



MONOGRAFIA DE INVESTIGAÇÃO
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

EFEITO DA CONDIÇÃO DIABÉTICA NA ESTRUTURA OSSEA
CRÂNIO-MAXILO-FACIAL – AVALIAÇÃO NUM MODELO
ANIMAL

Carolina Henriques Martinho da Silva

Orientador:

Professor Doutor Pedro Gomes

Coorientador:

Professor Doutor Bruno Colaço

Porto, 2013

ÍNDICE

RESUMO	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO	3
MATERIAIS E MÉTODOS	6
Indução da diabetes experimental	7
Avaliação da glicemia	7
Eutanásia e recolha das amostras	7
Avaliação microtomográfica	7
Aquisição radiográfica	8
Análise densitométrica	8
Análise estatística	9
RESULTADOS	10
Avaliação microtomográfica	10
Análise densitométrica	13
DISCUSSÃO	19
CONCLUSÃO	22
AGRADECIMENTOS	23
BIBLIOGRAFIA	24
ANEXOS	27

RESUMO

Introdução: A diabetes *mellitus* é uma doença metabólica, que leva à falência multissistêmica de diversos órgãos e tecidos, entre eles o tecido ósseo. Na diabetes *mellitus* tipo I têm-se verificado défices no crescimento e alterações no metabolismo ósseo. Diversos estudos têm demonstrado uma relação entre a produção inadequada de insulina e a alteração do metabolismo e formação óssea.

Objetivos: Este trabalho tem como objetivo estudar as alterações na morfologia e no crescimento do tecido ósseo craniofacial, de forma a perceber o impacto da condição diabética na estrutura e na qualidade do tecido ósseo do complexo crânio-maxilo-facial.

Metodologia: Uma amostra inicial de 24 ratas da estirpe *Wistar* (8 semanas de idade) foi dividida em 4 grupos: (1) diabéticos 2 semanas, (2) controlos 2 semanas, (3) diabéticos 6 semanas e (4) controlos 6 semanas. a indução da condição diabética foi realizada com estreptozotocina (STZ). Nos tempos designados, foram recolhidas as mandíbulas, maxilas, tíbias e fémures, que foram fixadas adequadamente. Procedeu-se à avaliação microtomográfica e à análise densitométrica de raios-X, procurando comparar a densidade mineral óssea nos diferentes ossos e grupos experimentais.

Resultados: A análise densitométrica revelou diferenças significativas entre os animais diabéticos e os controlos para a tíbia (às 2 e às 6 semanas) e para a mandíbula (às 6 semanas). Para a maxila e o fémur não houve diferenças. Na análise microtomográfica, observaram-se alguns parâmetros inferiores nos diabéticos, nomeadamente, a fração do volume ósseo e a espessura das trabéculas, às 2 e às 6 semanas, e a densidade de trabéculas conectadas e o número de trabéculas, às 6 semanas.

Conclusão: As alterações detetadas pelas técnicas utilizadas (microtomografia computadorizada e densitometria de raios-X) foram significativas, especialmente para a tíbia e a mandíbula. Não se verificaram diferenças significativas nos restantes ossos, sugerindo que poderão não ser tão suscetíveis a uma redução da densidade mineral óssea mediada pela condição diabética.

ABSTRACT

Introduction: Diabetes mellitus is a metabolic disorder which leads to the failure of many organs and tissues, including bone. In type I diabetes mellitus deficits have been observed in the growth and changes in bone metabolism. Several studies have shown a relationship between inadequate insulin production and altered metabolism and bone formation.

Objective: This work aims to study the changes in morphology and growth of the craniofacial bone, in order to understand the impact of diabetic condition on the structure and quality of the bone tissue of cranio-maxillo-facial complex.

Methods: An initial sample of 24 Wistar rats (8 weeks old) were divided into 4 groups: (1) diabetic 2 weeks, (2) controls 2 weeks, (3) diabetic 6 weeks and (4) controls 6 weeks. Inducing the diabetic condition was performed with streptozotocin (STZ). In the appointed times, were collected mandibles, maxillas, tibias and femurs, which were fixed properly. It was proceeded to the microtomographic evaluation and the densitometric analysis of X-rays, looking for to compare the bone mineral density in the different bones and experimental groups.

Results: Densitometric analysis revealed significant differences between diabetic animals and controls for the tibia (at 2 and 6 weeks) and the mandible (at 6 weeks). For the maxilla and femur there were no differences. In microtomographic analysis, there were some parameters lower in diabetics, namely the volume fraction and the thickness of the trabeculae bone, at 2 and 6 weeks, and the density of trabeculae number and trabeculae connected at 6 weeks.

Conclusion: The changes detected by the techniques (computed microtomography and X-ray densitometry) were significant, in particular for the tibia and the mandible. There were no significant differences in the remaining bone, suggesting that they might not be as susceptible to a reduction of bone mineral density mediated by diabetic condition.

INTRODUÇÃO

A diabetes *mellitus* (DM) engloba um conjunto de condições metabólicas, bem conhecidas e muito estudadas. Atinge mais de 371 milhões de pessoas em todo o mundo, correspondendo a 8,3% da população mundial. A sua incidência continua a aumentar em todos os países, estimando-se que em 2030 a população atingida pela doença sofra um aumento de 49% – dados do Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes (OND) em Portugal de 2012 [1]. É uma das doenças metabólicas mais frequentes entre os países desenvolvidos [2] e Portugal é um dos países europeus com uma taxa de prevalência mais elevada. No nosso país, a prevalência da diabetes é de cerca de 12,7%. A doença afeta preferencialmente indivíduos do sexo masculino e idosos – mais de um quarto da população portuguesa na faixa etária dos 60-79 anos tem diabetes [1]. Os indivíduos com excesso de peso ou obesidade também constituem uma população de risco: um indivíduo obeso apresenta um risco três vezes superior de desenvolver a doença em relação a um indivíduo com peso normal. 90% da população diabética apresenta excesso de peso ou obesidade [1].

A DM é uma doença sistémica, definida como "uma desordem metabólica de etiologia múltipla, caracterizada por uma hiperglicemia crónica com distúrbios no metabolismo dos hidratos de carbono, lípidos e proteínas, resultantes de deficiências na secreção ou ação da insulina, ou de ambas" pela Sociedade Portuguesa de Diabetologia [1,3,4].

Os critérios de diagnóstico recaem essencialmente nos valores da glicose plasmática e da hemoglobina glicada A1c (HbA1c) e englobam: (i) glicemia em jejum ≥ 126 mg/dL (ou $\geq 7,0$ mmol/L); (ii) glicemia ≥ 200 mg/dL (ou $\geq 11,1$ mmol/L) às 2 horas, na prova de tolerância à glicose oral (PTGO) com 75g de glicose; (iii) sintomas clássicos de descompensação associados a glicemia ocasional ≥ 200 mg/dL (ou $\geq 11,1$ mmol/L); (iv) HbA1c $\geq 6,5\%$. Basta que um destes quatro critérios se verifique para se estabelecer o diagnóstico [1].

A diabetes é, assim, uma doença multifatorial, que depende da ocorrência de interações complexas entre genes, fatores ambientais e fatores comportamentais inerentes ao indivíduo. [30] Existem vários tipos de DM, sendo os mais prevalentes o tipo I (deficiente secreção de insulina), o tipo II (deficiente ação da insulina) e o gestacional (na grávida) [1].

A DM tipo I é, de entre as três, a menos prevalente [1], e resulta de uma destruição autoimune das células β dos ilhéus de Langerhans, com conseqüente deficiência, ou mesmo ausência, na produção de insulina [1,2,4], sendo que esta é a hormona

responsável pela absorção de glicose pelas células [1,2]. Os pacientes diabéticos tipo I são dependentes da administração de insulina exógena [1]. Os sintomas clássicos incluem polidipsia, xerostomia, poliúria, polifagia, astenia, perda de peso súbita, dificuldade na cicatrização de feridas, infecções recorrentes e visão turva [1,4]. A doença ocorre normalmente em crianças ou adultos jovens [1,4] situados na faixa etária 0-19 anos, atingindo 0,14% dessa população, em Portugal. A incidência da DM tipo I nas crianças e nos jovens tem vindo a aumentar significativamente nos últimos 10 anos no país [1].

