

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Resposta biológica à implantação subcutânea de nanopartículas de hidroxiapatite em ratos diabéticos

Dissertação de Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial

Vânia Marisa Silva Reis

Orientador: Professor Doutor Bruno Colaço

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, UTAD

Co-orientador: Professor Doutor Pedro Gomes

Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, FMDUP



Vila Real, 2013

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Resposta biológica à implantação subcutânea de nanopartículas de hidroxiapatite em ratos diabéticos

Dissertação de Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial

Vânia Marisa Silva Reis

Orientador: Professor Doutor Bruno Colaço

Co-orientador: Professor Doutor Pedro Gomes

Composição do Júri:

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

Agradecimentos

Apresento de uma forma reconhecida e carinhosa os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que, de uma forma ou de outra, tornaram possível a realização e concretização deste trabalho.

A Deus, meu porto seguro, por tudo o que sou, tenho e acredito.

Ao meu orientado Professor Doutor Bruno Colaço, pela transmissão de conhecimentos, apoio, compreensão e amizade que recebi. Pela leitura crítica da presente dissertação e interpretação dos resultados. Por todo o incentivo e encorajamento transmitidos nos momentos em que o trabalho não decorreu como esperado.

Ao Co-orientador Professor Doutor Pedro Gomes, por todo o apoio e disponibilidade, pelos ensinamentos transmitidos e boa disposição durante as cirurgias. Assim como, pela leitura crítica da presente dissertação e interpretação dos resultados.

À Professora Doutora Adelina Gama, pela simpatia e constante disponibilidade quer na realização da necropsia dos animais, quanto para a exaustiva análise histopatológica.

À Professora Doutora Maria João Pires, pela disponibilidade e ajuda prestada na realização das análises bioquímicas e hematológicas.

Ao Professor Doutor Jorge Colaço, pelo seu precioso tempo gentilmente cedido, por toda a simpatia e apoio prestado na realização da análise estatística dos resultados.

À colega Vanessa Silva, pela ajuda na manutenção dos animais durante todo o ensaio experimental, assim como na realização das análises bioquímicas e hematológicas.

À D^a. Lígia Lourenço, técnica do laboratório de Anatomia Patológica da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, pela preciosa ajuda no processamento do material, realização dos cortes histológicos e colorações.

À Professora Doutora Ana Calado, pela constante disponibilidade e transmissão de conhecimentos, embora o trabalho não tenha corrido como esperado, os seus ensinamentos contribuíram para um maior enriquecimento científico.

À Regina Arantes, pela disponibilidade e partilha de conhecimentos.

Ao Félix, por toda a ajuda prestada sempre que necessário.

À Rita, pela amizade, pelos momentos divertidos e colaboração na realização de todo o trabalho.

Ao Hugo, Maria, Marina e Daniela, pela amizade e ajuda prestada na elaboração desta dissertação.

Aos meus tios e primos, mesmo que à distância, sempre acreditaram nas minhas capacidades, e que certamente, estão contentes por mais esta etapa vencida. Obrigada pelo amor incondicional.

Ao meu namorado Miguel, por todo o carinho, companheirismo e paciência que sempre demonstrou.

A Teresa e ao Nando, por nunca terem colocado limites na minha formação acadêmica. Agradeço sinceramente pela ajuda, apoio e amizade.

A todos aqueles que contribuíram para a minha formação, não só intelectual, como humana.

A vocês toda a minha gratidão!

Resumo

Patologias do tecido ósseo, originárias de várias causas, nomeadamente traumas, infeções ou doenças ósseas, são muito comuns na nossa sociedade. Na situação de diabetes *mellitus*, estes defeitos ósseo estão agravados e o seu tratamento apresenta uma maior dificuldade para os clínicos. Nos últimos anos a nanotecnologia tem fornecido variadíssimos benefícios no campo da engenharia do tecido ósseo, no entanto nenhuma das soluções tem resolvido totalmente os diversos desafios que pressupõem a reparação óssea. Desta forma, têm sido estudadas novas soluções terapêuticas para resolver este problema, e o desenvolvimento de novos biomateriais fabricados com nanopartículas que simulem a estrutura e composição do osso, favorecendo a sua regeneração, têm sido equacionados. Assim este trabalho tem como principal objetivo o estudo da biocompatibilidade de uma preparação de nanopartículas de hidroxiapatite (NanoXIM•HAp102®) na condição de diabetes, usando para tal um modelo de implante subcutâneo em ratos Wistar.

Neste estudo foram usados 16 ratos machos da estirpe Wistar, dos quais 10 foram submetidos à indução da diabetes, por via intraperitoneal, com uma única administração de 55 mg/Kg de estreptozotocina (STZ), sendo os restantes injetados com soro tampão citrato (grupo controlo). Duas semanas após a indução da diabetes, implantou-se subcutaneamente em todos os animais 0,5 ml de suspensão de nanopartículas de hidroxiapatite (nano-HAp). Os animais foram sacrificados às 48h e 3 semanas, sendo recolhido o sangue, órgãos, e tecido subcutâneo com a nano-HAp, para avaliar a atividade e expressão de variados marcadores séricos, assim como proceder à análise histopatológica.

Os animais diabéticos apresentaram uma diminuição do peso corporal e um aumento do peso relativo dos rins e do fígado quando comparado com os respetivos grupos controlo. Os valores dos marcadores de função renal, ureia e creatinina, e das enzimas hepáticas ALT e FA, encontraram-se elevados nos animais diabéticos comparativamente com os controlos. Às 48h, verificou-se a existência de uma resposta inflamatória aguda, com presença de neutrófilos e linfócitos, e uma resposta inflamatória crónica caracterizada pela presença de macrófagos e células gigantes, às 3 semanas. Tanto a resposta inflamatória, como a reabsorção das nanopartículas encontraram-se diminuídas nos grupos diabéticos comparativamente com o respetivo grupo controlo. Constatou-se a presença de uma cápsula fibrosa nos grupos experimentais das 3 semanas, sendo que esta foi menor no grupo diabético comparativamente com o respetivo grupo controlo. Observou-se ainda alguma agregação de

nano-HAp, tendo esta sido mais intensa em ambos os grupos diabéticos, e dentro destes maior às 3 semanas.

Uma vez que não se verificou uma reação exacerbada e que ocorreu reabsorção do biomaterial, sem sinal de toxicidade hepática ou renal, na quantidade testada, podemos concluir que as nano-HAp não apresentam toxicidade. Embora se tenha observado reabsorção das nano-HAp ao longo do período experimental, constatou-se que este processo era bastante mais lento nas condições diabéticas.

Palavras-chave: Regeneração óssea; Diabetes; Nano-HAp; Biocompatibilidade.

Abstract

Pathologies of bone tissue, that are provided from different causes, including trauma, infections or bone diseases, are very common in our society. In the specific case of diabetes *mellitus*, the bone defects are intensified and its treatment presents a major difficulty for clinicians. Actually, nanotechnology provides many different benefits in the field of bone tissue engineering, however, any solutions have completely solved the challenges that require bone repair. In this way, it has been studied new therapeutic solutions to solve this problem, the development of new biomaterials made from nanoparticles that acquire a similar structure and composition of the original bone, promoting regeneration, have been solved. The main objective of this work is the study of the biocompatibility, of hydroxyapatite nanoparticles (NanoXIM • HAp102 ®) in diabetic conditions, using for such a model of subcutaneous implantation in Wistar rats.

This study used 16 male rats of the Wistar strain, 10 of which were subjected to induction of diabetes with single intraperitoneally administration of 55 mg / kg streptozotocin (STZ), and the remaining were injected with physiological serum (the control group). After the induction of diabetes, was subcutaneously implanted 0,5 ml hydroxyapatite nanoparticles (nano-HAp). The animals were sacrificed at 48 hours and 3 weeks, being collected the blood, organs, and subcutaneous tissue, with nano-Hap, to evaluate the expression and the activity of various serum markers, as well as the histopathology.

Diabetic animals showed a decrease in body weight and an increase in the relative weight of the liver and kidneys when compared with the respective control groups. The values of markers of renal function, urea and creatinine, and liver enzymes ALT and FA, were also higher in diabetic animals compared with control. At 48 h, it was found a several inflammatory response with neutrophils and lymphocytes, and a chronic inflammatory response characterized by the presence of macrophages and giant cells, at 3 weeks. The inflammatory response and the reabsorption of the nanoparticles were found decreased in diabetic group compared with the respective control group. It was observed the presence of a fibrous capsule in the experimental groups of the 3 weeks, but it was lower in the diabetic group as compared to the respective control group. There was also some aggregation of nano-Hap, that was more intense in both diabetic groups, and within these higher at 3 weeks.

With the quantity tested, there has not been observed an overreaction and the biomaterial reabsorption occurred without signs of hepatic or renal toxicity. Although we

observed a progressive reabsorption of nano-HAp throughout the experimental period, this process was significantly slower in diabetic conditions.

Keywords: Bone regeneration; Diabetes; Nano-HAp; Biocompatibility.

Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
Abstract	vii
Índice de figuras	xi
Índice de tabelas	xiii
Símbolos e abreviaturas.....	xiv
1.Introdução.....	1
1.1 Tecido ósseo.....	1
1.1.1 Anatomia do tecido ósseo.....	1
1.1.2 Estrutura do tecido ósseo.....	3
1.1.3 Regeneração óssea.....	6
1.2 Biomateriais	8
1.2.1 Hidroxiapatite.....	9
1.2.2 Resposta biológica aos biomateriais.....	12
1.3 Diabetes.....	16
1.3.1 Tipos de diabetes	17
1.3.2 Regulação do metabolismo da glucose.....	19
1.3.3 Fisiopatologia da diabetes <i>mellitus</i>	20
1.3.4 Efeito da diabetes no metabolismo e reparação/regeneração óssea.....	21
1.3.5 Modelos animais de diabetes experimental	22
2.Objetivos	26
3.Material e Métodos.....	27
3.1 Animais	27
3.2 Nanohidroxiapatite	27
3.3 Condições experimentais.....	27
3.3.1 Alojamento	27
3.3.2 Alimentação.....	28
3.4 Protocolo experimental.....	29
3.5 Procedimentos experimentais.....	29
3.5.1 Indução da diabetes	29
3.5.2 Pesagens dos animais e da alimentação.....	29
3.5.3 Medição dos níveis séricos de glucose.....	30
3.5.4 Cirurgia para implantação subcutâneo da nano-HAp.....	30
3.5.5 Sacrifício dos animais e recolha das amostras.....	32

3.6 Métodos de análise	32
3.6.1 Análise hematológica	32
3.6.2 Análise bioquímica.....	35
3.6.3 Processamento das amostras e análise histológica	35
3.6.4 Análise estatística	35
3.7 Fórmulas utilizadas.....	36
3.7.1 Taxa de sucesso de indução da diabetes.....	36
3.7.2 Índice de perdas.....	36
3.7.3 Percentagem de peso ganho e índice de homogeneidade ponderal	36
4.Resultados	38
4.1 Taxa de sucesso da indução da diabetes, Glicemia e Índice de perdas	38
4.2 Variação do peso corporal	38
4.3 Consumo médio de comida e de água	40
4.4 Peso dos órgãos	40
4.4.1 Peso absoluto dos órgãos.....	40
4.4.2 Peso relativo dos órgãos	41
4.5 Análise sérica da função renal e hepática.....	42
4.6 Avaliação da implantação de nano-HAp.....	44
4.6.1 Avaliação macroscópica.....	44
4.6.2 Análise histopatológica	45
4.7 Análise hematológica	49
5.Discussão.....	51
6. Conclusões	60
7. Bibliografia.....	61
Anexo I.....	I

Índice de figuras

Figura 1: Anatomia macroscópica do osso: a) osso compacto e b) osso esponjoso. Adaptado de (Doblare et al., 2004).....	2
Figura 2: Processo de remodelação óssea realizado pelas células do tecido ósseo: osteoblastos, osteócitos, células de revestimento e osteoclastos. Adaptado de (Stepien, 2011).....	4
Figura 3: Etapas da regeneração óssea. Adaptado de (Seeley et al., 2003).....	7
Figura 4: Comportamento biológico dos biomateriais: a) bioinertes e biotoleráveis e b) bioativos (Guastaldi e Aparecida, 2010).....	9
Figura 5: Modelo espacial da molécula de hidroxiapatite com cálcio como átomo central (Ca, esfera branca maior; O, esfera preta pequena; P, esfera branca pequena; H, esfera preta menor). Adaptado de (Gutowska et al., 2005).	10
Figura 6: Ilustração esquemática do mecanismo pelo qual os nanomateriais podem ser superiores aos materiais convencionais na regeneração óssea; a) Adsorção imediata das proteínas ao material; b) Ligação dos osteoblastos e proliferação; c) Diferenciação dos osteoblastos e remodelação óssea. Adaptado de (Zhang e Webster, 2009).....	11
Figura 7: Etapas da reação ao corpo estranho (FB): (a) adsorção das proteínas do sangue e do fluido tecidual; (b) migração de leucócitos; (c) proliferação de macrófagos e fibroblastos; (d) formação da cápsula fibrosa. Adaptado de (Fournier et al., 2003).	12
Figura 8: Variação temporal na resposta inflamatória aguda, resposta inflamatória crônica e desenvolvimento do tecido de granulação a biomateriais implantados. Adaptado de (Anderson, 2001).	14
Figura 9: Regulação da glicemia pelo pâncreas e fígado. A-Glucagon, B-Insulina. Adaptado de (Duarte, 2002).	19
Figura 10: Mecanismo de produção de insulina nas células β pancreáticas. O aumento da glucose intracelular conduz ao aumento da produção de ATP, e de um aumento da razão ATP/ADP (1), o aumento da razão de ATP/ADP leva ao fecho dos canais de potássio (K) e despolarização da célula (2), com a despolarização da célula há abertura dos canais de cálcio (3) que levam a secreção de insulina (4). Adaptado de (Layden et al., 2010).....	20
Figura 11: Mecanismo de destruição das células β produtoras de insulina na diabetes tipo 1. Adaptado de (Vega-Monroy e Fernandez-Mejia, 2011).....	21
Figura 12: Esquema da marcação numérica na cauda dos animais.....	28
Figura 13: Cronograma do protocolo experimental.....	29
Figura 14: Algumas etapas do procedimento cirúrgico: A) Incisão da região dorsal; B) Desbridamento do espaço subcutâneo; C) Implantação da nano-HAp; D) Esquema de implantação da nano-HAp (N) e do soro fisiológico (C).....	31

Figura 15: A) Esquema da câmara de Neubauer para contagem total de leucócitos; B) Regra do L – Sistema de contagem de células: as células que tocam a linha central tripla (representada pela linha grossa) da esquerda e inferior são contadas. As células que tocam a linha superior ou a linha direita não são contadas. Adaptado de (Viana, 2010).	33
Figura 16: Representação esquemática da realização de um esfregaço sanguíneo. Adaptado de (Baptista, 2011).	34
Figura 17: Evolução do peso médio corporal dos animais de todos os grupos do protocolo experimental. *Diferenças estatisticamente significativas do grupo CTR 3s ($p < 0,01$).....	39
Figura 18: Concentração sérica dos marcadores de função renal: A)Ureia e B)Creatinina.	43
Figura 19: Atividade das enzimas hepáticas ALT e FA. *Diferenças estatisticamente significativas do grupo CTR ($p < 0,05$);**Diferenças estatisticamente significativas do grupo CTR ($p < 0,01$).	43
Figura 20: Imagens macroscópicas do tecido subcutâneo com a nano-HAp implantada. Presença de pequenos nódulos de nano-HAp (Círculos a preto) A) CTR 48h; B) DIAB 48h; C) CTR 3s; D) DIAB 3s.	44
Figura 21: Reação do tecido 48 horas após a implantação das nano-HAp: A) CTR 48h- Presença de aglomerados da nano-HAp, envolvidos por células inflamatórias. Objetiva de 10x. B) DIAB 48h- Presença de aglomerados de nano-HAp, envolvidos por células inflamatórias. Presença de tecido de granulação. Objetiva de 10x. C) CTR 48h- Marcação positiva para a coloração de Von Kossa, com evidência dos sais de cálcio (a negro). Objetiva de 10x. * Região das nano-HAp.	46
Figura 22: Reação do tecido 3 semanas após o implante de nano-HAp: A) CTR 3s- Presença de aglomerados de nano-HAp envolvidos por fibrose. Objetiva 4x. B) CTR 3s- Presença de infiltrado inflamatório constituído maioritariamente por células gigantes e macrófagos. Objetiva 20x. C) DIAB 3s- Presença de fibrose em redor das nano-HAp, e de necrose e fibrina no centro do implante. Objetiva 4x. D) DIAB 3s- Presença de aglomerados de nano-HAp envolvidos por células inflamatórias, maioritariamente células gigantes. Objetiva 20x.....	47
Figura 23: Marcação positiva para a coloração de Von Kossa, com evidência dos sais de cálcio (a negro): A) CTR 3s. Objetiva 10x; B) DIAB 3s. Objetiva 10x.	48
Figura 24: Concentração dos leucócitos (leucócitos totais, linfócitos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos) presentes no sangue dos animais dos diferentes grupos.....	50

Índice de tabelas

Tabela 1: Alterações provocadas pela diabetes na reparação de fraturas. Adaptado de (Graves et al., 2011).....	22
Tabela 2: Doses de STZ e aloxano administradas em roedores.	24
Tabela 3: Índice de perdas e valores médios de glicemia.	38
Tabela 4: Média do peso corporal inicial e final, diferença de pesos, %PG (% de peso ganho) e IHP (índice de homogeneidade ponderal) dos respectivos grupos.*- Diferença estatisticamente significativo do grupo CTR 3s (p<0,05).	39
Tabela 5: Consumo médio de comida e água consumida por rato por semana.*- Diferença estatisticamente significativa do grupo DIAB 48h (p<0,001). **- Diferenças estatisticamente significativas do grupo CTR 48h (p<0,001).***- Diferença estatisticamente significativa do grupo CTR 3s (p<0,001).....	40
Tabela 6: Médias do peso absoluto dos órgãos dos grupos experimentais.*- Diferença estatisticamente significativa do grupo CTR 48h (p<0,01). **- Diferenças estatisticamente significativas do grupo CTR 3s (p<0,01).***- Diferenças estatisticamente significativas do grupo CTR 48h (p<0,05).	41
Tabela 7: Peso médio relativo dos órgãos dos grupos experimentais. *- Diferença estatisticamente significativa do grupo CTR 48h (p<0,05).** - Diferença estatisticamente significativa do grupo CTR 3s (p<0,01).	42
Tabela 8: Caracterização do infiltrado inflamatório e dos tipos celulares presentes na resposta biológica à nano-HAp (-Ausente; +Escasso; ++Moderado; +++Intenso; ++++ Severo).....	45
Tabela 9: Caracterização da fibrose, neovascularização, agregação das nano-HAp, edema, mucinose, inflamação e necrose muscular, hemorragia e desorganização das fibras de colagénio.....	49

Símbolos e abreviaturas

%- Percentagem

\bar{x} - Média

µl- microlitros

µm- Micrómetros

°C- Graus celsius

ADP- Adenosina difosfato

AGEs- Produtos finais de glicosilação avançada

ALT- Alanina aminotransferase

ATP- Adenosina trifosfato

BB- *Biobreading*

Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂- Fórmula química da hidroxiapatite

Ca²⁺- Ião cálcio

Ca₃(PO₄)₂- Fosfato tricálcico β

CFU-GM- Unidades formadoras de colónias de granulócitos-macrófagos

CTR 48h- Grupo controlo das 48 horas

CTR 3s- Grupo controlo das 3 semanas

DIAB 48h- Grupo diabético das 48 horas

DIAB 3s- Grupo diabético das 3 semanas

dl- Decilitros

DNA- Ácido desoxirribonucleico

DP- Desvio Padrão

EDTA- Ácido etilenodiaminotetracético

FA- Fosfatase alcalina

FBGC- Células gigantes de corpo estranho

FBR- Reação ao corpo estranho

FGF- Fator de crescimento de fibroblastos

GAD- Ácido glutâmico descarboxilase

GLUT 1- Transportador de glucose 1

GLUT 2- Transportador de glucose 2

h- Horas

HPO₄²⁻-Ião hidrogeno fosfato

IHP- Índice de homogeneidade ponderal
IL1 β - Interleucina 1 β
IFN γ - Interferão gama
IP- Índice de perdas
i.p- Intraperitoneal
i.v- Intravenosa
K- Potássio
Kg- Quilogramas
L- Litros
LeucTotais- Leucócitos totais
mg- Miligramas
mm³- Milímetros cúbicos
Nano-HAp- Nanopartículas de hidroxiapatite
NFK β - Fator nuclear kapa β
NO- Óxido nítrico
NOD- *Non obese diabetic*
PDGF- Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDX1- Fator 1 promotor de insulina
Pf- Peso médio final
PG- Peso ganho
Pi- Peso médio inicial
Pma- Peso médio mais alto
Pmb- Peso médio mais baixo
PMNs- Leucócitos polimorfonucleares
PO₄³⁻-Ião fosfato
RE- Reticulo endoplasmático
STAT1- Transdutor de sinal e ativador de transdução
STZ- Estreptozotocina
TCD4⁺- Linfócito T CD4⁺
TCD8⁺- Linfócito T CD8⁺
TEM- Microscopia eletrônica de transmissão
TGF- β - Fator de crescimento de transformação β
UI- Unidades internacionais

1. Introdução

As patologias ósseas são cada vez mais frequentes nas sociedades ocidentais, estas podem ter diversas etiologias como traumas, tumores, infecções ou doenças ósseas, como por exemplo a osteoporose (Chiara et al., 2012).

