



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

CRISTHIAN REYNALDO GÓMEZ BAUTISTA

**EFEITOS DA SITAGLIPTINA NO TECIDO ÓSSEO EM RATOS
DIABÉTICOS E NÃO DIABÉTICOS**

2018

CRISTHIAN REYNALDO GÓMEZ BAUTISTA

**EFEITOS DA SITAGLIPTINA NO TECIDO ÓSSEO EM RATOS DIABÉTICOS E
NÃO DIABÉTICOS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área de Patologia.

Orientadora: Profa. Adj. Ana Lia Anbinder

São José dos Campos

2018

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adj. Ana Lia Anbinder (Orientadora)

Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Profa. Adj. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Prof. Dra. Denise Pontes Raldi

Universidade de Taubaté (Unitau)
Departamento de Odontologia

São José dos Campos, 30 de maio de 2018.

DEDICATORIA

Dedico este trabalho:

A Deus por me dar a oportunidade de vir ao Brasil e a coragem para enfrentar todas as situações. Obrigado a Deus por tornar este sonho realidade.

A minha mãe Alba Patricia Bautista por tanto amor, por todos os valores e princípios ensinados, os quis tornaram-me hoje a pessoa que sou, porque apesar da distância sempre esteve ao meu lado me apoiando incondicionalmente, me dando força todos os dias para lutar e seguir na frente nesta corrida. Você é meu grande tesouro!!

A minhas irmãs Johanna e Carolina, por cuidar da minha mãe durante este tempo, por cada palavra de motivação que provaram que os sonhos podem ser alcançados mesmo com tantos obstáculos.

A minha sobrinha Julieta por me encher de felicidade e por me dar mais um motivo para lutar ...

A meu tio Javier Bautista (Bolis) por adotar-me como um filho e sempre me apoiando.

Amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao Brasil, por me receber e me permitir conhecer uma nova cultura e me apresentar um mundo de conhecimento e novos desafios

À **Universidade Estadual Paulista (Unesp)**, especialmente Ao Programa de **Pós-graduação em Biopatologia Bucal**, representado pela sua coordenadora, professora **Luciane Dias de Oliveira**

Agradeço a minha orientadora professora **Ana Lia Anbinder**, pelo seu voto de confiança, por acreditar em mim, confiar nas minhas capacidades e dar-me a oportunidade de crescer profissionalmente, conhecendo as dificuldades que como estudante estrangeiro tinha, obrigado pela sua paciência, pelo respeito e apoio em tudo momento e por me orientar no campo profissional e pessoal.

Aos docentes do **Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal** pelo carinho, disponibilidade e o conhecimento compartilhado.

Agradeço enormemente a professora **Juliana Campos Junqueira** pela sua disponibilidade e gentileza. Obrigado por me fazer sentir sempre em casa.

Agradeço a professora **Janete Dias Almeida** pelas suas palavras de motivação e por me ouvir sempre. Obrigado por me entender principalmente com a linguagem.

Os professores: **Miguel Angel Castillo, Marianne Spalding e Luana Marotta de Vasconcellos** por me acolherem na família da histologia, e me guiarem nesse caminho da docência. Obrigado por me ensinarem tanto.

Agradeço a todos os **colegas da pós-graduação** da patologia e microbiologia, pela amizade e ajuda incondicional especialmente a Noala, Liliana,

Thais, Renata, Jaqueline, Lucas e Jéssica. Obrigado a todos vocês, foram importantes em este caminho.

Agradeço à **Silvana Alvarez** por me abrir as portas da sua casa incondicionalmente. Obrigado Silvana

A **minha família Brasileira Cláudio e Célia**, por me fazer sentir como um filho, por todo o carinho e apoio incondicional. Vocês são muito especiais.

À **Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES)**, pela bolsa de estudo concedida para a realização do curso.

A toda a **comunidade ICT/UNESP**, que diretamente ou indiretamente contribuiu para alcançar esse sonho.

"El conocimiento tiene que ser mejorado, desafiado e incrementado constantemente, o se desvanece."

Peter Drucker

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO..... | 8 |
| ABSTRACT..... | 9 |
| 1 INTRODUÇÃO | 10 |
| 2 PROPOSIÇÃO | 14 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS..... | 15 |
| 3.1 Animais..... | 15 |
| 3.2 Grupos experimentais..... | 15 |
| 3.3 Indução de Diabetes | 16 |
| 3.4 Tratamento medicamentoso..... | 16 |
| 3.5 Eutanasia..... | 17 |
| 3.6 Análise de HOMA-IR..... | 17 |
| 3.7 Microtomografia computadorizada..... | 18 |
| 3.8 Análise Estatística..... | 19 |
| 4 RESULTADOS..... | 20 |
| 4.1 Peso..... | 20 |
| 4.2 Glicemia e HOMA-IR..... | 20 |
| 4.3 Microtomografia (Micro CT) | 23 |
| 5 DISCUSSÃO | 26 |
| 6 CONCLUSÃO | 30 |
| REFERÊNCIAS..... | 31 |
| ANEXO..... | 36 |

Bautista CRG. Efeitos da sitagliptina no tecido ósseo em ratos diabéticos e não diabéticos [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2018.

RESUMO

A diabetes mellitus, doença caracterizada pelo aumento da glicemia no sangue, é um dos mais importantes problemas de saúde pública do mundo, com incidência crescente, sobretudo em países em desenvolvimento. Novas terapias medicamentosas para controlar os níveis de glicose no sangue têm sido desenvolvidas, entre elas, os inibidores da enzima dipeptidil peptidase-4 (DPP-4) como a sitagliptina. Pesquisas atuais mostram que este medicamento, além do controle da glicemia, contribui na estimulação da formação e inibição da reabsorção óssea e possui ação anti-inflamatória. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da sitagliptina no tecido ósseo em ratos diabéticos e não diabéticos. Foram utilizados 38 ratos machos, divididos em 4 grupos: Grupo diabético tratado com sitagliptina (GDS- 10 mg/Kg/dia); Grupo diabético (GD); Grupo normoglicêmico tratado sitagliptina (GNS-10 mg/Kg/dia); Grupo normoglicêmico (GN). Para indução da diabetes os animais receberam solução 10% de frutose na água de beber por 14 dias, após o quê receberam 40 mg/Kg de estreptozotocina via intraperitoneal. Quatro semanas depois, avaliou-se a glicemia e iniciou-se o tratamento com sitagliptina nos grupos GDS e GNS, que continuou por mais 4 semanas, quando ocorreu a eutanásia. A glicemia e a resistência à insulina (HOMA-IR) foram avaliadas também no dia da eutanásia. As tíbias foram removidas e avaliadas a porcentagem de volume ósseo (BV/TV), espessura trabecular (Tb.Th), número de trabéculas (Tb.N) e a separação de trabéculas (Tb Sp) da metáfise tibiana por microtomografia computadorizada. Os dados foram submetidos à análise estatística, ao nível de 0,05. Os animais dos grupos GD e GDS apresentaram maior glicemia que os animais dos demais grupos, mas não houve diferença entre os grupos com relação aos dados de HOMA-IR, evidenciando a indução de diabetes do tipo I. Os animais diabéticos apresentaram menor BV/TV e Tb.N, e maior Tb.Sp. Não houve diferença com relação à Tb.Th. O modelo experimental foi eficaz para a indução da diabetes, mas o tratamento com sitagliptina não foi suficiente para reverter os efeitos da diabetes no tecido ósseo.

Palavras-chave: Diabetes mellitus, Sitagliptina, Microtomografia computarizada, Tíbia de rato.

Bautista CRG. *Effects of sitagliptin on bone tissue in diabetic and non-diabetic rats* [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2018.