A DM tipo II é caracterizada por uma produção insuficiente de insulina ou por uma resistência periférica à insulina, isto é, o organismo não consegue utilizar eficazmente a insulina produzida [1,4]. Este tipo de DM é mais frequente acima dos 40 anos de idade [1], mas a prevalência em crianças e adolescentes está a aumentar, muito em parte associada à obesidade [1,4,5]. Mulheres que tenham desenvolvido diabetes gestacional e indivíduos com hipertensão ou dislipidemia têm risco aumentado de desenvolver DM tipo II [4]. O diagnóstico da DM tipo II é muitas vezes efetuado na sequência da manifestação de complicações associadas à doença ou, acidentalmente, através da deteção de valores de glicose anormais no sangue ou na urina [1,4]. Embora ainda não sejam conhecidos os principais genes predisponentes para a doença [1], sabe-se que existe uma forte componente hereditária [1,4,6]. Além da hereditariedade, existem outros fatores que podem estar envolvidos, como sejam os estilos de vida não saudáveis – alimentação inadequada, inatividade física, obesidade –, o envelhecimento e a raça [1]. O tratamento é sobretudo farmacológico, com antidiabéticos orais (AO), paralelamente à aquisição de um estilo de vida saudável. Em situações mais graves, em que os doentes não conseguem fazer o controlo da hiperglicemia com a dieta associada a AO, pode ser necessário recorrer a administrações de insulina exógena [1]. A DM tipo II constitui um problema de saúde pública em muitos países desenvolvidos [6].

A DM gestacional define-se como qualquer grau de intolerância à glicose que é diagnosticado pela primeira vez durante a gravidez [4,7]. A resolução desta condição é importante, pois o feto necessita de um adequado suprimento de glicose para o seu crescimento e desenvolvimento. Uma grávida saudável, no terceiro trimestre de gravidez, aumenta a produção de insulina 2 a 4 vezes para manter a normoglicemia; uma mulher grávida que desenvolve DM gestacional não consegue um aumento de produção que compense a resistência à insulina [7]. Na maioria dos casos, a condição diabética resolve até pouco tempo depois do parto [7], normalmente durante o terceiro trimestre de gestação [4]. Constituem fatores de risco para a DM gestacional a

obesidade e o excesso de peso, idade superior a 30 anos, história familiar de diabetes e glicosúria [7,8]. Este tipo de DM está associado a complicações e anomalias fetais e é um forte fator de risco preditivo para o desenvolvimento de DM tipo II pós-parto [8].

A DM, nas suas diferentes apresentações clínicas, afeta o organismo humano na sua generalidade, levando à perturbação do seu funcionamento e, inclusivamente, à falência multissistémica de vários órgãos. Os órgãos mais afetados são o coração e todo o sistema vascular (o que origina ou aumenta o risco para o desenvolvimento de hipertensão arterial, acidentes vasculares, insuficiência cardíaca, etc.), os rins (com risco de desenvolvimento de nefropatia), o sistema nervoso (risco de neuropatia), os olhos (risco de retinopatia) e os ossos (osteopatia, nomeadamente osteopenia e osteoporose) [1,2].

No que se refere ao tecido ósseo, a grande maioria dos estudos, experimentais e clínicos, demonstram uma relação entre a produção inadequada de insulina e a alteração do metabolismo e formação óssea [9]. Além do efeito da deficiência de insulina, também o efeito direto da hiperglicemia crónica e o efeito a longo prazo da doença vascular, características da DM tipo I, têm interferência no metabolismo ósseo – verifica-se uma redução da atividade osteoblástica, com diminuição da mineralização óssea, e uma redução da produção de proteínas da matriz (e.g., osteocalcina, colagénio tipo I), com conseqüente diminuição da produção de matriz óssea [2, 9-12].

Em termos moleculares, verificam-se níveis aumentados de citocinas inflamatórias e uma diminuição da expressão de fatores de crescimento insulínicos (e.g., IGF-1). A redução desta expressão pode levar a uma redução da mineralização da matriz óssea, e a presença de níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, de forma crónica, parece afetar a remodelação óssea: aumentam a reabsorção óssea, através da estimulação da atividade osteoclástica e supressão da diferenciação osteoblástica e formação óssea [10].

As concentrações aumentadas das citocinas pró-inflamatórias, cuja produção parece ser estimulada pela hiperglicemia, aparentam ter uma correlação positiva com a HbA1c, isto é, quanto maiores os níveis de citocinas inflamatórias maiores os níveis de HbA1c, ou seja, menor é o grau de controlo glicémico do paciente [10].

Em termos estruturais, a massa esquelética no indivíduo diabético torna-se, desta forma, mais frágil [9,11,12], havendo uma maior predisposição à ocorrência de fraturas [10]. Mais ainda, como a cicatrização nestes indivíduos está comprometida (devido,

entre outros, à doença vascular periférica), verificam-se atrasos na cicatrização das fraturas ósseas e no processo de regeneração tecidual [9].

Apesar da evidência dos efeitos negativos da condição diabética no metabolismo do tecido ósseo, são poucos ainda os estudos que averiguam as particularidades do tecido ósseo crânio-maxilo-facial, em condições diabéticas.

O processo de crescimento e desenvolvimento do esqueleto crânio-maxilo-facial é muito mais complexo do que o de qualquer outro osso. Sabe-se que o seu desenvolvimento compreende um mosaico de locais de crescimento, locais esses que crescem a diferentes velocidades e cuja maturação ocorre em tempos diferentes. Assim sendo, espera-se que diferentes partes do complexo crânio-maxilo-facial respondam de forma diferente ao mesmo estímulo hormonal ou biomecânico [11]. No caso da DM tipo I, em que há uma deficiente produção de insulina, têm-se verificado défices no crescimento e alterações no metabolismo ósseo dos indivíduos com desenvolvimento precoce da doença (designadamente antes ou durante o período circumpubertário) [10,11,13]. Apesar da evidência para determinadas regiões anatómicas (e.g., tibia, fémur, coluna vertebral), o conhecimento do efeito desta condição na estrutura óssea crânio-mandibular é ainda pouco conhecida.

Este trabalho visa, assim, estudar as alterações na morfologia e na dinâmica de crescimento ósseo craniofacial, recorrendo a um modelo animal de diabetes experimental – modelo do rato diabético induzido por estreptozotocina (STZ) – de forma a perceber o impacto da condição diabética na estrutura e na qualidade do tecido ósseo desta região anatómica.

MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho experimental efetuado foi realizado com a autorização da Direção Geral de Veterinária e seguiu as diretrizes da legislação portuguesa do Decreto 1005/ 92 e da diretiva europeia 2010/63, que preveem os padrões técnicos requeridos na manipulação de animais usados em trabalhos experimentais.

Foram utilizadas vinte e quatro ratas da estirpe *Wistar* com oito semanas de idade, que foram mantidas em condições controladas durante todo o período em que decorreu o estudo. Os animais foram alojados no biotério da Escola de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Aos animais foi dada uma dieta (*Diet standard 4RF24 GLP*, Mucedola®, Milão, Itália) e água, *ad*

libitum. Os animais foram divididos em quatro grupos – diabéticos 2 semanas (STZ 2 semanas), controlos 2 semanas, diabéticos 6 semanas (STZ 6 semanas) e controlos 6 semanas, de acordo com o tempo de indução do estado diabético.

Indução da diabetes experimental

Para indução de diabetes, após um jejum de 24h administrou-se uma dose única de estreptozotocina (60mg/kg) diluída em tampão citrato, por via intraperitoneal. Seguidamente, foi fornecida aos animais uma solução de glicose (10% m/V) como única fonte hídrica, durante 24h, para minimizar o risco de desenvolvimento de hipoglicemia. Os animais do grupo controlo foram administrados com o veículo da solução de estreptozotocina (tampão citrato).

Os dados clínicos dos grupos experimentais, incluindo peso, ingestão hídrica e ingestão alimentar, foram determinados semanalmente.

Avaliação da glicemia

36h após a administração da STZ ou do veículo, os animais foram submetidos a avaliação da glicose plasmática. A glicemia foi determinada com um glucómetro (Precision Xeed®). Os animais que apresentaram glicemia superior a 300mg/dL foram considerados diabéticos e incluídos no grupo experimental. A normoglicemia foi confirmada para todos os animais do grupo controlo.

Eutanásia e recolha das amostras

Findo o período experimental (2 e 6 semanas após a indução da condição diabética – de acordo com os grupos experimentais), os animais foram anestesiados com xilazina (10mg/kg) e cetamina (90mg/kg) e procedeu-se à eutanásia por exsanguinação, através de punção cardíaca. Para a realização das diversas análises, procedeu-se à remoção de amostras de mandíbula, maxila, tibia e fémur, que foram fixadas adequadamente (formol tamponado a 10%).

