

EVIDÊNCIAS DA FRAGILIDADE ÓSSEA EM RATOS DIABÉTICOS TIPO 1: ESTUDO DENSITOMÉTRICO E BIOMECÂNICO

Cristiane Nalin Manaia¹
Alessandra Marcondes Aranega²
Albanir Gabriel Borrasca³
Mário Jefferson Quirino Louzada⁴

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos provocados pelo diabetes tipo 1 (DM1) nos fêmures de ratos, pela densitometria óssea e ensaio biomecânico. Foram utilizados 22 animais (*Rattus norvegicus albinus*), separados aleatoriamente em: C (grupo controle) e D (grupo diabético). Para provocar o DM1, os animais receberam estreptozotocina dissolvida em tampão citrato a 0,01M, pH 4,5, em uma concentração de 35mg/Kg, em dose única, pela via endovenosa. Após 4 semanas da indução, os animais foram sacrificados e os fêmures congelados (-20°C). Foram realizados testes biomecânicos, para a determinação da Força Máxima (F_{máx}) e Rigidez, e análise densitométrica para a obtenção da Densidade Mineral Óssea (DMO) e Conteúdo Mineral Ósseo (CMO). O teste t de Student acusou diferenças significativas na DMO (p=0,0190), CMO (p=0,0264) e F_{máx} (p=0,0137) entre os grupos. Desta maneira conclui-se que, de acordo com a metodologia usada neste trabalho, o diabetes tipo 1 induzido provocou uma maior fragilidade nos fêmures.

Palavras-chave: densidade mineral óssea, diabetes, ensaio biomecânico, osso.

EVIDENCE OF BONE WEAKNESS IN TYPE 1 DIABETES RATS: STUDY DENSITOMETRIC AND BIOMECHANICAL

ABSTRACT

The purpose of this paper was to evaluate the effects caused by type 1 diabetes (DM1) in the femurs of rats by bone density and biomechanical testing. We used 22 animals (*Rattus norvegicus albinus*), which were separated randomly into: C (control group) and D (diabetic group). To induce type 1 diabetes, the animals received streptozotocin dissolved in citrate buffer 0.01M, pH 4.5, at a concentration of 35mg/kg, single dose, by intravenous injection. After 4 weeks of induction, the animals were sacrificed and the femurs frozen (-20° C). Biomechanical test were performed to determine the maximum force (F_{max}) and stiffness, and densitometry analysis, to obtain the bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC). The Student t test acknowledged significant differences in BMD (p = 0.0190), CMO (p = 0.0264) and F_{max} (p = 0.0137) between groups. Thus it follows that, according to the methodology used in this work, the induced type 1 diabetes led to a greater fragility in the femurs.

Key words: bone minerals density, diabetes, biomechanical test, bone

¹ Mestranda do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal. End.: Clóvis Pestana, 793, Bairro Dona Amélia, CEP:16050-680 – UNESP/Araçatuba, SP. Telefone (18) 3636-1359– Fax (18) 3622-6487. crisrmanaia@hotmail.com

² Professora Ass. Dr.^a do Departamento Cirurgia e Clínica Integrada. End.: José Bonifacio, 1193, Bairro: Vila Mendonça, CEP:16 015-050 – UNESP/Araçatuba, SP. Alessandra@foa.unesp.br

³ Doutorando do Programa de Pós Graduação da Área de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial. End.: José Bonifacio, 1193, Bairro: Vila Mendonça, CEP:16 015-050 - UNESP/Araçatuba, SP. albanirgabriel@hotmail.com

⁴ Professor Adj. do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal. End.: Clóvis Pestana, 793, Bairro Dona Amélia, CEP:16050-680 – UNESP/Araçatuba, SP louzada@fmva.unesp.br