ABSTRACT

Diabetes mellitus, a disease characterized by increased blood glucose levels, is one of the most important public health problems in the world, with a growing incidence, especially in developing countries. New drug therapies to control blood glucose levels have been developed, including dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitors such as sitagliptin. Current research shows that this drug, in addition to glycemic control, contributes to stimulate the formation and inhibition of bone resorption and has an anti-inflammatory action. The aim of this study was to evaluate the effects of sitagliptin on bone tissue in diabetic and non-diabetic rats. Thirty-eight male rats were divided into four groups: Diabetic group treated with sitagliptin (GDS-10 mg / kg / day); Diabetic group (GD); normoglycemic group treated with sitagliptin (GNS-10 mg / kg / day); normoglycemic group (GN). For induction of diabetes the animals received 10% solution of fructose in the drinking water for 14 days, after which they received 40 mg / kg streptozotocin intraperitoneally. Four weeks later, glycemia was evaluated and sitagliptin treatment was started in the GDS and GNS groups, which continued for another 4 weeks, when euthanasia occurred. Blood glucose and insulin resistance (HOMA-IR) were also evaluated on the day of sacrifice. Bone volume (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th), number of trabeculae (Tb.N) and trabeculae separation (Tb.Sp) of the tibial metaphysis were evaluated by computerized microtomography. Data were submitted to statistical analysis at the 0.05 level. The animals of groups GD and GDS presented higher glycemia, but there was no difference regarding HOMA-IR, evidencing diabetes type I induction. The animals in which diabetes was induced presented lower BV/TV and Tb.N, and higher Tb.Sp. There was no difference among groups in Tb.Th. The experimental model was sufficient for the induction of diabetes, but treatment with sitagliptin was not enough to reverse the effects of diabetes on bone tissue.

Keywords: Diabetes mellitus, Sitagliptin, Computerized microtomography, Rat tibiae.

1 INTRODUÇÃO

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) afetam principalmente os países em desenvolvimento, tornando-se uma ameaça à saúde (Alwan et al., 2010). Dentre essas doenças, a diabetes mellitus (DM) se destaca pelas suas complicações e por estar relacionada a um alto índice de morte no mundo (International Diabetes Federation, 2009). Segundo Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que cerca de 217 milhões de pessoas no mundo já foram afetadas pela DM Tipo 2 e que, até 2030, o número de pessoas afetadas será de 366 milhões (Wild et al., 2004). A prevalência de DM nos países da América Central e do Sul foi estimada em 26,4 milhões de pessoas e projetada para 40 milhões, em 2030 (Brasil, 2013). Este crescimento é devido ao aumento e envelhecimento da população, assim como outros fatores como estilo de vida, dieta, obesidade e sedentarismo (Danaei et al., 2011; Sociedade Brasileira de Diabetes, 2016).

A DM é uma doença metabólica sistêmica crônica, caracterizada por elevada taxa de glicose no sangue e por distúrbios no metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras, acarretando hiperglicemia. A hiperglicemia se desenvolve tanto pela deficiência da produção de insulina no pâncreas quanto pela redução de ação da insulina (American Diabetes Association, 2011). Estas alterações podem ocasionar complicações sistêmicas como problemas renais, oculares, vasculares (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2016). Além disso, também é responsável por alterar e comprometer o processo de reparo ósseo e de tecido mole (Villarino et al., 2011).

O método comumente utilizado para diagnosticar o DM é o exame de glicemia em jejum. De acordo com a American Diabetes Association (2004), o paciente normoglicêmico é aquele que apresenta glicemia menor que 99 mg/dL em jejum, o paciente pré-diabetes apresenta glicemia entre 100 e 125 mg/dL, e o paciente diabético apresenta glicemia maior que 126 mg/dl.

A DM tipo 1, conhecida como insulino dependente, imunomediada ou diabetes de início juvenil, é causada pela destruição das células produtoras de insulina do pâncreas, tipicamente devido a uma reação auto-imune. As células beta do pâncreas, portanto, produzem pouca ou nenhuma insulina. DM tipo 2 é

caracterizada por resistência à insulina e deficiência relativa de insulina, e seu diagnóstico geralmente ocorre após a 40 anos de idade. Existem vários fatores no desenvolvimento da DM tipo 2, tais como: obesidade, dieta, inatividade física, idade, e história familiar de diabetes (International Diabetes Federation, 2009). DM gestacional é qualquer intolerância à glicose diagnosticada na gravidez, devido a mudanças hormonais (International Diabetes Federation, 2009).

O paciente portador de DM apresenta um déficit na atividade imunológica e inflamatória, tornando-o mais susceptível a desenvolver infecções por aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias a partir de leucócitos polimorfonucleares, monócitos e diminuição da regulação de fatores de crescimento derivados de macrófagos (Grover et al., 2013; Taylor et al., 2013). Complicações em longo prazo têm sido relacionadas ao aumento da glicose sanguínea e a grupo de moléculas chamadas de produtos finais da glicolisação avançada (AGEs) (Orasanu et al 2010). As AGEs se acumulam por anos causando alterações no colágeno e proteoglicanas da matriz extra-celular (Orasanu, Plutzky, 2010). Todas essas manifestações acabam comprometendo o processo de cicatrização dos pacientes diabéticos, bem como a formação e remodelamento ósseo (Bollag et al., 2001).

DM afeta negativamente o tecido ósseo e está associada a um risco aumentado de osteoporose e fraturas. Os mecanismos ainda são desconhecidos mas podem incluir deficiência no acúmulo de massa óssea e complicações diabéticas, como a nefropatia. Na DM tipo 1, a formação óssea e a função dos osteoblastos estão comprometidas, provavelmente por falta de ações anabólicas ósseas da insulina e outros hormônios pancreáticos. Apesar de na diabetes tipo 2 a massa óssea poder ser alta, não protege contra fraturas, pois a qualidade óssea está comprometida (Hamann et al., 2012).

Novos medicamentos têm sido desenvolvidos para pacientes com DM com o objetivo aumentar o tempo de ação das incretinas. As incretinas são hormônios liberados pelo intestino que estimulam as células pancreáticas e regulam o metabolismo da glicose. O polipeptídeo inibitório gástrico (GIP) e o peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1) são as duas principais incretinas secretados no intestino após a ingestão de glicose para estimular a secreção de insulina das células β pancreáticas. GLP-1 é produzido a partir das células L no jejuno distal, íleo e cólon, enquanto o GIP é secretado de células K localizadas na mucosa intestinal

proximal (duodeno e jejuno superior) (Tasyurek et al., 2014). Ambos hormônios exercem seus efeitos por ligação aos seus receptores específicos GIPR e GLP-1R, respectivamente. O GIPR foi identificado nas células β pancreáticas, tecido adiposo, córtex adrenal, coração e cérebro, e o GLP-1R encontra-se nas ilhotas pancreáticas, fígado, pulmão, coração, trato gastrointestinal e em múltiplas regiões do sistema nervoso central e periférico. A ligação do receptor ativa e aumenta o nível de adenosina monofosfato cíclico intracelular em células pancreáticas, estimulando a secreção de insulina de forma dependente de glicose.

Além de seus efeitos insulíntricos, o GIP e GLP-1 desempenham mais funções em vários processos biológicos, incluindo o osso (Seino et al., 2010). Osteócitos e osteoblastos possuem GLP-1R e GIPR (Bollag et al., 2001; Kim et al., 2013; Nuche-berenguer et al., 2011; Pacheco-pantoja et al., 2011). Análises de histomorfometria óssea mostraram que os parâmetros de formação óssea são significativamente mais baixos e o número de osteoclastos aumenta em camundongos deficientes em GIPR, indicando osteoporose. Além disso, o GIP suprime a apoptose de osteoblastos *in vitro*, sugerindo que o GIP estimula a formação óssea (Tsukiyama et al., 2006).

