Factors affecting bone graft incorporation. **Clin Orthop Relat Res**, n. 324, p. 66-74, Mar 1996. ISSN 0009-921x.

STOLZING, A. et al. Diabetes induced changes in rat mesenchymal stem cells. **Cells Tissues Organs**, v. 191, n. 6, p. 453-65, 2010. ISSN 1422-6405.

STROTMEYER, E. S.; CAULEY, J. A. Diabetes mellitus, bone mineral density, and fracture risk. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v. 14, n. 6, p. 429-35, Dec 2007. ISSN 1752-296x.

SUDA, T.; TAKAHASHI, N.; MARTIN, T. J. Modulation of osteoclast differentiation. **Endocr Rev**, v. 13, n. 1, p. 66-80, Feb 1992. ISSN 0163-769x.

SUZUKI, K. et al. Osteoclastic function is accelerated in male patients with type 2 diabetes mellitus: the preventive role of osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin (OCIF/OPG) on the decrease of bone mineral density. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 68, n. 2, p. 117-25, May 2005. ISSN 0168-8227.

SZKUDELSKI, T.; SZKUDELSKA, K. Streptozotocin induces lipolysis in rat adipocytes in vitro. **Physiol Res**, v. 51, n. 3, p. 255-9, 2002. ISSN 0862-8408.

TAKIZAWA, M. et al. Increased bone resorption may play a crucial role in the occurrence of osteopenia in patients with type 2 diabetes: Possible involvement of accelerated polyol pathway in its pathogenesis. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 82, n. 1, p. 119-26, Oct 2008. ISSN 0168-8227.

TAMURA, T. et al. Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 24, p. 11924-8, Dec 15 1993. ISSN 0027-8424.

TANG, C. L. et al. Donor site morbidity following vascularized fibular grafting. **Microsurgery**, v. 18, n. 6, p. 383-6, 1998. ISSN 0738-1085.

TUOMINEN, J. T. et al. Bone mineral density in patients with type 1 and type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 22, n. 7, p. 1196-200, Jul 1999. ISSN 0149-5992.

URIST, M. R. The classic : a morphogenetic matrix for differentiation of bone tissue. **Clin Orthop Relat Res**, v. 467, n. 12, p. 3068-70, Dec 2009. ISSN 0009-921x.

URIST, M. R.; DAWSON, E. Intertransverse process fusion with the aid of chemosterilized autolyzed antigen-extracted allogeneic (AAA) bone. **Clin Orthop Relat Res**, n. 154, p. 97-113, Jan-Feb 1981. ISSN 0009-921x.

URIST, M. R. et al. Inductive substrates for bone formation. **Clin Orthop Relat Res**, v. 59, p. 59-96, Jul-Aug 1968. ISSN 0009-921x.

URIST, M. R.; MIKULSKI, A.; BOYD, S. D. A chemosterilized antigen-extracted autodigested alloimplant for bone banks. **Arch Surg**, v. 110, n. 4, p. 416-28, Apr 1975. ISSN 0004-0010.

URIST, M. R. et al. The bone induction principle. **Clin Orthop Relat Res**, v. 53, p. 243-83, Jul-Aug 1967. ISSN 0009-921x.

URIST, M. R.; STRATES, B. S. The classic: Bone morphogenetic protein. **Clin Orthop Relat Res**, v. 467, n. 12, p. 3051-62, Dec 2009. ISSN 0009-921x.

URURAHY, M. A. et al. Increased TLR2 expression in patients with type 1 diabetes: evidenced risk of microalbuminuria. **Pediatr Diabetes**, v. 13, n. 2, p. 147-54, Mar 2012. ISSN 1399-543x.

VAANANEN, H. K.; LAITALA-LEINONEN, T. Osteoclast lineage and function. **Arch Biochem Biophys**, v. 473, n. 2, p. 132-8, May 15 2008. ISSN 0003-9861.