Nos últimos anos, o rápido desenvolvimento da nanotecnologia tem permitido mudanças no paradigma da engenharia de tecidos, nomeadamente nas aplicações clínicas que visam a regeneração do tecido ósseo. Neste contexto, novos biomateriais foram desenvolvidos com nanocaraterísticas, que mimetizam a estrutura e composição do osso (Chiara et al., 2012).

O tecido ósseo é um tecido altamente especializado, com características específicas quanto a sua fisiologia e processo de reparação, que devem ser bem compreendidos de modo a poder-se utilizar adequadamente os nanomateriais em seu benefício (Isola, 2012).

1.1 Tecido ósseo

O esqueleto desempenha diversas funções biológicas. Os ossos do esqueleto proporcionam o suporte estrutural para o resto do corpo e protegem os órgãos vitais alojados nas caixas cranianas, torácicas e no canal raquidiano. Além desta função, o esqueleto é ainda o responsável pela proteção da medula óssea e por proporcionar fixação aos músculos esqueléticos, transformando as suas contrações em movimentos úteis. Funciona também como uma reserva dinâmica de substâncias, nomeadamente de cálcio e de fosfato. Cerca de 99% do cálcio do organismo está contido no esqueleto. Para um funcionamento normal do organismo é necessário que as concentrações de cálcio se mantenham constantes no sangue, isto só é possível porque existe um intercâmbio contínuo entre o cálcio dos ossos e o do plasma sanguíneo (Hing, 2004; Junqueira e Carneiro, 2004; Clarke, 2008).

1.1.1 Anatomia do tecido ósseo

De acordo com a sua forma os osso podem ser classificados em quatro categorias, são elas: os ossos longos, os ossos curtos, os ossos achatados e os ossos irregulares (Clarke, 2008). Os ossos longos têm um comprimento maior que a largura, como é o caso dos ossos constituintes dos membros superiores e inferiores. Os ossos curtos, como o carpo e o tarso,

são aproximadamente tão largos como compridos. Os ossos achatados são geralmente encurvados com uma forma delgada e achatada. São exemplo de ossos achatados as costelas e as omoplatas. Os ossos irregulares, como as vértebras e os ossos da face, são aqueles que possuem uma estrutura que não se enquadra em nenhuma das outras categorias (Seeley et al., 2003; Clarke, 2008).

Um osso longo em crescimento possui três componentes principais: a diáfise, as epífises e a placa epifisária. A diáfise é constituída principalmente por osso compacto. As epífises ou extremidades dos ossos são compostas essencialmente por osso esponjoso. A placa epifisária ou de crescimento, local onde ocorre o crescimento ósseo em comprimento, situa-se entre os outros dois componentes e é constituída por cartilagem hialina. O crescimento ósseo em comprimento ocorre na placa epifisária, que ossifica uma vez terminado o crescimento, e passa-se a denominar linha epifisária (Seeley et al., 2003; Junqueira e Carneiro, 2004).

O tecido ósseo, macroscopicamente, é formado por dois tipos de tecido distintos, o compacto ou cortical (80%) e o esponjoso ou trabecular (20%) (figura 1) (Junqueira e Carneiro, 2004; Andia et al., 2006; Clarke, 2008; Isola, 2012). Estes dois tipos de tecido ósseo podem ser diferenciados de acordo com a relação entre a quantidade de matriz óssea e a quantidade de lacunas presentes no osso (Seeley et al., 2003).

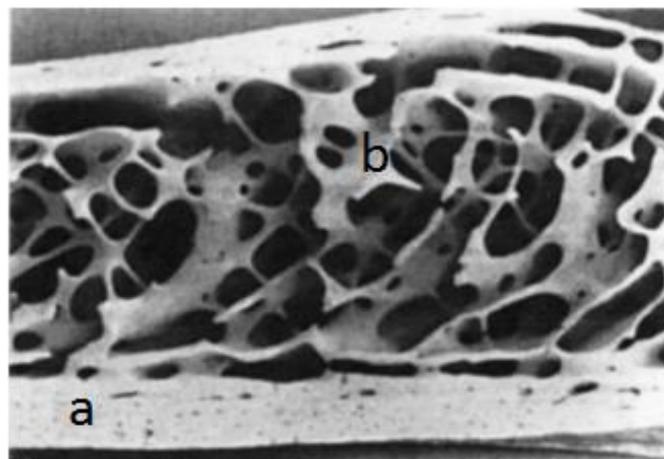


Figura 1: Anatomia macroscópica do osso: a) osso compacto e b) osso esponjoso. Adaptado de (Doblare et al., 2004).

O **osso esponjoso** contém menos matriz óssea e mais espaço do que o compacto. Este tipo de tecido é formado por placas ósseas interligadas denominadas trabéculas, entre estas existem espaços que são preenchidos por medula óssea e vasos sanguíneos. Estas placas são constituídas por várias lamelas, entre as quais estão dispostos os osteócitos. As superfícies das

trabéculas são revestidas por uma única camada de células, na sua maioria osteoblastos e alguns osteoclastos (Seeley et al., 2003; Doblare et al., 2004; Isola, 2012).

O **osso compacto** é denso; neste tipo de osso a matriz de colagénio está organizada em forma de lamelas concêntricas, geralmente em redor de um canal vascular central constituindo o sistema de Havers. Os vasos sanguíneos penetram na própria matriz óssea, e é predominantemente em torno destes que os osteócitos e as lamelas se vão orientar (Seeley et al., 2003; Doblare et al., 2004; Isola, 2012).

Histologicamente também existem dois tipos de tecido ósseo: o imaturo ou primário e o maduro, secundário ou lamelar. Ambos possuem o mesmo tipo de células e os mesmos constituintes da matriz. O tecido primário é o primeiro a formar-se no desenvolvimento embrionário e na reparação das fraturas, sendo depois substituído pelo tecido secundário. Assim sendo o tecido ósseo secundário é o mais abundante em adultos (Junqueira e Carneiro, 2004; Andia et al., 2006). Estes dois tipos de tecido apresentam uma organização diferente: enquanto o tecido ósseo primário apresenta as fibras de colagénio orientadas de uma forma irregular, o tecido ósseo secundário apresenta as fibras organizadas em lamelas (Seeley et al., 2003; Junqueira e Carneiro, 2004). As fibras do tecido secundário posicionam-se paralelamente umas às outras ou em camadas concêntricas em torno de canais com vasos, formando os sistemas de Havers (Junqueira e Carneiro, 2004).

1.1.2 Estrutura do tecido ósseo

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e material extracelular calcificado denominado de matriz óssea (Junqueira e Carneiro, 2004). As principais células deste tecido são os osteoblastos, os osteócitos, as células de revestimento, e os osteoclastos, que são, respetivamente, responsáveis pela produção, manutenção e reabsorção do osso (Hing, 2004; Andia et al., 2006; Isola, 2012).

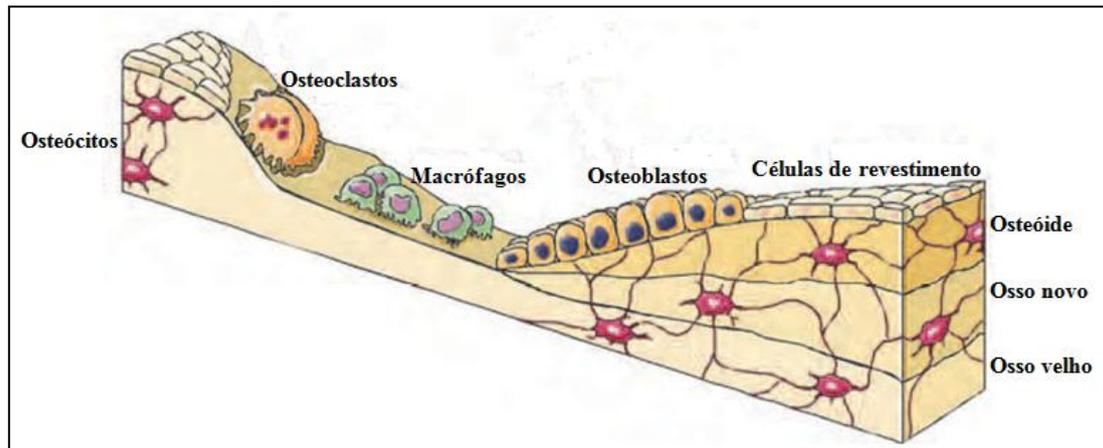


Figura 2: Processo de remodelação óssea realizado pelas células do tecido ósseo: osteoblastos, osteócitos, células de revestimento e osteoclastos. Adaptado de (Stepien, 2011).

Todos os ossos são recobertos tanto, na camada interna como na externa, por camadas de tecido conjuntivo ricas em células osteogênicas, designadas por endóstio e perióstio, respectivamente. As suas principais funções são a nutrição do tecido ósseo e o fornecimento de novos osteoblastos, para o crescimento e a reparação óssea (Junqueira e Carneiro, 2004; Isola, 2012).

A **matriz óssea** é constituída por matéria orgânica (35%) e matéria inorgânica (65%). O material orgânico é formado fundamentalmente por proteínas, entre as quais se destaca o colagénio (90%) e os proteoglicanos (Seeley et al., 2003; Hernández-Gil et al., 2006). O material inorgânico consiste principalmente em cristais de fosfato de cálcio denominados hidroxiapatite, que apresentam a fórmula molecular $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Seeley et al., 2003; Hernández-Gil et al., 2006; Isola, 2012). A matriz não deve ser vista apenas como um reservatório de cálcio e fósforo, uma vez que constitui um reservatório de proteínas envolvidas na regulação da diferenciação celular e na integridade e função do tecido ósseo (Hernández-Gil et al., 2006).

Os **osteoblastos** são as células extremamente importantes na formação do tecido ósseo, através de um processo denominado de osteogénese. Estas células apresentam um retículo endoplasmático bem desenvolvido e numerosos ribossomas (Seeley et al., 2003; Hernández-Gil et al., 2006; Isola, 2012). Os osteoblastos são os responsáveis pela produção da parte orgânica da matriz óssea, ou seja, do colagénio tipo I, dos proteoglicanos e das glicoproteínas, que são armazenados nas vesículas do aparelho de Golgi e posteriormente libertadas por exocitose (Seeley et al., 2003; Junqueira e Carneiro, 2004; Isola, 2012). Além desta função os osteoblastos formam ainda vesículas que acumulam iões de cálcio (Ca^{2+}), iões

de fosfato (PO_4^{2-}) e várias enzimas que são depois libertados, igualmente por exocitose para serem utilizados na formação de cristais de hidroxiapatite, fundamentais para a mineralização da matriz (Seeley et al., 2003). Estas células são também responsáveis por orientarem a disposição das fibras da matriz extracelular e por sintetizarem fatores de crescimento. A sua semi-vida é de 1 a 10 semanas, ao fim deste tempo elas podem morrer pelo processo de apoptose, ou podem transformar-se em células de revestimento do osso ou em osteócitos (Hernández-Gil et al., 2006; Isola, 2012).

As **células de revestimento** representam os osteoblastos que recobrem superfícies ósseas quiescentes, como tal, possuem escassos organelos de síntese e secreção de proteínas. Estas células formam uma camada contínua de células interligadas capazes de manter a homeostase, regulando a concentração plasmática de cálcio por mecanismos parcialmente independentes dos relacionados com o sistema de remodelação óssea. Embora as células de revestimento tenham origem nos osteoblastos, sob determinados estímulos, este processo pode ser revertido, e estas células diferenciam-se novamente em osteoblastos e consequentemente produzem matriz óssea (Andia et al., 2006).

Os **osteócitos** são células maduras derivadas dos osteoblastos que se encontram no interior das lacunas da matriz óssea, das quais partem canalículos. Estas células são achatadas, exibem pequena quantidade de retículo endoplasmático rugoso, aparelho de Golgi pequeno e núcleo com cromatina condensada (Junqueira e Carneiro, 2004; Andia et al., 2006; Isola, 2012). São as células mais abundantes do tecido ósseo, e o seu número é dez vezes superior ao dos osteoblastos (Andia et al., 2006; Hernández-Gil et al., 2006). Os osteócitos tornam-se relativamente inativos em comparação com a maioria dos osteoblastos na medida em que não conseguem promover a formação de nova matriz óssea. No entanto, têm a capacidade de produzir os componentes necessários para manter a matriz óssea já existente (Seeley et al., 2003). Acredita-se que a principal função destas células seja controlar a remodelação óssea, detetando as variações de cargas mecânicas, um processo conhecido por mecanotransdução (Hernández-Gil et al., 2006). Uma vez que não existe difusão de substâncias através da matriz óssea calcificada, a nutrição dos osteócitos é dependente dos canalículos existentes na matriz. Esta ligação dos osteócitos aos canalículos permite a formação de uma estrutura única, com uma enorme superfície de contacto que assegura as trocas de moléculas de oxigénio e nutrientes entre os capilares sanguíneos e os osteócitos (Junqueira e Carneiro, 2004; Hernández-Gil et al., 2006). Os osteócitos constituem a fase final da linha osteoblástica e são incapazes de se auto renovar (Hernández-Gil et al., 2006; Clarke, 2008).

Os **osteoclastos** são células móveis, de grandes dimensões, multinucleadas, extremamente ramificadas e são as responsáveis pela reabsorção ou destruição óssea (Seeley et al., 2003; Junqueira e Carneiro, 2004; Isola, 2012). Estas células derivam de células estaminais hematopoiéticas denominadas “unidades formadoras de colónias de granulócitos-macrófagos “ (CFU-GM), precursoras de macrófagos e monócitos (Hernández-Gil et al., 2006; Clarke, 2008). Na zona de contacto entre a membrana celular dos osteoclastos e a matriz óssea, formam-se uma membrana pregueada denominada de *ruffled border*, com inúmeras projeções (Seeley et al., 2003). Através desta projeções são libertados iões de hidrogénio que promovem a formação de um meio ácido fundamental para a descalcificação da matriz óssea. Os osteoclastos também libertam enzimas, como a catepsina K, que digerem os componentes proteicos da matriz, que é principalmente composta por colagénio tipo I (Seeley et al., 2003; Clarke, 2008; Isola, 2012). Por endocitose, os osteoclastos, recebem produtos resultantes da reabsorção óssea. Os osteoblastos também contribuem para uma reabsorção ou destruição óssea mais eficiente, produzindo enzimas que degradam a fina camada de matriz orgânica não mineralizada que normalmente cobre o osso, deste modo, os osteoclastos têm um contacto mais eficiente com a matriz óssea mineralizada (Seeley et al., 2003).

1.1.3 Regeneração óssea

O osso é o único tecido, dos vertebrados, capaz de ser reparado, por formação de osso novo, após uma lesão, com a mesma organização estrutural do tecido anterior (Seeley et al., 2003; Hing, 2004; Hernández-Gil et al., 2006).

O processo de regeneração óssea envolve várias etapas (figura 3):

- Em primeiro lugar forma-se um hematoma inicial (com hemácias, plaquetas e fibrina) resultante da lesão do perióstio e dos tecidos moles locais (Hing, 2004; Hernández-Gil et al., 2006);
- Na sequência da interrupção no fornecimento de sangue, devido à lesão do perióstio, os osteócitos mais próximos da fratura morrem, originando uma necrose local em redor da fratura do osso. Em simultâneo começam a organizar-se os mecanismos para a reparação do osso, a estabilização da área danificada e a remoção do tecido morto (Hing, 2004);

- Como resposta, os macrófagos, fibroblastos, fatores de crescimento e citocinas, são recrutados para o local. Os macrófagos encarregam-se da limpeza do local, removendo os restos de tecido. Os fibroblastos são os responsáveis por sintetizarem nova matriz celular. Os fatores de crescimento e as citocinas, promovem o recrutamento das células mesenquimais, a partir da medula óssea e do perióstio, para que estas proliferem e se diferenciem em células osteoprogenitoras (Hing, 2004; Hernández-Gil et al., 2006);
- Há assim um espessamento aparente do perióstio e a produção do calo. As células osteoprogenitoras que se encontram junto do local lesado diferenciam-se em osteoblastos e formam o osteóide que é rapidamente calcificado no osso, enquanto, os condroblastos derivados das células progenitoras osteocondrais do perióstio e do endóstio, começam a produzir a cartilagem (Seeley et al., 2003; Hing, 2004);
- A angiogénese é induzida imediatamente após a formação da cartilagem e há estabilização do local lesado. A porção de tecido é substituída por osso esponjoso, através da ossificação endocondral (Hing, 2004);
- O material não calcificado é reabsorvido e o novo osso é depositado. Ocorre a remodelação do tecido ósseo em osso lamelar. O processo finaliza com o retorno da medula óssea para o interior das regiões esponjosas (Hing, 2004).

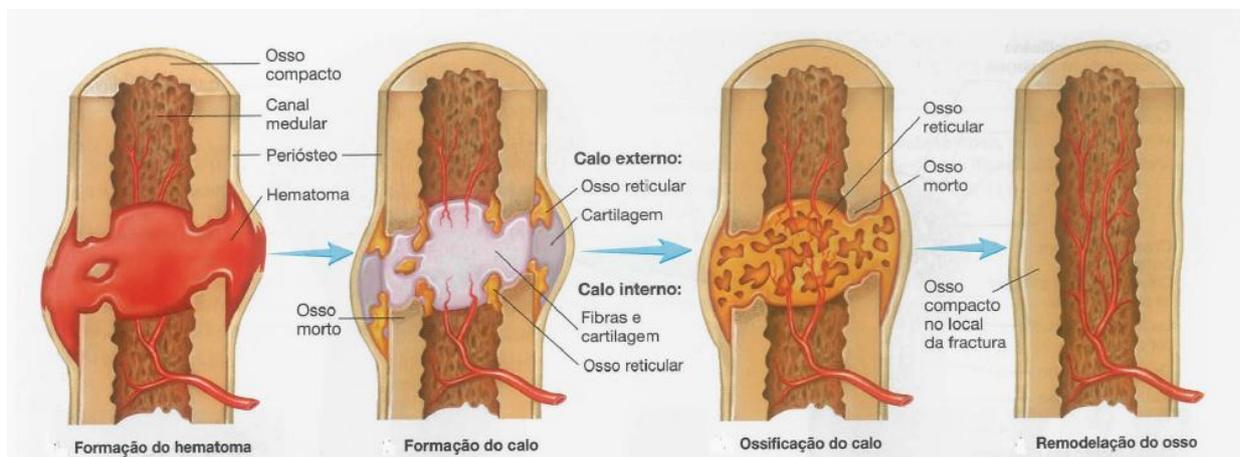


Figura 3: Etapas da regeneração óssea. Adaptado de (Seeley et al., 2003).

Embora o organismo disponha deste mecanismo espontâneo para regenerar uma lesão, quando esta é de dimensões elevadas, o organismo não tem a capacidade de as reparar totalmente. Assim, tendo por objetivo a melhoria do processo reparativo e regenerativo, foram desenvolvidos materiais que auxiliam a resposta biológica do organismo.

1.2 Biomateriais

Os materiais utilizados para substituição e regeneração da estrutura óssea pertencem à classe de materiais denominados de biomateriais (Guastaldi e Aparecida, 2010). Os biomateriais são substâncias de origem natural ou sintética, tolerados de forma transitória ou permanente pelos diversos tecidos dos seres vivos. Estes devem ser inertes, degradáveis e absorvíveis e favorecerem o crescimento ósseo por condução e, se possível, por indução. Estas características dependem das propriedades físicas e químicas do material, que devem ser compatíveis com as reações fisiológicas do osso (Vital et al., 2006).

Vários biomateriais têm sido projetados para substituir partes do corpo e permitir a recuperação de funções biológicas provenientes de doenças ou acidentes. A biocompatibilidade, aceitação do material pelo corpo, e a biofuncionalidade, habilidade do material desempenhar a função desejada, são características necessárias para que estes materiais exerçam adequadamente essas funções (Gutierrez et al., 2006; Costa et al., 2009).

Todas estas características conferem ao biomaterial uma interação benéfica com o organismo onde é implantado, desde que:

- Quando implantado *in vivo*, o material não desencadeie resposta inflamatória sustentada ou tóxica;
- O seu tempo de degradação possibilite a ocorrência do processo de regeneração;
- O material contenha as propriedades mecânicas adequadas à sua aplicação, e que no caso destas se alterarem no momento da sua degradação *in vivo*, sejam compatíveis com o processo de regeneração;
- A sua degradação não gere produtos tóxicos, e que os produtos que forem gerados sejam facilmente metabolizados e libertados pelo organismo (Oliveira et al., 2010).

De uma forma geral, os biomateriais podem ser classificados segundo a sua composição e o seu comportamento biológico. Segundo a sua composição química, estes podem ser divididos em quatro classes: metais e ligas metálicas, cerâmicas, polímeros e por último os compósitos (Gutierrez et al., 2006). Com base na resposta induzida pelos biomateriais ao meio biológico, estes podem ser classificados em bioinertes, biotoleráveis e bioativos (figura 4). A resposta dos materiais bioinertes e biotoleráveis, em relação ao tecido ósseo, consiste na encapsulação do implante por uma camada de tecido fibroso não aderente, impedindo assim a interação direta entre implante e tecido, podendo levar à instabilidade e

falha (Guastaldi e Aparecida, 2010). Já os materiais bioativos apresentam a capacidade de interagir intimamente com o tecido vivo sem a intervenção do tecido fibroso. Nestes existe a formação de uma ligação direta entre os tecidos vivos, pois geralmente, têm na sua composição, íons de cálcio e/ou fósforo (no caso dos substitutos ósseos) que estabelecem uma ponte química com o osso envolvente. A hidroxiapatite é um exemplo destes biomateriais (Gutierrez et al., 2006; Guastaldi e Aparecida, 2010).

