

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

NATÁLIA PRADELLA CIGNACHI

Regeneração óssea em camundongos: correlação entre diabetes tipo 1 e  
menopausa experimental

Porto Alegre  
2018

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

NÍVEL: DOUTORADO

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA  
BUCOMAXILOFACIAL

NATÁLIA PRADELLA CIGNACHI

**REGENERAÇÃO ÓSSEA EM CAMUNDONGOS: CORRELAÇÃO ENTRE  
DIABETES TIPO 1 E MENOPAUSA EXPERIMENTAL**

Porto Alegre  
2018

NATÁLIA PRADELLA CIGNACHI

**REGENERAÇÃO ÓSSEA EM CAMUNDONGOS: CORRELAÇÃO ENTRE  
DIABETES TIPO 1 E MENOPAUSA EXPERIMENTAL**

*Linha de Pesquisa:* Diagnóstico e Terapêutica Aplicadas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Escola de Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na área de concentração de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial

Orientadora: Maria Martha Campos

Porto Alegre  
2018

## Ficha Catalográfica

C571r Cignachi, Natália Pradella

Regeneração óssea em camundongos : Correlação entre diabetes tipo 1 e menopausa experimental / Natália Pradella Cignachi .

– 2018.

125 f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Martha Campos.

1. regeneração óssea. 2. diabetes tipo 1. 3. camundongos machos e fêmeas. 4. insulina. 5. vitamina D3. I. Campos, Maria Martha. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecário responsável: Marcelo Votto Texeira CRB-10/1974

NATÁLIA PRADELLA CIGNACHI

**REGENERAÇÃO ÓSSEA EM CAMUNDONGOS: CORRELAÇÃO ENTRE  
DIABETES TIPO 1 E MENOPAUSA EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Escola de Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na área de concentração de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial

BANCA EXAMINADORA

---

Dr. João Batista Calixto

---

Dr. Pedro Antônio González Hernandez

---

Dr. Vânia Regina Camargo Fontanella

---

Dr. Rogério Belle de Oliveira

---

Dr. Pedro Cesar Chagastelles

À minha família, dedico todas as minhas conquistas.  
Meu pai Lauro, minha mãe Irdes e minha irmã Amanda, agradeço por  
acreditarem na minha capacidade; pelo carinho e incentivo  
constantes.  
Ao meu marido, Paulo, agradeço pela paciência, pela força e,  
principalmente, pelo amor durante todo esse período.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço minha orientadora, Profa. Dra. Maria Martha Campos. Totalizamos 6 anos nessa caminhada, sendo 2 anos de mestrado e outros 4 de doutorado. Muito, ou praticamente tudo que aprendi nesse período devo a ti. Obrigada pela paciência de ensinar. Obrigada por me ajudar a conduzir esse projeto que criamos juntas. Obrigada pelo tempo disponível. Obrigada pela orientação na tese e obrigada pelos conselhos que levarei para a vida. Tu és uma referência profissionalmente, na ciência, mas também como pessoa.

Não tenho palavras para agradecer os meus colegas e colaboradores, Rodrigo Braccini Da Silva, Gustavo Dalto Barroso Machado, Alice Ribeiro e Amanda Pradella Cignachi, minha amada equipe de “insulinos”; sem o apoio de vocês, esse trabalho não teria acontecido. Obrigada pela ajuda nos dias de semana, nos finais de semana e nos feriados. Obrigada pelos momentos de trabalho árduo e pelos momentos de risadas. Hoje vocês são mais que colegas, são amigos queridos que levarei para sempre no coração.

À minha colega de laboratório, que virou uma amiga muito especial, Raquel Dal Sasso Freitas, tu foste alguém com quem eu sempre pude contar, seja para me ajudar em seminários ou ainda para um café e uma conversa.

Aos meus colegas de laboratório e amigos, Natália Nicoletti, Kesiane Da Costa, Maria Eduarda Amaral, Cauana Tavares, Fernanda Cruz, Priscila Pail, Valnês Rodrigues Júnior, Ana Paula Dagnino e Pedro Chagas Telles pelo apoio e carinho.

Aos meus amigos de infância e de faculdade agradeço por apoiarem a minha decisão de executar esse projeto e pela minha ausência durante esse tempo.

Aos meus pacientes que compreenderam minha ausência no consultório em certas ocasiões.

Ao professor Ricardo Smidt, que me encorajou a ingressar na vida acadêmica.

Às técnicas Janaína Pasetti Nunes e Raquel Oliveira, obrigada pelo tempo dedicado a me ajudar na parte histológica.

Aos funcionários do INTOX, Fillipe Angelino, Carlos Eduardo Leite, Rafaela Rubin e Juliano Soares pela parceria.

Ao técnico Adolpho Augustin, por fazer as capturas das imagens de micro-CT e me orientar nas análises.

Ao professor Maurício Bogo e Luiza Kist, pelo tempo dedicado a realizar a análise de PCR.

À CAPES, pelo apoio financeiro através da bolsa de estudos.

À Faculdade de Odontologia da Pontifícia Católica Universidade do Rio Grande do Sul, representada pelo seu Diretor, Prof. Alexandre Bahlis, pela sua relevância no ensino.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontologia da PUCRS em nome da Profa. Dra. Ana Maria Spohr e Profa. Dra. Maria Martha Campos pela excelência do curso de doutorado.



“Fui encontrar meu sorriso, esbarrei nos mais indecisos.  
Alguns me traziam motivos, outros somente empecilhos.  
Preferi os ombros sinceros, desdenhei dos que me impediam.  
Os sonhos são de quem busca, não dos que buscariam”.

*Egui Baldasso*

## RESUMO

A presente tese está dividida em duas partes: na parte I, comparou-se a regeneração óssea em camundongos fêmeas e machos, com diabetes do tipo 1 (T1D). Na parte II, foi avaliada a regeneração óssea no modelo de menopausa experimental induzido por ovariectomia (OVX), com ou sem T1D. Na parte I, os animais (machos e fêmeas) foram divididos em dois grandes grupos: controle e T1D (induzido por estreptozotocina; STZ). Na parte II, os animais foram divididos em quatro grandes grupos: fêmeas falso-operadas e OVX, com ou sem T1D. Após a indução do T1D, foi criado um defeito ósseo monocortical no fêmur. Nas duas partes do trabalho, foram avaliados os efeitos da suplementação com vitamina D3 e/ou insulina. Na segunda parte, também se avaliou o efeito da reposição hormonal com estradiol. Decorridos 21 dias do procedimento da criação do defeito, os animais foram eutanasiados; o fêmur e o sangue foram coletados para análises posteriores. Tanto as fêmeas, quanto os machos T1D, apresentaram uma redução do ganho de peso corporal, associado à hiperglicemia. Não houve alterações nos níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), fator de necrose tumoral (TNF) ou interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ). Os animais T1D, de ambos os sexos, apresentaram um comprometimento na regeneração óssea, como demonstrado pelas análises histológicas e de micro-CT. A suplementação com vitamina D3 reestabeleceu a regeneração óssea em fêmeas e machos T1D, apresentando valores próximos aos encontrados nos animais do grupo controle. A terapia com insulina melhorou a remodelação óssea nas fêmeas e machos T1D; porém, os efeitos foram mais pronunciados nos machos. A avaliação da atividade osteoclástica não revelou diferenças significativas entre os grupos experimentais, após a indução de T1D, em machos ou fêmeas. Os resultados do PCR em tempo real para *runx2* e *osterix* (dois fatores de transcrição relacionados aos osteoblastos), no tecido ósseo, não demonstraram nenhuma diferença significativa, exceto por um aumento nos níveis de RNAm dos dois fatores nos camundongos machos T1D, que receberam suplementação com vitamina

D3. Por outro lado, fêmeas T1D que receberam vitamina D3 apresentaram um aumento na expressão dos níveis de RNAm para o fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 (IGF-1), quando comparado com os machos que tiveram o mesmo tratamento, sugerindo assim, diferenças relacionadas ao sexo. Além das análises já mencionadas anteriormente, na parte II da tese, parâmetros comportamentais e níveis séricos de cálcio e fosfatase alcalina também foram analisados. Os resultados da segunda parte do trabalho demonstraram que os animais submetidos a OVX tiveram um aumento do peso corporal, com atrofia uterina. Em contrapartida, quando foi induzido T1D, houve uma diminuição do peso corporal mais acentuada no grupo OVX que no grupo falso-operado. Os animais falso-operados e OVX T1D apresentaram hiperglicemia, confirmando o desenvolvimento do diabetes. Os níveis séricos de fosfatase alcalina foram divergentes entre os grupos não-diabéticos OVX e OVX T1D. Não houve variações dos níveis de cálcio. Os animais falso-operados T1D, não diabéticos OVX e OVX T1D apresentaram prejuízos similares na regeneração óssea, como observado pelas análises histológicas e imagens de micro-CT. A reposição com estradiol melhorou a cicatrização óssea nos animais não-diabéticos OVX e OVX T1D. Houve uma tendência ao aumento nos níveis de RNAm de IGF-1 no grupo OVX, o que não foi observado quando da associação de T1D e menopausa. Não foram observadas diferenças na atividade locomotora dos animais com T1D e/ou OVX, a não ser por uma diminuição no número de *rearings* no grupo falso-operado T1D, independente do tratamento com vitamina D3, insulina e estradiol, de forma isolada ou em associação.

**Palavras chaves:** regeneração óssea, diabetes tipo 1, camundongos machos e fêmeas, insulina, vitamina D3, estrogênio, ovariectomia, menopausa

## ABSTRACT

This thesis encompasses two parts: firstly, we compared the bone healing in female and male mice, after induction of type 1 diabetes (T1D); secondly, the bone regeneration was evaluated in a menopause model induced by bilateral ovariectomy (OVX), with or without T1D induction. For the part I, the animals (female and male) were initially assigned into two groups, namely control or T1D (elicited by streptozotocin; STZ). In the part II, the females were divided into four experimental groups: sham-operated or OVX, with or without STZ T1D induction. After T1D induction, a monocortical femoral defect was created. In either parts of the present study, we evaluated the effects of supplementation with vitamin D3 and/or insulin. In the second part, the effects of estrogen replacement were also analyzed. Following 21 days of bone defect creation, the animals were euthanized; the femurs and blood were collected for posterior analysis. Both T1D females and males presented a reduction in body weight gain, associated with hyperglycemia. There were no changes in the serum levels of the pro-inflammatory cytokines [interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor (TNF) and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )] in all the evaluated groups. T1D mice of both sexes presented a delayed bone regeneration, according to the histological and micro-CT assessment. The supplementation with vitamin D3 restored the bone healing in female and male T1D mice, reaching values close to controls. The insulin therapy improved the bone remodeling in T1D mice of both sexes, but the effects of this hormone were superior in males. The evaluation of osteoclast activity did not reveal significant differences among the experimental groups. Real time PCR revealed slight differences in the mRNA expression of two transcription factors related to osteoblast differentiation, namely runx2 and osterix, as measured in the area into the bone defect. A higher upregulation of both factors was seen in T1D males treated with vitamin D3. Conversely, vitamin D3-treated T1D females displayed an upregulation of insulin-like growth factor 1 (IGF-1), further indication sex-related differences for the treatments. Besides the experimental protocols described for the

part I of this thesis, in the part II, we also evaluated some behavioral locomotor parameters and serum levels of calcium and alkaline phosphatase. OVX animals presented increased body weight gain, accompanied by uterus atrophy. Otherwise, T1D induction elicited a reduction of body weight gain, which was more pronounced in OVX-T1D animals. Serum levels of alkaline phosphatase were divergent in the non-diabetic and T1D OVX animals. Calcium or cytokine levels were similar in all the experimental groups. The sham-operated T1D, the non-diabetic OVX and the OVX-T1D groups presented a delayed bone regeneration, as indicated by histological and micro-CT analysis. Estrogen replacement improved the bone healing in all OVX groups. There was a trend toward an upregulation of IGF-1 mRNA in non-diabetic OVX animals, which was not mirrored in OVX-T1D mice. Locomotor parameters remained unaltered, except by a general reduction of rearing numbers in T1D animals.

**Keywords:** bone regeneration, type 1 diabetes, males, females, insulin, vitamin D3, ovariectomy, menopause.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

BMPs: Proteínas ósseas morfogenéticas

Colla: Colágeno do tipo 1

DM: Diabetes Mellitus

IGF-1: Fator de crescimento semelhante a insulina do tipo 1

IL: Interleucinas

OB: Osteoblasto

OC: Osteocalcina

OPG: Osteoprotegerina

RANKL: “Ligante do receptor ativador nuclear  $\kappa$ B”

RANK: “Receptor ativador nuclear  $\kappa$ B”

Runx2: Runt-related transcription factor 2

STZ: Estreptozotocina

T1D: Diabetes tipo 1

T2D: Diabetes tipo 2

TNF: Fator de necrose tumoral

VD: Vitamina D

OVX: Ovariectomia

OSTERIX: zinc finger-containing transcription factor

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	34
2.1 Objetivo geral .....	34
2.2 Objetivo específicos .....	34
<b>3 CAPÍTULO I</b> .....	36
Manuscrito 1 .....	37
<i>Title Page</i> .....	37
<i>Abstract</i> .....	38
<i>Introduction</i> .....	39
<i>Methods</i> .....	40
<i>Results</i> .....	45
<i>Discussion</i> .....	48
<i>References</i> .....	55
<b>4 CAPÍTULO II</b> .....	76
Manuscrito 2 .....	77
<i>Title Page</i> .....	77
<i>Introduction</i> .....	78
<i>Methods</i> .....	80
<i>Results</i> .....	85
<i>References</i> .....	89
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	107
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS</b> .....	111
ANEXO A- Carta de aprovação pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia/PUCRS .....	124
ANEXO B- Carta de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais/PUCRS. ....	125

## 1. INTRODUÇÃO

### *Considerações gerais*

O aumento da expectativa de vida, bem como, a maior procura por tratamentos odontológicos na área da implantodontia, faz com que um grande número de pessoas com algum comprometimento sistêmico seja atendido, por vezes, sem os cuidados e restrições adequados. A prevalência de doenças metabólico-inflamatórias na população (diabetes mellitus, obesidade, osteoporose, entre outras) vem aumentando ao longo dos anos. Para não restringir o tratamento cirúrgico-odontológico dessa população, é necessário que sejam realizados novos estudos, a fim de identificar as alterações ósseas dos pacientes, permitindo a identificação de alternativas viáveis para o manejo dos indivíduos acometidos por doenças metabólicas. Existem evidências da literatura que sugerem diferenças em relação à regulação metabólica, quando se compara homens e mulheres, o que ainda precisa de investigações adicionais, especialmente no que se refere aos processos de regeneração óssea. Ademais, deve-se levar em consideração que pacientes do sexo feminino que se encontram no período de pré-menopausa, menopausa e pós-menopausa podem também apresentar doenças metabólicas como o diabetes tipo 1 (T1D). A prescrição de suplementação vitamínica, de forma geral, vem chamando atenção dos profissionais de diversas áreas da saúde. Um exemplo é a administração sistêmica de vitamina D3, que tem sido amplamente empregada no período da menopausa, assim como, precocemente, em casos de baixos níveis ou insuficiência da vitamina. Uma vez que a suplementação com vitamina D3 influencia o metabolismo ósseo, faz-se necessário entender de que forma essa vitamina poderia modular os mecanismos de neoformação e reabsorção óssea em diferentes condições, como diabetes e menopausa. Outrossim, pacientes com T1D fazem uso de insulina para a manutenção dos níveis glicêmicos, contribuindo para prevenir as maiores complicações associadas ao T1D, como retinopatia, nefropatia e neuropatia. Entretanto, os benefícios potenciais da reposição de insulina sobre a regeneração



óssea no T1D, ainda não estão totalmente claros, indicando a necessidade de novos estudos nessa área.

### ***Tecido ósseo***

O osso é um tecido conjuntivo especializado, formado por 60% a 70% de material inorgânico (cristais de hidroxiapatita) e, 30% a 35% de material orgânico, dos quais 90% são representados por colágeno (principalmente colágeno do tipo I) (Bord et al., 1996; Viguet-Carrin et al., 2006). O componente ósseo mineral está associado com a rigidez, característica desse tecido, enquanto que o colágeno está ligado diretamente com os movimentos de flexão ou torção (Ruppel et al., 2008; Zeynep et al., 2016). Após o crescimento, 5 a 10% do tecido ósseo do adulto é renovado todo ano por remodelação óssea. O osso tem como principais funções a resistência e o suporte, além de proteger os órgãos vitais. O esqueleto, além das funções estruturais, está envolvido diretamente na homeostase de cálcio em todo organismo. Os ossos, de uma forma geral, são revestidos por uma parte externa, mais resistente, denominada cortical, enquanto que, internamente, observa-se a porção mais esponjosa e vascularizada do osso, também denominada de osso medular. Podemos citar dois tipos de formação óssea: ossificação endocondral e ossificação intramembranosa. Enquanto que na ossificação endocondral, a formação óssea é precedida pela cartilagem, que por sua vez é substituída por osso (maioria dos ossos), a intramembranosa, envolve a diferenciação direta das células mesenquimais em osteoblastos (crânio, osso maxilar e mandibular) (Ishikawa e Yamada, 2017).

As células mesenquimais provenientes da medula óssea e dos vasos sanguíneos no tecido conjuntivo diferenciam-se em células osteogênicas, pelo estímulo dos fatores de crescimento e das proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) (Fujisawa et al., 1995; Odgren et al., 2001). Tipos celulares distintos fazem parte do metabolismo e da fisiologia óssea: pré-

osteoblastos, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Outras células participam do metabolismo ósseo como, monócitos, linfócitos e células endoteliais, que são responsáveis pela secreção de citocinas e outros mediadores necessários para o remodelamento ósseo (Valenti et al., 2016).

Um dos fatores de transcrição mais relevantes para o desenvolvimento ósseo é o *runx2* (do inglês, *runt-related transcription factor 2*). A expressão desse gene está relacionada diretamente com a diferenciação das células mesenquimais em pré-osteoblastos, promovendo a formação de osteoblastos imaturos e inibindo a diferenciação das células mesenquimais em adipócitos e condrócitos (Komori, 2006; Kalaitzoglou et al., 2016). O *runx2* regula a expressão de várias proteínas como, colágeno do tipo I, osteopontina e osteocalcina, principalmente nos estágios iniciais da formação óssea. Durante a fase de diferenciação celular, um grupo de células progenitoras de osteoblastos, expressando *runx2*, inicia a fase de proliferação. Essas células com atividade de fosfatase alcalina são denominadas, pré-osteoblastos (Capulli et al., 2014). Os pré-osteoblastos são derivados de células mesenquimais indiferenciadas, presentes no periósteo e no endósteo. Quando estão em proliferação, sofrem alterações morfológicas tornando-se células maiores e cuboides, que representam os osteoblastos maduros (Capulli et al., 2014; Florencio-Silva et al., 2015).

Os osteoblastos estão associados com o processo de osteogênese. São responsáveis pela formação do tecido ósseo; sendo assim, sintetizam os componentes de matriz orgânica (colágeno) e controlam a mineralização dessa matriz e do osteoide. Estão localizados na superfície óssea, promovendo a deposição da matriz ativa e, podem, por fim, se diferenciar em dois tipos celulares: células ósseas de recobrimento e osteócitos (Turner, 1991; Robinson et al., 1997; Florencio-Silva et al., 2015).

O “*Zinc finger-containing transcription factor*”, conhecido como osterix, é o fator de transcrição relacionado ao tecido ósseo em desenvolvimento (em estágios mais precoces, atuando principalmente em pré-osteoblastos). Segundo Nakashima et al. (2002), é possível que

o *runx2* e outros fatores de transcrição funcionem em conjunto com o *osterix*, para ativar genes marcadores de osteoblastos *in vivo*, levando à produção de matriz óssea. Um estudo conduzido por Baek et al. (2009), com camundongos “knockout”, demonstrou que o *osterix* é necessário para regulação da diferenciação dos osteoblastos *in vivo*, assim como para a formação e manutenção óssea. Esse fator de transcrição é essencial para a diferenciação de osteoblastos durante o desenvolvimento embrionário, visto que camundongos nocaute para *osterix* apresentam uma ausência completa de ossificação intramembranosa e endocondral (Nakashima et al., 2002).

A osteocalcina, produzida pelos osteoblastos maduros, é a principal proteína não colágena envolvida com a matriz óssea inorgânica. A osteocalcina é um marcador de formação óssea, na diferenciação dos osteoblastos em estágio mais tardio (Lee et al., 2007; Ferron et al., 2008; Maggio et al., 2010; Kalaitzoglou et al., 2016). Pode ser utilizada como um indicador sérico sensível e específico para avaliação da atividade osteoblástica (Vieira, 1999; Kumar, 2005).

Outro fator envolvido diretamente com os osteoblastos e com o processo de formação óssea é o fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 (IGF-1). O IGF-1 é produzido, principalmente pelo fígado, sendo altamente expresso no tecido ósseo, onde exerce papel essencial no crescimento e maturação dos osteoblastos. Foi demonstrado que o IGF-1 modula células mesenquimais indiferenciadas que estimulam esse crescimento, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Kawai et al., 2012; Xian et al., 2012; Crane et al., 2013).

A fosfatase alcalina é uma enzima, codificada pelo gene *ALP*, localizado no cromossomo 1. A isoenzima óssea é um peptídeo de 507 aminoácidos, cuja sequência é exatamente igual à da isoenzima hepática; a diferença entre elas se dá na glicosilação. Em condições normais, as duas formas de fosfatase alcalina predominantes na circulação (> 90% do total) são a óssea e a hepática, em quantidades equivalentes (Vieira et al., 1999; Kumar et al., 2005).

A síntese da matriz óssea, mediada pelos osteoblastos, pode ser dividida em duas fases

distintas: deposição da matriz orgânica e, conseqüente mineralização (Florencio-Silva et al., 2015). Quando os osteoblastos estão em intensa atividade de síntese, suas formas modificam-se, lembrando um cubo, tornando-se achatados, com redução da basofilia citoplasmática. Uma vez aprisionados pela matriz óssea recém-sintetizada, os osteoblastos recebem o nome de osteócitos. Os osteócitos são células com forma estrelada, que estão inseridas na matriz óssea mineralizada, mas permanecem em contato com as outras células ósseas por um processo altamente controlado (Turner et al., 1991; Robinson et al., 1997; Florencio-Silva, 2015). Portanto, essas células derivadas dos osteoblastos são residentes em lacunas da matriz óssea. Apesar dos osteócitos não apresentarem a função de secretar a matriz óssea, eles permanecem produzindo as substâncias necessárias à manutenção do osso. Além disso, têm um papel na mecanoccepção, ajustando a forma esquelética, densidade e tamanho, respondendo assim às mudanças biomecânicas (Kalaitzoglou et al., 2016).

Os osteócitos produzem esclerostina, que por sua vez, impede a formação óssea e promove a apoptose osteoblástica. Essa proteína funciona como um regulador negativo de deposição de massa óssea (Robling et al., 2006). A produção elevada de paratormônio (PTH) e as altas concentrações de estrogênio diminuem os níveis de esclerostina (Ardawi et al., 2012; Amrein et al., 2012), enquanto que o avanço na idade e os glicocorticoides aumentam os níveis dessa proteína (Mabilleau et al., 2011). Os osteócitos atuam também como reguladores parácrinos de osteoblastos e osteoclastos, através de moléculas de sinalização como: prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), osteoprotegerina (OPG), ligante do receptor ativador nuclear  $\kappa$ B (RANKL), além da esclerostina (Parajuli et al., 2015).

Segundo Cappariello et al. (2014), os osteoclastos são as células com a morfologia mais incomum entre todas do tecido ósseo, com características morfológicas únicas, sendo células multinucleadas, com uma distribuição específica de organelas. Nos últimos anos, a compreensão acerca do papel desse tipo celular passou da função exclusiva de reabsorção óssea,

para uma função extremamente complexa, com participação na regulação de diferentes processos, como hematopoiese, formação óssea, angiogênese intraóssea e regulação da função da osteocalcina (Cappariello et al., 2014).

Os osteoclastos se originam de monócitos hematopoiéticos e macrófagos (Perkins, 1995; Long et al., 1995). Os fatores reguladores da função dos osteoclastos são: fator estimulador de colônia de monócitos (CFS-1), fator de diferenciação dos osteoclastos (ODF), interleucinas (IL), vitamina D3, fator de necrose tumoral (TNF) e, partículas ósseas mineralizadas contendo osteocalcina (Marks et al., 1983; Perkins, 1995).

O RANKL, produzido por células de linhagem osteoblástica e por linfócitos T ativados, é o fator essencial para a formação, fusão, ativação e sobrevivência dos osteoclastos, levando à reabsorção óssea, pela ligação ao receptor RANK (Kalaitzoglou et al., 2016). Os efeitos do RANKL são contrabalanceados através da OPG, que atua como um receptor solúvel neutralizador (Young et al., 1993; Loureiro et al., 2014). RANKL e OPG são regulados por vários hormônios (glicocorticoides, vitamina D3, estrogênio), citocinas (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-11 e IL-17) e, pelo fator de transcrição cbfa-1 (do inglês, *core-binding factor alpha 1*). Alterações do sistema RANKL/RANK/OPG implicam na patogênese da osteoporose pós-menopausa, artrite reumatoide, doença de Paget, doença periodontal, tumores ósseos benignos e malignos, metástases ósseas e hipercalcemia. Ademais, o sistema RANKL/RANK/OPG pode-se apresentar alterado em pacientes com T1D (Loureiro et al., 2014). De forma interessante, a administração da OPG é capaz de prevenir ou atenuar esses transtornos em modelos animais (Young et al., 1993; Loureiro et al., 2014).

A matriz orgânica é formada de colágeno, principalmente do tipo I, proteoglicanas e glicoproteínas adesivas. Por outro lado, a matriz inorgânica é composta por íons fosfato, cálcio e, em menor quantidade, bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato. A união do fosfato e do cálcio forma cristais de hidroxiapatita, que quando associados às fibras colágenas, fornecem

a resistência e a dureza características do tecido ósseo (Junqueira e Carneiro, 2004; Kikuta et al., 2010). O colágeno do tipo I, além de ser o maior componente da matriz óssea, está intimamente associado à cicatrização e à regeneração do osso. Como mencionado anteriormente, o osso é a reserva primária de cálcio; tem capacidade de renovação a fim de responder às necessidades metabólicas do organismo, sendo indispensável para a manutenção de níveis adequados de cálcio (Dolin et al., 1974; Roberts et al., 1987; Krishnan et al., 2006).

Vários fatores locais e sistêmicos controlam a formação, a proliferação, a diferenciação e a atividade das células ósseas (Florencio-Silva et al., 2015). Dentre os fatores sistêmicos, destacam-se o hormônio de crescimento, os hormônios tireoidianos, os glicocorticoides, o PTH, o estrogênio, a calcitonina e a vitamina D3. Entre os fatores locais, podem-se citar PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$ , interferon-gama (INF $\gamma$ ), fator de crescimento de transformação beta (TGF $\beta$ ), IGF-1, fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF) e fator de crescimento derivado do esqueleto (SGF) (Marks, 1983). Outros fatores como, medicamentos, dieta e envelhecimento influenciam a homeostase óssea. As anormalidades na remodelação óssea ocorrem em algumas das doenças mais comuns, tais como osteoporose, doença periodontal, artrite reumatoide, insuficiência renal crônica e osteólise induzida por tumores (Perkins, 1995; Bord et al., 1996). O aumento nos níveis de PTH, produzido pela paratireoide (hiperparatireoidismo), leva a um aumento do número de osteoclastos, com conseqüente estímulo à reabsorção óssea (Bord, 1996). Já, a calcitonina, produzida pela tireoide, inibe a atividade osteoclástica, com diminuição da reabsorção óssea (Odgren, 2001). A integridade estrutural do osso pode estar comprometida pela necessidade do metabolismo normal do cálcio e por estados patológicos, alterando assim, estrutura e massa ósseas. Compreender os mecanismos básicos que modulam o *turnover* ósseo torna-se essencial para estabelecer a relação do tecido com as alterações encontradas nas doenças a serem abordadas no presente estudo.