VALCOURT, U. et al. Non-enzymatic glycation of bone collagen modifies osteoclastic activity and differentiation. **J Biol Chem**, v. 282, n. 8, p. 5691-703, Feb 23 2007. ISSN 0021-9258.

VEIDAL, S. S. et al. Procollagen type I N-terminal propeptide (PINP) is a marker for fibrogenesis in bile duct ligation-induced fibrosis in rats. **Fibrogenesis Tissue Repair**, v. 3, n. 1, p. 5, 2010. ISSN 1755-1536.

VERGANI, L. et al. Antioxidant defences and homeostasis of reactive oxygen species in different human mitochondrial DNA-depleted cell lines. **Eur J Biochem**, v. 271, n. 18, p. 3646-56, Sep 2004. ISSN 0014-2956.

VESTERGAARD, P.; REJNMARK, L.; MOSEKILDE, L. Relative fracture risk in patients with diabetes mellitus, and the impact of insulin and oral antidiabetic medication on relative fracture risk. **Diabetologia**, v. 48, n. 7, p. 1292-9, Jul 2005. ISSN 0012-186x.

VILLARINO, M. E. et al. Influence of short-term diabetes on osteocytic lacunae of alveolar bone. A histomorphometric study. **Acta Odontol Latinoam**, v. 19, n. 1, p. 23-8, 2006. ISSN 0326-4815.

WALSH, N. C. et al. Rheumatic diseases: the effects of inflammation on bone. **Immunol Rev**, v. 208, p. 228-51, Dec 2005. ISSN 0105-2896.

WANG, J.; GLIMCHER, M. J. Characterization of matrix-induced osteogenesis in rat calvarial bone defects: II. Origins of bone-forming cells. **Calcif Tissue Int**, v. 65, n. 6, p. 486-93, Dec 1999. ISSN 0171-967x.

WANG, Q. et al. Locally controlled delivery of TNFalpha antibody from a novel glucose-sensitive scaffold enhances alveolar bone healing in diabetic conditions. **J Control Release**, v. 206, p. 232-42, May 28 2015. ISSN 0168-3659.

WANG, Y. et al. All-trans retinoic acid prevents the development of type 1 diabetes by affecting the levels of interferon gamma and interleukin 4 in streptozotocin-induced murine diabetes model. **Genet Mol Res**, v. 15, n. 1, 2016. ISSN 1676-5680.

WANG, Y. J. et al. [Causes of death in STZ-induced rat models of diabetes mellitus]. **Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**, v. 45, n. 4, p. 691-5, Jul 2014. ISSN 1672-173x.

WEIBEL, E. R. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. **Int Rev Cytol**, v. 26, p. 235-302, 1969. ISSN 0074-7696.

WILD, S. et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p. 1047-53, May 2004. ISSN 0149-5992.

WITTRANT, Y. et al. High d(+)glucose concentration inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis. **Bone**, v. 42, n. 6, p. 1122-30, Jun 2008. ISSN 8756-3282.

WONGDEE, K.; CHAROENPHANDHU, N. Osteoporosis in diabetes mellitus: Possible cellular and molecular mechanisms. **World J Diabetes**, v. 2, n. 3, p. 41-8, Mar 15 2011. ISSN 1948-9358.

WOOD, R. A.; MEALEY, B. L. Histologic comparison of healing after tooth extraction with ridge preservation using mineralized versus demineralized freeze-dried bone allograft. **J Periodontol**, v. 83, n. 3, p. 329-36, Mar 2012. ISSN 0022-3492.

WU, Y. Y.; XIAO, E.; GRAVES, D. T. Diabetes mellitus related bone metabolism and periodontal disease. **Int J Oral Sci**, v. 7, n. 2, p. 63-72, Jun 2015. ISSN 1674-2818.

XING, D. G. et al. Effect of transplantation of marrow mesenchymal stem cells transfected with insulin-like growth factor-1 gene on fracture healing of rats with diabetes. **Bratisl Lek Listy**, v. 116, n. 1, p. 64-8, 2015. ISSN 0006-9248.

