

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

ESTUDO DA FRAGILIDADE EM FÊMURES DE RATOS
DIABÉTICOS PELA ANÁLISE DENSITOMÉTRICA E
BIOMECÂNICA

Cristiane Nalin Manaia
Fisioterapeuta

Araçatuba-SP
2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

ESTUDO DA FRAGILIDADE EM FÊMURES DE RATOS
DIABÉTICOS PELA ANÁLISE DENSITOMÉTRICA E
BIOMECÂNICA

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia – UNESP, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

Cristiane Nalin Manaia
Orientador: Prof. Adj. Mário Jefferson
Quirino Louzada

ARAÇATUBA – SP
2009

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

M266a Manaia, Cristiane Nalin
Estudo da fragilidade em fêmures de ratos diabéticos pela
análise densitométrica e biomecânica / Cristiane Nalin Manaia. -
Araçatuba : [s.n.],
2009
59 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, 2009
Orientador: Prof. Mário Jefferson Quirino Louzada

1. Densidade mineral óssea 2. Densidade radiográfica 3.
Diabetes mellitus tipo 1 3. ensaio mecânico 4. Estreptozotocina

CDD 636.0896

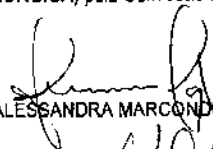
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: estudo da fragilidade em fêmures
de ratos diabéticos pela análise
densitométrica e biomecânica

AUTOR: CRISTIANE NALIN MANAIA

ORIENTADOR: Dr. MARIO JEFFERSON QUIRINO LOUZADA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL
(FISIOPATOLOGIA MÉDICA E CIRÚRGICA) pela Comissão Examinadora.


Dr.ª ALESSANDRA MARCONDES ARANEGA


Dr.ª STELA MARCIA MATTEILO GONÇALVES ROSA


Dr. MARIO JEFFERSON QUIRINO LOUZADA

DATA DA REALIZAÇÃO: 15 de dezembro de 2009.


Presidente da Comissão Examinadora
Dr. MARIO JEFFERSON QUIRINO LOUZADA
- Orientador -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Cristiane Nalin Manaia – nascida em 21 de março de 1983, na cidade de Araçatuba– SP, Graduação em Fisioterapia, 2005 pela Faculdades Integradas de Santa Fé do Sul , FUNEC, Santa Fé do Sul/SP. Pós-graduação em Músculo Esquelético pela Faculdade de Medicina de Rio Preto FAMERP, São José do Rio Preto/SP. Aluna do curso de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Campus de Araçatuba; Araçatuba/SP.

A Deus

*Eu pedi Força...
e Deus me deu Dificuldades para me fazer forte.
Eu pedi Sabedoria...
e Deus me deu Problemas para resolver.
Eu pedi Prosperidade...
e Deus me deu Cérebro e Músculos para trabalhar.
Eu pedi Coragem...
e Deus me deu Perigo para superar.
Eu pedi Amor...
e Deus me deu pessoas com Problemas para ajudar.
Eu pedi Favores...
e Deus me deu Oportunidades.
Eu não recebi nada do que pedi...
Mas eu recebi tudo de que precisava!*

Dedico este trabalho a Deus, aos
Meus pais e ao meu orientador
Prof. Mário Jefferson Quirino
Louzada, pelo alicerces nesta etapa
sonhada e cumprida em minha vida

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS, por ter me dado todas as condições e a força que as vezes faltavam para sempre prosseguir em meus sonhos, dando-me uma família maravilhosa, os amigos companheiros que sempre estiveram presentes nesta minha caminhada, e mesmo as pessoas que não acreditavam em mim que me fizeram lutar mais ainda e alcançar meus objetivos.

Ao meu orientador **Mário Jefferson Quirino Louzada**, pela dedicação, convivência, ensinamento e apoio, sem a qual este trabalho não teria sido possível. Agradeço por ter aceitado ser meu orientador, e ter me ensinado o real valor de respeito, admiração e amizade. Obrigada por ter acreditado em mim, ao senhor, todo meu respeito e gratidão.

A professora **Alessandra Marcondes Aranega**, pelo carinho, amizade, compreensão e ajuda incansável. Sendo um grande exemplo de amor à pesquisa, determinada, competente, e não medindo esforços. Sua disposição para o ensino, que contribuiu marcadamente para a minha formação. Muito obrigado pela paciência e confiança em mim depositada. E me proporcionado a realização desse grande sonho. Você é muito especial!

A professora **Doris Hissako Sumida**, pela ajuda e dedicação, nesse trabalho.

Aos meus pais **Gilberto e Fátima** por terem sido minha base e meu alicerce em todos os momentos. Pelo grande amor, carinho e preocupação dedicados a mim, pelo apoio e por possibilitarem a realização desse grande sonho.

Ao meu irmão, **Ricardo** e a minha cunhada **Nice**, seres humanos especiais, exemplo de luta e amor. Obrigada pelo estímulo e presença nas dificuldades e conquistas.

As minhas amigas **Adriana, Bruna, Cintia, Fernanda, Juliana, Ligia, Marianna, Milena, Mirela, Nandressa, Natali, Thalita** e as minhas primas **Bruna, Renata**, sem as quais minha vida não seria completa. Acredito que não tenham idéia do quanto são importantes para mim.

Aos amigos que adquiri nesse mestrado sendo sempre presentes: Prof. **Sérgio Diniz**, Prof. **Wagner Pedro**, Prof. **Antônio, Pedrão, Alexandre**.

Aos amigos que me ajudaram muito vocês foram essências nessa fase da minha vida, foram anjos colocados por Deus: **Bruninha, Priii, Jú, Natalia**. E aos que não nos encontrávamos muito mas quando nos reunimos era aquela festa **Dú, Zé Cavalo**. Adoro todos!

Priii, obrigada pela ajuda incansável, uma pessoa sem igual, que a conheço desde a época da faculdade, fomos do mesmo grupo de estágio. A qual me ensino muito, me deu altos conselhos, adoro esses conselhos, apesar que não costumava segui-los. Obrigada por existir!

Bruca, a pessoa que ajuda sem medir esforços, não sabe falar não. Uma pessoa doce que fala fininho, mas que eu amo muito! Obrigada por tudo que você fez por mim!

Ao **Albanir** que me cedeu os ossos, sem eles essa pesquisa não teria sido realizada! E sempre me ajudou quando precisei de sua ajuda! Obrigada!

A todos meus amigos e familiares pelo apoio e incentivo.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVO	18
3 REVISTA DA LITERATURA	19
3.1 Tecido Ósseo.....	19
3.2 Diabetes Mellitus.....	21
3.3 Tecido Ósseo e Diabetes.....	25
4 MATERIAL E METODOS	27
4.1 Variáveis Analisadas.....	29
4.1.1 Densitometria Óssea - DXA	29
4.1.2 Densidade Radiográfica - DR	31
4.1.3 Ensaio Mecânico – Flexão em três pontos	32
4.2 Análise Estatística	34
5 RESULTADOS	35
5.1 Densitometria Óssea - DXA.....	35
5.2 Densidade Radiográfica - DR	36
5.3 Ensaio Mecânico.....	37
6 DISCUSSÃO	39
7 CONCLUSÃO	44
REFÊNCIAS	45
ANEXO A Dados Relativos à Densitometria Óssea	55
ANEXO B Dados Relativos à Densidade Radiográfica	56

ANEXO C	Dados Relativos ao Ensaio Mecânico	57
ANEXO D	Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa)	58
ANEXO E	Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa)	59

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Corte da cauda do animal para obtenção de amostra de sangue	28
FIGURA 2 - Glicosímetro Portátil.....	28
FIGURA 3 - Densitômetro DPX-ALPHA.....	29
FIGURA 4 – Foto ilustrativa da tela do computador onde se pode verificar o programa operacional para a análise de dados	30
FIGURA 5 – Equipamento Digora [®] utilizada para densitometria radiográfica	31
FIGURA 6 – Exemplo de teste de flexão em três pontos onde se pode observar o fêmur apoiado recebendo a força	33
FIGURA 7 – Esquema da curva Força X Deslocamento obtida no ensaio mecânico	33
FIGURA 8 – Média e desvio padrão do CMO (g) observados nos fêmures do grupo diabético e controle.....	35
FIGURA 9 – Média e desvio padrão da Área (cm ²) observados nos fêmures do grupo diabético e controle.....	36
FIGURA 10 – Média e desvio padrão da DMO (g/cm ²) observadas nos fêmures do grupo diabético e controle.....	36

FIGURA 11 – Média e desvio padrão da Densitometria Radiográfica (mmAl) observados nos fêmures do grupo diabético e controle.....	37
FIGURA 12 – Média e desvio padrão da $F_{\text{máx.}}(N)$ observadas nos fêmures do grupo diabético e controle.....	37
FIGURA 13 – Média e desvio padrão da Rigidez observadas nos fêmures do grupo diabético e controle.....	38

ESTUDO DA FRAGILIDADE DE FÊMURES DE RATOS DIABÉTICOS PELA ANÁLISE DENSITOMÉTRICA E BIOMECÂNICA

RESUMO: Diabetes é uma desordem metabólica que interfere no tecido ósseo. Objetivou-se avaliar a fragilidade de fêmures de ratos diabéticos tipo 1 (DM1), pela densitometria e ensaio biomecânico. Foram utilizados 22 animais (*Rattus novogicus, albinus*, Wistar), com aproximadamente 250 gramas, divididos em grupo: Controle e Diabetes aleatoriamente. A DM1 foi inoculada pela estreptozotocina dissolvida em tampão citrato a 0,01M, pH 4,5, na concentração de 35mg/Kg na via peniana. Após 4 semanas da indução, foram sacrificados e os fêmures desarticulados. Para análise densitométrica utilizou-se densitômetro DPX Lunar TM, para densidade radiográfica o sistema digital Digora[®]. No ensaio mecânico usou a máquina universal de ensaio EMIC[®] na região diafisária do fêmur. Os resultados passaram por análise estatística, teste t de Student, paramétrico e não pareado, onde o Conteúdo Mineral Ósseo (g), Densidade Mineral Óssea (g/cm²), Densidade Óssea (mmAl), Força Máxima (N) observadas nos fêmures de portadores de diabetes foi inferior ao grupo controle comprovado estatisticamente. Na Rigidez (x10³N/m) e na Área (cm²) não houve diferença estatística. Conclui-se que o diabetes tipo 1 causou fragilidade nos fêmures dos ratos, reduzindo sua densidade mineral e consequentemente sua resistência mecânica.

Palavras-Chave: densidade mineral óssea, densidade radiográfica, diabetes tipo 1, ensaio biomecânico, estreptozotocina.

