

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**INFLUÊNCIA DO *DIABETES MELLITUS* NO PROCESSO DE REPARAÇÃO DE  
FRATURAS. ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

**SANDOVAL FELICÍSSIMO DINIZ**

**BRASÍLIA**

**2007**

**SANDOVAL FELICÍSSIMO DINIZ**

**INFLUÊNCIA DO *DIABETES MELLITUS* NO PROCESSO DE REPARAÇÃO DE  
FRATURAS. ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

Dissertação submetida ao Programa Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre.

**Área de concentração:** Medicina.

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Tarcília Aparecida da Silva.

**BRASÍLIA**

**2007**

# RELATÓRIO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO



## RELATÓRIO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Universidade de Brasília - UnB  
Decanato de Pesquisa e Pós-Graduação - DPP  
Secretaria de Administração Acadêmica - SAA

### M E S T R A D O

#### 1 - Identificação do Aluno

Nome	Sandoval Felicíssimo Diniz		Matrícula	05/52747
Curso	Ciências Médicas			
Área de Concentração	Mestrado em Ciências Médicas - Medicina	Código	7927	Departamento
				FMD

#### 2 - Sessão de Defesa de Dissertação

Título  
"Influência do diabetes Mellitus no processo de reparação de fraturas. Estudo experimental em ratos."

#### 3 - Comissão Examinadora

Nome	Função	Assinatura
Tarcília Aparecida Silva (Doutor)	Membro Externo vinculado ao programa (Presidente) Universidade Federal de Goiás	<i>Tarcília Ap Silva</i>
ANAMELIA LORENZETTI BOCCA (Doutor)	Membro Interno não vinculado ao programa Departamento de Biologia Celular	<i>Am Bocca</i>
FLORENCIO DE FIGUEIREDO CAVALCANTE NETO	Membro Interno vinculado ao programa Faculdade de Medicina	<i>Florencio Figueiredo</i>
JAIME MARTINS DE SANTANA (Doutor)	Membro Interno vinculado ao programa (Suplente) Departamento de Biologia Celular	

#### 4 - Resultado

A Comissão Examinadora, em 03/07/2007 após exame da Defesa de Dissertação e arguição do candidato, decidiu:

- Pela aprovação da Dissertação  
 Pela reprovação da Dissertação  
 Pela revisão de forma, indicando o prazo de 30 dias para apresentação definitiva.  
 Pela reformulação da Dissertação, indicando o prazo de \_\_\_\_\_ para nova versão.

#### Preencher somente em caso de revisão de forma:

- O aluno apresentou a revisão de forma e a Dissertação foi aprovada.  
 O aluno apresentou a revisão de forma e a Dissertação foi reprovada.  
 O aluno não apresentou a revisão de forma.

Autenticação  
Presidente da Comissão Examinadora

03, 07, 2007  
Data

*Tarcília Ap Silva*  
Assinatura/Carimbo

Autenticação  
Coordenador do Curso

Ciente  
Aluno

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Data Assinatura/Carimbo

03, 07, 2007 *Sandoval Felicissimo Diniz*  
Data Assinatura/Aluno

Este relatório não é conclusivo e não tem efeitos legais sem a aprovação do Decanato de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade de Brasília.

#### Aprovação do Decanato de Pesquisa e Pós-Graduação

Decisão:

Homologar

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Decano

Dedico este trabalho,  
aos meus filhos, expressão maior do meu amor e carinho;  
ao meu pai e minha mãe, exemplos de perseverança, os quais me ensinaram a não deixar de  
crer na vida e a construí-la com trabalho e engrandecê-la com decência.

## AGRADECIMENTOS

(PRIMEIRAMENTE A DEUS, POIS SEM A SUA PRESENÇA TUDO SE TORNA IMPOSSÍVEL).

Agradecemos a todos os que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste estudo, e especialmente as seguintes pessoas e instituições a que pertencem:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Tarcilia Aparecida da Silva que, com paciência e conhecimento, orientou todas as fases deste trabalho. Fica aqui registrado o meu testemunho de maior apreço e eterna gratidão.

Professores e residentes do Centro de Anatomia Patológica do Hospital Universitário de Brasília.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Anamelia Lorenzetti Bocca, do Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília.

Prof. Dr. Florêncio Figueiredo Cavalcante Neto, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

Prof. Dr. Leopoldo Luiz dos Santos Neto, Coordenador do Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas. Prof. Dr. Paulo Gonçalves de Oliveira, Diretor da Faculdade de Medicina da UnB.

Prof. Dr. Júlio Mário de Melo e Lima ( FUA Manaus-AM). Mestre e amigo, grande incentivador deste estudo.

João Vieira Lopes, médico cirurgião, amigo sincero e colega do Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas.

Às Senhoritas Edelyn Cristina e Renata Ribeiro de Souza, funcionárias do Laboratório de Cirurgia Experimental. Sr. José Tavares dos Santos, técnico responsável do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. Sras. Fernanda Guedes Amorim e Tarciane de Araújo, amigas e colegas do curso de Pós-graduação em Ciências Médicas, pelo trabalho conjunto desenvolvido no Laboratório de Cirurgia Experimental.

Tânia Regina de Almeida Muniz e Leila Avinte Correa, amigas sinceras e solidárias. Sr<sup>a</sup>. Valtelina Bailona Ribeiro, minha tia, pelo acolhimento e incentivo. Muito obrigado.

Também a Gislainy Jorge Mesquita, minha companheira, que soube ser compreensiva nesta árdua jornada pela busca do conhecimento.

## RESUMO

Com o objetivo de investigar o efeito do Diabetes induzido pela aloxana na consolidação de fratura óssea, produziu-se uma fratura fechada na tíbia esquerda de ratos Wistar, os quais foram divididos em dois grupos – controle e diabético. A análise histomorfométrica do sítio de fratura foi realizada nos períodos de 7, 14, 25 e 35 dias. Após 7 dias, os ratos diabéticos (GD) apresentaram menor formação de tecido ósseo ( $P=0,068$ ) e cartilaginoso ( $P=0,045$ ) e maior formação de tecido conjuntivo fibroso ( $P=0,006$ ) no local da fratura, em comparação ao grupo de controle (GC). Por outro lado, nos períodos de 14, 25 e 35 dias, observou-se no GD maior osteogênese ( $P=0,011$ ,  $P=0,010$ ;  $P=0,010$ , respectivamente para os períodos de 14, 25 e 35 dias), e condrogênese ( $P=0,028$ ;  $P=0,033$ ;  $P=0,019$ ) em relação ao GC. A análise radiográfica revelou fratura deslocada com alinhamento precário de fragmentos ósseos e atraso na consolidação das fraturas no GD. Os níveis séricos de fosfatase alcalina foram significativamente maiores no GD nos 14° ( $P=0,06$ ) e 25° ( $P=0,009$ ) dias em relação ao GC. Nossos resultados sugerem que a formação excessiva inicial de tecido conjuntivo fibroso nos animais diabéticos, associada ao atraso na condrogênese e osteogênese, pode não fornecer a estabilidade apropriada no local da fratura, contribuindo para um maior desvio dos fragmentos e aumento de volume do calo ósseo nos estágios finais de consolidação. Esse processo está possivelmente relacionado à necessidade de períodos maiores para remodelação e completa consolidação da fratura em indivíduos diabéticos.

Palavras-chave: Aloxano, Diabetes, Consolidação de Fraturas.

## ABSTRACT

To investigate the effect of alloxan on the course of bone fracture healing, a closed fracture was performed on the anatomical left tibia of rats that were either healthy or made diabetic by alloxan. Histomorphometric analysis of the fracture site was performed at 7, 14, 25 and 35 days. After 7 days, diabetic rats (db) had significantly less bone ( $P=0.068$ ) and cartilage ( $P=0.045$ ) and greater connective ( $P=0.006$ ) tissue formation at the fracture site compared to controls. In contrast, marked callus formation was seen in db with a greater osteogenesis ( $P=0.011$ ,  $P=0.010$ ;  $P=0.010$ , respectively for 14, 25 and 35 days) and chondrogenesis ( $P=0.028$ ;  $P=0.033$ ;  $P=0.019$ ) than controls. Radiographic analysis revealed displaced fracture with poor alignment of bone fragments and delayed consolidation at these periods in the db group. The levels of alkaline phosphatase (ALP) were significantly higher in db at 14 ( $P=0.06$ ) and 25 ( $P=0.009$ ) days. Results suggest that the initial excessive formation of fibrous connective tissue associated with delay in chondrogenesis and osteogenesis may not provide suitable stability of the fractured site, contributing to the inappropriate alignment of fragments and an increase in the volume of callus in the later stages. The resulting displaced fracture in diabetic rats requires long periods for remodeling and complete bone consolidation.

Key-words: Alloxan, Diabetes, Fracture Repair.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 - Procedimento para avaliação da glicemia. ....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 2 - Técnica de punção cardíaca. ....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 3 - Peça cirúrgica dissecada para análise microscópica.....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 4 - Médias do peso final dos animais. ....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 5 - Médias dos níveis de glicose. ....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 6 - Níveis de fosfatase alcalina.....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 7 - Correlação entre os níveis de fosfatase alcalina e formação de tecido ósseo...39</b>	
<b>Figura 8 - Aspecto radiográfico das fraturas nos diferentes períodos experimentais.....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 9 - Análise morfométrica. ....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 10 - Aspecto microscópico do calo ósseo.....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 11 - Aspecto microscópico do pâncreas sob efeito do aloxano. ....</b>	<b>44</b>

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1 - Grupo diabético (GD) .....</b>	<b>31</b>
<b>Quadro 2 - Grupo controle (GC).....</b>	<b>31</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGEs	Produtos finais de glicosilação avançada
BMP	Proteína óssea morfogenética
d/L	Decilitros
FA	Fosfatase alcalina
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FM	Faculdade de Medicina
g	Gramma
GC	Grupo controle
GD	Grupo diabético
GDCI	Grupo diabético controle interno
HE	Hematoxilina e Eosina
HUB	Hospital Universitário de Brasília
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGF	Fator de crescimento tipo insulina
IL	Interleucina
Kg	Kilograma
M	Molaridade
mg	Miligrama
mL	Mililitros
mm	Milímetro
mm <sup>2</sup>	Milímetro quadrado
°C	Grau Celsius
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PH	Potencial hidrogeniônico
PTH	Paratormônio
s	Segundos
TGF	Fator transformador do crescimento
TNF	Fator de necrose tumoral
UI	Unidades Internacionais
U/mL	Unidades/mL
UnB	Universidade de Brasília

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>iv</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE QUADROS .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1 <i>Diabetes Mellitus</i>.....</b>	<b>15</b>
3.1.1 Classificação .....	15
3.1.2 Diabetes Tipo 1 .....	15
3.1.3 Diabetes Tipo 2.....	16
<b>3.2 Diabetes Experimental.....</b>	<b>16</b>
<b>3.3 Metabolismo Ósseo Geral.....</b>	<b>18</b>
<b>3.4 Mecanismo de Consolidação das Fraturas .....</b>	<b>22</b>
<b>3.5 Processo de Consolidação de Fraturas e o <i>Diabetes Mellitus</i> .....</b>	<b>24</b>
3.5.1 Redução do suprimento sanguíneo e da angiogênese .....	25
3.5.2 Alteração na resposta inflamatória .....	25
3.5.3 Modificações na síntese de colágeno e no processo de mineralização.....	26
3.5.4 Desequilíbrio entre a reabsorção e a deposição óssea .....	26
3.5.5 Produtos finais de glicosilação avançada.....	27
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
<b>4.1 Aspectos Éticos .....</b>	<b>28</b>
<b>4.2 Animais de Experimentação .....</b>	<b>28</b>
<b>4.3 Indução do Diabetes.....</b>	<b>28</b>
<b>4.4 Determinação dos Grupos Experimentais .....</b>	<b>30</b>
<b>4.5 Seqüência das Etapas Experimentais.....</b>	<b>31</b>
4.5.1 Produção das fraturas.....	31
4.5.2 Análise histopatológica.....	32
4.5.3 Análise radiográfica .....	33

4.5.4 Análise bioquímica .....	34
4.5.5 Análise estatística .....	35
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>36</b>
<b>5.1 Modelo Experimental .....</b>	<b>36</b>
<b>5.2 Evolução Clínica.....</b>	<b>36</b>
<b>5.3 Avaliação do Peso.....</b>	<b>36</b>
<b>5.4 Avaliação da Glicemia .....</b>	<b>37</b>
<b>5.5 Avaliação dos Níveis Séricos de Paratormônio e Fosfatase Alcalina .....</b>	<b>38</b>
<b>5.6 Análise Radiográfica.....</b>	<b>40</b>
<b>5.7 Análise Morfológica e Morfométrica do Sítio de Fratura.....</b>	<b>41</b>
<b>5.8 Análise Microscópica do Pâncreas .....</b>	<b>43</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>51</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>60</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>61</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos 60 anos, a modificação no perfil demográfico da população brasileira constitui-se em relevante transformação social do século 20, conseqüência do processo de industrialização, o qual deslocou a população brasileira do campo para as grandes cidades. Atualmente, 80% da população vivem nas cidades e apenas 20% vivem no campo. Na década de 40, a proporção era de 70% no campo e apenas 30% nas cidades (IBGE, 2000).

Houve também uma redução da taxa de fecundidade e de mortalidade infantil, as quais, associadas a outros fatores, como os avanços tecnológicos da medicina e as campanhas de vacinação vertical, resultaram em aumento da expectativa de vida, segundo dados do último censo nacional do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2000). Em síntese, a população cresceu em uma escala menor, envelheceu e está habitando, predominantemente, nas cidades.

o processo de modernização, industrialização e a globalização das sociedades possibilitam o desenvolvimento de diferentes padrões de vida, disponibilidade de serviços e opções de alimentos que, associados ao sedentarismo, incrementam a obesidade e o surgimento de doenças decorrentes: as chamadas síndromes metabólicas, entre elas o *Diabetes Mellitus* (ZIMMET *et al.*, 2001).

O *Diabetes Mellitus* compreende uma desordem metabólica caracterizada por distúrbios no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos, resultante da deficiência absoluta ou relativa de insulina (DIB *et al.*, 1992). Dois transtornos assumem maior importância clínica: o Diabetes tipo 1 e o Diabetes tipo 2 que, embora tenham etiologias diferentes, compartilham de sintomas comuns e complicações similares, decorrentes da hiperglicemia. O Diabetes tipo 1 é uma doença auto-imune específica e resulta da falha do pâncreas em produzir insulina, como conseqüência da destruição das células beta-pancreáticas, produtoras deste hormônio, nas ilhotas de Langerhans (EXPERT COMMITTEE, 2002).

O Diabetes tipo 2 conhecida como doença da maturidade, pois a prevalência aumenta com o passar dos anos, representa cerca de 90% dos casos. Desses casos, a maior parte ocorre em pessoas obesas. Caracteriza-se pela diminuição da secreção de insulina e da sensibilidade tecidual a esse hormônio. Nos tempos modernos, as transformações no comportamento e estilo de vida têm proporcionado um aumento considerável da prevalência dessa forma da doença em todo o mundo (ZIMMET *et al.*, 2001).

---

Com prevalência maior nos países desenvolvidos e tendência de crescimento exponencial nos países em desenvolvimento, o *Diabetes Mellitus* assume características epidêmicas. Em uma projeção para o ano de 2025, o número de indivíduos portadores da doença no mundo será de 300 milhões, representando um aumento de 122% em relação ao ano de 1995, em que havia uma população de 135 milhões de portadores da doença. No Brasil, a previsão é que a população de diabéticos no ano de 2025 seja de 11,6 milhões, ocupando o oitavo lugar no *ranking* dos 10 países com população adulta mais acometida pela doença (KING *et al.*, 1998).