YAMAMOTO, M. Insights into bone fragility in diabetes: the crucial role of bone quality on skeletal strength. **Endocr J**, v. 62, n. 4, p. 299-308, 2015. ISSN 0918-8959.

YAN, W.; LI, X. Impact of diabetes and its treatments on skeletal diseases. **Front Med**, v. 7, n. 1, p. 81-90, Mar 2013. ISSN 2095-0217.

YASUDA, H. et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 7, p. 3597-602, Mar 31 1998. ISSN 0027-8424.

YASZEMSKI, M. J. et al. Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone. **Biomaterials**, v. 17, n. 2, p. 175-85, Jan 1996. ISSN 0142-9612.

YOUNGER, E. M.; CHAPMAN, M. W. Morbidity at bone graft donor sites. **J Orthop Trauma**, v. 3, n. 3, p. 192-5, 1989. ISSN 0890-5339.

ZAMBUZZI, W. F. et al. Rat subcutaneous tissue response to macrogranular porous anorganic bovine bone graft. **Braz Dent J**, v. 17, n. 4, p. 274-8, 2006. ISSN 0103-6440.

ZHANG, F. et al. Interleukin-17A induces cathepsin K and MMP-9 expression in osteoclasts via celecoxib-blocked prostaglandin E2 in osteoblasts. **Biochimie**, v. 93, n. 2, p. 296-305, Feb 2011. ISSN 0300-9084.

ZHANG, M.; POWERS, R. M., JR.; WOLFINBARGER, L., JR. Effect(s) of the demineralization process on the osteoinductivity of demineralized bone matrix. **J Periodontol**, v. 68, n. 11, p. 1085-92, Nov 1997. ISSN 0022-3492.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K. G.; SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 782-7, Dec 13 2001. ISSN 0028-0836.

APÊNDICES

APÊNDICES

Encontram-se em apêndices os valores morfométricos individuais de Volume total da região do enxerto (mm³), Densidade de volume (%) e Volume absoluto (mm³) de tecido ósseo, Densidade de volume (%) e N° total de osteoclastos, valores de imunomarcacão para as citocinas OPG, RANKL e TNF- α , assim como valores de glicemia e peso, para os grupos CTL COAG, CTL MAOD, DIAB COAG e DIAB MAOD, durante os períodos de 0, 7, 14, 21 e 42 dias.