Outra incretina é o peptídeo semelhante ao glucagon 2 (GLP-2), um hormônio que estimula crescimento, com ação anti-inflamatória, inibe absorção de nutrientes no intestino, estimula a proliferação celular e a inibição da apoptose nas criptas intestinais, aumenta o transporte intestinal de glicose e melhora a função da barreira intestinal, embora, não possua efeito insulíntrico (Drucker et al., 1996; Lovshin et al., 2001; Tang-christensen et al., 2000). No entanto, as funções biológicas do GLP-2 e a localização do seu receptor (GLP-2R) ainda não estão esclarecidas (El-jamal et al., 2014).

Os novos medicamentos para diabetes funcionam como agonistas do receptor GLP-1 ou inibidores da DPP-4 (Fukuhara et al., 2014). A DPP-4 é uma molécula abundantemente expressa por células epiteliais e endoteliais, presente na circulação ligada a membrana e solúvel (Duke-Cohan et al., 1995), que degrada as incretinas em metabólitos inativos. Além disso, tem funções importantes no metabolismo, inflamação, migração e celular diferenciação, cérebro e células nervosas, e as osso (Ohnuma et al., 2011).

Inibidores da DPP4 como a sitagliptina, aprovada em 2006, são reconhecidos atualmente e são utilizados para o tratamento da tolerância à glicose do em DM tipo 2, pois aumentam a meia-vida das incretinas (GIP e GLP-1), promovendo assim a secreção de insulina (Richter et al., 2008; Waugh et al., 2010).

Os substratos da DPP 4 também podem influenciar diretamente o tecido ósseo, uma vez que eles têm receptores nas células ósseas ativas. Estes incluem hormônios do intestino (GIP, GLP-1 e GLP-2) e peptídeos que influenciam saciedade e fome, como neuropeptídeo Y (NPY) e peptídeo YY (PYY), mas também fator-1 derivado de células estromais, peptídeo intestinal vasoativo (VIP), peptídeo ativador da adenilato ciclase hipofisária (PACAP), substância P (SP) e fator crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) (Glorie et al., 2014).

Numa meta-análise de 28 ensaios clínicos, foi observada uma redução do risco de fraturas ósseas em doentes tratados com inibidor de DPP-4, durante pelo menos 24 semanas (Monami et al., 2011). Neste contexto, a literatura científica sugere que os inibidores da DPP-4 podem ter ação favorável no osso, influenciando a formação óssea e impedindo a reabsorção (Kyle et al., 2011). De acordo com literatura e seus resultados descritos acima levantamos a hipótese que a sitagliptina possa ter um efeito positivo no tecido ósseo de ratos diabéticos.

2 PROPOSIÇÃO

Avaliar os efeitos da sitagliptina no tecido ósseo em ratos diabéticos e não diabéticos através da avaliação dos seguintes parâmetros microtomográficos: porcentagem de volume ósseo (BV/TV), espessura trabecular (Tb.Th), número de trabéculas (Tb.N) e separação de trabéculas (Tb.SP).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 38 ratos maduros adultos (machos) (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), de cento e vinte dias, que foram mantidos no Biotério do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos (Unesp) e alimentados com ração e água ad libitum. A manipulação dos animais seguiu as recomendações da lei 11794, de 8 de outubro de 2008. O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da nossa Unidade, com o número de protocolo 10/2014-CEUA/ICT-CJSC- UNESP (ANEXO A).

3.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em quatro grupos:

- (1) Grupo diabético tratado com sitagliptina (GDS): dez animais em que foi induzida a diabetes mellitus através de injeções estreptozotocina e suplementação alimentar de frutose, e que receberam tratamento com sitagliptina;
- (2) Grupo diabético (GD): dez animais em que foi induzida a diabetes mellitus através de injeções estreptozotocina e suplementação alimentar de frutose e que receberam apenas o veículo de diluição da sitagliptina;
- (3) Grupo normoglicêmicos tratados sitagliptina (GNS): dez animais normoglicêmicos que receberam tratamento de sitagliptina;
- (4) Grupo normoglicêmicos (GN): oito animais normoglicêmicos que receberam apenas o veículo de diluição da sitagliptina.

3.3 Indução de Diabetes

O modelo de indução de diabetes mellitus utilizado nesta pesquisa é baseado no proposto por Wilson e Islam (Wilson, Islam, 2012). Os animais receberam solução 10% de frutose na água de beber durante 2 semanas. Depois deste período, permaneceram 16 h em jejum e foi injetado com 40 mg/Kg de estreptozocina (>98%, Sigma- Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), por via intraperitoneal. A estreptozocina foi dissolvida em tampão citrato (pH 4,4), na concentração de 15 mg/ml.

Uma hora após a injeção com estreptozocina, os animais voltaram a receber água e ração *ad libitum* até o fim do experimento. Os animais foram pesados, assim como foi medida a concentração plasmática de glicose com glicosímetro portátil (OneTouch Ultra Mini- Johnson & Johnson Medical Group São Paulo-SP-Brasil) a partir de sangue da veia caudal 4 semanas após a injeção de estreptozotocina e no dia da eutanásia. Foram considerados diabéticos os animais com dosagem de glicose plasmática superior a 300 mg/dL.

Os animais dos grupos GN e GD receberam injeção intraperitoneal apenas do veículo de dissolução da estreptozocina.

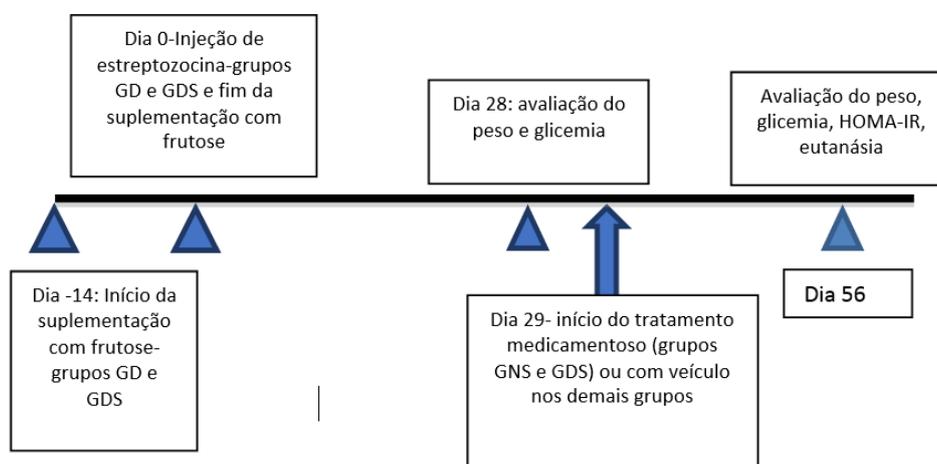
3.4 Tratamento medicamentoso

Os animais dos grupos GNS e GDS começaram a receber 10 mg/Kg/dia (Monami et al., 2011) do inibidor da DPP-4 (Janúvia, Novartis, São Paulo, SP, Brasil) por gavagem 28 dias depois da injeção de estreptozotocina. Os animais dos grupos GN e GD receberam o veículo de dissolução da sitagliptina por gavagem ao invés do medicamento.