No Brasil, o *Diabetes Mellitus* é um problema de saúde pública, com importantes repercussões socioeconômicas, tanto para o indivíduo como para a sociedade. Seus custos estão relacionados principalmente com uma alta frequência de complicações agudas e crônicas, que são causas de hospitalização, incapacitações, perda de produtividade e morte prematura, ocupando a quarta causa de morte no Brasil (SDB, 2004). Aliado a isso, em estudo multicêntrico e populacional, realizado em nove capitais brasileiras, quase 50% dos diabéticos com diagnósticos confirmados desconheciam previamente a enfermidade e 20% dos que tinham conhecimento não faziam tratamento (MALERBI & FRANCO, 1992).

A associação entre o *Diabetes Mellitus* com alterações prejudiciais do tecido ósseo tem sido analisada em vários estudos clínicos e experimentais. LODER (1988), em estudo retrospectivo de 1972 a 1982 envolvendo 31 pacientes diabéticos, identificou retardo no processo de consolidação de fraturas em 70% dos casos. Estudos experimentais (MACEY *et al.*, 1989; BEAM *et al.*, 2002; FOLLAK *et al.*, 2004a; FOLLAK *et al.*, 2005) confirmam estes dados.

Diante dessa realidade, estudos experimentais têm sido empregados para compreender melhor os mecanismos fisiopatológicos envolvidos e suas complicações. O estudo seqüencial dos eventos envolvidos no reparo ósseo pode contribuir para melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos do *Diabetes Mellitus* e, potencialmente, na identificação de alvos de intervenção terapêutica e profilática. Dessa forma, este trabalho propõe o estudo experimental do processo de consolidação de fraturas fechadas em tíbias de ratos com Diabetes induzido pelo aloxano.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

- Avaliar a influência do Diabetes induzido pelo aloxano no processo de consolidação de fraturas fechadas em tibia de ratos.

### **2.2 Específicos**

- Realizar análise histomorfométrica nos períodos de 7, 14, 25 e 35 dias após a fratura, em animais controle e diabéticos;
- Quantificar os níveis séricos de glicose, fosfatase alcalina e paratormônio nos animais dos grupos controle e diabético, nos períodos de 7, 14, 25 e 35 dias após a fratura;
- Realizar análise radiográfica nos animais dos grupos controle e diabético, nos períodos de 14, 25 e 35 dias após a fratura.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 *Diabetes Mellitus*

##### 3.1.1 Classificação

Considerando-se aspectos clínicos e epidemiológicos, as duas formas mais importantes do Diabetes são: o Diabetes tipo 1 e o tipo 2. O tipo 2 tem sua importância etiológica baseada no meio ambiente e estilo de vida como fator preponderante; o tipo 1 é uma doença auto-imune e constitui principal forma de Diabetes diagnosticada na infância e na juventude. Em escala de menor importância, outras formas de Diabetes, ditas específicas, podem ocorrer. Fruto de uma diversidade etiológica, a doença pode surgir como consequência do alcoolismo, infecções no pâncreas exócrino, uso de medicamentos, doenças endócrinas e o Diabetes gestacional (DIB *et al.*, 1992; EXPERT COMMITTEE, 2002).

##### 3.1.2 Diabetes Tipo 1

FERNANDES *et al.* (2005), em uma contextualização dos fatores imunogenéticos associados ao Diabetes do tipo 1 descreveram os mecanismos pelos quais determinados fatores imunogenéticos conferem susceptibilidade para o desencadeamento da doença. Agentes ambientais como infecções virais, especialmente enterovírus, em particular *Coxsackie B*, estão associados com o processo auto-imune de lesão das células beta. Mecanismos imunológicos tanto celulares como humorais têm sido relatados na patogenia do Diabetes tipo 1. Em relação aos mecanismos celulares, destaca-se a participação de linfócitos T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>). Os linfócitos B e as células apresentadoras de antígenos como macrófagos e células dendríticas constituem os primeiros tipos celulares a se infiltrarem nas ilhotas de Langerhans, promovendo a insulinite. Entre os mecanismos humorais, destaca-se a participação de auto-anticorpos específicos para antígenos das ilhotas pancreáticas. Assim, em uma ação sinérgica, macrófagos, linfócitos T-CD4<sup>+</sup> e linfócitos T-CD8<sup>+</sup> atuam na destruição das células beta-pancreáticas.

### 3.1.3 Diabetes Tipo 2

Essa forma de Diabetes vem da associação de forte predisposição familiar e genética com o estilo de vida e os fatores ambientais (ZIMMET *et al.*, 2001). A maior parte dos pacientes é obesa e de pacientes que não preenchem os critérios para obesidade pelo índice de massa corporal, porém apresentam aumento de gordura predominantemente na região abdominal (EXPERT COMMITTEE, 2002). Caracteriza-se por apresentar resistência à ação da insulina, que pode preceder o início do quadro clínico, e uma deficiência relativa de insulina, a qual se acentua com o decorrer dos anos de evolução da doença (OLIVEIRA & MILECH, 2004). O aumento da gordura intra-abdominal ou visceral é uma causa conhecida de insulino-resistência e, com o passar do tempo, costuma agregar no seu portador fatores de risco para a doença cardiovascular, como hipertensão arterial, dislipidemia, microalbuminúria e fatores favorecedores da coagulação e trombose (DIB *et al.*, 2002; OLIVEIRA & MILECH, 2004).

### 3.2 Diabetes Experimental

Vários estudos têm sido realizados na tentativa de elucidar os diferentes efeitos deletérios do Diabetes no organismo e como revertê-los por meio de tratamento e dieta.

O Diabetes pode ser induzido em animais por vários mecanismos: estresse, infecções virais, toxinas ou manipulações, como pancreatectomia; lesões do sistema nervoso central; uso de hormônios anti-insulínicos; exposição à hidrocortisona (Hormônio Adenocorticotrófico) e o uso de agentes químicos beta-citotóxicos (LERCO *et al.*, 2003).

Entre os agentes químicos, os mais empregados são o aloxano e a estreptozotocina (LUKENS, 1948; GOODMAN, 1987). Ambos destroem as células beta, do pâncreas endócrino, produtoras de insulina; todavia, mantêm intacto o pâncreas exócrino produtor das enzimas digestivas (KATSUMATA *et al.*, 1992; SZKUDELSKI, 2001). A estreptozotocina, no entanto, tem a desvantagem do alto custo (LERCO *et al.*, 2003).

Em humanos, a estreptozotocina é utilizada para o tratamento do carcinoma das ilhotas pancreáticas que cursam com hiperglicemia (GOODMAN, 1987).

O Diabetes também pode ocorrer na forma espontânea. Alguns estudos documentam experimentos em roedores com essa forma de Diabetes, como no rato Wistar chinês (BB), nos camundongos C57BL/ksj homozigotos diabéticos (db/db) e nos

camundongos diabéticos não-obesos (NOD) (KIKUTANI & MAKINO, 1992).

A ação diabetogênica do aloxano caracteriza-se pela produção de radicais livres que são tóxicos, especificamente para as células beta, do pâncreas, levando à degeneração e morte definitiva das mesmas (GRANKVIST *et al.*, 1981). Essa citotoxicidade seletiva do aloxano é devido à grande capacidade da célula beta em acumular a droga, aliada ao fato de esta célula demonstrar uma maior sensibilidade aos radicais peróxidos, quando comparada a outros tipos celulares (JÖRNS *et al.*, 1999). Estudos documentam a eficácia do aloxano em modelos animais para estudo do *Diabetes Mellitus*. (LUKENS, 1948; LOCATTO *et al.*, 1993; SZKUDELSKI, 2001).

Essa droga foi descoberta por Woehler em 1838, por intermédio da oxidação do ácido úrico, e sua ação diabetogênica foi descoberta por Dunn em 1943 quando estudava os efeitos do ácido úrico e seus derivados na produção de lesão renal em coelhos. Depois da indução, verificou-se que freqüentemente ocorria a morte dos animais do primeiro ao quinto dia por uremia (oligúria/anúria), albuminúria e hematúria associada ao Diabetes. Em ratos, a persistência do Diabetes nos animais remanescentes, isto é, que sobreviveram após a indução, podia perdurar de 2 a 8 meses (LUKENS, 1948).

Segundo LUKENS (1948), em extensa revisão da literatura a respeito da ação do aloxano sobre animais de várias espécies, incluindo o rato, o cão, o coelho, o macaco, o gato, os índices de mortalidade relacionados ao uso da droga podem variar de 33% e 100%, na mesma espécie. Esta variabilidade pode estar ligada a múltiplos fatores capazes de modificar os efeitos da droga e a sensibilidade do hospedeiro, envolvendo desde o estado de hidratação, a velocidade de infusão, a via de administração, o tempo de jejum, o peso do animal e até a utilização de substâncias tais como: os barbitúricos, que tornam os animais mais sensíveis à ação da droga; e o ácido nicotínico, o qual protege os animais de seus efeitos quando administrados simultaneamente.

Quanto às vias de administração da droga, a via endovenosa tem sido a de escolha na maioria das espécies animais. Contudo, quando essa via for utilizada, a velocidade de infusão é importante. Doses efetivas de aloxano não produzem Diabetes se as mesmas são injetadas muito lentamente. As vias subcutâneas e intraperitonal também são consideradas satisfatórias no rato (LERCO *et al.*, 2003). Por outro lado, a via oral é usualmente insatisfatória, muito embora o Diabetes possa ser produzido em ratos e coelhos se a droga for rapidamente ingerida com alimento, após um jejum prolongado (LUKENS, 1948).

Quanto ao peso dos animais, este apresenta importância na susceptibilidade do animal aos efeitos tóxicos do aloxano, sendo que a toxicidade da droga altera-se numa relação

linear com o peso do animal, aumentando 0,73 poderes de toxicidade para cada unidade de peso, fato esse importante para cálculo da dose letal (LUKENS, 1948).

O jejum também tem um papel importante em relação à ação da droga, pois o índice de conversão em animais diabéticos após a indução aumenta quanto mais prolongado for o tempo de jejum, podendo chegar a 95% de conversão após indução com jejum prévio de 48 a 60 horas. A administração de uma dose similar de aloxano, quando o jejum não foi observado, diminui essa resposta para menos de 25% (LERCO *et al.*, 2003).

A dose de aloxano para indução do Diabetes é variável e depende também da via de administração. Diversos trabalhos apresentam essa variação como o estudo realizado por LUKENS (1948), que indica a dose única de 42 mg/kg de aloxano diluído em solução aquosa a 5% após 12 horas de jejum por via endovenosa.

DERIVI *et al.* (2002) demonstraram a eficácia do uso de dose única de 40 mg/kg de aloxano diluído em solução salina a 2% após jejum alimentar de 24 horas por via endovenosa com injeção na veia peniana.

Por outro lado, LERCO *et al.* (2003) sugerem o uso de dose única de 42 mg/kg de aloxano diluído em solução aquosa a 2% após jejum alimentar de 12 horas por via endovenosa. Vale ressaltar que a aplicação da droga via endovenosa ocorreu em uma das veias da cauda do rato, sendo que, antes da injeção, o animal foi colocado durante 10 minutos no interior de uma caixa aquecida com lâmpada elétrica, o que proporcionou um grau de vasodilatação evidente.

Há ainda a indicação de MAZZANTI *et al.* (2003) e SCHOSSLER *et al.* (2004), os quais preconizam o uso de dose única de 150 mg/kg de aloxano diluído a 2% em solução de citrato de sódio após jejum de 24 horas por via intraperitoneal.

CARVALHO *et al.* (2003) utilizaram dose única de 40 mg/kg de aloxano diluído a 2% em solução salina com jejum prévio de 48 horas por via endovenosa com injeção na veia peniana. Utilizando essa metodologia, os autores obtiveram um índice de aproveitamento de 40% dos animais tratados, 40% dos animais morreram na primeira semana, provavelmente de cetoacidose diabética e os 20% restantes não se tornaram diabéticos.

### 3.3 Metabolismo Ósseo Geral

O tecido ósseo é um sistema complexo, dinâmico e em constante equilíbrio entre formação e reabsorção. O osso desempenha função vital na produção de células sanguíneas e

reservatório de cálcio e fósforo do organismo. Estruturalmente, protege as vísceras e serve de alavanca para os movimentos. A parte orgânica do osso é formada por células e matriz protéica e a parte inorgânica, formada pelos minerais, estas partes representam respectivamente 30% e 70% da estrutura óssea (NETTER, 1990).

Aproximadamente 90% da parte orgânica do osso encontram-se na forma de colágeno, e os 10% restantes do material orgânico não-colagênico são constituídos por fosfolipídios, glicoproteínas e proteoglicanos. O colágeno predominante em ossos e tendões é do tipo 1 (NETTER, 1990). Entre as proteínas não-colagênicas do osso temos: a osteocalcina, a sialoproteína óssea e a proteína óssea morfogenética (BMP). A parte mineral consiste principalmente em um análogo de hidroxiapatita, rica em carbonato, que se denomina apatita óssea e pequenas quantidades de sódio, magnésio e potássio (URIST *et al.*, 1983; NETTER, 1990).

As células formadoras de osso incluem as células osteoprogenitoras, osteoblastos e os osteócitos. A geração e o estímulo dessas células são regulados por citocinas e fatores de crescimento, como as BMPs, fator de crescimento derivado de fibroblastos (FGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento tipo insulina (IGF) e fator transformador do crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (URIST *et al.*, 1983; KUMAR *et al.*, 2005). As células osteoprogenitoras são células-tronco mesenquimais pluripotentes localizadas na vizinhança de todas as superfícies ósseas. Quando estimuladas de forma apropriada por fatores de crescimento, estas células sofrem divisão celular e produzem descendentes que se diferenciam em osteoblastos (DUCY *et al.*, 2000; KUMAR *et al.*, 2005). Os osteoblastos são células unicelulares que sintetizam os componentes da matriz orgânica. Estas células são capazes de concentrar fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz. Os osteoblastos dispõem-se sempre nas superfícies ósseas, lado a lado, em um arranjo que lembra um epitélio simples. Eles possuem prolongamentos citoplasmáticos que se prendem aos dos osteoblastos vizinhos. Quando um osteoblasto é envolvido pela matriz, recém-sintetizada, este passa a ser chamado de osteócito. Dessa forma, osteoblastos e osteócitos representam as mesmas células em estágios funcionais diferentes (DUCY *et al.*, 2000; KUMAR *et al.*, 2005).

O osteoclasto é a célula responsável pela reabsorção óssea. Possui de 6 a 12 núcleos, é derivado das células progenitoras hematopoiéticas, as quais também dão origem aos monócitos e macrófagos. As citocinas e os fatores de crescimento cruciais para a diferenciação e a maturação dos osteoclastos em humanos incluem a interleucina (IL) -1, IL-3, IL-6, IL-11, fator de necrose tumoral (TNF), fator estimulante de colônia de granulócitos-macrófagos (CSF-GM), entre outros. Esses fatores atuam pela estimulação das células

progenitoras de osteoclastos ou participando em um sistema parácrino, no qual os osteoblastos e as células do estroma da medula óssea desempenham um papel central (KUMAR *et al.*, 2005; TEITELBAUM, 2007).

A reabsorção óssea ocorre por meio da secreção de ácidos, colagenases e outras enzimas que digerem a matriz óssea. É importante destacar que o equilíbrio de metabolismo ósseo depende essencialmente de um delicado balanço entre a formação e reabsorção óssea, processo fisiológico que chamamos de remodelamento ósseo. As células que controlam diretamente o remodelamento são os osteoclastos e osteoblastos, responsáveis pela reabsorção e formação óssea, respectivamente (SUDA *et al.*, 1992; DUCY *et al.*, 2000; KUMAR *et al.*, 2005; TEITELBAUM, 2007).