STUDY OF FRAGILITY IN RATS FEMURS DIABETES BY ANALYSIS DENSITOMETRY AND BIOMECHANICAL

SUMMARY: Diabetes is a metabolic disorder that interferes with bone mass reducing the minerals density and consequently its mechanical strength. Our objective was to evaluate the femurs fragility in rats with type 1 diabetes (DM1) by densitometry and biomechanical tests. A total of 22 animals (*Rattus novogicus*, *Albinus*, *Wistar*), with approximately 250 grams were divided into group: Control and Diabetes. In-group Diabetes animals received streptozotocin dissolved in citrate buffer 0.01 M, pH 4.5, at a concentration of 35 mg/kg single dose in the penile vein. After 4 weeks of induction, the animals were sacrificed and the femurs were disarticulated for biomechanical analysis (Maximum Strength and stiffness) and densitometric analysis (Bone Mineral Density, Bone Mineral Content and Area). For densitometric analysis was used densitometer Lunar DPX™ for the radiographic density digital Digora®. The biomechanical analysis used the universal testing machine EMIC® in the femoral shaft. The results passed through statistical analysis, Student t test, parametric and non-paired where of bone mineral content (g), bone mineral density (g/cm²), Bone Density (mmAl) Maximum Force (N) observed in the femurs of diabetic patients was lower than the control group accused significative differences. In Stiffness (x10³N/m) and Area (cm²) there was no statistical difference.. Concluded that type 1 diabetes has caused weakness in the femurs of mice, reducing its mineral density and consequently its mechanical strength.

Keywords: bone mineral density, radiographic density, type 1 diabetes, biomechanical test, streptozotocin.

1 INTRODUÇÃO

O interesse em pesquisar características biomecânicas e propriedades físicas dos ossos de diabéticos se originou em razão da necessidade de avaliar o quanto o diabetes interfere no desenvolvimento da estrutura óssea sendo esta uma das deficiências mais comuns encontradas na população humana, atingindo aproximadamente 151 milhões de pessoas mundialmente (ZAGURY, 2004) sendo 5% a 10% diabetes tipo 1 (DM1) e 90% a 95% diabetes tipo 2 (DM2) dos atingidos (BROTMAN; GIROD, 2002; VERHAEGHE et al., 2002).

Diabetes Mellitus é uma desordem metabólica, cuja característica é a deficiência absoluta ou relativa de insulina que altera o funcionamento de tecidos como: fígado, músculos esqueléticos, tecido adiposo, tecido cartilaginoso e ósseo, incluindo o sistema renal e cardiovascular (GOMES, 2005; BROTMAN; GIROD, 2002; VERHAEGHE et al., 2002).

O crescimento ósseo endocondral e a remodelação óssea mostram significativas alterações no DM1 e DM2. A DM1 é causada pela destruição auto-imune das células beta do pâncreas, assim a uma deficiência absoluta na produção de insulina; já a DM2 é a forma mais prevalente de diabetes, sua fisiopatologia varia largamente entre hiper e hipoinsulinemia (BROTMAN; GIROD, 2002; PIETSCHMANN et al., 2007; VERHAEGHE et al., 2002).

Segundo Bezerra, (2005), o DM1, está associado a uma diminuição do tecido ósseo, com aumento a predisposição à fraturas.

A osteoporose é a diminuição da massa óssea por unidade de volume do osso mineralizado (HODGSON, 2005) e seus efeitos aparecem na terceira idade, mas a predisposição se inicia na infância e adolescência onde ocorre a máxima incorporação de conteúdo mineral ósseo de até 80% (GOLDBERG, SILVA, 2004).

A expectativa de vida dos diabéticos tem aumentado devido à cuidados médicos, uso de fármacos, prática de atividades físicas, dentre outras. A maior expectativa de vida gera aumento na incidência de fragilidade óssea. Existem

evidências de que pacientes com DM1 têm alto risco para certos tipos de fraturas (MEIER et al., 2005; SZULC et al., 2007).

Segundo Reddy et al., (2001), pacientes com diabetes mellitus apresentam alto risco para fraturas por causa do comprometimento da integridade estrutural comparando com indivíduos saudáveis. Nesse estudo avaliou a integridade estrutural do fêmur e da tíbia em ratos diabéticos induzidos pela estreptozotocina. Com os resultados obtidos garantem que o diabetes esta correlacionada com a mecânica de deteriorização do osso, apresentando assim ossos com a integridade biomecânica menor.

O principal efeito na patogênese das anormalidades ósseas na deficiência de insulina relaciona-se à formação óssea. Em modelos experimentais de DM1 foi encontrado diminuição no número de osteoblastos e no “turnover ósseo” – remodelação óssea, acompanhado por redução no conteúdo mineral (MEIER et al., 2005; SZULC et al., 2007).

Com a crescente longevidade, obesidade e o sedentarismo da população, a prevalência da DM tem aumentado. Diante disso, é imprescindível que os profissionais estejam cientes dos danos causados pelo diabetes à estrutura óssea, especialmente quando necessitarem avaliar o nível de sua fragilidade (LERARIO, 2004).

A fragilidade óssea procede da redução da síntese protéica, diminuindo as fibras colágenas, resultando em um osso quebradiço e suscetível a fraturas. A perda da massa óssea causa deformidades na flexibilidade, força muscular, equilíbrio, coordenação, que provocam risco elevado para quedas, declínio funcional, podendo ocasionar dor, rigidez (TORTORA e GRABOWSKI, 2002).

Esse trabalho objetivou quantificar a fragilidade óssea nos ratos diabéticos através do ensaio biomecânico e densitométrico.

2 OBJETIVO

O objetivo desse trabalho foi verificar, por meio de ensaio mecânico e densitométrico, se o diabetes tipo 1 interfere na fragilidade óssea de fêmures de ratos machos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Tecido Ósseo

O modelamento ósseo ocorre na fase de desenvolvimento neonatal com aumento do tecido esquelético e o remodelamento ocorre para a maturação óssea continuar ou se contrapor a reabsorção óssea (CENTRELLA et al., 1990).

O tecido ósseo é formado por matriz e células sendo elas os osteócitos, os osteoblastos, os osteoclastos. Os **osteoblastos** são células de origem mesenquimal e estão localizadas nas margens ósseas com a função de produzir matriz orgânica, colágeno e glicoproteínas. Os **osteócitos** são osteoblastos encapsulados, que após a maturação, ficaram presos dentro da matriz mineralizada, mas que ainda mantém contato com outras células através de ramificações do citoplasma, mantendo assim uma funcionalidade fisiológica do tecido tendo por função a manutenção da integridade da matriz óssea. Os **osteoclastos** são responsáveis pela reabsorção óssea, mantendo uma constante remodelação óssea; são células gigantes multinucleadas. Em sinergia com os osteoblastos promovem a remodelação óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999). O balanço entre os osteoclastos e osteoblastos é necessário, porque se a atividade dos osteoclastos predominarem o osso torna-se mais frágil, mas se a atividade dos osteoblastos prevalecerem o osso torna-se mais forte e denso (GUYTON; HALL, 2006).

Os principais hormônios reguladores do metabolismo ósseo são: hormônio da paratireóide (PTH), $1,25(\text{OH})_2$ vitamina D, calcitonina, hormônio do crescimento (GH), glicocorticóides, hormônios tireoidianos, insulina, hormônios gonadais, reguladores locais (LORENZO et al., 2008).

A matriz óssea é uma substância do tecido ósseo que contém lacunas onde de encontram os osteócitos. Ela é formada por uma parte inorgânica correspondente a 65%, que proporciona resistência e rigidez ao osso e outra

parte orgânica que corresponde a 35% representada pela flexibilidade óssea. A inorgânica é principalmente constituída por íons de cálcio e fosfato, mas pode também encontrar íons de potássio, magnésio, citrato, sódio e bicarbonato. Em estudos de difração de raios x o cálcio e o fósforo formam cristais os quais apresentam estrutura de hidroxiapatita. A parte orgânica da matriz é constituída por grande quantidade de fibras colágenas tipo I (95%) e uma pequena quantidade de glicoproteínas e proteoglicanas. As fibras de colágeno estendem principalmente ao longo das linhas de forças de tensão, o que proporciona ao osso sua vigorosa resistência à tração (GUYTON; HALL, 2006).

O tecido ósseo é constituído por 80% de osso cortical e 20% de osso trabecular (BERNE; LEVY, 1996). O osso cortical é compacto encontrado em ossos longos, colo femoral e na parte distal do rádio. O trabecular é formado por inúmeras traves ósseas com aspecto esponjoso, suscetível às alterações da massa óssea, estando presente nas vértebras, crânio e pélvis (AIRES, 1999).

Na estrutura óssea ocorre o depósito de cálcio, fósforo e em menor quantidade sódio, magnésio e potássio. Esses minerais misturados com a água fazem com que haja formação de um tecido rígido (HODGSON, 2005). O osso é um tecido vivo que se renova durante toda a vida, sendo auto remodelador (turnover ósseo), alterando suas propriedades e geometria em resposta às mudanças na demanda mecânica (LIRANI, 2004, HODGSON, 2005). Os osteoblastos são responsáveis pelo processo de formação óssea, enquanto os osteoclastos pelo processo de reabsorção óssea (GUYTON; HALL, 2006).

As modificações são devido aos processos de crescimento, desenvolvimento, remodelação óssea, por causa dos danos causado pelo desgaste ósseo (AIRES, 1999; HODGSON, 2005).

A remodelagem é um dos principais mecanismos da manutenção da homeostasia do cálcio no processo de renovação óssea nos adultos. Aproximadamente 15% da massa óssea total é renovada a cada ano com o processo de remodelagem (BERNE; LEVY, 1996).

A deposição de osso é parcialmente regulada pela quantidade de tensão mecânica a ele imposta, os ossos com maior tensão e maior curvatura proporcionam osteoblastos mais ativos, portanto, são mais fortes e mais resistentes.

Muitas atividades do organismo são reguladas pelos hormônios produzidos pelo sistema endócrino. A deficiência desse está associada com o crescimento e à manutenção óssea, podendo interferir na remodelação óssea; é o que ocorre na DM1 que está ligada à perda da massa óssea (HODGSON, 2005).

3.2 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus é o termo que se refere a um grupo de desordens metabólicas complexas dos carboidratos, lipídeos e proteínas. Além da hiperglicemia, possui como sintomatologia: polidipsia, poliúria e glicosúria.