APÊNDICE A – MORFOMETRIA IMUNOISTOQUIMICA

DIAB COAG - 7 DIAS			DIAB MAOD - 7 DIAS			CTL COAG - 7 DIAS			CTL MAOD - 7 DIAS		
IMUNO RANKL	IMUNO OPG	IMUNO TNFalfa	IMUNO RANKL	IMUNO OPG	IMUNO TNFalfa	IMUNO RANKL	IMUNO OPG	IMUNO TNFalfa	IMUNO RANKL	IMUNO OPG	IMUNO TNFalfa
128,42	155,34	120,09	56,41	40,60	101,07	116,88	139,53	34,40	57,69	80,77	21,15
8,25	28,63	61,32	42,52	113,03	121,15	79,27	82,26	38,25	50,21	168,16	73,72
106,84	62,82	135,47	72,86	126,28	161,75	147,01	151,07	35,47	48,93	75,43	58,12
135,26	95,73	124,36	66,03	107,26	136,11	49,57	54,91	43,80	77,35	133,55	61,32
114,74	142,52	113,46	87,61	93,59	114,74	124,57	78,21	59,62	61,54	200,64	76,50
DIAB COAG - 14 DIAS			DIAB MAOD - 14 DIAS			CTL COAG - 14 DIAS			CTL MAOD - 14 DIAS		
39,53	54,91	17,09	57,48	54,27	61,54	72,86	145,51	47,65	45,94	115,17	54,06
73,50	68,38	48,72	38,68	78,85	62,82	81,62	113,89	45,73	54,70	183,76	71,15
68,80	143,38	44,87	61,97	99,57	93,59	59,19	149,15	39,10	41,24	153,85	94,23
56,20	80,34	48,08	81,62	243,16	142,09	34,83	62,39	41,24	42,95	140,60	108,97
39,99	74,57	39,32	48,56	120,09	104,27	41,88	119,23	29,06	52,14	140,60	14,10
DIAB COAG - 21 DIAS			DIAB MAOD - 21 DIAS			CTL COAG - 21 DIAS			CTL MAOD - 21 DIAS		
27,78	81,84	39,32	57,48	135,47	99,36	41,24	144,44	57,69	38,68	77,35	28,63
27,99	45,73	79,06	38,68	170,73	113,46	81,20	153,63	23,93	34,19	64,74	43,38
52,14	65,60	55,34	61,97	106,84	54,27	35,26	43,80	26,28	26,92	101,71	36,32
67,74	70,30	38,25	81,62	86,54	88,25	36,75	132,05	26,92	18,16	67,09	4,70
64,10	76,71	55,77	68,38	59,40	132,26	11,32	33,12	8,12	25,85	45,94	30,98
DIAB COAG - 42 DIAS			DIAB MAOD - 42 DIAS			CTL COAG - 42 DIAS			CTL MAOD - 42 DIAS		
13,46	29,27	40,38	28,21	91,88	104,49	12,61	24,57	10,47	27,35	36,75	31,20
35,47	23,93	25,85	47,44	81,41	95,51	4,49	15,17	7,48	45,09	85,26	52,14
43,16	49,57	22,65	46,58	158,33	113,46	19,23	21,58	7,26	42,09	56,41	48,93
30,98	37,61	52,14	54,70	91,24	86,75	35,47	81,41	50,64	21,37	41,88	58,55
26,50	44,23	29,06	48,50	60,47	106,41	19,02	100,43	25,00	51,50	98,50	75,21

**APÊNDICE B - DENSIDADE DE VOLUME (%), VOLUME TOTAL (MM²) E
NÚMERO DE OSTEOCLASTOS**

		Nº OSTEO- CLASTO	% OSTEO- CLASTO	VOL. TOTAL ÁREA DEF.	% TEC. ÓSSEO	VOL. TOTAL. TEC. ÓSSEO
7 dias	DIAB COAG	0,00	0,00	20,95	0,93	0,19
7 dias	DIAB COAG	5,00	0,00	19,06	0,00	0,00
7 dias	DIAB COAG	1,00	0,04	20,64	1,14	0,24
7 dias	DIAB COAG	4,00	0,15	17,07	0,00	0,00
7 dias	DIAB COAG	4,00	0,04	23,98	0,00	0,00
7 dias	DIAB MAOD	28,00	0,13	90,14	0,00	0,18
7 dias	DIAB MAOD	-	0,00	50,02	0,00	0,00
7 dias	DIAB MAOD	26,00	0,14	92,56	0,00	0,00
7 dias	DIAB MAOD	13,00	0,03	54,72	0,00	0,10
7 dias	DIAB MAOD	18,00	0,18	71,86	0,00	0,07
7 dias	CTL COAG	0,00	0,00	24,84	4,92	1,22
7 dias	CTL COAG	2,00	0,03	23,33	9,29	2,17
7 dias	CTL COAG	5,00	0,04	23,44	6,22	1,46
7 dias	CTL COAG	2,00	0,00	22,11	8,12	1,79
7 dias	CTL COAG	3,00	0,35	27,94	11,71	3,27
7 dias	CTL MAOD	7,00	0,00	110,88	0,00	0,00
7 dias	CTL MAOD	39,00	0,02	138,38	0,23	0,32
7 dias	CTL MAOD	5,00	0,03	131,52	0,05	0,07
7 dias	CTL MAOD	15,00	0,00	83,07	0,66	0,55
7 dias	CTL MAOD	-	0,00	115,96	0,24	0,23