### ***Diabetes Mellitus***

O diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica resultante de defeitos na secreção de insulina e/ou em sua ação. De acordo com a Federação Internacional de Diabetes, no ano de 2017, mais de 400 milhões de adultos foram diagnosticados com diabetes, sendo que em 2045, esse número pode aumentar para mais de 620 milhões, um incremento de 50% em relação a 2017 (International Diabetes Federation, 2017). O DM não tem predileção por homens ou mulheres, afetando ambos os sexos de forma quase semelhante. É uma doença que merece atenção devido à gravidade e evolução; uma pessoa morre de diabetes a cada seis segundos no mundo. O Brasil ocupa o quarto lugar mundial em número de pessoas com diabetes. Com o aumento na prevalência do DM, houve um crescimento nos custos gerados por essa doença, sendo assim um problema de saúde pública extremamente relevante. Uma das únicas explicações para esse aumento de DM são as mudanças no meio ambiente ou, ainda, as mudanças no estilo de vida (Rewers e Ludvigsson, 2016).

Os sintomas como poliúria, polidipsia, perda de peso, polifagia e visão turva são resultantes das variações dos níveis glicêmicos, independentemente do tipo de diabetes. A hiperglicemia crônica está associada ao dano, disfunção e falência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group, 1998). Visto que a expectativa de vida teve um aumento ao longo dos anos, as comorbidades relacionadas ao diabetes acompanharam essa tendência (Kerckhofs, 2016).

O DM pode ser classificado como tipo 1 ou tipo 2. No T1D, ocorre destruição das células  $\beta$ -pancreáticas, através de uma infiltração de linfócitos T auto-reativos, decorrente de um processo autoimune (forma autoimune; tipo 1A) ou, menos comumente, por causas desconhecidas (forma idiopática; tipo 1B) (Atkinson et al., 1994; Imagawa et al., 2000; Smith et al., 2017). Na forma autoimune, há um processo de insulinite e estão presentes autoanticorpos circulantes (anticorpos anti-descarboxilase do ácido glutâmico, anti-ilhotas e anti-insulina).

Como não há insulina na circulação em concentrações ideais, a absorção de glicose fica prejudicada, sendo necessário fazer a reposição de insulina (Ward et al., 2001). O T1D acomete, usualmente, pessoas mais jovens (Polonsky, 2012). Vários estudos, incluindo relatos de casos e trabalhos epidemiológicos, demonstram que o desenvolvimento do DM pode ter uma relação potencial com infecções virais. Ademais, há associação com fatores da dieta específicos, sendo que o aleitamento materno é considerado um fator protetor para o início do DM. Embora a vitamina D3 seja um alvo potencial de pesquisas recentes, ainda existem poucas evidências que demonstram um papel protetor para o desenvolvimento de DM. Tem havido, ainda, especulações sobre o possível benefício de vacinas na prevenção do aparecimento de DM; entretanto, ainda não houve sucesso com esta estratégia (Rewers e Ludvigsson, 2016).

No diabetes do tipo 2 (T2D), a associação entre fatores hereditários e obesidade apresenta maior importância do que no T1D. Apesar dos pacientes produzirem insulina normalmente, suas células são incapazes de usar toda a insulina secretada pelo pâncreas, fazendo com que os níveis sanguíneos desse hormônio permaneçam elevados, o que é conhecido como resistência à insulina (Figueiredo et al., 2009; Polonsky, 2012). O principal motivo que faz os níveis de glicose permanecerem altos é a incapacidade das células musculares e adiposas em utilizar a insulina secretada pelo pâncreas. Os sintomas do T2D são pronunciados, sendo que o tratamento deve ser cauteloso, em virtude dos riscos de complicações cardiovasculares em longo prazo (Polonsky, 2012). Além disso, o T2D pode evoluir para insulino dependente se não controlado. O diagnóstico pode ser feito através de exames laboratoriais, como glicemia de jejum (valores maiores ou iguais a 126mg/dl sugerem DM), teste de tolerância a glicose (valores maiores ou iguais a 200mg/dl sugerem DM) ou, ainda, através da determinação da hemoglobina glicosilada (valores maiores que 6,5%). O tratamento para o T2D deve ser feito visando reestabelecer os níveis de glicose, através do controle da dieta, exercícios e/ou medicação (agentes hipoglicemiantes orais) (Polonsky, 2012).



O pâncreas é o órgão responsável pela produção de insulina, possuindo funções exócrinas e endócrinas (ElSayed e Bhimji, 2017). Esse hormônio é produzido, em grande parte, pelas ilhotas de Langerhans, sendo que o metabolismo ocorre no fígado, rins e musculatura esquelética. A insulina faz a regulação dos níveis de glicose no sangue (glicemia) (Peled et al., 2003). Para manter a glicemia constante, o pâncreas também produz outro hormônio antagônico à insulina, o glucagon. Quando os níveis glicêmicos ficam baixos, mais glucagon é secretado, para restabelecer os níveis de glicose na circulação (Herrero et al., 2017). A somatostatina, outro hormônio produzido pelo pâncreas, é um inibidor de células secretoras. Nas ilhotas de Langerhans, esse hormônio inibe a produção de insulina e glucagon. A amilina é co-secretada juntamente com a insulina e, tem como função, a indução da degradação de glicogênio a lactato na musculatura esquelética, além de retardar o esvaziamento gástrico e inibir a secreção de glucagon (ElSayed e Bhimji; 2017). Infelizmente, apesar dos avanços terapêuticos e das campanhas de prevenção do DM, ainda não há cura para essa doença e os números de pacientes portadores das principais formas de DM se mantêm alarmantes (Polonsky, 2012). No T1D, a terapia com insulina é essencial e deve ser administrada para manter a glicemia controlada. Quando realizado o diagnóstico de T1D, o indivíduo necessita realizar a reposição desse hormônio por tempo indeterminado, visto que as consequências das oscilações dos níveis glicêmicos podem ser muito graves, e até mesmo fatais.

Independentemente do tipo, os pacientes diabéticos têm um baixo potencial de cicatrização dos tecidos moles e ósseos, devido à redução do metabolismo de proteínas e dos prejuízos da função neutrofílica (Peled et al., 2003). A perda óssea não está necessariamente vinculada a um aumento da atividade osteoclástica. A hiperglicemia inibe a diferenciação osteoblástica e altera a produção de PTH, que regula o metabolismo do fósforo e do cálcio (Santana et al., 2003). Isso produz efeitos deletérios sobre a matriz óssea, afetando a aderência, o crescimento e o acúmulo da matriz extracelular (Weiss et al., 1981; Kerckhofs et al., 2016).

Mesmo com todos os relatos de que a hiperglicemia seria um indicador de fraturas ósseas, a associação de altos níveis de glicose ou resistência à insulina e, a relação com a densidade óssea mineral, ainda não está bem definida (Nebot et al., 2016). A terapia com insulina poderia melhorar a condição óssea por aumentar sua densidade e força, agindo diretamente ou indiretamente no processo de formação óssea (Bortolin et al., 2017). Atualmente, tem sido sugerido que a perda da qualidade óssea e o aumento na chance de fraturas durante o T1D podem estar associados com prejuízos na função dos osteoblastos (deficiência na formação óssea) ou dos osteoclastos (excesso de reabsorção óssea) (Jiao 2015; Xu, 2016; Reni, 2016). Os mecanismos de modulação óssea relacionados à terapia com insulina ainda não foram esclarecidos. Bortolin et al. (2017) sugeriram que o tratamento com insulina tem um efeito protetor e osteoanabólico, o que pode ter relação com o aumento da expressão de OPG e osteocalcina nos osteoblastos, levando à manutenção da estrutura mineral e integridade do colágeno, tendo como consequência a manutenção da arquitetura e da flexibilidade óssea. Sabe-se que a redução na densidade mineral óssea desde o diagnóstico de T1D, na infância, pode evoluir para osteoporose na fase adulta ou, até mesmo, aumentar o risco de fraturas nesses pacientes, afetando tanto a parte óssea cortical, quanto a medular. Os autores desse trabalho também afirmam que a influência do sexo na perda óssea associada ao T1D ainda é desconhecida (Raisingani et al., 2017).

Na área da Odontologia, Oates et al. (2013) realizaram uma revisão de literatura sobre DM e implantes dentários e concluíram que não há relação entre o número de falhas de implantes dentários e o controle glicêmico deficitário, indicado a reabilitação com implantes para pacientes diabéticos, com ou sem controle da glicemia. Em contrapartida, outro trabalho de revisão sistemática, conduzido por Annibali et al. (2016) demonstrou que pacientes com DM têm uma tendência crescente na falha de implantes, durante o período de osseointegração, assim como no primeiro ano após a instalação desses implantes. Além disso, um estudo experimental

demonstrou prejuízos na regeneração óssea peri-implantar em um modelo de T1D em porcos (von Wilmsky et al., 2016). Esses dados controversos reforçam a necessidade de estudos adicionais sobre os efeitos do DM sobre a regeneração óssea aplicada à implantodontia. Oates et al. (2014) realizaram um estudo prospectivo de coorte para avaliar se a ausência do controle glicêmico para o T2D contraindicaria a instalação de implantes. Os autores demonstraram que os níveis elevados de HbA1 não foram associados ao sucesso dos implantes ao longo de um ano; entretanto, os prejuízos na cicatrização e na estabilidade óssea precoce foram associados à hiperglicemia. Um trabalho conduzido por Hashiguchi et al (2014), em ratos com T2D, sugeriram que o controle da glicemia não foi suficiente para reestabelecer os efeitos negativos do DM no tecido ósseo em torno dos implantes.

Para induzir DM experimental podem ser utilizados animais geneticamente modificados denominados NOD (*nonobese diabetic mouse*), que desenvolvem T1D espontaneamente (Grant et al., 2012). Ainda, é possível induzir T1D através da inoculação de substâncias químicas específicas. A aloxana e a estreptozotocina (STZ) são capazes de produzir radicais livres que destroem as células  $\beta$ -pancreáticas, induzindo T1D (Murata et al., 1999). O antibiótico STZ causa degranulação das células produtoras de insulina, promovendo o aparecimento do diabetes. O núcleo glicérico, presente na estrutura das células  $\beta$ -pancreáticas, permite a entrada da STZ e do grupo nitrosureia, promovendo o acúmulo de substâncias tóxicas, resultando em morte celular (Wong e Tzeng, 1993; Murata et al., 1999; Lenzen, 2008).

A indução de diabetes por STZ pode ser constatada em 24 h após a administração intraperitoneal deste agente. As alterações fisiológicas apresentadas incluem hiperglicemia, glicosúria, polidipsia, polifagia e poliúria. A hiperglicemia plasmática aumenta a absorção de glicose pelos néfrons, levando à maior excreção de glicose na urina (glicosúria), com aumento da pressão osmótica e maior retenção de água (poliúria). Conseqüentemente, a ingestão de água é aumentada (polidipsia). O aumento do consumo de ração (polifagia) pode ser associado ao

comprometimento do transporte de glicose para as células, em decorrência da falta de insulina, sendo que o animal aumenta a ingestão de ração para suprir a falta de energia celular; mesmo assim, ocorre perda progressiva de peso corporal (Wong e Tzengs, 1993).

No início da doença, a redução da formação óssea em diabéticos está mais relacionada com um menor número de osteoblastos, os quais apresentam função normal. Em animais diabéticos, uma relação normal e diretamente proporcional é observada entre os eventos de formação da matriz óssea e de mineralização óssea. Porém, com a progressão da doença, há menor produção de matriz óssea, decorrente da redução do número de osteoblastos presentes no osso, gerando distúrbios na atividade dos osteoblastos, resultando em alterações das taxas da síntese da matriz do colágeno e/ou mineralização óssea (Goodman e Hori, 1984). Um estudo prévio do nosso grupo de pesquisa (Cignachi et al., 2015) demonstrou que o prejuízo da regeneração, associado ao T1D em camundongos, estava relacionado com o comprometimento da formação óssea (apoptose de osteoblastos), não havendo diferença significativa no processo de reabsorção mediado pelos osteoclastos.

Mesmo com a manutenção de níveis glicêmicos aceitáveis, através da reposição com insulina, muitas vezes, não é possível impedir os efeitos negativos sistêmicos do DM, como o desequilíbrio do metabolismo ósseo. Picke et al. (2016) demonstraram que o tratamento com insulina, em ratos espontaneamente diabéticos, não foi capaz de reestabelecer os efeitos do diabetes sobre a homeostase óssea sistêmica e a resistência óssea, mas restaurou a regeneração óssea no local do defeito.

A vitamina D é formada na pele pela ação da luz ultravioleta (vitamina D<sub>3</sub>) ou, pode ser obtida de fontes nutricionais, como ovos, óleo de peixe e leite fortificado (vitamina D<sub>2</sub>). A obtenção de vitamina é diretamente afetada pela estação do ano, latitude e exposição à luz solar (Colotta et al., 2017). O papel clássico da vitamina D no sistema endócrino é estimular a absorção de cálcio no intestino, fazer a sua manutenção e, indiretamente, regular a

mineralização óssea (Llips, 2006). A vitamina D (tanto D<sub>2</sub>, quanto D<sub>3</sub>) é transportada para o fígado, onde é hidroxilada por uma enzima (CYP2R1, também conhecida como P450 2R1) para produzir 25(OH)D. A 25(OH)D é transportada para os rins, sendo hidroxilada por outra enzima, a CYP27B1, formando a 1,25(OH)<sub>2</sub>D (Colotta et al., 2017). A 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (calcitriol), forma biologicamente ativa da vitamina D, é reconhecida como um regulador do processo de neoformação e reabsorção óssea, mediado pelos osteoblastos e osteoclastos, respectivamente. Interessantemente, não há um consenso na literatura quanto à dose ideal de suplementação com vitamina D<sub>3</sub>, lembrando que a ingestão excessiva pode causar hipercalcemia, cálculos renais e insuficiência renal. Atualmente, há um grande número de publicações demonstrando que a deficiência de vitamina D<sub>3</sub> está associada a doenças auto-imunes e inflamatórias, infecções e câncer, entre outras (Colotta et al., 2017).

Uma concentração adequada de vitamina D<sub>3</sub> é um fator importante para manutenção óssea, visando evitar a osteoporose. A 1,25 (OH)<sub>2</sub>D mantém a homeostase do cálcio entre as células sanguíneas e o osso, estimulando a absorção de cálcio no intestino (Mangin et al., 2014). O efeito da vitamina D<sub>3</sub> sobre a absorção de cálcio parece ser o principal mecanismo relacionado com a manutenção da homeostase óssea, através da sinalização, via PTH e 1,25(OH)<sub>2</sub>D (Park e Weaver, 2012). O sistema RANKL/RANK/OPG pode ser modulado pela administração da vitamina D<sub>3</sub>.

Estudos clínicos indicam que indivíduos diabéticos têm baixas concentrações de 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> na circulação, em comparação com pessoas saudáveis (Misof et al., 2003; Rapuri et al., 2007; Vaidya e Williams, 2012). A vitamina D<sub>3</sub> também apresenta efeitos anti-inflamatórios, reduzindo a produção de citocinas, sendo alvo de pesquisas no DM, pelo papel na regulação do sistema imunológico (Rewers e Ludvigsson, 2016). Outro fato importante é que a vitamina D<sub>3</sub> participa na regulação da secreção de insulina, atenuando a inflamação crônica gerada no DM (Mitri e Pittas, 2014).

A deficiência de vitamina D3 materna tem sido associada a vários desfechos materno-fetais adversos, incluindo pré-eclâmpsia, DM gestacional, aumento da taxa de cesariana primária, parto prematuro, retardo do crescimento fetal e neonatal e hipocalcemia (Barrett e McElduff, 2010). A periodicidade no nascimento de crianças com T1D pode ser explicada pela variação sazonal da produção de vitamina D3, a partir da exposição ao sol. Na Bélgica, as médias mensais nas horas diárias de sol foram inversamente relacionadas ao número de novos pacientes com T1D por mês, demonstrando uma interessante relação entre vitamina D3 e T1D (Weets et al., 2004). Entretanto, uma metanálise sobre a suplementação de vitamina D3 durante a gravidez não mostrou efeitos sobre a incidência de T1D (Dong et al., 2013). Dois outros estudos de metanálise mostraram que o risco de T1D foi menor em lactentes que foram suplementados com vitamina D3 (colicalciferol), em comparação com aqueles que não receberam suplementação (Zipitis e Akobeng, 2008; Miettinen et al., 2012). Dois ensaios clínicos relataram não haver efeitos da suplementação com vitamina D3 sobre a produção de insulina, após o aparecimento de T1D (Bizzarri et al., 2010; Walter et al., 2010). Um trabalho conduzido por Mohammadian et al. (2015) avaliou as mudanças nos níveis glicêmicos, após a suplementação com vitamina D3 em crianças com T1D e deficiência de vitamina D3. Os autores concluíram que a suplementação vitamínica reduz a HbA1C em pacientes com deficiência dessa vitamina e com T1D. Ademais, os autores propõem que os níveis de vitamina D3 sejam precocemente avaliados em crianças com diagnóstico de T1D.

Não há consenso na literatura a respeito da suplementação com vitamina D3 e seus efeitos no DM. Os trabalhos mencionados acima dizem respeito à relação da vitamina D3 com o T1D de forma generalizada, na prevenção do aparecimento e no desfecho da progressão. Por outro lado, questiona-se qual seria o papel da vitamina D3 sobre o tecido ósseo, no DM. Um trabalho de Wu et al. (2013) demonstrou que o tratamento combinado de insulina com vitamina

D3 teve efeitos adicionais, em relação à recuperação dos prejuízos de osseointegração associados ao T1D em ratos.

### *Menopausa e Osteoporose*

As mulheres tipicamente alcançam o período da menopausa entre a quarta e quinta décadas de vida, onde se observa uma diminuição marcante dos níveis de estrogênio, o que leva a diversas alterações imunológicas, bem como, comportamentais, com alterações de sono e humor (Studd e Zamblera, 1994). A fase de transição da menopausa é precedida por aproximadamente 35 anos de ciclos menstruais regulares (Santoro e Randolph, 2011). Dentre as implicações clínicas inerentes à menopausa, destaca-se o desenvolvimento de osteoporose, que causa grandes prejuízos à qualidade de vida. Anormalidades do sistema RANKL/RANK/OPG implicam na patogênese da osteoporose pós-menopausa (Perkins e Kling, 1995; ESHRE Capri Workshop Group, 2010). A osteoporose é caracterizada pela fragilidade óssea, diminuição da massa óssea, mudanças na arquitetura e estrutura, podendo ter como resultado final, fraturas ósseas (Sambrook e Cooper, 2006). Pode ser classificada de duas formas: (I) primária ou (II) secundária. A primária está relacionada à diminuição dos níveis de estrogênio em mulheres na menopausa. Por outro lado, a forma secundária é resultante de doenças metabólicas (como T1D), disfunção de órgãos, deficiências nutricionais, uso de glicocorticoides, idade, entre outros fatores (Raetz et al., 2017).

A osteoporose apresenta grande impacto social na vida dos indivíduos, pelo fato de limitar a mobilidade, levando assim, a um sentimento de isolamento ou depressão. Segundo a Fundação Nacional de Osteoporose (<https://www.nof.org/patients/what-is-osteoporosis/>), 20% dos idosos que fraturam o quadril, morrem dentro de um ano, devido a complicações relacionadas com a cicatrização ou com a cirurgia. Sugere-se que uma em cada duas mulheres

e, um em cada quatro homens, com idade igual ou superior a 50 anos poderão apresentar fraturas ósseas.

O estrogênio é um hormônio que ajuda na manutenção da integridade óssea, através da modulação da função de osteoblastos e osteoclastos. Na ausência desse hormônio, o processo de reabsorção óssea se torna mais acelerado do que a formação (ESHRE Capri Workshop Group, 2010). Como o osso perde massa, as comunicações entre o trabeculado ósseo também são perdidas (Emerton et al., 2010). Além desse desequilíbrio, com o avanço da idade, as mulheres apresentam uma tendência de acúmulo de adipócitos na medula óssea, devido ao aumento na capacidade de diferenciação dessas células, maior do que a diferenciação em osteoblastos. O estrogênio atua na modulação de alguns fatores de transcrição, como M-CSF, RANKL e OPG, envolvidos com a diferenciação de osteoclastos, além de regular a atividade e a meia-vida dessas células. Os receptores de estrogênio ( $ER\alpha$  e  $ER\beta$ ) são expressos de forma pleiotrópica, principalmente nos ossos e cartilagem. O  $ER\alpha$  está mais presente na cortical, sendo envolvido na diferenciação óssea; por outro lado, o papel do  $ER\beta$  ainda precisa ser melhor esclarecido (Venken et al., 2008). Ademais, a deficiência na produção de estrogênio, durante a menopausa, aumenta a produção de citocinas e mediadores inflamatórios, resultando em menor remodelação óssea. Uma revisão sistemática da literatura demonstrou que mulheres na menopausa, com osteoporose ou osteopenia, apresentam maior perda óssea periodontal, em relação àquelas com densidade óssea mineral normal (Penoni et al., 2017).

A produção do hormônio folículo estimulante (FSH) nas mulheres no período de pré-menopausa apresenta um *feedback* negativo, não somente pelo estradiol, mas também pelos peptídeos inibina A (InhA) e inibina B (InhB), membros da superfamília do TGF $\beta$  (Bilezikjian, 2004). Um trabalho conduzido por Nicks et al. (2010) sugere que as mudanças no *turnover* ósseo têm relação com o aumento dos níveis do hormônio folículo estimulante. As inibinas ligam-se às células durante a osteoblastogênese e a osteoclastogênese, bloqueando as BMPs,



que estimulam a diferenciação dos osteoblastos e osteoclastos. A exposição à inibina A, de forma contínua, *in vivo*, demonstrou um efeito protetor sobre a perda óssea induzida pela ovariectomia, em camundongos, indicando que as inibinas contribuem para a regulação endócrina do metabolismo ósseo.

A terapia de reposição hormonal, foi, por muitos anos, a primeira linha na prevenção da osteoporose pós-menopausa (Papadakis et al., 2016). O estudo randomizado conduzido pelo grupo *Women's Health Initiative* foi o primeiro a demonstrar que a terapia de reposição hormonal reduz a incidência de fraturas relacionadas à osteoporose, em mulheres na menopausa. Entretanto, apesar dos benefícios claros ao nível ósseo, há um aumento na incidência de câncer de mama, doenças cardíacas coronárias e acidente vascular cerebral, diminuindo a indicação da reposição hormonal (Rossouw et al., 2002). Papadakis et al. (2016) demonstraram que a reposição hormonal, com estrogênio e/ou progestina, foi associada com uma melhora na arquitetura óssea, segundo a avaliação das variações dos níveis de cinza (TBS, do inglês, trabecular bone score) em imagens de DXA (do inglês, *X-ray absorptiometry*). De forma interessante, parece que os efeitos favoráveis sobre o tecido ósseo persistem após a interrupção da reposição, por pelo menos dois anos.

Os tratamentos para a osteoporose estão direcionados à diminuição da reabsorção óssea e, podem ser denominados de agentes farmacológicos antirreabsortivos. O estrogênio, como citado anteriormente, além de bisfosfonatos, moduladores seletivos do receptor de estrogênio (SERM), denosumabe (anticorpo monoclonal para RANK-L) e, ranelato de estrôncio (SR), são alguns exemplos de terapias empregadas na atualidade para o manejo da osteoporose (Sözen et al., 2017). Em adição, para prevenir a osteoporose, a Fundação Nacional de Osteoporose recomenda a suplementação com vitamina D e/ou cálcio para indivíduos que apresentam alto risco de desenvolvimento dessa doença, incluindo mulheres no período da menopausa, com mais de 50 anos de idade (Cosman et al., 2014). Um estudo de Park e Weaver (2012)

demonstrou que a combinação de vitamina D com os fitoestrógenos de soja durante a menopausa, apresenta efeitos sinérgicos sobre a ativação dos osteoblastos, prevenindo a diferenciação de osteoclastos, por mecanismos que envolvem o aumento de metabólitos da vitamina D, bem como, a modulação de VDR e ER.

A ovariectomia é um modelo animal utilizado para o estudo da menopausa e do desenvolvimento de osteoporose em roedores, através da retirada cirúrgica bilateral dos folículos ovarianos (Bekku e Yoshimura, 2005). Nos camundongos, a perda óssea ocorre logo após o procedimento cirúrgico de ovariectomia, e, a reposição de estrogênio, pela administração de  $17\beta$ -estradiol, pode evitar a perda óssea (Komori, 2015). Como abordado anteriormente, pacientes do sexo feminino que se encontram no período de pré-menopausa, menopausa e pós-menopausa podem também apresentar doenças metabólicas como T1D. Alguns trabalhos sugerem que a combinação da deficiência de estrogênio com hiperglicemia pode levar a uma perda óssea adicional (Fukuharu et al., 2000; Khalil et al., 2011; Raehtz et al., 2017). Por outro lado, um estudo realizado em mulheres iranianas, com T2D e menopausa, não demonstrou diferença nos valores de massa óssea ou no *turnover* ósseo (Razi et al., 2016). De forma interessante, foi demonstrado que a suplementação com vitamina D3 pode trazer benefícios no tratamento da osteoporose e de fraturas ósseas, em camundongos diabéticos. Estes autores mostraram que a deficiência de vitamina D3 diminui a densidade mineral óssea no modelo de T1D induzido por STZ em camundongos fêmeas (Mao et al., 2014).

Klein et al. (2015) sugerem que a diferença entre os sexos é uma variável fundamental no processo de entendimento dos resultados na pesquisa. Sendo assim, cada vez mais importante estudar o desfecho de diferentes mecanismos, em estudos pré-clínicos, entre machos e fêmeas. Grande parte dos trabalhos presentes na literatura relatam o desfecho do DM e/ou da osteoporose no tecido ósseo, analisando o *turnover* ósseo. Entretanto, ainda há poucos estudos que avaliam a regeneração óssea na menopausa experimental, sendo assim necessário a

realização de novas pesquisas que relacionem ainda as diferenças no desfecho do T1D entre machos e fêmeas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 *Objetivo geral*

O presente estudo teve por objetivo avaliar o processo de regeneração óssea em camundongos, machos e fêmeas, no modelo de T1D, bem como, no modelo de menopausa experimental induzida por ovariectomia em fêmeas, além de analisar as repercussões da combinação de ambos os modelos de doença. Ademais, este estudo avaliou o metabolismo ósseo frente a diferentes tratamentos, incluindo administração de insulina, a suplementação de vitamina D3 e a reposição de estrogênio.

### 2.2 *Objetivos específicos*

- a. Comparar a regeneração óssea de camundongos machos e fêmeas com T1D, em um modelo de defeito ósseo monocortical;
- b. Avaliar se a regeneração óssea é modificada quando os animais T1D, tanto fêmeas quanto machos, são tratados com vitamina D3 e/ou insulina;
- c. Determinar se a suplementação com vitamina D3 e insulina melhora a regeneração óssea na ausência de T1D;
- d. Avaliar a regeneração óssea no modelo de menopausa experimental induzido pela ovariectomia, bem como, analisar os efeitos da reposição com estrogênio, da suplementação com vitamina D3 ou, da combinação de ambos nesse parâmetro.
- e. Elucidar os impactos do T1D na menopausa, frente às alterações no metabolismo ósseo e, se o quadro pode ser revertido pelo tratamento com insulina, vitamina D3 e/ou estrogênio.
- f. Avaliar a expressão sérica das citocinas pró-inflamatórias: IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e TNF, além de marcadores relacionados com o *turnover* ósseo nos diferentes grupos.