Em 1500 a.C, quando se descobriu o primeiro caso de diabetes, o termo Diabetes originou-se da palavra grega “cifão” que significa tubo para aspirar água. Tal nome se deve à própria sintomatologia da doença, por provocar sede intensa e grande quantidade de urina. O diabetes só adquire a terminologia *mellitus* no século I d.C., *Mellitus*, em latim, que significa mel, pelo fato da urina ser considerada “doce” (KAHN et al., 2009).

O diabetes é um problema de importância crescente na saúde pública em vários países do mundo sendo que nos Estados Unidos são estimados cerca de 20 milhões de diabéticos, aproximadamente 7% da população. Na América Latina a prevalência em adultos estipula-se entre 6% a 8% (BARCELÓ; RAJPATHAK, 2001). Segundo a sociedade brasileira de diabetes, no Brasil existem 8 milhões de portadores de diabetes.

O diabetes é um distúrbio desencadeado pela falta ou pela resistência da secreção e/ou ação da insulina. Os tipos mais comuns da doença descritos na literatura são o tipo 1 e o tipo 2. O tipo 1 ocorre entre 5% a 10% dos casos e

geralmente resulta da destruição auto-imune das células beta do pâncreas levando assim a uma deficiência absoluta na produção de insulina (NORDIN; FRANKEL, 2003; REPORT, 2000).

No DM1, é caracterizado pela produção de anticorpos à insulina (auto-imune), por motivo desconhecido, o organismo sofre uma desordem metabólica, e suas células de defesa atacam e destroem as células do pâncreas, ocasionando a diminuição ou a falta de insulina, fazendo com que a glicose não entre nas células permanecendo na circulação sanguínea (LUCÍRIO; WUSTHOF, 2000).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2003), o DM1 ocorre quando o sistema imunitário acomete as células beta do pâncreas levando a uma diminuição ou absoluta deficiência de insulina, sendo mais frequente na fase infanto-juvenil, por volta dos 7 anos, por um processo auto-imune ou idiopático. Que é caracterizado pela produção de anticorpos à insulina, mas também pode ocorrer em pessoas com mais idade, muitas vezes por fatores hereditários não estando relacionado com hábitos de vida ou alimentares errôneos, com sintomatologia definida onde os enfermos perdem peso.

Com relação ao diabetes tipo II, os níveis de insulina variam largamente entre hiper (fase pré-diabética) e hipoinsulinemia (fraco diabetes). Estudos epidemiológicos indicam que além dos fatores genéticos, os fatores ambientais, como aumento de peso e o sedentarismo, estariam relacionados a uma redução da sensibilidade periférica à insulina (resistência) que, por sua vez, está relacionado ao aumento da secreção compensatória de insulina. Assim, a pessoa pode permanecer com aumento de insulinemia e ainda com glicemia normal em jejum e até mesmo pós-alimentar por período prolongado. Caso este processo persista, causará redução gradual da capacidade do pâncreas de fabricar insulina. Na fase seguinte, a glicemia começa a aumentar principalmente após a alimentação (hiperglicemia pós-prandial). Finalmente, a glicemia em jejum se eleva e a hiperglicemia mantida pode agravar a glicotoxicidade em todos os tecidos e também nas células que fabricam insulina no pâncreas, podendo reduzir a produção de insulina (hipoinsulinemia). Assim,

toda seqüência termina em glicemia de jejum aumentada, ou seja, aparece o diabetes como é conhecido (COSTA; ALMEIDA NETO, 2004; PIETSCHMANN et al., 2007).

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) apresenta-se com capacidade insuficiente na absorção de glicose por causa do mau funcionamento ou diminuição dos receptores das células alvo, porém o pâncreas continua produzindo a insulina normal. Tendo como fatores cooperativos o mal hábito alimentar e a vida sedentária, o DM2 faz com que o organismo fique resistente a ação da insulina chegando as vezes a ter que fazer terapia com insulina para um controle metabólico adequado. Tal situação ocorre em pessoas mais velhas (acima dos 40 anos) é conhecida por *Diabetes Tardios*, apresentando lenta e progressiva resistência dos músculos, fígado e tecido adiposo (GUYTON; HALL, 2006).

A gordura afeta o fígado, que desempenha o papel de armazenar a glicose que não é utilizada no organismo. Se comprometido, pode retornar à corrente sangüínea um açúcar modificado, imperfeito, sem condições de introduzir-se nas células. Outro fato propenso no diabetes é a senilidade, pois com a velhice, as células perdem de forma natural a habilidade de capturar a glicose na corrente sangüínea. Acredita-se que, acima dos 60 anos, aproximadamente 17% das pessoas tornem-se diabéticas (LUCÍRIO; WUSTHOF, 2000).

Outros tipos de diabetes menos comuns, assim, como o tipo II. No diabetes **Gestacional** ocorre a intolerância a glicose durante a gestação, podendo ou não permanecer após o parto. No tipo **Insipidus** ocorre à deficiência do hormônio antidiurético e não há aumento da glicose sérica, o que leva ao aumento da eliminação de urina.

Diabetes Mellitus relaciona-se a múltiplos fatores tais como obesidade, sedentarismo, hereditariedade, estresse, vírus, idade, doenças pancreática e hepática (GOMES, 2005).

Para reconhecer o papel da insulina, é necessário observar que a glicose, ao penetrar na corrente sanguínea, é enviada as células onde ocorre a

oxidação celular para ser utilizada como energia. Essa glicose pode também ser armazenada no fígado, músculo e no tecido adiposo. O transporte da glicose da corrente sanguínea para o interior das células alvos depende da insulina que se localiza nos receptores das membranas celulares. Quando esse transporte não é possível pela ausência ou redução da insulina ocorre a hiperglicemia (MAHAN; KRAUSE, 1994).

O hormônio insulina, portanto, determina as modificações na homeostasia do meio interno, controla o metabolismo dos substratos energéticos, tem efeitos anticatabólicos e anabólicos que facilita a captação, utilização e armazenamento dos substratos (AIRES, 1999; DOUGLAS, 2006).

O controle da concentração de glicose no sangue é realizado por dois hormônios produzidos pelo pâncreas: a insulina e o glucagon. O pâncreas é uma glândula mista que apresenta função exócrina que através dos ácinos secretam enzimas digestivas no interior do duodeno e função endócrina do pâncreas que tem em sua estrutura as ilhotas de Langerhans que armazenam células das quais secretam hormônios como insulina pelas células beta, o glucagon pelas células alfa e as células delta que secretam somatostatina na circulação sanguínea (GOODNER; RUSSEL, 1965).

A insulina altera o potencial das membranas tornando-as permeáveis a glicose. O glucagon atua no metabolismo da glicose no fígado, estimulando a glicogenólise, a gliconeogênese. Estimula a utilização da glicose pelo músculo, aumenta a síntese da proteína e do glicogênio, estimula a captação de aminoácidos e reduz a proteólise, ocorrendo o débito de aminoácidos. No tecido adiposo, estimula a captação, síntese e esterificação de ácidos graxos e reduz a lipólise (BERNE; LEVY, 1996; GUYTON; HALL, 2006).

A concentração de glicose sanguínea em jejum é dentro da faixa de 80 a 90 mg/dl de sangue e após a refeição, comumente os valores não devem ultrapassar 160-180 mg/dl (GUYTON; HALL, 2006).

A insulina é um agente anabólico que promove a proliferação de osteoblasto, síntese de colágeno e a produção de fosfatase alcalina (DUARTE,

2005). Zhang et al., 2008 revelaram que o baixo teor de Ca, P, Mg, K, e Sr em diabéticos está associado com a diminuição da DMO.

O diabetes com o passar do tempo acomete alterações vasculares, por causa do mau controle metabólico e da perda óssea. No DM são elevadas as taxas de glicação (quando adere de glicose com proteína), sendo esse o acúmulo cruzado dos derivados da glicose nas fibras colágenas, e com isso, o tecido ósseo é um dos grandes acometidos (MAINARDES et al., 2007; REDDY, 2003;).

3.3 Tecido Ósseo e Diabetes

O DM1 está associado à redução do tecido ósseo, patologias como a microangiopatia, o déficit controle glicêmico, insulinopenia, fraca regulação do metabolismo mineral e desordens intrínsecas (DUARTE et al., 2005; VERHAEGHE; BOUILLON, 2002).

Segundo Duarte et al., (2005) e Brown; Sharpless, (2004), o diabetes mellitus induzido pela estreptozotocina diminui significativamente o número de osteoclastos e o volume de osso formado nos animais diabéticos comparado ao grupo controle. Como pode ser observado no estudo de Ivers et al. 2001; Vargas et al., 2003 a diminuição da massa óssea é propensa a riscos de fraturas em DM 1.

O tempo de evolução do diabetes tem influência negativa tanto na densidade mineral óssea quanto em parâmetros histomorfométricos no fêmur de ratos diabéticos aloxânicos como a espessura de trabéculas, distância intertrabecular e volume do osso trabecular. Estudos histomorfométricos em diabetes induzido por estreptozotocina mostraram que a formação óssea é muito baixa ou ausente, o que se aplicam em as todas as superfícies: trabecular-endostal, endocortical e periostal (BROWN; SHARPLESS, 2002; DUARTE et al., 2005; INZERILLO; EPSTEIN, 2004; VERHAEGHE; POILLON, 2002).

O osso é um tecido duro ou mineralizado que apresenta alta resistência sendo considerado apropriado para constituir o esqueleto, proteger e suportar órgãos assim como proporcionar flexibilidade corporal. A sua rigidez e resistência devem-se a alta impregnação mineral de matriz de osteóide particularmente de colágeno (DOUGLAS, 2006).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os ossos foram fornecidos por Borrasca, (2007), do departamento de cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial que utilizou os ratos em sua dissertação de acordo com os Princípios éticos na experimentação Animal o tendo o comitê de ética sob o protocolo nº. 2007-007842 apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista - UNESP / Campus de Araçatuba – SP, no dia 23 de outubro de 2007.

Essa pesquisa foi realizada no laboratório de biofísica, sendo aprovada pela Comissão de Ética na experimentação animal, sob protocolo nº. 2007-007842 da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus Araçatuba, no dia 08 de abril de 2009.

Foram utilizados 22 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), com massa corpórea aproximadamente de 250 gramas. Provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba e foram mantidos sob temperatura controlada (aproximadamente 24°C) e ciclos de luz-escuro de 12 horas durante todo o experimento. Foram alimentados com ração sólida e água à vontade, exceto nos períodos de jejum. Após o jejum alimentar de 14 - 16 horas antes da indução, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: controle e diabetes, com 11 animais cada, sendo que o diabetes recebeu inoculação de estreptozotocina (Sigma-Aldrich) dissolvida em tampão citrato a 0,01M, pH 4,5, na concentração de 35mg/Kg, protegida da luz, na veia peniana.