Os marcadores bioquímicos mais importantes do metabolismo ósseo são a osteocalcina e a fosfatase alcalina (marcadores de formação), os quais refletem a atividade dos osteoblastos, e as piridinolinas e os telopeptídeos carboxi e amino terminais (marcadores de reabsorção), que refletem a atividade dos osteoclastos (VIEIRA, 1999). A osteocalcina é uma proteína não-colagênica derivada dos osteoblastos e está envolvida na mineralização da matriz. A osteocalcina pode ser utilizada como um marcador sérico sensível e específico para a atividade osteoblástica (VIEIRA, 1999; KUMAR *et al.*, 2005). A fosfatase alcalina é uma enzima codificada pelo gene, tecido não específico, A1P, localizado no cromossomo 1. A isoenzima óssea é um peptídeo de 507 aminoácidos, cuja seqüência é exatamente igual à da isoenzima hepática; a diferença entre elas se dá na glicosilação. Em condições normais, as duas formas predominantes em circulação (>90% do total) de fosfatase alcalina são a óssea e a hepática em quantidades equivalentes (VIEIRA, 1999; KUMAR *et al.*, 2005).

Vários hormônios atuam sobre o metabolismo ósseo. Entre esses, de maneira geral, os hormônios tireoideanos exercem um efeito positivo na reabsorção óssea, e os hormônios sexuais um efeito negativo. Os glicocorticóides exercem efeito negativo na formação, porém os hormônios de crescimento e a insulina exercem um efeito positivo. Todavia, a ação direta no equilíbrio mineral é mantida por três hormônios principais Paratormônio (PTH), vitamina D e calcitonina (SUDA *et al.*, 1992; BODY, 2002; KUMAR *et al.*, 2005; HAMANN & LANE, 2006).

O PTH é um hormônio com 84 aminoácidos sintetizado nas glândulas paratireóides de ação hipercalcemiante que é secretado em resposta às concentrações baixas de cálcio ionizado (livre de ligação protéica). Tais concentrações de cálcio são detectadas por um receptor sensor presente nas células das paratireóides, que uma vez ativado pelo cálcio impede a secreção de PTH, ou na presença de baixa concentração de cálcio deixa de inibir a

liberação do PTH, permitindo sua secreção à corrente sanguínea. A ação do PTH se faz diretamente no rim e no osso e indiretamente sobre o intestino, elevando o fluxo de cálcio para a circulação (GRACITELLI *et al.*, 2002; HAMANN & LANE, 2006).

Os efeitos biológicos conhecidos do PTH se fazem por meio de um receptor de membrana acoplado à proteína G, que compartilha com o PTH *related protein* (PTHrp), denominado receptor PTH/PTH rp tipo I (PRPI). As ações do PTH sobre a formação e reabsorção ósseas têm sido intensamente estudadas, enquanto novos aspectos sobre sua ligação com o receptor e as vias de sinalização intracelular nos osteoblastos têm sido descritos. Receptores de PTH foram também identificados nos osteoblastos e seus precursores (GOLTZMAN, 1999; GRACITELLI *et al.*, 2002; HAMANN & LANE, 2006).

Recentemente, identificou-se a presença de receptores para o PTH também nos osteoclastos, evidenciando a ação direta desse hormônio também nessas células. Neste estudo, os autores demonstraram que duas formas regulatórias do PTH atuam sobre os osteoclastos, através de receptores diretos e indiretamente via osteoblastos (DEMPSTER *et al.*, 2005).

De uma forma global, o PTH induz as células estromais à expressão de genes relacionados a vários fatores de crescimento, incluindo o IGF-I, IGF-II e TGF- $\beta$ . Esses fatores de crescimento agem recrutando células pre-osteoblásticas e induzindo sua diferenciação e maturação em osteoblastos maduros (GOLTZMAN, 1999).

A calcitonina é um hormônio de ação contrária ao PTH, produzida principalmente nas células parafoliculares C da tireóide. O papel principal da calcitonina é proteger o esqueleto da perda excessiva de cálcio durante períodos de *turnover* alto, como crescimento, gestação e lactação. A calcitonina age através de receptores específicos presentes nos osteoclastos, inibindo a reabsorção óssea. A possibilidade de a calcitonina contribuir para maior quantidade de tecido ósseo neoformado, tem sido atribuída à inibição da atividade osteoclástica (BODY, 2002).

Entretanto, a importância da calcitonina como hormônio regulador da homeostase de cálcio é ainda controversa. Assim, pacientes com carcinoma medular de tireóide, uma condição clínica geralmente associada com níveis muitos altos de calcitonina, não apresentam hipocalcemia. Por outro lado, existem situações de hipercalcemia severas que não estão necessariamente associadas com altos níveis circulantes de calcitonina (KOCHI, *et al.*, 1998).

A principal ação do metabólito ativo da vitamina D, é contribuir para manter níveis séricos e extracelulares de cálcio constantes. Sua ação mais estabelecida é a estimulação do transporte ativo do cálcio da luz do duodeno para o sangue. A vitamina D aumenta a absorção de fósforo pelo intestino. Quando ocorre uma diminuição no fosfato

sérico, há um aumento na síntese de vitamina D, gerando aumento na absorção deste íon (HAUSSLER & McCAIN, 1977).

Especificamente no tecido ósseo, a vitamina D é importante tanto na formação como na reabsorção. Na manutenção da massa óssea, a vitamina D permite a mineralização óssea normal, participa da maturação do colágeno e da matriz extracelular, aumenta a síntese osteoblástica de proteínas não-colágênicas (osteocalcina, osteopontina) e estimula a atividade fosfatase alcalina (HAUSSLER & McCAIN, 1977). Além disso, incrementa a síntese do colágeno pelos osteoblastos e regula os efeitos de IGF-I sobre o osso. Em condições fisiológicas, este metabólito potencializa a ação do PTH (HAMANN & LANE, 2006).

A vitamina D ainda atua como potente estimulador da reabsorção óssea, por intermédio do aumento da atividade e da quantidade de osteoclastos, conforme estudos documentados *in vivo* (SUDA *et al.*, 1992). Estudos *in vitro* demonstraram a sua atuação sobre a diferenciação e fusão dos precursores dos osteoclastos, uma demonstração da presença de receptores específicos para o metabólito ativo da vitamina D nestas células (HAMANN & LANE, 2006).

### 3.4 Mecanismo de Consolidação das Fraturas

A formação óssea pode ocorrer em áreas ocupadas tanto por tecido conjuntivo como por tecido cartilaginoso. O processo de ossificação que ocorre a partir de tecido conjuntivo é denominado de intramembranosa e o tecido ósseo resultante se denomina osso membranoso. A maioria dos ossos da calota craniana, ossos faciais, clavícula e mandíbula é formada por esse processo. Todos os outros ossos do corpo se formam por intermédio de um modelo cartilaginoso, que são os núcleos de ossificação que trazemos durante o nascimento, os quais são substituídos gradualmente por tecido ósseo. O processo de ossificação é denominado endocondral e os ossos são chamados de cartilagosos. Os termos osso cartilaginoso e osso membranoso descrevem meramente o ambiente em que se forma um osso e não altera a estrutura, uma vez formada (NETTER, 1990). O processo de reparo de fraturas envolve tanto o modelo intramembranoso como o endocondral (CAPLAN, 1987; EINHORN, 1998).

O reparo ósseo é um processo altamente regulado que pode ser separado em estágios microscópicos, bioquímicos e biomecânicos superpostos. A seqüência de estágios é desencadeada por uma série de interações e comunicações entre as diversas células e proteínas

localizadas na zona de cura (EINHORN, 1998; KUMAR *et al.*, 2005).

O processo de consolidação óssea pode ser dividido em três fases: formação do calo de tecido mole, calo ósseo propriamente dito e remodelação. A fratura óssea causa sangramento nas extremidades ósseas e tecidos moles vizinhos; o coágulo se forma com rapidez e se observa o início de uma reação inflamatória caracterizada pelo aumento da rede capilar, exsudação de plasma e de leucócitos e posterior limpeza de tecidos necróticos nas extremidades. O hematoma fraturário é importante, porque serve de suporte para a migração e proliferação celular (EINHORN, 1998; KUMAR *et al.*, 2005).

A proliferação celular inicia-se aproximadamente 8 horas após a fratura e alcança a sua atividade máxima em torno de 24 horas. Essa proliferação ocorre em torno do perióstio e tecidos vizinhos, com produção de células indiferenciadas pluripotenciais e substância fundamental, formando-se, assim, um novo tecido conjuntivo. Durante essa fase, os elementos relativos aos tecidos locais se comunicam continuamente entre si (efeito parácrino). Nessa fase, células inflamatórias secretam citocinas, tais como IL-1 e IL-6, que são importantes na regulação dos eventos iniciais do processo de reparo das fraturas. A produção de fatores de crescimento, tais como TGF- $\beta$  e PDGF participa na regulação e diferenciação de células mesenquimais e na proliferação vascular (EINHORN, 1995; EINHORN, 1998). Assim, no final da primeira semana, o hematoma se organiza, os tecidos adjacentes estão sendo modulados para a futura produção de matriz e as extremidades fraturadas dos ossos sofrem remodelação. Este tecido não-mineralizado é chamado calo de tecido mole ou pró-calo (KUMAR *et al.*, 2005).

Subseqüentemente, as células osteoprogenitoras ativadas depositam trabéculas sub-periosteais de osso que se orientam perpendicularmente ao eixo cortical e dentro da cavidade medular. A formação de osso intramembranoso a partir do perióstio inicia-se imediatamente após a fratura (EINHORN, 1998). Em alguns casos, as células mesenquimais ativadas nos tecidos moles e no osso ao redor da linha de fratura também se diferenciam em condroblastos que formam fibrocartilagem e cartilagem hialina. Esta posteriormente sofre ossificação endocondral similar ao que ocorre na placa de crescimento, que constitui o modelo cartilaginoso no processo de reparação das fraturas (NETTER, 1990; EINHORN, 1995; KUMAR *et al.*, 2005).

Após a formação do calo ósseo, inicia-se o período de remodelação, que é um período mais prolongado que devolve ao osso sua forma, estrutura e resistência originais. Essa etapa envolve processos simultâneos de reabsorção e deposição óssea, acompanhados também pela formação de novos vasos. Os osteoclastos invadem e reabsorvem o calo, propiciando a

neoformação vascular. A formação de novos vasos facilita a migração de células precursoras osteoblásticas e a conseqüente deposição de osso (EINHORN, 1995; EINHORN, 1998; KUMAR *et al.*, 2005).

A cura de uma fratura é um processo muito peculiar, já que pode alcançar a reparação *ad integrum* do tecido lesionado. O processo de remodelação óssea pode levar anos e obviamente varia de acordo com a idade do indivíduo. A reparação *ad integrum* do tecido ósseo pode ser completa em crianças, quase completa em adolescentes, porém nunca se completa nos adultos, principalmente nas fraturas que se consolidam com certo grau de desvio (NETTER, 1990).

O processo de consolidação de fratura pode ser correlacionado à formação do esqueleto embrionário, uma vez que as populações celulares envolvidas são semelhantes histomorfologicamente. Nesse caso, o processo de reparo de fratura recapitula parcial ou completamente o processo de formação do osso fetal (CAPLAN, 1987).

### **3.5 Processo de Consolidação de Fraturas e o *Diabetes Mellitus***

A associação entre o *Diabetes Mellitus* com alterações prejudiciais do tecido ósseo tem sido analisada em vários estudos clínicos envolvendo fraturas e cirurgias ortopédicas. Na prática clínica, tem sido verificado retardo de consolidação e ocorrência de pseudoartrose em fraturas de pacientes diabéticos. LODER (1988), realizou um estudo retrospectivo de 1972 a 1982 envolvendo 31 pacientes diabéticos, sendo 21 pacientes portadores de Diabetes do tipo 1 e 10 do tipo 2 com fratura de membro inferior. O autor identificou retardo no processo de consolidação em 70% dos casos.

PAPA *et al.* (1993), em um estudo retrospectivo de cirurgias de artrodese (fusão cirúrgica de uma articulação) em pé e tornozelo, efetuadas em pacientes diabéticos portadores de artropatia neuropática, obtiveram um índice de pseudoartrose de 34%. Em decorrência do alto risco de complicações nesses pacientes, os autores chamam atenção para outras possíveis formas de tratamento dessa doença como moldes de gesso e órtesis. Na população em geral, as técnicas atuais para artrodese do tornozelo obtêm fusão em cerca de 80 a 90% dos pacientes (CRENSHAW, 1996). Estudos experimentais (MACEY *et al.*, 1989; BEAM *et al.*, 2002; FOLLAK *et al.*, 2004a; FOLLAK *et al.*, 2005) confirmam o atraso no reparo ósseo relacionado com o Diabetes. Entretanto, estes mesmos trabalhos, bem como estudos clínicos (HJORTRUP *et al.*, 1985), têm demonstrado que a doença diabética controlada pela terapia

com insulina não interfere com o processo de reparo ósseo.

Vários mecanismos foram propostos para explicar a maior incidência do retardo de consolidação e a não-consolidação de fraturas em diabéticos, os quais serão descritos a seguir.

### 3.5.1 Redução do suprimento sanguíneo e da angiogênese

A microcirculação é constituída de uma monocamada de células, o endotélio, envolvidas por membrana basal, as quais exercem importante função reguladora de fluxo a nível regional, permitindo trocas nutritivas adequadas em todos os tecidos. Essa regulação se faz basicamente pela célula endotelial, através da liberação de várias substâncias com função constritora, como as endotelinas e o tromboxano A<sub>2</sub>, ou relaxadora, como o óxido nítrico, as prostaciclina e as citocinas. A liberação dessas substâncias em resposta a estímulos fisiológicos está alterada no Diabetes, caracterizando uma disfunção endotelial (DIB *et al.*, 1992; OLIVEIRA & MILECH, 2004).

TYNDALL *et al.* (2003), em estudos com ratos BB Wistar espontaneamente diabéticos, demonstraram a importância de fatores angiogênicos tais como o PDGF no processo inicial de consolidação de fraturas. Assim, fraturas produzidas no fêmur foram analisadas na primeira fase da consolidação. Estudos imuno-histoquímicos demonstraram uma diminuição desse fator nos animais diabéticos em relação aos controles. Observou-se, ainda, diminuição na taxa de proliferação de células com potencial osteogênico. Esses resultados sugerem que interferência da doença diabética nos estágios iniciais de consolidação das fraturas pode estar associada à diminuição na expressão de PDGF.

### 3.5.2 Alteração na resposta inflamatória

Como mencionado anteriormente, o processo de consolidação de uma fratura envolve uma fase inicial, também chamada de fase inflamatória, durante a qual a formação do infiltrado inflamatório é passo fundamental. Esse processo é controlado por mediadores químicos, sendo que alterações na expressão dessas moléculas podem repercutir na migração de células para o foco de fratura, influenciando, dessa forma, nas etapas subsequentes do processo de consolidação óssea.

GRAVES *et al.* (2005) observaram aumento da expressão de mediadores

inflamatórios em ratos CD-1 que se tornaram diabéticos pelo tratamento com estreptozotocina e ratos db/db, que desenvolvem espontaneamente o Diabetes tipo 1, em estudo comparativo com ratos normoglicêmicos. Verificou-se uma resposta inflamatória mais prolongada em ambos os animais diabéticos pela ação das quimiocinas proteína quimiotática de macrófagos (MCP)-1 e proteína inflamatória do macrófago (MIP)-2 que atraem macrófagos e células polimorfonucleares, como também estimulam a liberação de TNF. Resultados similares foram obtidos por WETZLER *et al.* (2000) e LU *et al.* (2004).