- g. Avaliar a expressão de alguns fatores de transcrição e crescimento como *runx2*, *osterix* e IGF-1, relacionados com o *turnover* ósseo nos diferentes grupos.
- h. Avaliar as diferenças no processo de neoformação óssea em camundongos machos e fêmeas na presença ou ausência de doença utilizando microtomografia computadorizada (micro-CT).
- i. Analisar parâmetros comportamentais no modelo de menopausa e/ou T1D.

### 3. CAPÍTULO I

O artigo a seguir intitula-se “Bone regeneration in type 1 diabetes: influence of sex, vitamin D3 and insulin” e será submetido ao *Journal of Dental Research* (Fator de impacto: 4.7; Qualis A1 Internacional, Área de Odontologia, CAPES).

**Bone regeneration in type 1 diabetes: influence of sex, vitamin D3 and insulin**

Natália P. Cignachi<sup>1,2</sup>, Alice Ribeiro<sup>3</sup>, Gustavo D. Barroso<sup>4</sup>, Amanda P. Cignachi<sup>2</sup>, Luiza W. Kist<sup>4,5</sup>, Maurício R. Bogo<sup>5</sup>, Rodrigo B. M. Silva<sup>2,4</sup>, Maria M. Campos<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Escola de Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil.

<sup>2</sup>Centro de Pesquisa em Toxicologia e Farmacologia, Escola de Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil.

<sup>3</sup>Curso de Graduação em Odontologia, Escola de Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil.

<sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Escola de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, 90619-900, Brazil.

<sup>5</sup>Laboratório de Genômica e Biologia Molecular, Escola de Ciências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, 90619-900, Brazil.

Corresponding Author: Maria Martha Campos. E-mail address: camposmmartha@yahoo.com

Telephone number: +555133203562

## Abstract

Type 1 diabetes (T1D) leads to several complications, including bone diabetic disease. Insulin therapy is required to prevent hyperglycemia, minimizing T1D-related osteopenia. Additionally, it has been suggested that vitamin D3 restores the bone turnover in T1D. There are no obvious sex differences in T1D prevalence, but the impacts of T1D on osseous regeneration might be sex-dependent. This study set forth a question: are there any differences in bone responses to insulin and/or vitamin D3 treatment in female and male T1D mice? To address this hypothesis, we produced a non-critical sized femur defect in streptozotocin (STZ)-T1D mice. Control non-diabetic and T1D female and male mice were subdivided into four treatment groups: (i) saline; (ii) vitamin D3; (iii) insulin; and (iv) vitamin D3 plus insulin. The body weight was recorded thoroughly. After 21 days of treatment, the femurs and blood were collected for further analysis. There were no marked sex differences in T1D development, except by slightly higher glucose levels in males, whereas the females were leaner. Female and male T1D mice showed impaired bone healing, as indicated by histological and micro-computed tomography (micro-CT) analysis. Vitamin D3 or insulin improved the bone regeneration in T1D mice of both sexes, although males generally displayed greater bone healing rates. Vitamin D3 combined with insulin did not exhibit any additional effects. RT-qPCR analysis revealed an upregulation of the osteoblast-related genes *osterix* and *runx2* in bone samples of vitamin D3-treated male T1D mice. Conversely, female T1D mice treated with vitamin D3, isolated or plus insulin, presented an increased expression of insulin growth factor-1 (*IGF-1*). The serum levels of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) or tumor necrosis factor (TNF) did not variate among the groups. T1D similarly delayed the osseous healing in females and males, despite slight sex differences in bone responses to vitamin D3 or insulin therapy.

**Keywords:** diabetes, bone healing, vitamin D, insulin, sex, mice.



## Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disease affecting a great number of individuals of both sexes globally. According to the International Diabetes Federation (IDF), 400 million people were estimated to have DM in 2017, while 620 million cases are predicted for 2045 (IDF Diabetes Atlas, 2017). DM is classified as type 1 (insulin-dependent) or type 2 (obesity-related). Type 1 diabetes (T1D) is characterized by an autoimmune destruction of the pancreatic  $\beta$ -cells, resulting in hyperglycemia. The patients with T1D can develop many complications, such as retinopathy, neuropathy, nephropathy and cardiovascular diseases (Polonsky et al., 2012). Noteworthy, there is an increased risk of bone fractures, in association with low bone turnover (Sundararaghavan et al., 2017). The changes in bone metabolism related to DM might include alterations in the activity and viability of osteoblasts, osteoclasts or even osteocytes, although this remains a matter of great debate (Kalaitzoglou et al., 2016).

The major goal of T1D treatment is to control the glycemic levels by insulin replacement therapy. An adequate insulin treatment postpones the main T1D-related complications, also contributing to the stabilization of bone metabolism, likely via bone formation (Seref-Ferlengez et al., 2016; Bortolin et al., 2017). The mechanisms underlying bone-related problems in T1D are not currently clear, and the management of this condition remains a clinical challenge. Nevertheless, T1D represents a great concern in Dentistry, especially when considering the impaired bone metabolism and its impacts in oral surgery, periodontology and implantology. Some few investigations have evaluated alternative therapeutic strategies for improving osseointegration in DM. Of note, an experimental study by Wu et al. (2013) showed that the combined treatment of insulin plus vitamin D<sub>3</sub> had additional effects in improving osseointegration in T1D rats. The classic role of vitamin D in the endocrine system is to stimulate the absorption of calcium in the intestine, secondarily regulating the bone

mineralization (Llips, 2006). Furthermore, vitamin D can also affect the bone turnover, via a direct modulation of inflammatory pathways (Gorter et al., 2014).

The present study evaluated the bone regeneration in a femoral defect model, comparing the outcomes in male and female T1D mice. Attempts have also been made to assess whether the insulin replacement, alone or combined with vitamin D3 supplementation, might influence the bone healing in this context.

## **Materials and Methods**

### *Experimental animals and ethical statement*

Male and female C57/BL/6J mice (two months old, 18-25 g, Total N= 186) were obtained from the Center of Experimental Biological Models (CeMBE/PUCRS). The animals were housed under standard conditions of temperature ( $22 \pm 2$  °C), in a 12:12 h light-dark cycle (lights on 07:00 AM), and humidity (50 - 70 %), in ventilated cages, with autoclaved wood chip bedding. Standard rodent chow and tap water were provided *ad libitum*. The experimental procedures were carried out in accordance with the Guidelines for the Use and Care with Laboratorial Animals from the National Institutes of Health. The *in vivo* experiments are reported following the ARRIVE Guidelines (Kilkenny et al., 2012). The local animal ethics committee (15/00433) approved the experimental protocols.

### *Induction of type 1 diabetes*

The animals (male and female) were randomly divided into two major: type 1 diabetes (T1D) and non-diabetic (control). T1D was induced by 5-daily injections of streptozotocin (50 mg/kg; Sigma–Aldrich, St. Louis, MO), given intraperitoneally (i.p.), dissolved in citrate buffer (50 mM; pH 4.5) (Motyl et al., 2009). Control animals received citrate buffer vehicle alone (i.p.), at the same schedule of administration. The body weight gain (in g) was registered

throughout the entire experiment. The glucose levels were measured at the end of experiments, and expressed in mg/dl (OneTouch; Johnson & Johnson Medical Brazil; São Paulo, Brazil).

### *Femur defect*

Seven days after the last STZ injection, which corresponds to the 12<sup>th</sup> day of the experimental protocol, a monocortical bone defect was created in the left femur, by a single operator, as described before (Cignachi et al., 2015). The surgical procedures were performed under aseptic conditions. The animals were anesthetized with an i.p. injection of xylazine (10mg/kg) and ketamine (100mg/kg). An access to the left mouse femur was made through a skin incision (6–8 mm in length), followed by a muscle retraction and detachment of the periosteum. The osteotomy was carried out under irrigation, by using a surgical contra-angle hand-piece (800 rpm) to create a mono-cortical bone defect (4-mm in length and 2-mm in diameter). Following the bone defect creation, the soft tissues were sutured in separated layers, and the animals received antibiotic and analgesic post-operative medication.

### *Treatments*

Control or T1D male and female mice were randomly distributed into four subgroups, according to the treatment: (i) vehicle; (ii) vitamin D3; (iii) insulin; (iv) vitamin D3 plus insulin. Vitamin D3 (4 µg/kg; orally; Aché Laboratories, São Paulo, Brazil) (Wang et al., 2016) and/or insulin (3 UI/kg; by subcutaneous route; Humulin R, Eli Lilly and Co., Indianapolis) (Baba et al., 2017) were dosed daily, for 21 days.

### *Sample collection*

On day 22 post-surgery (33 days after the onset of T1D induction), the animals were euthanized by sevoflurane inhalation, after overnight fasting. The blood was collected for

analysis of glycemia and cytokines. The femurs were cleaned of connective tissues, and fixed in 4%-buffered formaldehyde solution, for subsequent histological procedures or micro-CT analysis. Separately, samples corresponding to the defect area were stored in TRIzol® Reagent (Life Technologies) for quantitative PCR analysis.

#### *Serum cytokine levels*

The blood was collected and the samples were centrifuged at 2000 X g, at 4 °C, for 10 min. The serum was frozen and stored at -80 °C for analysis of the pro-inflammatory cytokines interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and tumor necrosis factor (TNF) by specific enzyme-linked immunosorbent assay dual-set (ELISA) kits, according to the recommendations of the supplier (R&D Systems).

#### *Micro-computed tomography (micro-CT) analysis*

The bone regeneration was further evaluated by micro-CT scanning using Skyscan 1172 (Bruker Micro-CT, Belgium) before decalcification, at 89 Kv and 112  $\mu$ A, with 6- $\mu$ m thickness, in a resolution of 1336 x 2000 pixels. For each femur, a specific volume-of-interest (VOI) was selected to include the center of the bone defect. The Software CTAn V1.16 (Bruker) was used for 3D-morphometric analysis. The following parameters were evaluated: bone volume fraction (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th), and trabecular separation (Tb.Sp).

#### *General histological procedures*

After fixation, the samples were decalcified in a 17% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution, for 10 days (with daily changes of fresh solution), and embedded in paraffin. Consecutive four  $\mu$ m-thick longitudinal sections were obtained from each femur for different sets of analysis. The slides were stained with hematoxylin–eosin (H&E), Masson's trichrome

(Accustain Mallory's stain kit, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO), tartrate-resistant acid phosphate (Leukocyte TRAP kit, Sigma–Aldrich, USA) or alkaline phosphatase (Alkaline Phosphatase kit, Sigma–Aldrich, USA). The histological images were taken with a microscope (Axio Imager A1, Jena, Germany) coupled to an image capture system (Axio Vision Rel. 4.4 Software Multimedia, Jena, Germany), from Carl Zeiss (Hallbergmoos, Germany). The NIH Image J 1.36b software program was used to semi-quantitatively determine the percentage areas of bone formation in relation to the total area in H&E-stained slides. The same software was used for analyzing the blue-colored collagen fibers in Mallory-stained slides (200-x magnification, for both staining techniques). The number of TRAP-positive cells presenting osteoclast morphology was analyzed under 400-x magnification. Qualitative analyses was carried out for alkaline phosphatase staining (200-x magnification).

#### *RNA isolation and Real-time RT-qPCR*

The gene expression of *runx2*, *osterix* and *IGF-1* were determined by RT-qPCR. Bone samples were crushed in liquid nitrogen, and total RNA was isolated from bone with TRIzol® Reagent (Life Technologies) in accordance with the manufacturer's instructions. RNA purity (Abs 260/280nm ~2.0) and concentration were determined by L-Quant (Loccus Biotecnologia). Deoxyribonuclease I (Sigma-Aldrich) was used to eliminate genomic DNA contamination in accordance with the manufacturer's instructions. The cDNA was synthesized with ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega) from 1 µg of the total RNA, following the manufacturer's instructions. Quantitative PCR was performed using SYBR® Green I (Invitrogen) to detect double-strand cDNA synthesis on the 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems). The PCR cycling conditions were: an initial polymerase activation step for 5 min at 95 °C, 40 cycles of 15 s at 95 °C for denaturation, 35 s at 60 °C for annealing and 15 s at 72 °C for elongation. At the end of cycling protocol, a melting-curve analysis was

included and the fluorescence was measured from 60 to 99 °C to confirm the specificity of primers and the absence of primer-dimers; in all cases, one single peak was obtained. All real-time assays were carried out in quadruplicate, and in all experiments, a reverse transcriptase negative control was included. *Hprt1* was used as the reference gene for normalization. The sequences of reverse and forward primers are provided in Table 1. The efficiency per sample was calculated using LinRegPCR 2016.1 Software (<http://LinRegPCR.nl>). GeNorm 3.5 Software (<http://medgen.ugent.be/genorm/>) was used to assess the stability of the reference gene, and the optimal number of reference genes according to the pairwise variation (V). Relative mRNA expression levels were determined using the  $2^{-\Delta\Delta C_q}$  method (Bustin et al., 2013).

#### *Statistical analysis*

Data are expressed as the mean  $\pm$  the standard error mean. Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni multiple comparison test. P values less than 0.05 were considered as significant. The experimental N for each protocol is indicated in each legend to figure. GraphPad Prism® software version 5.01 (San Diego, USA) was used for statistical analysis and for creation of graphs.

## Results

### *Body weight variation and glycemic levels in female and male T1D mice*

After the last STZ injection (on day 5), female and male T1D mice presented an impaired body weight gain, when compared to control animals. T1D females were leaner when compared to male T1D mice, as indicated by the evaluation of body weight on day 32. The insulin replacement significantly prevented the body weight loss in female T1D animals (Supplementary Figure 1A and C). As previously shown (Elmarakby et al., 2011; Mao et al., 2014), T1D induction by STZ injection led to hyperglycemia (>250 mg/dl), confirming the development of diabetes in female and male mice. The last treatment with vitamin D3 and/or insulin was performed one day before the euthanasia, justifying the hyperglycemia, even in insulin-treated mice (Supplementary Figure 1B and D).

### *Bone regeneration based on histological analysis*

We carried out a non-critical sized bone defect in STZ-T1D animals to assess the effects of different treatments on bone regeneration, comparing the outcomes in male and female mice. Based on the evaluation of H&E staining, female and male T1D mice showed an impairment of bone healing, with the presence of a disorganized loose connective tissue within the defects (Figure 1, A-D). The percentages of newly formed bone areas were reduced in  $53.4 \pm 4\%$  and  $47.8 \pm 6\%$ , in male and female T1D mice, respectively, in comparison with non-diabetic animals, according to the semi-quantitative analysis ( $P < 0.01$ ). The supplementation with vitamin D3 recovered the bone regeneration in T1D animals to the values seen in control non-diabetic mice, in either males or females ( $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ , respectively). Conversely, the insulin replacement significantly improved the bone regeneration in males ( $P < 0.05$ ), whereas it failed to significantly increase this parameter in females. No further increase in the areas of newly formed bone was observed by the combined treatment with vitamin D3 plus insulin, in

either female or male mice. The assessment of Masson's trichrome-stained slides showed a marked diminishment of collagen contents, with reduction percentages of  $55.7 \pm 12\%$  and  $56.8 \pm 8\%$ , in T1D males and females, respectively, when compared to non-diabetic control mice. The qualitative evaluation of collagen-rich blue-colored regions corroborated the semi-quantitative analyses (Figure 2, A-D  $P < 0.05$ ). A partial (but not significant) improvement of collagen contents was observed for vitamin D3 and insulin treatment, in male and female mice, when administered alone or in a combination scheme. We also performed an analysis of tartrate-resistant acid phosphate (TRAP) in the areas of the defect, as an indicative of osteoclast activity. This staining did not reveal significant differences among the experimental groups, regardless of the sex or treatments (Figure 4, A-D). Female and male T1D mice presented an overall increase of bone alkaline phosphatase staining in the defect areas, when compared with non-diabetic mice of both sexes, with a slight reduction in animals treated with insulin and/or vitamin D3 (Supplementary Figure 2).

#### *Micro-CT evaluation*

Micro-CT is a useful tool to measure the microstructural changes in the process of bone regeneration (Cano et al., 2007). The quantitative analysis of bone volume density (BV/TV) revealed that either female or male T1D mice displayed lessened bone formation (BV/TV) in relation to control animals (Figure 4B and D, respectively), which is supported by qualitative images (Figure 4A and C). Insulin-treated male T1D mice showed a significant recovery of BV/TV values ( $P < 0.01$ ), an effect that was mirrored by treatment with vitamin D3, alone or in combination with insulin, although significant differences were not observed. The supplementation with vitamin D3 and/or insulin also improved BV/TV values in female T1D mice, but these effects were not statistically significant. Other parameters were assessed in



micro-CT analysis, such as trabecular thickness (Tb.Th) and trabecular separation (Tb.Sp). This set of data did not reveal any differences among the experimental groups (Figure 4E-H).

#### *Runx2, Osterix and IGF-1 expression in bone*

Next, we evaluated the bone mRNA expression of two osteoblast-related transcription factors, namely *runx2* and *osterix*, in addition to *IGF-1*, which is decreased under T1D (Nakashima et al., 2002; Crane et al., 2013; Kalaitzoglou et al., 2016). Real-time PCR for *runx2* (Figure 5A and B) and *osterix* (Figure 5C and D) did not reveal marked changes among the experimental groups, except by an elevation of *runx2* and *osterix* mRNA levels in T1D male mice treated with vitamin D3 ( $P<0.01$ ). Conversely, T1D female mice that received vitamin D3, or vitamin D3 plus insulin, displayed an increased expression of *IGF-1* mRNA levels ( $P<0.01$ ), when compared to control T1D mice (Figure 5E). An elevation of *IGF-1* mRNA expression was observed in vitamin D3-treated non-diabetic males, without significant alterations in male T1D mice (Figure 5F).

#### *Elisa assay*

The serum levels of the pro-inflammatory cytokines IFN- $\gamma$  and TNF were undetectable (data not shown), whereas IL-1 $\beta$  (Supplementary Figure 3) was identified in all the experimental groups. Regarding IL-1 $\beta$ , there was no significant difference among the treatment groups, except by a reduction in female T1D mice, when compared to non-diabetic females ( $P<0.01$ ).

## Discussion

A major concern about DM involves the complications caused by chronic hyperglycemia. The outcomes related to DM progression are very serious and can greatly compromise the life quality of the individuals, independent of the type. As mentioned before, T1D is associated with retinopathy, neuropathy, nephropathy, and cardiovascular diseases, besides an increased risk of bone fractures, probably associated with low bone turnover (Polonsky, 2012; Sundararaghavan et al., 2017). T1D-related complications have great impacts on Dentistry, due to the compromised cicatrization of soft and bone tissues (Desta et al., 2010; Chrcanovic et al., 2014). With this in mind, the present study evaluated the bone healing in a femoral defect model in T1D mice, comparing the outcomes in males and females. Additionally, we investigated whether insulin replacement and/or the vitamin D3 supplementation might influence the bone regeneration in this experimental paradigm.

The repeated administration of STZ resulted in impaired body weight gain in female and male C57/BL/6J mice, when compared to control animals, followed by hyperglycemia, confirming T1D induction (Zauli et al., 2010; Carvalho et al., 2017). The serum levels of pro-inflammatory cytokines were undetectable (TNF and IFN $\gamma$ ) or presented low variations among the experimental groups (IL-1 $\beta$ ). Generally, there were no sex differences in the development of STZ-induced T1D, except by slightly higher glucose levels in males, whilst females were leaner. This confirms previous evidence showing lower glyceic levels and body weight gain in females, in a study conducted with STZ-T1D Balb/c mice of both sexes (Martin and McCabe, 2007). According to the International Diabetes Federation (2017), DM has no predilection for men or women, similarly affecting both sexes. Despite most autoimmune diseases have a predilection for women, T1D does not present such profile; in fact, a predominance of T1D in Caucasian men has been suggested (Gale and Gillespie, 2001; Mauvais-Jarvis, 2017). Of interest, a meta-analysis study conducted by Chrcanovic et al. (2015) proposed that implant

failure rates are superior in males, in relation to females. In addition, as recently reviewed by Mauvais-Jarvis et al. (2017), there is a current tendency to consider sex as a biological variable in pre-clinical studies. However, most experimental studies on T1D or T2D still use males, rather than females (Mauvais-Jarvis et al., 2015). Hence, it is reasonable to consider that sex has an influence on bone metabolism, especially when taking into account the complexity of bone biology, justifying the use of males and females in the present study.

As demonstrated by Nyman et al. (2017), the continuous insulin treatment rescued the body weight gain in male T1D mice. In our study, the insulin replacement significantly prevented the body weight loss in female T1D animals. However, insulin failed to significantly altering this parameter in males. At this moment, we are not able to explain this discrepancy, but it might be related to the use of different mouse strains. The glycemic levels of insulin-treated female and male animals did not return to the control levels, possibly because the last treatment with insulin was carried out one day before euthanasia.

Herein, we tested the effects of vitamin D3 and/or insulin therapy in female and male T1D mice, by using a non-critical sized bone defect model (Cignachi et al., 2015), aiming to gain further insights on bone regeneration patterns under DM. Our data demonstrated marked histological bone changes in vehicle-treated female and male T1D mice. These animals showed an impaired bone regeneration, according to the evaluation of H&E-stained sections, with the presence of a disorganized cancellous bone within the area of the defect, regardless of the sex. Similarly, the collagen contents were diminished in T1D animals, as revealed by Masson's trichrome staining, without sex differences. Some experimental studies showed a significant negative impact of T1D on bone formation in rodent models of calvarial or femur critical defects (Mao et al., 2014; de Santana and Trackman, 2015; Carvalho et al., 2017). A recent study from Shehata et al. (2017), conducted in male rats, without bone defect creation, demonstrated that T1D animals presented degenerated compact bone, according to the

histological analyses by H&E staining. Conversely, in our study, female and male non-diabetic animals displayed extensive areas of newly formed bone in the defect, as it can be expected for non-critical sized bone defects. The present data confirm and extend previous evidence indicating that T1D-related osteopenia is not sex dependent (Martin and McCabe, 2007).

There is a clear relationship between vitamin D insufficiency and diabetic bone disease. However, only a few studies investigated the effects of vitamin D3 supplementation on bone healing under T1D (Xiong et al., 2017a;b). Indeed, there is no consensus regarding the beneficial effects of vitamin D3 therapy on major chronic diseases, such as DM (Cianferotti et al., 2017). We provide novel evidence showing that vitamin D3 treatment was able to recover the bone regeneration in female and male T1D animals, to the values seen in control non-diabetic mice, as indicated by the H&E histological analysis. A similar favorable effect for vitamin D3 on bone healing under T1D was also demonstrated by Masson's trichrome analysis, indicating a positive modulation of collagen contents towards bone regeneration, in animals of both sexes. Supporting the present results, Li et al. (2013) showed that administration of vitamin D3 ameliorated alveolar bone loss in a periodontitis model in STZ-T1D mice.

Insulin replacement is imperative for T1D management. However, the real benefits of insulin treatment on bone recovery in DM still require further investigations. We report that insulin therapy generally improved the bone regeneration in male and female mice, as indicated by H&E, besides Masson's trichrome collagen staining. The insulin therapy recovered the bone regeneration in T2D rats, by using a subcritical size defect model (Picke et al., 2016). Of high interest, a recent study demonstrated that continuous infusion of insulin favored osseous healing in T1D mice, an effect that was positively correlated with the insulin doses, but independent on the retrieval of glucose homeostasis (Nyman et al., 2017). Another study indicated that insulin therapy in T1D mice led to increased expression of collagen type 1 (Lu et al., 2003), what might support our data on the recovery of collagen levels by insulin. Herein, the pro-healing actions

of insulin appear to be slightly superior in male, when compared to female T1D mice. Of note, men display higher insulin concentrations in relation to women, after the same insulin infusion rates, what might be an explanation for the slight sex-related differences in insulin responses (Jensen et al., 2012).

Since insulin therapy is indispensable for the treatment of T1D, we investigated whether vitamin D3 combination might increase the favorable effects of insulin on bone healing. A study conducted by Wang et al. (2016) showed that the administration of vitamin D3, prior to induction with STZ, increased insulin secretion in mice. We found that combined treatment with vitamin D3 plus insulin failed to present superior bone healing or collagen levels, when compared to the separate treatments, in female or male T1D animals. On the other hand, Wu et al. (2013) demonstrated that vitamin D3 and insulin combination synergistically stimulated titanium implant osseointegration in male T1D rats. Different from our approach, the authors evaluated the mechanisms of osseointegration, but not the bone healing, what might justify the unlike results.

Next, we evaluated TRAP and alkaline phosphatase staining, as indicatives of osteoclast and osteoblast activity, respectively. Previous studies showed that osteoblast and osteoclast differentiation or activity could be increased, decreased or even unchanged in DM (Goodman e Hori, 1984; Hie et al., 2007; Xu et al., 2015; Jiao et al., 2015; Bortolin et al., 2017). In the present study, the counts of active osteoclasts in the area of the defect, as measured by TRAP staining, did not reveal significant differences among the experimental groups. Oppositely, male and female T1D mice showed a general increase of alkaline phosphatase staining. Corroborating our results, a previous clinical study indicated an induction of bone alkaline phosphatase in young T1D women, whereas the levels of free deoxypyridinoline (a marker of bone resorption) remained unaltered (Massé et al., 2010). The authors correlated this evidence with an impairment of osteoblast differentiation that accounted for delayed matrix

mineralization, without osteoclastogenesis changes. Furthermore, an *in vitro* study conducted with cultured mouse osteoblasts showed an elevation of alkaline phosphatase activity and expression, after chronic hyperglycemia (Botolin and McCabe, 2006). When analyzed together with H&E and Masson's trichrome results, this data set allows suggesting that T1D impairs the ability of osteoblasts to produce collagen (Bikle et al., 2015), negatively affecting the quality and the length time of bone healing, without changes of osteoclast activity. The treatment with insulin and/or vitamin D3 slightly reduced the alkaline phosphatase staining, what might support an interference with bone formation rates.

Previous studies demonstrated the importance of micro-CT analysis to establish the bone microarchitecture, especially given the skeletal complications in DM (Coe et al., 2012 ; Wu et al., 2013; Wang et al., 2015; Picke et al., 2016; Carvalho et al., 2017). The micro-CT scanning revealed decreased BV/TV values in female and male T1D animals, when compared to non-diabetic mice. The insulin replacement in male T1D mice increased the BV/TV rates to the values seen in control non-diabetic animals, extending the histological data. Picke et al. (2016) observed a similar result in the values of BV/TV, using male T2D ZDF rats. The effects of insulin on BV/TV values in female T1D mice were slighter, reinforcing the sex differences for insulin treatment, as also revealed by histological evaluation. The vitamin D3 supplementation alone or in combination with insulin mirrored the effects of insulin therapy, in either female or male animals. A study conducted by Wu et al. (2013) showed an increase of BV/TV and Tb.Th ratios in the implant osseointegration, when male T1D rats were treated with vitamin D3 plus insulin. Additionally, it was verified that vitamin D3 administration increased the BV/TV levels in male mice, leading to improved implant osseointegration, likely by inactivation of FoxO1 in osteoblasts (Xiong et al., 2017a). Herein, the values of Tb.Th and Tb.Sp did not exhibit marked differences when comparing females and males in the different experimental groups. This contrasts somewhat with previous evidence showing an elevation of

Tb.Sp in male T1D mice, without beneficial effects for vitamin D3 therapy on this parameter (Xiong et al., 2017a). Whereas the authors tested the osseointegration of titanium implants, we evaluated the bone healing in a non-critical sized bone defect.