Segundo Goodner; Russel, 1965, após uma hora da indução via endovenosa dessa droga ocorre o aparecimento do diabetes. Porém os sinais clínicos da nova condição sistêmica começam a aparecer 24 horas após sua inoculação (ESTEVES, 2008).

O grupo controle recebeu inoculação de tampão de citrato via endovenosa. Previamente à coleta, os animais foram colocados em caixas de aquecimento para induzir a vasodilatação periférica.

A coleta do sangue para a determinação da glicemia foi realizada na cauda após corte com tesoura, a cerca de 2 milímetros de sua extremidade distal (FIGURA 1).

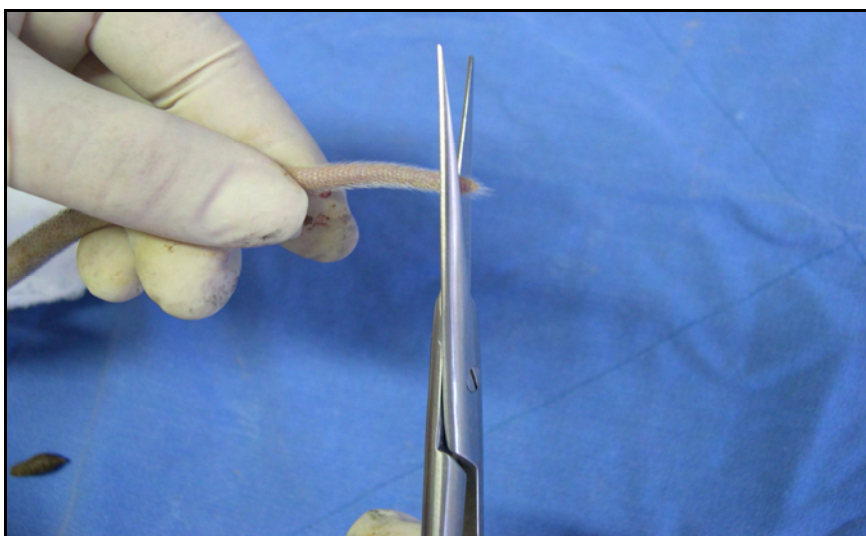


FIGURA 1 - Corte da cauda do animal para obtenção de amostra de sangue.

A glicemia de ambos os grupos foi avaliada cinco dias após tratamento e imediatamente antes do sacrifício, pelo mesmo mecanismo. Foi colhida uma gota de sangue da extremidade da cauda e a glicemia quantificada em glicosímetro portátil (Accu-Chek Advantage (Roche Diagnostica Brasil Ltda)) (FIGURA 2) calibrado. Considerou-se portador da DM ratos com glicemia superior a 350mg/dl.



FIGURA 2 – Glicosímetro Portátil.

Os animais foram sacrificados após quatro semanas da indução do diabetes com dose excessiva de ketamina e xilazina; os fêmures direito e esquerdo removidos, dissecados, identificados e guardados em frasco contendo soro fisiológico na solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9%, e armazenados em freezer -20°C para posterior análise.

4.1 Variáveis Analisadas

4.1.1 Densitometria Óssea - DXA

A densidade mineral óssea (DMO), em g/cm^2 , o conteúdo mineral ósseo (CMO), em g, e a área em cm^2 foram examinados em todos os fêmures dos animais. Para a análise densitométrica utilizou-se o densitômetro de dupla emissão de raios - X (DXA), modelo DPX-ALPHA¹ (FIGURA 3), com software especial para pequenos animais (FIGURA 4) (Marques, 2008).



FIGURA 3 - Densitômetro DPX-ALPHA.

¹ LUNAR™, processo Fapesp n. 04/13264-7

Os ossos foram submersos em um recipiente de plástico contendo 2 cm de profundidade de água para simular tecido mole. Em baixo do recipiente usou-se uma régua posicionadora normalmente utilizado em auxílio de antebraço de humanos para referenciar o ponto onde o osso permanecia. O terço médio do osso foi delimitado pelo aparelho o qual seria a área a ser percorrida pelo aparelho em um comprimento de 5 cm e uma largura de 4cm.

O laser do densitômetro que serve como guia de posicionamento foi ajustado acima do centro do osso onde se iniciou a captura da imagem. O obturador que fica abaixo do braço do scanner se abre permitindo que os raios x sejam emitidos. Durante o exame, o braço do scanner move-se até que a região delimitada seja avaliada pelo programa.

Após a captura das imagens os ossos foram analisados utilizando-se a ferramenta de análise manual (FIGURA 4). A área desejada para análise foi delimitada na região terço médio da diáfise do fêmur e esta foi contornada para obtenção dos valores de conteúdo mineral ósseo, densidade mineral ósseo.

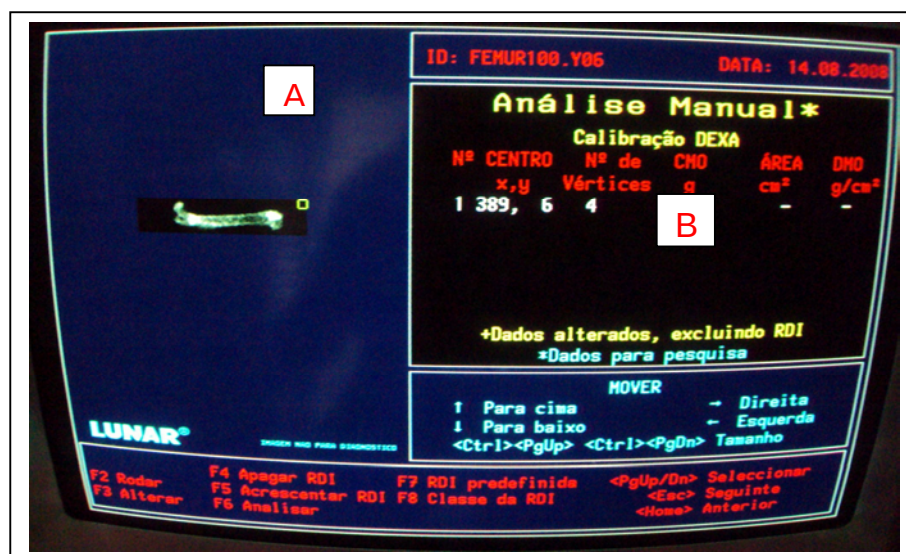


FIGURA 4 - Foto ilustrativa da tela do computador onde se pode verificar o programa operacional para a análise de dados. (A) é a imagem do osso capturado pelo aparelho que manualmente será delimitada a área estudada. (B) são os valores fornecidos pelo programa (CMO, Área, DMO) depois de delimitada a área.

4.1.2 Densidade Radiográfica - DR

Os fêmures foram radiografados pelo aparelho de raios X GE-100 (General Electric®, Milwaukee, EUA), operando com 60 Kvp, 8mA, 12 pulsos, com distância foco-filme de 20 cm e com incidência do foco de radiação perpendicular ao plano do filme-objeto (FIGURA 5).

O sistema digital Digora® avaliou a área regular da diáfise óssea (retângulo), as imagens digitalizadas pelo sistema Digora® e foram exportadas em formato TIFF (“Tagged Image File Format”).

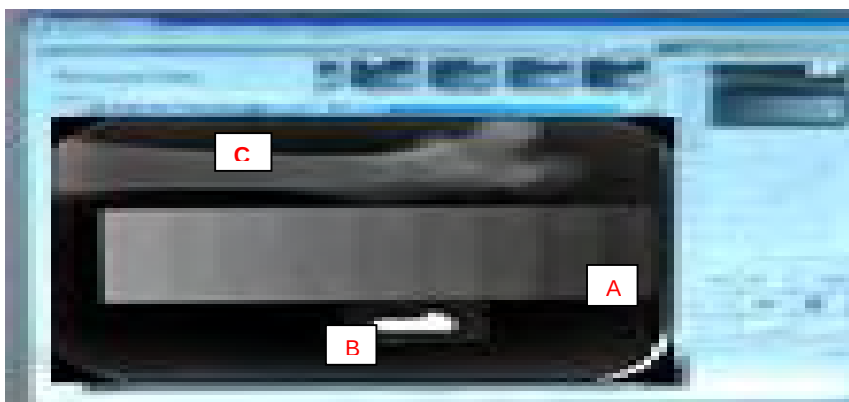


FIGURA 5 – Imagem obtida pelo sistema digital Digora, onde se observa a identificação (A) escada de alumínio utilizada como referência densitométrica (B) identificação do osso (C) fêmur

As imagens digitais dos fêmures juntamente com sua identificação e uma escada de alumínio de 9 degraus (TABELA 1), cada degrau com 5x25mm² de área usada como referencial densitométrico, foram obtidas utilizando placa óptica do sistema digital Digora® (Soredex, Orion Corporation, Helsinki, Finland). As placas ópticas foram então colocadas em scanner a laser do próprio equipamento Digora®, lidas e armazenadas no programa computacional do sistema e as densidades radiográficas foram medidas na

diáfise, numa área de 30x10 pixels, e nos degraus da escada de alumínio, numa área de 24x84 pixels.

Com os valores de espessura dos degraus da escada e os valores de densidade radiográfica (expressos em níveis de cinza - 256 tons) foi determinada uma equação, para cada radiografia, que serviu para calcular os valores de densidade óssea em milímetros de alumínio (mmAl) (LOUZADA et al., 1998; SALZEDAS et al., 2006).

TABELA 1 – Espessura de cada degrau da escada de alumínio.

Degrau	Espessura (mm)
1	0,70
2	1,10
3	1,60
4	2,25
5	3,23
6	4,15
7	5,00
8	6,10
9	6,90

4.1.3 Ensaio Mecânico - Flexão em três pontos

Os ossos foram submetidos ao ensaio mecânico destrutiva para análise de suas propriedades mecânicas após serem retirados do “freezer” e mantidos em refrigerador comum, por vinte e quatro horas. Algumas horas antes de serem testados foram mantidos em temperatura ambiente, para entrar em equilíbrio térmico com a sala onde estava a máquina de ensaio.

Para os ensaios mecânicos foi utilizada a máquina universal de ensaio EMIC® modelo DL 3000 (FIGURA 6).

A força foi aplicada a uma velocidade de 5 mm/min e registrada automaticamente pelo programa computacional pertencente à máquina. A distância entre os apoios foi de 20 mm e a célula de carga utilizada foi de 2000 N.

A partir da curva Força versus Deslocamento (FIGURA 7) foi obtida a força máxima admitida pelo tecido ósseo e calculada a rigidez, pela inclinação da curva na fase elástica.