Avaliação microtomográfica

A fim de avaliar a estrutura do osso trabeculado das tíbias, amostras da zona proximal das tíbias foram submetidas a microtomografia de raio-X (micro-CT). Esta metodologia é uma técnica não destrutiva, que permite a análise de secções microtomográficas e a visualização tridimensional interna das amostras, além de quantificações automatizadas de área e/ou volume.

A região proximal de cada tíbia foi digitalizada com uma fonte de raios-X de 50kV e uma intensidade de 160 μ A, usando um tamanho de voxel de 12 μ m. Foram adquiridas 600 secções por amostra. Para a avaliação da estrutura trabecular foi definida uma região de interesse na orientação metáfise-diáfise com 2mm. (excluindo o osso cortical), com início a 1mm da placa de crescimento, numa direção proximal.

Foram avaliadas as seguintes variáveis: VO/VT (fração do volume ósseo, expressa em percentagem – calculada pela razão entre o volume ósseo (VO, em mm³) e o volume total (VT, em mm³)); Dens.Conect (densidade de trabéculas conectadas, normalizada pelo VT, expressa em 1/mm³); Tb.N (número de trabéculas, expressa em 1/mm); Tb.Esp (espessura das trabéculas, expressa em mm); Tb.Sp (separação entre trabéculas (ou espessura medular), expressa em mm).

Aquisição radiográfica

Procedeu-se à aquisição das imagens radiológicas, a qual se levou a cabo com recurso a um sensor intraoral RVG (Kodak RVG® 5100) e a um aparelho de raio-X convencional (Trophy®, tipo 708 B) com 8 mA e 70 kV como fonte de radiação. A distância ao foco foi constante para todas as amostras (0,20m), assim como o tempo de exposição (0,10 segundos). Na aquisição da imagem teve-se em especial atenção o paralelismo das áreas a radiografar com o plano de suporte e o foco. As imagens foram processadas usando o *software* KODAK® *Dental Imaging Software* 6.12.32 e arquivadas sob a forma de ficheiros TIFF.

Análise densiométrica

Efetou-se a medição da densidade ótica relativa utilizando o *software* de análise de imagem Image J (versão 1.6.0 20) nas áreas de interesse (AI) delimitadas para a tíbia, fémur, hemimandíbula e hemimaxila, conforme representado na figura 1. Nas hemimandíbulas bem como nas hemimaxilas, a AI foi delimitada pela zona interradicular do primeiro molar; na tíbia, a AI foi delimitada na face medial da porção proximal (excluindo o osso cortical); e no fémur a AI foi limitada à cabeça.

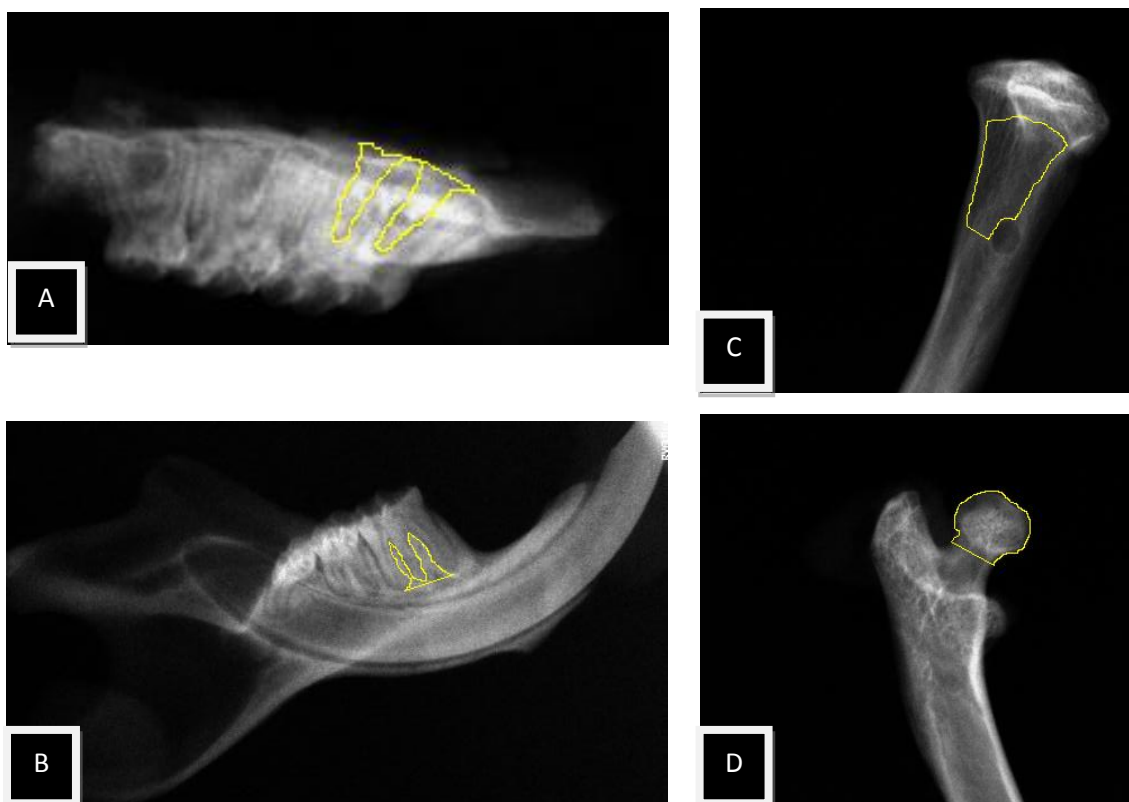


Figura 1. Delimitação das áreas de interesse para a avaliação da DMO. Na hemimaxila e na hemimandíbula (A e B, respetivamente), selecionaram-se as áreas interradiculares dos primeiros molares de cada uma das peças ósseas; na tíbia (C), selecionou-se a área medular da face medial da porção proximal do osso; no fémur (D), selecionou-se a cabeça e o colo.

Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos a análise estatística, utilizando o *software Special Package for Studies in Society (SPSS®)*, versão 21, IBM®. As variáveis foram testadas para a sua igualdade, usando o teste não-paramétrico U de Mann-Whitney. Considerou-se um nível de significância de 5%, para um intervalo de confiança de 95% ($p < 0.05$).

Considerou-se como hipótese inicial que existem diferenças na densidade mineral óssea (DMO) entre o grupo diabético e o grupo controlo. Pesquisou-se a existência de diferenças entre os controlos de 2 semanas e os diabéticos de 2 semanas (C2s vs D2s); os controlos de 6 semanas e os diabéticos de 6 semanas (C6s vs D6s); os controlos de 2 semanas e os controlos de 6 semanas (C2s vs C6s); e os diabéticos de 2 semanas e os diabéticos de 6 semanas (D2s vs D6s).

RESULTADOS

Avaliação microtomográfica

A avaliação da microestrutura do osso trabeculado foi realizada na tíbia, região proximal – às 2 e às 6 semanas após a indução da condição diabética. Nas figuras 2 e 3 apresentam-se as imagens representativas da avaliação microtomográfica bidimensional, num corte longitudinal representativo após a reconstrução tridimensional da região caracterizada, para os períodos de tempo avaliados.

Esta avaliação revelou uma redução da estrutura trabeculada nos animais do grupo diabético, quer às 2 quer às 6 semanas, com perda da interconectividade das trabéculas ósseas, principalmente ao nível da região central. As alterações foram bem mais evidentes às 6 semanas, observando-se inclusivamente zonas de ausência da organização trabecular característica. Nas zonas em que se observa a manutenção da rede trabecular, verifica-se uma menor espessura das trabéculas remanescentes. As imagens das reconstruções tridimensionais sugerem resultados semelhantes, sendo notória a redução quantitativa das trabéculas ósseas e a sua menor espessura e interconectividade nos animais diabéticos, às 2 e às 6 semanas após a indução.