3.5 Eutanásia

Após 4 semanas de tratamento com sitagliptina, os animais foram novamente anestesiados com dose excessiva de anestésico e posicionados em decúbito dorsal, e então se realizou uma incisão longitudinal da região púbica até o processo xifoide, abrindo a caixa torácica com a exposição do coração, onde foi introduzida uma agulha acoplada a um tubo com gel separador de soro (Tubo gel BD SST® II Advance BD, São Paulo, SP, Brasil) no ventrículo esquerdo, para coleta de sangue. Em seguida, o animal foi decapitado em guilhotina. As tíbias esquerdas foram removidas, o tecido mole excedente eliminado e armazenadas em paraformaldeído durante o período mínimo de 24 h. A figura 1 ilustra o delineamento experimental.

Figura 1- Representação esquemática do delineamento experimental



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.6 Análise de HOMA-IR

A glicemia (Interkit método enzimático colorimétrico, Katal Biotecnológica, Belo Horizonte, MG, Brasil) e a insulinemia (ELISA kit- EZRMI-13K, Millipore

Corporation, St Charles, Missouri, EUA) foram avaliadas, conforme instruções dos fabricantes, no sangue coletado durante a eutanásia, para a determinação do índice HOMA-IR. O índice é utilizado para avaliação da resistência à insulina e calculado pela fórmula:

$$\text{HOMA -IR} = \text{glicemia} * \text{insulinemia} / 22,5.$$

3.7 Microtomografia Computarizada (Micro CT)

A aquisição das imagens microtomográficas foi feita por meio do microtomógrafo Skyscan 1176 (Aatselaar, Bélgica, 2003) no laboratório de Microtomografia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

As tibias de cada animal foram posicionadas verticalmente no equipamento e as imagens tomográficas foram obtidas. Todas as amostras foram escaneadas nas mesmas condições 0,0120 de rotação, 50 kV, 500 uA com cortes de 18 µm de espessura. Após obtenção pela projeção dos raios-X, as imagens foram reconstruídas utilizando o software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0), e Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit), de acordo com três planos (transversal, longitudinal e sagital) . Em seguida, utilizando o software CTAnalyser – CTAn (2003-11SkyScan, 2012 Bruker MicroCT Versão 1.12.4.0) foi determinada a região de interesse (ROI) utilizando o corte transaxial.

A ROI avaliada correspondeu a 175 tomogramas da metáfise tibianda localizados a uma distância de 80 cortes após o ponto mais caudal da cartilagem de crescimento.

Os parâmetros avaliados foram: percentual do volume ósseo (BV/TV), a separação trabecular (Tb.Sp), o número trabecular (Tb.N), e a espessura trabecular (Tb.Th).

3.8 Análise estatística

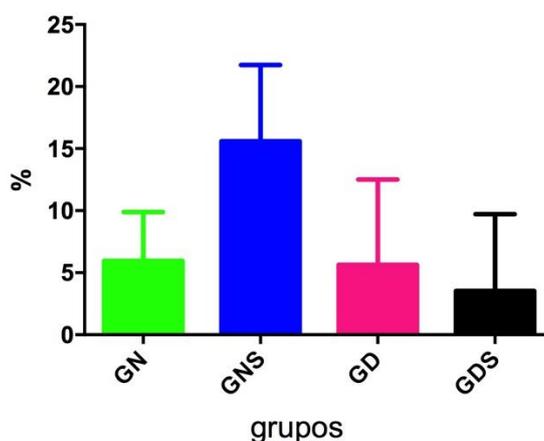
De acordo com a normalidade da amostra, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância a dois fatores (ANOVA) ou teste t e Mann-Whitney, dependendo da distribuição dos dados, com nível de significância de 0,05, com o auxílio do programa GraphPad Prism versão 6.01 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Peso

Foi feita a análise da porcentagem de ganho de peso entre o dia 28 e da eutanásia (dia 56) e os valores de média e erro padrão podem ser observados na figura 2. Foi realizada ANOVA a dois fatores e não se verificou efeito significativo com relação a interação entre fatores ($F=0,958$; $p=0,3342$), medicamento ($F=0,392$; $p=0,5353$) ou presença ou ausência de diabetes ($F=1,061$; $p=0,3098$).

Figura 2 – Médias e erro padrão dos valores de porcentagem de ganho de peso entre o dia 28 e da eutanásia (dia 56)



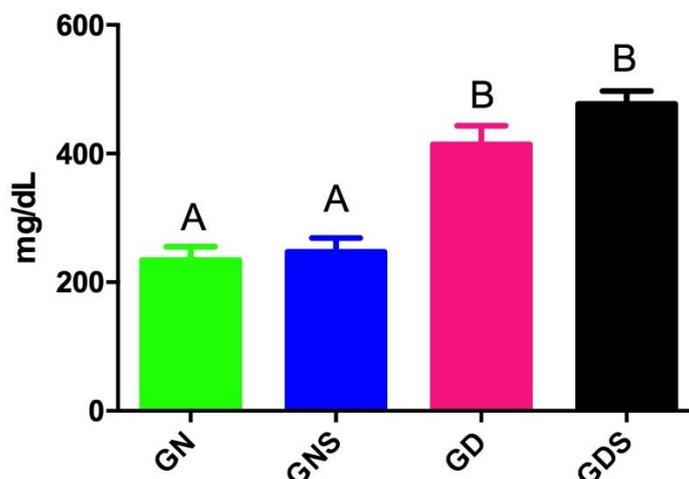
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Glicemia e HOMA-IR

Foi feita a análise da glicemia dos animais nos dias 28 e 56 e os valores de média e erro padrão podem ser observados nas figuras 3 e 4.

Após a ANOVA a dois fatores, não se verificou efeito significativo com relação à interação ($F=1,14$; $p=0,2928$) e ao medicamento no dia 28 ($F= 2,617$; $p=0,1144$). Houve significância estatística apenas com relação ao efeito principal presença ou não de diabetes, sendo que nos animais em que se induziu diabetes apresentaram maior glicemia ($F=76,67$; $p<0,0001$), conforme demonstrado na figura 3.

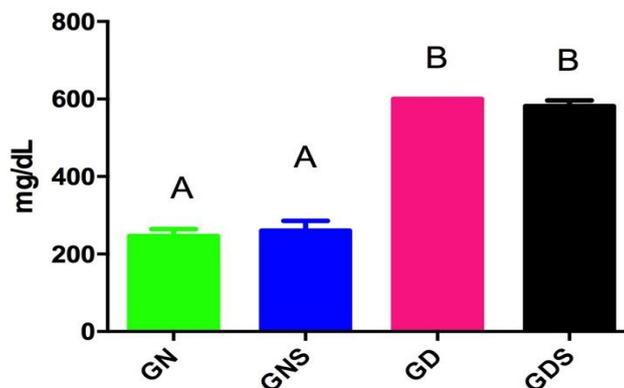
Figura 3 – Médias e erros-padrão dos valores de glicemia do dia 28, onde os grupos normoglicêmicos



Legenda: (A) possuem valores significativamente menores que os grupos diabéticos; (B) Resultado do teste de comparação múltipla de Tukey (entre todos os grupos).
Fonte: Elaborado pelo autor.

Com relação aos valores de glicemia no dia da eutanásia, também foi realizada ANOVA a dois fatores e não se verificou efeito significativo com relação a interação ($F=0,6312$; $p=0,433$) e ao medicamento ($F= 0,0132$; $p=0,9094$). Houve significância estatística apenas com relação ao efeito principal presença ou não de diabetes, sendo que nos animais em que se induziu diabetes houve maior glicemia ($F=278,9$; $p<0,0001$), conforme demonstrado na figura 4.