PRUEBAS DE DEBILIDAD ÓSEA EN RATAS DIABÉTICAS TIPO 1: ESTUDIO DENSITOMÉTRICO Y BIOMECÁNICO

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos causados por la diabetes tipo 1 (DM1) en el fémur de ratas por la densidad ósea y las pruebas biomecánicas. Se utilizaron 22 animales (*Rattus norvegicus albinus*), fueron aleatoriamente separados en: C (grupo control) y D (grupo de diabéticos). Para inducir la diabetes tipo 1, los animales recibieron estreptozotocina disuelto en tampón citrato 0,01 M, pH 4,5, a una concentración de 35mg/kg, dosis única, por vía intravenosa. Después de 4 semanas de inducción, fueron sacrificados y los fémures congelados (-20° C). Pruebas biomecánicas se realizaron para determinar la fuerza máxima (Fmáx) la rigidez, y la análisis densitométrica, para obtener la densidad mineral ósea (DMO) y contenido mineral óseo (CMO). La prueba t de Student acusa diferencias significativas en la DMO (p = 0,0190), CMO (p = 0,0264) y Fmax (p = 0,0137) entre los grupos. Por lo tanto, se deduce que, de acuerdo con la metodología utilizada en este estudio, el diabetes tipo 1 inducido llevó a una mayor fragilidad en el fémur.

Palabras claves: densidad mineral ósea, diabetes, prueba biomecánicas, óseo

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) causa desequilíbrio metabólico afetando vários sistemas, e comprometendo o crescimento e desenvolvimento ósseos. A insulina participa no metabolismo ósseo e, por estar presente nos osteoblastos, quando alterada exerce influência direta sobre o crescimento epifiseal, causando diminuição da velocidade do pico de crescimento na puberdade, aumento do risco de osteopenia, fraturas e reparo ósseo atrasado (1,2). Neste trabalho objetivou-se quantificar os efeitos provocados pelo DM1 nos fêmures de ratos, analisando parâmetros mecânicos e densitométricos. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (n° 2007-007842). Foram selecionados aleatoriamente 22 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*), com massa corpórea de aproximadamente 250g, mantidos sob temperatura controlada de 24°C e alimentados com ração sólida e água à vontade. Sob jejum, o diabetes foi induzido em 11 animais (D) por inoculação de estreptozotocina (dissolvida em tampão citrato a 0,01M, pH 4,5, na concentração de 35mg/Kg) pela via endovenosa. O grupo C (n=11) recebeu inoculação de tampão de citrato via endovenosa. A glicemia foi avaliada 5 dias após o tratamento e antes do sacrifício, utilizando glicosímetro portátil calibrado¹. Foram considerados diabéticos ratos com glicemia superior a 350mg/dl. Após quatro semanas da indução, os animais foram sacrificados com injeção intramuscular por dose excessiva de Cloridrato de Xilazina e Cloridrato de Cetamina, tendo seus fêmures removidos e armazenados em solução isotônica de sódio a 0,9% a temperatura de -20°C.

Para a análise densitométrica utilizou-se densitômetro de dupla emissão de raios-X (DXA), modelo DPX-ALPHA², com software especial para pequenos animais (3), sendo determinado o CMO e a DMO em toda a área do osso. No ensaio mecânico foi utilizada a máquina universal de ensaio EMIC[®], modelo DL 3000. A carga foi aplicada a uma velocidade de 5 mm/min. A distância entre os apoios foi de 20mm e a célula de carga utilizada foi de 2000 N (4). Foram avaliados a Fmáx admitida pelo fémur e sua rigidez (pela inclinação da curva na fase elástica).

¹ Accu-Chek Advantage - Roche Diagnostica Brasil Ltda

² LUNAR[™], processo Fapesp n. 04/13264-7

Utilizou-se o teste t de Student, para comparar os dados dos grupos C e D. A análise estatística foi realizada no programa *GraphPAD InStat*[®] versão 3.06. O nível de significância adotado foi de 5%.

Como não foram encontradas diferenças entre os resultados para os fêmures direito e esquerdo estes foram agrupados passando o número amostral para 22 ossos em cada grupo.