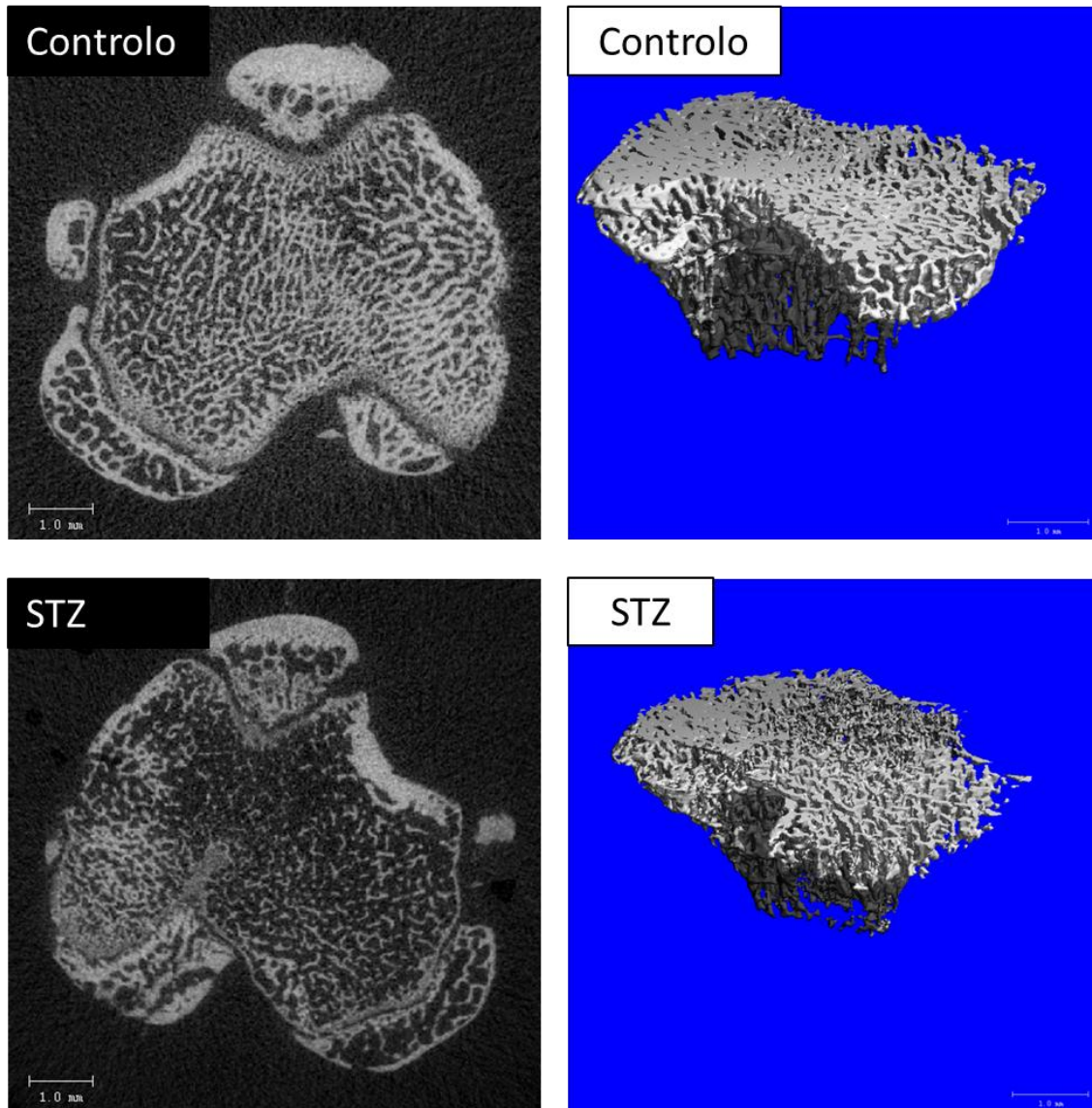


Figura 2. Avaliação microtomográfica da tíbia proximal às 2 semanas após a indução da condição diabética (STZ) e respetivos controlos (Controlo). Imagens representativas da análise bidimensional - secções longitudinais - (esquerda) e da reconstrução tridimensional (direita).

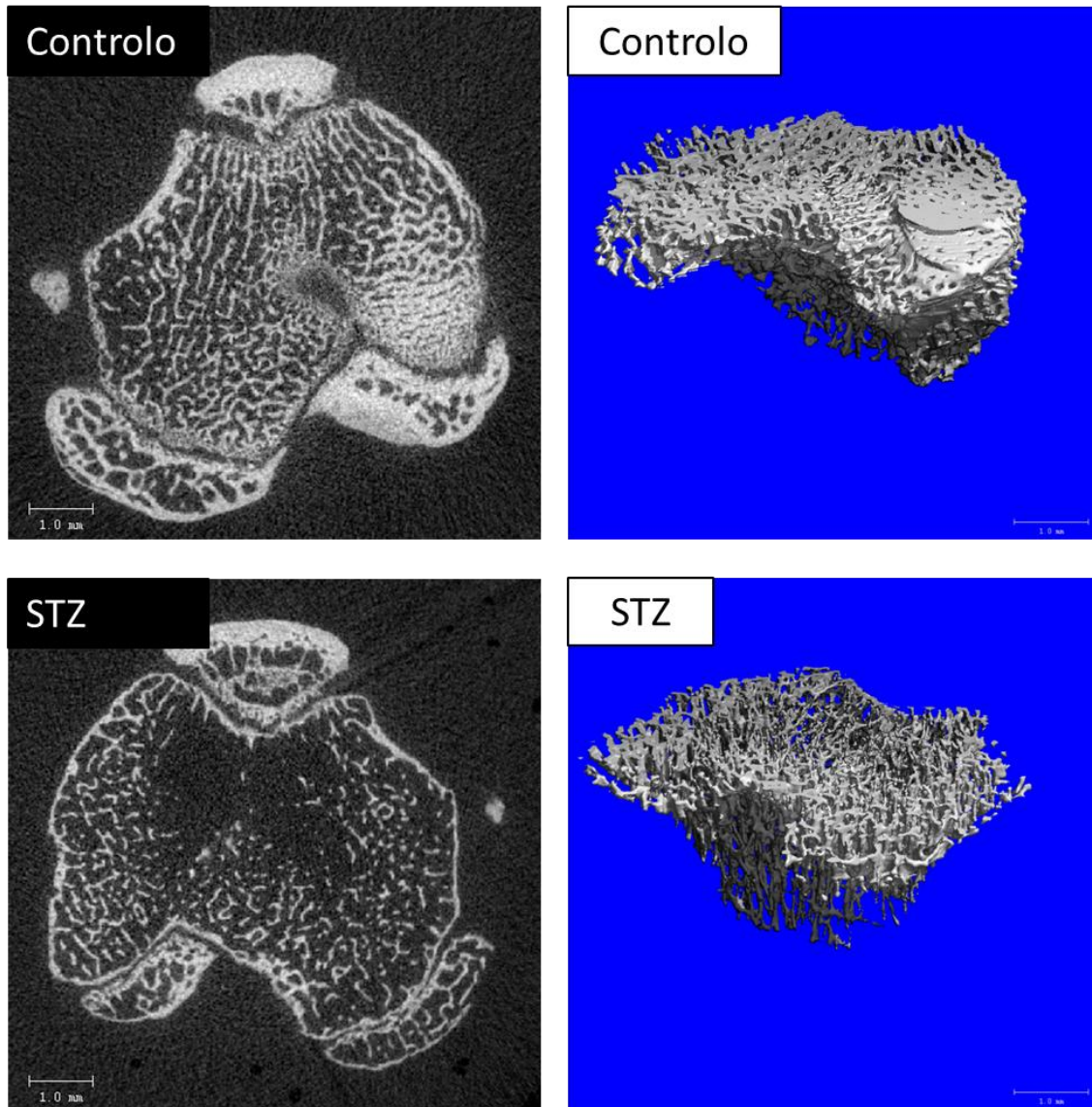


Figura 3. Avaliação microtomográfica da tíbia proximal às 6 semanas após a indução da condição diabética (STZ) e respetivos controlos (Controlo). Imagens representativas da análise bidimensional - secções longitudinais - (esquerda) e da reconstrução tridimensional (direita).

Para além da avaliação qualitativa, foi realizada também uma avaliação quantitativa da microestrutura da região trabeculada, através da computação de índices morfométricos. Os resultados encontram-se apresentados na tabela I.

Tabela I. Resultados da avaliação dos índices morfométricos da microestrutura do osso trabecular na tíbia proximal. STZ: Grupo "Diabetes". VO/VT: fração do volume ósseo. Dens.Conect: densidade de trabéculas conectadas. Tb.N: número de trabéculas. Tb.Esp: espessura das trabéculas. Tb.Sp: separação entre trabéculas. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão. (*) Significância estatística vs controlo 2 semanas ($p < 0,05$). (#) Significância estatística vs controlo 6 semanas ($p < 0,05$).