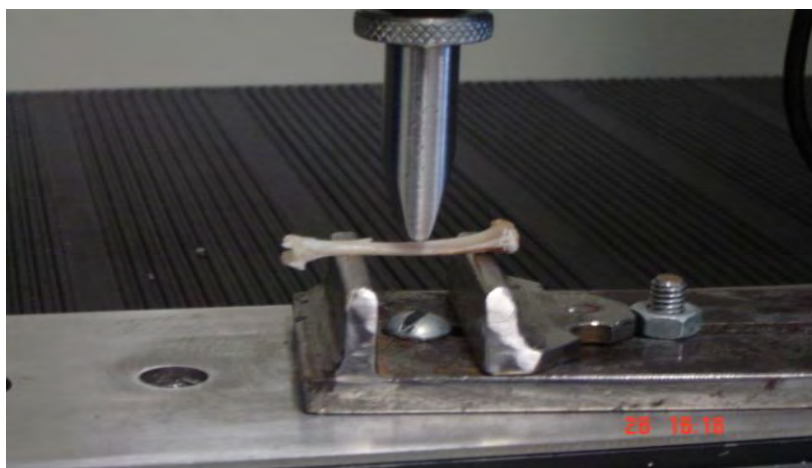


FIGURA 6 - Exemplo de teste de flexão em três pontos onde se pode observar o fêmur apoiado recebendo a força.

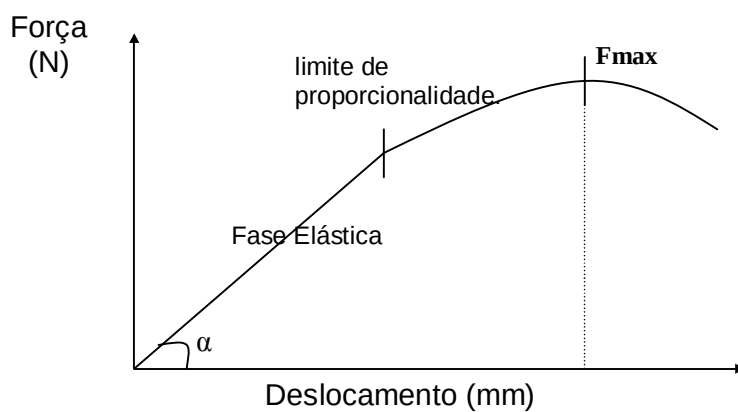


FIGURA 7 - Esquema da curva Força X Deslocamento obtida no ensaio mecânico.

4.2 Análise Estatística

Todas as variáveis foram submetidas por meio do teste t de Student, para comparar os grupos controle e diabético. A análise estatística foi realizada no programa *GraphPAAd Instat*[®] versão 3.06. O nível de significância adotada foi de 5%.

5 RESULTADOS

Os resultados da densitometria e ensaio mecânico encontrados para os fêmures direito e esquerdo (anexo 1) foram confrontados e não apresentaram diferenças significativas estão foram agrupados e o número amostral passou para 22 ossos em cada grupo.

5.1 Densitometria Óssea - DXA

A DMO (g/cm^2) dos fêmures do grupo Controle foi maior que no grupo Diabético (FIGURA 8) o mesmo podendo ser observado no CMO (g) (FIGURA 9) com diferença significativa $p=0,019$ e $p=0,0264$, respectivamente. Na área (cm^2) não houve diferença significativa $p=0,7255$ (FIGURA 10).

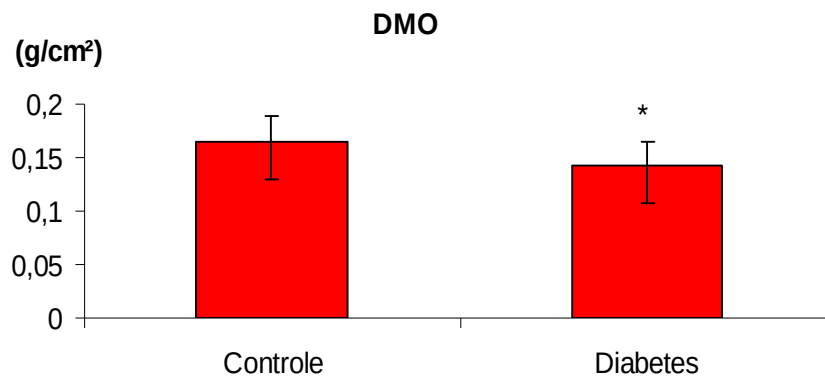


FIGURA 8 - Média e desvio padrão da DMO (g/cm^2) observadas nos fêmures do grupo diabético e controle.

* Estatisticamente significante.

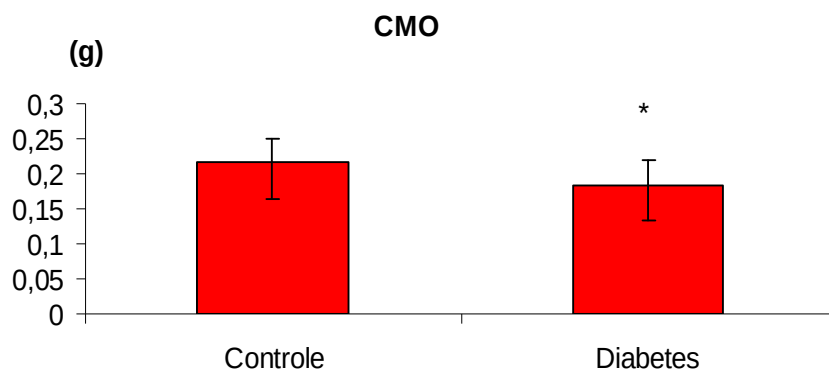


FIGURA 9 - Média e desvio padrão do CMO (g) observados nos fêmures do grupo diabético e controle.
* Estatisticamente significativo.

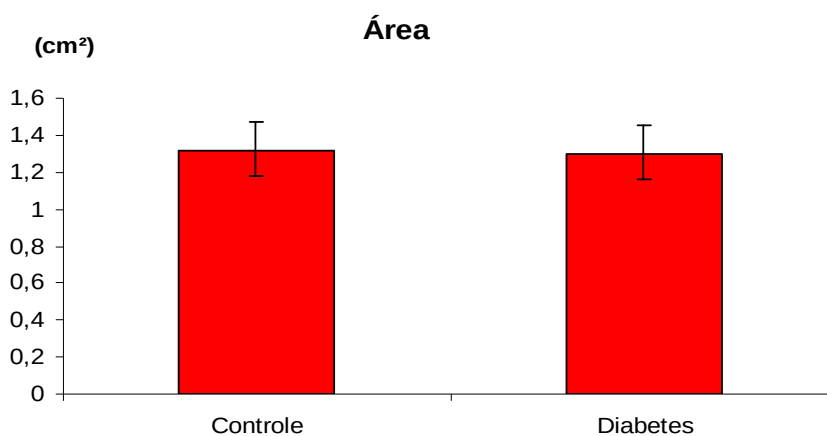


FIGURA 10 - Média e desvio padrão da Área (cm²) observada nos fêmures do grupo diabético e controle.

5.2 Densidade Radiográfica - DR

As médias e desvios padrão das densidades pela densitometria radiográfica (mmAl) no terço médio dos fêmures foram analisadas (FIGURA 11) e foi menor no grupo diabético com diferença significativa ($p=0,0112$).

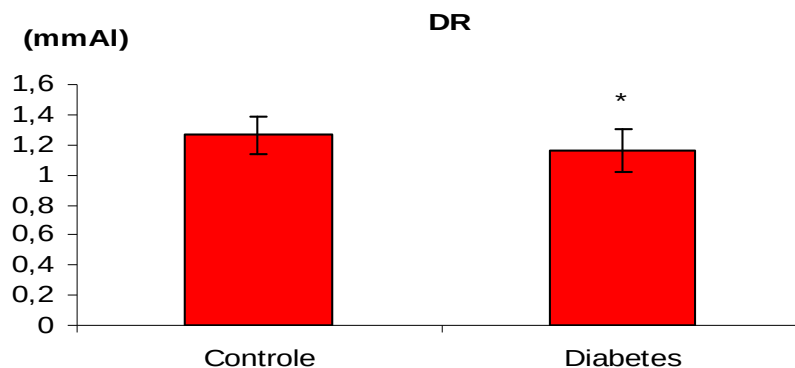


FIGURA 11 - Média e desvio padrão da Densidade Radiográfica (mmAl) observados nos fêmures do grupo diabético e controle.

* Estatisticamente significativa.

5.3 Ensaio Mecânico

Na FIGURA 12 os valores da média e desvio padrão na força máxima (N) foi menor no grupo Diabético com diferença significativa $p = 0,0137$. Na FIGURA 13 a rigidez não houve diferença significativa $p = 0,8026$.

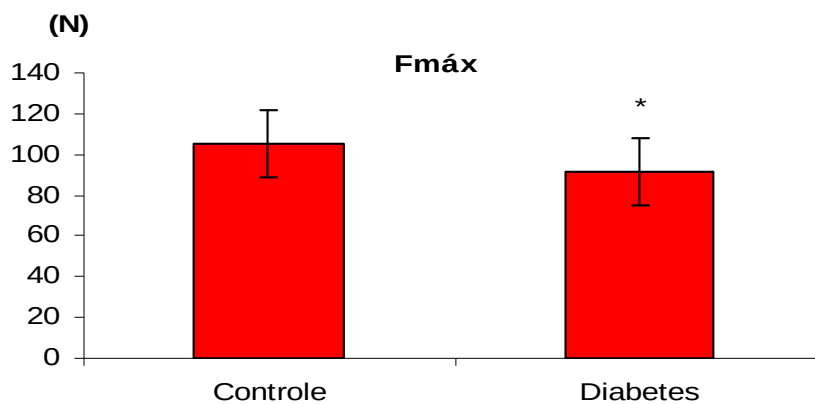


FIGURA 12 - Média e desvio padrão da Fmáx.(N) observadas nos fêmures do grupo diabético e controle.

* Estatisticamente significativa.