In our study, the mRNA bone expression of *runx2* and *osterix* was not significantly altered by T1D induction in females or males. Conversely, it was demonstrated that mRNA expression of either *runx2* or *osterix*, besides other osteoblast-related factors, such as osteocalcin, was reduced in the tibial bone of STZ-T1D female rats (Iitsuka et al., 2013). In addition, the exposure to high glucose levels led to *runx2* and *osterix* downregulation, according to assessment of osteoblast-like cells obtained from T2D diabetic patients submitted to total hip replacement (Miranda et al., 2016). This contrasting data might be explained by the time-point in which the femurs were collected for mRNA analysis in our study, corresponding to 28 days after T1D induction protocol. An evaluation of *runx2* and *osterix* expression at earlier periods after the last STZ injection might help to confirm this hypothesis. Strikingly, the vitamin D3 supplementation enhanced the mRNA expression of *osterix* and *runx2* in T1D males, when compared to vehicle-treated T1D mice. In agreement with our results, Xiong et al. (2017) demonstrated that vitamin D3 treatment rescued T1D-induced *runx2* and *osterix* mRNA downregulation in male mice, in a protocol for studying femur implant osseointegration. This might explain the superior results observed in males for vitamin D3 supplementation, in H&E staining and micro-CT evaluation.

Experimental data suggested that IGF-1 signaling in immature osteoblasts is crucial for bone fracture repair (Wang et al., 2015). Furthermore, a clinical study conducted with young T1D patients correlated low bone density and poor glycemic control with a reduced expression of *IGF-1* and its receptor (de Souza et al., 2016). Our data revealed an upregulation of *IGF-1* mRNA in female T1D mice treated with vitamin D3, alone or plus insulin, in addition to male non-diabetic mice. A previous study demonstrated that vitamin D3 deficiency aggravated the

downregulation of *IGF-1* mRNA in female STZ-T1D mice submitted to a femur bone defect (Mao et al., 2014), reinforcing our data on diabetic females. *IGF-1* modulation by vitamin D appears to be relevant for the soft callus formation stage during the fracture healing process, although the vitamin D/*IGF-1* crosstalk remains controversial (Gorter et al., 2014). Nevertheless, this might help to explain our data in non-diabetic males, in which vitamin D3 administration elicited an increase of *IGF-1* expression within the bone defect area. Altogether, these results suggest sex-related differences for bone *IGF-1* expression under vitamin D3 treatment.

In conclusion, the present results bring novel evidence on the mechanisms underlying T1D bone disease. T1D mice of both sexes presented a similar delay in bone regeneration, probably by an alteration of osteoblastogenesis. The administration of insulin or vitamin D3 improved the osseous healing in T1D mice, with slight differences between females and males. Nonetheless, the combination of vitamin D3 with insulin did not provide additional benefits.



## References

- Baba H, Kurano M, Nishida T, Hatta H, Hokao R, Tsuneyama K. 2017. Facilitatory effect of insulin treatment on hepatocellular carcinoma development in diabetes. *BMC Res Notes*. 10(1): 478.
- Bikle DD, Tahimic C, Chang W, Wang Y, Philippou A, Barton ER. 2015. Role of IGF-I signaling in muscle bone interactions. *Bone*. 80: 79-88.
- Bortolin RH, Freire Neto FP, Arcaro CA, Bezerra JF, da Silva FS, Ururahy MA, Souza KS, Lima VM, Luchessi AD, Lima FP, Lia Fook MV, da Silva BJ, Almeida MD, Abreu BJ, de Rezende LA, de Rezende AA. 2017. Anabolic Effect of Insulin Therapy on the Bone: Osteoprotegerin and Osteocalcin Up-Regulation in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 120(3): 227-234.
- Botolin S, McCabe LR. 2007. Bone loss and increased bone adiposity in spontaneous and pharmacologically induced diabetic mice. *Endocrinology*. 148(1): 198-205.
- Bustin SA, Benes V, Garson J, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley G, Wittwer CT, Schjerling P, Day PJ, Abreu M, Aguado B, Beaulieu JF, Beckers A, Bogaert S, Browne JA, Carrasco-Ramiro F, Ceelen L, Ciborowski K, Cornillie P, Coulon S, Cuypers A, De Brouwer S, De Ceuninck L, De Craene J, De Naeyer H, De Spiegelaere W, Deckers K, Dheedene A, Durinck K, Ferreira-Teixeira M, Fieuw A, Gallup JM, Gonzalo-Flores S, Goossens K, Heindryckx F, Herring E, Hoenicka H, Icardi L, Jaggi R, Javad F, Karampelias M, Kibenge F, Kibenge M, Kumps C, Lambertz I, Lammens T, Markey A, Messiaen P, Mets E, Morais S, Mudarra-Rubio A, Nakiwala J, Nelis H, Olsvik PA, Pérez-Novo C, Plusquin M, Remans T, Rihani A, Rodrigues-Santos P, Rondou P, Sanders R, Schmidt-Bleek K, Skovgaard K, Smeets K, Tabera L, Toegel S, Van Acker T, Van den Broeck W, Van der Meulen J, Van Gele M, Van Peer G, Van Poucke M, Van Roy N, Vergult S, Wauman J, Tshuikina-Wiklander M, Willems E, Zaccara S, Zeka F,

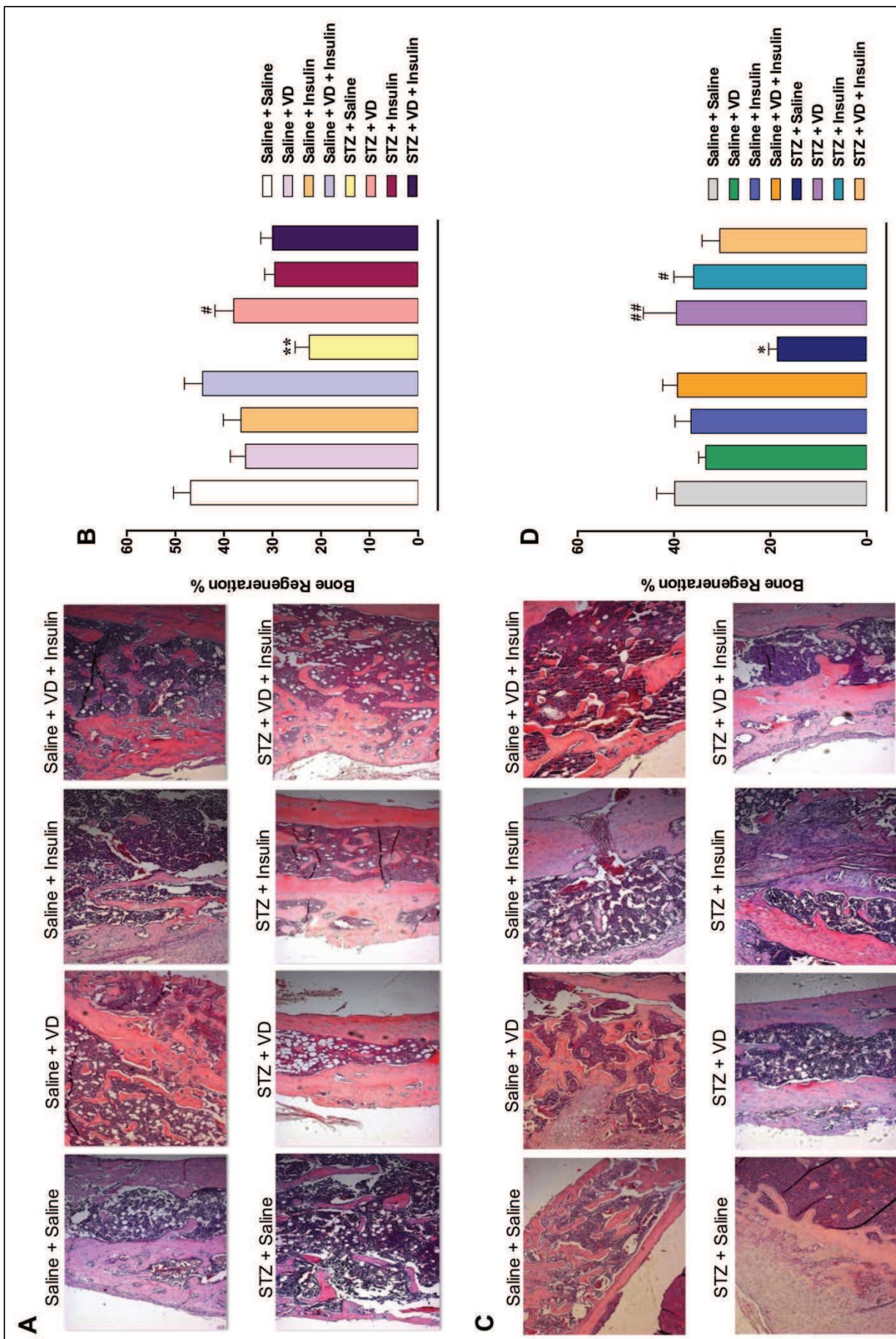
- Vandesompele J. The need for transparency and good practices in the qPCR literature. *Nat Methods*. 2013; 10(11):1063-7.
- Cano J, Campo J, Vaquero JJ, Martínez JM, Bascones A. 2007. High resolution image in bone biology I. Review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 12(6):454-8.
- Carvalho AL, DeMambro VE, Guntur AR, Le P, Nagano K, Baron R, de Paula FJA, Motyl KJ. 2018. High fat diet attenuates hyperglycemia, body composition changes, and bone loss in male streptozotocin-induced type 1 diabetic mice. *J Cell Physiol*. 233(2): 1585-1600.
- Chrcanovic BR, Albrektsson T, Wennerberg A. 2014. Diabetes and oral implant failure: a systematic review. *J Dent Res*. 93(9): 859-867.
- Cianferotti L, Bertoldo F, Bischoff-Ferrari HA, Bruyere O, Cooper C, Cutolo M, Kanis JA, Kaufman JM, Reginster JY, Rizzoli R, Brandi ML. 2017. Vitamin D supplementation in the prevention and management of major chronic diseases not related to mineral homeostasis in adults: research for evidence and a scientific statement from the European society for clinical and economic aspects of osteoporosis and osteoarthritis (ESCEO). *Endocrine*. 56(2): 245-261.
- Cignachi NP, Pesquero JP, Oliveira RB, Etges A, Campos MM. 2015. Kinin B1 receptor affects bone healing in type 1 diabetic mice. *J Cell Physiol*. 230(12): 3019-3028.
- Coe LM, Tekalur SA, Shu Y, Baumann MJ, McCabe LR. 2015. Bisphosphonate treatment of type I diabetic mice prevents early bone loss but accentuates suppression of bone formation. *J Cell Physiol*. 230(8): 1944-1953.
- Crane JL, Zhao L, Frye JS, Xian L, Qiu T, Cao X. 2013. IGF-1 Signaling is Essential for Differentiation of Mesenchymal Stem Cells for Peak Bone Mass. *Bone Res*. 1(2): 186-194.

- De Santana RB, Trackman PC. 2015. Effect of targeted delivery of bone morphogenetic protein-2 on bone formation in type 1 diabetes. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 30(3): 707-714.
- de Souza KS, Ururahy MA, da Costa Oliveira YM, Loureiro MB, da Silva HP, Bortolin RH, Melo Dos Santos F, Luchessi AD, Neto JJ, Arrais RF, Hirata RD, das Graças Almeida M, Hirata MH, de Rezende AA. 2016. Low bone mineral density in patients with type 1 diabetes: association with reduced expression of IGF1, IGF1R and TGF B 1 in peripheral blood mononuclear cells. *Diabetes Metab Res Rev.* 32(6): 589-595.
- Desta T, Li J, Chino T, Graves DT. 2010. Altered fibroblast proliferation and apoptosis in diabetic gingival wounds. *J Dent Res.* 89(6): 609-614.
- Elmarakby AA, Ibrahim AS, Faulkner J, Mozaffari MS, Liou GI, Abdelsayed R. 2011. Tyrosine kinase inhibitor, genistein, reduces renal inflammation and injury in streptozotocin-induced diabetic mice. *Vascul Pharmacol.* 55(5-6): 149-156.
- Gale EA, Gillespie KM. 2001. Diabetes and gender. *Diabetologia.* 44(1): 3-15.
- Goodman WG, Hori MT. 1984. Diminished bone formation in experimental diabetes. Relationship to osteoid maturation and mineralization. *Diabetes.* 33(9): 825-831.
- Gorter EA, Hamdy NA, Appelman-Dijkstra NM, Schipper IB. 2014. The role of vitamin D in human fracture healing: a systematic review of the literature. *Bone.* 64:288-297.
- Hie M, Shimono M, Fujii K, Tsukamoto I. 2007. Increased cathepsin K and tartrate-resistant acid phosphatase expression in bone of streptozotocin-induced diabetic rats. *Bone.* 41(6): 1045-1050.
- Iitsuka N, Hie M, Tsukamoto I. 2013. Zinc supplementation inhibits the increase in osteoclastogenesis and decrease in osteoblastogenesis in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol.* 714(1-3): 41-47.
- International Diabetes Federation. *Diabetes Atlas.* 2017. <https://www.idf.org>

- Jensen MD, Nielsen S, Gupta N, Basu R, Rizza RA. 2012. Insulin clearance is different in men and women. *Metabolism*. 61(4): 525-530.
- Jiao H, Xiao E, Graves DT. 2015. Diabetes and Its Effect on Bone and Fracture Healing. *Curr Osteoporos Rep*. 13(5): 327-335.
- Kalaitzoglou E, Popescu I, Bunn RC, Fowlkes JL, Thrailkill KM. 2016. Effects of Type 1 Diabetes on Osteoblasts, Osteocytes, and Osteoclasts. *Curr Osteoporos Rep*. 14(6): 310-319.
- Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. 2012. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *Osteoarthritis Cartilage*. 20(4): 256-260.
- Li H, Wang Q, Xiao Y, Bao C, Li W. 2013. 25-Hydroxyvitamin D(3)-loaded PLA microspheres: in vitro characterization and application in diabetic periodontitis models. *AAPS PharmSciTech*. 14(2):880-889.
- Llips P. 2006. Vitamin D, physiology. *Prog Biophys Mol Bio*. 92(1):4-8.
- Lu H, Kraut D, Gerstenfeld LC, Graves DT. 2003. Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation. *Endocrinology*. 144(1): 346-352.
- Mao L, Tamura Y, Kawao N, Okada K, Yano M, Okumoto K, Kaji H. 2014. Influence of diabetic state and vitamin D deficiency on bone repair in female mice. *Bone*. 61: 102-108.
- Martin LM, McCabe LR. 2007. Type I diabetic bone phenotype is location but not gender dependent. *Histochem Cell Biol*. 128(2): 125-133.
- Mauvais-Jarvis F, Arnold AP, Reue K. 2017. A Guide for the Design of Pre-clinical Studies on Sex Differences in Metabolism. *Cell Metab*. 25(6): 1216-1230.
- Mauvais-Jarvis F. 2017. Gender differences in glucose homeostasis and diabetes. *Physiol Behav*. 0031-9384(17)30262-7.

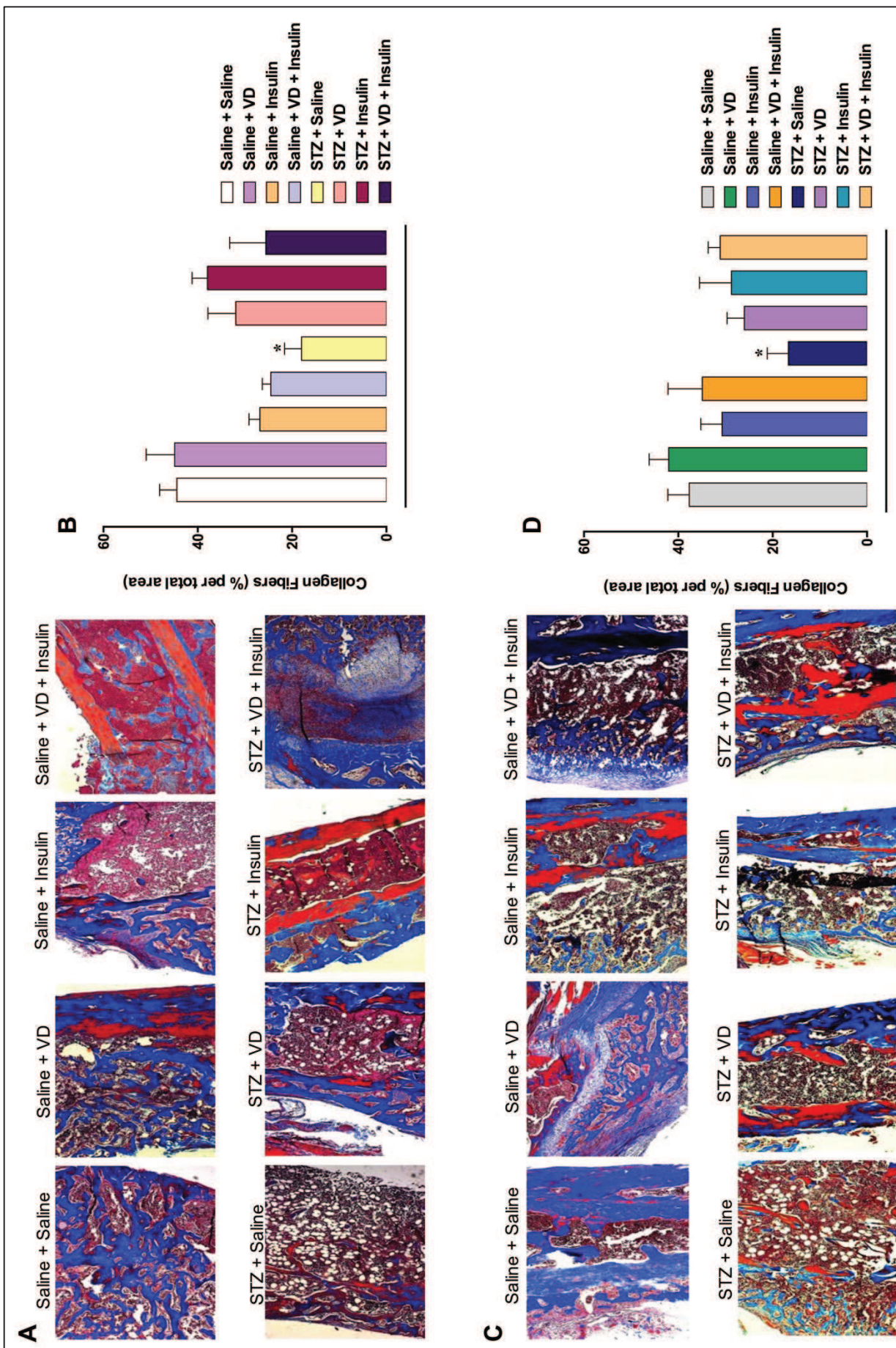
- Mauvais-Jarvis F. 2015. Sex differences in metabolic homeostasis, diabetes, and obesity. *Biol Sex Differ.* 6(1):14.
- Miranda C, Giner M, Montoya MJ, Vázquez MA, Miranda MJ, Pérez-Cano R. 2016. Influence of high glucose and advanced glycation end-products (ages) levels in human osteoblast-like cells gene expression. *BMC Musculoskelet Disord.* 17(1):377.
- Motyl KJ, Botolin S, Irwin R, Appledorn DM, Kadakia T, Amalfitano A, Schwartz RC, McCabe LR. Bone inflammation and altered gene expression with type I diabetes early onset. *J Cell Physiol* 2009; 218(3):575-83.
- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. 2002. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell.* 108(1): 17-29.
- Napoli N, Strollo R, Pitocco D, Bizzarri C, Maddaloni E, Maggi D, Manfrini S, Schwartz A, Pozzilli P; IMDIAB Group. 2013. Effect of calcitriol on bone turnover and osteocalcin in recent-onset type 1 diabetes. *PLoS One.* 8(2):56488.
- National Osteoporose Foundation. <https://www.nof.org/patients/what-is-osteoporosis/>
- Nyman JS, Kalaitzoglou E, Clay Bunn R, Uppuganti S, Thrailkill KM, Fowlkes JL. 2017. Preserving and restoring bone with continuous insulin infusion therapy in a mouse model of type 1 diabetes. *Bone Rep.* 7: 1-8.
- Picke AK, Gordaliza Alaguero I, Campbell GM, Glüer CC, Salbach-Hirsch J, Rauner M, Hofbauer LC, Hofbauer C. 2016. Bone defect regeneration and cortical bone parameters of type 2 diabetic rats are improved by insulin therapy. *Bone.* 82:108-115.
- Polonsky KS. 2012. The past 200 years in diabetes. *N Engl J Med.* 367(14): 1332-1340.
- Seref-Ferlengez Z, Suadicani SO, Thi MM. 2016. A new perspective on mechanisms governing skeletal complications in type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci.* 1383(1):67-79.

- Shehata AS, Amer MG, Abd E-Haleem MR, Karam RA. 2017. The ability of hesperidin compared to that of insulin for preventing osteoporosis induced by type I diabetes in young male albino rats: A histological and biochemical study. *Exp Toxicol Pathol.* 69(4):203-212.
- Sundararaghavan V, Mazur MM, Evans B, Liu J, Ebraheim NA. 2017. Diabetes and bone health: latest evidence and clinical implications. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 9(3):67-74.
- Wang Y, He D, Ni C, Zhou H, Wu S, Xue Z, Zhou Z. 2016. Vitamin D induces autophagy of pancreatic  $\beta$ -cells and enhances insulin secretion. *Mol Med Rep.* 14:2644-2650.
- Wu YY, Yu T, Yang XY, Li F, Ma L, Yang Y, Liu XG, Wang YY, Gong P. 2013. Vitamin D3 and insulin combined treatment promotes titanium implant osseointegration in diabetes mellitus rats. *Bone.* 52(1):1-8.
- Xiong Y, Zhang Y, Guo Y, Yuan Y, Guo Q, Gong P, Wu Y. 2017.  $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D3 increases implant osseointegration in diabetic mice partly through FoxO1 inactivation in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 494(3-4):626-633.
- Xiong Y, Zhang Y, Xin N, Yuan Y, Zhang Q, Gong P, Wu Y. 2017.  $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D3 promotes bone formation by promoting nuclear exclusion of the FoxO1 transcription factor in diabetic mice. *J Biol Chem.* M117.796367.
- Xu MT, Sun S, Zhang L, Xu F, Du SL, Zhang XD, Wang DW. 2016. Diabetes mellitus affects the biomechanical function of the callus and the expression of TGF- $\beta$ 1 and BMP2 in an early stage of fracture healing. *Braz J Med Biol Res.* 49(1):4736.
- Zauli G, Toffoli B, di Iasio MG, Celeghini C, Fabris B, Secchiero P. 2010. Treatment with recombinant tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand alleviates the severity of streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes.* 59(5):1261-1265.

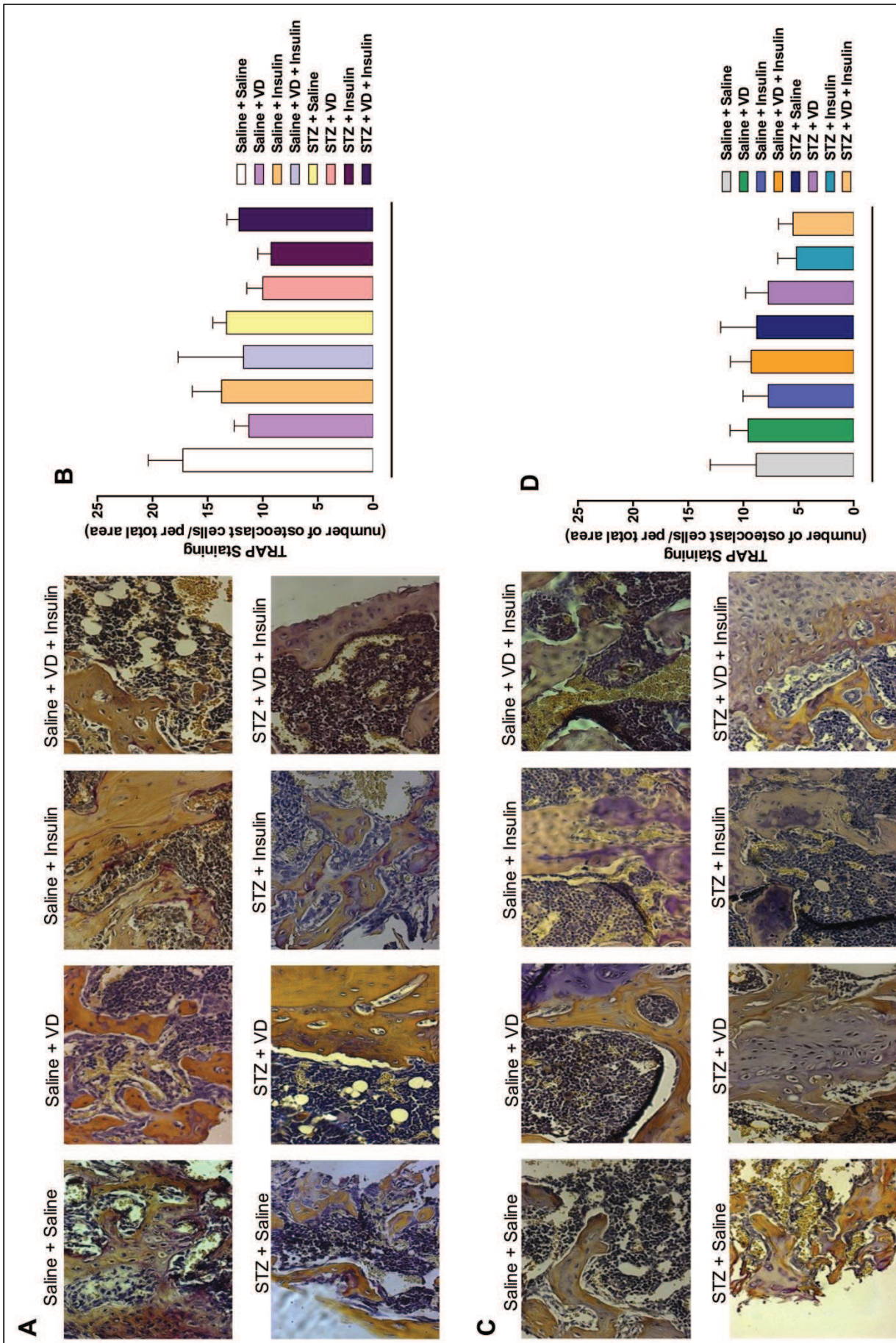


**Figure 1:** Femur bone regeneration areas in the different experimental groups (A, B, C and D). T1D (STZ-treated) female (B) or male (D) mice treated with vitamin D3 (VD) and/or insulin, according to assessment of H&E-stained sections. Compared with the non-diabetic control groups, T1D female and male mice showed an impairment of bone healing, presenting a disorganized tissue in the defect area, with a delayed bone regeneration. The supplementation with vitamin D3 recovered the bone regeneration in T1D animals to the values seen in control non-diabetic mice, in both females and males ( $P<0,05$  and  $P<0,01$  respectively). Insulin replacement significantly improved the bone healing in T1D males ( $P< 0,05$ ). Each column represents the mean of 5-8 animals per group and the vertical lines indicate the standard error mean. \* $p<0.05$ ; \*\* $P<0.01$  in comparison to non-diabetic control mice. # $p<0.05$ ; ## $p<0.01$  in comparison to control non-treated T1D group. Panels A and C are illustrating representative images of bone regeneration in T1D females and males, respectively.