	VO/VT (%)	Dens.Conect (1/mm ³)	Tb.N (1/mm ¹)	Tb.Esp (mm)	Tb.Sp (mm)
Controlo – 2 semanas	0,27 \pm 0,009	106,77 \pm 7,08	4,33 \pm 0,058	0,081 \pm 0,003	0,223 \pm 0,007
STZ – 2 semanas	0,19 \pm 0,015 *	98,53 \pm 8,05	4,40 \pm 0,288	0,065 \pm 0,002 *	0,221 \pm 0,014
Controlo – 6 semanas	0,28 \pm 0,012	96,41 \pm 6,03	4,24 \pm 0,129	0,083 \pm 0,003	0,224 \pm 0,004
STZ – 6 semanas	0,08 \pm 0,017 #	47,11 \pm 2,92 #	2,61 \pm 0,048 #	0,048 \pm 0,004 #	0,383 \pm 0,010 #

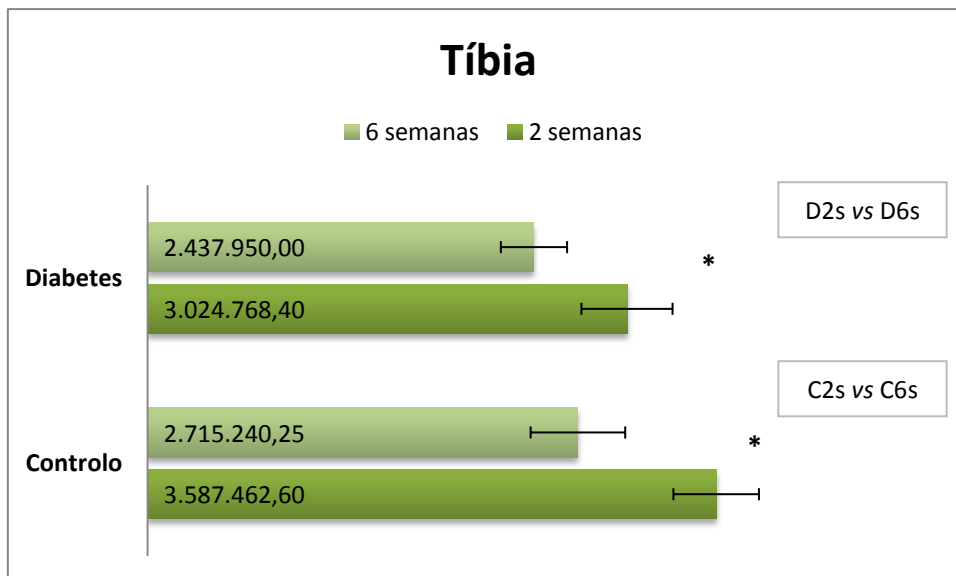
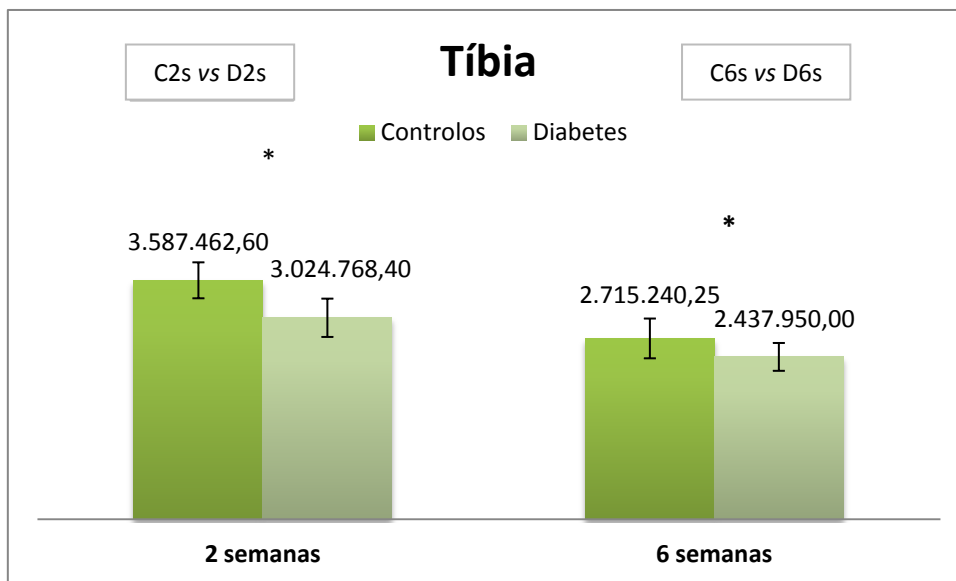
Para a fração do volume ósseo, os valores são significativamente inferiores nos animais diabéticos comparativamente com os do grupo controlo, nos dois tempos avaliados. O mesmo se verifica para a espessura das trabéculas. No entanto, para a densidade de trabéculas conectadas e para o número de trabéculas, não se observam diferenças significativas entre os dois grupos às 2 semanas, mas às 6 semanas após indução da condição diabética os valores foram significativamente mais baixos no grupo diabético. No que respeita à separação entre trabéculas, apesar de, à semelhança dos dois parâmetros anteriores, não se verificarem diferenças significativas às 2 semanas, às 6 semanas o grupo diabético apresenta valores significativamente superiores aos dos registados no grupo controlo.

Análise densitométrica

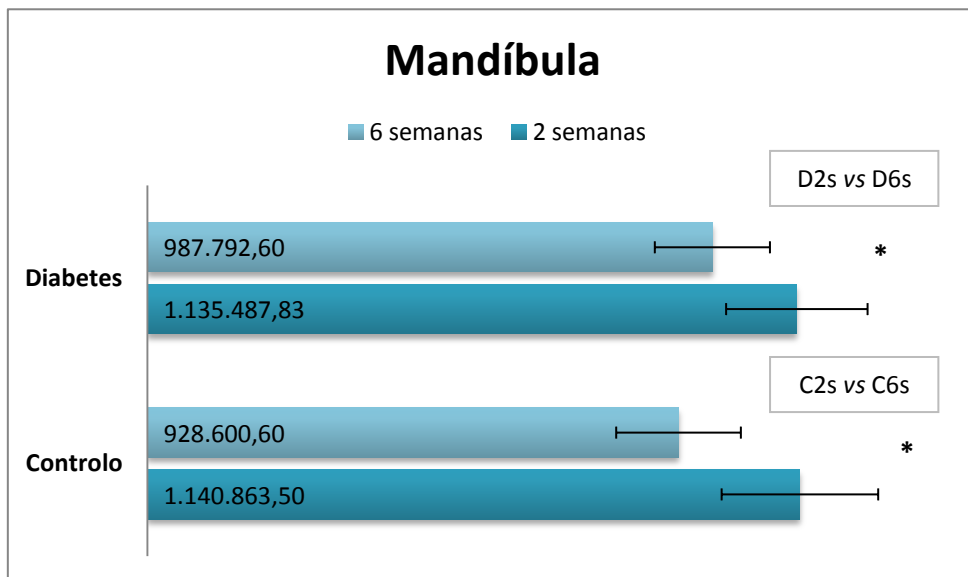
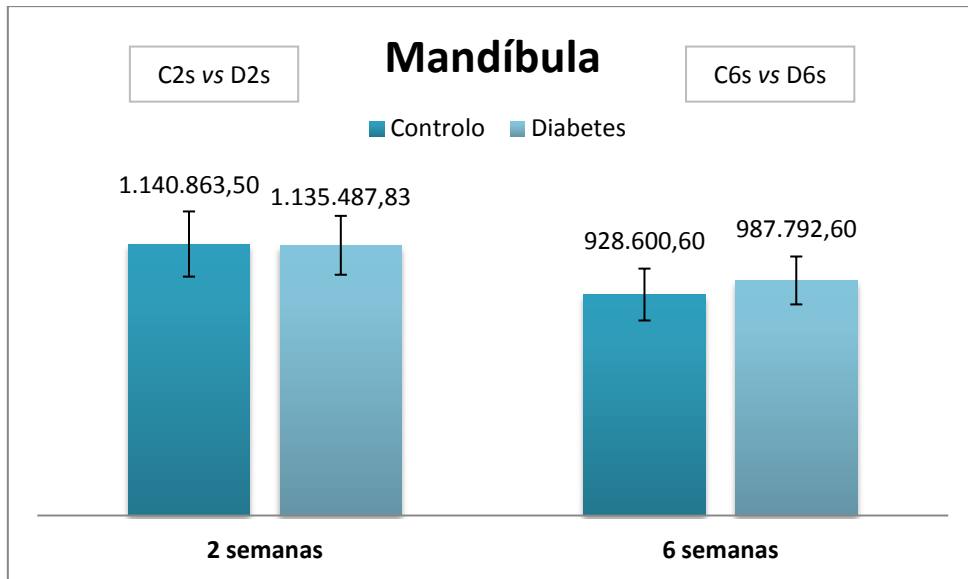
Os resultados obtidos foram distintos para as diferentes peças ósseas avaliadas. Para a tíbia, obtiveram-se diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) para os quatro parâmetros avaliados, ou seja, C2s vs D2s, C6s vs D6s, C2s vs C6s e D2s vs D6s. Para a mandíbula também se obtiveram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), mas apenas para os parâmetros C2s vs C6s e D2s vs D6s. Para a maxila

bem como para a cabeça do fémur nenhuma das diferenças registadas foi estatisticamente significativa ($p>0,05$).