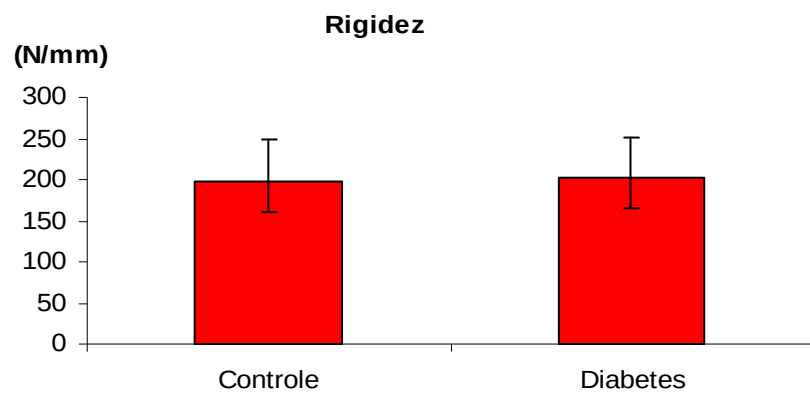


FIGURA 13 - Média e desvio padrão da Rigidez observada nos fêmures do grupo diabético e controle.

6 DISCUSSÃO

Na indução do diabetes, as drogas mais empregadas são Aloxana e a Estreptozotocina, com a capacidade de destruição das células pancreáticas. Oncogênica mais acessível é Aloxana que a Estreptozotocina, porém menos utilizada por apresentar dificuldades em manter os animais diabéticos em boas condições e por mais tempo (LUCIANO; MELLO, 1998).

A Estreptozotocina tem a função de bloquear a produção de insulina levando a hiperglicemia acarretando assim o diabetes mellitus tipo 1, pois ela diminui a ação da adenina-nicotinamida das células beta do pâncreas, inibindo a síntese de DNA pelas células beta das ilhotas de Langerhans, bloqueando a produção da insulina irreversivelmente levando ao DM. (CARVALHO, 2003; MENDEZ; RAMOS, 1994).

Na literatura, as concentrações de Estreptozotocina variam de 40mg/Kg (PEPATO et al., 1993, BOTOLIN, 2007), 50-60mg/Kg (MATTILA, 1998; GOMES, 2006), 45mg/Kg (FACCHINI, 2005) e 65mg/Kg (ROBBINS et al., 1980), dissolvidas em tampão citrato a 0,01M, pH 4,5 e as vias de administração podem ser a veia caudal, jugular, peniana entre outras. De acordo com o grau de glicemia desejada, a massa corpórea, a idade do animal a via de administração é eleita e a concentração é selecionada (PEPATO, 1992).

As concentrações diabetogênicas utilizadas na maioria dos estudos são iguais ou superiores a 40mg/Kg; porém Aranega, 2001, realizou um grupo piloto com concentração de 35 mg/Kg com administração pela veia peniana, com ratos de massa corpórea aproximadamente de 250g, onde verificou níveis glicêmicos superiores a 350mg/dl, apresentando os mesmos resultados que estudos com concentrações maiores. Concentrações maiores poderiam ter sido utilizadas obtendo-se níveis de glicemia ainda mais elevados, contudo, os animais de acordo com Aranega, 2001, corriam riscos de ficarem mais debilitados, podendo não suportar o tempo desejado da pesquisa.

Os resultados da influência da estreptozotocina na concentração de 35mg/Kg, sobre a massa corporal (g) dos ratos em relação ao tempo após administração da droga foi observado nesse experimento. O estado diabético interferiu no crescimento dos animais, deixando-os fracos ao longo dos dias após a inoculação da droga até que a eutanásia fosse realizada. A pele passou a adquirir a consistência flácida, sua aparência tornou-se cianótica, seus olhos perderam o brilho e escureceram discretamente. Com relação ao consumo hídrico e excreção urinária, observou-se sinais do diabetes como polidipsia, poliúria e polifagia, logo na primeira semana após a indução da estreptozotocina. Os animais inoculados com 35mg/Kg de estreptozotocina apresentaram um aumento significativo da glicemia em relação ao Grupo controle que recebeu injeção de tampão citrato. É oportuno lembrar que não foram considerados na amostra deste estudo os animais diabéticos não controlados com glicemias inferiores a 350mg/dl. A média da glicemia dos ratos controles realizada às 09h da manhã, sem a instituição do jejum, foi de 112,1 mg/dl enquanto que a do Grupo diabético foi de 442,17 mg/dl.

A escolha do ensaio mecânico adequado para o experimento, ou seja, flexão em três pontos foi de acordo com a finalidade proposta ao trabalho e assim obter as propriedades mecânicas que desejava medir a fragilidade do material (HIBBELER, 2006).

A droga estreptozotocina que induz o diabetes, danificar a integridade biomecânica do osso e apresentam as propriedades biomecânicas menores comparadas ao grupo controle (REDDY, 2001).

A densidade radiográfica analisada pelo sistema digital Digora é uma técnica de avaliação da massa óssea numa unidade volumétrica do osso, expressando assim a qualidade do tecido ósseo e servindo de orientação quanto a sua resistência mecânica (NORDIN; FRANKEL, 2003). É a metodologia utilizada em estudos odontológicos, pela ampla dimensão da região que pode ser estudada (SOUZA et al., 2004).

Segundo Louzada et al., (1998), o DR é capaz de avaliar as alterações da massa óssea, com excelente qualidade, e apresentando baixo custo, o que torna essa técnica propícia em aplicações experimentais e clínicas.

Neste estudo foi avaliada a densidade mineral óssea para avaliar a DMO e a resistência mecânica que avalia a qualidade óssea e depende densidade óssea (HODGSON, 2005; RAUCH; SCHOENAU, 2001).

A influência negativa do diabetes no tecido ósseo foi observada por Thrailkill et al., (2005), Inzerillo; Epstein (2004) e Vargas et al. (2003). Thrailkill et al., (2005), utilizando análise DXA, verificaram a interferência do diabetes tipo 1 no tecido ósseo humano, com redução da DMO e o do CMO, a semelhança do que foi observada nos ratos no presente estudo.

Segundo Bagi et al., (1997), existem semelhanças entre humanos e ratos quanto às características ósseas, celulares e teciduais. A vantagem da utilização de ratos é a possibilidade de estudar as propriedades mecânicas como o ensaio mecânico que é um estudo não realizado em humanos, a ser em cadáveres, pelo fato de quebrar o osso para quantificar a fragilidade através da força máxima e da rigidez.

Na tentativa de identificar diferenças existentes na fragilidade do tecido ósseo do organismo diabético comparando-os ao não diabético, este estudo demonstrou que tanto a densidade mineral óssea – DMO quanto o conteúdo mineral ósseo – CMO e a força máxima diminuem no DM sugerindo que a estrutura óssea do organismo está mais fragilizada nessa endocrinopatia. Essa fragilidade foi comprovada quando as forças máximas admitida pelos fêmures diabéticos ficaram menores que os não diabéticos.

Muitas complicações do diabetes mellitus relacionadas à estrutura ou massa corpórea do organismo diabético podem ser decorrentes dos defeitos no metabolismo das proteínas colágenas (MAINARDES, 2007), da diminuição em sua síntese (CATANZARO-GUIMARÃES, 1968; SCHNEIR et al., 1979) associada a maior destruição destas fibras com o aumento do catabolismo do colágeno no estado diabético (SCHNEIR et al., 1982). Dessa forma, acredita-se que, como o colágeno é uma importante proteína no tecido de granulação, a

sua alteração (CATANZARO-GUIMARÃES, 1968; GRANDINI et al., 1990, REDDY, 2003) também poderá afetar o “turnover ósseo” (MEIER et al., 2005; SZULC et al., 2007).

Reddy et al., (2001), obtiveram o aumento da rigidez nos animais diabéticos após sete semanas de indução, diferença estatística do estudo com duração de quatro semanas. Os resultados da rigidez revelam alteração nas propriedades intrínsecas do osso diabético, sendo a possível causa a síntese desorganizada do colágeno interferindo com a sua mineralização, diminuindo assim o conteúdo mineral ósseo e a densidade mineral ficando um osso pouco mineralizado levando a uma falsa rigidez e a diminuição da força máxima (LIU et al., 2003; REDDY et al., 2001).

A deficiência insulínica, por sua vez, pode restringir o número e a atividade dos osteoblastos e dos osteoclastos, como relatados por Mancini, 2000. No entanto, a administração da insulina em organismo diabético, compensando os seus níveis glicêmicos, pode prevenir e reverter os efeitos na produção protéica, melhorando o metabolismo do tecido conjuntivo (UMPIERREZ et al., 1989).

Os resultados complementam a idéia de que o processo de mineralização parece ser ainda mais desorganizado e imaturo do que a própria síntese colágena, uma vez que, embora a formação de osteóide pareça adiantada nas fases iniciais da reparação óssea, quando tal processo é estudado em lesões ósseas (ESTEVES et al., 2008), a síntese desorganizada do colágeno parece interferir com a sua mineralização, além de ser bastante conhecido o atraso proporcionado na diferenciação celular (ESTEVES et al., 2008; THRAILKILL et al., 2005), em particular dos osteoblastos, e também na deposição retardada de minerais nas trabéculas ósseas recém formadas (MADEIRO et al., 2005).

Segundo Devlin et al., (1996), o Diabetes mellitus produz acentuado atraso no reparo alveolar, devido a uma deficiência na proliferação do fibroblasto, osteoblasto e conseqüentes reflexos na produção de substância fundamental amorfa, fibras colágenas e matriz orgânica.

Tal fragilidade pode estar associada com o atraso na fase de mineralização das fibras colágenas do tecido ósseo em constante remodelação óssea. O atraso da síntese das novas fibras colágenas após o estabelecimento da DM o tecido ósseo torna-se cada vez menos resistente às fraturas.

A diminuição do conteúdo mineral ósseo, densidade mineral óssea, e a força máxima nos fêmures diabéticos conferem a fragilidade, no entanto outras pesquisas deverão ser realizadas com maior tempo de estudo.

7 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada, concluiu-se que o diabetes promoveu maior fragilidade nos fêmures dos ratos diabéticos, com a diminuição de DMO, CMO, densidade radiográfica e a força máxima.

REFERÊNCIAS

ARANEGA, A. **Análise histomorfométrica da reparação de alvéolos infectados após extração dental em ratos diabéticos controlados e não controlados.** Araçatuba, 2001. 226 f. Tese (Doutorado em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista - UNESP.

ARANEGA, A. **Análise microbiológica de feridas infectadas após extração dental em ratos diabéticos não controlados.** Araçatuba, 1999. 168 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista - UNESP.

AIRES, M.M. Fisiologia. In BIANCO, A.C.; CASTRO, M.L. **Fisiologia do metabolismo osteomineral.** 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1999. p.855-876.

BAGI, C.M.; WILKIE, D.; GEORGELOS, K.; WILLIAMS, D.; BERTOLINI, D. Morphological and structural characteristics of the proximal femur in human and rat. **Bone** v.21, n.3, p.261-267, 1997.