Figura 4 – Médias e erros-padrão dos valores de glicemia do dia 56, onde os grupos normoglicêmicos

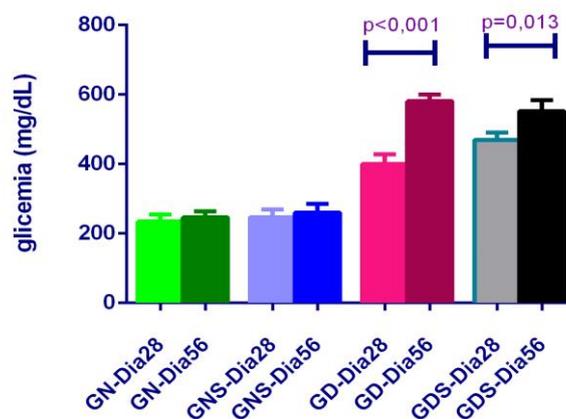


Legenda: (A) possuem valores significativamente menores que os grupos diabéticos; (B) Resultado do teste de comparação múltipla de Sidak (entre todos os grupos).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Quando se compararam os valores de glicemia nos dias 28 e 56 em cada grupo (Figura 5), não houve diferença estatística intra-grupo em GN (teste t, $p=0,2855$) e GNS (Mann-Whitney, $p= 0,6994$). Nos grupos GD e GDS observou-se um aumento da glicemia no dia da eutanásia (GD-Mann-Whitney, $p= 0,0004$; e GDS-Mann-Whitney, $p= 0,0127$).

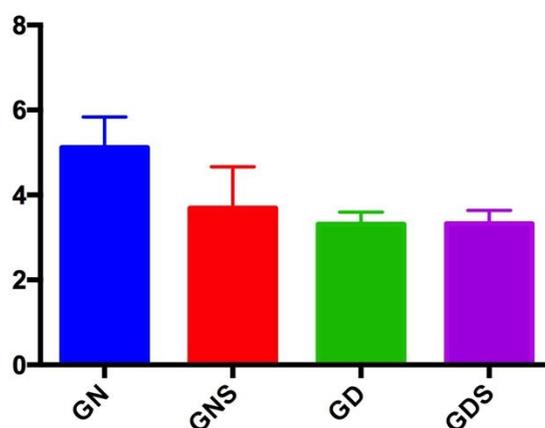
Figura 5 – Médias e erros-padrão dos valores de glicemia dos animais nos dias 28 e 56



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os dados de HOMA-IR no sangue coletado no momento da eutanásia também foram submetidos à ANOVA dois fatores, e não foram encontradas diferenças significantes na interação ($F=1,183$; $p=0,2840$), no fator medicamento ($F=1,125$; $p=0,2960$) ou na presença ou não de diabetes ($F=2,682$; $p=0,1102$). A Figura 6 ilustra os valores de média e erro-padrão do índice HOMA-IR entre os grupos.

Figura 6 – Médias e erros-padrão dos valores de HOMA-IR dos animais



Fonte: Elaborado pelo autor.

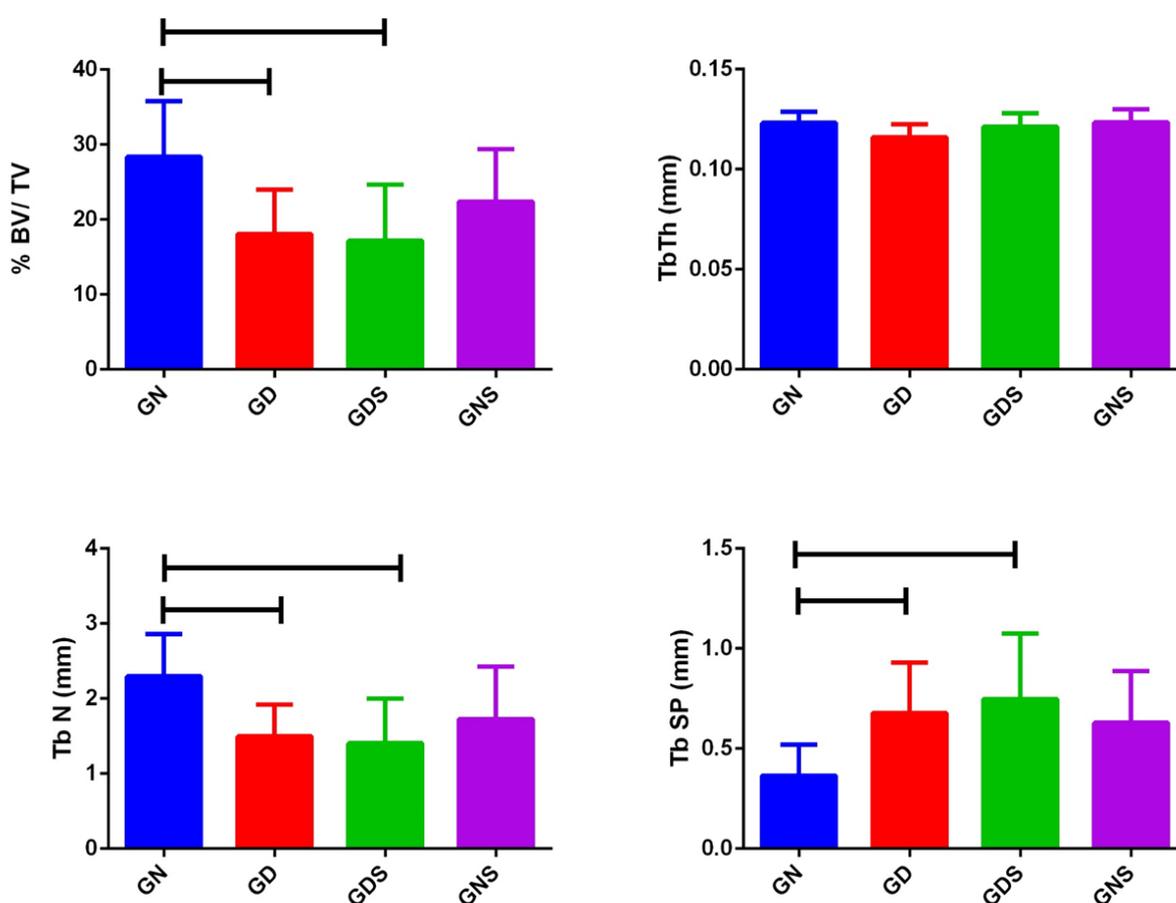
4.3 Microtomografia (Micro CT)

Os dados de microtomografia foram submetidos a análise estatística à ANOVA dois fatores, como mostrado na figura 7, e não foram encontradas diferenças significantes na interação em todos os parâmetros avaliados: percentual do volume ósseo (BV/TV) ($F=1,246$; $p= 0,2722$); separação de trabéculas (Tb.Sp) ($F=0,2035$; $p=0,6548$); número de trabéculas (Tb.N) ($F=1,100$; $p= 0,3016$) e espessura trabecular (Tb.Th) ($F=1,469$; $p=0,2342$).

Observou-se também que o fator tratamento não foi significativo nos parâmetros avaliados, BV/TV ($F=2,317$; $p=0,1372$); Tb.Sp ($F=1,513$; $p=0,2272$); Tb.N ($F=2,440$; $p=0,1275$) e Tb.Th ($F=1,805$; $p=0,1882$).

Em relação com o nível glicêmico, observou-se que houve diferença significativa nos parâmetros BV/TV ($F=11,77$; $p=0,0016$); Tb.N ($F=11,61$; $p=0,0017$) e Tb.Th ($F=4,771$; $p=0,0362$), ao contrário de Tb.Sp ($F=3,154$; $p=0,0847$), onde não houve diferença estatística.