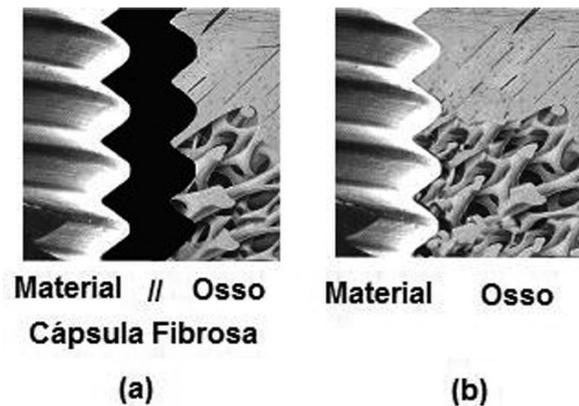


Figura 4: Comportamento biológico dos biomateriais: a) bioinertes e biotoleráveis e b) bioativos (Guastaldi e Aparecida, 2010).

As cerâmicas da família dos fosfatos de cálcio são a classe dos materiais mais importantes na regeneração óssea e também as mais estudadas (Cardoso et al., 2012). Das suas vantagens destacam-se: o facto de apresentarem uma estrutura semelhante ao componente inorgânico do osso, de serem biocompatíveis e osteocondutivas. As suas principais limitações devem-se à sua baixa rigidez estrutural, impedindo o seu uso em regiões com grande esforço mecânico, e à sua natureza porosa, que aumenta o risco de fraturas. A hidroxiapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) e o fosfato tricálcico β ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), são as principais cerâmicas disponíveis comercialmente para a reparação e substituição óssea (Oliveira et al., 2010).

1.2.1 Hidroxiapatite

A hidroxiapatite tem sido alvo de vários estudos devido ao facto de ser o principal constituinte da porção inorgânica do osso (figura 5) (Costa et al., 2009).

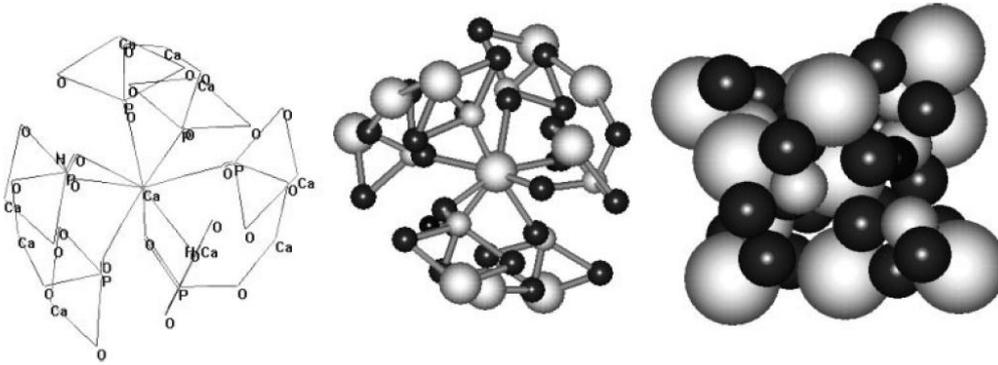


Figura 5: Modelo espacial da molécula de hidroxiapatite com cálcio como átomo central (Ca, esfera branca maior; O, esfera preta pequena; P, esfera branca pequena; H, esfera preta menor). Adaptado de (Gutowska et al., 2005).

Estudos cristalográficos e químicos demonstraram que a hidroxiapatite sintética é semelhante ao componente inorgânico encontrado nos ossos e dentes. Devido a esta semelhança, desde o século xx, que as pesquisas se tem direcionado para a utilização da hidroxiapatite sintética como um substituto ósseo e /ou de substituição em várias aplicações biomédicas (Cardoso et al., 2012). A hidroxiapatite sintética tem sido amplamente usada na medicina e na medicina dentária para a reparação de tecidos ósseos devido às suas propriedades de biocompatibilidade e osteointegração (Vital et al., 2006; Costa et al., 2009). Esta molécula é ainda vantajosa devido à sua composição uniforme, à ausência de toxicidade tanto local como sistémica, à ausência de respostas inflamatórias e aparente habilidade em estabelecer uma ligação química com o tecido ósseo do hospedeiro. O facto da sua microestrutura, tamanho dos poros, ser completamente controlável é ainda outra vantagem. A estrutura porosa da hidroxiapatite funciona como suporte passivo à neoformação vascular, o que conduz à proliferação de fatores indutores da aposição óssea (Vital et al., 2006; Guastaldi e Aparecida, 2010).

Apesar de este biomaterial apresentar inúmeras vantagens o seu uso clínico tem sido limitado devido à sua lenta biodegradação. Vários estudos têm demonstrado que a sua reabsorção gradual só se inicia 4 a 5 anos após a implantação. A reabsorção é uma característica desejada para biomateriais nos quais o processo de degradação é concomitante com a reposição do osso em formação (Guastaldi e Aparecida, 2010).

1.2.1.1 Nanopartículas e hidroxiapatite nanoestruturada

Nas duas últimas décadas, a nanotecnologia tem entrado no campo da medicina regenerativa, resultando no desenvolvimento de biomateriais nanoestruturados capazes de coordenar o comportamento celular (Cardoso et al., 2012). Além desta área a nanotecnologia tem tido avanços significativos nas principais aplicações biomédicas, incluindo as áreas da terapia gênica, diagnóstico de imagem, e liberação controlada de fármacos no tratamento de doenças como a diabetes e o cancro (Abdel-Gawad e Awwad, 2010; Subramani et al., 2012). Uma vez que o osso é naturalmente nanoestruturado, a aplicação de biomateriais nanoestruturados para a regeneração óssea está a ganhar cada vez mais interesse na área de investigação da pesquisa dos biomateriais (Abdel-Gawad e Awwad, 2010; Chiara et al., 2012). Um nanomaterial pode ser definido como um material que é composto por partes funcionais, com uma ou mais dimensões inferiores a 100 nm (Cardoso et al., 2012). As vantagens dos biomateriais nanoestruturados residem no seu pequeno tamanho, na sua alta porosidade e elevada área de superfície. Esta aumenta a adsorção das proteínas adesivas que medeiam as interações entre a célula e a superfície do material (Zhang e Webster, 2009; Chiara et al., 2012).

Substitutos ósseos de materiais nanoestruturados podem aumentar a atividade e a proliferação das células ósseas de modo mais eficiente, de forma a estimular o crescimento ósseo, em comparação com materiais convencionais (figura 6) (Zhang e Webster, 2009).

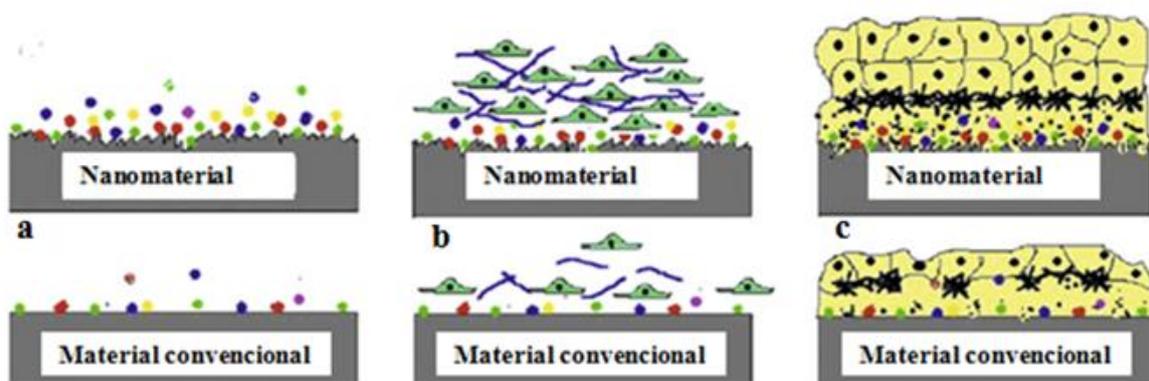


Figura 6: Ilustração esquemática do mecanismo pelo qual os nanomateriais podem ser superiores aos materiais convencionais na regeneração óssea; a) Adsorção imediata das proteínas ao material; b) Ligação dos osteoblastos e proliferação; c) Diferenciação dos osteoblastos e remodelação óssea. Adaptado de (Zhang e Webster, 2009).

As nanopartículas de materiais cerâmicos, especialmente as nanopartículas de hidroxiapatite (nano-HAp), são dos materiais com maior potencialidade de aplicação, devido às vantagens previamente enumeradas, bem como pela sua capacidade de promoverem a mineralização da matriz extracelular, no microambiente ósseo (Zhang e Webster, 2009).

No entanto, estudos recentes têm demonstrado que as nanopartículas de hidroxiapatite poderão apresentar alguma biotoxicidade, que poderá estar relacionada com o diâmetro das partículas, a dose de exposição e o modo de contacto, sendo no entanto, na maioria dos casos, desconhecida a razão da sua toxicidade (Abdel-Gawad e Awwad, 2010; Cardoso et al., 2012). O destino final das nanopartículas dentro do organismo é ainda desconhecido, como tal, é crucial a sua avaliação antes do seu uso em aplicações clínicas (Motskin et al., 2009).

1.2.2 Resposta biológica aos biomateriais

O processo de implantação assim como a presença permanente de um biomaterial, uma prótese ou um dispositivo médico resulta na lesão dos tecidos ou órgãos nos quais estes são implantados (Anderson, 2001; Onuki et al., 2008). Após a lesão ocorre uma sequência de reações do hospedeiro que incluem as interações sangue-material, a formação da matriz provisória, a inflamação aguda, a inflamação crónica, o desenvolvimento do tecido de granulação, a reação ao corpo estranho e a fibrose/desenvolvimento da cápsula fibrosa (figura 7) (Anderson, 2001; Anderson et al., 2008).

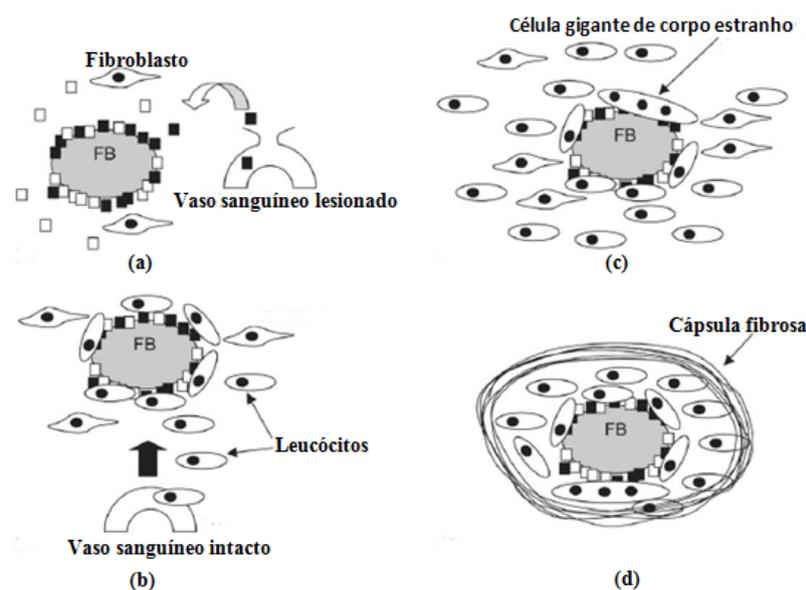


Figura 7: Etapas da reação ao corpo estranho (FB): (a) adsorção das proteínas do sangue e do fluido tecidual; (b) migração de leucócitos; (c) proliferação de macrófagos e fibroblastos; (d) formação da cápsula fibrosa. Adaptado de (Fournier et al., 2003).

As **interações sangue-material** são inevitavelmente criadas após a implantação do material. Ocorre assim uma adsorção não específica de proteínas do sangue e do fluido tecidual sobre toda a superfície do material implantado (Fournier et al., 2003; Morais et al., 2010; Anderson e McNally, 2011).

A **formação da matriz provisória** no local do implante é desencadeada após a lesão do tecido vascularizado aquando do implante. Esta matriz consiste em fibrina, produzida pela ativação dos sistemas de coagulação e trombose, e produtos inflamatórios, resultantes da ativação sistema complemento, ativação plaquetária, e recrutamento e ativação de células endoteliais e da resposta imunológica (Anderson, 2001; Ratner et al., 2004). Durante a formação desta rede, as plaquetas ativadas libertam o fator 4 plaquetário, o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento de transformação β (TGF- β), que contribuem para o recrutamento de fibroblastos, essenciais para o processo de reparação (Anderson, 2001). Foi demonstrado que a fibrina, o maior componente da matriz provisória, desempenha um papel chave no desenvolvimento da neovascularização (Anderson, 2001).

A **inflamação** é, geralmente, definida como a reação do tecido vivo vascularizado a uma lesão local. A inflamação permite que ocorram uma série de processos que podem cicatrizar e reconstituir o local do implante através da substituição do tecido lesionado pela regeneração das células parenquimatosas nativas, formação de tecido cicatrizado fibroblástico, ou uma combinação dos dois processos (Anderson, 2001; Ratner et al., 2004). Existe uma série de fatores químicos libertados a partir do plasma, das células ou do tecido lesionado que medeiam a resposta inflamatória (Anderson, 2001; Ratner et al., 2004). O tipo de células predominantemente presentes na resposta inflamatória varia com a idade da lesão (figura 8). Em geral, os neutrófilos predominam durante os primeiros dias após a lesão sendo depois substituídos, maioritariamente, por monócitos, que rapidamente se diferenciam em macrófagos, as principais células responsáveis pela cicatrização normal na reação ao corpo estranho (Anderson, 2001).

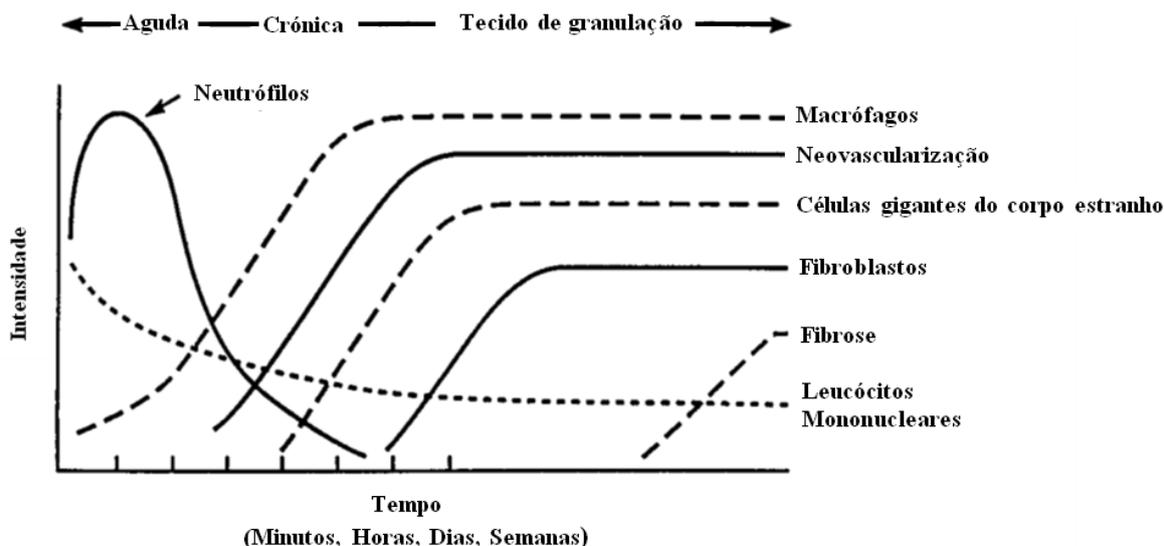


Figura 8: Variação temporal na resposta inflamatória aguda, resposta inflamatória crônica e desenvolvimento do tecido de granulação a biomateriais implantados. Adaptado de (Anderson, 2001).

O tamanho, a forma e as propriedades químicas e físicas do biomaterial podem ser responsáveis por variações na intensidade e duração do processo inflamatório ou cicatrização das lesões. Assim, a intensidade e/ou tempo de duração da reação inflamatória pode modular a biocompatibilidade de um biomaterial (Ratner et al., 2004).

No âmbito do processo inflamatório, o controlo rigoroso do seu início e término são cruciais. Este controlo é mediado, maioritariamente, por proteínas solúveis, como as citocinas e os fatores de crescimento, que atuam entre as células inflamatórias e as células não hematopoiéticas, tais como os fibroblastos e as células endoteliais vasculares, no interior do tecido lesado (Villarreal et al., 2001).

A resposta inflamatória aguda, no caso dos biomateriais e dependendo da extensão da lesão e do local do implante, tem uma duração relativamente curta, normalmente menos de uma semana, e inicia-se alguns minutos, ou no máximo, algumas horas após a lesão (Anderson, 2001; Villarreal et al., 2001; Anderson et al., 2008; Onuki et al., 2008; Boccafoschi et al., 2012). Este tipo de inflamação tem como características principais a exsudação de fluidos e proteínas plasmáticas (edema) e a migração de leucócitos polimorfonucleares (PMNs), predominantemente neutrófilos e, em menor grau, eosinófilos (Anderson, 2001; Ratner et al., 2004; Onuki et al., 2008; Anderson e McNally, 2011; Boccafoschi et al., 2012). O principal papel dos neutrófilos na inflamação aguda é a fagocitose de microrganismos e materiais estranhos. No processo de fagocitose os neutrófilos reconhecem o agente estranho, ligam-se a ele e envolvem-no de modo a proceder à sua morte

ou degradação. No caso dos biomateriais o processo de envolvimento e degradação nem sempre ocorre, tudo depende das propriedades do biomaterial (Anderson, 2001; Ratner et al., 2004). Existe uma variedade de fatores que colaboram na migração dos leucócitos da circulação para o local da lesão. Para além das alterações no fluxo sanguíneo e o aumento da permeabilidade vascular, as células endoteliais promovem a localização e retenção dos leucócitos pela expressão de moléculas de adesão e agentes quimiotáticos (Villarreal et al., 2001).

Em geral, a **resposta inflamatória crónica** é caracterizada pela presença de monócitos, macrófagos, e linfócitos, com a proliferação de vasos sanguíneos e tecido conjuntivo que reestruturam a área lesada. Este tipo de resposta é proveniente da persistência de estímulos inflamatórios, tais como a presença permanente de um corpo estranho. Histologicamente a resposta inflamatória crónica é menos uniforme que a aguda (Anderson, 2001; Ratner et al., 2004; Anderson et al., 2008; Onuki et al., 2008; Morais et al., 2010; Anderson e McNally, 2011; Boccafoschi et al., 2012). A resposta inflamatória crónica produzida pelos biomateriais tanto pode ser provocada pelas suas propriedades físicas e químicas, quanto pelo movimento dos mesmos no local do implante. Esta resposta é confinada ao local do implante (Anderson, 2001; Ratner et al., 2004). Devido ao elevado número de produtos biologicamente ativos que produzem, os macrófagos são provavelmente as células mais importantes da inflamação crónica (Anderson, 2001). As classes mais importantes de produtos produzidos pelos macrófagos incluem as proteases neutras, os fatores quimiotáticos, os metabolitos do ácido araquidónico e de oxigénio reativo, os componentes do complemento, os fatores de coagulação, os fatores promotores de crescimento e as citocinas (Anderson, 2001). Nas situações em que as células macrofágicas são incapazes de fagocitar o material, fundem-se originando células gigantes multinucleadas, as células gigantes de corpo estranho (FBGC) (Fournier et al., 2003; Boccafoschi et al., 2012).

A **formação do tecido de granulação**, é caracterizada pela formação de novos vasos sanguíneos (angiogénese), por células endoteliais vasculares e pela produção de matriz extracelular por monócitos, macrófagos e fibroblastos no local do implante (Anderson, 2001; Ratner et al., 2004; Boccafoschi et al., 2012). Os fibroblastos são os responsáveis pela síntese de proteoglicanos, que predominam numa fase inicial, e de colagénio, predominante numa fase posterior, especialmente o colagénio tipo I que constitui a cápsula fibrosa (Anderson, 2001; Fournier et al., 2003; Anderson e McNally, 2011). Dependendo da extensão da lesão, o tecido de granulação pode ser observado três a cinco dias após o implante do biomaterial (Anderson, 2001; Ratner et al., 2004). O tecido de granulação apenas se forma quando há

perda ou perturbação da arquitetura do tecido, de tal modo, que o processo de cicatrização não possa restaurar completamente a área lesada (Anderson e McNally, 2011)

A **reação ao corpo estranho (FBR)** é composta por células gigantes do corpo estranho e os componentes do tecido de granulação (como por exemplo; os macrófagos, os fibroblastos, e os capilares em quantidades variáveis, dependendo da forma e da topografia do material implantado) (Anderson, 2001; Ratner et al., 2004; Anderson e McNally, 2011). O grau e a extensão desta reação dependem das propriedades do dispositivo, tais como: a forma, o tamanho, a química e a rugosidade da superfície, a morfologia, a porosidade, a composição, as questões de esterilidade, a duração do contato e a degradação (Onuki et al., 2008; Morais et al., 2010; Boccafoschi et al., 2012). Em geral, os biomateriais de superfície lisa ou plana exibem uma fina camada de macrófagos com fibrose, em comparação com biomateriais de elevada rugosidade e biomateriais porosos, que apresentam maior número de macrófagos e FBGC (Anderson e McNally, 2011).

Em geral, a **fibrose/desenvolvimento da cápsula fibrosa** é a etapa final da reparação de uma lesão provocada pelo implante de um biomaterial (Anderson, 2001; Ratner et al., 2004; Boccafoschi et al., 2012). Esta cápsula, como já foi referido anteriormente, é constituída por colagénio e proteoglicanos. Embora esta cápsula não signifique um estado de não biocompatibilidade, a sua presença é altamente indesejável, uma vez que dificulta o fornecimento de oxigénio e nutrientes para as células encapsuladas (Fournier et al., 2003; Morais et al., 2010).