BARCELÓ, A.; RAJPATHAK, S. Incidence and prevalence of diabetes mellitus in the Americas. **Rev. Panam Salud Publica**, v.10, n.5, p.300-8, 2001.

BERNE, R.M.; LEVY, M.N. **Fisiologia.** 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

BEZERRA, J.B. **Estudo dos efeitos do Ultra-som de baixa intensidade e do exercício físico sobre a consolidação de fraturas em ratos diabéticos.** São Carlos, 2005. 53 f. Dissertação (Mestrado em bioengenharia) – Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo – USP.

BORRASCA, A.G. Processo de reparo ósseo de cavidades cirúrgicas preenchidas ou não com osso autógeno e recobertas por membrana de matriz óssea homogênea em diabéticos. Análise histomorfométrica em tíbia de ratos, Araçatuba, 2007. Dissertação (Mestrado em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista - UNESP.

BOTOLIN, S.; MCCABE, L.R. Bone loss and increased bone adiposity in spontaneous and pharmacologically induced diabetic mice. **Endocrinology** v.148, n.1, p.198–205, 2007.

BROTMAN, D.J.; GIROD, J.P. The metabolic syndrome: A tug-of-war with no winner. **Clin. J. Sport. Med.**, v. 69, n.12, p.990-994, 2002.

BROWN, S.A.; SHARPLESS, J.L. Osteoporosis: an under-appreciated complication of diabetes. **Clin. Diabetes**, v.22, p.10-20, 2004.

CAMPOS, D.P.R. Diabetes Mellito: considerações diagnósticas classificação e controle. Laes/Haes, São Paulo, p.20-48, 1991-1992.

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.

CATANZARO-GUIMARÃES, S.A. Estudo morfológico do processo de reparação cicatricial em ratos diabéticos aloxânicos. **Estomat. Cult.** v.2, n.2, p.41-47, 1968.

CENTRELLA, M.; MACCARTHY, T.L.; CANALIS, E. Receptors for Insulin-Like Growth Factors-I and -II in osteoblast-enriched cultures from fetal rat bone. **Endocrinology** .v. 126, n 1, p.39-44, 1990.

CHIAVERINI, V **Tecnologia mecânica – Estrutura e propriedades: processos de fabricação.** v. I, Mc Graw-Hil do Brasil, São Paulo, 1979.

COSTA, A.A.; ALMEIDA NETO, J.S. **Manual de Diabetes.** 4º. ed. São Paulo: Sarvier. 2004. p.201.

DEVLIN, H., GARLAND, H., SLOAN, P. Healing of tooth extraction sockets in experimental diabetes mellitus. **J. Oral Maxillofac Surg.**, v.54, p.1087-91, 1996.

DOUGLAS, C.R. Tratado de fisiologia aplicada as ciências médicas. In: DOUGLAS, C.R.; DOUGLAS, N.A. **Fisiologia do osso.**6.ed. Guanabara Koogan p.1243-121257, 2006

DUARTE, V.M.G.; RAMOS, A.M.O.; REZENDE, L.A.; MACEDO, U.B.O.; BRANDÃO NETO, J.; ALMEIDA, M.G.; REZENDE, A.A. Osteopenia: a bone disorder associated with diabetes mellitus. **J. Bone Miner. Metab.**, v.23, p.58-68, 2005.

ESTEVES, J.C; ARANEGA, A.M.; BORRASCA, A.G., FATTAH, C.M.R.S.; GARCIA-JÚNIOR, R.I. Repair process of surgical defects filled with autogenous bone grafts in tibia of diabetic rats. **J Appl Oral Sci.**, v.16, n.5, p.316-320, 2008.

FACCHINI, D.M.; YUEN, V.G.; BATTELL, M.L.; MCNEILL, J.H.; GRYNPAS, M.D. The effects of vanadium treatment on bone in diabetic and non-diabetic rats. **Bone**, v.38, p.368–377, 2006.

GAULTON, G.N.; SCHWARTZ, J.L.; EARDLEY, D.D. Assesment of the diabetogenic drugs alloxan and streptozotocin as models for the study of immune defects in diabetic mice. **Diabetologia.** v.28, p.769-775, 1985.

GOMES, D.A.S. **Influência do estado diabético na doença periodontal induzida em ratos:** análise bioquímica, macroscópica, radiográfica e dos níveis de mieloperoxidase. Araraquara, 2006. 37f. Dissertação (Mestrado em Periodontia) - Faculdade de Odontologia do Campus de Araraquara Universidade Estadual Paulista – UNESP.

GOMES, R.J. **Treinamento físico aeróbio e o eixo de crescimento GH/IGF-1 em ratos diabéticos experimentais.** Rio Claro, 2005. Dissertação (Doutorado em Ciências da Motricidade - Área de Biodinâmica da Motricidade Humana) - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista.

GOLDBERG, T.B.L.; SILVA, C.C. Osteoporose é uma doença que acomete crianças e adolescentes? **Jornal de Pediatria**, v.80, n.2, p.165, 2004.

GOODNER, C.J., RUSSEL, J.A. Pancreas. In: RUCH, T.C., PATTON, H.D. **Physiology and biophysics**. 19 ed. Philadelphia: W. B. Saunders,. p.1109-20, 1965.

GRANDINI, S.A., BRENTGANI, L.G., NOVAES, A.B., MIGLIORINI, R.H. Protein synthesis in wound after tooth extractio in pancreatectomized diabetic rats. **Braz. Dent. J.**, v. 1, n. 1, p. 25-30, 1990.

GRANDINI, S.A. The effect of parcial-pancreatectomy-induced diabetes on wound healing subsequent to tooth extraction. Histologic study in rats. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v.45, n.2, p.190-9, 1978.

GUYTON, A.C. **Fisiologia humana e mecanismo das doenças**. 3.ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1984.

GUYTON, A.C. **Fisiologia humana e mecanismos das doenças**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 11.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

HIBBELER, R.C. **Resistência dos materiais**. 5.ed. São Paulo: Prentice Hall, 2006.

HODGSON, S. **Guia da Clínica Mayo sobre osteoporose**: como manter seus ossos saudáveis e fortes e reduzir o risco de fraturas. Rio de Janeiro: Anima, 2005.

INZERILLO, A.M.; EPSTEIN, S. Osteoporosis and diabetes mellitus. **Rev Endocr. Metab. Disord.**, v.5, p.261-268, 2004.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: **Histologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1999.

KAHN, C.R.; WEIR, G.C.; KING, G.L.; JACOBSON, A.M.; MOSES, A.C.; SMITH, R.J. **Joslin Diabetes Melito**. 14.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

LERARIO A.C: Diabetes mellitus tipo2. **Diabetes News**, v.1, n.1, p.20-25, 2004.

LIRANI, A.P.R. **Estudo comparativo dos efeitos do ultra-som e do laser de baixa intensidade no reparo ósseo de tíbia de rato**. 2004. Dissertação Mestrado - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

LIU, E.Y.; WACTAWSKI-WENDE, J.; DONAHUE, R.P.; DMOCHOWSHI, J.; HOVEY, K.M.; QUATTRIN, T. Does low bone mineral density start in postteenage years in women with type 1 diabetes? **Diabetes Care**, v.26, p.2365–2369, 2003.

LORENZO, J.A.; CANALIS, E.; RAIZS, L.G. Metabolic bone disease. In: KRONENBERG HM, MELMED S, POLONSKY K, LARSEN PQ. Ed. **Williams textbook of endocrinology**. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2008.

LOUZADA, M.J.Q.; PELA, C.A.; BELANGERO, W.D.; SANTOS-PINTO, R. Metodologia para avaliação de densidade em imagens radiográficas. **Rev. Brás. Eng./Caderno de Eng. Biom.**, v.14, n.2, p.37-47, 1998.

LUCIANO, E.; MELLO, M.A.R. Atividade física e metabolismo de proteínas em músculos de ratos diabéticos experimentais. **Rev.Paul.Educ.Fís.**, v.12, n.2, p.202-209, 1998.

LUCÍRIO, I.D.; WUSTHOF, R. A epidemia do sangue doce. **Super Interessante**, v.14, n.1, p.31-34, 2000.

MADEIRO, A.T.; BANDEIRA, F.G.; FIGUEIREDO, C.R.L.V. A estreita relação entre diabetes e doença periodontal inflamatória. **Odontologia Clín.-Científ.**, v.4, n.1, p. 07-12, 2005.

MAHAN, L.K.; NKRAUSE, M.T.A. **Alimentos, nutrição e dietoterapia**. 8.ed. São Paulo: Roca. p. 957, 1994.

MAINARDES, K.C.; VIANA NETTO, R.; DONOSO, C.P.M.; KUME, P.K.; KUME, K.Y.; BUSATO, T.S. Efeito do diabetes associado ao envelhecimento na consolidação de fraturas na tíbia de ratos. **Rev. Bras. Ortop.**, v.42, n.3, p.55-63, 2007.

MANCINI, L.; MORADI-BIDHENDI, N.; BECHERINI, L.; MARTINETI, V.; MACINTYRE, I. The biphasic effects of nitric oxide in primary rat osteoblasts are GMP dependent. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.274, n.2, p.477-481, 2000.

MARQUES, T.M. **Avaliação da densitometria óssea em fêmur de rato após consumo de álcool e fluoreto de sódio**. 2008. 45f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba.

MATTILA, P.T.; KNUUTTILA, M.L.E.; SVANBERG, M.D. Dietary xylitol supplementation prevents osteoporotic changes in streptozotocin-diabetic rats. **Metabolism**, v.47, n.5, p. 578-583, 1998.

MÉIER, C.; NGUYEN, T.V.; CENTER, J.R.; SEIBEL, M.J.; EISMAN, J.A. Bone resorption and osteoporotic fractures in elderly men: the Dubbo osteoporosis epidemiology study. **J. Bone Miner. Res.**, v.20, p.579-587, 2005.

MENDEZ J.D, RAMOS H.G. Animal models in diabetes research. **Arch Med Res.**, v.25, n.4, p.367-375, 1994.

MOTTA, M.; BENNATI, E.; CAPRI, M.; FERLITO, L.; MALAGUARNERA, M. Diabetes mellitus in the extreme longevity. **Exp. Gerontol.**, v.43, n.2, p.102-105, 2007.

NORDIN, M.; FRANKEL, V.H. Biomecânica básica do sistema musculoesquelético. 3.ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2003, p.99.

ORGANIZAÇÃO Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde: **Doenças crônico-degenerativas e obesidade**: estratégia mundial sobre alimentação saudável, atividade física e saúde: Brasília, p.60, 2003.