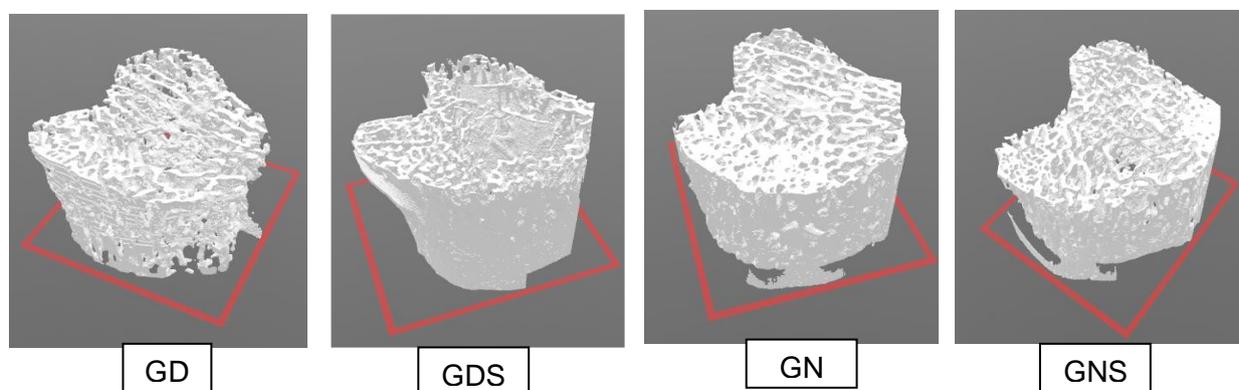
Figura 7– Médias e desvios-padrão dos parâmetros de microtomografia computadorizada



Legenda: (A) Porcentual de volume ósseo (BV/TV); (B) Número de trabéculas (Tb.N); (C) Separação trabecular (Tb.Sp); (D) Espessura trabecular (Tb.Th). Foi aplicada ANOVA dois fatores e teste de Tukey. Barras indicam diferença estatística.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 8 – Imagens tridimensionais da metáfise reconstruídas pelo software CTAnalyser



Fonte: Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

A DM é uma doença epidêmica, razão pela qual a pesquisa do seu tratamento é importante. Atualmente, entre os medicamentos utilizados para o controle da glicemia estão os inibidores da enzima dipeptidil peptidase-4 (DPP-4), que além de desempenhar um papel importante na regulação da glicemia, tem características importantes na estimulação da formação e inibição da reabsorção óssea (Kyle et al., 2011). Assim, a proposta deste estudo foi avaliar o efeito da sitagliptina (inibidor da DPP-4) no tecido ósseo em ratos diabéticos e não diabéticos.

Modelos animais de diabetes representam uma ferramenta importante na investigação dos mecanismos e tratamento da doença, e nos ajudam a evitar estudos em seres humanos eticamente desafiadores (Radenković, et al., 2016). Vários protocolos de indução de DM são encontrados na literatura (Radenković, et al., 2016).

A insulina é o hormônio mais importante no regulamento das concentrações de glicose no sangue e é essencial no estado pós-prandial. Quando as concentrações de açúcar no sangue aumentam, a insulina é secretada na corrente sanguínea pelas células do β do pâncreas endócrino (Khan, Pessin, 2002). Considerando isso, vários modelos experimentais de indução de DM, baseados em destruição química das células β pancreáticas, remoção cirúrgica da massa de células β ou pancreatectomia, injúria ao hipotálamo ventromedial, dietas ricas em açúcares, gorduras, má nutrição *in utero* ou altas doses de hormônios contra-regulatórios, como os glicocorticoides, foram descritos (Islas-andrade et al., 2000).

Os métodos químicos com injeção de aloxana ou estreptozotocina representam os modelos experimentais mais importantes para indução de DM tipo 1. Os dois compostos são semelhantes pois são hidrofílicos e podem ser classificados como análogos de glicose tóxicos de células beta (Szkudelski et al., 2013). A aloxana (2,4,5,6-tetraoxipirimidina; 5,6-dioxiuracilo) é um derivado de pirimidina que é sintetizado pela oxidação do ácido úrico (Lenzen, 2008). É um composto instável com uma estrutura semelhante à glicose. O antifúngico estreptozotocina (2-desoxi-2-(3- (metil-3-nitrosoureído) -D-glucopiranosose)) é sintetizado por *Streptomyces achromogenes* (Szkudelski et al., 1998). Curiosamente, a estreptozotocina possui

atividade antimicrobiana e também tem sido usado como um agente quimioterápico. Ambos os compostos têm mecanismos idênticos de ação sobre as células beta, mas seu potencial diabetogênico é alcançado através de diferentes vias citotóxicas. Embora aloxana e a estreptozotocina sejam os agentes mais usados para induzir DM tipo 1, a estreptozotocina em combinação com diferentes regimes de alimentação ou outros tipos de manipulações pode ser usada para induzir DM tipo 2. A indução de diabetes tipo 2 com aloxana também é possível, mas é eticamente questionável pela baixa possibilidade de desenvolvimento desse tipo de DM em relação ao DM tipo 1 (Radenković et al., 2016).

Para o desenvolvimento de este trabalho, utilizamos o modelo de indução de DM tipo 2 em ratos proposto por Wilson e Islam, com ingestão de solução de frutose 10% e injeção de baixa dose de estreptozotocina. Escolhemos este modelo por ser rápido e barato, diferentemente de alguns modelos que usam dieta especial rica em gordura ou animais geneticamente modificados. Ao fim do experimento, observamos que os animais apresentaram altos níveis de glicose em relação ao grupo controle, porém o índice HOMA-IR evidenciou que não houve resistência à insulina, descartando a possibilidade de indução de DM tipo 2, e indicando a indução de DM tipo 1. O tratamento com sitagliptina não foi suficiente para a redução da glicemia porque não conseguimos induzir DM tipo 2, e o medicamento, que estimula a produção de insulina pelo pâncreas, depende da integridade das células beta para sua ação. Um estudo realizado em ratos (Glorie et al., 2014) confirma esta situação, pois a sitagliptina não diminuiu a glicemia em DM tipo 1. Utilizamos a mesma dose de Moraes et al. (2015), que verificaram que nesta posologia a administração de sitagliptina reduziu a concentração sérica de DPP - 4 (Moraes et al., 2015).

Okoduwa et al., 2017, também procuraram um modelo experimental para desenvolvimento de DM tipo 2, baseado no protocolo de indução de diabetes segundo Wilson e Islam (Wilson et al., 2012). Dez dias após a injeção da estreptozotocina (STZ), os grupos tratados com STZ (45 e 55 mg/kg) desenvolveram hiperglicemia franca com diminuição significativa da insulina e do peptídeo C séricos, uma deficiência grave típica de diabetes tipo 1. No entanto, quando a dieta rica em gordura foi combinada com a solução de frutose a 20%, um estado de resistência à insulina foi observado após 6 semanas (Okoduwa et al., 2017).

Outros dois estudos em animais (Stark et al., 2000; Zarfeshani et al., 2012) mostraram que o consumo de solução de alta frutose (21% e 53%) não conseguiu levar à resistência à insulina.

É importante ressaltar que, embora a intenção fosse induzir diabetes tipo 2, conseguimos um modelo experimental de DM obtendo vantagens como baixa taxa de mortalidade, baixo custo e com um método rápido. Algumas diferenças foram encontradas entre o modelo que usamos como base para indução de DM tipo 2 (Wilson, Islam, 2012) e nosso experimento, como a linhagem e o número de semanas de vida dos animais. A indução deste tipo de diabetes nos permitiu avaliar os efeitos da sitagliptina no tecido ósseo independentemente dos níveis glicêmicos.