Os fatores locais e sistémicos podem intervir na resposta de reparação de lesões provocadas por biomateriais ou implantes. Os fatores locais incluem o local do implante, o adequado suprimento do fluxo sanguíneo e o potencial da infeção. Os fatores sistémicos incluem a nutrição, distúrbios hematológicos e imunológicos e doenças pré-existentes como a aterosclerose e a diabetes (Anderson, 2001).

1.3 Diabetes

A prevalência mundial de diabetes *mellitus* aumentou drasticamente nas últimas duas décadas, passando de aproximadamente 30 milhões de casos em 1985 para 177 milhões em 2000. Para 2030 prevê-se a existência de mais de 360 milhões de indivíduos com diabetes (Fauci et al., 2009).

A diabetes *mellitus* engloba um grupo de doenças caracterizada por uma hiperglicemia plasmática provocada: pela deficiência da produção de insulina e/ou da ação da insulina (Kuzuya et al., 2002; Fauci et al., 2009; Association, 2011). Das múltiplas causas que estão na origem da diabetes os fatores genéticos e ambientais (sedentarismo, obesidade, dieta hipercalórica) são os que apresentam um papel mais relevante na sua etiologia (Duarte, 2002; Kuzuya et al., 2002). Pacientes com hiperglicemia ligeira podem ser assintomáticos enquanto pacientes com uma evidente hiperglicemia apresentam como sintomas: a poliúria, a polidipsia e a perda de peso muitas vezes acompanhada de polifagia e visão turva (Kuzuya et al., 2002; Association, 2011; Subramani et al., 2012). Em casos extremos de hiperglicemia podem ocorrer a cetoacidose ou a hiperglicemia-hiperosmolar que se não forem tratadas de uma forma adequada podem conduzir ao coma ou até mesmo à morte. Esta acidez do sangue, a cetoacidose, é resultante da formação de corpos cetónicos, compostos químicos tóxicos, provenientes da decomposição das células gordas. A diabetes acelera e agrava a ocorrência da arteriosclerose, aumentando o risco da ocorrência de enfartes do miocárdio e cerebrais, sendo estas complicações as principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes diabéticos (Kuzuya et al., 2002; Altman et al., SD).

1.3.1 Tipos de diabetes

Segundo a sua etiologia a diabetes pode ser classificada em diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, diabetes gestacional e outros tipos específicos que incluem defeitos genéticos das células β e defeitos genéticos da ação da insulina entre outros. Embora exista esta diversidade de tipos de diabetes, atualmente, os dois principais tipos de diabetes são a diabetes tipo 1 e a diabetes tipo 2. Cerca de 85 a 90% dos pacientes com diabetes tem diabetes tipo 2 e apenas 5 a 10 % tem diabetes tipo 1 (Kuzuya et al., 2002; Chatzigeorgiou et al., 2009). Apesar de se verificar um aumento de ambos os tipos de diabetes, devido ao aumento da obesidade e sedentarismo, tem-se verificado um aumento mais rápido do tipo 2 (Fauci et al., 2009). Ainda que a etiopatogenia dos dois tipos de diabetes seja diferente, ambos os tipos estão relacionados com características genéticas do indivíduo sendo a carga deste fator muito superior na diabetes tipo 2 (Duarte, 2002; Association, 2011).

A **diabetes tipo 1** é caracterizada por uma deficiência absoluta de insulina devida, na sua maioria, à destruição autoimune das células β pancreáticas, que são mais numerosas nos ilhéus de Langerhans, embora também possa ser provocada pela perda de tecido pancreático

(Duarte, 2002; Kidambi e Patel, 2008; Association, 2011; King, 2012). Esta destruição irreversível das células β provoca uma insuficiente insulino-secreção, sendo indispensável a insulino-terapia para a sobrevivência do paciente (Duarte, 2002; Altman et al., SD). Os marcadores de destruição imunológica das células β podem ser os autoanticorpos das células de ilhéus, os autoanticorpos para a insulina, os autoanticorpos do ácido glutâmico descarboxilase (GAD), e os autoanticorpos para a tirosina fosfatase IA-2 e IA-2 β . Dos indivíduos em que a hiperglicemia de jejum é inicialmente detetada, 85-90% apresentam um ou mais destes autoanticorpos (Chatzigeorgiou et al., 2009; Kirsten et al., 2010; Association, 2011). Apesar deste tipo de diabetes ser mais comum em indivíduos com menos de 30 anos de idade, o processo auto-imune destrutivo das células β pode instalar-se em qualquer idade (Fauci et al., 2009; King, 2012; Altman et al., SD). A taxa de destruição das células β pancreáticas pode ser muito variável, podendo ser rápida em pacientes mais jovens, como os bebês e as crianças e lenta em adultos. Normalmente, em crianças e adolescentes a primeira manifestação da doença é a cetoacidose. Os adultos podem manter os níveis residuais de função das células β prevenindo assim o aparecimento da cetoacidose por alguns anos (Association, 2011). Pacientes com este tipo de diabetes apresentam uma maior suscetibilidade para desenvolver complicações microvasculares e macrovasculares (Kidambi e Patel, 2008).

A **diabetes tipo 2** caracteriza-se por uma combinação da diminuição da secreção de insulina e diminuição da sensibilidade à insulina. Para que se possa confirmar o diagnóstico da diabetes tipo 2 é necessário que ambas as condições estejam presentes (Kuzuya et al., 2002; Association, 2011). Existem inúmeras e complexas causas de resistência à ação de insulina entre elas destacam-se: a produção de insulina anormal pelas células β , a circulação de antagonistas da insulina e os defeitos nas células alvo (Duarte, 2002). Numa fase inicial da doença e mesmo ao longo da sua vida, muitas vezes, os pacientes não necessitam de tratamento com insulina para sobreviverem. Alguns pacientes conseguem obter um controlo glicémico adequado apenas com alterações no estilo de vida, tais como a perda de peso e a prática de exercício físico (Kidambi e Patel, 2008; Association, 2011). A diabetes tipo 2 é mais frequente a partir dos 30 anos de idade mas recentemente tem aparecido em crianças e adolescentes, devido ao aumento da obesidade (King, 2012; Altman et al., SD). Os pacientes que apresentam este tipo de diabetes são por norma obesos o que potencia o desenvolvimento de algum grau de resistência à insulina. Espontaneamente estes pacientes não apresentam cetoacidose, mas quando presente ela está, normalmente, associada a outras patologias como infeções (Kuzuya et al., 2002; Association, 2011).

1.3.2 Regulação do metabolismo da glicose

Existem múltiplos fatores que regulam o nível de glicose no sangue, entre estes fatores destacam-se como reguladores chave: a insulina e o glucagon, duas hormonas produzidas nos ilhéus de Langerhans (Duarte, 2002; Layden et al., 2010). A produção de glicose no fígado é também regulada por estas duas hormonas, o glucagon ativa o processo, quer por degradação do glicogénio em glicose quer por síntese de novo da glicose, já a insulina suprime-o bloqueando a nível hepático a neoglicogénese (figura 9) (Duarte, 2002)

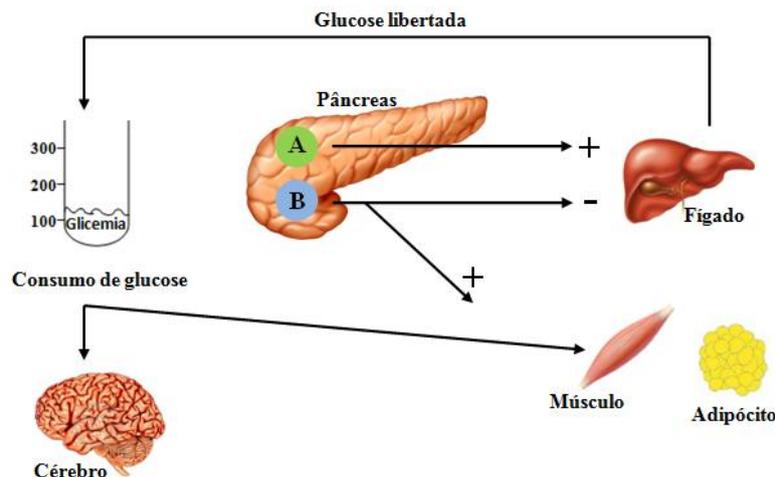


Figura 9: Regulação da glicemia pelo pâncreas e fígado. A-Glucagon, B-Insulina. Adaptado de (Duarte, 2002).

Para promover a libertação de insulina as células β pancreáticas captam a glicose através do transportador de glicose GLUT2 presente na sua membrana. A metabolização da glicose no interior das células β conduz ao aumento da produção de ATP, que por sua vez, aumenta a razão de ATP/ADP. O aumento desta razão provoca o fecho dos canais de potássio (K) na membrana das células e subsequente despolarização da célula. O fecho dos canais de K e a despolarização celular permite que haja a abertura dos canais de cálcio e consequente fluxo de cálcio para o interior das células. Esta acumulação de cálcio provoca a secreção de insulina para a corrente sanguínea (figura 10) (Duarte, 2002; Layden et al., 2010; Skelin et al., 2010). A insulina libertada vai atuar sobre as células de uma variedade de tecidos, nomeadamente do fígado, musculo e adipócitos.

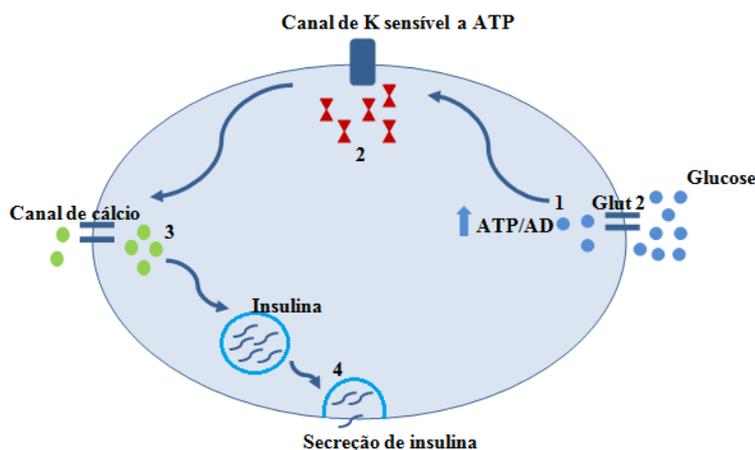


Figura 10: Mecanismo de produção de insulina nas células β pancreáticas. O aumento da glucose intracelular conduz ao aumento da produção de ATP, e de um aumento da razão ATP/ADP (1), o aumento da razão de ATP/ADP leva ao fecho dos canais de potássio (K) e despolarização da célula (2), com a despolarização da célula há abertura dos canais de cálcio (3) que levam a secreção de insulina (4). Adaptado de (Layden et al., 2010).

1.3.3 Fisiopatologia da diabetes *mellitus*

A diabetes tipo 1 é uma das doenças autoimunes mais comuns, resultante da destruição das células β produtoras de insulina (Culina et al., 2013). Embora a etiologia da diabetes tipo 1 seja extensamente estudada, os mecanismos envolvidos na iniciação e progressão da destruição autoimune das células β ainda não estão totalmente elucidados (Yoon e Jun, 2005; Culina et al., 2013). No entanto, o papel de várias células do sistema imunológico envolvidas neste processo parece estar esclarecido, nomeadamente dos linfócitos T ($CD4^+$ e $CD8^+$), linfócitos B, auto-antígenos das células β , macrófagos e células dendríticas (Yoon e Jun, 2005). Tem sido proposto que as células β apoptóticas possivelmente participam na iniciação da resposta autoimune, particularmente na apresentação do auto-antígeno (Vega-Monroy e Fernandez-Mejia, 2011). Nos ilhéus pancreáticos os auto-antígenos das células β ativam as células apresentadoras de antígeno. Estas células por sua vez vão ativar as células T $CD4^+$ auto-reativas no sistema linfóide periférico (Yoon e Jun, 2005; Vega-Monroy e Fernandez-Mejia, 2011). Estas células T $CD4^+$ auto-reativas são ativadas e segregam citocinas, as quais podem ativar as células T $CD8^+$ citotóxicas específicas das células β . As células T ativadas são recrutadas para os ilhéus pancreáticos onde produzem citocinas inflamatórias, que ativam ainda mais macrófagos e outras células T que contribuem para a destruição das células β (Yoon e Jun, 2005; Culina et al., 2013). A ativação dos fatores de transcrição $NF\kappa\beta$ e STAT-1, pelas citocinas inflamatórias, conduzem a uma diminuição da expressão da PDX1 e dos

GLUT2, levando a uma insuficiente produção e secreção de insulina. A ativação dos fatores de transcrição NF κ B e STAT-1 também desencadeia stress do retículo endoplasmático (RE), processos apoptóticos e liberação de citocinas (IL1 β e o IFN γ) pelas células β , conduzindo assim a um ciclo vicioso de inflamação/destruição das células β , que mantém e, eventualmente, amplificam o ataque autoimune (figura 11) (Vega-Monroy e Fernandez-Mejia, 2011)

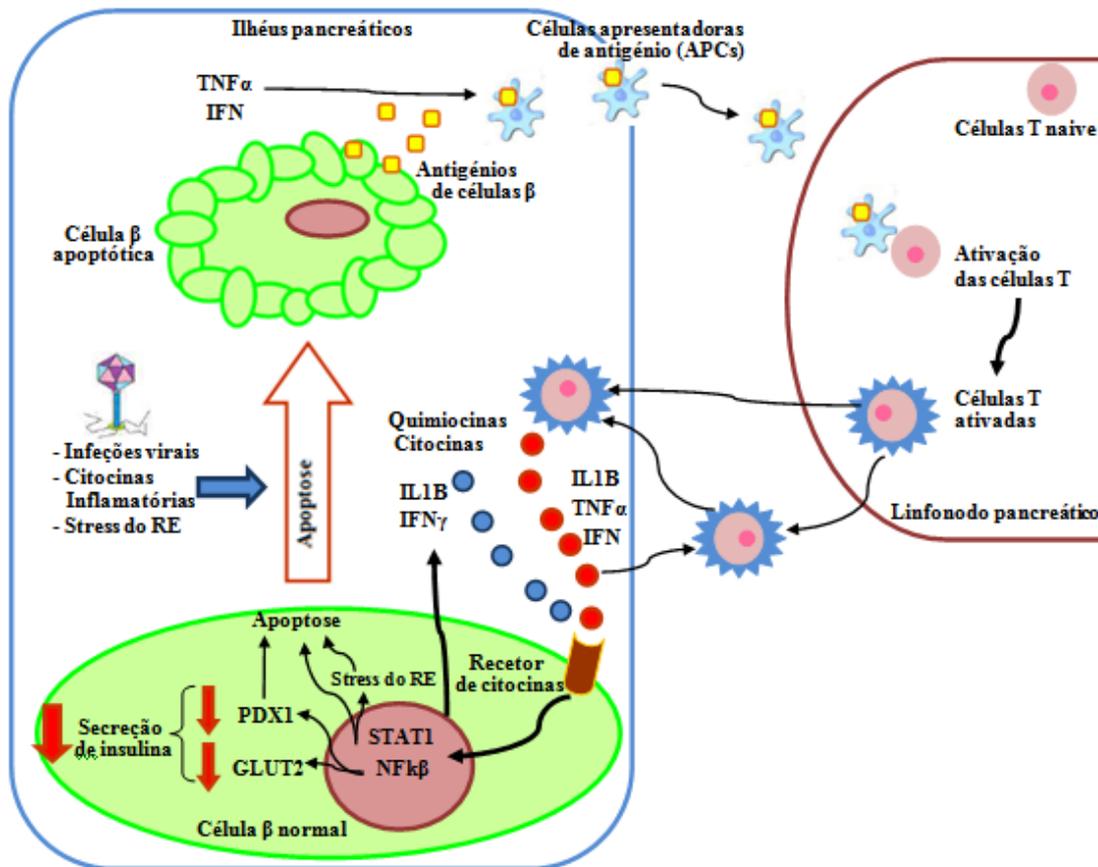


Figura 11: Mecanismo de destruição das células β produtoras de insulina na diabetes tipo 1. Adaptado de (Vega-Monroy e Fernandez-Mejia, 2011).

1.3.4 Efeito da diabetes no metabolismo e reparação/regeneração óssea

A diabetes *mellitus* está associada a múltiplas complicações que envolvem quase todos os tecidos do organismo, incluindo os ossos. Clinicamente e experimentalmente, tem sido demonstrado que esta patologia afeta o metabolismo e a remodelação óssea, bem como a reparação do tecido ósseo lesado. Na clínica humana, muitas vezes a diabetes, é associada à redução da massa óssea, a uma maior probabilidade de fraturas e a um atraso na recuperação

das mesmas. Experimentalmente, animais diabéticos, apresentam uma cicatrização demorada e menor resistência mecânica, quando comparados com animais controlo (Funk et al., 2000; Graves et al., 2011). O impacto da diabetes nos acontecimentos celulares da reparação das fraturas encontram-se resumido na tabela 1 (Graves et al., 2011).

Tabela 1: Alterações provocadas pela diabetes na reparação de fraturas. Adaptado de (Graves et al., 2011).

Alterações a nível estrutural	Alterações a nível molecular
<ul style="list-style-type: none"> • Reduzida formação óssea • Reduzida formação de cartilagem • Perda acelerada de cartilagem • Reduzida vascularização e angiogénese 	<ul style="list-style-type: none"> • Reduzida expressão dos fatores de crescimento • Reduzida expressão das proteínas da matriz • Expressão aumentada de genes pró-inflamatórios • Expressão aumentada de genes pró-apoptóticos • Expressão aumentada de fatores pró-osteoclastogénicos

A osteopenia é uma das principais complicações em pacientes diabéticos e ocorre em associação com a diabetes tipo 1. Pacientes com esta patologia apresentam alterações no metabolismo e nas propriedades biomecânicas do tecido ósseo (Santana et al., 2003; Parizi et al., 2010). Parizi e seus colaboradores (2010), relatam que a presença de diabetes retarda a regeneração de lesões ósseas e ainda que a hidroxiapatite tem um efeito positivo na regeneração dessas mesmas lesões.

A diabetes também provoca alterações na função leucocitária, debilitando o processo inflamatório, o que acaba por comprometer o processo de cicatrização, formação e remodelação óssea em pacientes diabéticos (Sakakura et al., 2005). A atividade dos neutrófilos encontra-se alterada devido à diminuição da quimiotaxia, aderência, fagocitose e destruição intracelular. Estas alterações são provocadas, em parte, pela hiperglicemia e acumulação de AGEs (produtos finais de glicosilação avançada), que provocam a ativação contínua dos leucócitos polimorfonucleares, com ativação espontânea da cadeia oxidativa e libertação de mieloperoxidase, elastase e outros elementos dos grânulos neutrofílicos (Alba-Loureiro et al., 2007; Alves et al., 2007).

1.3.5 Modelos animais de diabetes experimental

Os modelos animais de diabetes têm sido amplamente usados para a aumentar o esclarecimento sobre esta doença. A diabetes tipo 1 pode ser induzida cirurgicamente,

quimicamente ou utilizando modelos experimentais de diabetes espontâneo (Etuk, 2010; Kirsten et al., 2010). Embora a remoção cirúrgica do pâncreas seja um método eficaz, para induzir diabetes, pelo menos 90-95% do pâncreas deve ser removido (Abeeleh et al., 2009). Além disso, esta técnica requer um elevado conhecimento técnico e adequado à cirurgia, para além do elevado risco de infeção dos animais (Etuk, 2010).

A indução química da diabetes, em animais experimentais, ocorre após a destruição química seletiva das células β pancreáticas (Kirsten et al., 2010; King, 2012). O aloxano e a estreptozotocina (STZ) são as substâncias mais utilizadas para a indução química nos ratos, murganhos e coelhos (Kirsten et al., 2010). Estes fármacos, que apresentam toxicidade seletiva, são administrados em doses que dependem da espécie do animal, da via de administração e do peso do animal (Etuk, 2010; Kirsten et al., 2010; Rohilla e Ali, 2012; Sakata et al., 2012). Ambos os fármacos podem ser administrados por via parenteral (intravenosa, intraperitonal ou subcutânea) (tabela 2) (Etuk, 2010; Rohilla e Ali, 2012).

A STZ é semelhante à glucose na medida em que é transportado pelo transportador de glucose GLUT2, mas não é reconhecido pelos outros transportadores (Sakata et al., 2012). A ação intracelular da STZ provoca alterações no DNA das células β conduzindo à sua fragmentação (Szkudelski, 2001). A STZ pode ser administrada por dois métodos: uma única administração ou múltiplas administrações com dose baixa (Szkudelski, 2001; King, 2012; Sakata et al., 2012). Embora o método de administração única seja mais prático, este método é instável em termos de condições diabéticas e causa a morte súbita a cerca de 10% a 20% dos animais devido a elevação de glucose no sangue e à toxicidade da STZ. Em contrapartida o método de múltiplas administrações permite obter um estado de hiperglicemia, minorando a mortalidade (Sakata et al., 2012).

O aloxano é um derivado da ureia que provoca a necrose seletiva das células β . Com este agente, é possível induzir diferentes graus da doença, variando a dose de aloxano utilizada (Etuk, 2010; Rohilla e Ali, 2012). A semelhança de forma entre a glucose e o aloxano, permite que esta última seja facilmente transportada para o citosol pelo transportador de glucose GLUT2 existente na membrana plasmática das células β (King, 2012; Rohilla e Ali, 2012). O aloxano provoca o aumento dos radicais livres oxigénio, que têm como alvo o DNA dos ilhéus de Langerhans. Uma vez fragmentado o DNA as células β ficam mais expostas à ação do aloxano (Etuk, 2010).

Tabela 2: Doses de STZ e aloxano administradas em roedores.