### 3.5.3 Modificações na síntese de colágeno e no processo de mineralização

GOOCH *et al.* (2000) demonstraram alteração na expressão de RNA mensageiro para colágenos tipo II e tipo X, com hipotrofia e retardo na maturação de condrócitos, sugerindo que as alterações na expressão do colágeno e maturação dos condrócitos são mecanismos responsáveis pelo atraso na consolidação de fraturas em diabéticos. Estudos de TOPPING *et al.* (1994) também demonstram diminuição na síntese de colágeno tipo X em torno do 14º dia nos sítios de fratura em ratos diabéticos.

Ratos com Diabetes induzido pela estreptozotocina apresentaram diminuição na produção de colágeno em torno de 15 a 50% e diminuição da população de condrócitos em torno de 40% entre o 4º e 11º dia após a fratura (MACEY *et al.*, 1989).

Ratos espontaneamente diabéticos apresentaram, com base na histomorfometria do osso, nas primeiras quatro semanas após a fratura, distúrbios severos de mineralização bem como atraso na diferenciação celular e menor força mecânica do calo ósseo (FOLLAK *et al.*, 2003; FOLLAK *et al.*, 2004a; FOLLAK *et al.*, 2004b, FOLLAK *et al.*, 2005).

### 3.5.4 Desequilíbrio entre a reabsorção e a deposição óssea

Em estudo realizado em humanos, SUZUKI *et al.* (2005), por meio de marcadores de atividade osteoclástica na circulação sugeriram maior atividade osteoclástica em pacientes diabéticos. Além disto, HE *et al.* (2004) demonstraram números relativamente mais elevados de osteoblastos apoptóticos no tecido ósseo de animais diabéticos em relação aos animais do grupo controle.

### 3.5.5 Produtos finais de glicosilação avançada

Um dos mecanismos postulados para a deficiência no processo de consolidação de fraturas em diabéticos é a incorporação de glicose às proteínas da matriz extracelular (BISHARA *et al.*, 2002). Essa via de incorporação da glicose independe de um mecanismo enzimático de caráter fisiológico que, geralmente, é referido como glicosilação não-enzimática de proteínas e parece ser mais significativo em proteínas que possuem longo período de atividade biológica como, por exemplo, o colágeno (REDDY *et al.*, 2002). A glicosilação ocorre como resultado da interação do açúcar com um grupo amino na molécula da proteína. Este produto origina compostos estáveis denominados produtos finais de glicosilação avançada (AGEs) que desencadeiam ligações cruzadas entre moléculas do colágeno (MENTINK *et al.*, 2002). O acúmulo desses produtos pela sua capacidade de alterar as propriedades físico-químicas das proteínas, incluindo enzimas e membranas celulares alteram os mecanismos de indução e sinalização celular (INOUYE *et al.*, 1999).

Produtos finais de glicosilação avançada, presente em altos níveis nos indivíduos diabéticos, aumentam os quadros inflamatórios (NEUMANN *et al.*, 1999) e retardam o processo de cicatrização (GOOVA *et al.*, 2001).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Aspectos Éticos

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB). O projeto foi submetido à aprovação do Comitê de Ética no Uso Animal, do Instituto de Ciências Biológicas da UnB, processo UnB/Doc. n° 27287/05 (Anexo A).

### 4.2 Animais de Experimentação

Foram utilizados ratos, linhagem Wistar, *Rattus norvegicus albinus*, machos, com peso corporal inicial entre 215,36 e 376,73 gramas (diabéticos), 280,89 e 393,33 gramas (controle), com aproximadamente 112 dias de vida. Os animais, fornecidos pela empresa Bioagri Laboratórios Ltda., foram alojados no Biotério da Faculdade de Medicina da UnB, em ambiente com 12 horas de luz e 12 horas de escuro e temperatura em torno de 28 °C. Os animais foram alimentados com ração LabinaR (Purina Nutrimentos Ltda, São José dos Campos, SP, Brazil) e água à vontade. Antes do início do experimento, os animais passaram por um período de 10 dias de adaptação no Laboratório de Cirurgia Experimental, sob supervisão de um médico veterinário.

### 4.3 Indução do Diabetes

Para indução do Diabetes, após um período de jejum de 30 horas, administrou-se aloxano 2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), diluído em solução de cloreto de sódio 0,9% na dose de 150 mg/kg/peso, via intraperitoneal em dose única, conforme previamente descrito (CARVALHO *et al.*, 2003; MAZZANTI *et al.*, 2003). Previamente à indução, os animais foram submetidos a uma avaliação dos níveis de glicose plasmática empregando-se amostras colhidas na cauda. Os níveis de glicose foram medidos por meio de um glucômetro Accu-Chek Advantage (Boehringer Mannheim, IN, USA) (Figura 1).

Quatro horas após a administração da droga, os animais tiveram livre acesso à

alimentação. Posteriormente, 6 horas após, foi fornecida uma solução de glicose a 10% como única fonte hídrica, durante 24 horas, para evitar uma hipoglicemia fatal, devido à liberação maciça de insulina que ocorre após a destruição das células beta do pâncreas (MAZZANTI *et al.*, 2003).

Ao final do sétimo dia após a indução, os animais foram submetidos a outra avaliação da glicose plasmática pelo mesmo método descrito previamente, após jejum de 6 horas. Os animais que apresentaram uma glicemia superior a 200 mg/dl foram considerados diabéticos (CARVALHO *et al.*, 2003) e selecionados para o experimento, uma vez que os níveis de glicose sérica, considerados normais em *Rattus norvegicus albinus*, variam de 50 a 135 mg/100 mL (HARKNESS & WAGNER, 1993).



**Figura 1 - Procedimento para avaliação da glicemia.**

(A) Coleta de amostras de sangue da cauda do animal. (B) Glucômetro e glicofita utilizados para dosagem de glicose. (C) Glicofita com amostra de sangue de animal do grupo controle. (D) Glicofita com amostra de sangue de animal do grupo diabético.

#### 4.4 Determinação dos Grupos Experimentais

Para fins de avaliação do processo de consolidação de fraturas nas suas diferentes fases evolutivas, foram utilizados 44 animais divididos em dois grupos: controle (GC n= 20) e diabético (GD n= 24). A distribuição dos animais em subgrupos foi realizada por alocação probabilística empregando-se sorteio simples sem reposição. Os animais foram individualmente identificados por meio de marcas correspondentes a uma letra do alfabeto, variando de 1 a 6, ou seja, de A até F, para os diabéticos. O grupo controle foi marcado de 1 a

5, ou seja, de A até E. Cada grupo foi dividido em 4 subgrupos numerados de 1 a 4, devidamente identificados nas gaiolas, os quais representam diferentes períodos experimentais, respectivamente, 7, 14, 25 e 35 dias após a fratura. Os animais do grupo diabético (Quadro 1) foram alocados em 4 caixas com 6 animais em cada e os animais do grupo controle em 4 caixas com 5 animais (Quadro 2).

**Quadro 1 - Grupo diabético (GD)**

Subgrupos	1	2	3	4
ANIMAIS	A	A	A	A
	B	B	B	B
	C	C	C	C
	D	D	D	D
	E	E	E	E
	F	F	F	F

Fonte: Elaborado pelo autor.

**Quadro 2 - Grupo controle (GC)**

Subgrupos	1	2	3	4
ANIMAIS	A	A	A	A
	B	B	B	B
	C	C	C	C
	D	D	D	D
	E	E	E	E

Fonte: Elaborado pelo autor.

## 4.5 Seqüência das Etapas Experimentais

### 4.5.1 Produção das fraturas

Os animais foram anestesiados utilizando-se cloridrato de cetamina (Laboratórios Pfizer Ltda., São Paulo, SP, Brazil) na dose de 40 mg/kg/peso associado à xilazina (Virbax® 2%, Virbac do Brasil, Jurubatuba, SP, Brazil) na dose de 5 mg/kg/ peso, injeção intramuscular na face medial da coxa direita do animal. Foram considerados anestesiados os animais que

apresentavam respiração regular, com flacidez de musculatura esquelética e ausência de reflexos.

Foram produzidas fraturas no terço médio das tíbias esquerdas dos ratos de forma manual com 3 pontos de apoio na diáfise, semelhantes quanto ao traço e sem exposição ao meio externo, por um único pesquisador. Com evidência clínica da fratura, isto é, mobilidade no foco; após recuperação anestésica, os animais foram recolocados nas caixas previamente identificadas, com água e ração à vontade.

Após períodos de 7, 14, 25 e 35 dias, os animais foram sacrificados utilizando-se cetamina (Laboratórios Pfizer Ltda.) na dose de 50mg/kg/peso associada à xilasina (Virbax® 2%, Virbac do Brasil) na dose de 10 mg/kg/peso, via intraperitoneal. Nesse momento procedeu-se à punção cardíaca para coleta de sangue (Figura 2).



**Figura 2 - Técnica de punção cardíaca.**

#### 4.5.2 Análise histopatológica

Empregando-se um osteótomo, procedeu-se à osteotomia no terço proximal da tíbia e desarticulação no nível do tornozelo. A tíbia foi dissecada, mantendo-se o invólucro muscular ao redor do foco de fratura (Figura 3). O instrumental cirúrgico utilizado durante esse procedimento foi desinfetado utilizando-se solução de glutaraldeído a 2% durante 30 minutos.

Os espécimes obtidos foram fixados em solução de formalina (10% formaldeído 37%, 0,65%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,2). Inicialmente, as amostras foram lavadas em água corrente e

desmineralizadas em ácido nítrico 1% por 24 horas. Em seguida, as peças foram novamente lavadas em água corrente, desidratadas em banhos de álcool a 70%, 80%, 90% e 100%, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. O material foi seccionado em micrótomo RM2125RT (Leica, Heerbrugg, St. Gallen, Switzerland) obtendo-se cortes consecutivos de 5 µm, os quais foram corados pela Hematoxilina & Eosina (HE).

Secções verticais do sítio de fratura foram analisadas em microscópio óptico Axioskop 40 (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) adaptado a uma câmara digital (PowerShot A620, Canon, Tokyo, Japan). Procedeu-se à análise histomorfométrica avaliando-se a área total do calo ósseo e distinguindo-se as áreas de tecido fibroso, tecido cartilaginoso e tecido ósseo neoformado. Para tal análise, empregou-se o programa Image J (*National Institutes of Health, USA*).

Dois animais do grupo controle e 2 animais de cada subgrupo experimental foram submetidos à laparotomia para coleta do pâncreas com o objetivo de avaliar possíveis alterações provocadas na porção endócrina do órgão pelo aloxano.



**Figura 3 - Peça cirúrgica dissecada para análise microscópica.**

A identificação com tinta nanquim orienta a disposição para inclusão na parafina.

#### 4.5.3 Análise radiográfica

Os exames radiográficos foram realizados no Laboratório de Biomateriais da Faculdade de Ciências da Saúde da UnB e processados no setor de Radiologia da Clínica de Odontologia do Hospital Universitário de Brasília.

Para o estudo radiográfico do calo ósseo, foram obtidas radiografias de dois animais de cada sub-grupo nos períodos de 14, 25 e 35 dias após a fratura. As radiografias foram realizadas empregando-se filme oclusal 10-4 (Kodak) em aparelho Spectro (Dabi-Atlante, Ribeirão Preto, São Paulo). Foi utilizada incidência lateral, mantendo-se 20 cm de distância do cone ao objeto. O tempo de exposição foi de 0,5 segundos.

#### 4.5.4 Análise bioquímica

As amostras de sangue foram coletadas dos animais por punção cardíaca em tubos contendo gel de separação conforme as normas padrão H3-A3 e H1-A3 do *National Committee for Clinical Standards* (NCCLS), adotadas pelo setor de Bioquímica do Laboratório de Patologia do Hospital Universitário de Brasília.

As dosagens bioquímicas de glicose e fosfatase alcalina de todas as amostras foram realizadas por espectrofotometria no aparelho automatizado Konelab (Wiener Lab, Rosário, Argentina). Para dosagem de glicose, foi empregado o método da glicose-oxidase-peroxidase. A glicose é oxidada pela enzima glicose-oxidase a gliconolactona e peróxido de hidrogênio que, associado a formol e 4-aminoantipirina sob ação da peroxidase, origina a quinonimina, a qual é medida espectrofotometricamente. Para a dosagem da fosfatase alcalina foi empregado o método cinético de p-nitrofenil. Os monoésteres do ácido fosfórico se hidrolisam a p-nitrofenilfosfato, que não tem cor, produzindo fosfato e p-nitrofenol em pH alcalino. A velocidade de formação do p-nitrofenilfolato, que é amarelo, é proporcional à atividade da enzima presente na amostra de soro.

A dosagem de paratormônio foi realizada em aparelho automatizado Immulite 2000 (DPC Medlab Produtos Médico-Hospitalares Ltda, Brasília, DF, Brazil) pelo método de quimioluminescência. Esse método é uma reação de antígeno e anticorpo, marcada com fosfatase alcalina. Essa reação hidrolisa o substrato quimioluminescente gerando um produto instável que, depois de ser estabilizado, gera a emissão de fótons de luz, os quais são amplificados e medidos por um fotomultiplicador, que tem a função de transformar a luz emitida pelos fótons em impulsos elétricos. Esses impulsos são lidos em contagens de luz por segundo e convertido em unidades internacionais (UI).

#### 4.5.5 Análise estatística

Os dados quantitativos deste estudo foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Para análise dos dados não-paramétricos, foi aplicado o teste não paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa *Statistical Package Social for Sciences*™ (SPSS Inc. Chicago, IL, USA), versão 13.

---

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Modelo Experimental

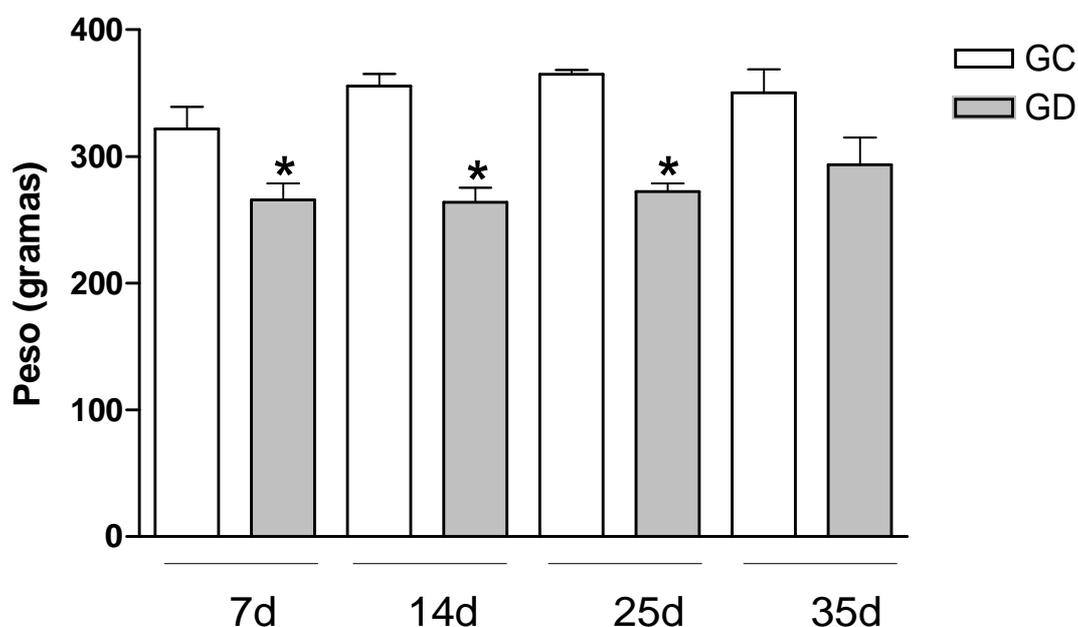
O modelo experimental mostrou-se adequado ao estudo proposto. A produção manual da fratura da tíbia, por flexão forçada, por um único pesquisador, possibilitou obter uma similaridade quanto ao traço e localização.