Os inibidores da DPP-4 são atualmente usados no tratamento para melhorar a tolerância à glicose dos diabéticos tipo 2, pois aumentam a meia-vida das incretinas GIP e GLP-1, que se ligam aos receptores nas células β -pancreáticas, promovendo assim a secreção de insulina.

Muitos substratos da DPP-4 afetam o metabolismo ósseo, sugerindo um efeito positivo da inibição da DPP-4. Apesar de existirem poucos estudos na literatura sobre os efeitos *in vivo* dos inibidores da DPP-4 no metabolismo ósseo, independente dos níveis de glicose (Glorie et al., 2014), verificamos que a sitagliptina não teve efeito sobre o tecido ósseo da metáfise das tíbias em nenhum dos parâmetros analisados. Diferentemente de nossos resultados, Glorie et al. (2014) avaliaram o efeito da sitagliptina no osso de ratos diabéticos tipo 1, demonstrando diferença na estrutura óssea entre animais diabéticos e animais do grupo controle. A (BV/TV) foi significativamente menor em animais diabéticos nas semanas 6, 9 e 12. A perda de osso trabecular em animais diabéticos foi completamente atenuada pelo tratamento com sitagliptina. BV/TV, Tb.Sp destes animais foi preservada em comparação com animais diabéticos não tratados nas semanas 9 e 12. Tb.N diminuiu de forma constante em todos os grupos e diabéticos tratados com sitagliptina em nenhum momento, a partir de 6 semanas, diferiram dos controles não diabéticos e foi significativamente maior em comparação com animais diabéticos não tratados na semana 9 (Glorie et al., 2014). Assim, é possível pensar que há uma forte associação entre o tempo de administração do medicamento e seus efeitos ósseos, uma vez que o menor tempo de avaliação de Glorie (6 semanas) é 2 semanas maior que o nosso (4 semanas).

Um estudo realizado em camundongos diabéticos tipo 2 mostra que o efeito positivo da sitagliptina no tecido ósseo está associado também à redução significativa dos níveis de glicose no sangue (Kyle et al., 2011).

A regulação da atividade da DPP-4 não depende apenas da expressão DPP-4 em si, mas também da disponibilidade de seus substratos, assim como seus receptores, que são expressos em osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. A ação indireta da enzima no hipotálamo através de peptídeos como leptinas e adiponectinas é difícil de prever. Por um lado, há efeito protetor do tecido ósseo pela inibição da DPP-4 em substratos como incretinas, fator de crescimento semelhante à insulina (IGF)-2 e peptídeo vasointestinal ativo (VIP); porém, efeitos negativos no metabolismo ósseo podem ocorrer pela ação da enzima em substratos como fator alfa derivado de células estromais (SDF1 α), neuropeptídeo Y (NPY), peptídeo YY e substância P. Assim, estudos clínicos a longo prazo devem ser realizados para compreender melhor os efeitos da inibição da DPP4 no tecido ósseo (Glorie et al., 2016).

6 CONCLUSÃO

O modelo experimental foi suficiente para a indução da DM, que prejudica volume ósseo, número e separação de trabecular. Nas condições avaliadas, o tratamento com sitagliptina não influenciou o tecido ósseo, nem foi suficiente para reverter os efeitos da diabetes.

REFERÊNCIAS*

American Diabetes Association (ADA). Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27(Suppl 1):s15-s35.

American Diabetes Association (ADA). Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care*. 2011;34(Suppl 1):s11-s61.

Alwan A, Maclean DR, Riley LM, d'Espaignet ET, Mathers CD, Stevens GA, Et al. Monitoring and surveillance of chronic non-communicable diseases: progress and capacity in high-burden countries. *Lancet*. 2010 Nov 27;376(9755):1861-8. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61853-3. PubMed PMID: 21074258.

Bollag RJ, Zhong Q, Ding KH, Phillips P, Zhong L, Qin F, et al. Glucose-dependent insulinotropic peptide is na integrative hormone with osteotropic effects. *Mol Cell Endocrinol*. 2001 May 25;177(1-2):35-41. PubMed PMID: 11377818.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica: diabetes mellitus. Brasília: Ministério da Saúde; 2013. (Cadernos de Atenção Básica, n. 36)

Danaei G, Finucane MM, Lu Y, Singh GM, Cowan MJ, Paciorek CJ, et al. Global burden of metabolic risk factors of chronic diseases collaborating group (blood glucose). National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of healthexamination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7million participants. *Lancet*. 2011 Jul 2;378(9785):31-40. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60679-X. PubMed PMID: 21705069.

Drucker DJ, Erlich P, Asa SL, Brubaker PL. Induction of intestinal epithelial proliferation by glucagon-like peptide 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jul23;93(15):7911-6. PubMed PMID: 8755576

Duke-Cohan JS, Morimoto C, Rocker JA, Schlossman SF. A novel form of dipeptidylpeptidase IV found in human serum. Isolation, characterization, and comparison with T lymphocyte membrane dipeptidylpeptidase IV (CD26). *J Biol Chem*.1995 Jun 9;270(23):14107-14. PubMed PMID: 7539799

El-Jamal N, Erdual E, Neunlist M, Koriche D, Dubuquoy C, Maggiotto F, et al. Glugacon-like peptide-2: broad receptor expression, limited therapeutic effect on intestinal inflammation and novel role in liver regeneration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2014 Aug 1;307(3):G274-85. doi: 10.1152/ajpgi.00389.2012. PubMed PMID: 24875097.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jun 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Fukuhara T, Hyogo H, Ochi H, Fujino H, Kan H, Naeshiro N, et al. Efficacy and safety of sitagliptin for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease with type 2 diabetes mellitus. *Hepatogastroenterology*. 2014 Mar-Apr;61(130):323-8. PubMed PMID: 24901133.

Glorie L, Behets GJ, Baerts L, De Meester I, D'Haese PC, Verhulst A. DPP IV inhibitor treatment attenuates bone loss and improves mechanical bone strength in male diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014 Sep 1;307(5):E447-55. doi: 10.1152/ajpendo.00217.2014. PubMed PMID: 25053403.

Glorie L, D'Haese PC, Verhulst A. Boning up on DPP4, DPP4 substrates, and DPP4-adipokine interactions: Logical reasoning and known facts about bone related effects of DPP4 inhibitors. *Bone*. 2016 Nov;92:37-49. doi: 10.1016/j.bone.2016.08.009. PubMed PMID: 27535784.

Grover HS, Luthra S. Molecular mechanisms involved in the bidirectional relationship between diabetes mellitus and periodontal disease. *J Indian Soc Periodontol*. 2013 May;17(3):292-301. doi: 10.4103/0972-124X.115642. Review. PubMed PMID: 24049328

Hamann C, Kirschner S, Günther KP, Hofbauer LC. Bone, sweet bone—osteoporotic fractures in diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2012 Jan 17;8(5):297-305. doi: 10.1038/nrendo.2011.233. Review. PubMed PMID: 22249517.

International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*. 4. ed. Bélgica: International Diabetes Federation; 2009.

Islas-Andrade S, Monsalve CR, de la Peña JE, Polanco AC, Palomino MG, Velasco AF. Streptozotocin and alloxan in experimental diabetes: comparison of the two models in rats. *Acta Histochem Cytochem*. 2000;33(3):201-8.

Khan AH, Pessin JE. Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia*. 2002 Nov;45(11):1475-83. Review. PubMed PMID: 12436329.

Kim JY, Lee SK, Jo KJ, Song DY, Lim DM, Park KY, et al. Exendin-4 increases bone mineral density in type 2 diabetic OLETF rats potentially through the down-regulation of SOST/sclerostin in osteocytes. *Life Sci*. 2013 Mar 21;92(10):533-40. doi: 10.1016/j.lfs.2013.01.001. PubMed PMID: 23357248.