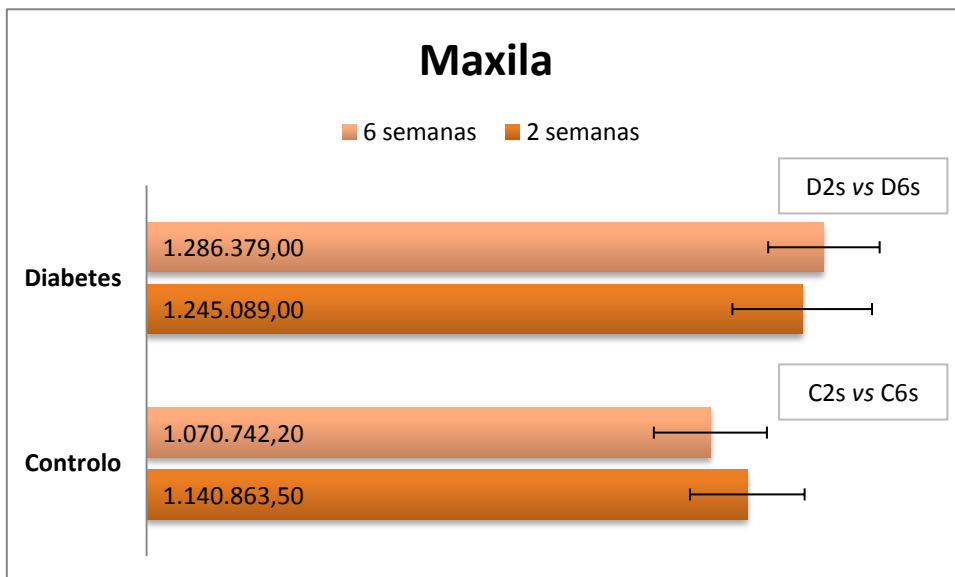
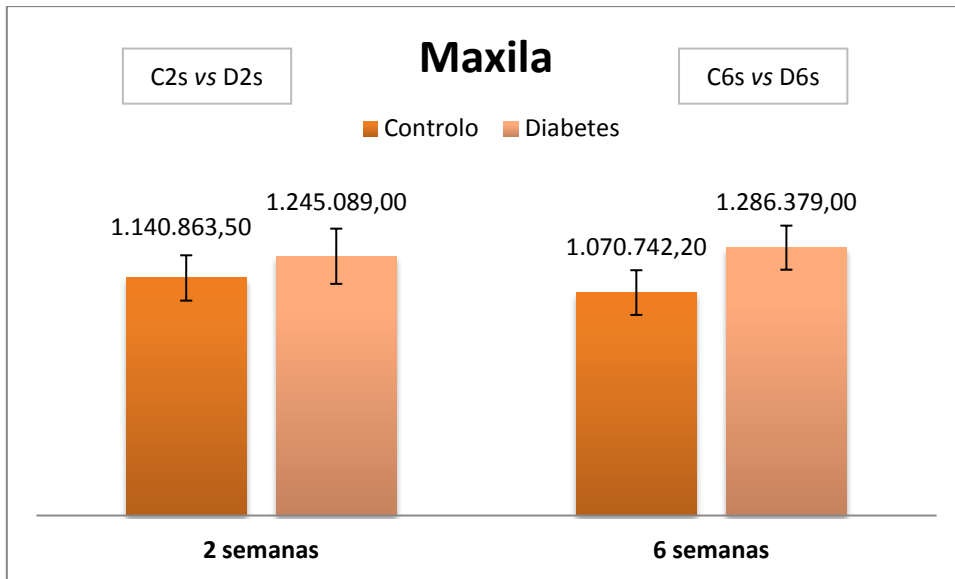
Os resultados apresentam-se nos gráficos que se seguem (1-8).



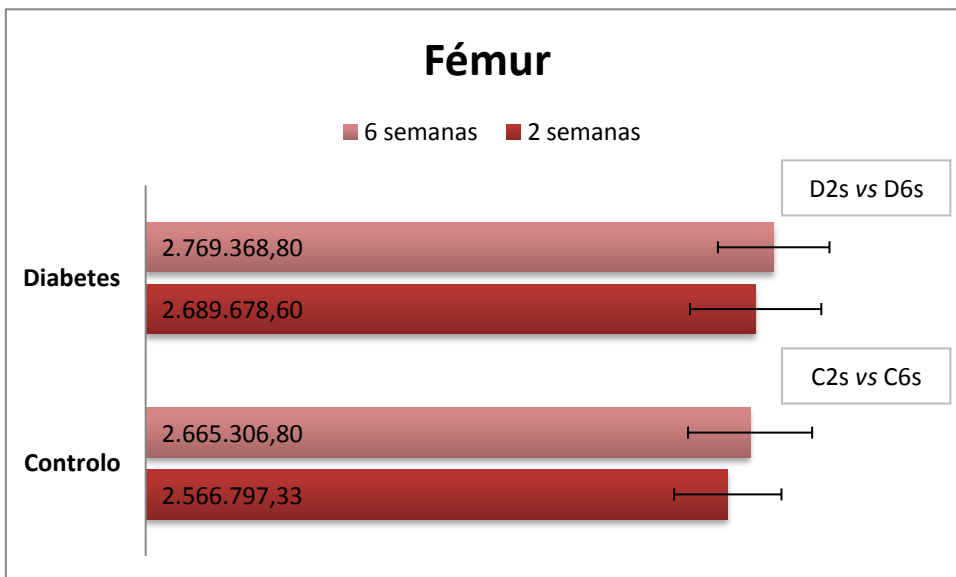
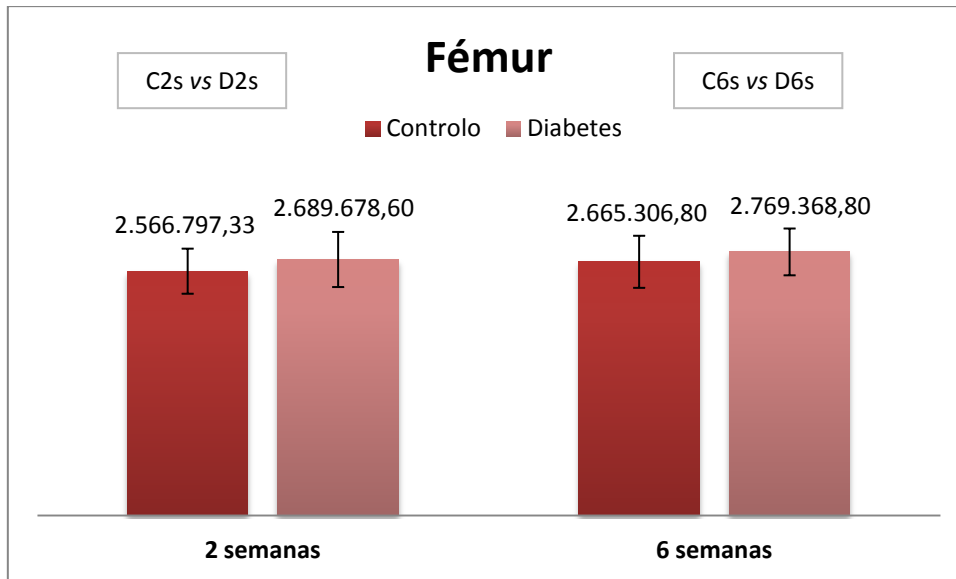
Gráficos 1 e 2. Comparação da densidade integrada da tíbia entre o grupo controlo e o grupo diabético. Os resultados são apresentados sob a forma de média e erro padrão. A escala de intensidades foi apresentada em unidades abstratas. (*) Significância estatística ($p < 0,05$).



Gráficos 3 e 4. Comparação da densidade integrada da mandíbula entre o grupo controle e o grupo diabético. Os resultados são apresentados sob a forma de média e erro padrão. A escala de intensidades foi apresentada em unidades abstratas. (*) Significância estatística ($p < 0,05$).



Gráficos 5 e 6. Comparação da densidade integrada da maxila entre o grupo controle e o grupo diabético. Os resultados são apresentados sob a forma de média e erro padrão. A escala de intensidades foi apresentada em unidades abstratas. (*) Significância estatística ($p < 0,05$).