		Nº OSTEO- CLASTO	% OSTEO- CLASTO	VOL. TOTAL ÁREA DEF.	% TEC. ÓSSEO	VOL. TOTAL. TEC. ÓSSEO
14 dias	DIAB COAG	9,00	0,30	23,99	3,62	0,87
14 dias	DIAB COAG	5,00	0,13	24,96	6,69	1,67
14 dias	DIAB COAG	3,00	0,09	25,29	4,76	1,20
14 dias	DIAB COAG	10,00	0,37	23,60	12,46	2,94
14 dias	DIAB COAG	5,00	0,15	24,54	4,90	1,20
14 dias	DIAB MAOD	14,00	0,05	90,34	0,00	4,82
14 dias	DIAB MAOD	15,00	0,04	107,70	0,00	1,32
14 dias	DIAB MAOD	17,00	0,04	93,61	0,00	2,98
14 dias	DIAB MAOD	12,00	0,04	75,17	0,00	3,99
14 dias	DIAB MAOD	15,00	0,08	50,73	0,00	0,74
14 dias	CTL COAG	0,00	0,00	24,52	20,88	5,12
14 dias	CTL COAG	9,00	0,17	22,75	15,78	3,59
14 dias	CTL COAG	6,00	0,19	25,15	23,68	5,96
14 dias	CTL COAG	5,00	0,12	25,52	27,96	7,14
14 dias	CTL COAG	6,00	0,21	24,49	22,08	5,45
14 dias	CTL MAOD	55,00	0,10	135,68	2,87	3,89
14 dias	CTL MAOD	23,00	0,09	74,61	3,50	2,61
14 dias	CTL MAOD	13,00	0,05	92,10	5,21	4,80
14 dias	CTL MAOD	43,00	0,13	90,91	5,86	5,33
14 dias	CTL MAOD	23,00	0,06	74,25	3,04	2,26

		Nº OSTEO- CLASTO	% OSTEO- CLASTO	VOL. TOTAL ÁREA DEF.	% TEC. ÓSSEO	VOL. TOTAL. TEC. ÓSSEO
21 dias	DIAB COAG	5,00	0,21	28,79	16,56	4,77
21 dias	DIAB COAG	4,00	0,20	23,36	5,84	1,36
21 dias	DIAB COAG	3,00	0,10	20,32	8,61	1,75
21 dias	DIAB COAG	4,00	0,03	23,86	3,08	0,73
21 dias	DIAB COAG	3,00	0,06	20,97	8,02	1,68
21 dias	DIAB MAOD	8,00	0,12	38,77	0,02	6,17
21 dias	DIAB MAOD	26,00	0,18	45,26	0,28	5,28
21 dias	DIAB MAOD	11,00	0,03	37,65	0,44	6,65
21 dias	DIAB MAOD	7,00	0,05	60,46	0,10	5,04
21 dias	DIAB MAOD	10,00	0,08	72,98	0,19	5,70
21 dias	CTL COAG	3,00	0,06	22,70	25,52	5,79
21 dias	CTL COAG	2,00	0,11	21,00	18,18	3,82
21 dias	CTL COAG	2,00	0,07	24,96	22,75	5,68
21 dias	CTL COAG	6,00	0,04	24,79	35,63	8,83
21 dias	CTL COAG	7,00	0,03	24,47	26,58	6,50
21 dias	CTL MAOD	59,00	0,13	131,27	10,99	14,43
21 dias	CTL MAOD	44,00	0,13	119,99	11,15	13,38
21 dias	CTL MAOD	44,00	0,11	125,33	9,88	12,39
21 dias	CTL MAOD	51,00	0,15	130,20	8,84	11,51
21 dias	CTL MAOD	24,00	0,07	138,57	5,04	6,98