Espécie/ Estirpe animal	Químico	Dose (mg/Kg)	Dose única/ Dose múltipla	Via de administração	Referências
Murganho ICR	STZ	95	Dose única	i.p	(Kim, 2012)
	Aloxano	100	Dose única	i.p	(Yang et al., 2012)
Murganho BALB/c	STZ	150	Dose única	i.p	(Ulugol et al., 2012)
		50	Dose múltipla (5 dias)	i.p	(Li et al., 2012)
	Aloxano	100	Dose única	i.p	(Yeap et al., 2012)
Rato Wistar	STZ	40	Dose múltipla (5dias)	i.p	(Arambasic et al., 2012)
		60	Dose única	i.v	(Akbarzadeh et al., 2007)
	Aloxano	42	Dose única	i.v	(Claudino et al., 2007)
		150	Dose única	i.p	(Akinola et al., 2012)
Rato Sprague- Dawley	STZ	65	Dose única	i.p	(Talbot et al., 2012; Tirgan et al., 2012)
		50	Dose múltipla (6 dias)	i.v	(Pizzi et al., 2012)
	Aloxano	150	Dose única	Subcutânea	(Elgazar et al., 2013)
		150	Dose única	i.p	(Osinubi et al., 2006)

Os ratos BB (*Biobreading*) e os murganhos NOD (*Non Obese Diabetic*) são dois excelentes modelos animais espontâneos para a diabetes tipo 1 sendo, de longe, os mais utilizados (Chatzigeorgiou et al., 2009; Kirsten et al., 2010; King, 2012). O facto de os murganhos NOD terem um genoma bem definido, maior quantidade de anticorpos monoclonais para a análise de componentes do sistema imune e um custo razoavelmente baixo, torna este modelo preferencial quando comparado com a utilização de ratos (Kirsten et al., 2010).

Os murganhos NOD exibem autoimunidade espontânea que causa a diabetes através da destruição das células produtoras de insulina, de forma semelhante à observada em humanos (Kirsten et al., 2010). A destruição autoimune é caracterizada por insulite, isto é, infiltrado leucocitário, composto predominantemente por células dendríticas, macrófagos e células T ($CD4^+$ e $CD8^+$) e B, nos ilhéus de Langerhans (Chatzigeorgiou et al., 2009; Kirsten et al., 2010). Neste modelo experimental, o início da diabetes é marcado por glicosúria moderada e glicemia maior que 250mg/dl (Kirsten et al., 2010). Estes murganhos, tal como acontece em humanos, têm a capacidade de desenvolver auto-anticorpos para a insulina, GAD e tirosina fosfatase IA-2 (Chatzigeorgiou et al., 2009). Os murganhos NOD possuem um sistema imune que é estimulado pelos agentes patogênicos ambientais, esta estimulação leva ao desenvolvimento de um sistema imune mais normal e menos suscetível aos diabetes. Assim, estes animais têm de ser alojados em condições livres de agentes patogênicos de modo a expressarem o fenótipo da diabetes (Chatzigeorgiou et al., 2009; Kirsten et al., 2010).

Os ratos BB, tal como os murganhos NOD, desenvolvem diabetes autoimune dependente das células T, que é também caracterizada por auto-anticorpos das células de ilhéus e de GAD. No entanto, em contraste com os murganhos NOD, o fenómeno de insulite é mais semelhante com o dos humanos (Chatzigeorgiou et al., 2009).

2. Objectivos

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar a biocompatibilidade de uma suspensão de nanopartículas de hidroxiapatite (NanoXIM•HAp102®) em ratos diabéticos.

Os objetivos específicos foram os seguintes:

- Indução e manutenção de um modelo de diabetes experimental.
- Caracterizar a resposta biológica à implantação subcutânea de nano-HAp, recorrendo à análise histopatológica e hematológica.
- Avaliar a toxicidade das nanopartículas de hidroxiapatite no organismo, nomeadamente nos rins e fígado, com auxílio da análise bioquímica da ureia e creatinina, e das enzimas ALT (alanina aminotransferase) e FA (fosfatase alcalina).

3. Material e Métodos

3.1 Animais

Para a realização deste trabalho experimental, foram utilizados 16 animais, da espécie *Rattus norvegicus*, da estirpe Wistar, do sexo masculino e com 4 meses de idade e peso médio de 395 g, adquiridos à empresa Harlan-Interfauna (Barcelona, Espanha).

O estudo foi iniciado após a realização de um período de 1 semana de quarentena, de modo a que os animais se adaptassem às condições experimentais.

A metodologia deste trabalho foi aprovada pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV). Todos os procedimentos experimentais foram executados de acordo com a diretiva Europeia 2010/63/UE, sobre a proteção do uso de animais de experimentação.

3.2 Nanohidroxiapatite

A nanohidroxiapatite (NanoXIM•HAp102®) avaliada neste estudo, foi obtida por tecnologia NETmix® pela empresa portuguesa Fluidinova, Engenharia de Fluídos S.A. Este é um produto sintético de hidroxiapatite nanocristalina com elevada pureza sob a forma de pasta em 15 % (peso/volume) de água pura, e com uma relação estequiométrica de Ca / P igual a $1,67 \pm 1\%$. As nanopartículas que constituem a NanoXIM•HAp102® têm um tamanho tipicamente menor que 100 nm, conforme determinada pela microscopia eletrónica de transmissão (TEM). Antes da sua utilização, *in vivo*, a nano-HAp foi submetida a esterilização por radiação gama.

3.3 Condições experimentais

3.3.1 Alojamento

Os animais foram distribuídos, ao acaso, por 4 grupos e colocados em gaiolas de policarbonato com superfícies lisas, adequadas à sua espécie. Todos os animais foram marcados, numericamente, na cauda, utilizando-se para esse fim uma caneta Faber-Castell (OHP-CD Plus 1513 permanent) (figura 12).

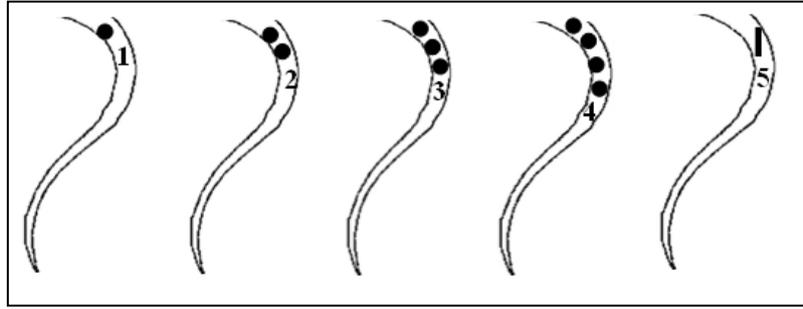


Figura 12: Esquema da marcação numérica na cauda dos animais.

Para revestir a gaiola utilizou-se uma cama de carolo de milho, guardada em local seco e fora do alcance de possíveis contaminações. As gaiolas foram devidamente identificadas e enriquecidas a nível ambiental, com tubos de PVC.

Os animais permaneceram alojados, durante todo o tempo de experiência, no biotério do Hospital Veterinário da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD) com condições padronizadas de luminosidade (12h de luz e 12h de escuro) e climatização, sendo a humidade $55\pm 5\%$, a temperatura $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e a renovação do ar de 10 a 20 ventilações por hora.

A limpeza das gaiolas e a substituição das camas foi efetuada uma vez por semana nos grupos controlo e três vezes por semana nos grupos diabéticos, uma vez que estes excretavam maior quantidade de urina.

3.3.2 Alimentação

A água e a dieta foram disponibilizadas *ad libitum* para todos os grupos. Utilizou-se água corrente do sistema de abastecimento municipal. A dieta fornecida aos animais foi uma dieta *standard* em forma de pellets, para roedores (Mucedola, Itália), com a seguinte constituição: trigo, milho, extrato de soja tostado, glúten de milho, palha de trigo, farinha de peixe, farinha de luzerna, carbonato de cálcio, cloreto de sódio, soro de leite em pó, óleo de soja, leveduras e peles de avelã. Esta dieta tem ainda na sua constituição aditivos nutricionais, nomeadamente vitamina A e D3, ferro, manganês, zinco, cobre, iodo e cobalto.

3.4 Protocolo experimental

Inicialmente os 16 animais foram divididos ao caso por 4 grupos, dois grupos com 3 animais e outros dois com 5 animais de acordo com o protocolo experimental apresentado na figura 13. Os animais do grupo 2 e 4 foram sujeitos à indução da diabetes com STZ.

Duas semanas após a indução da diabetes, foi realizada a implantação subcutânea da nanohidroxiapatite (nanoXIM•HAp102[®], Fluidinova, Portugal) nos animais de todos os grupos.

Decorridos os períodos experimentais, dependentes do grupo, às 48 horas e 3 semanas, os animais foram sacrificados e submetidos a uma necropsia cuidadosa.

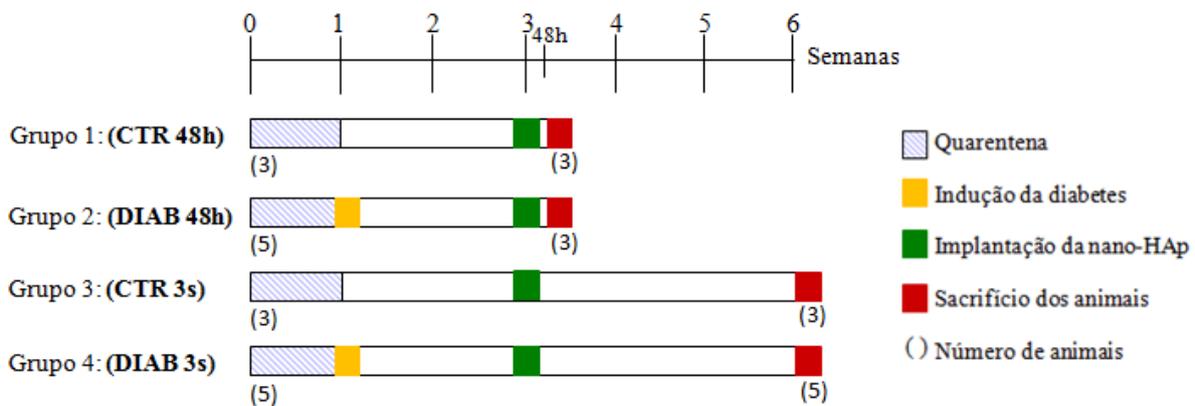


Figura 13: Cronograma do protocolo experimental.

3.5 Procedimentos experimentais

3.5.1 Indução da diabetes

Todos os animais dos grupos 2 e 4 foram submetidos à indução da diabetes com uma única administração de STZ (Sigma) por via intraperitoneal. O STZ foi preparado numa concentração de 55 mg/Kg em tampão citrato 0,1M (pH 4,5).

3.5.2 Pesagens dos animais e da alimentação

Foram realizadas pesagens semanais e individuais do peso corporal de todos os animais. O consumo de água e de comida dos grupos controlo foram registados uma vez por semana enquanto o consumo dos grupos diabéticos foram registados três vezes por semana.

Estes dados visam verificar possíveis variações quer a nível de peso, quer a nível de consumo de comida e água. Para estas pesagens utilizou-se uma balança METTLER PM 4000.

3.5.3 Medição dos níveis séricos de glucose

Uma semana após a indução da diabetes dos grupos 2 e 4, mediram-se os valores de glucose no sangue de todos os animais desses mesmos grupos. Para este procedimento, foi realizado um pequeno corte nas caudas dos ratos, de modo a obter uma gota de sangue que foi colocada numa tira de glicemia (Precision Xtra plus[®]) e levada ao aparelho medidor de glucose (Precision Xceed[®]).

Foram considerados diabéticos todos os animais que apresentavam um valor de glicemia acima de 200 mg/dl.

3.5.4 Cirurgia para implantação subcutâneo da nano-HAp

3.5.4.1 Anestesia

Os animais foram pesados, individualmente, na balança METTLER PM 4000, de modo a calcular a dose de anestésico a administrar. Em seguida foi administrada, por via intraperitoneal uma solução combinada por dois agentes anestésicos, 90 mg/Kg Ketamina (Imalgene 1000[®]) e 9 mg/Kg Xilazina (Rompum 2%[®]).

3.5.4.2 Procedimento cirúrgico

Na área dorsal dos animais, paralela à linha média dorsal, foi realizada a tricotomia, de modo a expor a pele. Nesta zona foi realizada a assepsia com uma gaze embebida em solução de iodopovidona (Betadine[®]).

Os animais foram colocados, cuidadosamente, sobre uma mesa operatória previamente aquecida e mantida à temperatura adequada durante todo o processo cirúrgico.

Com o auxílio de um bisturi com lâmina número 15 foi realizada uma incisão reta, ao longo da linha média dorsal, com aproximadamente 1,5 cm de comprimento, expondo assim o tecido subcutâneo (figura 14 A). Em seguida, foi realizado o desbridamento do espaço subcutâneo de modo a formar uma bolsa para a colocação da nano-HAp (figura 14 B).

Uma vez formada a bolsa, afastaram-se as margens da incisão e introduziu-se no espaço subcutâneo, aproximadamente a 1,5 cm de distância da incisão, 0,5 ml de suspensão de nano-HAp (figura 14 C). Em cada animal foram introduzidas 3 amostras de nano-HAp e uma amostra de soro fisiológico que funciona como controlo (figura 14 D). A incisão foi suturada com fio de seda entrançado (Silkam[®] 4/0) e limpa com solução de iodopovidona (Betadine[®]).

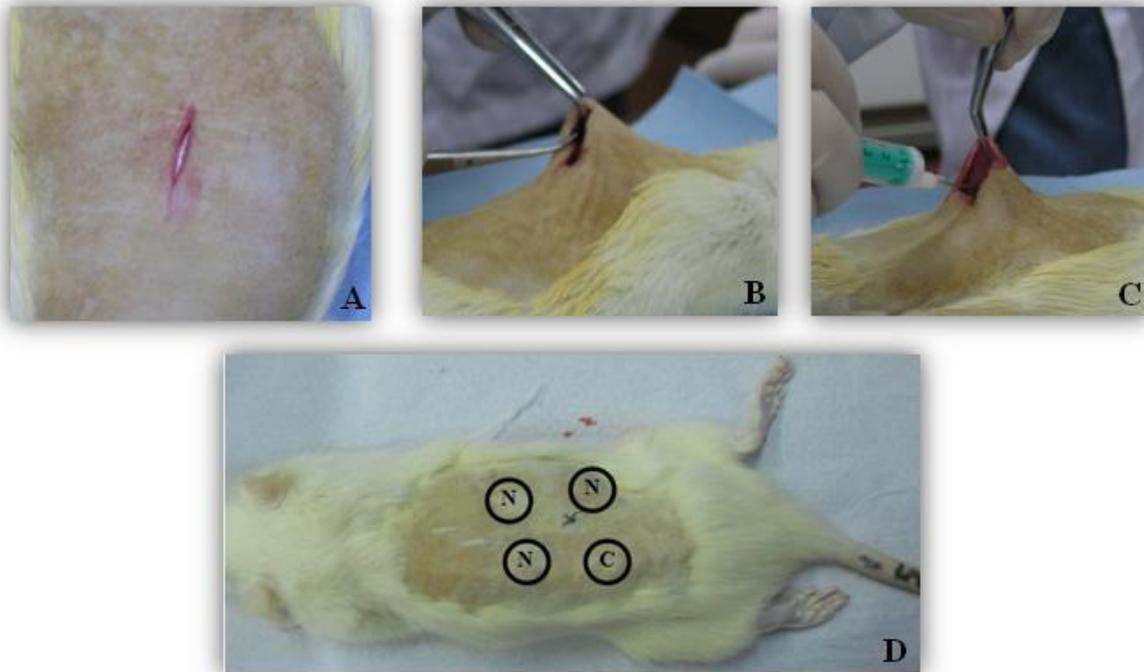


Figura 14: Algumas etapas do procedimento cirúrgico: A) Incisão da região dorsal; B) Desbridamento do espaço subcutâneo; C) Implantação da nano-HAp; D) Esquema de implantação da nano-HAp (N) e do soro fisiológico (C).

3.5.4.3 Recobro/ recuperação da anestesia

Após a cirurgia, foi administrado o antibiótico Amoxicilina (Clamoxyl[®]) 150 mg/Kg a todos os animais. Colocou-se ainda sobre a sutura um penso em spray para feridas cirúrgicas (Opsite Spray[®]). Os animais foram colocados em gaiolas limpas, sem cama, revestidas com papel absorvente. Estas foram colocadas num local silencioso, com temperatura adequada, e constante monitorização da recuperação anestésica, tendo-se ainda o cuidado de alternar a posição dos animais. Terminada a sua recuperação anestésica, os animais, foram transferidos para as respetivas gaiolas padrão.

3.5.5 Sacrifício dos animais e recolha das amostras

3.5.5.1 Sacrifício e colheita de sangue

Decorridos os períodos experimentais, os animais foram novamente anestesiados, seguindo o procedimento já descrito anteriormente, e sacrificados pelo método de exsanguinação cardíaca. O sangue recolhido neste processo foi transferido para um tubo sem anticoagulante (Eurotubo[®] Serum Separation, DeltaLab) para a realização de análise bioquímicas, e o sangue para a realização da hematologia foi transferido para tubos com anticoagulante, o EDTA. Em seguida todos os tubos da avaliação bioquímica foram colocados numa centrífuga Labofuge[®] onde foram submetidos a uma centrifugação de 3000 rpm durante 10 minutos.

3.5.5.2 Recolha de órgãos e da nano-HAp implantada

Após o sacrifício dos animais, os órgãos internos foram cuidadosamente inspecionados e removidos. Posteriormente, o fígado, o coração, os pulmões, o baço, o rim direito e o rim esquerdo foram pesados individualmente numa balança KERN PLJ 750.

Na área dorsal dos animais foi realizada a tricotomia para facilitar a localização da nano-HAp por palpação. De seguida, realizaram-se incisões com margens de segurança, de modo a não danificar as amostras, e retirou-se cuidadosamente o biomaterial com o tecido adjacente.

Imediatamente após a remoção do tecido com o biomaterial, este foi fixado e imerso em solução de formol tamponado a 10% para a fixação dos tecidos.

3.6 Métodos de análise

3.6.1 Análise hematológica

Na análise hematológica efetuou-se, manualmente, a contagem total e diferencial dos leucócitos presentes nas amostras de sangue de todos os animais do protocolo experimental.

3.6.1.1 Contagem total dos leucócitos

Para a contagem total de leucócitos utilizou-se a câmara de Neubauer. A diluição utilizada foi de 1:20. Este procedimento envolveu os seguintes passos:

1. Homogeneização do sangue;
2. Enchimento da pipeta diluidora de leucócitos com 0,5 ml de sangue;
3. Aspiração da solução de Turk, até perfazer 11 ml;
4. Agitação durante 5 minutos manualmente e 2 minutos no agitador;
5. Colocação na câmara de Neubauer, tendo o cuidado de não colocar excesso de sangue e evitando a formação de bolhas de ar;
6. Repouso da suspensão para sedimentação, durante cerca de 5 minutos,
7. Contagem dos leucócitos num microscópio ótico binocular (Olympus Optical CO, LTP), com uma ampliação de 100X.

O número total de leucócitos foi determinado por contagem de todos os leucócitos existentes nos quatro quadrantes (marcados com L) da câmara de Neubauer (figura 15 A), aplicando a regra do L (figura 15 B), e calculado pela aplicação da seguinte fórmula:

$$\text{LeucTotal (leucócitos/mm}^3\text{)} = \text{Total de leucócitos nos 4 quadrantes} \times 50$$

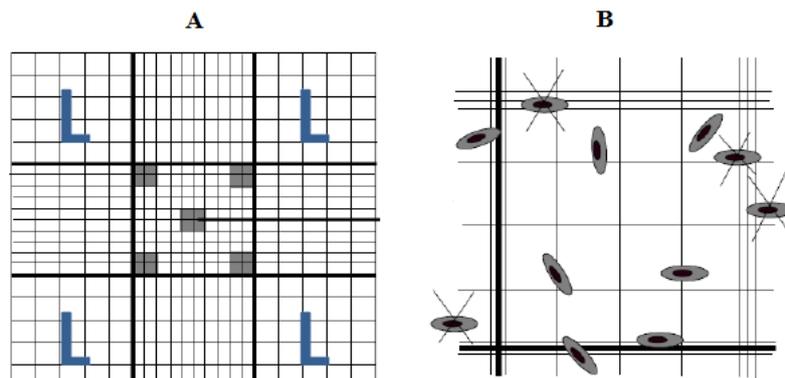


Figura 15: A) Esquema da câmara de Neubauer para contagem total de leucócitos; B) Regra do L – Sistema de contagem de células: as células que tocam a linha central tripla (representada pela linha grossa) da esquerda e inferior são contadas. As células que tocam a linha superior ou a linha direita não são contadas. Adaptado de (Viana, 2010).

3.6.1.2 Contagem diferencial de leucócitos

Para a contagem diferencial dos leucócitos recorreu-se ao esfregaço sanguíneo, uma vez que, esta contagem foi efetuada manualmente.

A realização do esfregaço sanguíneo envolveu o seguinte procedimento:

1. Colocou-se uma gota de sangue ligeiramente afastada das extremidades da lâmina (figura 16 A);
2. Pegou-se numa segunda lâmina, e colocou-se sobre a primeira lâmina, na extremidade oposta à gota de sangue, formando um ângulo de 45° (figura 16 A);
3. Com a segunda lâmina realizou-se um ligeiro movimento para trás até encostar na gota de sangue, permitindo assim, por capilaridade, uma difusão uniforme ao longo da borda da lâmina (figura 16 B);
4. Em seguida, cuidadosamente, movimentou-se a lâmina, num único movimento, para a frente de modo a estender o sangue numa fina e uniforme camada (figura 16 C);
5. Deixou-se secar todas as lâminas durante 24 horas;
6. Seguidamente, as mesmas foram coradas utilizando-se a coloração de Diff-Quick. As lâminas foram mergulhadas cinco vezes em cada uma das três soluções de corantes (azul claro, vermelho-alaranjado e azul violeta);
7. Adicionou-se água destilada tamponada e deixou-se atuar 3-5 minutos;
8. Lavou-se com água destilada e por fim deixou-se secar os esfregaços na posição vertical.