Gráficos 7 e 8. Comparação da densidade integrada do fémur entre o grupo controlo e o grupo diabético. Os resultados são apresentados sob a forma de média e erro padrão. A escala de intensidades foi apresentada em unidades abstratas. (*) Significância estatística ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

A diabetes *mellitus* é uma doença sistémica, multifatorial e de carácter crónico [1,3,4,6]. Atinge cerca de 8,3% da população mundial e 12,7% da população portuguesa e a sua incidência continua a aumentar em todos os países [1]. É uma das doenças mais frequentes entre os países desenvolvidos [2].

Entre os três tipos de DM, o tipo I é o menos frequente, mas também aquele que mais atinge indivíduos em período de crescimento – crianças e adolescentes entre os 0 e os 19 anos de idade [1,4]. A interferência nos processos de crescimento e desenvolvimento de um indivíduo resulta em complicações ao longo da vida [15]. No período pubertário, as hormonas sexuais estimulam o eixo GH/IGF (GH – *growth hormone*) promovendo assim o crescimento linear e a expansão óssea. Moyer-Mileur *et al* (2008) concluíram que a falta de controlo metabólico conduz a alterações neste eixo, culminando em alterações do metabolismo ósseo [13]. Aproximadamente 60% da massa óssea de um adulto, incluindo o osso do complexo crânio-maxilo-facial, é ganha durante o período de crescimento, que coincide muitas vezes com o início do desenvolvimento da DM tipo I, do que resulta interferência no processo de formação óssea [11].

No presente estudo experimental, com o modelo da ratazana diabética induzido por STZ, encontraram-se diferenças entre o grupo controlo e o grupo diabético, no que respeita à densidade mineral óssea (DMO).

A avaliação microtomográfica, efetuada para as tíbias, revelou uma redução da estrutura trabeculada nos animais do grupo diabético, com perda da interconectividade das trabéculas ósseas marcadamente na região central, quer às 2 quer às 6 semanas, sendo as alterações bem mais evidentes às 6 semanas, onde se observaram inclusivamente zonas de ausência de rede trabecular. As trabéculas remanescentes verificavam-se menos espessas. Estes resultados não estão de acordo com Armas *et al* (2012), que não encontraram diferenças significativas entre diabéticos e controlos, na análise microtomográfica computadorizada (μ CT). No entanto, este analisou amostras de osso da crista íliaca, que provavelmente não tem as mesmas características arquiteturais que a tíbia [14]. Akhter *et al* (2007) afirmaram que defeitos na microarquitettura óssea podem ser detetados através de μ CT [16].

Em termos quantitativos, por computação de índices morfométricos, verificou-se a existência de diferenças estatisticamente significativas em todos os parâmetros avaliados – VO/VT, Tb.Esp, Dens.Conect, Tb.N e Tb.Sp – no tempo de 6 semanas. Às

2 semanas, apenas a fração de volume ósseo e a espessura das trabéculas apresentaram diferenças significativas. Por estes resultados, concluímos que o osso dos animais diabéticos é claramente menos denso, apresentando-se com um menor número de trabéculas e estas de menor espessura e, logo, mais espaço isento de conteúdo mineral – maior separação entre trabéculas e menor densidade de trabéculas conectadas. Diferenças estas especialmente evidentes às 6 semanas da indução diabética, o que permitiu verificar que o tempo de desenvolvimento da condição diabética parece influir na gravidade da perda da estrutura mineral, pelo menos no que se refere à estrutura do osso trabeculado da tíbia. Em concordância com os resultados por nós obtidos, também Simmons *et al* (2011) observaram redução da estrutura trabecular óssea em ratazanas induzidas com DM tipo I [15].

Na análise densitométrica, os resultados obtidos diferiram de osso para osso, sendo evidente a presença de diferenças entre o grupo controlo e o grupo diabético, para a tíbia. Apenas neste caso, verificou-se que a densidade do tecido ósseo dos indivíduos diabéticos é inferior à dos indivíduos controlo e também que essa diferença se verifica entre os dois tempos de análise (2 e 6 semanas), com significância estatística. No caso da hemimandíbula, embora não se tenham encontrado diferenças entre o grupo controlo e o grupo diabético, quer para as 2 semanas quer para as 6 semanas, encontraram-se diferenças entre os controlos de 2 semanas e os controlos de 6 semanas e entre os diabéticos de 2 semanas e os diabéticos de 6 semanas, sendo consideravelmente mais baixos os valores de DMO para as 6 semanas, tanto nos controlos como nos diabéticos – o que quer dizer que não há diferenças entre os diabéticos e os não diabéticos, mas há diferenças com o tempo, havendo perda da DMO com o envelhecimento. Já para a hemimaxila e para o fémur não se encontraram quaisquer diferenças estatisticamente significativas.

Portanto, quer a μ CT quer a densitometria detetaram alterações significativas especialmente na tíbia; e na mandíbula apenas às 6 semanas. O que quer dizer que os restantes ossos serão pouco afetados pela condição diabética, em termos de densidade mineral, pelo menos neste modelo animal. Tal facto poderá estar relacionado com a estrutura intrínseca dos próprios ossos, apresentando estes uma estrutura trabecular reduzida, comparativamente com a tíbia. Assim talvez a razão pela qual a tíbia é o osso que parece ser mais afetado pela condição diabética se deva à sua microestrutura trabecular própria, diferente da restante generalidade do esqueleto ósseo da ratazana – essencialmente cortical –, e a um maior *turnover* ósseo, que se verifica neste tipo de osso.

Talvez por estes motivos, anteriormente citados, os indivíduos portadores de DM tipo I tenham risco aumentado de fraturas ósseas, relativamente à população não-diabética. Segundo Vestergaard *et al* (2007), Miao *et al* (2007) e Janghorbani *et al* (2005), esse risco relativo é 6-7 vezes maior [17-19]. Todavia, apesar de uma DMO diminuída ser frequente na DM tipo I [20,21] e de esta poder contribuir para o aumento do risco de fratura nos indivíduos com a doença, esse fator por si só não explica todas as alterações verificadas, afirma Vestegaard *et al* (2007) [17]. Segundo Verhaeghe *et al* (1989, 1990), determinadas características ósseas, como por exemplo variações na taxa de remodelação óssea (*turnover*) e efeitos microarquiteturais, podem ajudar a explicar o risco aumentado [22,23].

Estudos epidemiológicos têm demonstrado um aumento no risco de fratura na DM tipo I, mas estes nem sempre documentam complicações da diabetes [24,25]. Tal facto leva-nos a pensar que as alterações no metabolismo e/ou na microarquitetura óssea podem estar direta ou indiretamente relacionadas com complicações da doença. Por outro lado, o problema pode estar a um nível não detetável pelas técnicas histomorfométricas convencionais, como por exemplo a elasticidade, a dureza e a força do tecido ósseo, segundo Armas *et al* (2012) [14]. Coe *et al* (2011) referem ainda a possibilidade de a causa para o risco aumentado de fratura nos diabéticos tipo I estar relacionada com alterações no conteúdo mineral do tecido ósseo – forma e tamanho dos cristais de hidroxiapatite, concentração de minerais na matriz óssea – e no seu componente orgânico – moléculas de colagénio –, podendo estas também ser afetados pela hiperglicemia, quer direta quer indiretamente. As células responsáveis pela formação e pela manutenção ósseas – osteoblastos e osteócitos, respetivamente – podem também ser afetadas pela doença [26].

As causas para a redução da DMO nos indivíduos com DM tipo I não estão ainda bem definidas [27,28]. Vários mecanismos têm sido propostos, nomeadamente, efeitos de produtos de glicosilação avançada (resultantes da degradação do colagénio ósseo [29-32]), aumento da excreção urinária de cálcio, fosfato e magnésio, aumento da expressão de citocinas inflamatórias, baixos níveis de hormona paratiroideia (PTH), microangiopatia diabética com reduzido suprimento sanguíneo ao osso, alterações no metabolismo ósseo e deficiência de vitamina D [15].

Este estudo tem várias limitações. Desde logo o reduzido tamanho da amostra, que não nos permite uma representatividade da população e assim obter dados mais fiáveis, podendo não ter poder suficiente para se observarem diferenças. Não foram tidos em conta fatores como a idade e o sexo dos animais. A metodologia utilizada

apresenta também algumas limitações inerentes à própria técnica: a obtenção de imagem radiográfica é, por inerência, bidimensional; está sujeita a distorção; e é uma técnica em que se verificam sobreposições de imagem – situações que podem dificultar e mascarar a observação de diferenças entre grupos.