		Nº OSTEO- CLASTO	% OSTEO- CLASTO	VOL. TOTAL ÁREA DEF.	% TEC. ÓSSEO	VOL. TOTAL. TEC. ÓSSEO
42 dias	DIAB COAG	1,00	0,00	21,03	23,67	4,98
42 dias	DIAB COAG	0,00	0,00	22,23	7,12	1,58
42 dias	DIAB COAG	0,00	0,00	25,45	3,95	1,01
42 dias	DIAB COAG	2,00	0,03	25,57	34,04	8,70
42 dias	DIAB COAG	1,00	0,00	21,77	28,07	6,11
42 dias	DIAB MAOD	20,00	0,07	71,92	0,00	2,37
42 dias	DIAB MAOD	9,00	0,02	102,21	0,79	6,59
42 dias	DIAB MAOD	10,00	0,01	91,43	0,71	9,08
42 dias	DIAB MAOD	31,00	0,08	92,61	0,13	10,56
42 dias	DIAB MAOD	15,00	0,08	93,34	0,11	12,10
42 dias	CTL COAG	5,00	0,09	25,00	44,80	11,20
42 dias	CTL COAG	8,00	0,16	24,29	46,32	11,25
42 dias	CTL COAG	6,00	0,16	24,48	56,39	13,80
42 dias	CTL COAG	5,00	0,09	23,62	36,36	8,59
42 dias	CTL COAG	10,00	0,26	22,76	47,13	10,73
42 dias	CTL MAOD	50,00	0,22	93,08	22,54	20,98
42 dias	CTL MAOD	32,00	0,12	83,05	27,85	23,13
42 dias	CTL MAOD	53,00	0,18	89,88	24,17	21,72
42 dias	CTL MAOD	33,00	0,09	96,47	31,44	30,33
42 dias	CTL MAOD	71,00	0,21	118,51	27,22	32,25

APÊNDICE C - VALORES INICIAIS E FINAIS DE GLICEMIA E PESO

Médias de glicemia (mg/dl) e peso (g) antes das cirurgias (iniciais) e após os períodos pós-cirúrgicos obtidos durante o mestrado e o doutorado da aluna Bruna Barros Bighetti.

	CTL COAG			
Dias	Massa Inicial		MÉDIA	D. PADRÃO
0	234,333	357,000	295,667	86,74
7	285,167	358,240	321,703	51,67
14	322,667	348,500	335,583	18,27
21	294,000	367,310	330,655	51,84
42	244,000	390,310	317,155	103,46
	mestrado	doutorado		
Dias	Massa Final			
0	355,800	222,667	289,233	94,14
7	359,860	281,833	320,847	55,17
14	356,080	324,500	340,290	22,33
21	392,710	365,000	378,855	19,59
42	454,330	334,500	394,415	84,73
	mestrado	doutorado		
Dias	Glicemia Inicial			
0	84,000	79,667	81,833	3,06
7	90,400	83,000	86,700	5,23
14	83,800	98,500	91,150	10,39
21	83,600	90,167	86,883	4,64
42	68,000	89,833	78,917	15,44
	mestrado	doutorado		
Dias	Glicemia Final			
0	89,400	79,333	84,367	7,12
7	97,200	91,500	94,350	4,03
14	91,000	98,667	94,833	5,42
21	97,000	117,500	107,250	14,50
42	98,200	125,000	111,600	18,95
	mestrado	doutorado		

	CTL MAOD			
Dias	Massa Inicial		MÉDIA	D. PADRÃO
0	374,640	285,833	330,237	62,80
7	324,600	282,333	303,467	29,89
14	404,260	321,500	362,880	58,52
21	377,870	259,333	318,602	83,82
42	343,330	234,333	288,832	77,07
	mestrado	doutorado		
Dias	Massa Final			
0	363,990	376,500	370,245	8,85
7	340,020	326,833	333,427	9,32
14	379,630	330,333	354,982	34,86
21	414,850	251,500	333,175	115,51
42	400,830	222,667	311,748	125,98
	mestrado	doutorado		
Dias	Glicemia Inicial			
0	84,200	88,667	86,433	3,16
7	75,200	84,833	80,017	6,81
14	83,600	92,667	88,133	6,41
21	75,200	84,833	80,017	6,81
42	81,600	79,667	80,633	1,37
	mestrado	doutorado		
Dias	Glicemia Final			
0	83,800	112,333	98,067	20,18
7	86,800	125,500	106,150	27,37
14	90,800	83,333	87,067	5,28
21	95,600	81,167	88,383	10,21
42	88,200	79,333	83,767	6,27
	mestrado	doutorado		