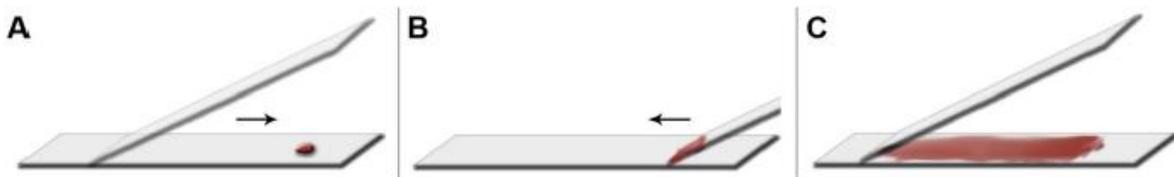


Figura 16: Representação esquemática da realização de um esfregaço sanguíneo. Adaptado de (Baptista, 2011).

Para a contagem diferencial dos leucócitos, utilizou-se um microscópio ótico binocular com uma ampliação de 1000x (objetiva de imersão de 100x) e um contador de células manual. Foi realizada a contagem de 100 células brancas, sendo estas classificadas de acordo

com as suas características morfológicas e de coloração em linfócitos, neutrófilos, mastócitos e eosinófilos. Uma vez obtida a percentagem de cada grupo celular, estabeleceu-se a fórmula leucocitária em função das contagens de leucócitos totais, usando a seguinte fórmula, em que Y é o número de células de cada grupo celular:

$$Y(\text{células}/\mu\text{l}) = \frac{\% Y \times \text{Leucócitos totais}}{100}$$

3.6.2 Análise bioquímica

Para a determinação dos valores séricos dos marcadores de unção renal, creatinina e ureia, e das enzimas hepáticas FA e ALT, utilizaram-se Kits comerciais (Randox Laboratories Limited, United Kingdom). Esta análise foi realizada no laboratório de análises clínicas do hospital veterinário da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. A concentração de ureia e creatinina expressa em mg/dl, e a atividade da FA e ALT em UI/L foram estimadas num aparelho RX Dayota Analyser.

3.6.3 Processamento das amostras e análise histológica

Após fixação, durante 24h, o material foi processado de acordo com o procedimento de rotina para a microscopia de luz. Dos blocos de parafina foram realizados cortes de 2 μ m de espessura num micrótomo de rotação Leica® 20035. As preparações foram desparafinadas em xilol, hidratadas numa série de álcoois de concentração decrescente e coradas pelo método convencional de Hematoxilina-Eosina, após o qual se procedeu à avaliação histológica. Para a identificação de depósitos de sais de cálcio nos tecidos foi efetuada a coloração histoquímica de Von Kossa (anexo I).

3.6.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa informático Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, Chicago, IL, USA) versão 20.0. Foram calculadas as médias (\bar{X}) e os desvios padrão (DP) do peso corporal, do consumo de comida e água, do peso dos órgãos de todos os grupos experimentais e dos parâmetros da análise bioquímica e hematológica. Em primeiro lugar, realizou-se o teste de Levene, de forma a verificar a

homogeneidade das variâncias. Quando se observou uma homogeneidade de variâncias utilizou-se o teste de Bonferroni ou o ANOVA e quando verificada uma heterogeneidade das variâncias efetuou-se o teste de Games O'Well. Os valores obtidos foram considerados estatisticamente significativos para valores de $p < 0,05$.

3.7 Fórmulas utilizadas

3.7.1 Taxa de sucesso de indução da diabetes

A taxa de sucesso de indução da diabetes foi calculada tendo em conta a relação entre o número de animais que sobreviveram e que apresentaram um valor glicémico superior a 200 mg/dl (NAD) após a administração de STZ e o número total de animais nos quais foi administrado STZ (NASTZ).

Equação 1: Fórmula matemática para o cálculo da taxa de sucesso de indução da diabetes.

$$\textit{Taxa de sucesso de indução da diabetes} = \frac{NAD}{NASTZ} * 100$$

3.7.2 Índice de perdas

No final da experiência calculou-se o índice de perdas (IP), ou seja, a percentagem de animais que foram excluídos deste estudo.

Equação 2: Fórmula matemática para o cálculo do índice de perdas.

$$IP = \frac{n^{\circ} \textit{animais excluidos}}{n^{\circ} \textit{animais iniciais}} * 100$$

3.7.3 Percentagem de peso ganho e índice de homogeneidade ponderal

Para cada grupo experimental foi calculado a percentagem de peso ganho (%PG) tendo em conta o peso médio final (Pf) e o peso médio inicial (Pi) dos animais. Também foi calculado para cada grupo o índice de homogeneidade ponderal (IHP), na qual se teve em consideração o peso médio mais baixo (Pmb) e o peso médio mais alto (Pma) de todo o grupo experimental.

Equação 3: Fórmulas matemáticas para o cálculo da percentagem de peso ganho (%PG) e do índice de homogeneidade ponderal (IHP).

$$\%PG = \left(\frac{Pf - Pi}{Pf} \right) * 100$$

$$IHP = \frac{2 * Pmb}{Pma + Pmb}$$

4. Resultados

Para análise dos resultados apenas serão realizadas comparações entre os grupos CTR 48h e DIAB 48h, grupos CTR 3s e DIAB 3s, grupos CTR 48h e CTR 3s e grupos DIAB 48h e DIAB 3s.

4.1 Taxa de sucesso da indução da diabetes, Glicemia e Índice de perdas

Durante o ensaio experimental foram excluídos do trabalho dois animais do grupo DIAB 48h. Um dos animais morreu após indução dos diabetes e o outro foi rejeitado por apresentar um valor de glicemia inferior a 200 mg/dl. Assim, a nossa taxa de sucesso da indução da diabetes foi de 80 % e o nosso índice de perdas total foi de 12,5 % (tabela 3). Os animais do grupo DIAB 48h apresentaram um valor médio de glicemia de 397 mg/dl, e os do grupo DIAB 3s de 365 mg/dl. Os valores de glicemia dos animais de ambos os grupos controle apresentaram valores < 125 mg/dl (tabela 3).

Tabela 3: Índice de perdas e valores médios de glicemia.

Grupo	Início da quarentena nº de animais	Início do estudo nº de animais	Final do estudo nº de animais	Índice de perdas % (IP %)	Valor médio de glicemia (mg/dl)
CTR 48h	3	3	3	0	<125
DIAB 48h	5	5	3	40	397
CTR 3s	3	3	3	0	<125
DIAB 3s	5	5	5	0	365

4.2 Variação do peso corporal

Pela análise do gráfico da figura 17, verifica-se uma gradual perda de peso dos animais dos grupos CTR 48h, DIAB 48h e DIAB 3s, enquanto o grupo CTR 3s sofreu um ligeiro aumento de peso.

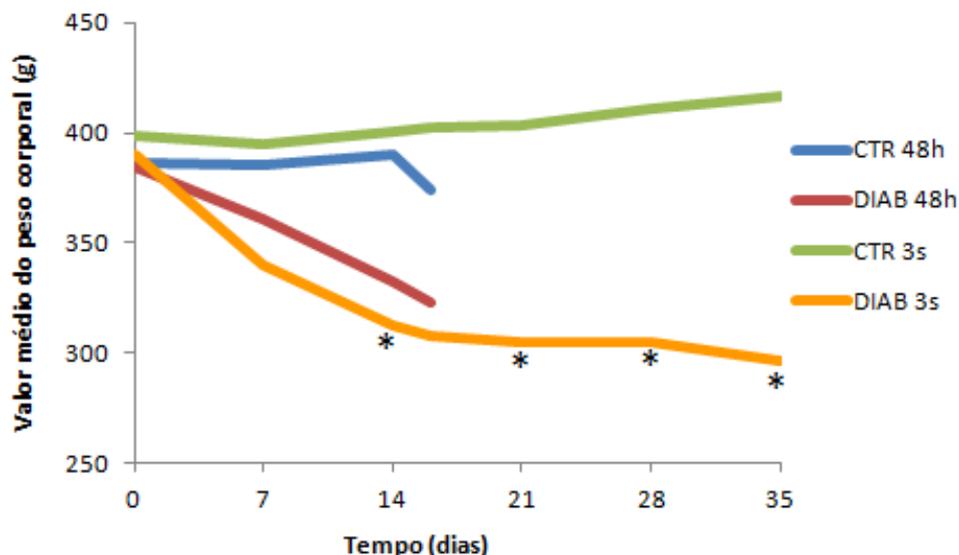


Figura 17: Evolução do peso médio corporal dos animais de todos os grupos do protocolo experimental. *Diferenças estatisticamente significativas do grupo CTR 3s ($p < 0,01$).

Para o período experimental de 48 horas, os animais de ambos os grupos perderam peso, sendo essa perda mais significativa no grupo diabético (DIAB 48h). Em relação ao período experimental de 3 semanas apenas se verificou uma perda acentuada de peso nos animais diabéticos (DIAB 3s), enquanto o controlo (CTR 3s) sofreu um ligeiro aumento de peso. Segundo os valores do IHP, verificou-se a elevada homogeneidade dos grupos, sendo esta superior nos grupos controlo (tabela 4).

Tabela 4: Média do peso corporal inicial e final, diferença de pesos, %PG (% de peso ganho) e IHP (índice de homogeneidade ponderal) dos respetivos grupos.*- Diferença estatisticamente significativo do grupo CTR 3s ($p < 0,05$).

Grupo (número de animais)	Peso corporal inicial (g) (\bar{X}) \pm DP	Peso corporal Final (g) (\bar{X}) \pm DP	Diferença de pesos (g)	%PG	IHP
CTR 48h (3)	386 \pm 44,14	374 \pm 48,52	-12	-3,21	0,98
DIAB 48h (3)	385 \pm 62,29	322 \pm 16,17	-63	-19,57	0,91
CTR 3s (3)	398 \pm 25,15	417 \pm 32,05	19	4,56	0,97
DIAB 3s (5)	390 \pm 57,77	296 \pm 38,18*	-94	-31,76	0,86

4.3 Consumo médio de comida e de água

A tabela 5 expressa o resumo do consumo médio de água e comida para cada grupo durante o período experimental. Relativamente ao consumo médio de comida, os animais diabéticos (grupos DIAB 48h e DIAB 3s) consumiram mais comida que os animais não diabéticos (grupos CTR 48h e CTR 3s), sendo que estes valores apenas são estatisticamente significativos entre DIAB 48h e DIAB 3s ($p < 0,001$). O consumo médio de água, tal como a comida, também foi superior nos grupos diabéticos comparativamente com os grupos controlo. Os valores são estatisticamente significativos entre os grupos CTR 48h e DIAB 48h ($p < 0,001$) e entre CTR 3s e DIAB 3s ($p < 0,001$).

Tabela 5: Consumo médio de comida e água consumida por rato por semana.*- Diferença estatisticamente significativa do grupo DIAB 48h ($p < 0,001$). **- Diferenças estatisticamente significativas do grupo CTR 48h ($p < 0,001$).***- Diferença estatisticamente significativa do grupo CTR 3s ($p < 0,001$).

Grupo (nº animais)	Comida (g/rato/semana) (\bar{X}) \pm DP	Água (g/rato/semana) (\bar{X}) \pm DP
CTR 48h (3)	142,39 \pm 17,12	215,63 \pm 13,48
DIAB 48h (3)	154,16 \pm 20,61	980,42 \pm 189,85**
CTR 3s (3)	163,91 \pm 10,91	230,19 \pm 25,23
DIAB 3s (5)	224,75 \pm 66,51*	1164,30 \pm 258,66***

4.4 Peso dos órgãos

4.4.1 Peso absoluto dos órgãos

Analisando a tabela 6, que expressa as médias do peso absoluto dos órgãos, verificou-se que o peso absoluto do rim direito e do rim esquerdo do grupo DIAB 48h são superiores em comparação com o grupo CTR 48h. Comparando os grupos CTR 3s e DIAB 3s, este último apresenta um peso absoluto inferior, tanto para no rim direito como para o rim esquerdo. Os valores de peso absoluto do fígado são superiores nos grupos controlo (CTR 48h e CTR 3s) comparativamente com os grupos diabéticos (DIAB 48h e DIAB 3s). Embora estes valores não sejam estatisticamente significativos. Em relação ao peso dos pulmões o valor é

estatisticamente significativo entre os grupos CTR 48h e CTR 3s ($p < 0,01$) e entre os grupos CTR 3s e DIAB 3s ($p < 0,01$). Para o baço, os valores são estatisticamente significativos entre os grupos CTR 48h e DIAB 48h ($p < 0,05$) e os grupos CTR 3s e DIAB 3s ($p < 0,01$).

Tabela 6: Médias do peso absoluto dos órgãos dos grupos experimentais.*- Diferença estatisticamente significativa do grupo CTR 48h ($p < 0,01$). **- Diferenças estatisticamente significativas do grupo CTR 3s ($p < 0,01$).***- Diferenças estatisticamente significativas do grupo CTR 48h ($p < 0,05$).

		Grupos (nº animais)			
		CTR 48h (3) (\bar{X}) \pm DP	DIAB 48h (3) (\bar{X}) \pm DP	CTR 3s (3) (\bar{X}) \pm DP	DIAB 3s (5) (\bar{X}) \pm DP
Fígado		12,11 \pm 1,50	11,37 \pm 0,98	13,79 \pm 1,61	10,07 \pm 1,34
Coração		1,06 \pm 0,16	0,94 \pm 0,04	1,13 \pm 0,10	0,85 \pm 0,12
Pulmões		1,43 \pm 0,18	1,52 \pm 0,03	1,85 \pm 0,05*	1,43 \pm 0,12**
Baço		0,73 \pm 0,07	0,52 \pm 0,08***	0,75 \pm 0,06	0,54 \pm 0,05**
Rim	Direito	1,44 \pm 0,23	1,56 \pm 0,20	1,39 \pm 0,07	1,38 \pm 0,23
	Esquerdo	1,39 \pm 0,13	1,48 \pm 0,21	1,32 \pm 0,08	1,28 \pm 0,21

4.4.2 Peso relativo dos órgãos

Na tabela 7 encontram-se expressos os resultados do peso médio relativo dos órgãos recolhidos por cada grupo experimental. Verificou-se que apenas existem diferenças estatisticamente significativas, quanto ao peso relativo do rim direito e do rim esquerdo, entre os grupos CTR 48h e DIAB 48h ($p < 0,05$) e ainda entre os grupos CTR 3s e DIAB 3s ($p < 0,01$). De uma forma geral, os restantes órgãos apresentaram maior peso relativo nos grupos diabéticos, comparativamente com o respetivo grupo controlo.

Tabela 7: Peso médio relativo dos órgãos dos grupos experimentais. *- Diferença estatisticamente significativa do grupo CTR 48h ($p < 0,05$).** - Diferença estatisticamente significativa do grupo CTR 3s ($p < 0,01$).

		Grupos (nº animais)			
		CTR 48h (3) (\bar{X}) \pm DP ($\times 10^{-3}$)	DIAB 48h (3) (\bar{X}) \pm DP ($\times 10^{-3}$)	CTR 3s (3) (\bar{X}) \pm DP ($\times 10^{-3}$)	DIAB 3s (5) (\bar{X}) \pm DP ($\times 10^{-3}$)
Fígado		3,19 \pm 0,16	3,52 \pm 0,13	3,30 \pm 0,24	3,40 \pm 0,22
Coração		0,28 \pm 0,01	0,29 \pm 0,02	0,27 \pm 0,01	0,29 \pm 0,01
Pulmões		0,38 \pm 0,02	0,47 \pm 0,02	0,44 \pm 0,03	0,49 \pm 0,08
Baço		0,19 \pm 0,01	0,16 \pm 0,02	0,18 \pm 0,03	0,18 \pm 0,01
Rim	Direito	0,38 \pm 0,01	0,48 \pm 0,04*	0,33 \pm 0,02	0,46 \pm 0,03**
	Esquerdo	0,37 \pm 0,04	0,46 \pm 0,04*	0,32 \pm 0,02	0,43 \pm 0,03**

4.5 Análise sérica da função renal e hepática

A concentração sérica dos marcadores da função renal, ureia e creatinina, encontram-se ligeiramente elevados nos animais diabéticos em comparação com os controlo (figura 18 A e B). No entanto, quer para a ureia quer para a creatinina, estas diferenças de valor não são estatisticamente significativas,

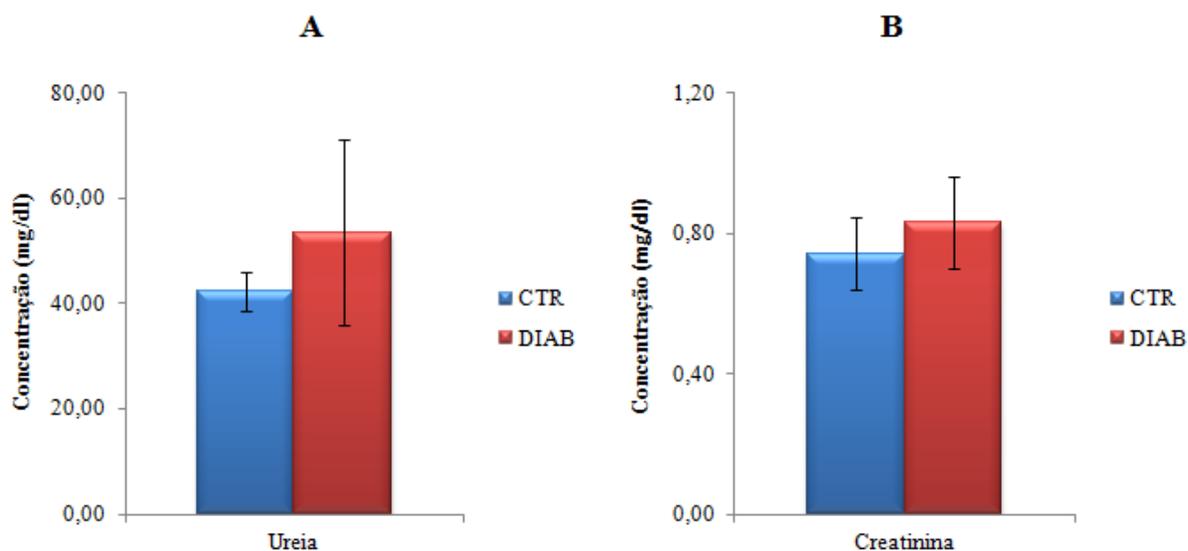


Figura 18: Concentração sérica dos marcadores de função renal: A)Ureia e B)Creatinina.

Os resultados relativos à análise da atividade das enzimas hepáticas ALT e FA, revelam que ambas as enzimas se encontram elevadas nos animais diabéticos comparativamente com os não diabéticos. Estes valores são estatisticamente significativos para a ALT ($p < 0,05$) e para a FA ($p < 0,01$) entre os dois grupos, CTR e DIAB (figura 19).

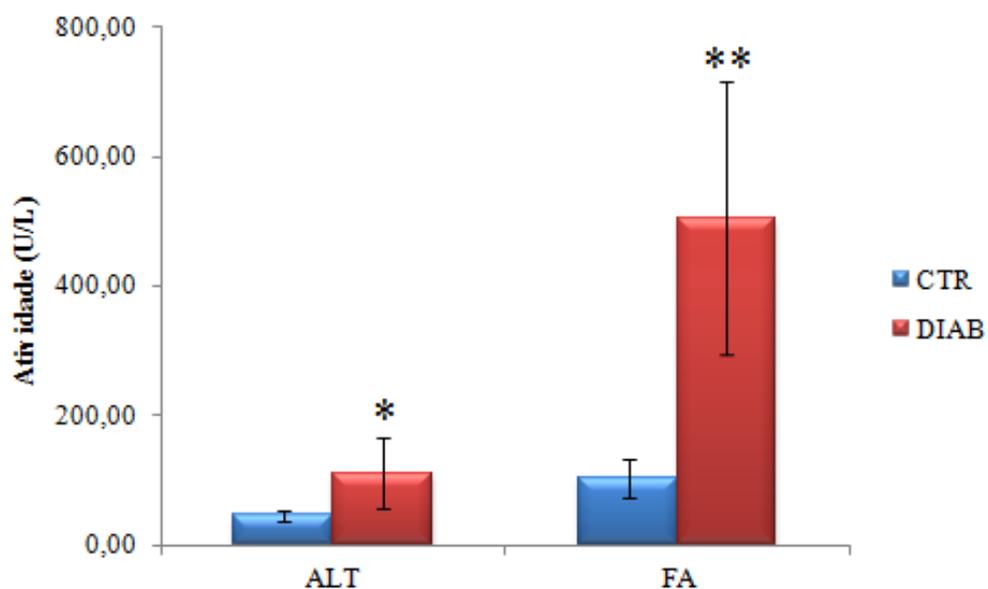


Figura 19: Atividade das enzimas hepáticas ALT e FA. *Diferenças estatisticamente significativas do grupo CTR ($p < 0,05$); **Diferenças estatisticamente significativas do grupo CTR ($p < 0,01$).