Os grupos não apresentaram diferenças quanto ao tamanho dos ossos ($p=0,7255$), mas tanto DMO quanto o CMO do C foram maiores que o D ($p=0,019$ e $p=0,0264$, respectivamente). O D apresentou valor de $F_{\text{máx}}$ menor que o C ($p=0,0137$), mas a rigidez não apresentou diferença ($p=0,8026$) (Tabela 1).

Densitometria Óssea e Ensaio Mecânico

Tabela 1. Valores da média e desvio padrão da Densidade Mineral Óssea (DMO), Conteúdo Mineral Ósseo (CMO), Área, Força Máxima ($F_{\text{máx}}$) e Rigidez (R) obtidos para os grupos diabético e controle.

Grupo	DMO (g/cm ²)	CMO (g)	Área (cm ²)	$F_{\text{máx}}$ (N)	R (N/mm)
Controle	0,164±0,023	0,216±0,034	1,315±0,154	105,10±16,69	197,96±50,43
Diabético	0,142±0,035	0,184±0,052	1,299±0,135	91,63±16,24	201,51±36,65
P	0,019	0,0264	0,7255	0,0137	0,8026

Teste T Student (P>0,05)

Tanto a DMO quanto o CMO diminuem no D, sugerindo que a estrutura óssea está mais fragilizada o que corrobora com Thraill et al. (5), que observaram a interferência do DM 1 no tecido ósseo. Essa fragilidade foi comprovada ao se obter $F_{\text{máx}}$ nos fêmures do D menor que C, podendo assim associar a fase de mineralização das fibras colágenas do tecido ósseo, o qual estava em constante remodelação, que após o estabelecimento da DM torna o tecido ósseo cada vez menos resistente, mais susceptível à fratura, interferindo assim na integridade biomecânica do osso (6).

A deficiência insulínica, por sua vez, pode restringir o número e a atividade dos osteoblastos e dos osteoclastos (7) resultando na fragilidade das propriedades biomecânicas ósseas. No entanto, a administração da insulina em organismo diabético, revertendo os níveis glicêmicos, podendo prevenir e reverter os efeitos na produção protéica, melhorando o metabolismo do tecido conjuntivo (8), evitando assim o atraso na deposição de minerais nas trabéculas ósseas recém formadas (7).

De acordo com a metodologia empregada, concluiu-se que o diabetes mellitus tipo 1 promoveu maior fragilidade nos fêmures de ratos.

REFERÊNCIAS

1. Verhaeghe J, Thomsen JS, Bree RV, Herck EV, Bouillon R, Mosekilde L. Effects of exercise and disuse on bone remodeling, bone mass, and biomechanical competence in spontaneously diabetic female rats. *Bone*. 2000;27(2):249-56.
2. Inzerillo AM, Epstein S. Osteoporosis and diabetes mellitus. *Rev Endocr Metab Disord*. 2004;5:261-8.
3. Marques TM. Avaliação da densitometria óssea em fêmur de rato após consumo de álcool e fluoreto de sódio [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista; 2008.

4. Louzada MJQ, Belangero WD, Martins LEB. Avaliação de parâmetros biomecânicos pela densitometria radiográfica. Estudo in vitro em osso cortical de tíbias de carneiros. Rev Bras Biomec. 2006;12:33-8.
5. Thrailkill KM, Lumpkin CKJR, Bunn RC, Kemp SF. Is insulin an anabolic agent in bone? Dissecting the diabetic bone for clues. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2005;289:735-45.
6. Reddy GK, Stehno-Bittel L, Hamade S, Enwemeka CS. The biomechanical integrity of bone in experimental diabetes. Diabetes Res Clin Pract. 2001;54:1-8.
7. Madeiro AT, Bandeira FG, Figueiredo CRLV. A estreita relação entre diabetes e doença periodontal inflamatória. Odontologia. 2005;4(1):7-12.
8. Umpierrez GE, Zlatev T, Spanheimer RG. Correction of altered collagen metabolism in diabetic animals with insulin therapy. Matrix. 1989;9:336-42.

Recebido em: 02/02/10

Aceito em:22/03/11