### 5.2 Evolução Clínica

No processo de indução do Diabetes utilizando aloxano, a maioria dos animais, 91%, sobreviveu e, desse grupo, 43% se tornaram hiperglicêmicos. Durante o período experimental, dois animais do grupo controle (animal GC3d e GC4e) morreram de causa não identificada, com aproximadamente 19 e 20 semanas de vida.

### 5.3 Avaliação do Peso

Avaliando o peso final nas 4 fases do período experimental (7, 14, 25 e 35 dias) verificou-se que o uso do aloxano afetou de modo significativo o peso corporal dos animais diabéticos em relação aos animais do grupo controle nos períodos de 7, 14 e 25 dias ( $P < 0,05$ ). No entanto, para os animais do 35º dia, onde, pelo maior tempo decorrido com a doença diabética, esperava-se um maior declínio do peso corporal, contudo isso não ocorreu (Figura 4).



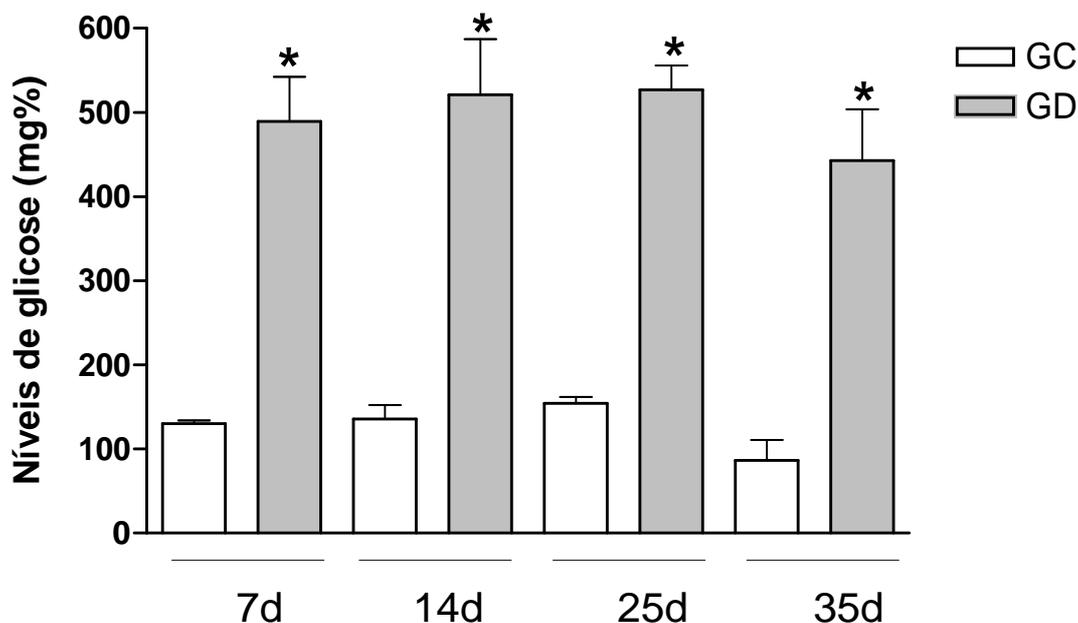
**Figura 4 - Médias do peso final dos animais.**

O peso dos animais do grupo controle (GC) e diabético (GD) foi avaliado nos diferentes períodos experimentais. (\*) Indicam diferenças significativas, valores de  $P < 0,05$ , em relação ao respectivo GC.

#### 5.4 Avaliação da Glicemia

Os níveis de glicose sanguínea foram significativamente maiores nos ratos diabéticos em comparação com os animais do grupo controle em todos os períodos experimentais ( $P < 0,05$ ) (Figura 5). Nos animais do primeiro período (7º dia), o grupo diabético obteve uma média de glicemia de 489,3 mg% e os animais controle uma média de 130,2 mg% ( $P < 0,05$ ). No 14º dia, a média de glicemia no grupo diabético foi de 521,0 mg % e no grupo controle 151,5 mg%. Nos animais do 25º dia, o grupo diabético apresentou média de glicemia igual a 527,0 mg%, enquanto os animais do grupo controle apresentaram média de 154,5mg%. Finalmente, no 35º dia, o grupo diabético apresentou média de glicemia de 442,5 mg% e os animais do grupo controle média igual a 86,75 mg% (Figura 5).

Em relação aos animais diabéticos do controle interno, estes apresentaram média de glicemia de 500,6 mg%



**Figura 5 - Médias dos níveis de glicose.**

A glicemia foi avaliada nos animais do grupo controle (GC) e diabético (GD) nos diferentes períodos experimentais. (\*) Indicam diferenças significativas, valores de  $P < 0,05$ , em relação ao respectivo GC.

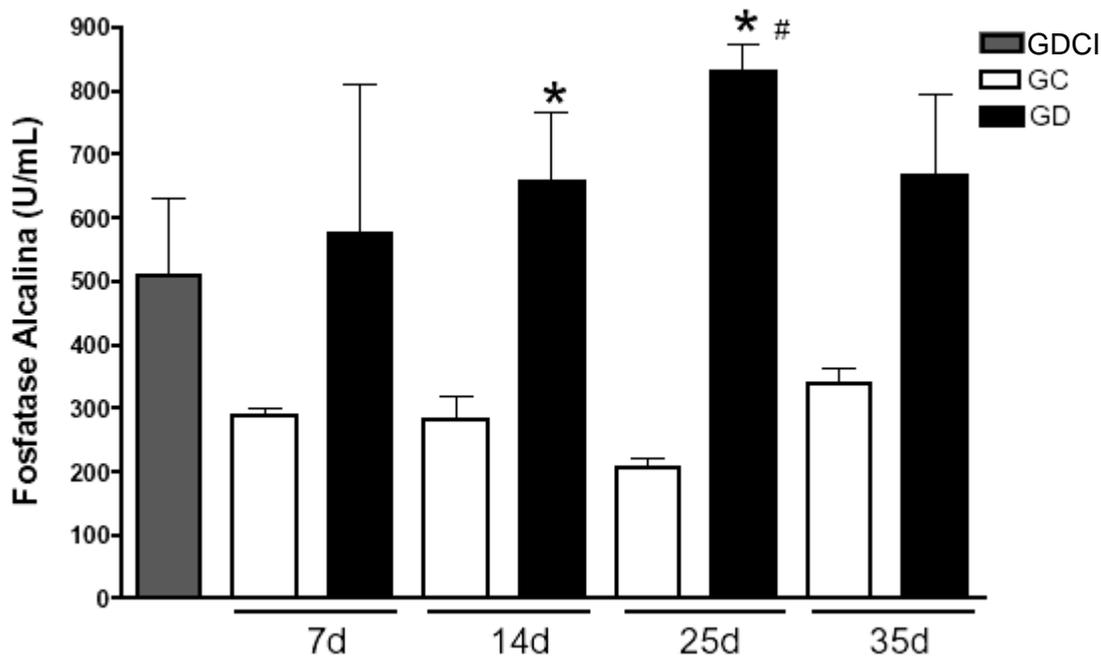
### 5.5 Avaliação dos Níveis Séricos de Paratormônio e Fosfatase Alcalina

Quanto à análise bioquímica de PTH, todos os valores obtidos para ambos os grupos de estudo foram menores que 3 UI, estando portando abaixo do limite de detecção do método empregado.

Em relação à fosfatase alcalina, nos animais diabéticos foi observado um pico nos níveis séricos desta enzima 25 dias após a fratura, enquanto no grupo controle esses níveis se mantiveram inalterados ao longo do período experimental. Os níveis de fosfatase alcalina do grupo diabético foram significativamente maiores que no respectivo grupo controle nos dias 14 ( $P=0,06$ ) e 25 ( $P=0,009$ ) após a fratura. O estado diabético *per si* parece afetar os níveis de fosfatase alcalina no soro. Contudo, os níveis de fosfatase alcalina dos ratos diabéticos não submetidos à fratura tibial (controle interno) não apresentaram diferenças significativas quando comparados aos níveis do grupo controle (Figura 6).

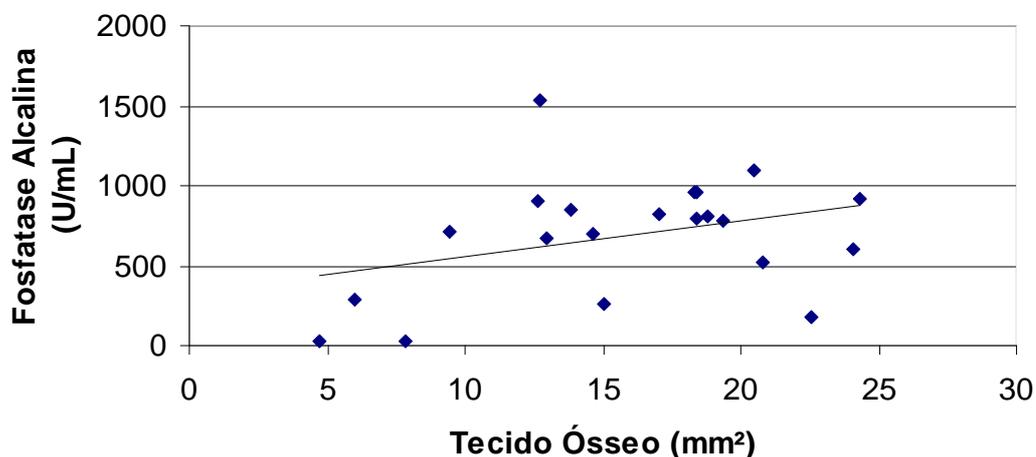
Conforme demonstrado na Figura 7, observou-se correlação positiva entre os níveis de fosfatase alcalina e a formação de tecido ósseo nos ratos diabéticos, considerando-se os dados referentes a todos os períodos experimentais (Correlação de Pearson  $R^2$  0.526;

$P < 0.01$ ). No grupo controle não se observou correlação significativa entre a atividade fosfatase alcalina e a neoformação de tecido ósseo.



**Figura 6 – Níveis de Fosfatase Alcalina.**

Os níveis séricos de fosfatase alcalina foram avaliados em animais do grupo controle (GC), diabéticos (GD) e diabéticos controle interno (GDCI) ou seja sem fraturas, nos diferentes períodos experimentais. (\*) Indicam diferenças significativas, valores de  $P < 0,01$ , em relação ao respectivo GC; (#) indicam diferenças significativas, valores de  $P < 0,01$ , em relação ao GDCI.



**Figura 7 - Correlação entre os níveis de fosfatase alcalina e formação de tecido ósseo.**  
Correlação de Pearson  $R^2 = 0.526$ .

## 5.6 Análise Radiográfica

A análise radiográfica revelou fratura tipo transversa na diáfise distal da tíbia (Figura 8). Nos animais diabéticos foi observado desvio posterior (Figuras 8B e 8D) e desvio anterior (Figura 8F). Por outro lado, os animais controle apresentaram alinhamento satisfatório com discreto desvio (Figuras 8A, 8C e 8E). No 14º dia após a fratura, observou-se esboço de calo ósseo nos dois grupos, sendo que, no grupo controle (Figura 8A) o calo apresentou sinais mais evidentes de consolidação em relação ao grupo diabético (Figura 8B). No 25º dia, o calo ósseo do grupo diabético (Figura 8D) apresentou acentuado deslocamento posterior, enquanto que no grupo controle observou-se fratura alinhada com ponte óssea unindo os fragmentos distal e proximal (Figura 8C). No 35º dia, observou-se a organização do calo ósseo e aparentemente a reconstituição do osso cortical no grupo controle (Figura 8E). Nessa fase, o grupo diabético também apresentou consolidação óssea, todavia com menor grau de remodelação e acentuado desvio (Figura 8F).



**Figura 8 - Aspecto radiográfico das fraturas nos diferentes períodos experimentais.**

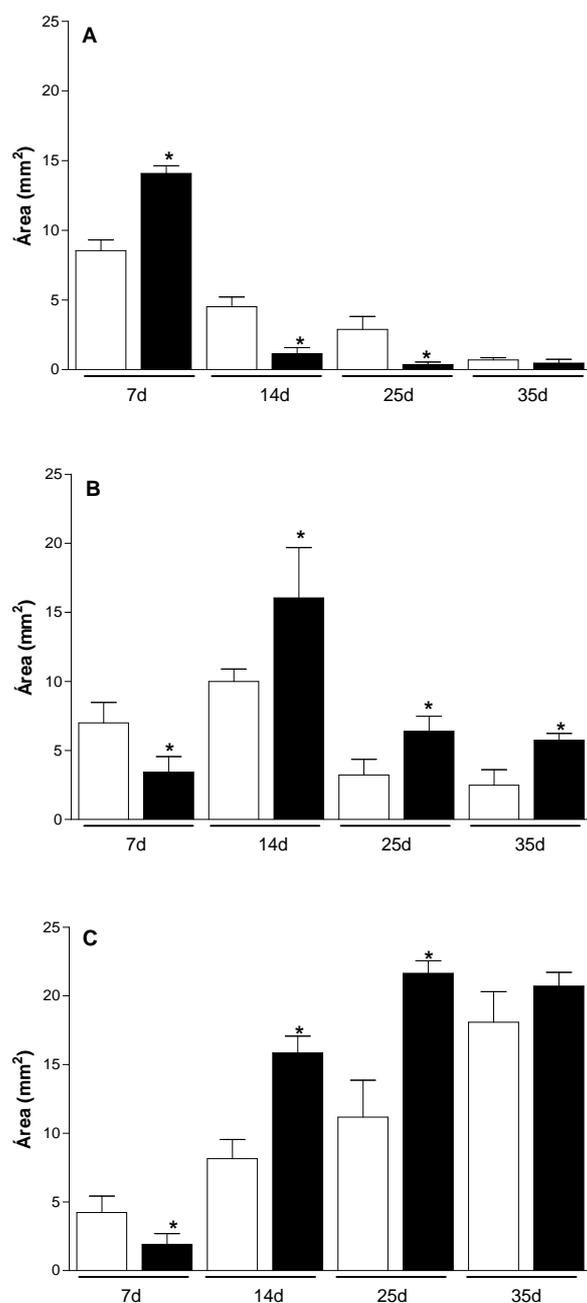
Incidência lateral evidenciando sítio de fratura na tíbia dos animais controle [(A) 14 dias, (C) 25 dias (E) 35 dias], e animais diabéticos [(B) 14 dias, (D) 25 dias (F) 35 dias].

### 5.7 Análise Morfológica e Morfométrica do Sítio de Fratura

No sétimo dia, os ratos diabéticos apresentaram maior área de tecido conjuntivo fibroso no sítio de fratura em comparação com o grupo controle (31,5% e 55,4%, respectivamente, para o grupo controle e diabético) ( $P=0,006$ ). Por outro lado, as áreas de tecido cartilaginoso (24,7% e 12,2%, respectivamente, para o grupo controle e diabético) ( $P=0,045$ ) e de tecido ósseo (15,2% e 7,3%, respectivamente, para o grupo controle e diabético) ( $P=0,068$ ) foram menores nos animais diabéticos nesse período (Figuras 9 e 10).