4.6 Avaliação da implantação de nano-HAp

4.6.1 Avaliação macroscópica

Macroscopicamente, às 48 horas, observou-se, em ambos os grupos, a presença de pequenos nódulos das nanopartículas de hidroxiapatite (figura 20 A e B). Às 3 semanas, observou-se um elevado grau de reabsorção das nano-HAp no grupo CTR 3s (figura 20 C) comparativamente com o grupo DIAB 3s (figura 20 D). O tecido subcutâneo envolvente apresentou ligeiro edema e hemorragia às 48h, não sendo observadas alterações macroscópicas significativas às 3 semanas.

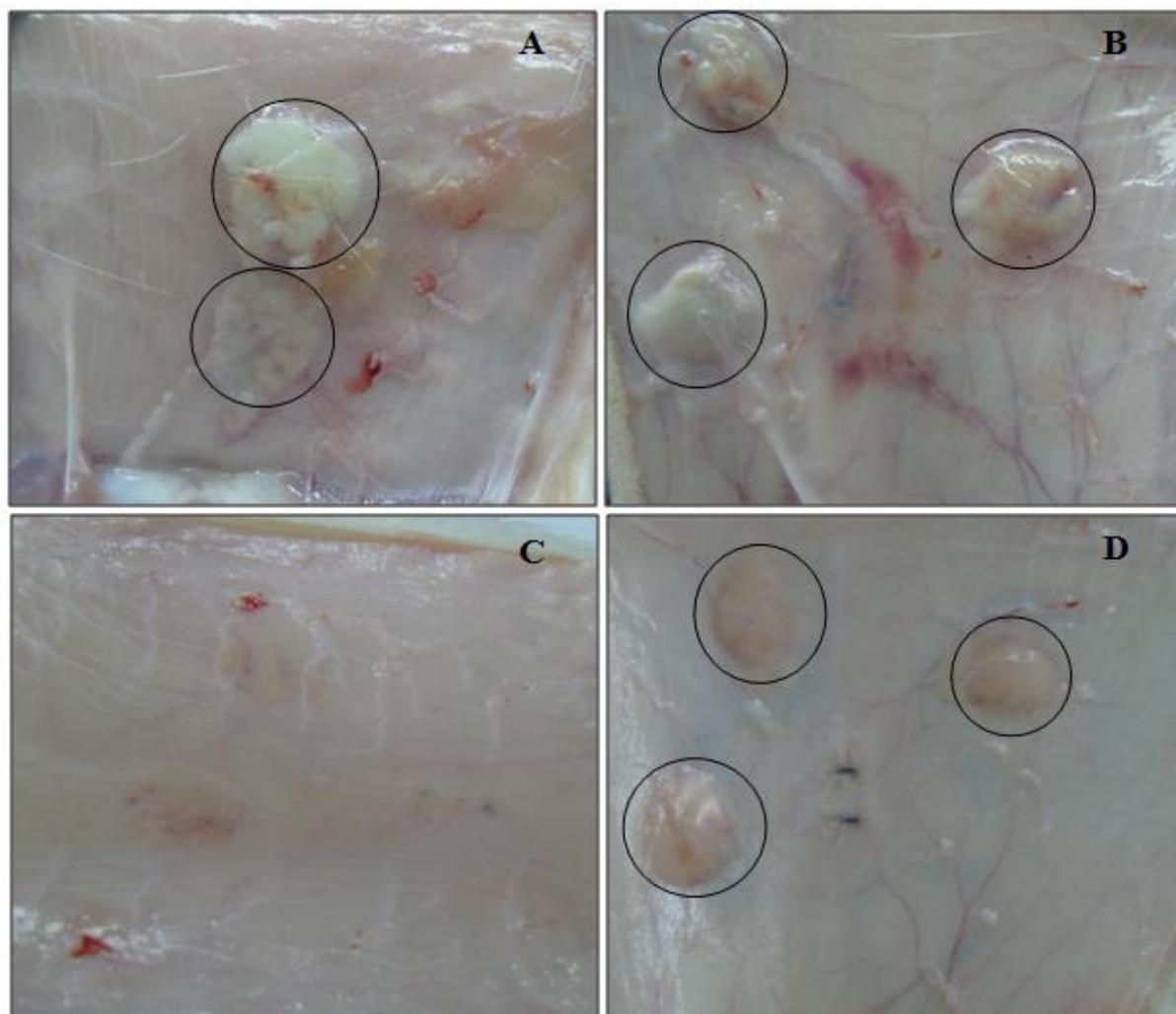


Figura 20: Imagens macroscópicas do tecido subcutâneo com a nano-HAp implantada. Presença de pequenos nódulos de nano-HAp (Círculos a preto) A) CTR 48h; B) DIAB 48h; C) CTR 3s; D) DIAB 3s.

4.6.2 Análise histopatológica

Na análise histopatológica avaliou-se qualitativamente o infiltrado inflamatório e os tipos celulares presentes (tabela 8). Analisou-se ainda qualitativamente a fibrose, a neovascularização e a agregação de partículas de cálcio nas nanopartículas de hidroxiapatite, e o tecido adjacente tendo em conta a presença ou ausência de edema, mucinose, inflamação e necrose muscular, hemorragia e desorganização das fibras de colagénio (tabela 9).

Tabela 8: Caracterização do infiltrado inflamatório e dos tipos celulares presentes na resposta biológica à nano-HAp (-Ausente; +Escasso; ++Moderado; +++Intenso; ++++ Severo).

Grupos	Material implantado	Infiltrado inflamatório	Tipos celulares				
			Neutrófilos	Linfócitos	Mastócitos	Macrófagos	Células gigantes
CTR 48h	Soro fisiológico	+	-	+	+	-	-
	Nano-HAp	++/+++	++/+++	++/+++	+	+	-
DIAB 48h	Soro fisiológico	+	-	+/>++	+/>++	+	-
	Nano-HAp	++	++	++	+	+	-
CTR 3s	Soro fisiológico	+	-	+	+	+	-
	Nano-HAp	++++	-	++	-/+	++++	++++
DIAB 3s	Soro fisiológico	+	-	+	+	+	-
	Nano-HAp	+++	-	++	-/+	++	+++

No grupo **CTR 48h**, as amostras controlo apresentaram um infiltrado inflamatório escasso, caracterizado pela presença de número reduzido de linfócitos e mastócitos (tabela 8 e 9). Neste grupo as amostras com implantação de nano-HAp, apresentaram um infiltrado inflamatório moderado a intenso, composto maioritariamente, por neutrófilos e linfócitos, sendo observados escassos mastócitos e macrófagos (tabela 8 e figura 21 A). As células inflamatórias localizaram-se em redor dos aglomerados de nano-HAp, estes de tamanho

variável, verificando-se degenerescência e necrose das células inflamatórias nas áreas centrais do biomaterial. Observou-se tecido de granulação envolvente, caracterizado por proliferação de fibroblastos e neovasos, associado a edema, mucinose, hemorragia e desorganização das fibras de colagênio (tabela 9). O tecido muscular exibiu áreas de inflamação e necrose. Através da coloração de Von Kossa comprovou-se a calcificação dos agregados de nano-HAp (figura 21 C).

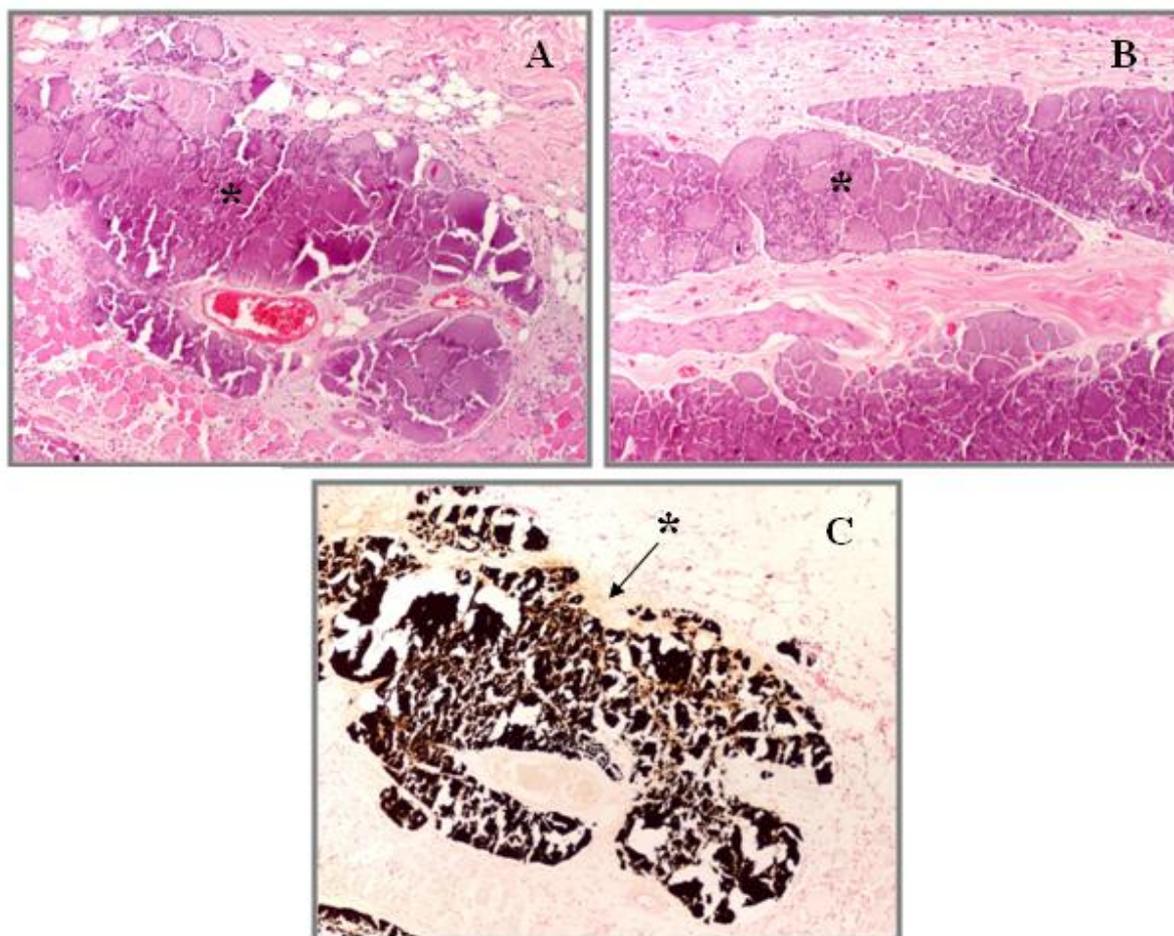


Figura 21: Reação do tecido 48 horas após a implantação das nano-HAp: A) CTR 48h- Presença de aglomerados da nano-HAp, envolvidos por células inflamatórias. Objetiva de 10x. B) DIAB 48h- Presença de aglomerados de nano-HAp, envolvidos por células inflamatórias. Presença de tecido de granulação. Objetiva de 10x. C) CTR 48h- Marcação positiva para a coloração de Von Kossa, com evidência dos sais de cálcio (a negro). Objetiva de 10x. * Região das nano-HAp.

As amostras controle do grupo **DIAB 48h**, exibiram um infiltrado inflamatório escasso constituído maioritariamente por linfócitos e mastócitos. Estas amostras exibiram ainda moderada neovascularização e edema (tabela 8 e 9). Já o infiltrado inflamatório presente nas amostras com implante de nano-HAp, foi classificado como moderado, sendo

este constituído predominantemente por neutrófilos e linfócitos, localizados em redor dos aglomerados do biomaterial, observando-se degenerescência e necrose central (tabela 8 e figura 21 B). Em redor das nanopartículas foi notória a presença de tecido de granulação, sendo visível edema, mucinose, hemorragia e desorganização das fibras de colagénio. O tecido muscular exibiu áreas de necrose. Neste grupo o número de agregados de nano-HAp foi ligeiramente superior aos do grupo CTR 48h (tabela 9 e figura 21 B).

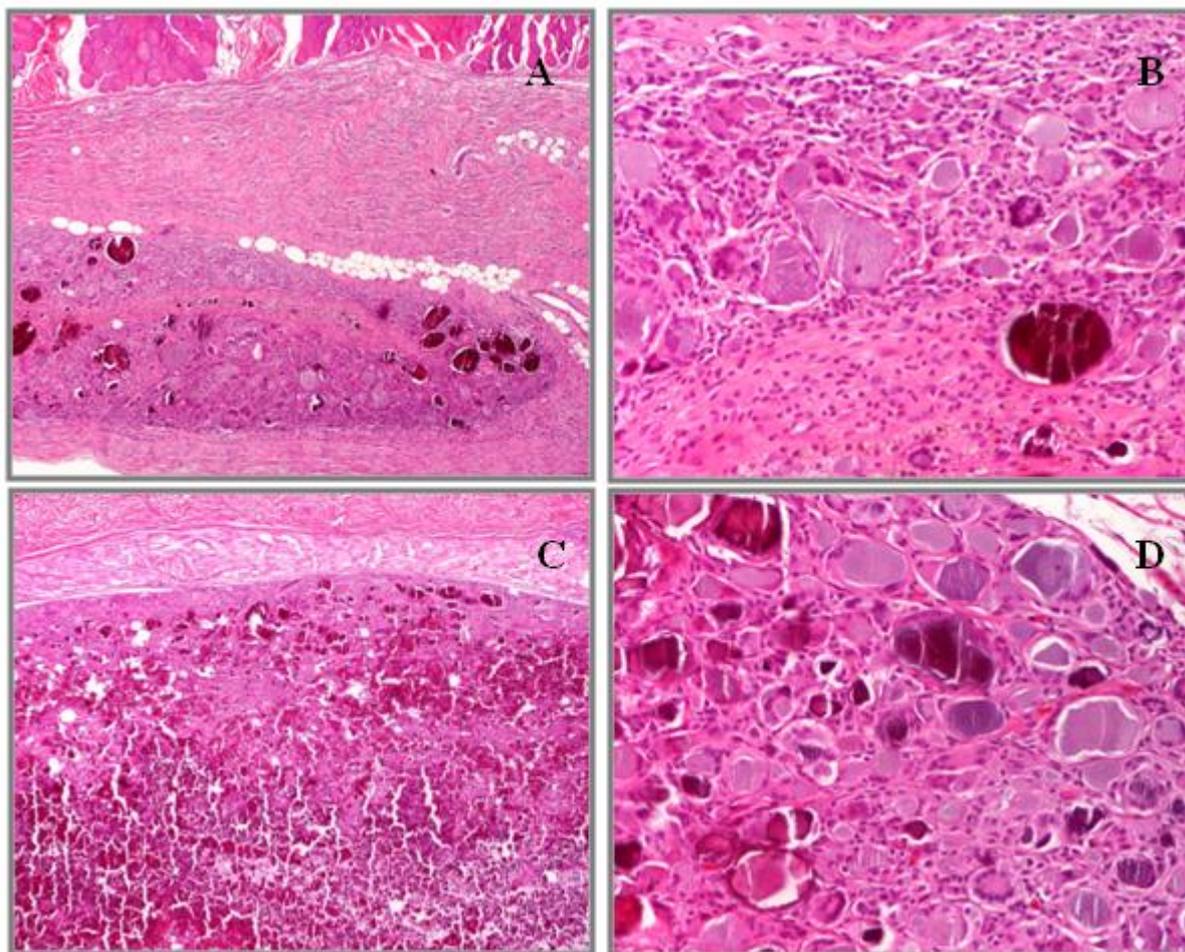


Figura 22: Reação do tecido 3 semanas após o implante de nano-HAp: A) CTR 3s- Presença de aglomerados de nano-HAp envolvidos por fibrose. Objetiva 4x. B) CTR 3s- Presença de infiltrado inflamatório constituído maioritariamente por células gigantes e macrófagos. Objetiva 20x. C) DIAB 3s- Presença de fibrose em redor das nano-HAp, e de necrose e fibrina no centro do implante. Objetiva 4x. D) DIAB 3s- Presença de aglomerados de nano-HAp envolvidos por células inflamatórias, maioritariamente células gigantes. Objetiva 20x.

No grupo **CTR 3s**, as amostras controlo apresentaram um infiltrado inflamatório escasso composto por linfócitos, mastócitos e macrófagos. Foi ainda visível nesta amostra a presença de neovascularização moderada (tabela 8 e 9). As amostras com implantação de nano-HAp exibiram um infiltrado inflamatório severo, constituído maioritariamente por

macrófagos e células gigantes, apresentando também em menor quantidade linfócitos e mastócitos, localizados em redor dos aglomerados do biomaterial (tabela 8 e figura 22 B). Os implantes apresentaram envolvimento por cápsula do tecido conjuntivo, sendo visíveis alguns neovasos. O tecido adjacente, apresentou mucinose e desorganização das fibras de colagénio. O tecido muscular exibiu áreas de inflamação e necrose. A agregação das nanopartículas foi superior à verificada nos grupos das 48 h (tabela 9 e figura 22 A).

As amostras controlo do grupo **DIAB 3s**, exibiram um infiltrado inflamatório escasso composto por linfócitos, mastócitos e macrófagos. Estas amostras apresentaram ainda ligeira neovascularização e presença de edema no tecido adjacente (tabela 8 e 9). Nas amostras com implantação de nano-HAp, classificou-se o infiltrado inflamatório como intenso, sendo a sua constituição maioritariamente células gigantes, alguns macrófagos e linfócitos e em menor quantidade mastócitos (tabela 8 e figura 22 D). Observou-se, em torno das nanopartículas a presença de fibrose, sendo esta inferior à observada no grupo CTR 3s, associada à presença de escassos neovasos. No tecido adjacente apenas se detetou a desorganização das fibras de colagénio. No centro dos implantes de nano-HAp observou-se a presença de fibrina e de necrose (tabela 9 e figura 22 C e D). Este foi o grupo no qual se encontrou maior agregação das nanopartículas de hidroxiapatite, quer em tamanho, quer em número. Este facto foi comprovado pela coloração histoquímica de Von Kossa, que se revelou mais intensa comparativamente aos grupos das 48h e ao grupo CTR 3s (figura 23 A e B).

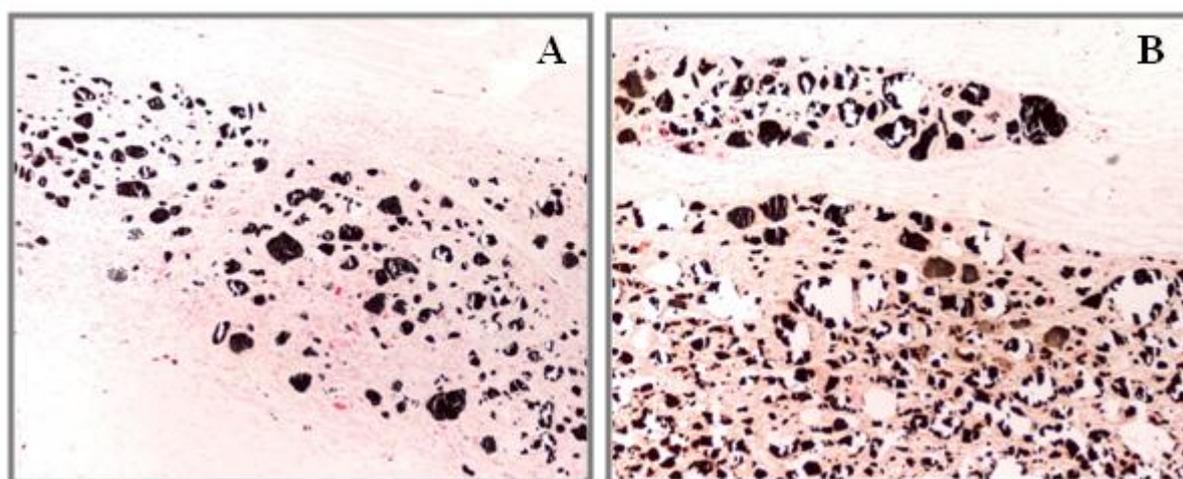


Figura 23: Marcação positiva para a coloração de Von Kossa, com evidência dos sais de cálcio (a negro): A) CTR 3s. Objetiva 10x; B) DIAB 3s. Objetiva 10x.

Tabela 9: Caracterização da fibrose, neovascularização, agregação das nano-HAp, edema, mucinose, inflamação e necrose muscular, hemorragia e desorganização das fibras de colagénio.

	Grupos							
	CTR 48h		DIAB 48h		CTR 3s		DIAB 3s	
	Soro fisiológico	Nano-HAp						
Fibrose	-	-	-	-	-	++	-	+/>++
Neovasos	-	++	++	+	++	+	+	+
Agregação das nano-HAp	-	+/>++	-	++	-	+++	-	++++
Edema	-	Presente	Presente	Presente	-	-	Presente	-
Mucinose	-	Presente	-	Presente	-	Presente	-	-
Inflamação muscular	-	Presente	-	Presente	-	Presente	-	-
Necrose muscular	-	Presente	-	Presente	-	Presente	-	-
Hemorragia	-	Presente	-	Presente	-	-	-	-
Desorganização do colagénio	-	Presente	-	Presente	-	Presente	Presente	Presente

Fibrose (- ausência de cápsula fibrosa; + presença de poucas células inflamatórias com pouco ou nenhum tecido conjuntivo organizado; ++ tecido da cápsula granulomatoso e denso, contendo fibroblastos e algumas células inflamatórias; +++ tecido da cápsula fibroso, porém imaturo, apresentando fibroblastos e pouco colagénio; ++++ cápsula fibrosa madura, densa e bem estabelecida). Neovascularização (-ausência de capilares sanguíneos; + presença de poucos capilares sanguíneos; ++ presença moderada de capilares; +++ presença de vários capilares sanguíneos; ++++ presença de muitos capilares sanguíneos em redor do implante). Agregação das nano-HAp (- ausência de agregação; + ligeira; ++ moderada; +++ intensa; ++++ severa). Edema, mucinose, inflamação e necrose muscular, hemorragia e desorganização das fibras de colagénio: presença (Presente) ou ausência (-).