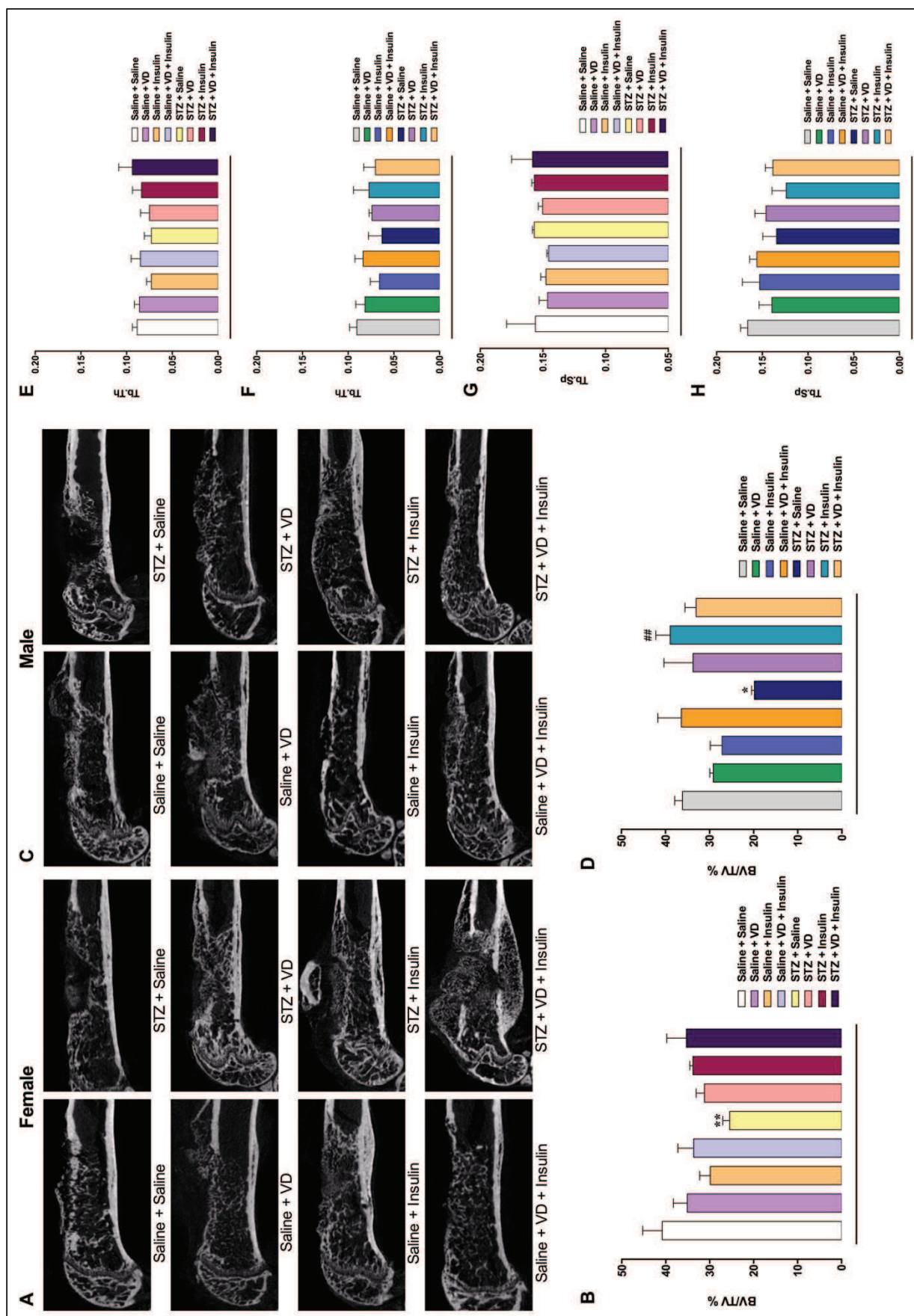




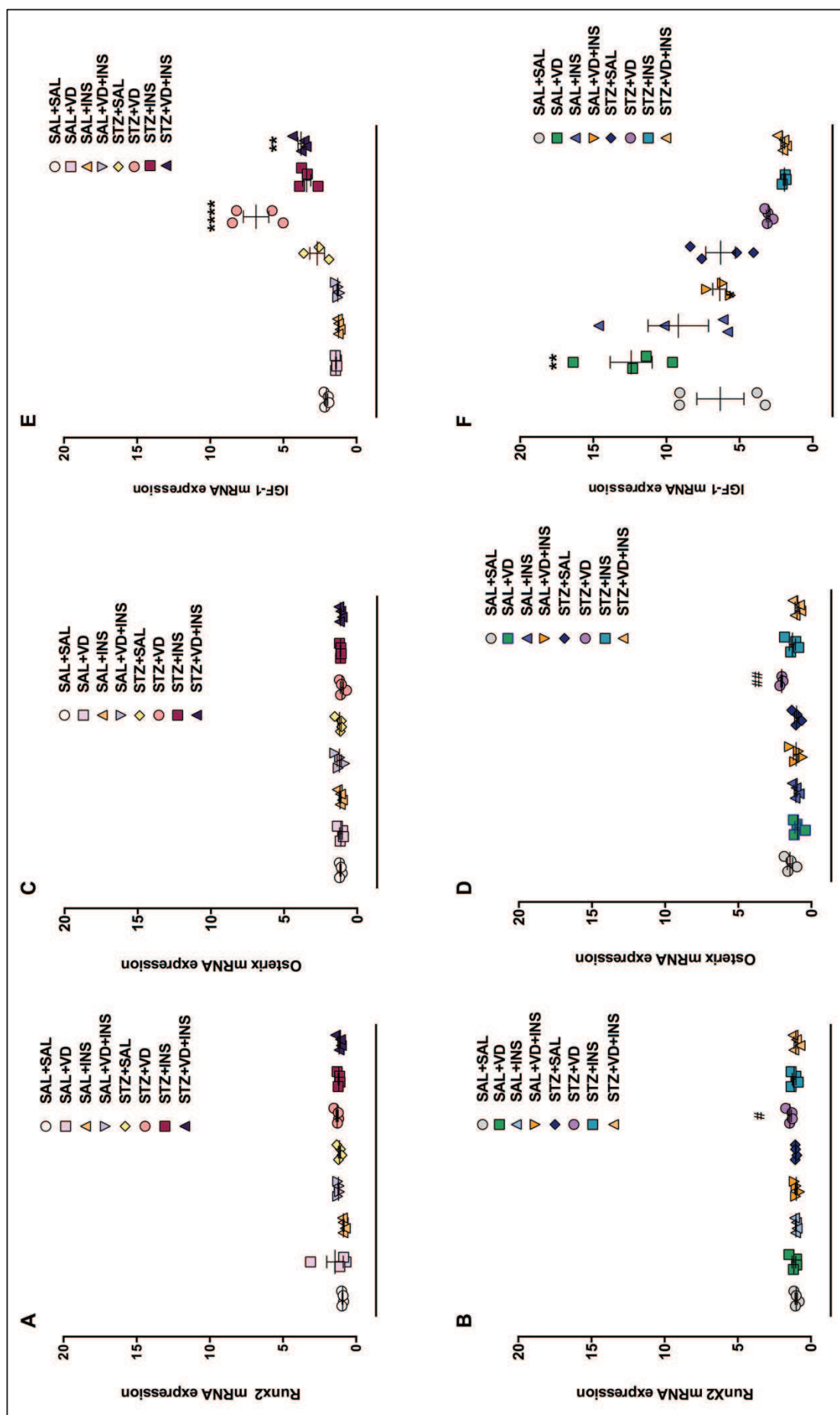
**Figure 2:** Femur collagen contents in T1D (STZ-treated) female (B) and male (D) mice treated with vitamin D3 (VD) and/or insulin, according to assessment of Masson's trichrome-stained sections. The collagen staining was clearer in female and male non-diabetic animals, when compared to T1D mice, based on the qualitative and semi-quantitative analyses. T1D female and male mice treated with vitamin D3 and/or insulin did not showed statistically differences in comparison with T1D animals. Each column represents the mean of 5-8 animals per group and the vertical lines indicate the standard error mean. \* $p < 0.05$  in comparison to non-diabetic control mice. # $p < 0.05$  in comparison to control non-treated T1D group. Panels A and C show representative images of collagen contents within the bone defect area of females and males, respectively.



**Figure 3:** Representative images of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining in femur bone defect of T1D (STZ-treated) female (A) and male (C) mice treated with vitamin D3 (VD) and/or insulin and semi-quantitative analysis of osteoclast-marked cells (B and D). The quantitative analysis of osteoclast-marked cells did not exposed differences concerning the experimental groups. Each column represents the mean of 5-8 animals per group and the vertical lines indicate the standard error mean.

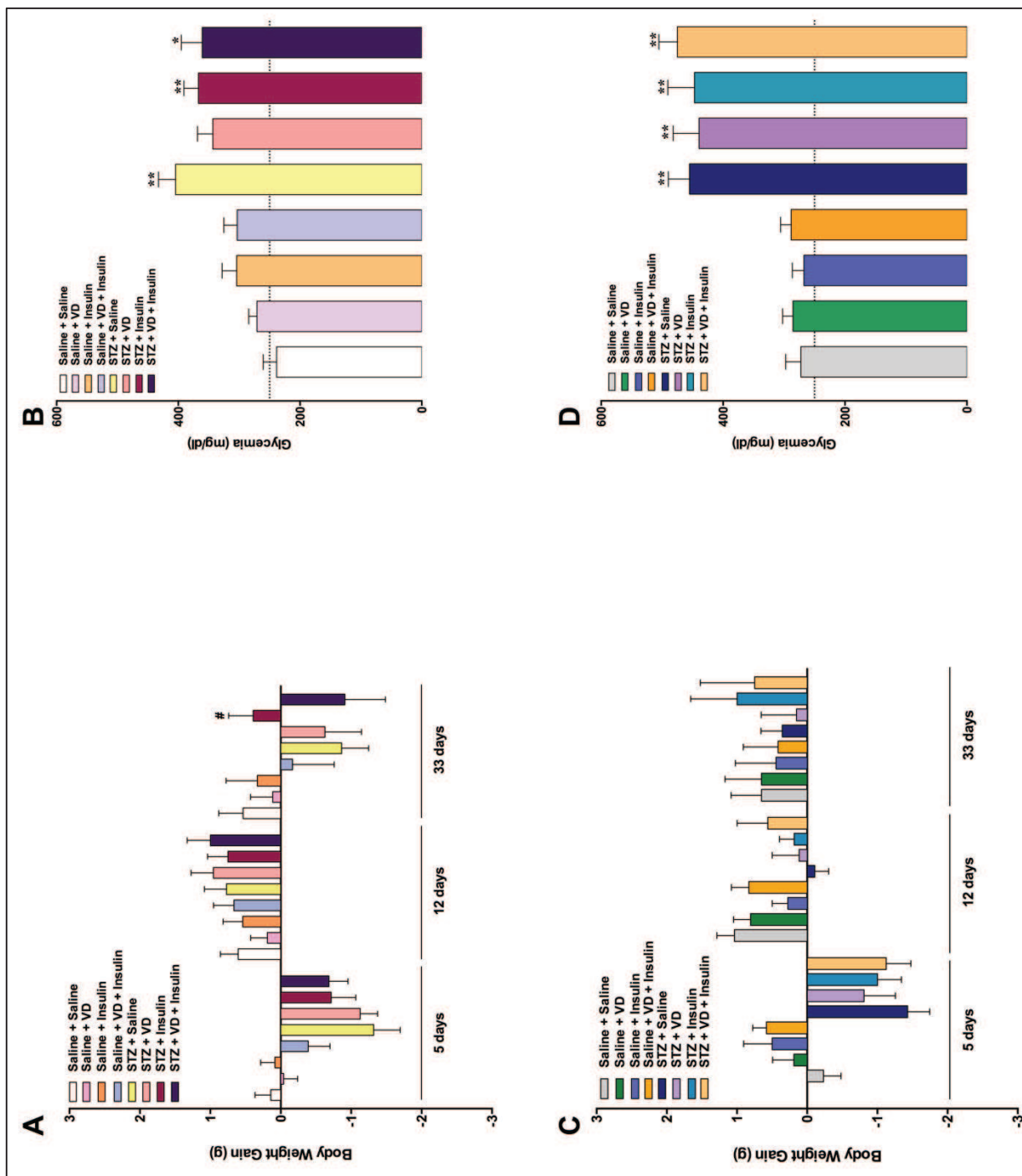


**Figure 4:** Femur bone regeneration in T1D (STZ-treated) female (B) and male (D) mice treated with vitamin D3 (VD) and/or insulin, according to micro-CT evaluation. The percentage of bone volume (BV/TV) was lessened in T1D female and male mice in relation to non-diabetic animals. T1D males that receive the insulin therapy. Each column represents the mean of 3-4 animals per group and the vertical lines indicate the standard error mean. \* $p < 0.05$  in comparison to non-diabetic control mice. ### $p < 0.01$  in comparison to control non-treated T1D group. Representative images for female and male mice (A and C respectively); micro-CT analysis of the femur microstructure in females and males, correspondingly (B and D).

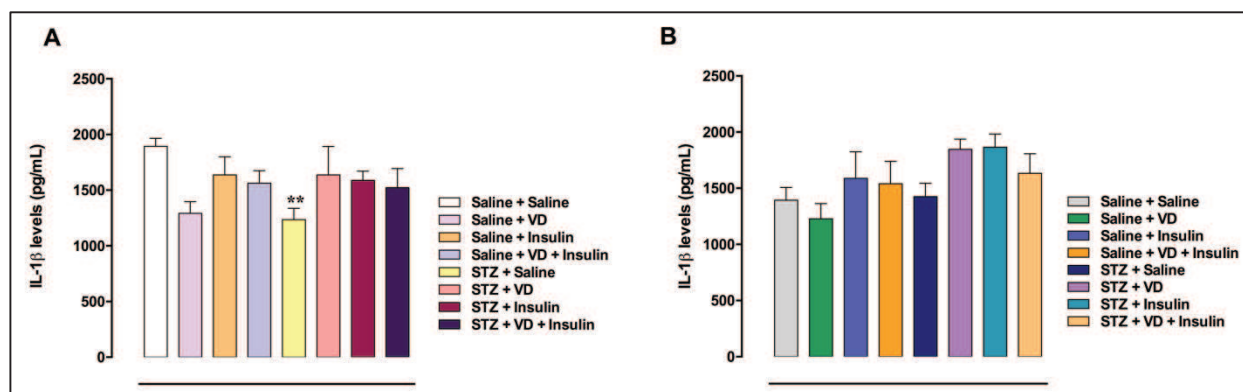


**Figure 5:** Real time PCR for runx2 (A and B), osterix (C and D) and IGF-1 (E and F) in T1D female (A, C and E) or male (B, D and F) mice. The area corresponding to the bone defect was collected for the analysis. Each column represents the mean of four animals per group and the vertical lines indicate the standard error mean. ##p<0.01 in comparison to control non-treated T1D group.

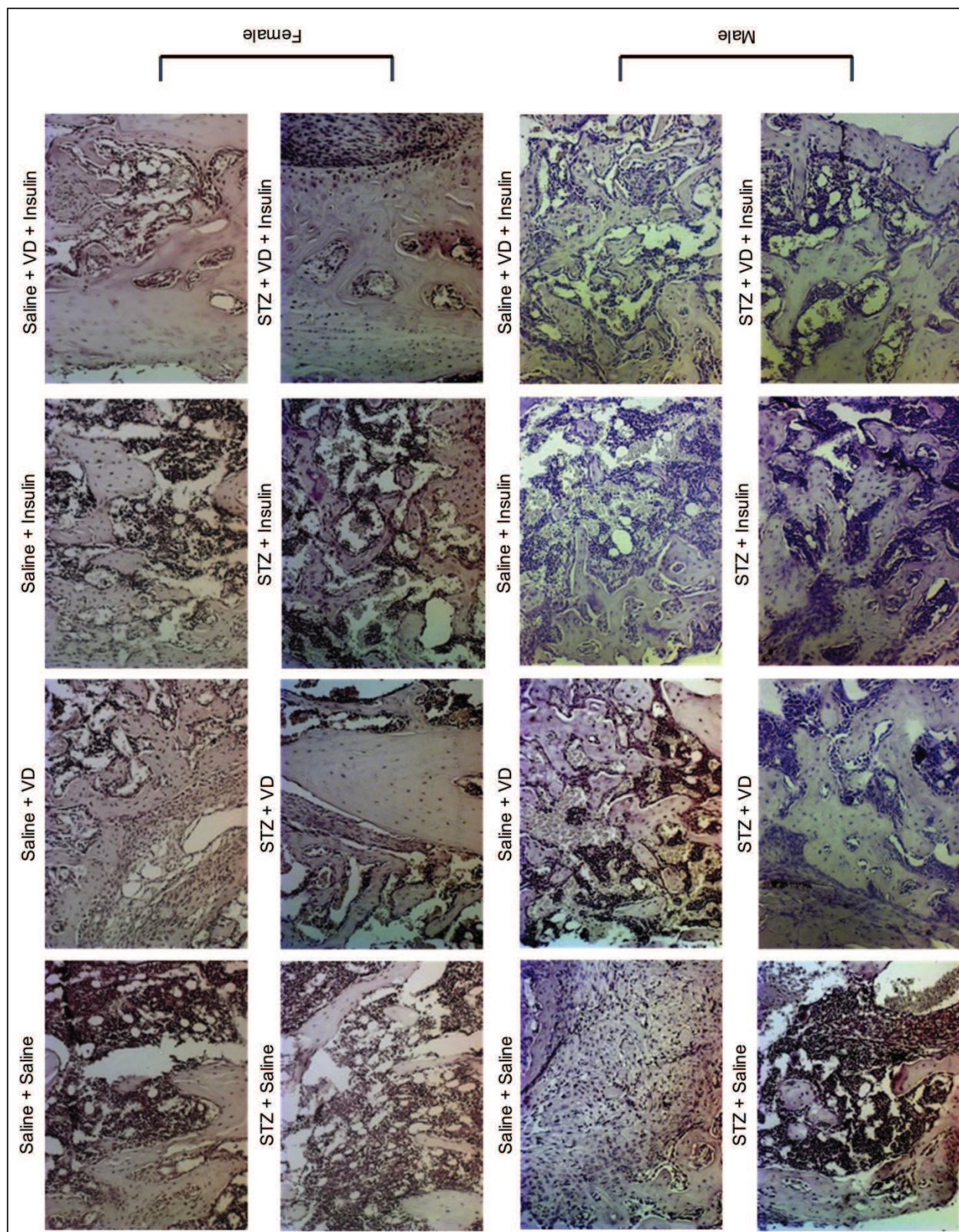




**Figure 1.S:** Body weight gain and glycemia levels in T1D (STZ-treated) female (A and B) and male (C and D) mice treated with vitamin D3 (VD) and/or insulin. Each column represents the mean of 9-14 animals per group and the vertical lines indicated the standard error mean. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  in comparison to non-diabetic control mice. # $p < 0.05$  in comparison to control non-treated T1D.



**Figure 2.S:** Serum IL-1 $\beta$  levels in T1D (STZ-treated) female (A) and male (B) mice treated with vitamin D3 (VD) and/or insulin. Each column represents the mean of 4-5 animals per group and the vertical lines indicated the standard error mean. \*\* $p < 0.01$  in comparison to female non-diabetic control mice.



**Figure 3.S:** Osteoblast activity, as indicated by Alkaline Phosphatase staining in the areas corresponding to the bone defect. Representative images of bone healing T1D female and male mice treated with vitamin D3 (VD) and/or insulin.

**Table 1.** Sequences of reverse and forward primers.

<b>Gene</b>	<b>Forward primer</b>	<b>Reverse primer</b>
<i>Hprt1</i>	5'- CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC-3'	5'- GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC-3'
<i>Runx2</i>	5'-AAATGCCTCCGCTGTTATGAA-3'	5'-GCTCCGGCCCACAAATCT-3'
<i>Osterix</i>	5'-AGCGACCACTTGAGCAAACAT-3'	5'-GCGGCTGATTGGCTTCTT-3'
<i>IGF-1</i>	5'-CAAGCCCACAGGCTATGGC-3'	5'-TCTGAGTCTTGGGCATGTCAG-3'

#### **4. CAPÍTULO II**

O artigo a seguir intitula-se “Novel evidence on bone healing outcomes in type 1 diabetes and menopause” e está em preparação para ser submetido à revista científica Bone (Fator de impacto: 4.14; Qualis A1 Internacional, Área de Odontologia, CAPES).

## **Novel evidence on bone healing outcomes in type 1 diabetes and menopause**

Natália P. Cignachi<sup>1,2</sup>, Alice Ribeiro<sup>3</sup>, Gustavo D. Barroso<sup>4</sup>, Amanda P. Cignachi<sup>2</sup>, Luiza W. Kist<sup>4,5</sup>, Maurício R. Bogo<sup>5</sup>, Rodrigo B. M. Silva<sup>2,4</sup>, Maria M. Campos<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Escola de Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil.

<sup>2</sup>Centro de Pesquisa em Toxicologia e Farmacologia, Escola de Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil.

<sup>3</sup>Curso de Graduação em Odontologia, Escola de Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil.

<sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Escola de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, 90619-900, Brazil.

<sup>5</sup>Laboratório de Genômica e Biologia Molecular, Escola de Ciências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, 90619-900, Brazil.

Corresponding Author: Maria Martha Campos. E-mail address: camposmmartha@yahoo.com

Telephone number: +555133203562

## Introduction

Menopause encompasses marked hormonal changes in middle-aged women, accompanied by alterations of body composition and fat distribution (Karvonen-Gutierrez et al., 2016). A prominent consequence of menopause is the development of osteoporosis due to decreased estrogen levels, characterized by low bone mass and skeletal frailty, with an increased risk of bone fractures (Song et al., 2017). Noteworthy, the decline of bone mineral density reaches 9 to 13 % in the first 5-years post-menopause (Khalil et al., 2011). By the year of 2050, the worldwide incidence of hip fractures in women is estimated to rise in 240 %, when compared to 1990, due to menopause-related osteoporosis (Tabatabaei-Malazy et al., 2017). Estrogen has many functions, preventing the occurrence of cardiovascular diseases and insulin resistance, also upholding the osseous integrity by the modulation of bone turnover (ESHRE Capri Workshop Group, 2010; Zhu et al., 2013). Considering the global population aging, the burden of menopause and related metabolic changes is expected to arise.

Type 1 diabetes (T1D) is a metabolic disease, characterized by an autoimmune destruction of the pancreatic  $\beta$ -cells, leading to hyperglycemia. T1D is associated with several long-standing complications, including bone diabetic disease. Diverging from most autoimmune diseases, T1D has no predilection for women. In fact, literature evidence suggests a protective role for estrogen against T1D onset in pubertal girls (Mauvais-Jarvis, 2017). In opposition, postmenarcheal adolescents present mild hypoestrogenism (Martínez et al., 2016), and T1D has been correlated with accelerated senescence, with an anticipated menopause transition (Dorman et al., 2001). However, there is some controversial data on the relationship between T1D and earlier menopause, what might be related to an improvement of glycemic control in the last years (Yarde et al., 2015; Karvonen-Gutierrez et al., 2016).

Both menopause and T1D have substantial impacts on the skeletal metabolism. It has been suggested that T1D is associated with an increased risk of fractures across menopause,



with a faster decline in bone mineral density of hips (Nicodemus and Folsom, 2001; Khalil, 2011). Experimental studies in rats and mice revealed additive effects for estrogen deficiency plus T1D on bone metabolism (Fukuharu et al., 2000; Gopalakrishnan et al., 2006). Of note, T1D post-menopausal women displayed lesser femoral neck bone mineral density, in comparison to healthy subjects in menopause (Rachón et al., 2003). More recently, it was demonstrated that ovariectomy worsens T1D-related inflammatory bone loss in mice (Raetz et al., 2017).

The concurrence of menopause and T1D certainly intensifies the decline of bone mineral density. Nevertheless, the effects of menopause combined with T1D on bone regeneration levels need to be unveiled. The present study compared the bone healing in a mouse model of menopause, with or without T1D induction, using a femoral non-critical sized defect. We also investigated whether vitamin D3 supplementation, insulin therapy and/or estrogen replacement might improve the bone regeneration when estrogen deficiency and diabetes are associated.

## Material and Methods

### *Animals*

Female C57/BL/6J mice (two months old, 18-25 g, N=4-12/group, Total N=205) were obtained from the Center of Experimental Biological Models (CeMBE/PUCRS). The animals were housed under standard conditions of temperature ( $22 \pm 2$  °C), under a 12:12 h light-dark cycle (lights on 07:00 AM), and humidity (50 - 70 %), in ventilated cages (4 animals per cage), with autoclaved wood chip bedding. Standard rodent chow and tap water were provided *ad libitum*. All the surgical procedures were performed under general anesthesia, with a mixture of xylazine (10 mg/kg) and ketamine (100 mg/kg), dosed by intraperitoneal (i.p.) route. The body weight (in g) was registered thoroughly. The experimental procedures were carried out in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health (NIH, 2011). The *in vivo* experiments are reported following the ARRIVE Guidelines (Kilkenny et al., 2012). The local animal ethics committee (15/00433) approved the experimental protocols.

### *Bilateral ovariectomy*

The menopause model was accomplished according to the method previously described by Bekku and Yoshimura (2005). Briefly, we performed a longitudinal incision in the dorsal skin and musculature to expose the ovaries. Next, a ligature was made for hemostasis, and the ovaries were bilaterally resected (OVX). The same procedure was carried out in the sham-operated group, but without ligature placement or ovary subtraction.

### *Induction of diabetes*

Twenty-one days after ovariectomy, the animals (OVX and sham-operated) were assigned into four major subgroups: type 1 diabetes (OVX-T1D and sham-operated T1D) and

non-diabetic (OVX and sham-operated). T1D was induced by 5-daily i.p. injections of streptozotocin (STZ; 50 mg/kg i.p.), dissolved in citrate buffer (50 mM; pH 4.5). Control animals received the vehicle alone, at the same scheme of administration. The glucose levels were measured at the day of euthanasia, and expressed in mg/dl (OneTouch; Johnson & Johnson Medical; São Paulo, Brazil).

### *Femur bone defect*

Three days after the last STZ injection (corresponding to the 29<sup>th</sup> day of the OVX protocol), a monocortical non-critical sized bone defect (4-mm x 2-mm) was created in the left femur, as described before (Cignachi et al., 2015). At the end of the surgery, the animals received antibiotic and analgesic post-operative medication.

### *Protocols of treatment*

One day after the bone defect creation, sham-operated or OVX animals, with or without T1D induction, were subdivided into additional five treatment groups: (i) vehicle (1 ml/kg; 0.9% NaCl solution); (ii) vitamin D3 (4 µg/kg; orally; Aché Laboratories, São Paulo, Brazil) (Wang et al., 2016); (iii) insulin (3 UI/kg; subcutaneously; Humulin® R Insulin, Eli Lilly and Co., Indianapolis) (Baba et al., 2017); (iv) 17-β-estradiol (10 µg/kg; i.p.; Sigma, St Louis, MO) (Vidal-Gómez et al., 2016; Chen et al., 2017); (v) vitamin D3 plus insulin plus estradiol (at the same doses and routes). The treatments were dosed daily, for 20 days, even on the day of euthanasia. The present study evaluated bone remodeling in 20 experimental subgroups.