PEPATO, M.T. **Estudo da degradação e síntese de proteínas em músculo esquelético de ratos diabéticos**. Ribeirão Preto, 1992. 183f. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

PEPATO, M.T., OLIVEIRA, J.R., KETTELHUT, I.C., MIGLIORINI, R.H. Assessment of the antidiabetic activity of myrcia uniflora extracts in Streptozotocin diabetic rats. **Diabetes Res.**, v.22, n.2, p.49-57, 1993.

PIETSCHMANN, P.; SKALICKY, M.; KNEISSEL, M.; RAUNER, M.; HOFBAUER, G.; STUPPHANN, D.; VIIDIK, A. Bone structure and metabolism in a rodent model of senile osteoporosis. **Exp. Gerontol.**, v.42, p.1099-1108, 2007.

RAUCH, F.; SCHOENAU, E. Changes in bone density during childhood and adolescence: An approach based on bone's biological organization. **J. Bone Min. Res.**, v.16, n.4, p.597-604, 2001.

REDDY, G.K.; STEHNO-BITTEL, L.; HAMADE, S.; ENWEMEKA, C.S. The biomechanical integrity of bone in experimental diabetes. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v.54, n.1, p.1-8, 2001.

REDDY G.K. Glucose-mediated in vitro glycation modulates biomechanical integrity of the soft tissues but not hard tissues. **J. Orthop. Res.**, v.21, n.4, p.738-743, 2003.

REPORT of the Expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v.23, p.54-19, 2000.

RIBEIRO, J.N. Efeitos de própolis, antocianina e naringenina em coelhos normais e diabéticos. 2001. **Dissertação de Magister Scientiae** - Agroquímica da Universidade Federal de Viçosa.

ROBBINS, M.J., SHARP, R.A., SLONIM, A.E., BURR, I.M. Protection against streptozotocin-induced diabetes by superoxide dismutase. *Diabetologia*, v.18, n.1, p.55-8, 1980.

ROBBINS, S. **Patologia estrutural e funcional**. 3.ed. São Paulo: Interamericana, 1993.

SCHNEIR, M.; RAMAMURTHY, N.; GOLUB, L. Skin collagen metabolism in the streptozotocin-induced diabetic rat: enhanced catabolism of collagen formed both before and during the diabetic state. **Diabetes**, v.31, n.5, pt.1, p.426-31, 1982.

SCHNEIR, M.; BOWERSOX, J.; RAMAMURTHY, N.; YAVELOW, J.; MURRAY, J.; EDLIN-FOLZ, E.; GOLUB, L. Response of rat connective tissues to streptozotocin-diabetes: tissue specific effects on collagen metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.*, v.583, n.1, p.95-102, 1979.

SELYE, H. The alarm reaction and diseases of adaptation. **Ann. Int. Med.**, v. 26, p. 403, 1946.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Conceito. In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Consenso Brasileiro sobre Diabetes 2002**: diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes melito tipo 2. Rio de Janeiro: Diagraphic , 2003. p.5-6.

SOUZA, P.H.C; COSTA, N.P.; VEECK, E.B. Influence of soft tissues on mandibular gray scale levels. **Braz. Oral Res.**, v. 18, n. 1, p. 40-44, 2004.

SZULC, P.; KAUFMAN, J.M.; DELMAS, P.D. Biochemical assessment of bone turnover and bone fragility in men. **Osteoporos Int.**, v.18, p.1451-1461, 2007.

THRAILKILL, K.M.; LUMPKIN, C.K.; BUNN, R.C.; KEMP, S.F.; FOWLKES, J.L. **Am J. Physiol. Endocrino Metab.**, v.289, p.735-745, 2005.

UMPIERREZ, G. E., ZLATEV, T., SPANHEIMER, R. G. Correction of altered collagen metabolism in diabetic animals with insulin therapy. **Matrix.**, v. 9, p. 336-42, 1989.

VARGAS, D.M.; RIGOTTI, T.; GÜTZ, C. N.R.M.; LOBE, M.C.S.; FERNANDES, J.A. Mineralização óssea em crianças e adolescentes com diabetes melito tipo 1. **J. Ped.**, v. 79, n.3, 2003.

VERHAEGHE, J.; BOUILLON, R. Effects of diabetes and insulin on bone physiology. In: **Principles of bone biology** (BILEZIKIAN, J.P.; RAISZ, L.G.; RODAN, G.A.). Academic Press: San Diego (CA), p.741-755, 2002.

ZAGURY, L. Conceitos atuais na prevenção do diabetes tipo 2. **Diabetes News**, v.1, n.1, p.5-9, 2004.

ZHANG, X.; FEI, Y; ZHANG, M.; WEI, D.; LI, M.; DING, W.; YANG, J. Reversal of osteoporotic changes of mineral composition in femurs of diabetic rats by insulin. **Biol. Trace Elem. Res.**,v.121, p.233–242, 2008.

ANEXO A

Dados Relativos à Densitometria Óssea

	CMO (g)	CMO (g)	Área (cm ²)	Área (cm ²)	DMO (g/cm ²)	DMO (g/cm ²)
Animais	RC	RD	RC	RD	RC	RD
1D	0,241	0,21	1,323	1,458	0,182	0,144
1E	0,267	0,176	1,349	1,077	0,198	0,164
2D	0,236	0,131	1,337	1,433	0,176	0,091
2E	0,217	0,269	1,072	1,472	0,203	0,183
3D	0,200	0,167	1,078	1,188	0,186	0,141
3E	0,223	0,198	1,282	1,316	0,174	0,151
4D	0,167	0,229	1,499	1,325	0,111	0,173
4E	0,262	0,202	1,541	1,300	0,170	0,156
5D	0,202	0,098	1,209	1,139	0,167	0,086
5E	0,260	0,157	1,548	1,254	0,168	0,125
6D	0,199	0,142	1,275	1,051	0,156	0,135
6E	0,262	0,137	1,434	1,067	0,182	0,129
7D	0,158	0,165	1,299	1,432	0,122	0,115
7E	0,232	*	1,330	*	0,174	*
8D	*	0,101	*	1,288	*	0,079
8E	0,248	0,248	1,421	1,421	0,174	0,174
9D	0,225	0,116	1,516	1,493	0,148	0,078
9E	0,209	0,198	1,305	1,306	0,160	0,152
10D	0,188	0,247	1,144	1,416	0,164	0,175
10E	0,191	0,258	1,205	1,326	0,158	0,194
11D	0,176	0,229	1,433	1,288	0,122	0,178
11E	0,165	0,195	1,022	1,239	0,161	0,158
MÉDIA	0,215	0,184	1,315	1,299	0,164	0,142
DP	0,034	0,052	0,154	0,135	0,023	0,035
CV(%)	15,8	28,0	11,7	10,4	14,2	24,8

* Ossos impossibilitados para análise.

ANEXO B

Dados Relativos à Densidade Radigráfica

DENSIDADE RADIOGRÁFICA (mmAl)

Animais	RC	RD
1D	1,431	0,995
1E	1,243	1,223
2D	1,460	1,162
2E	1,168	1,273
3D	1,169	1,140
3E	1,325	1,018
4D	1,180	1,191
4E	*	0,979
5D	1,373	1,138
5E	1,148	1,301
6D	1,424	1,182
6E	1,108	1,017
7D	1,419	1,219
7E	1,200	1,071
8D	*	1,258
8E	1,467	0,897
9D	1,160	1,129
9E	1,328	1,404
10D	1,156	0,943
10E	1,295	1,171
11D	1,144	1,341
11E	1,156	1,404
MÉDIA	1,268	1,157
DP	0,124	0,143
CV(%)	9,8	12,3

* Ossos impossibilitados para análise.

ANEXO C

Dados Relativos ao Ensaio Mecânico

	Fmáx (N)		RIGIDEZ (N/mm)	
Animais	RC	RD	RC	RD
1D	102,85	74,43	179,46	126,16
1E	109,29	93,69	199,70	182,99
2D	121,47	99,62	279,19	257,29
2E	97,50	109,48	158,43	206,18
3D	113,99	65,02	279,98	176,37
3E	117,15	*	293,41	*
4D	103,94	95,43	133,29	184,72
4E	116,57	74,23	220,03	165,78
5D	75,65	91,63	122,92	159,53
5E	*	106,65	*	194,46
6D	68,95	110,00	134,89	227,76
6E	114,57	67,92	224,05	*
7D	129,52	100,33	214,54	185,24
7E	100,14	98,21	189,65	259,96
8D	108,97	113,48	212,82	224,48
8E	127,14	74,17	249,46	207,66
9D	120,31	84,87	238,17	241,52
9E	98,14	*	165,06	*
10D	94,73	77,26	162,41	150,35
10E	104,65	108,84	196,21	220,85
11D	76,49	74,75	159,72	224,92
11E	*	112,7	143,94	232,46
MÉDIA	105,101	91,635	197,969	201,512
DP	16,697	16,241	50,430	36,659
CV(%)	15,9	17,7	25,5	18,2

* Ossos impossibilitados para análise.

ANEXO D

Certificado do Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DO PROCESSO DE REPARO ÓSSEO DE CAVIDADES CIRÚRGICAS PREENCHIDAS COM OSSO AUTÓGENO E RECOBERTAS POR MEMBRANAS DE MATRIZ ÓSSEA HOMÓGENA DESMINERALIZADA E CONSERVADA EM GLICERINA EM TÍBIA DE RATOS DIABÉTICOS" sob responsabilidade de Prof Dr OSVALDO MAGRO FILHO e colaboração de Profa Dra. ALESSANDRA MARCONDES ARANEÇA, Dra. ROBERTA OKAMOTO e ALBANIR GABRIEL BORRASCA está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado *AD REFERENDUM* pela CEEA de acordo com o protocolo nº 2007-007842.

Araçatuba, 23 de outubro de 2007.

Profª Drª CRISTINA ANTONIALI SILVA

Presidente da CEEA - FOA/UNESP

ANEXO E



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

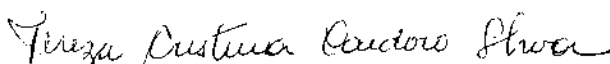


COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "**DENSIDADE MINERAL ÓSSEA DE FÊMURS EM RATOS DIABÉTICOS**" sob responsabilidade do **Prof. Ass. Dr. Mario Jefferson Quirino Louzada** e colaboração de **Cristiane Nalin Manaia, Alessandra Marcondes Aranega e Albanir Gabriel Borrasca** está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA "ad referendum".

Araçatuba, 08 de Abril de 2009


Prof. Adj. Tereza Cristina Cardoso da Silva
Presidente da CEEA- FOA/UNESP