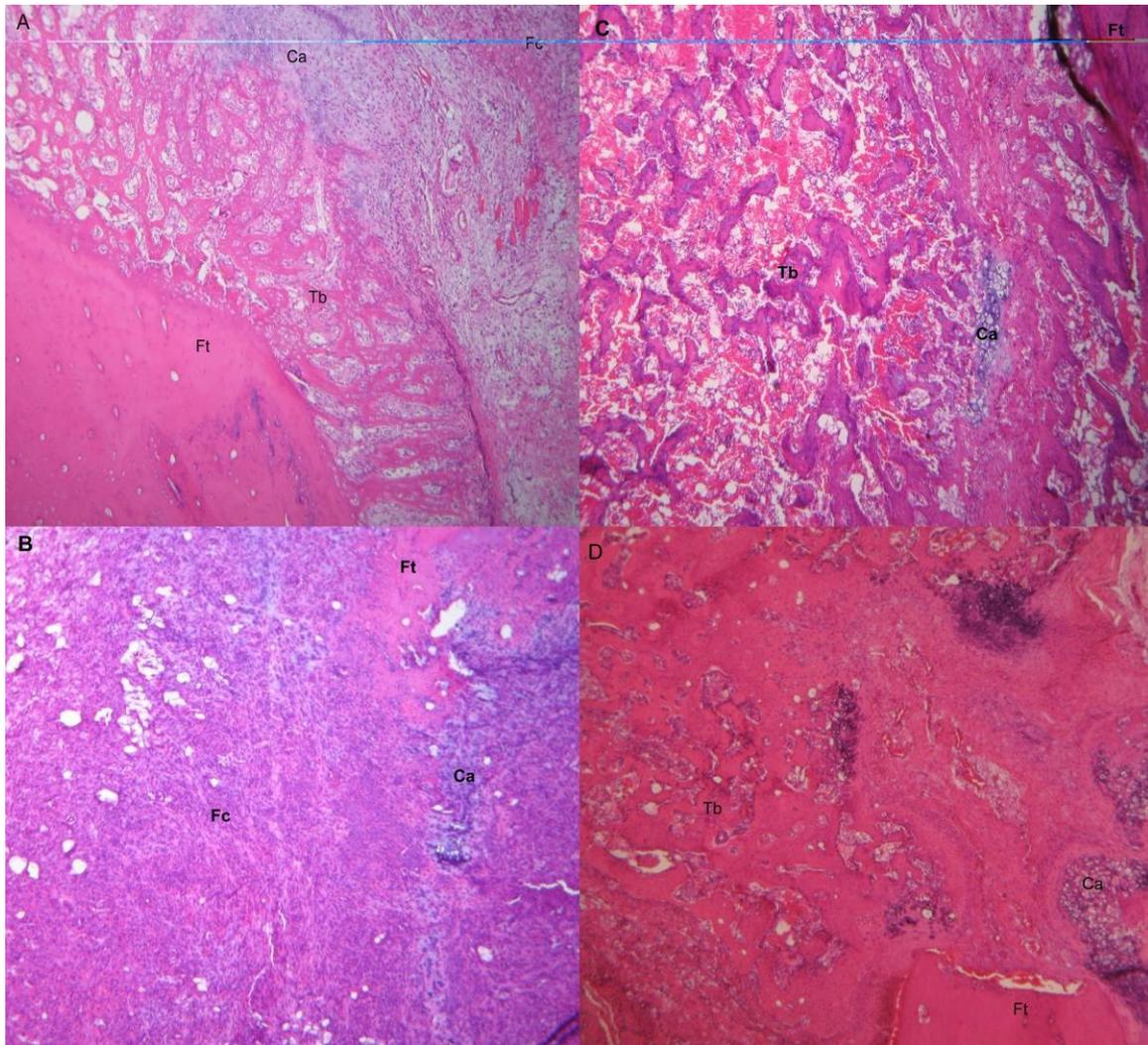
Entretanto, a formação de calo, vista após 14 e 25 dias, mostrou formação óssea maior para os animais diabéticos (26,5% e 52,1%, respectivamente, para os grupos controle e diabético no 14º dia,  $P=0,011$ ) e (31,9% e 75,2%, respectivamente, para os grupos controle e diabético no 25º dia,  $P=0,010$ ). Além disso, verificou-se maior formação de tecido cartilaginoso no grupo diabético (30,2% e 51,1%, respectivamente, para os grupos controle, e os diabéticos no 14º dia,  $P=0,028$ ) e (9,1% e 20,9%, respectivamente, para os grupos controle e diabético no 25º dia,  $P=0,033$ ). Por outro lado, um declínio da formação de tecido fibroso foi observado nos animais diabéticos, resultando em uma área menor de tecido conjuntivo fibroso nesse grupo (13,8% e 3,3%, respectivamente, para os grupos controle diabético no 14º dia) e (8,6% e 1,1%, respectivamente, para os grupos controle e diabético no 25º dia) ( $P=0,011$ ,  $P=0,019$ , respectivamente, para o 14º e o 25º dias). Nos 25º e 35º dias, a maior parte do calo apresentava-se constituída por tecido ósseo e cartilagem em ambos os grupos (Figuras 9 e 10).

Apesar das diferenças ao se considerar a área de calo ósseo distinguindo-se tecido conjuntivo fibroso, cartilagem e tecido ósseo em cada período experimental, pudemos observar que a configuração do calo ósseo foi similar em ambos os grupos, com idênticos picos de formação para cada tecido, sendo 7 dias para o tecido conjuntivo, 14 dias para tecido cartilaginoso e 35 dias para o tecido ósseo. Os resultados referentes aos dados relativos da análise morfométrica (valores em  $\text{mm}^2$  corrigidos em relação à área total analisada) apresentaram esboço idêntico ao dos valores absolutos para ambos os grupos em todos os períodos avaliados.



**Figura 9 - Análise morfométrica.**

A área ocupada pelos tecidos conjuntivo (A), cartilaginosa (B) e óssea (C) foi medida nos diferentes períodos experimentais nos grupos controle (□) e diabético (■). A delimitação da área foi realizada circundando-se os limites de cada tecido com o emprego do programa Image J. A área foi expressa em mm<sup>2</sup>. (\*) indicam diferenças significativas, valores de  $P < 0,05$ , em relação ao respectivo controle.



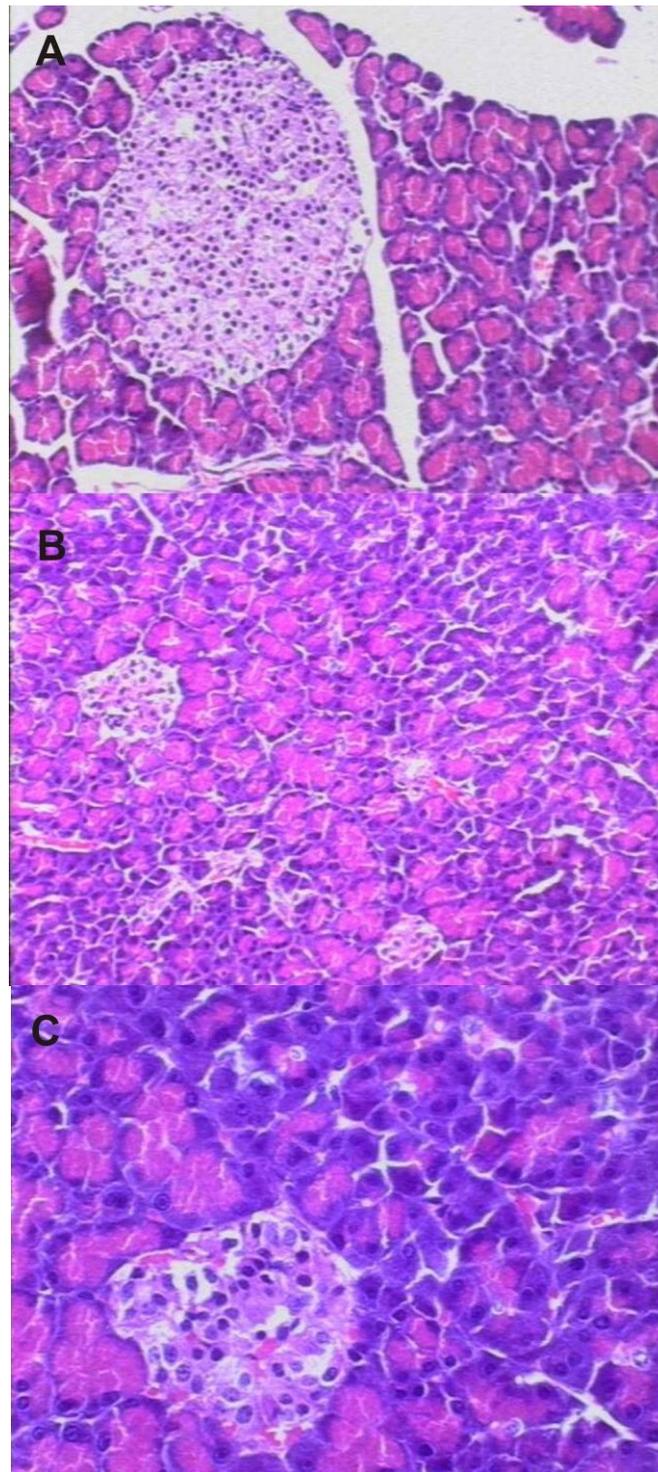
**Figura 10 - Aspecto microscópico do calo ósseo.**

Calo ósseo nos animais do grupo controle no 7º dia (A) e 25º dia (C) e nos animais do grupo diabético no 7º dia (B) e 25º dia (D). Coloração pela hematoxilina-eosina. FT-extremidade da fratura. TB-osso trabecular. FC-tecido conjuntivo fibroso, Ca-tecido cartilagenoso. Aumento 25x, coloração HE.

### 5.8 Análise Microscópica do Pâncreas

Foram analisados cortes histológicos do pâncreas de animais do grupo controle e animais diabéticos para avaliação das possíveis alterações histológicas decorrentes do uso do aloxano (Figura 11). A Figura 11A, apresenta o aspecto microscópico das ilhotas de Langerhans sem alterações, em cujo interior encontram-se predominantemente células beta (produtoras de insulina) e alfa (produtoras de glucagon), as células beta são alvo da ação do aloxano. Em comparação com o pâncreas do animal tratado com aloxano (Figuras 11B e 11C) pode-se observar que as ilhotas do pâncreas normal são mais arredondadas, apresentam

arquitetura regular e maior número de células em seu interior. Por outro lado, as ilhotas do pâncreas diabéticos apresentaram diminuição de seu tamanho e distorção da citoarquitetura em decorrência da diminuição da população de células beta (Figuras 11B e 11C).



**Figura 11 - Aspecto microscópico do pâncreas sob efeito do aloxano.**

(A) Pâncreas de animal controle (aumento 100x, coloração HE). (B) Pâncreas de animal diabético (aumento 100x, coloração HE). (C) Pâncreas de animal diabético (aumento 200x, coloração HE).

## 6 DISCUSSÃO

A concepção do trabalho em questão foi fundamentada em evidências clínicas e experimentais sobre a influência do Diabetes no reparo de fraturas, sendo o Diabetes importante causa do retardo de consolidação de fraturas (LODER, 1988; PAPA *et al.*, 1993). O processo de consolidação de fraturas e reparo de defeitos ósseos tem sido estudado em uma variedade de modelos de Diabetes, incluindo ratos espontaneamente diabéticos (FOLLAK *et al.*, 2003; FOLLAK *et al.*, 2004a; FOLLAK *et al.*, 2004b; FOLLAK *et al.*, 2005); ratos Wistar BB (BEAM *et al.*, 2002) e animais tratados com estreptozotocina (FUNK *et al.*, 2000; MACEY *et al.*, 1989). Entretanto, o presente estudo é o primeiro trabalho relativo ao efeito do Diabetes induzido pelo aloxano no reparo de fratura óssea fechada em ratos. Somado a isto, poucos estudos na literatura (PADULA *et al.*, 2003; FOLLAK *et al.*, 2004a; FOLLAK *et al.*, 2004b) obtiveram dados histomorfométricos dos sítios de fraturas de animais diabéticos com o objetivo de identificar as possíveis influências do estado diabético sobre a consolidação óssea. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do estado diabético induzido pelo aloxano sobre os parâmetros histomorfométricos do sítio de fratura. Os resultados apresentados no presente trabalho foram recentemente submetidos para publicação (Apêndice A).

Em relação à indução do *Diabetes Mellitus* utilizando aloxano, pudemos comprovar a eficácia da droga, sendo observado um índice de conversão de 43,7%. O aloxano exerce uma ação citotóxica direta nas ilhotas pancreáticas, eliminando assim a produção de insulina e causando severa hiperglicemia no animal. Esta situação é análoga ao Diabetes tipo 1 em humanos (KATSUMATA *et al.*, 1992; SZKUDELSKI, 2001). Consistente com a literatura, observamos no pâncreas dos animais diabéticos uma redução no tamanho e número das ilhotas pancreáticas e distorção de sua citoarquitetura, em decorrência da diminuição do número de células B (SCHOSSLER *et al.*, 2004). Estudos prévios também demonstraram a eficácia do aloxano em modelos animais para estudo do *Diabetes Mellitus* (LUKENS, 1948; LOCATTO *et al.*, 1993; LERCO *et al.*, 2003).

A linhagem Wistar *Rattus norvegicus* foi escolhida em função de ter sido utilizada em trabalhos de pesquisas semelhantes, favorecendo a comparação de resultados (UDUPA & PRASAD, 1963; BEAM *et al.*, 2002; PADULA *et al.*, 2003). Os níveis de glicose considerados normais nestes animais variam entre 50 e 135 mg/100 mL (HARKNESS & WAGNER, 1993), sendo considerados diabéticos animais com valores de glicemia igual ou

maiores que 200 mg/100 mL. (CARVALHO *et al.*, 2003). Por outro lado, TONIOLO *et al.* (1980) consideram diabéticos os animais que, após o tratamento com aloxano, apresentaram nível de glicemia igual ou maior que a média do grupo controle acrescido de 3 vezes o desvio-padrão desse grupo. No presente estudo, foram considerados diabéticos os animais com glicemia igual ou superior a 200 mg/100 mL. Tal decisão deveu-se ao fato de que um parâmetro acima desse nível nos obrigaria a empregar um grande número de animais em função da considerável perda por mortes em razão da hiperglicemia acentuada.

A via de administração do aloxano foi intraperitoneal, conforme preconizado por MAZZANTI *et al.* (2003) e SCHOSSLER *et al.* (2004). A opção por essa via de administração da droga deveu-se à praticidade e facilidade em relação à via endovenosa. Esta última, apesar de apresentar diferença significativa no índice de conversão (80%), também resulta em considerável percentual de perda (40%) por morte na primeira semana após a indução (CARVALHO *et al.*, 2003).

Os períodos experimentais adotados neste trabalho foram fundamentados nos estudos de UDUPA & PRASAD (1963), que através de estudos histoquímicos descreveram a evolução do processo de consolidação óssea em ratos.

Com relação ao procedimento de indução de fraturas, no presente estudo empregou-se o modelo de fraturas fechadas, em função dos baixos índices de infecção, além dos mínimos danos aos tecidos moles (ZACHARIAS *et al.*, 1990). Convém destacar que a adoção do mecanismo manual de trauma compressivo direto na tíbia para produção de fratura, por um único pesquisador, proporciona uma fratura padrão, com um traço transverso, sem cominuição, propiciando melhor avaliação comparativa nos períodos experimentais. Conforme previamente verificado em outros trabalhos experimentais a não-imobilização das fraturas experimentais em tíbias de ratos não interfere na obtenção da consolidação (CASTRO *et al.*, 2006). Além disto, a cirurgia para fixação interna dessas fraturas, está associada a complicações, tais como morte pós-operatória e infecção (PELKER & FRIEDLAENDER, 1997). Mesmo quando meios não-cirúrgicos são utilizados para estabilização de fratura em ratos, complicações podem ocorrer. Em estudo realizado por CASTRO *et al.* (2006), utilizando imobilização por gesso, os autores observaram que todos os animais evoluíram para síndrome compartimental.