### *Sample collection*

On day 50 (since the beginning of the ovariectomy), the animals were euthanized by sevoflurane inhalation, after overnight fasting. The blood was collected for analysis of glycemia, alkaline phosphatase and calcium. The femurs were cleaned of connective tissues, and fixed in 4%-buffered formaldehyde solution, for the histological procedures or micro-CT analysis. Separately, samples corresponding to the defect area were stored in TRIzol® Reagent (Life Technologies) for quantitative PCR analysis.

### *Micro-computed tomography (micro-CT) evaluation*

Micro-CT scanning was performed by Skyscan 1172, Bruker Micro-CT, Belgium, before decalcification, at 89 Kv and 112  $\mu$ A, with 6- $\mu$ m thickness, in a resolution of 1336 x 2000 pixels. For each femur, a specific volume-of-interest (VOI) was selected to cover the center of the bone defect. The Software CTAn V1.16 (Bruker) was used for 3D-morphometric analysis. The following parameters were evaluated: bone volume fraction (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th), trabecular separation (Tb.Sp) and trabecular number (Tb.N).

### *Histological analysis*

After fixation, the samples were decalcified in a 17% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution, for 10 days (with daily changes of fresh solution), and embedded in paraffin. Consecutive 4- $\mu$ m thick longitudinal sections were obtained from each femur. The slides were stained with hematoxylin–eosin (H&E) or Masson’s trichrome (Accustain Mallory’s stain kit, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO). The histological images were taken with a microscope (Axio Imager A1, Jena, Germany) coupled to an image capture system (Axio Vision Rel. 4.4 Software Multimedia, Jena, Germany), from Carl Zeiss (Hallbergmoos, Germany). The NIH Image J 1.36b software program was used to semi-quantitatively determining the percentage areas of bone

formation in relation to the total area of the sectioned sample in H&E-stained slides (100-x magnification). The same software was used for analyzing blue-colored collagen fibers in Mallory-stained slides (200-x magnification).

#### *Real-time RT-qPCR*

The gene expression of *runx2*, *osterix* and *IGF-1* was determined by RT-qPCR. Bone samples were crushed in liquid nitrogen, and the total RNA was isolated with TRIzol® Reagent (Life Technologies). RNA purity (Abs 260/280nm ~2.0) and concentration were determined by L-Quant (Loccus Biotechnologia). Deoxyribonuclease I (Sigma-Aldrich) was used to prevent genomic DNA contamination. The cDNA was synthesized with ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega) from one µg of the total RNA. Quantitative PCR was performed using SYBR® Green I (Invitrogen) to detect double-strand cDNA synthesis on the 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems). The PCR cycling conditions were: an initial polymerase activation step for 5 min at 95 °C, 40 cycles of 15 s at 95 °C for denaturation, 35 s at 60 °C for annealing and 15 s at 72 °C for elongation. A melting-curve analysis was included, and fluorescence was measured from 60 to 99 °C to confirm the specificity of primers, and the absence of primer dimer formation. The real-time assays were carried out in quadruplicate and a reverse transcriptase negative control was included in all protocols. *Hprt1* was used as a reference gene for normalization. The sequences of reverse and forward primers are provided in Table 1. The efficiency per sample was calculated using LinRegPCR 2016.1 Software (<http://LinRegPCR.nl>). GeNorm 3.5 Software (<http://medgen.ugent.be/genorm/>) was used to analyze the stability of the reference genes and the optimal number of reference genes. Relative mRNA expression levels were determined using the  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  method (Bustin et al., 2013).

### *Behavioral assessment*

The spontaneous locomotor activity in the different experimental groups was assessed by an automatic apparatus, consisting of an acrylic box (46 x 46 x 36 cm) equipped with infrared sensors (Insight, Ribeirão Preto, Brazil). An adaptation period of 30 min was allowed before the testing sessions. The ambulatory movement, the travelled distance (mm), the speed (mm/s) and the rearing numbers were evaluated in a 6-min session, consisting of 1 min for adaptation plus 5 min of observation. The arena was cleaned with alcohol 30° after each session, as recommended by the manufacturer.

### *Statistical analysis*

Data are expressed as the mean  $\pm$  the standard error mean of 4-12 animals per group, depending on the experimental protocol. Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni multiple comparison test. *P* values less than 0.05 were considered as significant. The experimental N was indicated in each legend to figure. GraphPad Prism® software version 5.01 (San Diego, USA) was used for statistical analysis and for creation of graphs.

## Results

### *Body weight after ovariectomy, STZ induction and treatments*

After 21 days, OVX animals presented a superior body weight gain, when compared to sham-operated mice. At this moment, the mice were not diabetic and they had not received any treatment (Figure 1-A). On day 21, the animals received the first STZ injection for T1D induction. After 5 days (on day 26), sham-operated and OVX-T1D animals displayed a reduced body weight gain, when compared to control animals. Remarkably, OVX-T1D mice had a more pronounced body weight loss than sham-operated T1D animals (Figure 1-B). The final absolute body weight (on day 50) did not reveal any significant difference among the experimental groups. In spite of that, all OVX mice showed a trend toward a higher body weight, whereas STZ-T1D mice were generally leaner (Figure 1-C).

### *Glycemic levels and uterus weight*

To confirm the T1D induction, the blood glucose was measured. Sham-operated and OVX-T1D animals exhibited hyperglycemia (>250 mg/dl), confirming the development of diabetes. The insulin therapy ameliorated the glycemic levels of sham-operated T1D and OVX-T1D mice. The combined scheme (vitamin D3 + insulin + estradiol) improved hyperglycemia in OVX-T1D, similarly to the insulin treatment alone. Non-diabetic animals treated with insulin presented slight hypoglycemia, when compared to control mice (Figure 2-A). As expected, ovariectomy reduced the uterus weight of the animals, when compared to sham-operated mice, confirming the induction of menopause. The estradiol replacement reversed the uterus weight in non-diabetic OVX and OVX-T1D animals. However, this parameter was significant solely in the OVX-T1D group (Figure 2-B).

### *Serum alkaline phosphatase and calcium levels*

Next, we evaluated the serum levels of two markers of bone turnover, namely alkaline phosphatase and calcium. OVX led to a slight reduction of alkaline phosphatase, an effect that was partially reversed by estradiol replacement. The levels of alkaline phosphatase were higher in OVX-TD1 animals, and this parameter was significantly reduced by insulin therapy (Figure 3-A). There was no variation of the calcium levels among the experimental groups (Figure 3-B).

### *Bone regeneration analysis*

The representative images and the semi-quantitative analysis of H&E-stained sections are depicted in the Figure 4-A and 4-B, respectively. A similar reduction in the percentage of newly formed bone areas was observed in sham-operated T1D, non-diabetic OVX, and OVX-T1D mice, when compared with sham-operated non-diabetic controls. The treatment with vitamin D3, insulin or the combination of both agents with estradiol significantly restored the bone remodeling in sham-operated T1D animals. A general, but not significant improvement of bone healing was seen non-diabetic OVX mice, for all the treatment groups. The improvement of bone regeneration was slightly superior in the groups that received estradiol alone or in combination with vitamin D3 and insulin. The impaired bone healing in OVX-T1D animals was improved by all the tested treatments, with a significant effect for vitamin D3 (Figure 4-B).

The analysis of trichrome Masson's-stained slides revealed reduced collagen contents in the experimental models of menopause and/or T1D, as indicated by representative images (Figure 5-A) and semi-quantitative analysis of blue-colored regions within the bone defect (Figure 5-B). All the treatment protocols, except estradiol alone, rescued the collagen contents in sham-operated T1D mice. OVX-related decrease of collagen-rich regions was significantly restored by estradiol replacement, with partial effects for vitamin D3, dosed alone or in a



combination scheme. In OVX-T1D mice, only the association of vitamin D3 plus insulin and estradiol triggered a significant restoring of the collagen contents (Figure 5-B).

The quantitative evaluation of osseous healing by micro-CT showed a significant decline of BV/TV values in sham-operated T1D, non-diabetic OVX, and OVX-T1D mice. The combination of vitamin D3, insulin, and estradiol was able to reestablish the BV/TV values in animals with T1D and or menopause, with partial effects for the isolated treatments (Figure 7-A). The analysis of Tb.Th did not show marked changes, except by a reduction in the OVX-T1D group treated with insulin (not statistically significant) (Figure 7-B). The Tb.Sp was significantly increased in non-diabetic OVX animals, when compared to the respective sham-operated group. The OVX-elicited increase in Tb.Sp was significantly prevented by all the treatments, except by insulin therapy alone (Figure 7-C). Representative images obtained from micro-CT scanning for the 20 experimental groups are provided in Figure 6.

#### *Runx2, Osterix and IGF-1 mRNA bone expression*

Insulin-treated sham-operated T1D animals displayed a significant increase in runx2 mRNA levels (Figure 8-A). Conversely, osterix mRNA was upregulated in non-diabetic OVX mice, a parameter that was significantly reversed by insulin administration (Figure 8-B). The expression of IGF-1 mRNA was generally increased in all disease groups, with a significant difference in the sham-operated T1D group. The insulin therapy, given alone or in a combination scheme, was able to reverse the IGF-1 overexpression in sham-operated diabetic mice (Figure 8-C).

#### *Behavioral parameters*

The influence of T1D or menopause induction, plus the creation of a femur defect was assessed in a series of locomotor parameters, such as ambulatory movement (Figure 9-A), speed

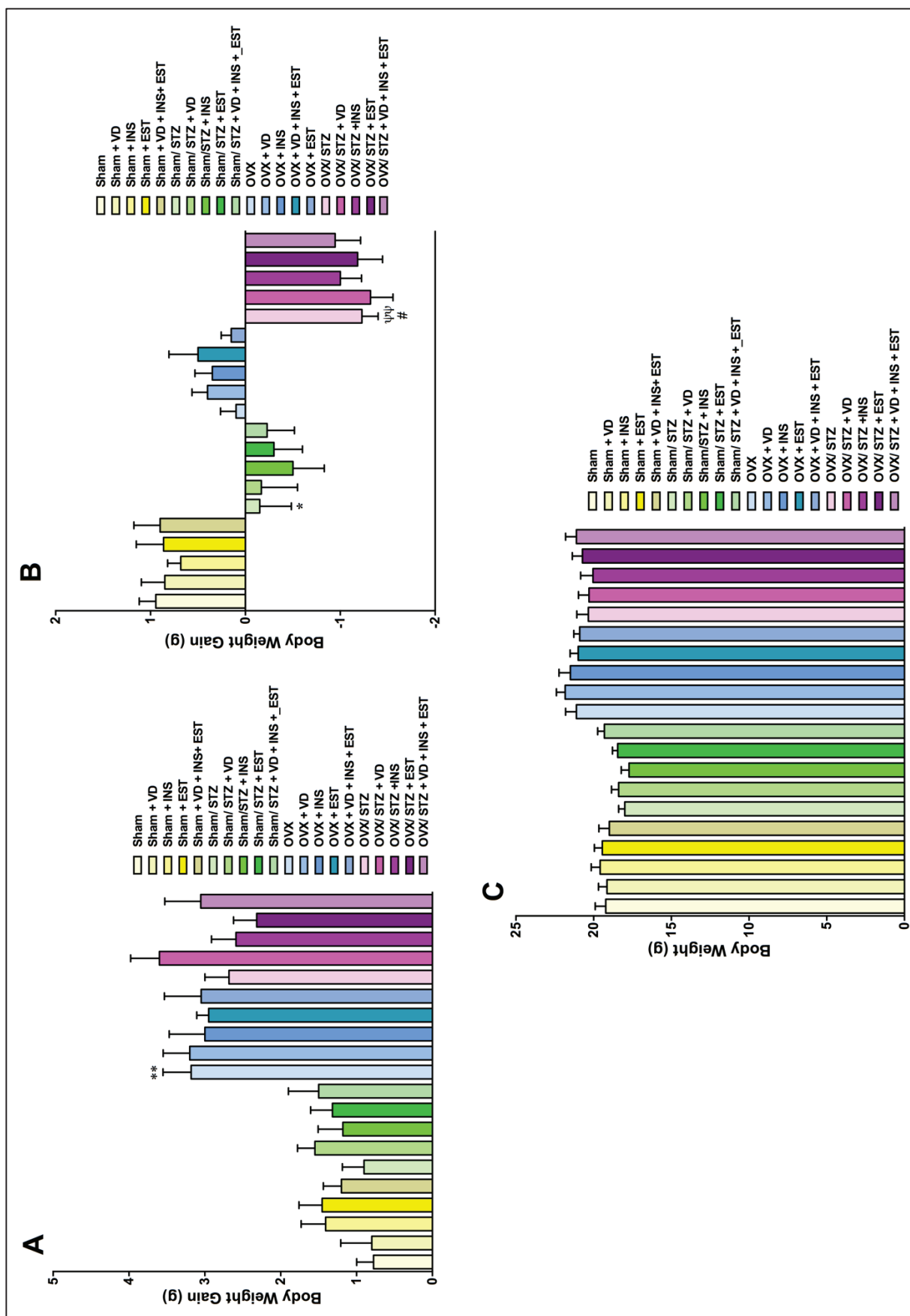
(Figure 9-B), travelled distance (Figure 9-C) and rearing numbers (Figure 9-D). There were no marked changes of the analyzed parameters among the experimental groups, except by a significant reduction in the rearing activity in the sham-operated T1D mice. The insulin therapy slightly reduced all the evaluated locomotors parameters, regardless of the experimental group (Figure 9- A to D).

**REFERENCES**

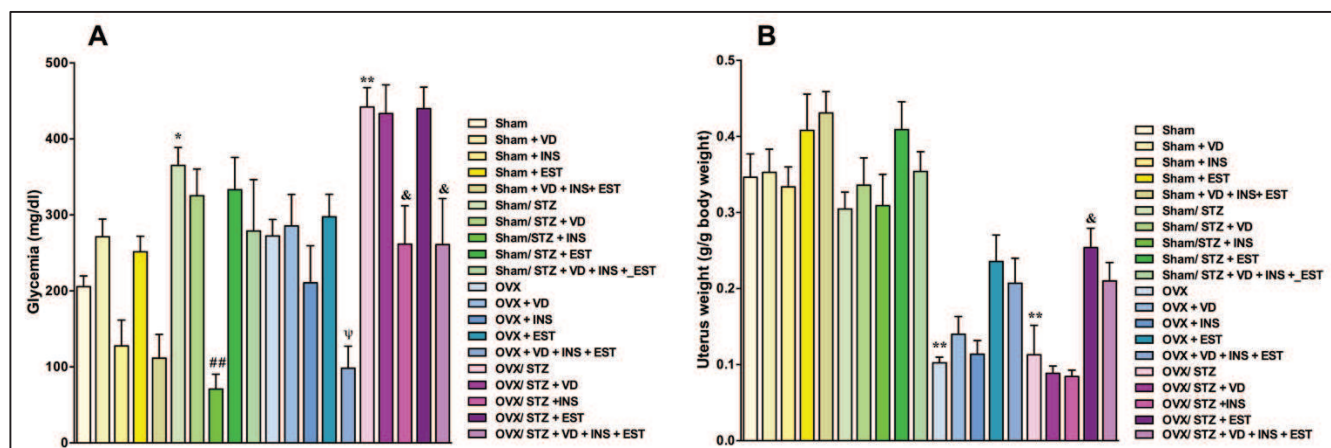
- Baba H, Kurano M, Nishida T, Hatta H, Hokao R, Tsuneyama K. Facilitatory effect of insulin treatment on hepatocellular carcinoma development in diabetes. *BMC Res Notes*. 2017 Sep 13;10(1):478.
- Bekku N, Yoshimura H. Animal model of menopausal depressive-like state in female mice: prolongation of immobility time in the forced swimming test following ovariectomy. *Psychopharmacology* 2005; 183(3):300-7.
- Bustin SA, Benes V, Garson J, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley G, Wittwer CT, Schjorling P, Day PJ, Abreu M, Aguado B, Beaulieu JF, Beckers A, Bogaert S, Browne JA, Carrasco-Ramiro F, Ceelen L, Ciborowski K, Cornillie P, Coulon S, Cuypers A, De Brouwer S, De Ceuninck L, De Craene J, De Naeyer H, De Spiegelaere W, Deckers K, Dheedene A, Durinck K, Ferreira-Teixeira M, Fieuw A, Gallup JM, Gonzalo-Flores S, Goossens K, Heindryckx F, Herring E, Hoenicka H, Icardi L, Jaggi R, Javad F, Karampelias M, Kibenge F, Kibenge M, Kumps C, Lambertz I, Lammens T, Markey A, Messiaen P, Mets E, Morais S, Mudarra-Rubio A, Nakiwala J, Nelis H, Olsvik PA, Pérez-Novo C, Plusquin M, Remans T, Rihani A, Rodrigues-Santos P, Rondou P, Sanders R, Schmidt-Bleek K, Skovgaard K, Smeets K, Tabera L, Toegel S, Van Acker T, Van den Broeck W, Van der Meulen J, Van Gele M, Van Peer G, Van Poucke M, Van Roy N, Vergult S, Wauman J, Tshuikina-Wiklander M, Willems E, Zaccara S, Zeka F, Vandesompele J. The need for transparency and good practices in the qPCR literature. *Nat Methods*. 2013; 10(11):1063-7.
- Chen H, Zhu H, Zhang K, Chen K, Yang H. Estrogen deficiency accelerates lumbar facet joints arthritis. *Sci Rep* 2017; 7(1):1379.
- Cignachi NP, Pesquero JB, Oliveira RB, Etges A, Campos MM. Kinin B1 Receptor Deletion Affects Bone Healing in Type 1 Diabetic Mice. *J Cell Physiol*. 2015 Dec;230(12):3019-28.

- Elmarakby AA, Ibrahim AS, Faulkner J, Mozaffari MS, Liou GI, Abdelsayed R. Tyrosine kinase inhibitor, genistein, reduces renal inflammation and injury in streptozotocin-induced diabetic mice. *Vascul Pharmacol*. 2011 Nov-Dec;55(5-6):149-56.
- Fukuharu M, Sato J, Ohsawa I, Oshida Y, Nagasaki M, Nakai N, Shimomura Y, Hattori M, Tokudome S, Sato Y. Additive effects of estrogen deficiency and diabetes on bone mineral density in rats. *Diabetes Res Clin Pract*. 2000; 48(1):1-8.
- Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012 Apr;20(4):256-60.
- Mao L, Tamura Y, Kawao N, Okada K, Yano M, Okumoto K, Kaji H. Influence of diabetic state and vitamin D deficiency on bone repair in female mice. *Bone* 2014;61:102-8.
- Mao L, Tamura Y, Kawao N, Okada K, Yano M, Okumoto K, Kaji H. Influence of diabetic state and vitamin D deficiency on bone repair in female mice. *Bone*. 2014 Apr;61:102-8.
- Mauvais-Jarvis F. Are estrogens promoting immune modulation and islet protection in type 1 diabetes? *J Diabetes Complications*. 2017; 31(11):1563-1564.
- National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8th edition. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/> doi: 10.17226/12910.
- Pernot F, Dorandeu F, Beaup C, Peinnequin A. Selection of reference genes for real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction in hippocampal structure in a murine model of temporal lobe epilepsy with focal seizures. *J Neurosci Res*. 2010;88(5):1000-8

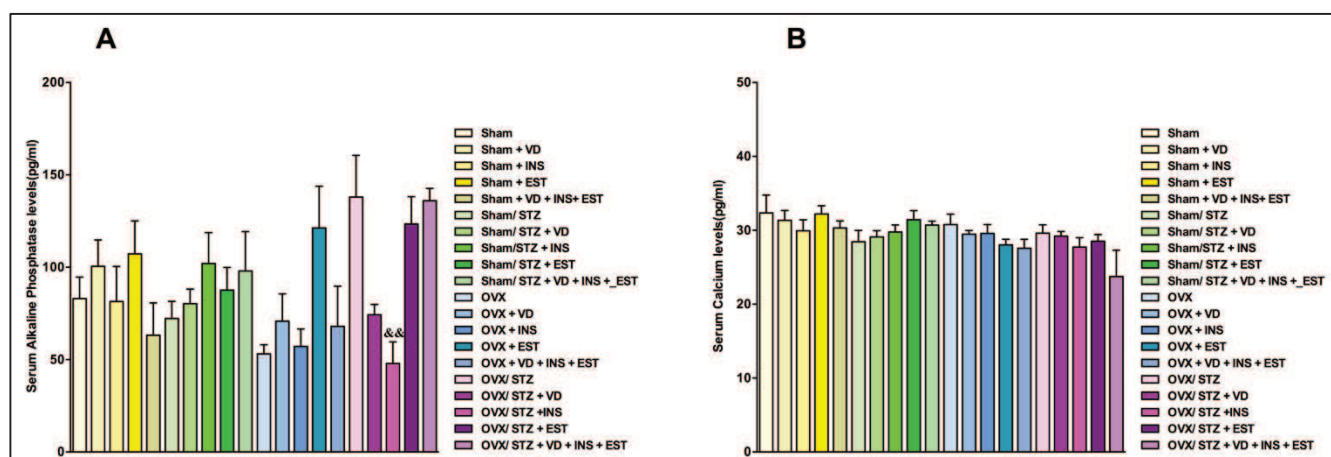
- Rachoń D, Myśliwska J, Suchecka-Rachoń K, Semetkowska-Jurkiewicz B, Zorena K, Łysiak-Szydłowska W. Serum interleukin-6 levels and bone mineral density at the femoral neck in post-menopausal women with Type 1 diabetes. *Diabet Med.* 2003; 20(6):475-80.
- Ravn P, Hetland ML, Overgaard K, Christiansen C. Premenopausal and postmenopausal changes in bone mineral density of the proximal femur measured by dual-energy X-ray absorptiometry. *J Bone Miner Res* 1994; 9:1975-1980.
- Vidal-Gómez X, Novella S, Pérez-Monzó I, Garabito M, Dantas AP, Segarra G, Hermenegildo C, Medina P. Decreased bioavailability of nitric oxide in aorta from ovariectomized senescent mice. Role of cyclooxygenase. *Exp Gerontol* 2016; 76:1-8.
- Wang Y, He D, Ni C, Zhou H, Wu S, Xue Z, Zhou Z. Vitamin D induces autophagy of pancreatic  $\beta$ -cells and enhances insulin secretion. *Mol Med Rep.* 2016 Sep;14(3):2644-50.
- Yarde F, van der Schouw YT, de Valk HW, Franx A, Eijkemans MJ, Spiering W, Broekmans FJ; OVADIA study group. Age at menopause in women with type 1 diabetes mellitus: the OVADIA study. *Hum Reprod.* 2015; 30(2):441-446.



**Figure 1:** Body weight at three different time-points in the mouse model of menopause (OVX) plus T1D (STZ-induced) induction. (A) Body weight gain in sham-operated versus OVX animals on day 21. At this moment, mice were not diabetic and they had not received any treatment. (B) Body weight gain after T1D induction. (C) Final body weight after the treatment with vitamin D3, insulin and/or estradiol, on the day of euthanasia. Each column represents the mean of 9-11 animals per group and the vertical lines indicated the standard error mean. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  in comparison to sham-operated animals; # $p < 0.05$  and ## $p < 0.01$  in comparison to T1D sham-operated animals;  $\Psi\Psi p < 0.01$  in comparison to OVX non-diabetic females.

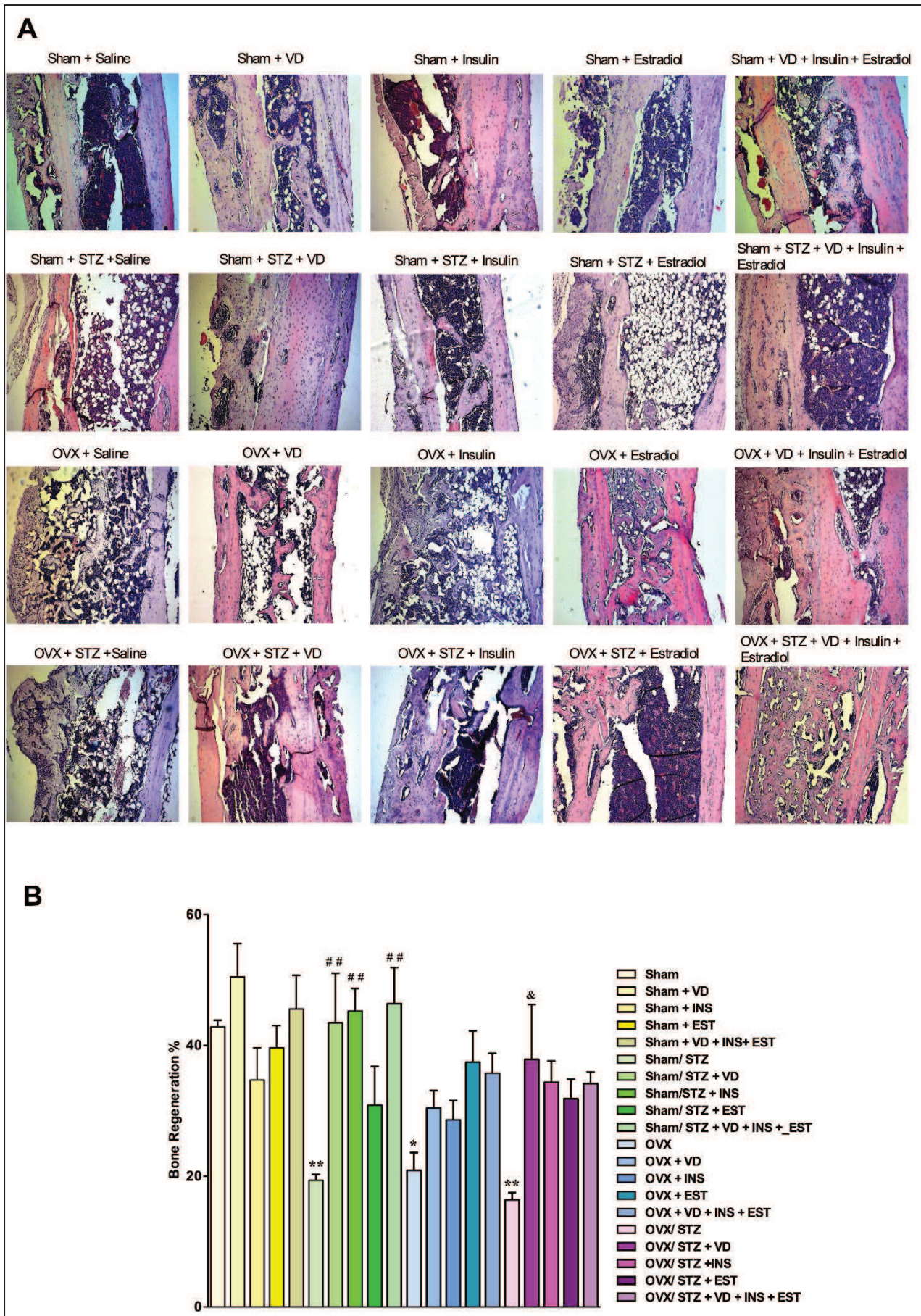


**Figure 2:** Glycemic levels in sham-operated T1D and OVX-T1D mice treated with vehicle, vitamin D3 (VD), insulin and/or estradiol (A). Reduced uterus weight confirming menopause development after OVX (B). Each column represents the mean of 9-11 animals per group and the vertical lines indicated the standard error mean. \*\* $p < 0.01$  in comparison to sham-operated animals; ## $p < 0.01$  in comparison to T1D sham-operated animals; & $p < 0.05$  in comparison to OVX T1D mice.