Kyle KA, Willett TL, Baggio LL, Drucker DJ, Grynpas MD. Differential effects of PPAR- γ activation versus chemical or genetic reduction of DPP-4 activity on bone quality in mice. *Endocrinology*. 2011 Feb;152(2):457-67. doi: 10.1210/en.2010-1098. PubMed PMID: 21177828

Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008 Feb;51(2):216-26. PubMed PMID: 18087688.

Lovshin J, Estall J, Yusta B, Brown TJ, Drucker DJ. Glucagon-like peptide (GLP)-2 action in the murine central nervous system is enhanced by elimination of GLP-1 receptor signaling. *J Biol Chem*. 2001 Jun 15;276(24):21489-99. PubMed PMID: 11262390.

Monami M, Dicembrini I, Antenore A, Mannucci E. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and bone fractures: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Diabetes Care*. 2011 Nov;34(11):2474-6. doi: 10.2337/dc11-1099. Erratum in: *Diabetes Care*. 2014 Jan;37(1):312. PubMed PMID: 22025784

Moraes RM, Lima GM, Oliveira FE, Brito AC, Pereira RC, Oliveira LD, et al. Exenatide and sitagliptin decrease interleukin 1 β , matrix metalloproteinase 9, and nitric oxide synthase 2 gene expression but does not reduce alveolar bone loss in rats with periodontitis. *J Periodontol*. 2015 Nov;86(11):1287-95. doi: 10.1902/jop.2015.150278. PubMed PMID: 26205746.

Nuche-Berenguer B, Lozano D, Gutiérrez-Rojas I, Moreno P, Mariñoso ML, Esbrit P, et al. GLP-1 and exendin-4 can reverse hyperlipidic-related osteopenia. *J Endocrinol*. 2011 May;209(2):203-10. doi: 10.1530/JOE-11-0015. PubMed PMID: 21372151.

Ohnuma K, Hosono O, Dang NH, Morimoto C. Dipeptidyl peptidase in autoimmune pathophysiology. *Adv Clin Chem*. 2011;53:51-84. Review. PubMed PMID: 21404914.

Okoduwa SI, Umar IA, James DB, Inuwa HM. Appropriate insulin level in selecting fortified diet-fed, streptozotocin-treated rat model of type 2 diabetes for anti-diabetic studies. *PLoS One*. 2017 Jan 27;12(1):e0170971. doi: 10.1371/journal.pone.0170971. eCollection 2017. PubMed PMID: 28129400

Orasanu G, Plutzky J. The continuum of diabetic vascular disease: from macro- to micro. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Feb 3; 53(5 Suppl): S35-S42. doi: 10.1016/j.jacc.2008.09.055

Pacheco-Pantoja EL, Ranganath LR, Gallagher JA, Wilson PJ, Fraser WD. Receptors and effects of gut hormones in three osteoblastic cell lines. *BMC Physiol*. 2011 Jul 29;11:12. doi: 10.1186/1472-6793-11-12. PubMed PMID: 21801348

Radenković M, Stojanović M, Prostran M. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: the current state of the art. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2016 Mar-Apr;78:13-31. doi: 10.1016/j.vascn.2015.11.004. PubMed PMID: 26596652.

Richter B, Bandeira-Echtler E, Bergerhoff K, Lerch CL. Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitors for type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008 Apr 16;(2):CD006739. doi: 10.1002/14651858.CD006739.pub2. Review. PubMed PMID: 18425967.

Seino Y, Fukushima M, Yabe D. GIP and GLP-1, the two incretin hormones: Similarities and differences. *J Diabetes Investig*. 2010 Apr 22;1(1-2):8-23. doi: 10.1111/j.2040-1124.2010.00022.x. Review. PubMed PMID: 24843404

Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2015-2016. São Paulo: A. C. Farmaceutica; 2016.

Stark AH, Timar B, Madar Z. Adaptation of Sprague Dawley rats to long-term feeding of high fat or high fructose diets. *Eur J Nutr.* 2000 Oct;39(5):229-34. PubMed PMID: 11131370.

Szkudelski T, Kandulska K, Okulicz M. Alloxan in vivo does not only exert deleterious effects on pancreatic B cells. *Physiol Res.* 1998;47(5):343-6. PubMed PMID: 10052602.

Szkudelski T, Zywert A, Szkudelska K. Metabolic disturbances and defects in insulin secretion in rats with streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes. *Physiol Res.* 2013;62(6):663-70. PubMed PMID: 23869889.

Tang-Christensen M, Larsen PJ, Thulesen J, Rømer J, Vrang N. The proglucagon-derived peptide, glucagon-like peptide-2, is a neurotransmitter involved in the regulation of food intake. *Nat Med.* 2000 Jul;6(7):802-7. PubMed PMID: 10888930.

Tasyurek HM, Altunbas HA, Balci MK, Sanlioglu S. Incretins: their physiology and application in the treatment of diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev.* 2014 Jul;30(5):354-71. doi: 10.1002/dmrr.2501. Review. PubMed PMID: 24989141.

Taylor JJ, Preshaw PM, Lalla E. A review of the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes. *J Clin Periodontol.* 2013 Apr;40 Suppl 14:S113-34. doi: 10.1111/jcpe.12059. Review. PubMed PMID: 23627323.

Tsukiyama K, Yamada Y, Yamada C, Harada N, Kawasaki Y, Ogura M, et al. Gastric inhibitory polypeptide as an endogenous factor promoting new bone formation after food ingestion. *Mol Endocrinol.* 2006 Jul;20(7):1644-51. PubMed PMID: 16469773.

Villarino ME, Lewicki M, Ubios AM. Bone response to orthodontic forces in diabetic Wistar rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2011 Apr;139(4 Suppl):S76-82. doi: 10.1016/j.ajodo.2010.06.021. PubMed PMID: 21435542.

Waugh N, Cummins E, Royle P, Clar C, Marien M, Richter B, et al. Newer agents for blood glucose control in type 2 diabetes: systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess.* 2010 Jul;14(36):1-248. doi: 10.3310/hta14360. Review. PubMed PMID: 20646668.

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 2004 May;27(5):1047-53. PubMed PMID: 15111519.

Wilson RD, Islam MS. Fructose-fed streptozotocin-injected rat: an alternative model for type 2 diabetes. *Pharmacol Rep.* 2012;64(1):129-39. PubMed PMID: 22580529.

Zarfeshani A, Mutalib MSA, Khaza'ai H. Evaluating of high fructose diet to induce hyperglycemia and its inflammatory complications in rats. *Pak J Nutr.* 2012;11(1):21–26.

ANEXO A- Certificado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da nossa UnidadeThe logo for UNESP (Universidade Estadual Paulista) features the word "unesp" in a bold, lowercase sans-serif font, followed by a blue stylized flower-like icon.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia



CERTIFICADO
CEUA – Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 10/2014-CEUA/ICT-CJSC-UNESP, sobre "Efeitos da Sitagliptina na ósseointegração de implantes em ratos diabéticos e não diabéticos", sob responsabilidade de ANA LIA ANBINDER, tendo como colaboradores Ingrid Valadares dos Santos e Bruna Ribas de Meireles, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal – CONCEA e Lei Arouca nº 11.794 de 08/10/2008 e foi aprovado por esta CEUA.

São José dos Campos, 12 de setembro de 2014

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Rubens Nísie Tango".

Prof.Dr. RUBENS NÍSIE TANGO
Coordenador

Obs:- Para este trabalho serão utilizados 95(noventa e cinco) ratos machos heterogênicos de 45 dias