Consistente com dados clínicos (LODER, 1988) e experimentais (MACEY, *et al.*, 1989; FUNK *et al.*, 2000; BEAM *et al.*, 2002; FOLLAK *et al.*, 2004b; FOLLAK *et al.*, 2005) previamente relatados na literatura, demonstrou-se neste estudo que o *Diabetes Mellitus* retarda o processo de consolidação de fraturas fechadas em tíbia sem imobilização. Esse

retardo no processo ocorre nos primeiros estágios da cicatrização, ou seja, no desenvolvimento da formação do tecido mole abundante, associado ao atraso na diferenciação de células com potencial osteogênico e condrogênico, possivelmente afetado pela alteração na expressão dos fatores de transcrição que regulam a diferenciação destas células (LU *et al.*, 2004). Entre esses fatores, é relevante a atuação do PDGF na fase inicial do processo de consolidação, conforme estudo de TYNDALL *et al.* (2003). Estes autores demonstraram, por meio de estudos imuno-histoquímicos, uma diminuição da expressão de PDGF nos animais diabéticos, a qual foi relacionada à deficiência na síntese do colágeno. A pouca formação óssea nos estágios iniciais da consolidação observada nos animais diabéticos poderia, também, ser explicada pelo aumento do número de osteoblastos em apoptose observados no tecido ósseo de animais diabéticos (HE *et al.*, 2004). Tais deficiências foram também comprovadas pelos estudos de MACEY *et al.* (1989); TOPPING *et al.* (1994) e GOOCH *et al.* (2000). Verificou-se ainda, distúrbios no processo de mineralização da matriz óssea em animais diabéticos (FOLLAK *et al.*, 2004b; FOLLAK *et al.*, 2005). Outros fatores, como o aumento da atividade osteoclástica (SUZUKI *et al.*, 2005) e a incorporação de glicose às proteínas da matriz celular podem contribuir para o atraso no reparo ósseo observado nos animais diabéticos (NEUMANN *et al.*, 1999; GOOVA *et al.*, 2001).

Um aspecto importante que pode também afetar a osteogênese é o processo de angiogênese, a qual presumidamente estaria afetada nos animais diabéticos (DIB *et al.*, 1992), justificando o atraso da histogênese. Contudo, a maior reação tecidual observada neste estudo nos estágios iniciais da consolidação óssea possivelmente não demonstra a existência da microangiopatia, geralmente associada a estados diabéticos crônicos (OLIVEIRA & MILECH, 2004).

Consistente com estudos prévios, nossos resultados demonstraram uma maior reação inflamatória e conseqüente maior formação de tecido conjuntivo nos animais diabéticos nos períodos iniciais de consolidação (GRAVES *et al.*, 2005; WETZLER *et al.*, 2000). A presença predominante de tecido conjuntivo, o atraso na formação de tecido ósseo e cartilaginoso e, ainda conforme documentado na literatura, o retardo no processo de mineralização (FOLLAK *et al.*, 2004b; FOLLAK *et al.*, 2005) contribuiu provavelmente para uma menor resistência biomecânica do calo ósseo (FUNK *et al.*, 2000; GOOCH *et al.*, 2000) nos estágios iniciais da consolidação. Dessa forma, estes aspectos provavelmente propiciaram um maior desvio nas fraturas e deslocamento entre os fragmentos, conforme evidenciado nas radiografias dos animais diabéticos em comparação com os animais do grupo controle, especialmente nos períodos mais tardios de consolidação. A avaliação radiográfica confirmou

ainda que os animais diabéticos apresentaram atraso na consolidação do sítio de fratura, o que está de acordo com achados prévios da literatura (GOOCH *et al.*, 2000).

Em consequência do desvio mais acentuado dos fragmentos no sítio de fratura, foi observado nos animais diabéticos um aumento do volume do calo ósseo e conseqüentemente maior formação de tecido ósseo e cartilaginoso nos estágios finais do processo de consolidação. Dessa maneira, a presença de um calo ósseo mais exuberante nos animais diabéticos provavelmente irá requerer períodos maiores para a remodelação e consolidação definitiva da fratura. Com base nos nossos resultados, podemos sugerir que o *Diabetes Mellitus* retarda, mas não impede o processo de consolidação óssea de fraturas fechadas. Sendo assim, o tratamento de fraturas em pacientes diabéticos deve requerer a redução anatômica e estabilização dos fragmentos ósseos, minimizando os efeitos da doença sobre as etapas seqüenciais do processo de cura que, geralmente, serão dificultados em fraturas com maiores desvios. Nesse contexto, as fraturas em pacientes diabéticos muitas vezes devem requerer tratamento operatório, com os cuidados exigidos na avaliação clínica pré-operatória rigorosa (OLIVEIRA & MILECH, 2004), em que pesem os riscos inerentes ao procedimento nesses pacientes. Estudos experimentais (BEAM *et al.*, 2002; FOLLAK *et al.*, 2005; MACEY, 1989) e estudos clínicos (HJORTRUP *et al.*, 1985) demonstram que a doença diabética controlada pela terapia com insulina não induz repercussões no processo de consolidação de fraturas, o que reforça a necessidade de controle da doença diabética para o sucesso do reparo.

Consistente com a exuberante formação óssea observada nos animais diabéticos nos dias 14 e 25 após a indução de fratura, verificamos que a análise dos níveis séricos de fosfatase alcalina nesses animais também foi significativamente maior em relação aos animais do grupo controle. Além disso, observamos uma correlação estatística significativa entre a formação de tecido ósseo e os níveis séricos de fosfatase alcalina nos animais diabéticos. Tais resultados corroboram que o Diabetes induzido pelo aloxano afeta o processo de formação e mineralização matricial no osso, conforme previamente descrito em outros modelos de Diabetes (MACEY *et al.*, 1989; FUNK *et al.*, 2000; BEAM *et al.*, 2002; FOLLAK *et al.*, 2004b; FOLLAK *et al.*, 2005). Estes resultados apontam a fosfatase alcalina como potencial fator para o monitoramento clínico do processo de reparo ósseo em indivíduos diabéticos.

Em conclusão, este trabalho representa o primeiro estudo histomorfométrico do reparo de fraturas em ratos com Diabetes induzido pelo aloxano. Nossos achados fortemente sugerem que o estado diabético induzido pelo aloxano resulta em atraso nos processos de osteogênese e condrogênese e, portanto, na consolidação da fratura. A redução anatômica da

fratura em indivíduos diabéticos, possivelmente traria uma menor expressão dos efeitos deletérios da doença diabética no processo de reparo ósseo.

## **7 CONCLUSÃO**

A partir dos resultados obtidos e com base na metodologia utilizada, podemos concluir que:

- O Diabetes induzido pelo aloxano interfere significativamente com o processo de reparação de fraturas fechadas;
- Nos sítios de fratura de animais diabéticos ocorre uma excessiva formação de tecido conjuntivo e atraso nos processos de condrogênese e osteogênese nos períodos iniciais da consolidação. Nesse contexto, a estabilidade do sítio de fratura é reduzida contribuindo para um alinhamento deficiente dos fragmentos e conseqüente aumento do volume do calo ósseo nas fases mais tardias de consolidação. Esse processo está possivelmente relacionado à necessidade de períodos maiores para uma remodelação e completa consolidação da fratura em indivíduos diabéticos;
- A análise dos níveis séricos de fosfatase alcalina pode ser empregada como potencial marcador para a avaliação de modificações relacionadas à consolidação de fraturas em diabéticos;
- O significado clínico dos nossos dados é que durante o tratamento das fraturas em indivíduos diabéticos é de crucial importância que os fragmentos sejam reduzidos da forma mais anatômica possível, a fim de se obter uma relativa independência do estado hiperglicêmico no reparo ósseo.

---

**8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS<sup>1</sup>**

1. 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. 1210-1216, 2002.
2. BISHARA, N. B.; DUNLOP, M. E.; MURPHY, T. V.; DARBY, I. A.; SHARMINI RAJANAYAGAM, M. A.; HILL, M. A. Matrix protein glycation impairs agonist-induced intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling in endothelial cells. **J. Cell. Physiol.**, v. 193, n.1, p. 80-92, 2002.
3. BODY, J. J. Calcitonin for the long-term prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. **Bone**, v. 30, n. 5, p. 75-79, 2002. Suplemento.
4. CAPLAN, A. L. Bone development and repair. **Bioessays**, v. 6, n. 4, p. 171-175, 1987.
5. CARVALHO, E. N.; CARVALHO, N. A. S.; FERREIRA, L. M. Experimental model of induction of *Diabetes Mellitus* in rats. **Acta Cir. Bras.**, v. 18, p. 60-64, 2003. Número especial.
6. CASTRO, P. C. F; HOSHINO, A.; BRITO, R. B.; DIAS JÚNIOR, L. B.; BRITO, J. A. F.; BARROS, R. S. M.; SANTILI, C. Estudo do processo de consolidação óssea em ratos tratados com acetaminofen: avaliação radiográfica e histológica. **Rev. Bras. Ortop.**, v. 40, n. 10, p. 614-620, 2006.
7. CRENSHAW, A. H. (Org.). **Cirurgia ortopédica de Campbell**. São Paulo: Manole, 1996.
8. DEMPSTER, D. W.; HUGHES-BEGOS, C. E.; PLAVETIC-CHEE, K.; BRANDAO-BURCH, A.; COSMAN, F.; NIEVES, J.; NEUBORT, S.; LU, S. S.; IIDA-KLEIN, A.; ARNETT, T.; LINDSAY, R. Normal human osteoclasts formed from peripheral blood monocytes express PTH type 1 receptors and are stimulated by PTH in the absence of

---

<sup>1</sup> Este trabalho foi elaborado com base nas normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas, NBR 6027, NBR 6028, NBR 14724, NBR 6024 e NBR 6023.

- osteoblasts. **J. Cell. Biochem.**, v. 95, n. 1, p. 139-148, 2005.
9. DERIVI, S. C. N.; MENDEZ, M. H., M.; FRANCISCONI, A. D.; SILVA, C. S.; CASTRO, A. F.; LUZ, D. P. Efeito hipoglicêmico de rações à base de berinjela (*Solanum melongena*,L.) em ratos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 2, p. 164-169, 2002.
10. DIB, S. A.; RUSSO, E. M.; CHACRA, A. R. **Tratado de endocrinologia clínica**. São Paulo: Rocca, 1992.
11. DUCY, P.; SCHINKE, T.; KARSENTY, G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. **Science**, v. 289, n. 5484, p. 1501-1504, 2000.
12. EINHORN T. A. The cell and molecular biology of fracture healing. **Clin. Orthop. Rel. Res.**, v. 355, p. 7-21, 1998. Suplemento.
13. EINHORN, T. A. Enhancement of fracture-healing. **J. Bone Joint. Surg. Am.**, v. 77, n.6, p. 940-956, 1995.
14. EXPERT COMMITTEE on the Diagnosis and Clasification of *Diabetes Mellitus*. American Diabetes Association: clinical practice recommendations 2002. **Diabetes Care**, v. 25, p. 1-147, 2002. Suplemento 1.
15. FERNANDES, A. P. M.; PACE, A. E.; ZANETTI, M. L.; FOSS, M. C.; DONADI, E. A. Fatores imunogenéticos associados ao *Diabetes Mellitus* do tipo 1. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 13; n. 5, p 743-748, 2005.
16. FOLLAK, N.; KLÖTING, I.; MERK, H. Influence of diabetic metabolic state on fracture healing in spontaneously diabetic rats. **Diabetes Metab. Res. Rev.**, v. 21, n. 3, p. 288-296, 2005.
17. FOLLAK, N.; KLÖTING, I.; WOLF, E.; MERK, H. Delayed remodeling in the early period of fracture healing in spontaneously diabetic BB/OK rats depending on the diabetic metabolic state. **Histol. Histopathol.**, v. 19, n. 2, p. 473-486, 2004a.

18. FOLLAKE, N.; KLÖTING, I.; WOLF, E.; MERK, H. 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. 144-152, 2004b.
19. FOLLAKE, N.; KLÖTING, L.; GANZER, D.; MERK, H. Scanning electron microscopic examinations on retarded bone defect healing in spontaneously diabetic BB/O(ttawa)K(arlsburg) rats. **Histol. Histopathol.**, v. 18, n. 1, p. 111-120, 2003.
20. FUNK, J. R.; HALE, J. E.; CARMINES, D. GOOCH, H. L.; HURWITZ, S. R. Biomechanical evaluation of early fracture healing in normal and diabetic rats. **J. Orthop. Res.**, v. 18, n. 1, p. 126-132, 2000.
21. GOLTZMAN, D. Interactions of PTH and PTHrP with the PTH/PTHrP receptor and with downstream signaling pathways: exceptions that provide the rules. **J. Bone Miner. Res.**, v. 14, n. 2, p. 173-177, 1999.
22. GOOCH, H. L.; HALE, J. E.; FUJIOKA, H.; BALIAN, G.; HURWITZ, S. R. Alterations of cartilage and collagen expression during fracture healing in experimental diabetes. **Connect. Tissue Res.**, v. 41, n. 2, p. 81-91, 2000.
23. GOODMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1987.
24. GOOVA, M. T.; LI, J.; KISLINGER, T.; QU, W.; LU, Y.; BUCCIARELLI, L. G.; NOWYGRÓD, S.; WOLF, B. M.; CALISTE, X.; YAN, S. F.; STERN, D. M.; SCHMIDT, A. M. Blockade of receptor for advanced glycation end-products restores effective wound healing in diabetic mice. **Am. J. Pathol.**, v. 159, n. 2, p. 513-525, 2001.
25. GRACITELLI, M. E. C.; VIDORIS, A. A. C.; LUBA, R.; LAZARETTI-CASTRO, M. Paratormônio e osteoporose: encontrando o fio da meada. Bases fisiológicas para utilização do PTH no tratamento da osteoporose. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 46, n. 3, p. 215-219, 2002.

- 
26. GRANKVIST, K.; MARKLUND, S.; TÄLJEDAL, I. B. Superoxide dismutase is a prophylactic against alloxan diabetes. **Nature**, v. 294, n. 5837, p. 158-160, 1981.
27. GRAVES, D. T.; NAGUIB, G.; LU, H.; LEONE, C.; HSUE, H.; KRALL, E. Inflammation is more persistent in type 1 diabetic mice. **J. Dent. Res.**, v. 84, n. 4, p. 324-328, 2005.
28. HAMANN, K. L.; LANE, N. E. Parathyroid hormone update. **Rheum. Dis. Clin. North. Am.**, v. 32, n. 4, p. 703-719, 2006.
29. HARKNESS, J. E.; WAGNER, J. E. **Biologia e clínica de coelhos e roedores**. 3. ed. São Paulo: Roca, 1993.
30. HAUSSLER, M. R.; McCAIN, T. A. Basic and clinical concepts related to vitamin D metabolism and action . **N. Engl. J. Med.**, v. 297, n. 18, p. 974-983, 1977.
31. HE, H.; LIU, R.; DESTA, T.; LEONE, C.; GERSTENFELD, L. C.; GRAVES. D. T. Diabetes causes decreased osteoclastogenesis, reduced bone formation, and enhanced apoptosis of osteoblastic cells in bacteria stimulated bone loss. **Endocrinology**, v. 145, n. 1, p. 447-452, 2004.
32. HJORTRUP, A.; SØRENSEN, C.; DYREMOSE, E.; KEHLET, H. Morbidity after femoral neck fracture not increased in diabetics. **Acta Orthop. Scand.**, v. 56, n. 4, p. 309-311, 1985.
33. INOUYE, M.; MIO T.; SUMINO L. Link between glycation and lipoxidation in red blood cells in diabetes. **Clin. Chim. Acta**, v. 285, n. 1-2, p. 35-44, 1999.
34. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Censo Demográfico 2000. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/censo/default.php>> Acesso em: 17 dez. 2005.
35. JÖRNS, A.; TIEDGE, M.; LENZEN, S.; MUNDAY, R. Effect of superoxide dismutase, catalase, chelating agents, and free radical scavengers on the toxicity of alloxan to isolated pancreatic islets *in vitro*. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 26, n. 9-10, p.