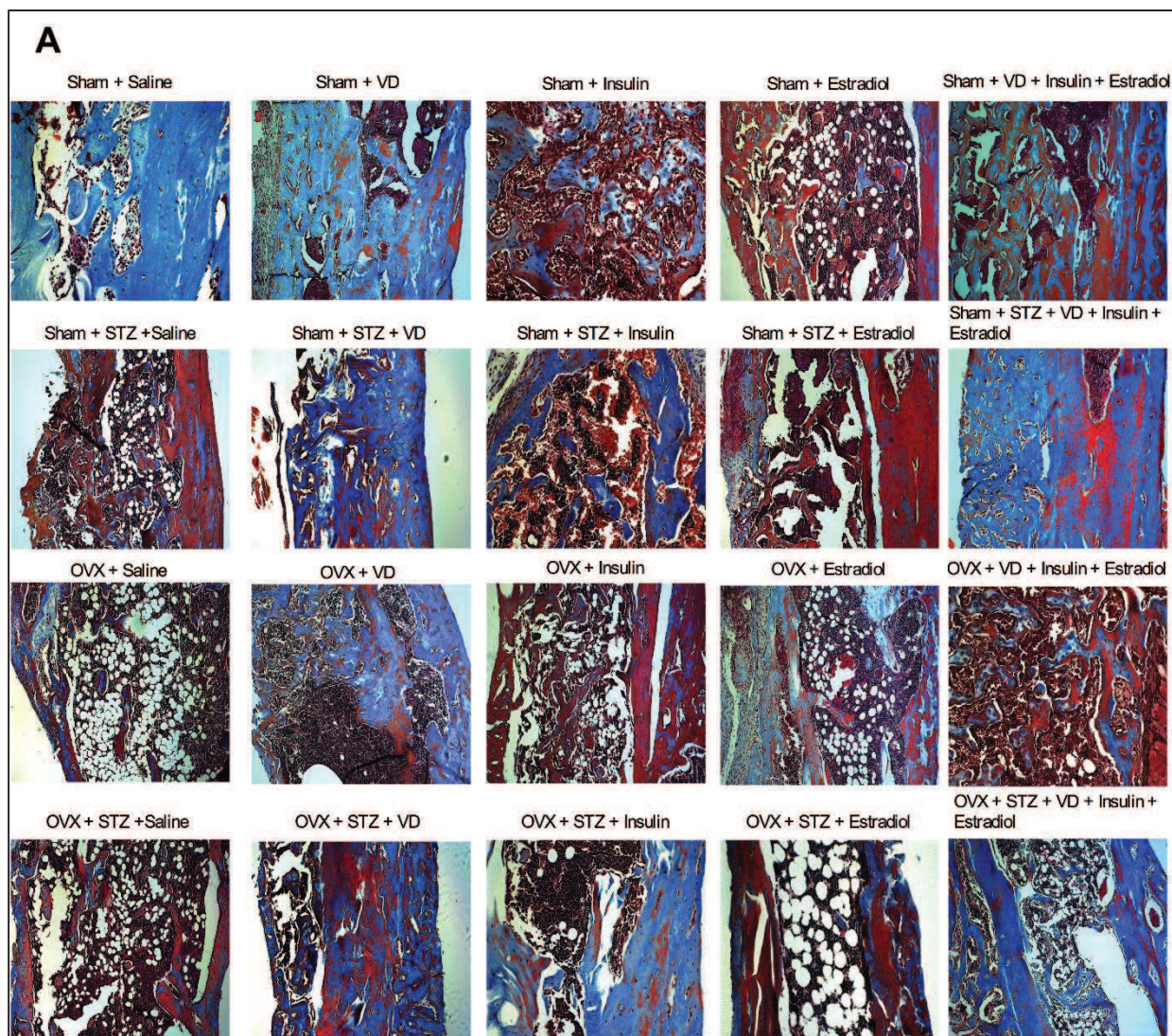


**Figure 3:** Alkaline phosphatase (A) and calcium (B) serum levels. Each column represents the mean of 4-6 animals per group and the vertical lines indicated the standard error mean. && $p < 0.01$  in comparison to OVX T1D mice.

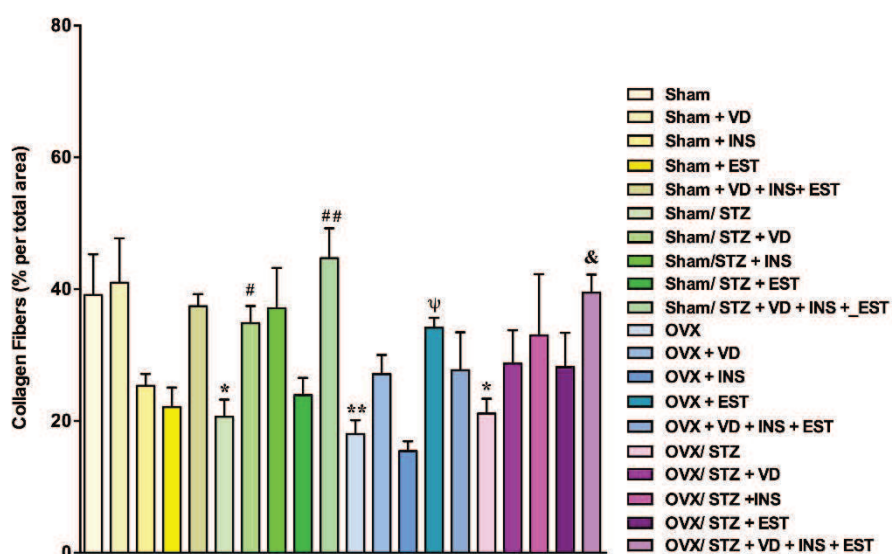




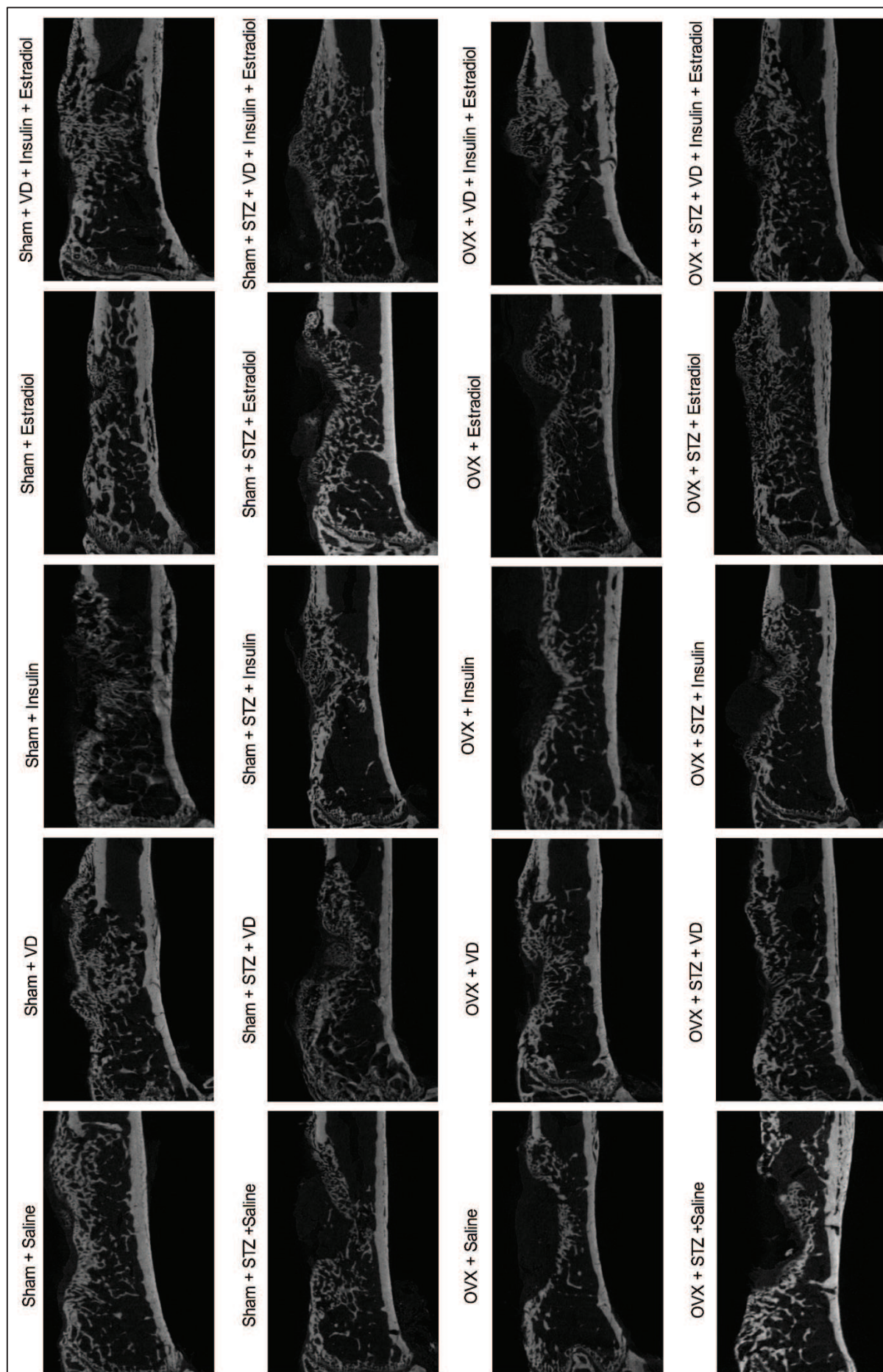
**Figure 4:** H&E sections showing the femur bone healing in the different experimental groups. (A) Representative images. (B) Semi-quantitative analysis of bone regeneration areas. Each column represents the mean of four animals per group and the vertical lines indicated the standard error mean. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  in comparison to Sham animals; ### $p < 0.01$  in comparison to T1D Sham animals; & $p < 0.05$  in comparison to OVX mice.



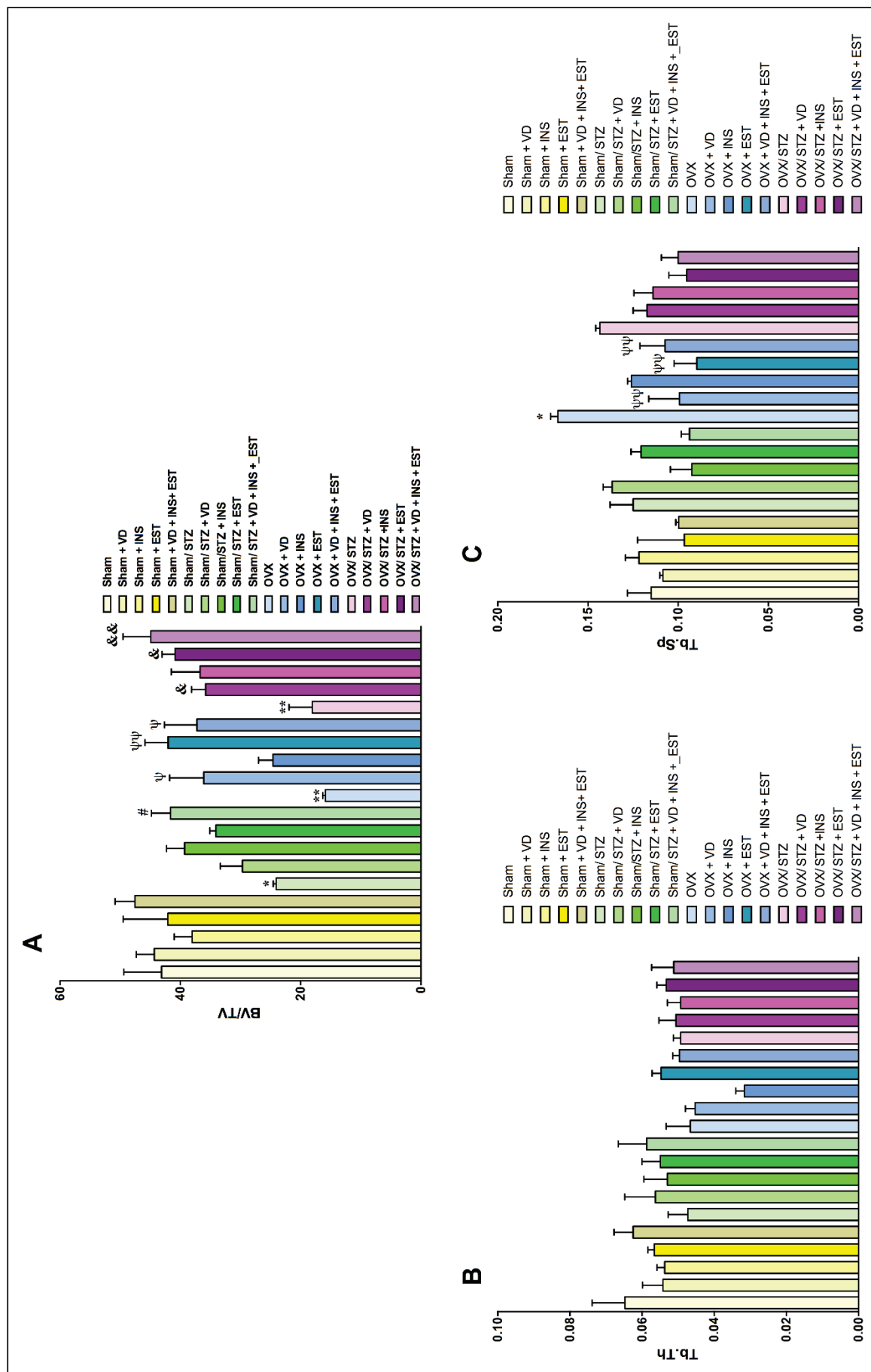
**B**



**Figure 5:** Masson`s trichrome-stained sections showing the areas corresponding to the bone defect. (A) Representative images. (B) Semi-quantitative analysis of blue-stained areas. Each column represents the mean of four animals per group and the vertical lines indicated the standard error mean. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  in comparison to Sham animals; # $p < 0.05$  and ## $p < 0.01$  in comparison to T1D Sham animals; & $p < 0.05$  in comparison to OVX mice.

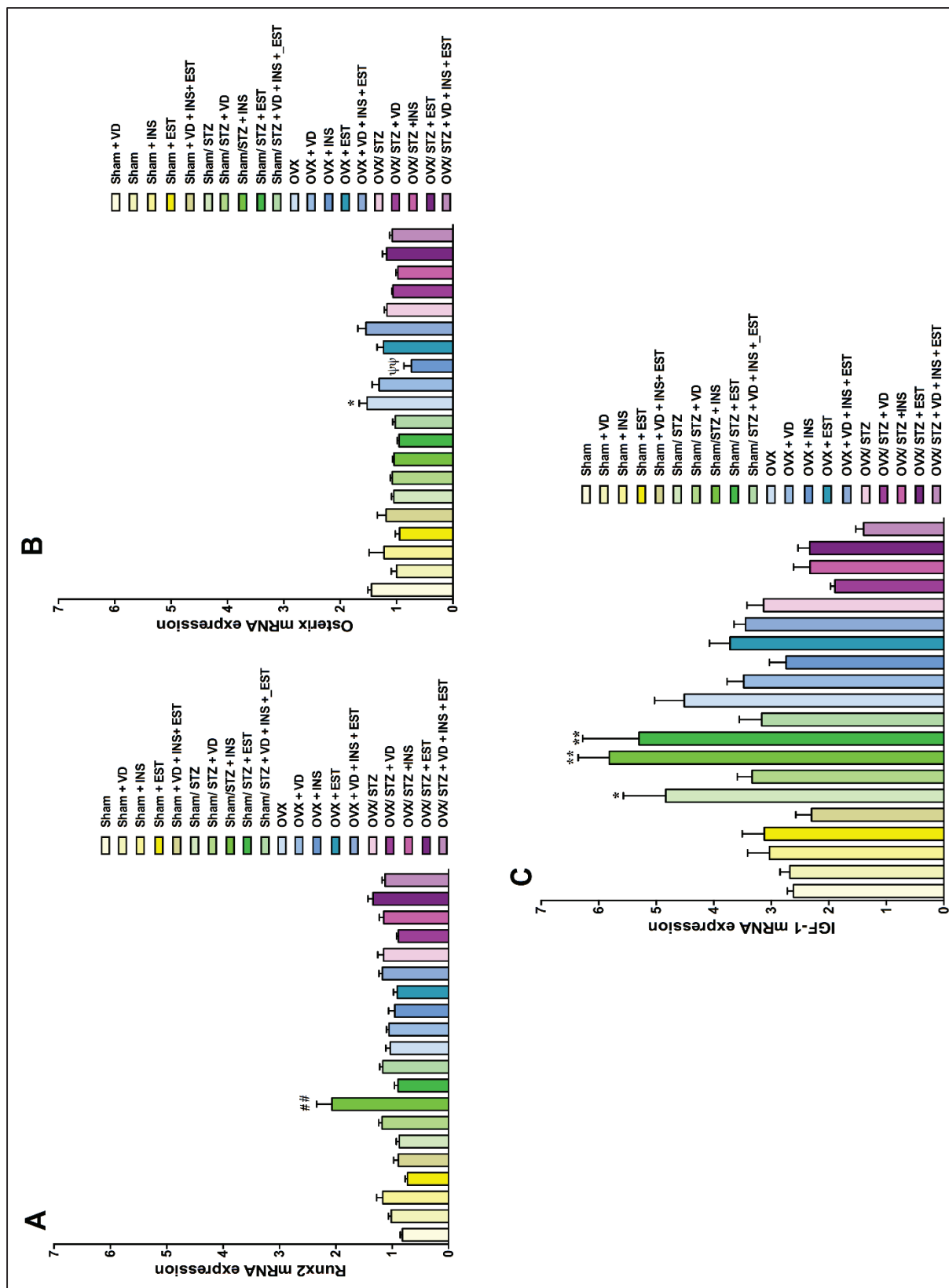


**Figure 6:** Representative images of femur bone healing in different experimental groups according to micro-CT evaluation.

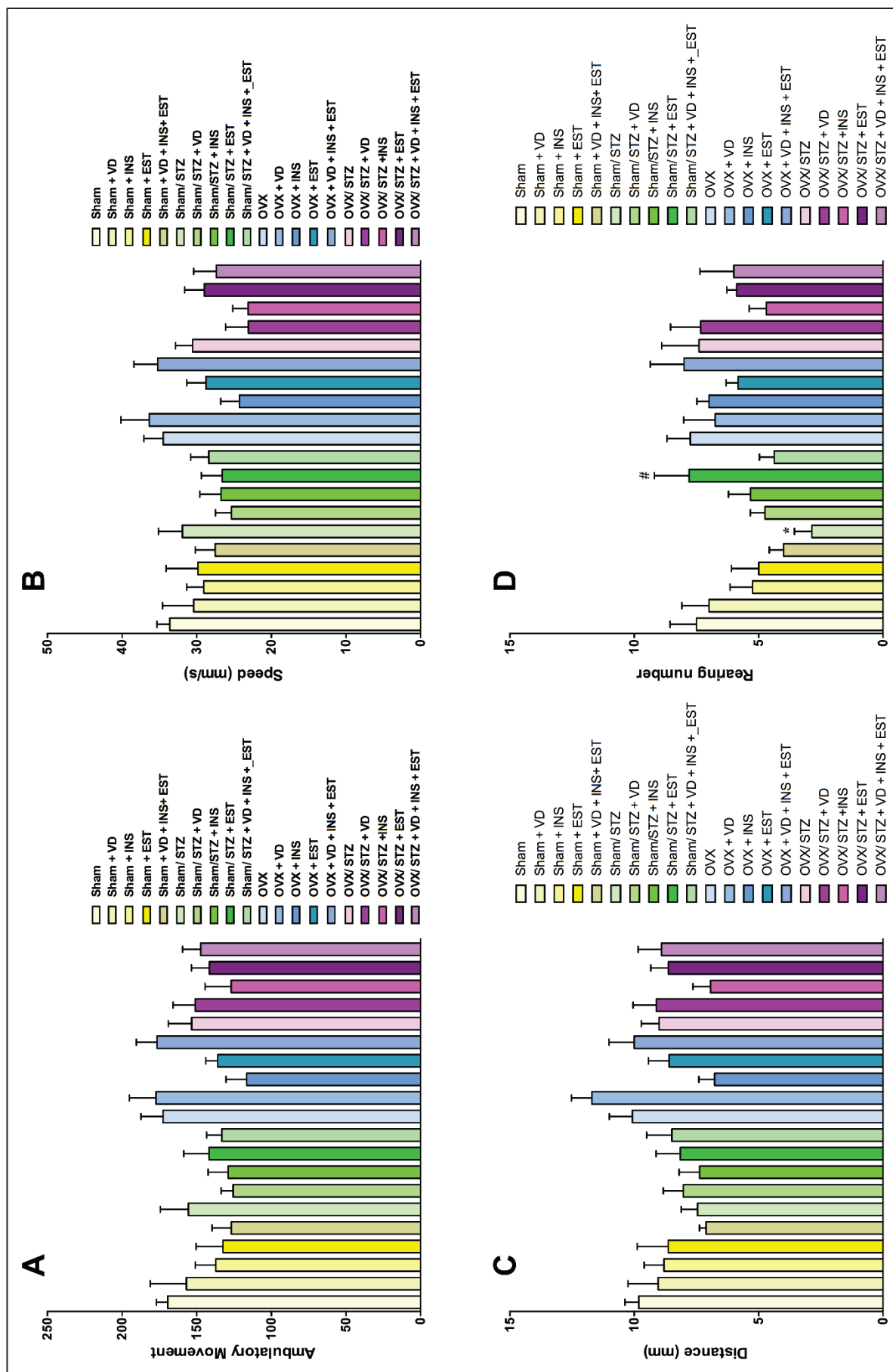


**Figure 7:** Quantitative micro-CT evaluation of femur bone regeneration in the mouse model of menopause (OVX) plus T1D (STZ-induced) induction. Percentage of bone volume (BV/TV) (A). Trabecular thickness (Tb.Th) (B), and trabecular separation parameters (Tb.Sp) (C). Each column represents the mean of 4-5 animals per group and the vertical lines indicate the standard error mean. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  in comparison to sham-operated animals; # $p < 0.05$  in comparison to sham-operated T1D animals;  $\Psi p < 0.05$ ;  $\Psi\Psi p < 0.01$  in comparison to non-diabetic OVX animals.  $\& p < 0.05$  and  $\&\& p < 0.01$  in comparison to OVX-T1D mice.





**Figure 8:** Real time PCR for runx2 (A), osterix (B) and IGF-1 in the different experimental groups. The area corresponding to the bone defect was collected for the analysis. Each column represents the mean of four animals per group and the vertical lines indicate the standard error mean. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  in comparison to sham-operated animals; ## $p < 0.01$  in comparison to sham-operated T1D animals; ΨΨ $p < 0.01$  in comparison to non-diabetic OVX animals. && $p < 0.01$  in comparison to OVX-T1D mice.



**Figure 9:** Ambulatory movement (A), speed (B), travelled distance (C) and rearing number (D) in mouse model of menopause (OVX) plus T1D (STZ-induced) induction. Each column represents the mean of 7-10 animals per group and the vertical lines indicate the standard error mean. \* $p < 0.05$  in comparison to sham-operated animals; # $p < 0.01$  in comparison to sham-operated T1D animals.

**Table 1.** Sequences of reverse and forward primers.

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>Hprt1</i>	5'- CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC-3'	5'- GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC-3'
<i>Runx2</i>	5'-AAATGCCTCCGCTGTTATGAA-3'	5'-GCTCCGGCCCACAAATCT-3'
<i>Osterix</i>	5'-AGCGACCACTTGAGCAAACAT-3'	5'-GCGGCTGATTGGCTTCTT-3'
<i>IGF-1</i>	5'-CAAGCCCACAGGCTATGGC-3'	5'-TCTGAGTCTTGGGCATGTCAG-3'

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O DM é uma doença metabólica, com grande prevalência na população mundial. Infelizmente, apesar dos avanços nas pesquisas acerca de sua patogênese, o DM ainda não tem cura. Os dados são alarmantes: uma pessoa morre a cada 6 segundos no mundo, em decorrência das complicações causadas pela hiperglicemia (International Diabetes Federation, 2017). Tanto o T1D, quanto o T2D, apresentam grandes repercussões na Odontologia, seja modulando a progressão da periodontite, interferindo no curso de tratamentos ortodônticos, bem como, influenciando a cicatrização e a regeneração óssea na área de cirurgia/implantodontia. Apesar de não haver enfoque adequado na maior parte das escolas de Odontologia, é imperativo que o cirurgião-dentista reconheça as doenças sistêmicas dos pacientes e seus impactos sobre a cavidade bucal, para assim, manejá-los corretamente.

O tratamento para o T1D é a terapia com insulina. Os pacientes, através de um esquema personalizado, são orientados a realizar a aplicação do hormônio, considerando os índices glicêmicos. Sendo a insulina essencial para o manejo do T1D, o presente trabalho analisou a regeneração óssea e os benefícios dessa terapia. Também foi considerada a possibilidade de que o tratamento usual com insulina pudesse ser associado com a suplementação com vitamina D3, largamente empregada nos dias atuais. Ainda, sabendo-se que muitas respostas diferem entre homens e mulheres, nos questionamos se haveria diferenças na regeneração óssea em camundongos machos e fêmeas, diante dos tratamentos propostos. A maioria dos trabalhos, no contexto acima empregado, avalia o desfecho do T1D no metabolismo ósseo, sem utilização de defeitos ósseos, o que representa uma novidade no presente trabalho de tese.

No presente estudo, como era esperado, a indução de T1D levou à hiperglicemia, sem diferenças significativas entre machos e fêmeas. Observou-se um atraso na regeneração óssea nos animais sem tratamento, de forma muito semelhante, sem distinção de sexo, provavelmente pela modulação do processo de formação óssea e não dos mecanismos de reabsorção.

Anteriormente, nosso grupo de pesquisa conduziu um estudo experimental em camundongos com T1D, não encontrando alterações significativas de fatores relacionados com a atividade osteoclástica (RANK, RANKL e OPG), em comparação aos animais controle. Entretanto, nesse estudo, observou-se um aumento da apoptose de osteoblastos após a indução de T1D (Cignachi et al., 2015).

A suplementação com vitamina D3 e a terapia com insulina, quando administradas de forma isolada, melhoraram a cicatrização óssea nos machos e fêmeas. A insulina apresentou efeitos mais pronunciados em machos. Curiosamente, ao contrário do que era esperado, a combinação do tratamento da vitamina D3 com insulina, não mostrou efeitos adicionais sobre a regeneração óssea. Não houve diferenças na expressão de *runx2* e *osterix*, dois fatores de transcrição relacionados à diferenciação de osteoblastos, nas fêmeas e machos com T1D. Por outro lado, o tratamento com vitamina D3 aumentou a expressão do RNAm para *runx2* e *osterix* nos machos, indicando uma diferença relacionada ao sexo. Outra alteração pertinente ao sexo foi observada na expressão dos níveis de IGF-1: fêmeas com T1D que receberam a suplementação com vitamina D3, sozinha ou combinada à insulina, apresentaram um aumento de IGF-1, o que não foi visto nos machos. É importante que trabalhos experimentais sejam realizados com animais de ambos os sexos, para que assim, os desfechos de doenças e/ou tratamentos sejam avaliados de forma mais específica, considerando as particularidades referentes a cada condição metabólica e hormonal.

Nos últimos anos, muito tem se discutido sobre a menopausa e as suas consequências. Um ponto questionável diz respeito à reposição hormonal. Os benefícios são maiores que os prejuízos? E no caso de situações distintas que ocorrem simultaneamente, como as mulheres no climatério com T1D? As repercussões negativas no tecido ósseo seriam potencializadas, visto que as duas doenças modulam o *turnover* ósseo, embora de modos diferentes. A literatura tem questionado se o estrogênio poderia apresentar um papel protetor para o desenvolvimento

de T1D durante a adolescência, ou ainda, se o T1D pode antecipar o climatério. Nesse contexto, o objetivo da segunda parte desse trabalho foi avaliar a regeneração óssea em um modelo de osteoporose relacionada à menopausa (OVX) e T1D, além de analisar o desfecho de diferentes tratamentos como: suplementação com vitamina D3, terapia com insulina e/ou reposição com estradiol. Dessa forma, poderíamos esclarecer eventuais diferenças nos resultados da primeira parte do estudo.