	DIAB COAG			
Dias	Massa Inicial		MÉDIA	D. PADRÃO
0	260,000	205,000	232,500	38,89
7	278,000	216,833	247,417	43,25
14	346,800	227,833	287,317	84,12
21	332,600	201,500	267,050	92,70
42	339,800	212,667	276,233	89,90
	mestrado	doutorado		
Dias	Massa Final			
0	217,450	223,111	220,281	4,00
7	223,000	233,667	228,333	7,54
14	260,060	219,333	239,697	28,80
21	283,480	187,667	235,573	67,75
42	264,120	224,333	244,227	28,13
	mestrado	doutorado		
Dias	Glicemia Inicial			
0	323,600	434,667	379,133	78,54
7	388,200	416,333	402,267	19,89
14	258,400	415,333	336,867	110,97
21	294,600	444,333	369,467	105,88
42	288,200	434,667	361,433	103,57
	mestrado	doutorado		
Dias	Glicemia Final			
0	356,400	476,111	416,256	84,65
7	463,200	532,667	497,933	49,12
14	482,800	362,167	422,483	85,30
21	449,200	267,500	358,350	128,48
42	478,000	560,333	519,167	58,22
	mestrado	doutorado		

	DIAB MAOD			
Dias	Massa Inicial		MÉDIA	D. PADRÃO
0	256,400	189,333	222,867	47,42
7	287,800	216,167	251,983	50,65
14	315,600	232,167	273,883	59,00
21	312,000	208,333	260,167	73,30
42	275,200	212,667	243,933	44,22
	mestrado	doutorado		
Dias	Massa Final			
0	238,580	199,111	218,846	27,91
7	225,410	216,833	221,122	6,06
14	238,900	212,667	225,783	18,55
21	247,160	199,000	223,080	34,05
42	241,530	224,333	232,932	12,16
	mestrado	doutorado		
Dias	Glicemia Inicial			
0	306,600	463,000	384,800	110,59
7	324,000	369,167	346,583	31,94
14	279,200	378,500	328,850	70,22
21	377,200	498,667	437,933	85,89
42	361,600	434,667	398,133	51,67
	mestrado	doutorado		
Dias	Glicemia Final			
0	447,200	445,556	446,378	1,16
7	374,000	480,000	427,000	74,95
14	501,000	596,333	548,667	67,41
21	514,000	326,333	420,167	132,70
42	508,000	560,333	534,167	37,01
	mestrado	doutorado		

APÊNDICE D – RT-PRC

Expressão do RNAm para OPG			
CTL COAG			
7 dias	14 dias	21dias	42 dias
1,000000	0,896628	2,276805	3,481957
0,525685	2,043577	6,152972	8,150550
1,261196	3,643209	2,882083	5,151737
CTL MAOD			
7 dias	14 dias	21dias	42 dias
0,821192	-	0,628194	2,769242
0,872052	1,546990	1,443950	2,901689
0,658426	6,988423	1,248893	3,229551
DIAB COAG			
7 dias	14 dias	21dias	42 dias
0,734683	1,624568	0,872334	7,190405
0,931633	1,350905	2,179965	5,691802
1,185234	3,471812	7,663197	5,584707
DIAB MAOD			
7 dias	14 dias	21dias	42 dias
0,732752	0,397848	1,323441	2,122665
0,589886	0,350702	0,568640	4,138001
0,961387	0,377592	0,950840	3,280201