CONCLUSÃO

Pouco se sabe ainda acerca das alterações na microarquitetura e no metabolismo ósseos e a sua relação com a patogénese da fragilidade esquelética dos pacientes com DM tipo I. Os mecanismos que conduzem à redução da DMO nos indivíduos com a doença não estão ainda bem definidos e as opiniões são variadas. As alterações detetadas quer pela μ CT quer pela densitometria foram significativas especialmente na tíbia; e na mandíbula apenas às 6 semanas de indução diabética. Ao que parece, os restantes ossos não são tão suscetíveis à doença.

Importa desenvolver mais estudos na área, com amostras de tamanho e representatividade suficiente para obter resultados estatisticamente significativos. A DM é uma doença com importância significativa e crescente, sendo que a osteopatia diabética assume um papel importante na morbilidade e mortalidade associada a estas condições metabólicas, cuja incidência continua a aumentar.

AGRADECIMENTOS

Deixo o meu sincero agradecimento ao Professor Doutor Pedro de Sousa Gomes, pela sua contribuição para a concretização desta monografia, com a sua competência, empenho e paciência.

Cada dia sabemos mais e entendemos menos.

Albert Einstein

BIBLIOGRAFIA

1. **Diabetes: factos e números.** Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes, Portugal. 2012.
2. Freude T, Braun KF, Haug A, Pscherer S, Stöckle U, Nussler AK, Enhert S. **Hyperinsulinemia reduces osteoblast activity in vitro via upregulation of TGF- β .** J Mol Med 2012; 90:1275-1266.
3. **Sociedade Portuguesa de Diabetologia.** Em: <http://www.spd.pt/index.php/grupos-de-estudo-mainmenu-30/classificacao-da-diabetes-mellitus-mainmenu-175>.
4. American Diabetes Association. **Diagnosis and Classification of Diabetes.** Diabetes Care 2009; 32(Suppl 1): S62–S67.
5. Blumentals WA, Hwu P, Kobayashi N, Ogura E. **Obesity in hospitalized type 2 diabetes patients: A descriptive study.** Med Sci Monit. 2013; 19: 359–365.
6. Bener A, Yousafzai MT, DeFronzo RA. **Parental transmission of type 2 diabetes mellitus in a highly endogamous population.** World J Diabetes. 2013 April 15; 4(2): 40–46.
7. Golbidi S, Laher I. **Potential Mechanisms of Exercise in Gestational Diabetes.** J Nutr Metab. 2013; 2013: 285948.
8. Yang SJ, Kim TN, Kim SH. **Insulin secretion and insulin resistance in Korean women with gestational diabetes mellitus and impaired glucose tolerance.** Korean J Intern Med. 2013 May; 28(3): 306–313.
9. Lu H, Kraut D, Gerstenfeld LC, Graves DT. **Diabetes Interferes with the Bone Formation by Affecting the Expression of Transcription Factors that Regulate Osteoblast Differentiation.** Endocrinology 2003; 144(1):346-352.
10. AboElAsrar MA, Elbarbary NS, Elshennawy DE, Omar AM. **Insulin-like growth factor-1 cytokines cross-talk in type 1 diabetes mellitus: relationship to microvascular complications and bone mineral density.** Elsevier (2012) 59:86-93.
11. Abbassy M, Watari I, Ono T: **The Effect of Type 1 Diabetes Mellitus on the Craniofacial Complex.** Type 1 Diabetes Complications, Kindle ed., 2012; 21:437-462.
12. Horcajada-Molteni MN, Chanteranne B, Lebecque P, Davicco MJ, Coxam V, Young A, Barlet JP. **Amylin and Bone Metabolism in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats.** J Bone Miner Res 2001; 16(5): 958-965.
13. Moyer-Mileur LJ, Slater H, Jordan KC, Murray MA. **IGF-1 and IGF Binding Proteins and Bone Mass, Geometry, and Strength: Relation to Metabolic Control in Adolescent Girls With Type 1 Diabetes.** J Bone Miner Res 2008; 23(2):1884-1891.
14. Armas LAG, Akhter MP, Drincic A, Recker RR. **Trabecular Bone Histomorphometry in Humans with Type 1 Diabetes Mellitus.** Bone 2012; 50(1): 91-96.
15. Simmons JH, Raines M, Ness KD, Hall R, Gebretsadik T, Mohan S, Spagnoli A. **Metabolic control and bone health in adolescents with type 1 diabetes.** Int J Ped Endo 2011; 2011:13.

16. Akhter MP, Lappe JM, Davies KM, Recker RR. ***Transmenopausal changes in the trabecular bone structure.*** Bone 2007; 41:111–116.
17. Vestergaard P. ***Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes – a meta-analysis.*** Osteoporos Int. 2007; 18:427–444.
18. Janghorbani M, Van Dam RM, Willett WC, Hu FB. ***Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture.*** Am J Epidemiol 2007; 166:495–505.
19. Miao J, Brismar K, Nyrén O, Ugarph-Morawski A, Ye W. ***Elevated hip fracture risk in type 1 diabetic patients: A population-based cohort study in Sweden.*** Diabetes Care 2005; 28:2850–2855.
20. Strotmeyer ES, Cauley JA, Orchard TJ, Steenkiste AR, Dorman JS. ***Middle-aged premenopausal women with type 1 diabetes have lower bone mineral density and calcaneal quantitative ultrasound than nondiabetic women.*** Diabetes Care 2006; 29:306–311.
21. Mastrandrea LD, Wactawski-Wende J, Donahue RP, Hovey KM, Clark A, Quattrin T. ***Young women with type 1 diabetes have lower bone mineral density that persists over time.*** Diabetes Care 2008; 31:1729–1735.
22. Verhaeghe J, Suiker AM, Nyomba BL, Visser WJ, Einhorn TA, Dequeker J, Bouillon R. ***Bone mineral homeostasis in spontaneously diabetic BB rats. II. Impaired bone turnover and decreased osteocalcin synthesis.*** Endocrinology 1989; 124:573–582.
23. Verhaeghe J, Visser WJ, Einhorn TA, Bouillon R. ***Osteoporosis and diabetes: Lessons from the diabetic BB rat.*** Horm Res 1990; 34:245–248.
24. Forsen L, Meyer HE, Midthjell K, Edna TH. ***Diabetes mellitus and the incidence of hip fracture: Results from the nord-trondelag health survey.*** Diabetologia 1999; 42:920–925.
25. Ahmed LA, Joakimsen RM, Berntsen GK, Fonnebo V, Schirmer H. ***Diabetes mellitus and the risk of non-vertebral fractures: The tromso study.*** Osteoporos Int. 2006; 17:495–500.
26. Coe LM, Irwin R, Lippner D, McCabe LR. ***The bone marrow microenvironment contributes to type 1 diabetes induced osteoblast death.*** J Cell Physiol. 2011; 226:477–483.
27. Valerio G, del PA, Esposito-del PA, Buono P, Mozzillo E, Franzese A. ***The lumbar bone mineral density is affected by long-term poor metabolic control in adolescents with type 1 diabetes mellitus.*** Horm Res 2002; 58:266-272.

28. Heap J, Murray MA, Miller SC, Jalili T, Moyer-Mileur LJ. ***Alterations in bone characteristics associated with glycemic control in adolescents with type 1 diabetes mellitus.*** J Pediatr 2004; 144:56-62.
29. Massé PG, Pacifique MB, Tranchant Carole, Arjmandi BH, Ericson KL, Donovan SM, Delvin E, Caissie M. ***Bone Metabolic Abnormalities Associated with Well-Controlled Type 1 Diabetes (IDDM) in Young Adult Women: A Disease Complication Often Ignored or Neglected.*** J Am Col Nut 2010; 29(4):419-429.
30. Eller-Vainicher C, Zhukouskaya VV, Tolkachev YV, Koritko SS, Cairoli E, Grossi E, Beck-Peccoz P, Chiodini I, Shepelkevich AP. ***Low Bone Mineral Density and Its Predictors in Type 1 Diabetic Patients Evaluated by the Classic Statistics and Artificial Neural Network Analysis.*** Diabetes Care 2011; 34:2186-2191.
31. Miazgowski T, Czekalski S. ***A 2-year Follow-up Study on Bone Mineral Density and Markers of Bone Turnover in Patients with Long-Standing Insulin-Dependent Diabetes Mellitus.*** Osteoporos Int 1998; 8:399-403.
32. Danielson KK, Elliot ME, LeCaire T, Binkley N, Palta M. ***Poor Glycemic Control is Associated with Low BMD Detected in Premenopausal Women with Type 1 Diabetes.*** Osteoporos Int 2009; 20(6):923-933.

ANEXOS