A cirurgia de ovariectomia levou a um aumento do peso corporal, confirmando um dos eventos frequentes observados na menopausa. A indução do T1D por STZ foi realizada após 21 dias, para que houvesse o desenvolvimento de osteoporose (Song et al., 2017), permitindo avaliar os prejuízos adicionais no tecido ósseo. A associação da menopausa com o T1D causou um atraso ainda maior na regeneração óssea, o que foi confirmado pela análise histológica. Os tratamentos, exceto a terapia com insulina, aumentaram o volume ósseo nos grupos não diabéticos e diabéticos OVX, como indicado pela micro-CT. Ademais, a reposição hormonal nos animais OVX parece ser de grande importância para a recuperação óssea, frente a um modelo de regeneração. Apesar de haver diferenças sutis na expressão de *runx2* e *osterix*, houve uma tendência ao aumento nos níveis de IGF-1 no grupo OVX, o que não foi observado quando o T1D foi induzido após a remoção dos ovários. Diferenças nos níveis séricos de fosfatase alcalina foram detectadas no grupo com menopausa e T1D, em relação a essas condições isoladas, indicando peculiaridades relacionadas com a osteopenia diante de comorbidades.

Foi realizada uma análise comportamental, através do monitor de atividades, a fim de avaliar se o defeito ósseo, associado com a menopausa e/ou T1D poderia comprometer a atividade locomotora dos animais. Não houve diferenças entre os grupos experimentais, a não ser por uma leve diminuição nos grupos tratados com insulina, nos parâmetros analisados. Outros experimentos estão em andamento para elucidar as possíveis alterações na atividade de

osteoblastos, osteoclastos e osteócitos, avaliando a imunopositividade para osteocalcina, RANKL e esclerostina, respectivamente.

Esse trabalho de pesquisa traz novas evidências sobre a regeneração óssea associada ao T1D e menopausa experimental, em diferentes contextos, em um modelo de defeito não crítico. Até onde sabemos, esse é o primeiro trabalho que avaliou as diferenças relacionadas ao sexo, ao T1D e a associação de vitamina D3 e insulina no modelo de cicatrização óssea. Assim como, é a primeira vez que a menopausa é associada a esse tipo de defeito, com diferentes tipos de tratamento, incluindo a reposição hormonal. Dados gerais sugerem que o número de mulheres na menopausa no final da década de 90 era de aproximadamente 500 milhões, devendo alcançar números superiores a 1 bilhão em 2025. Considerando o aumento gradual da expectativa de vida nas últimas décadas, tornam-se necessários novos estudos sobre as repercussões da menopausa e suas comorbidades. Dentre as alterações a serem consideradas, o diabetes apresenta grande relevância, especialmente em vista dos números alarmantes de indivíduos afetados por essa condição. O estudo da regeneração óssea nessas condições é fundamental, já que o reparo adequado de fraturas ósseas está relacionado com melhor qualidade de vida em mulheres idosas. Em Odontologia, cada vez mais mulheres na menopausa e com diabetes procuram por tratamentos estéticos e de reabilitação com implantes dentários osseointegrados. Essa questão corrobora a necessidade de estudos acerca da regeneração óssea frente a alterações sistêmicas.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

- Amrein K, Amrein S, Drexler C, Dimai HP, Dobnig H, Pfeifer K, Tomaschitz A, Pieber TR, Fahrleitner-Pammer A. Sclerostin and its association with physical activity, age, gender, body composition, and bone mineral content in healthy adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97:148-54.
- Annibali S1, Pranno N, Cristalli MP, La Monaca G, Polimeni A. Survival Analysis of Implant in Patients With Diabetes Mellitus: A Systematic Review. *Implant Dent* 2016; 25:663-74.
- Ardawi MS, Al-Sibiany AM, Bakhsh TM, Rouzi AA, Qari MH. Decreased serum sclerostin levels in patients with primary hyperparathyroidism: a cross-sectional and a longitudinal study. *Osteoporos Int* 2012; 23:1789-97.
- Atkinson MA, Maclaren NK. The pathogenesis of insulin dependent diabetes. *N Engl J Med* 1994; 331:1428-36.
- Baek WY, Lee MA, Jung JW, Kim SY, Akiyama H, de Crombrughe B, Kim JE. Positive regulation of adult bone formation by osteoblast-specific transcription factor osterix. *J Bone Miner Res*. 2009; 24:1055-65.
- Bekku N, Yoshimura H. Animal model of menopausal depressive-like state in female mice: prolongation of immobility time in the forced swimming test following ovariectomy. *Psychopharmacology* 2005; 183:300-7.
- Bilezikjian, L.M. et al. Autocrine/paracrine regulation of pituitary function by activin, inhibin and follistatin. *Mol. Cell Endocrinol* 2004; 225:29–36.
- Bizzarri C, Pitocco D, Napoli N, et al, for the IMDIAB Group. No protective effect of calcitriol on beta-cell function in recent-onset type 1 diabetes: the IMDIAB XIII trial. *Diabetes Care* 2010; 33:1962–63.

- Bord S, Horner A, Hembry RM, Reynolds JJ, Compston JE. Production of collagenase by human osteoblast and osteoclast in vivo. *Bone* 1996; 19:35-40.
- Bortolin RH, Freire Neto FP, Arcaro CA, Bezerra JF, da Silva FS, Ururahy MA, Souza KS, Lima VM, Luchessi AD, Lima FP, Lia Fook MV, da Silva BJ, Almeida MD, Abreu BJ, de Rezende LA, de Rezende AA. Anabolic Effect of Insulin Therapy on the Bone: Osteoprotegerin and Osteocalcin Up-Regulation in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2017; 120:227-234.
- Cappariello A, Maurizi A, Veeriah V, Teti A. The Great Beauty of the osteoclast. *Arch Biochem Biophys* 2014; 15:558:70-8.
- Capulli M, Paone R, and Rucci N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2014; 561:3-12.
- Cignachi NP, Pesquero JP, Oliveira RB, Etges A, Campos MM. Kinin B<sub>1</sub> receptor affects bone healing in type 1 diabetic mice. *J Cell Physiol* 2015; 230:3019-3028.
- Colotta F, Jansson B, Bonelli F. Modulation of inflammatory and immune responses by vitamin D. *J Autoimmun* 2017; 17:30463-30468.
- Cosman, F. et al. Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. *Osteoporos Int* 2014; 25:2359–2381.
- Crane JL, Zhao L, Frye JS, Xian L, Qiu T, Cao X. IGF-1 Signaling is Essential for Differentiation of Mesenchymal Stem Cells for Peak Bone Mass. *Bone Res* 2013; 1:186-194.
- Dimitriou R, Giannoudis PV. Discovery and development of BMPs. *Int J Care Injured* 2005; 36:28-33.
- Dolin N, Olson KE. Bone mineral content and physical activity. *Acta Orthu Scand* 1974; 45:170-176.

- Dong JY, Zhang WG, Chen JJ, Zhang ZL, Han SF, Qin LQ. Vitamin D intake and risk of type 1 diabetes: a meta-analysis of observational studies. *Nutrients* 2013; 5:3551-62.
- ElSayed SA, Bhimji SS. Physiology, Endocrine, Pancreas. [Updated 2017 Oct 17]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2017 Jun-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459261/>
- Emerton KB, Hu B, Woo AA, Sinofsky A, Hernandez C, Majeska RJ, Jepsen KJ, Schaffler MB. Osteocyte apoptosis and control of bone resorption following ovariectomy in mice. *Bone* 2010; 46:577-583.
- ESHRE Capri Workshop Group. Bone fractures after menopause. *Hum Reprod Update* 2010; 16:761-773.
- Ferron M, Hinoi E, Karsenty G, Ducy P. Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:5266-5270.
- Figueiredo, D. M.; Rabelo, F. L. A. Diabetes insipidus: principais aspectos e análise comparativa com diabetes mellitus. *Semina Cienc. Biol. Saúde* 2009; 30:155-162.
- Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri OS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int* 2015; 2015:421746.
- Fujisawa R, Nodasaka Y, Kuboki Y. Further characterization of interaction between bone sialoprotein (BSP) and collagen. *Calcif Tissue Int* 1995; 56:140-144.
- Fukuharu M, Sato J, Ohsawa I, Oshida Y, Nagasaki M, Nakai N, Shimomura Y, Hattori M, Tokudome S, Sato Y. Additive effects of estrogen deficiency and diabetes on bone mineral density in rats. *Diabetes Res Clin Pract.* 2000; 48:1-8.
- Goodman WG, Hori MT. Diminished bone formation in experimental diabetes. Relationship to osteoid maturation and mineralization. *Diabetes* 1984; 33:825-831.

- Grant CW, Duclos SK, Moran-Paul CM, Yahalom B, Tirabassi RS, Arreaza-Rubin G, Spain LM, Guberski DL. Development of standardized insulin treatment protocols for spontaneous rodent models of type 1 diabetes. *Comp Med* 2012; 62:381-390.
- Hashiguchi C, Kawamoto S, Kasai T, Nishi Y, Nagaoka E. Influence of an antidiabetic drug on biomechanical and histological parameters around implants in type 2 diabetic rats. *Implant Dent* 2014; 23:264-269.
- Herrero P, Bondia J, Oliver N, Georgiou P. A coordinated control strategy for insulin and glucagon delivery in type 1 diabetes. *Comput Methods Biomech Biomed Engin* 2017; 20:1474-1482.
- Imagawa A, Hanafusa T, Miyagawa J-I, Matsuzawa Y, for the Osaka IDDM Study Group. A novel subtype of type 1 diabetes mellitus characterized by a rapid onset and an absence of diabetes-related antibodies. *N Engl J Med* 2000; 342:301-307.
- International Diabetes Federation Atlas. 8th Edition 2017. <https://www.idf.org>.
- Ishikawa M, Yamada Y. The Role of Pannexin 3 in Bone Biology. *J Dent Res* 2017; 96: 372-379.
- Jiao H, Xiao E, Graves DT. Diabetes and Its Effect on Bone and Fracture Healing. *Curr Osteoporos Rep* 2015; 13:327-335.
- Junqueira LC, Carneiro J. Tecido ósseo. In: Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2004; p.111-128.
- Kalaitzoglou E, Popescu I, Bunn RC, Fowlkes JL, Thrailkill KM. Effects of Type 1 Diabetes on Osteoblasts, Osteocytes, and Osteoclasts. *Curr Osteoporos Rep* 2016; 14:310-319.
- Khalil N, Sutton-Tyrrell K, Strotmeyer ES, Greendale GA, Vuga M, Selzer F, Crandall CJ, Cauley JA. Menopausal bone changes and incident fractures in diabetic women: a cohort study. *Osteoporos Int*. 2011; 22:1367-1376.

- Kawai M, Rosen CJ. The insulin-like growth factor system in bone: basic and clinical implications. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2012; 41:323-333.
- Kerckhofs, M. Durand, R. Vangoitsenhoven, C. Marin B. Van der Schueren, G. Carmeliet, F. P. Luyten, L. Geris & K. Vandamme. Changes in bone macro- and microstructure in diabetic obese mice revealed by high resolution microfocus X-ray computed tomography. *Scientific Reports* 2016; 6:35517.
- Kikuta J, Nevius E, Ishii M, Pereira J. Trafficking of osteoclasto precursors in *Osteoimmunology* 2010.
- Klein SL, Schiebinger L, Stefanick ML, Cahill L, Danska J, de Vries GJ, Kibbe MR, McCarthy MM, Mogil JS, Woodruff TK, Zucker I. Opinion: Sex inclusion in basic research drives discovery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112:5257-5258.
- Komori T. Animal models for osteoporosis. *Eur J Pharmacol* 2015; 15:759:287-94.
- Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem.* 2006; 99:1233-1239.
- Krishnan V, Bryant HU, MacDougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest* 2006; 116:1202–1209.
- Kumar S, Mahendra G, Ponnazhagan S. Determination of osteoprogenitor-specific promoter activity in mouse mesenchymal stem cells by recombinant adeno-associated virus transduction. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1731:95-103.
- Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 2007; 130:456-469.
- Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 2008; 51:216-226.
- Llips P. Vitamin D, physiology. *Prog Biophys Mol Bio* 2006; 92:4-8.

- Long MW, Robinson JA, Ashcraft EA, Mann KG. Regulation of human bone marrow-derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors. *J Clin Invest* 1995; 95:881-887.
- Loureiro MB, Ururahy MA, Freire-Neto FP, Oliveira GH, Duarte VM, Luchessi AD, Brandão-Neto J, Hirata RD, Hirata MH, Maciel-Neto JJ, Arrais RF, Almeida MG, Rezende AA. Low bone mineral density is associated to poor glycemic control and increased OPG expression in children and adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2014; 103:452-457.
- Mabilleau G, Chappard D, Baslé MF. Cellular and molecular effects of thiazolidinediones on bone cells: a review. *Int J Biochem Mol Biol* 2011; 2:240-246.
- Maggio AB1, Ferrari S, Kraenzlin M, Marchand LM, Schwitzgebel V, Beghetti M, Rizzoli R, Farpour-Lambert NJ. Decreased bone turnover in children and adolescents with well controlled type 1 diabetes. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2010; 23:697-707.
- Mangin M, Sinha R, Fincher K. Inflammation and vitamin D: the infection connection. *Inflamm Res*. 2014; 63:803-19.
- Mao L, Tamura Y, Kawao N, Okada K, Yano M, Okumoto K, Kaji H. Influence of diabetic state and vitamin D deficiency on bone repair in female mice. *Bone* 2014; 61:102-8.
- Marks SC. The origin of osteoclast: Evidence, clinical implications and investigative challenges of an extra-skeletal source. *J Pathol* 1983; 12:226-56.
- Miettinen ME, Reinert L, Kinnunen L, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D level during early pregnancy and type 1 diabetes risk in the offspring. *Diabetologia* 2012; 55: 1291–1294.
- Misof BM, Roschger P, Tesch W, Baldock PA, Valenta A, Messmer P, Eisman JA, Boskey AL, Gardiner EM, Fratzl P, Klaushofer K. Targeted overexpression of vitamin D

receptor in osteoblasts increases calcium concentration without affecting structural properties of bone mineral crystals. *Calcif. Tissue Int* 2003; 73:251-257.

Mitri J, Pittas AG. Vitamin D and diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2014; 43:205–232.

Mohammadian S, Fatahi N, Zaeri H, Vakili MA. Effect of vitamin d3 supplement in glycemic control of pediatrics with type 1 diabetes mellitus and vitamin d deficiency. *J Clin Diagn Res* 2015; 9:5-7.

Murata M, Takahashi A, Saito I, Kawanishi S. Site-specific DNA methylation and apoptosis: induction by diabetogenic streptozotocin. *Biochem Pharmacol.* 1999; 57: 8817.

Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 2002; 108:17-29.

Nebot E, Aparicio VA, Coll-Risco I, Camiletti-Moirón D, Schneider J, Kapravelou G, Heimel P, Martínez R, Andrade A, Slezak P, Redl H, Porres JM, López-Jurado M, Pietschmann P, Aranda P. Effects of a moderately high-protein diet and interval aerobic training combined with strength-endurance exercise on markers of bone metabolism, microarchitecture and turnover in obese Zucker rats. *Bone* 2016; 92:116-123.

Nicks KM, Fowler TW, Akel NS, Perrien DS, Suva LJ, Gaddy D. Bone turnover across the menopause transition : The role of gonadal inhibins. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1192:153-60.

Oates TW Jr, Galloway P, Alexander P, Vargas Green A, Huynh-Ba G, Feine J, McMahan CA. The effects of elevated hemoglobin A(1c) in patients with type 2 diabetes mellitus

- on dental implants: Survival and stability at one year. *J Am Dent Assoc* 2014; 145:1218-1226.
- Oates TW, Huynh-Ba G, Vargas A, Alexander P, Feine J. A critical review of diabetes, glycemic control, and dental implant therapy. *Clin Oral Implants Res* 2013; 24:117-127.
- Odgren PR, Kim N, van Wesenbeeck L, MacKay C, Mason-Savas A, Safadi FF, Popoff SN, Lengner C, van-Hul W, Choi Y, Marks SC Jr. Evidence that the rat osteopetrotic mutation toothless (tl) is not in the TNFSF11 (Trance, Rankl, ODF, OPGL) gene. *Int J Dev Biol* 2001; 45:853-9.
- Papadakis G, Hans D, Gonzalez-Rodriguez E, Vollenweider P, Waeber G, Marques-Vidal PM, Lamy O. The Benefit of Menopausal Hormone Therapy on Bone Density and Microarchitecture Persists After its Withdrawal. *J Clin Endocrinol Metab* 2016; 101:5004-5011.
- Parajuli A, Liu C, Li W, Gu X, Lai X, Pei S, Price C, You L, Lu XL, Wang L. Bone's responses to mechanical loading are impaired in type 1 diabetes. *Bone* 2015; 81:152-160.
- Park CY, Weaver CM. Vitamin D interactions with soy isoflavones on bone after menopause: a review. *Nutrients* 2012; 4):1610-1621.
- Peled M, Ardekian L, Tagger-Green N, Gutmacher Z, Machtei EE. Dental implants in patients with type 2 diabetes mellitus: a clinical study. *Implant Dent* 2003; 12:116-122.
- Penoni DC, Fidalgo TK, Torres SR, Varela VM, Masterson D, Leão AT, Maia LC. Bone Density and Clinical Periodontal Attachment in Postmenopausal Women: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Dent Res* 2017; 96:261-269.



- Perkins SL, Kling SJ. Local concentrations of macrophage colony-stimulating factor mediate osteoclast differentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1995; 269:424-430.
- Picke AK, Gordaliza Alaguero I, Campbell GM, Glüer CC, Salbach-Hirsch J, Rauner M, Hofbauer LC, Hofbauer C. Bone defect regeneration and cortical bone parameters of type 2 diabetic rats are improved by insulin therapy. *Bone* 2016; 82:108-115.
- Pinero GJ, Farach-Carson MC, Devoll RE, Aubin JE, Brunn JC, Butler WT. Bone matrix proteins in osteogenesis and remodeling in the neonatal rat mandible as studied by immunolocalization of osteopontin, bone sialoprotein 2HS-glycoprotein and alkaline phosphatase. *Arch Oral Biol* 1995; 40:145-55.
- Polonsky KS. The past 200 years in diabetes. *N Engl J Med* 2012; 367(14):1332-40.
- Positive regulation of adult bone formation by osteoblast-specific transcription factor osterix. *J Bone Miner Res* 2009; 24:1055-1065.
- Raetz S, Bierhalter H, Schoenherr D, Parameswaran N, McCabe LR. Estrogen Deficiency Exacerbates Type 1 Diabetes-Induced Bone TNF- $\alpha$  Expression and Osteoporosis in Female Mice. *Endocrinology* 2017; 158:2086-2101.
- Raisingani M, Preneet B, Kohn B1, Yakar S. Skeletal growth and bone mineral acquisition in type 1 diabetic children; abnormalities of the GH/IGF-1 axis. *Growth Horm IGF Res* 2017; 34:13-21.
- Rapuri PB, Gallagher JC, Nawaz Z. Caffeine decreases vitamin D receptor protein expression and 1,25 (OH) $_2$ D $_3$  stimulated alkaline phosphatase activity in human osteoblast cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; 103:368-371.
- Razi F, Esmaili M, Esfahani EN, Yaghmaei P, Qorbani M, Mohammadi Z, Keshtkar A, Khashayar P, Larijani B. Bone structure and turnover in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus. *Menopause* 2016; 23:280-285.

- Reni C, Mangialardi G, Meloni M, Madeddu P. Diabetes Stimulates Osteoclastogenesis by Acidosis-Induced Activation of Transient Receptor Potential Cation Channels. *Sci Rep* 2016; 29:6:30639.
- Rewers M, Ludvigsson J. Environmental risk factors for type 1 diabetes. *Lancet* 2016; 387:2340-2348.
- Roberts WE, Tlirley PK, Breznick N, Fielder PJ. Implants: bone physiology and metabolism. *J Calif Dent Assur* 1987; 15:54-61.
- Robinson JA, Harris SA, Riggs BL, Spelsberg TC. Estrogen regulation of human osteoblastic cell proliferation and differentiation. *Endocrinology* 1997; 138:2919-2927.
- Robling AG<sup>1</sup>, Bellido T, Turner CH. Mechanical stimulation in vivo reduces osteocyte expression of sclerostin. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2006; 6:354.
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J; Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002; 288:321-333.
- Ruppel, M.E., L.M. Miller & D.B. Burr. The effect of the microscopic and nanoscale structure on bone fragility. *Osteoporos Int* 2008; 19:1251-1265.
- Sambrook P, Cooper C. Osteoporosis. *Lancet* 2006; 367:2010-2018.
- Santana RB, Xu L, Chase HB, Amar S, Graves DT, Trackman PC. A role for advanced glycation end products in diminished bone healing in type 1 diabetes. *Diabetes* 2003; 52:1502-1510.
- Santoro N, Randolph JF Jr. Reproductive hormones and the menopause transition. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2011; 38:455-466.

- Shires R, Teitelbaum SL, Bergfeld MA, Fallon MD, Slatopolsky E, Avioli LV. The effect of streptozotocin-induced chronic diabetes mellitus on bone and mineral homeostasis in the rat. *J Lab Clin Med* 1981; 97:231-40.
- Smith MJ, Simmons KM, Cambier JC. B cells in type 1 diabetes mellitus and diabetic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2017; 13:712-720.
- Sözen T, Özişik L, Başaran NÇ. An overview and management of osteoporosis. *Eur J Rheumatol* 2017; 4:46-56.
- Studd J, Zamblera D. Estrogen therapy in women over 60 years of age. *Gynecol Endocrinol* 1994; 8:191-196.
- Turner CH. Homeostatic control of bone structure: An application of feedback theory. *Bone* 1991; 12:203-207.
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998; 352:837-853.
- Vaidya A, Williams JS. The relationship between vitamin D and the renin-angiotensin system in the pathophysiology of hypertension, kidney disease, and diabetes. *Metabolism* 2012; 61:450–458.
- Valenti MT, Dalle Carbonare L, Mottes M. Osteogenic Differentiation in Healthy and Pathological Conditions. *Int J Mol Sci* 2016; 18: pii: E41.
- Venken K, Callewaert F, Boonen S, Vanderschueren D. Sex hormones, their receptors and bone health. *Osteoporos Int* 2008; 19:1517-1525.
- Vieira NE, Marini JC, Hopkins E, Abrams SA, Yergey AL. Effect of growth hormone treatment on calcium kinetics in patients with osteogenesis imperfecta type III and IV. *Bone* 1999; 25:501-505.

- Viguet-Carrin, S., P. Garnero & P.D. Delmas. The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int* 2006; 17:319-336.
- von Wilmowsky C, Schlegel KA, Baran C, Nkenke E, Neukam FW, Moest T. Peri-implant defect regeneration in the diabetic pig: A preclinical study. *J Craniomaxillofac Surg* 2016; 44:827-834.
- Walter M, Kaupper T, Adler K, Foersch J, Bonifacio E, Ziegler AG. No effect of the 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 on beta-cell residual function and insulin requirement in adults with new-onset type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2010; 33:1443-1448.
- Ward DT, Yau SK, Mee AP, Mawer EB, Miller CA, Garland HO, Riccardi D. Functional, molecular, and biochemical characterization of streptozotocin-induced diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12:779-790.
- Weets I, Kaufman L, Van der Auwera B, Crenier L, Rooman RP, De Block C, Casteels K, Weber E, Coeckelberghs M, Laron Z, Pipeleers DG, Gorus FK; Belgian Diabetes Registry. Seasonality in clinical onset of type 1 diabetes in belgian patients above the age of 10 is restricted to HLA-DQ2/DQ8-negative males, which explains the male to female excess in incidence. *Diabetologia* 2004; 47:614-621.
- Weiss RE, Gorn AH, Nimni ME. Abnormalities in the biosynthesis of cartilage and bone proteoglycans in experimental diabetes. *Diabetes* 1981; 30:670-677.
- Wong KK, Tzeng ES. Appearance of different diabetic symptoms after streptozocin administration: a comparison study. *Biochem Mol Biol Int* 1993; 30:1035-1041.
- Wu YY, Yu T, Yang XY, Li F, Ma L, Yang Y, Liu XG, Wang YY, Gong P. Vitamin D3 and insulin combined treatment promotes titanium implant osseointegration in diabetes mellitus rats. *Bone* 2013; 52:1-8.

- Xian L, Wu X, Pang L, Lou M, Rosen CJ, Qiu T, Crane J, Frassica F, Zhang L, Rodriguez JP, Xiaofeng Jia, Shoshana Yakar, Shouhong Xuan, Argiris Efstratiadis, Mei Wan, Xu Cao. Matrix IGF-1 maintains bone mass by activation of mTOR in mesenchymal stem cells. *Nat Med* 2012; 18:1095-1101.
- Xu MT, Sun S, Zhang L, Xu F, Du SL, Zhang XD, Wang DW. Diabetes mellitus affects the biomechanical function of the callus and the expression of TGF-beta1 and BMP2 in an early stage of fracture healing. *Braz J Med Biol Res* 2016; 49: e4736.
- Young MF, Ibaraki K, Kerr JM. Molecular and cellular biology of the major noncollagenous proteins in bone. In: Noda M (ed). *Cellular and molecular biology of bone*. New York: Academic Press 1993; 191-234.
- Zeynep Seref-Ferlengez, Sylvia O. Suadicani, and Mia M. Thi. A new perspective on mechanisms governing skeletal complications in type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci*. 2016; 1383:67-79.
- Zipitis CS, Akobeng AK. Vitamin D supplementation in early childhood and risk of type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child* 2008; 93:512-17.



# SIPESQ

Sistema de Pesquisas da PUCRS



Código SIPESQ: 6228

Porto Alegre, 14 de janeiro de 2015.

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão Científica da FACULDADE DE ODONTOLOGIA da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "REGENERAÇÃO ÓSSEA EM CAMUNDONGOS: CORRELAÇÃO ENTRE DIABETES TIPO I E MENOPAUSA EXPERIMENTAL" coordenado por MARIA MARTHA CAMPOS. Caso este projeto necessite apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e/ou da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), toda a documentação anexa deve ser idêntica à documentação enviada ao CEP/CEUA, juntamente com o Documento Unificado gerado pelo SIPESQ.

Atenciosamente,

Comissão Científica da FACULDADE DE ODONTOLOGIA

---



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 09/2015 - CEUA

Porto Alegre, 12 de março de 2015.

Prezado Sr(a). Pesquisador(a),

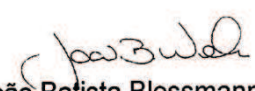
A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 15/00433, intitulado **“Regeneração óssea em camundongos: correlação entre diabetes tipo 1 e menopausa experimental”**.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está **autorizada** a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Nº de Animais	Espécie	Duração do Projeto
432	Mus musculus	03/2015 – 03/2018

Atenciosamente,

  
Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber  
Coordenador da CEUA/PUCRS

Ilma. Sra.  
Profa. Dra. Maria Martha Campos  
INTOX  
Nesta Universidade

**PUCRS**

**Campus Central**

Av. Ipiranga, 6681 – P. 99 – Portal Tecnopuc – sala 1512  
CEP: 90619-900 – Porto Alegre/RS

Fone: (51) 3353-6365

E-mail: [ceua@pucrs.br](mailto:ceua@pucrs.br)