- 1300-1304, 1999.
36. KATSUMATA, K.; KATSUMATA Jr., K.; KATSUMATA, Y. Protective effect of diltiazem hydrochloride on the occurrence of alloxan- or streptozotocin-induced diabetes in rats. **Horm. Metab. Res.**, v. 24, n.11, p. 508-510, 1992.
37. KIKUTANI, H.; MAKINO S. The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. **Adv. Immunol.**, v. 51, p. 285-322, 1992.
38. KING, H.; AUBERT, R. E.; HERMAN, W. H. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. **Diabetes Care**, v. 21, n. 9, p. 1414-1431, 1998.
39. KOCHI, C.; MONTE, O.; LONGUI, C. A.; CALLIARI, L. E. P.. **Endocrinologia para o pediatra**, 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1998.
40. KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Pathologic basis of disease**. 7. ed. Pennsylvania: Elsevier, 2005.
41. LERCO, M. M.; SPADELLA, C. T.; MACHADO, J. L. M.; SCHELLINI, S. A.; PADOVANI, C. R. Caracterização de um modelo experimental de *Diabetes Mellitus*, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta Cir. Bras.**, v. 18, n. 2., p. 132-142, 2003.
42. LOCATTO, M. E.; ABRANZON, H.; CAFERRA, G. D.; FERNANDEZ, M. C.; ALLOATTI, R; PUCHE, R. C. Growth and development of bone mass in untreated alloxan diabetic rats. Effects of collagen glycosylation and parathyroid activity on bone turnover. **Bone Miner.**, v. 23, n. 2, p. 129-144, 1993.
43. LODER, R. T. The influence of *Diabetes Mellitus* on the healing of closed fractures. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 232, p. 210-216, 1988.
44. LU, H.; RAPTIS, M.; BLACK, E.; STAN, M.; AMAR, S.; GRAVES, D. T. Influence of diabetes on the exacerbation of an inflammatory response in cardiovascular tissue. **Endocrinology**, v. 145, n. 11, p. 4934-4939, 2004.

- 
45. LUKENS, F. D. W. Alloxan diabetes. **Physiol. Rev.**, v. 28, p. 304-330, 1948.
46. MACEY, L. R.; KANA, S. M.; JINGUSHI, S.; TEREK, R. M.; BORRETOS, J.; BOLANDER, M. E. Defects of early fracture-healing in experimental diabetes. **J. Bone Joint. Surg .Am.**, v. 71, n. 5, p. 722-733, 1989.
47. MALERBI, D. A.; FRANCO, L. J. Multicenter study of the prevalence of *Diabetes Mellitus* and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. The Brazilian cooperative group on the study of diabetes prevalence. **Diabetes care**, v. 15, n. 11, p. 1509-1516, 1992.
48. MAZZANTI, C. M.; SCHOSSLER, D. R.; FILAPPI, A.; PRESTES, D.; BALZ, D.; MIRON, V.; MORSCH, A.; SCHETINGER, M. R. C.; MORSCH, V. M.; CECIM, M. Extrato da casca de *Syzygium cumini* no controle da glicemia e estresse oxidativo de ratos normais e diabéticos. **Cienc. Rural**, v. 33, n. 6, p. 1061-1065, 2003.
49. MENTINK, C. J.; HENDRIKS, M.; LEVELS, A. A.; WOLFFENBUTTEL, B. H. Glucose-mediated cross-linking of collagen in rat tendon and skin. **Clin. Chim. Acta**, v. 321, n. 1-2, p. 69-76, 2002.
50. NETTER, F. H. **Sistema musculoesquelético. Anatomia, fisiologia y enfermedades metabólicas**. Barcelona: Salvat, 1990.
51. NEUMANN, A.; SCHINZEL, R.; PALM, D.; RIEDERER, P.; MUNCH, G. High molecular weight hyaluronic acid inhibits advanced glycation endproduct-induced NF-kappaB activation and cytokine expression. **FEBS Lett.**, v. 453, n. 3, p. 283-287, 1999.
52. OLIVEIRA, J. E. P.; MILECH, A. **Diabetes Mellitus – clinica, diagnóstico e tratamento multidisciplinar**. São Paulo: Atheneu, 2004.
53. PADULA, E. O. C.; ANDRADE, M. L.; GIORDANO, V.; RAMALHO, M. V. Aspectos morfológicos do processo de consolidação de fratura em ratos diabéticos. **Rev. Bras. Ortop.**, v. 38, n. 3, p. 127-136, 2003.

- 
54. PAPA, J.; MYERSON, M.; GIRARD, P. Salvage, with arthrodesis, in intractable diabetic neuropathic arthropathy of the foot and ankle. **J. Bone Joint. Surg. Am.**, v. 75, n. 7, p. 1056-1066, 1993.
55. PELKER, R. R.; FRIEDLAENDER, G. E. The Nicolas Andry Award-1995. Fracture healing. Radiation induced alterations. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 341 p. 267-282, 1997.
56. REDDY, G. K.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C. S. Glycation-induced matrix stability in the rabbit achilles tendon. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 399, n. 2, p. 174-180, 2002.
57. SCHOSSLER, D. R. C.; MAZZANTI, C. M.; LUZ, S. C. A.; FILAPPI, A.; PRESTES, D.; SILVEIRA, A. F.; CECIM, M. Alterações histológicas e imunoistoquímicas em pâncreas de ratos normais e diabéticos tratados com *Syzygium cumini*. **Ciência Rural**, v. 34, n 6, p. 1821-1825, 2004.
58. SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES – SBD. Estimativa da população diabética no Brasil em 2004. Disponível em: <[www.diabetes.org.br/imprensa/diamundial/sbddiamundial.php](http://www.diabetes.org.br/imprensa/diamundial/sbddiamundial.php)>. Acesso em: 10 out. 2006.
59. SUDA, T.; TAKAHASHI, N.; ABE, E. Role of vitamin D in bone resorption. **J. Cell. Biochem.**, v. 49, n. 1, p. 53-58, 1992.
60. SUZUKI, K.; KUROSE, T.; TAKIZAWA, M.; MARUYAMA, M.; USHIKAWA, K.; KIKUYAMA, M.; SUGIMOTO, C.; SEINO, Y.; NAGAMATSU, S.; ISHIDA, H. 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. 117-125, 2005.
61. SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiol. Res.**, v. 50, n. 6, p. 537-546, 2001.

- 
62. TEITELBAUM, S. L. Osteoclasts: what do they do and how do they do it? **Am. J. Pathol.**, v. 170, n. 2, p. 427-435, 2007.
63. TONIOLO, A.; ONODERA, T.; YOON, J. W.; NOTKINS, A. L. Induction of diabetes by cumulative environmental insults from viruses and chemicals. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 383-385, 1980.
64. TOPPING, R. E.; BOLANDER, M. E.; BALIAN, G. Type X collagen in fracture callus and the effects of experimental diabetes. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 308, p. 220-228, 1994.
65. TYNDALL, W. A.; BEAM, H. A.; ZARRO, C.; O'CONNOR, J. P.; LIN, S. S. Decreased platelet derived growth factor expression during fracture healing in diabetic animals. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 408, p. 319-330, 2003.
66. UDUPA, K. N.; PRASAD, G. C. Chemical and histochemical studies on the organic constituents in fracture repair in rats. **J. Bone Joint. Surg. Br.**, v. 45, p. 770-779, 1963.
67. URIST, M. R.; DeLANGE, R. J.; FINERMAN G.A.M. Bone cell differentiation and growth factors. **Science**, v. 220, n. 4598, p. 680-686, 1983.
68. VIEIRA, J. G. H. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 43, n. 6, p. 415-421, 1999.
69. WETZLER, C.; KÄMPFER, H.; STALLMEYER, B.; PFEILSCHIFTER, J.; FRANK, S. Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair. **J. Invest. Dermatol.**, v. 115, n. 2, p. 245-253, 2000.
70. ZACHARIAS, D. P. M.; WAITZBERG, D. L.; BEVILACQUA, L. R.; GONÇALVES, E. L. Modelo Experimental de traumatismo osteomuscular em ratos. **Acta Cir. Bras.**, v. 5, n. 1, p. 13-16, 1990.

71. ZIMMET, P.; ALBERTI, K. G. M. M.; SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 782-787, 2001.

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética no Uso Animal, do Instituto de Ciências Biológicas da UnB.



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - IB  
COMITÊ DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA

Brasília, 27 de março de 2007.

**DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto intitulado "INFLUÊNCIA DOS *DIABETES MELLITUS* NO PROCESSO DE REPARAÇÃO DE FRATURAS: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS", sob responsabilidade da Profa. Tarsila Aparecida da Silva, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

  
Prof. Anamélia Lorenzetti Bocca  
Coordenadora do CEUA

## APÊNDICE

**Apêndice 1. Áreas médias de tecidos conforme período de observação. Diabéticos e controle.**

	Grupo	Rato	Área média dos tecidos por rato				
			Total	Ósseo	Cartilaginoso	Conjuntivo	
GRUPOS CONTROLE	GC1	A	<b>23220,6</b>	2075,3	6715,5	8080,9	
		B	<b>27516,8</b>	5930,9	5359,4	8150,4	
		C	<b>32742,9</b>	1928,3	12573,1	10047,7	
		D	<b>24828,4</b>	3186,1	3881,9	10314,6	
		E	<b>29419,1</b>	8054,1	6453,7	6092,1	
	GC2	A	<b>32931,9</b>	6001,0	10562,3	6523,8	
		B	<b>32139,8</b>	7825,0	8693,1	4214,2	
		C	<b>32490,2</b>	9455,3	10093,7	5407,6	
		D	<b>31079,4</b>	4754,4	12960,9	4158,3	
		E	<b>32478,1</b>	12725,0	7704,4	2299,5	
	GC3	A	<b>32968,6</b>	8149,0	2265,9	3866,0	
		B	<b>35583,1</b>	15135,5	2832,6	2322,6	
		C	<b>34212,2</b>	5177,8	1287,5	4784,8	
		E	<b>35750,9</b>	16249,9	6489,4	609,8	
	GC4	A	<b>30058,8</b>	15078,9	3366,7	515,1	
		B	<b>35421,4</b>	18289,5	235,0	1141,6	
		C	<b>33681,9</b>	14664,2	5226,6	432,2	
		D	<b>35426,4</b>	24308,3	1092,4	712,1	
	GRUPOS DIABÉTICOS	GD1	A	<b>27240,9</b>	149,4	2314,4	14110,3
			B	<b>32356,1</b>	784,3	1742,3	13817,6
C			<b>35245,0</b>	1230,0	2326,0	31689,1	
D			<b>16500,7</b>	1294,5	2802,5	12403,8	
E			<b>22270,0</b>	2496,6	2249,3	14102,9	
F			<b>33707,2</b>	5516,2	9070,7	15937,6	
GD2		A	<b>34187,0</b>	12621,0	17400,0	1196,3	
		B	<b>33458,3</b>	13878,5	14554,5	1642,4	
		C	<b>28302,9</b>	12998,4	13142,6	161,5	
		D	<b>28487,3</b>	18402,5	8635,7	749,7	
		E	<b>33386,2</b>	18369,9	32979,5	3019,0	
		F	<b>28570,5</b>	18826,6	9598,3	45,8	
GD3		A	<b>28722,6</b>	22367,0	5853,3	276,3	
		B	<b>30428,3</b>	20873,8	8982,3	0,0	
		C	<b>27207,1</b>	21547,2	2230,7	1231,8	
		D	<b>29806,0</b>	18352,4	8899,2	451,9	
		E	<b>29922,1</b>	25160,8	4761,4	0,0	
		F	<b>30066,5</b>	21544,4	7699,2	219,2	
GD4		A	<b>22953,3</b>	17049,9	4425,5	1477,8	
		B	<b>30697,3</b>	24051,6	6201,7	443,0	
	C	<b>29053,9</b>	22582,2	6148,0	323,6		
	D	<b>23244,1</b>	17309,1	5831,8	103,1		
	E	<b>22865,6</b>	19374,6	3491,0	0,0		
	F	<b>23485,5</b>	17001,4	6303,9	180,2		

**Apendice 2. peso inicial, peso final, glicemia e FA (GD)****Grupo GD1**

<b>Animal</b>	<b>Peso inicial</b>	<b>glicemia</b>	<b>F.A.</b>	<b>Peso final</b>
A	274,56	289	294	271,85
B	312,21	584	24	216,95
C	215,36	645	712	217,16
D	257,45	394	26	197,99
E	274,10	498	1535	270,84
F	261,23	526	850	257,70

**Grupo GD2**

<b>Animal</b>	<b>Peso inicial</b>	<b>glicemia</b>	<b>F.A.</b>	<b>Peso Final</b>
A	288,15	234	261	317,94
B	277,66	560	958	265,51
C	240,87	567	704	244,78
D	236,11	619	916	222,35
E	300,74	449	453	297,70
F	238,44	697	655	194,00

**Grupo GD3**

<b>Animal</b>	<b>Peso inicial</b>	<b>glicemia</b>	<b>F.A.</b>	<b>Peso Final</b>
A	259,97	514	905	236,94
B	285,66	575	847	236,42
C	254,55	536	667	262,89
D	286,97	396	964	312,22
E	258,15	542	795	240,02
F	287,72	599	815	278,36

**Grupo GD4**

<b>Animal</b>	<b>Peso Inicial</b>	<b>glicemia</b>	<b>F.A.</b>	<b>Peso Final</b>
A	238,35	563	1102	237,85
B	376,73	505	600	291,90
C	314,78	275	175	274,19
D	261,43	228	518	311,78
E	252,01	558	777	315,76
F	317,21	526	820	293,46

**Apêndice 3. peso inicial, peso final, glicemia e FA (GC)****Grupo GC 1**

<b>Animal</b>	<b>Peso inicial</b>	<b>glicemia</b>	<b>F.A.</b>	<b>Peso Final</b>
A	338,21	124	269	341,25
B	374,55	129	313	372,95
C	284,77	137	281	287,85
D	329,54	141	279	332,76
E	280,99	120	306	271,19

**Grupo GC 2**

<b>Animal</b>	<b>Peso inicial</b>	<b>glicemia</b>	<b>F.A.</b>	<b>Peso final</b>
A	330,12	145	170	332,06
B	389,61	171	295	383,46
C	357,91	148	316	361,83
D	349,21	150	314	347,96
E	350,25	142	342	342,75

**Grupo GC 3**

<b>Animal</b>	<b>Peso inicial</b>	<b>glicemia</b>	<b>F.A.</b>	<b>Peso final</b>
A	365,35	150	194	349,39
B	354,73	140	216	382,56
C	369,78	176	175	394,73
E	369,40	152	241	375,00

**Grupo GC 4**

<b>Animal</b>	<b>Peso inicial</b>	<b>glicemia</b>	<b>F.A.</b>	<b>Peso final</b>
A	393,33	158	362	396,06
B	305,46	58	376	361,66
C	364,09	69	330	388,85
D	337,71	62	385	379,57

---

**Apêndice 4 peso inicial, peso final, glicemia e FA****Grupo controle interno**

<b>Animal</b>	<b>Peso inicial</b>	<b>Glicemia</b>	<b>F.A.</b>	<b>Peso final</b>
C	274,24	690	652	260,54
D	266,30	219	262	259,76
E	384,15	593	611	373,35