Expressão do RNAm para RANKL			
CTL COAG			
7 dias	14 dias	21dias	42 dias
1,000	2,508	1,256	0,586
1,734	1,169	1,854	2,457
0,546	1,773	1,722	1,493
CTL MAOD			
7 dias	14 dias	21dias	42 dias
15,660745	-	2,995485	1,131735
1,005253	2,269754	3,275322	1,562781
1,188120	1,945316	3,300463	2,218731
DIAB COAG			
7 dias	14 dias	21dias	42 dias
1,844585	3,056649	2,259242	1,647819
1,139924	2,743190	2,199456	4,407353
1,873242	3,490262	1,013800	2,479639
DIAB MAOD			
7 dias	14 dias	21dias	42 dias
2,756324	2,116265	3,499348	5,32917
2,422571	2,405576	4,142928	8,318756
2,393274	2,939208	2,449251	6,312301

Expressão do RNAm do TNF- α			
CTL COAG			
7 dias	14 dias	21dias	42 dias
1,000000	0,549827	1,590182	1,245057
0,521733	4,611407	2,395480	
1,622436	3,430513	2,752029	1,075019
CTL MAOD			
7 dias	14 dias	21dias	42 dias
		1,590182	1,704329
0,956491	0,656025	2,395480	1,623778
0,447054		2,752029	0,819010
DIAB COAG			
7 dias	14 dias	21dias	42 dias
0,976777	0,737142	0,861696	1,911584
1,393181	0,916357	1,631281	3,855665
0,899230	0,865914	2,399317	2,769753
DIAB MAOD			
7 dias	14 dias	21dias	42 dias
3,027009	1,4143	1,341	3,409641
0,724049	1,042965	0,723106	2,81577
1,809737	1,109233	0,860807	2,098353

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A - Ofício de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa - Mestrado

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais
Fone: (14)3235-8356
e-mail: mferrari@fob.usp.br

CEEPA-Proc. Nº 015/2009

Bauru, 1º de julho de 2009.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado *"Avaliação das citocinas VEGF, TNF- α , RANKL e OPG no reparo de defeito ósseo em calvária de ratos diabéticos tratados com Matriz Óssea Desmineralizada"*, de autoria de Bruna Barros Bigheti foi enviado ao relator para avaliação.

O parecer do Relator **aprovando** o projeto foi aceito *"ad referendum"* desta Comissão, considerando que não existem infrações éticas.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira

Vice-Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis

Docente do Departamento de Ciências Biológicas

ANEXO B - Ofício de Aprovação de Alteração do Título do Projeto de Pesquisa

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Fone: (14)3235-8356

e-mail: mferrari@fob.usp.br

CEEPA-Proc. Nº 015/2009

Bauru, 4 de abril de 2011.

Senhor Professor,

Em atenção à solicitação de alteração no título do projeto de pesquisa "**Avaliação das citocinas VEGF, TNF- α , RANKL e OPG no reparo de defeito ósseo em calvária de ratos diabéticos tratados com Matriz Óssea Desmineralizada**" de autoria de Bruna Barros Bighetti, sob sua orientação, para **AVALIAÇÃO DO REPARO DE DEFEITO ÓSSEO EM CALVÁRIA DE RATOS DIABÉTICOS TRATADOS COM MATRIZ ÓSSEA DESMINERALIZADA**, informamos a aprovação por esta Comissão, considerando não haver impedimentos éticos.

Atenciosamente,

• Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis
Docente do Departamento de Ciências Biológicas

ANEXO C - Ofício de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – Doutorado **Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru****Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais** **CEEPA-Proc. Nº 016/2012**

Bauru, 23 de maio de 2012.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Avaliação das citocinas TNF- α , RANKL e OPG e do número de osteoblastos no reparo de defeito ósseo em calvária de ratos diabéticos tratados com Matriz Óssea Desmineralizada**, de autoria de Bruna Barros Brighetti, sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação e considerado **APROVADO** "ad referendum" desta Comissão nesta data.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis
Docente do Departamento de Ciências Biológicas

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-101 – C.P. 73
e-mail: mferrari@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8356
<http://www.fob.usp.br>