4.7 Análise hematológica

Tendo em conta, os dois períodos experimentais do trabalho, 48h e 3 semanas, os resultados relativos à análise hematológica (figura 24), revelaram uma maior concentração de leucócitos totais nos grupos controlo comparativamente com o grupo diabético correspondente a cada período experimental. Ainda assim, a concentração de leucócitos totais foi superior no grupo CTR 48h comparativamente com o grupo CTR 3s. A concentração de

linfócitos foi ligeiramente superior no grupo CTR 3s, de 2394,96 células /mm³, embora os valores não tenham variado muito entre grupos, uma vez que, o grupo com menor concentração, o CTR 48h, apresentou um valor de 2218,54 células /mm³. A concentração de neutrófilos foi superior no grupo CTR 48h comparativamente com o grupo DIAB 48h. Relativamente aos mastócitos e eosinófilos os valores não diferiram muito entre grupos. Nenhum dos valores apresentou diferenças estatisticamente significativas.

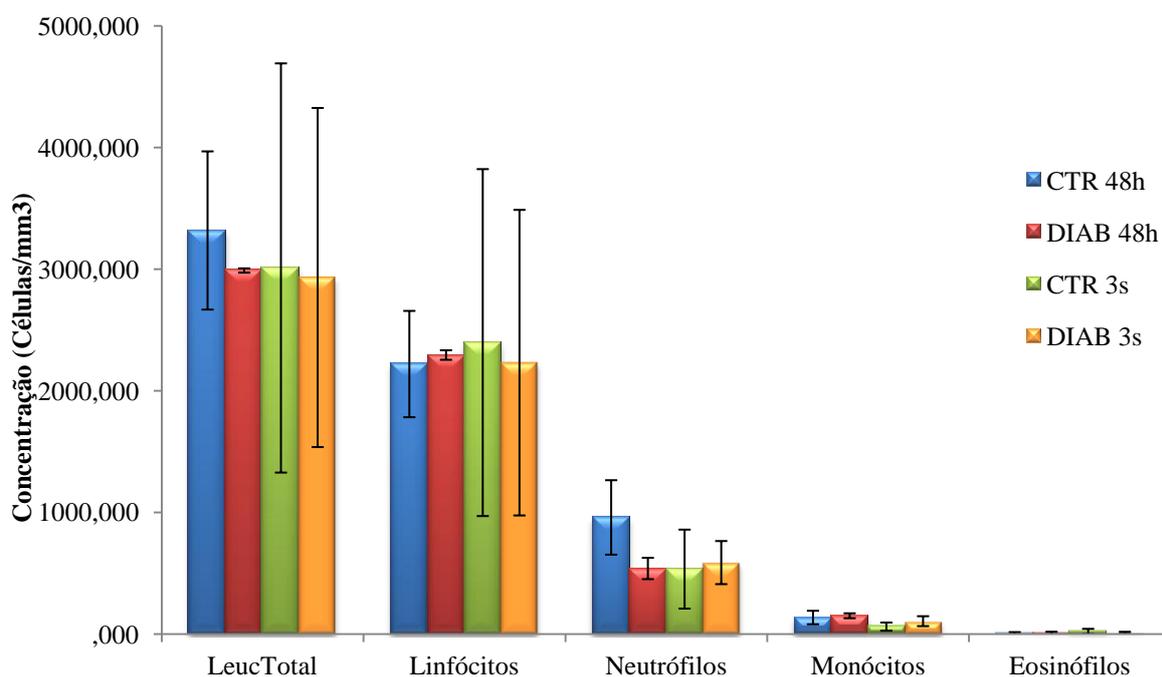


Figura 24: Concentração dos leucócitos (leucócitos totais, linfócitos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos) presentes no sangue dos animais dos diferentes grupos.

5. Discussão

A hidroxiapatite tem sido considerada um material biomédico biocompatível e estável, que pode ser utilizado, entre outras funções, como sistema de libertação de fármacos e para a reparação óssea (Queiroz et al., 2005; Ding et al., 2012). Com o desenvolvimento de técnicas de produção de materiais nanoestruturados ou de nanopartículas, as nanopartículas de HA foram sintetizadas, tendo em vista uma aplicação biomédica. Estas partículas parecem apresentar um aumento da bioatividade, favorecendo a sua biodegradação e promovendo a proliferação e migração celular, a vascularização dos tecidos e a difusão dos nutrientes, comparativamente com materiais convencionais (Navarro et al., 2008; Ding et al., 2012). No entanto, os dados relativos ao seu perfil de biossegurança são ainda escassos, existindo o risco de toxicidade associado ao tamanho de partícula, dose de exposição e modo de contacto (Motskin et al., 2009; Abdel-Gawad e Awwad, 2010; Cardoso et al., 2012; Ding et al., 2012).

A avaliação da biocompatibilidade e toxicidade da nano-HAp e o seu comportamento de biodegradação *in vivo* ainda não estão bem esclarecidos. Neste contexto, é fundamental avaliar novos parâmetros que permitam o desenvolvimento de biomateriais mais adequados ao uso clínico.

A biocompatibilidade é uma das questões críticas na pesquisa de biomateriais, esta reflete o grau de interação entre os biomateriais e os tecidos do hospedeiro. A biocompatibilidade consiste basicamente em dois elementos: a) biossegurança, isto é, apropriada resposta do hospedeiro não só sistémica mas também local (tecido circundante), ausência de citotoxicidade, e/ ou carcinogénese e b) biofuncionalidade, ou seja, a capacidade de o material desempenhar a função para a qual se destina (Morais et al., 2010).

Os modelos animais são utilizados para prever o comportamento clínico, segurança e biocompatibilidade de dispositivos médicos em humanos (Anderson, 2001). Os roedores têm conquistado um lugar de destaque na investigação, sendo os mais utilizados até hoje, o que se deve ao facto de terem: um tamanho reduzido, um ciclo reprodutivo curto, gerarem uma descendência numerosa, adaptarem-se facilmente a ambientes variados, serem animais dóceis e sociáveis e de fácil manipulação (Andrade et al., 2002). No nosso estudo foi utilizado o rato wistar do sexo masculino, uma vez que, a maioria dos estudos de biocompatibilidade realizados, foram efetuados nestes animais, o que nos facilita a comparação dos resultados.

No que diz respeito à biocompatibilidade, a implantação subcutânea em ratos é o método mais utilizado devido às seguintes vantagens: uso de área limitada para a manutenção dos animais e fácil manutenção da mesma; é uma metodologia de fácil execução que não

envolve tecidos duros, acelerando assim o processo laboratorial; permite comparar a resposta dos tecidos, para diversos materiais implantados, no mesmo animal e tem um custo relativamente baixo (Neto et al., 2008). Outra razão pela qual optamos por este modelo, foi o facto da obtenção de quantidades representativas de tecido tanto para a inclusão quanto para a análise histopatológica.

Este estudo envolveu ainda o estudo da biocompatibilidade na situação da diabetes, uma vez que, não existe nenhum estudo relatado na literatura que procure avaliar a resposta biológica da nano-HAp em condições diabéticas. Isto é relevante pelas alterações metabólicas que a doença implica e que poderão ter influência na abordagem terapêutica com nanopartículas. Assim, procuramos pela primeira vez avaliar a resposta biológica sistémica à implantação de nanoHAp, num modelo de diabetes experimental. Para induzir a diabetes nos animais, foi utilizada a administração de STZ, uma vez que é um fármaco mais seletivo para as células beta e apresenta uma toxicidade reduzida comparativamente ao aloxano (Hoftieze e Carpenete, 1973; Pinheiro et al., 2011). O modelo da indução da diabetes com STZ em ratos, tem sido amplamente estudado desde 1963. Este modelo tem a vantagem de ser altamente reprodutível, de se conhecer bem o tempo que diversas complicações demoram a desenvolver-se e do facto de apresentar semelhanças em algumas alterações estruturais, funcionais e bioquímicas com a doença humana (Ugarte et al., 2012). As vias de administração da STZ podem ser intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea (Etuk, 2010; Rohilla e Ali, 2012). Neste estudo a via i.p para a administração do STZ, foi selecionada tendo em conta a experiência do grupo de trabalho quer na administração quanto na dose administrar. E tendo em conta o facto de que a administração por via i.v provoca maior taxa de mortalidade do que por via intraperitoneal. Embora na indução da diabetes por via i.p ocorra mais facilmente a reversão espontânea da doença, se após duas semanas de indução o animal permanecer diabético, a reversão do estado hiperglicémico é rara (Delfino et al., 2002; Elias et al., 2008).

No nosso estudo, obteve-se um índice de perdas total de 12,5 % e uma taxa de sobrevivência de 80 % para os animais diabéticos induzidos com STZ. Esta taxa de sobrevivência é superior à obtida por Al-Kushi (2013), que usando uma concentração de STZ a 60 mg/Kg, pela mesma via de administração, obteve uma taxa de 66,6%. Num estudo realizado por Elias *et al* (2008), para uma concentração de STZ de 60 mg/kg estes autores obtiveram uma taxa de mortalidade de 53%. Em outros estudos realizados no nosso grupo de trabalho, usando uma concentração de STZ superior à usada neste estudo (55 mg/Kg), foram obtidas também menores taxas de sobrevivência. Concluimos assim, que a dose por nós

selecionada permite obter uma maior taxa de sobrevivência mantendo uma taxa razoável de indução.

Após a indução da diabetes, começou-se a observar, nos animais diabéticos, sintomas característicos da doença registados na literatura, tais como a perda de peso, a polifagia, a polidipsia e a poliúria (Kuzuya et al., 2002; Howarth et al., 2005; Subramani et al., 2012; Al-Kushi, 2013). Os animais dos grupos diabéticos (DIAB 48h e DIAB 3s) registaram ao longo de todo o período experimental perda de peso, tendo esta sido mais intensa nas primeiras duas semanas. Já os animais dos grupos controlo (CTR 48h e CTR 3s), até ao implante da nano-HAp, tiveram um gradual aumento de peso. Após o implante, o grupo CTR 48h registou uma gradual perda de peso, o mesmo não se verificou no grupo CTR 3s que registou um gradual aumento de peso ao longo de todo o período experimental. Este facto pode ser explicado tendo em conta que os animais do grupo CTR 48h foram sacrificados 48 horas após a implantação das nano-HAp, que poderá corresponder ao período de recuperação da cirurgia, período na qual os animais consomem menos comida. Já no grupo CTR 3s, o período de recuperação da cirurgia fica dissimulado no registo dos valores de peso, uma vez que este valor, neste grupo, só foi registado uma semana após o implante. Outra razão possível é o facto de no grupo CTR 48h ser mais evidente o efeito agudo das nano-HAp. Os resultados relativos à perda de peso vão ao encontro de outros resultados encontrados na literatura em que, animais diabéticos perdem peso comparativamente com animais controlo (McCracken et al., 2006; Al-Kushi, 2013). Está descrito na literatura que animais diabéticos perdem peso até ao estabelecimento da doença, mas após este período os animais retomam um gradual ganho de peso (Santana et al., 2003; Howarth et al., 2005). Este facto foi também já observado em vários protocolos experimentais realizados pelo nosso grupo de trabalho. No entanto, o mesmo não aconteceu no nosso estudo, pois os animais de ambos os grupos diabéticos perderam peso ao longo de todo o protocolo experimental, o que nos leva a suspeitar que haverá neste fator e na presença da diabetes algum efeito das nano-HAp.

Os animais diabéticos (DIAB 48h e DIAB 3s) consumiram uma maior quantidade de água e comida que os animais controlo (CTR 48h e CTR 3s). Estes resultados estão de acordo com a literatura, em que animais diabéticos consomem maior quantidade de água e comida comparativamente com o grupo controlo (Akbarzadeh et al., 2007; Okon et al., 2012). Na diabetes o limiar renal para a glucose é excedido e a glucose é excretada na urina. Esta glucose excedente vai atuar como soluto osmótico na urina, produzindo uma diurese osmótica, ou seja, a poliúria. Como consequência desta excessiva perda de água na urina, ocorre uma diminuição do volume de fluido extracelular e desidratação. Devido a este estado

hiperosmótico, o centro de sede é ativado resultando em sede excessiva, a polidipsia (Okon et al., 2012). A polifagia pode ser explicada segundo a teoria glucoestática da regulação de alimento. Segundo esta teoria, as diferenças de glucose no sangue são detetadas por glucoreceptores no centro hipotálamo, que afetam o consumo de energia. Assim, o aumento dos níveis de glucose resulta num aumento da sensação de saciedade, enquanto que a diminuição dos níveis de glucose no sangue tem o efeito oposto. Como na diabetes a glucose não se consegue mover para dentro das células a sensação de fome está sempre ativada, o que explica a ocorrência da polifagia (Chaput e Tremblay, 2009; Okon et al., 2012)

A toxicidade de novos biomateriais é frequentemente avaliada por monitorização da resposta dos órgãos vitais distantes do implante, nomeadamente, o baço, os pulmões, o coração, o fígado e os rins (Sabri et al., 2012). Quanto ao peso relativo dos órgãos recolhidos, apenas os rins apresentam diferenças estatisticamente significativas. Os rins dos animais diabéticos apresentam um maior peso relativo quando comparados com o grupo controlo do respetivo tempo de experiência. Resultados semelhantes foram obtidos em outros estudos relatados na literatura (Vats et al., 2004; Zafar e Naqvi, 2010). Vats e seus colaboradores, relacionam este aumento de peso com a hipertrofia renal mostrada por animais cuja diabetes é induzida com STZ. A entrada de glucose no tecido renal não é dependente da ação da insulina, e conseqüentemente, no caso da hiperglicemia, há um aumento da entrada de glucose. Desta forma ocorre uma maior deposição de glicogénio intra-renal, o que conduz à glicosilação do colagénio da membrana basal do rim (Vats et al., 2004). A análise bioquímica dos níveis séricos dos marcadores da função renal, ureia e creatinina, revelou que ambos os marcadores se encontram elevados nos animais diabéticos (Ureia=53,43±17,66 e Creatinina=0,83±0,13 mg/dl) em comparação com os não diabéticos (Ureia=42,43±3,67 e Creatinina=0,74±0,10 mg/dl), embora as diferenças não seja estatisticamente significativas para ambos os marcadores. Em outros estudos relatados na literatura, ambos os marcadores se encontram elevados em animais diabéticos. A tendência dos nossos resultados vai de encontro à relatada na literatura. Saeed et al, (2008), em ratos wistar machos (270-315g) obteve, para animais controlo, um valor médio da concentração de ureia de $52,50 \pm 2,1$ (mg/dl) e de creatinina de $0,85 \pm 0,1$ (mg/dl). Neste mesmo estudo, para animais diabéticos, induzidos com uma concentração de 65 mg/Kg de STZ, por via i.p, os resultados obtidos da ureia foram de $84,85 \pm 2,4$ (mg/dl) e para a creatinina de $1,40 \pm 0,3$ (mg/dl). No estudo realizado por Ding e seu grupo de trabalho (2012) em que avaliaram a biocompatibilidade de duas nano-HAp de diferentes diâmetros (10-20 e 20-40 nm), em animais saudáveis, estes autores verificaram que a nano-HAp de menor tamanho pode causar toxicidade renal. Segundo eles isto deve-se ao

facto que nanopartículas de menor tamanho estão em maior concentração no rim uma vez que são mais facilmente captadas por meio de endocitose, e como possuem maior área de superfície, têm uma atividade mais elevada. Estes autores sugerem que o principal órgão de excreção destas partículas podem ser os rins. Tendo em conta estes resultados e o facto de que as alterações dos níveis de ureia e creatinina só ocorrem quando a função renal é comprometida acima de 50% (Cologna et al., 2008), podemos concluir que a concentração de STZ por nós administrada é menos agressiva para os rins, e que as nossas nano-HAp não contribuem para um agravamento da função renal.

O peso relativo do fígado também foi superior nos animais diabéticos, comparativamente com o respetivo grupo controlo, embora estas diferenças não sejam estatisticamente significativas. Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores (Ohno et al., 2000; Vats et al., 2004; Zafar e Naqvi, 2010). Onho e seus colaboradores (2000) e Zafar e Naqvi (2010) relataram que esta hipertrofia do fígado pode ser devida a um aumento da acumulação de triglicéridos no fígado induzida pela hipoinsulinemia e pela baixa capacidade de excreção de secreção das lipoproteínas do fígado, resultante de uma anomalia na síntese da apolipoproteína B. As análises bioquímicas das enzimas hepáticas ALT e FA mostraram um aumento significativo dos níveis séricos de ambas as enzimas nos animais diabéticos (ALT=111,13±55,02 e FA=505,50±210,49) em comparação com os não diabéticos (ALT=45,33±8,17 e FA=103,00±29,07). Estes valores são estatisticamente significativos para a ALT ($p < 0,05$) e para a FA ($p < 0,01$) entre os dois grupos, CTR e DIAB. Em seus estudos, Saeed *et al.* (2008) e Zafar *et al.* (2009), verificaram que a administração, por via i.p, de 65 mg/kg e 45 mg/Kg, respetivamente, de STZ em ratos wistar causou danos histopatológicos no fígado e o aumento dos níveis séricos das enzimas hepáticas. A enzima FA está localizada no citoplasma e será libertada para a circulação após dano celular. Já a ALT, uma enzima solúvel, é libertada quando a lesão envolve organelos como as mitocôndrias (Saeed et al., 2008). No estudo realizado por Abdel Gawad e Awwad (2010) em que avaliaram a biocompatibilidade de diferentes concentrações (150, 300, 600, 1200, 1800 e 2400 mg/kg) de uma nano-HAp (40nm), injetada por via intravenosa em animais controlo, ou autores não verificaram alterações significativas nos valores de ALT. Já Ding e seus colaboradores (2012) ao avaliarem a biocompatibilidade de duas nano-HAp de diferentes diâmetros (10-20 e 20-40 nm), em animais saudáveis, verificaram que a ALT, no caso das nano-HAp de 20-40 nm, mostrou diferenças estatisticamente significativas do grupo controlo, sendo o seu valor mais baixo. Embora as diferenças de valores da FA não fossem estatisticamente significativas os seus valores apresentaram-se aumentadas para ambas as nano-HAp, sendo este valor superior

para as nano-HAp de menor dimensão. Num outro estudo realizado no nosso grupo de trabalho, em que avaliaram a biocompatibilidade de uma membrana de colagénio, em animais saudáveis e diabéticos, os valores obtidos para ambas as enzimas foram aproximadamente iguais ao deste estudo. Uma vez que esta membrana de colagénio é bastante biocompatível, segundo estudos relatados na literatura, e perante os nossos resultados podemos presumir que as nano-HAp não contribuem para o aumento significativo das enzimas hepáticas.

Em geral, a biocompatibilidade de um novo biomaterial com o tecido é avaliada com base nas respostas inflamatórias *in vivo* bem como a fibrose formada em torno do implante. A inflamação é esperada para todos os materiais externos ao organismo, incluindo os biomateriais, e é reconhecida como parte da resposta do organismo ao corpo estranho (Sabri et al., 2012). No presente trabalho, a análise histopatológica do tecido subcutâneo no qual foi implantado a nano-HAp, demonstrou a presença de uma reação inflamatória aguda para as amostras das 48 horas, com presença predominante de neutrófilos, e uma resposta inflamatória crónica caracterizada pela presença de macrófagos e células gigantes, para as amostras das 3 semanas.

Em 2012, Lopes realizou um estudo no qual avaliou, *in vivo*, a biocompatibilidade de uma nano-HAp. Neste estudo, foram inoculadas 0,30 gramas de nano-HAp (em forma de pasta) no tecido subcutâneo de ratos wistar saudáveis com aproximadamente 90 dias. O tecido subcutâneo foi avaliado em microscopia ótica aos 3, 7, 14, 21, 45 e 60 dias. Aos 3 dias foi observado que o material formou aglomerados de tamanhos variados, promoveu necrose local e intensa migração de células inflamatórias. Aos 21 dias, foi observado que o volume do implante reduziu acentuadamente, e que os restos de material se encontravam envolvidos por macrófagos e células gigantes. No nosso estudo observamos algo semelhante, sendo que a nossa reação inflamatória foi menos intensa para ambos os tempos e não observamos intensa necrose local. A ligeira necrose por nós observada, pode não estar associada com a toxicidade do material, mas com o procedimento cirúrgico que conduz a uma desintegração dos tecidos.

Em 1993, Oliveira *et al* implantaram uma hidroxiapatite microgranular (30 mg) no tecido subcutâneo de rato wistar de modo a avaliarem o seu comportamento biológico. Às 24 horas após o implante observou-se uma inflamação aguda intensa caracterizada por edema e elevado número de polimorfonucleares (PMNs). Aos 21 dias verificaram a presença de granulomas do tipo corpo estranho, com predominância de macrófagos e células gigantes envolvendo as partículas de hidroxiapatite. Estes autores compararam os seus resultados com outro estudo, realizado por Tanaka e seu grupo de trabalho, no qual foi implantado discos densos de hidroxiapatite e verificaram que a inflamação aguda induzida pela hidroxiapatite

microgranular foi mais exuberante, o que segundo eles, provavelmente, ocorreu devido ao tamanho das partículas.

Em ambos os períodos experimentais do nosso estudo, a respetiva reação inflamatória, foi maior nos animais controlo comparativamente com os animais diabéticos. Segundo a literatura, na situação de diabetes, existe uma diminuição das respostas microvasculares para os mediadores inflamatórios, uma reduzida interação entre os leucócitos e o endotélio e um reduzido número de leucócitos nas lesões inflamatórias (Alba-Loureiro et al., 2007; Sakuljaitrong et al., 2012), o que explica o facto de, nos grupos diabéticos, ter ocorrido menor reação inflamatória e ainda o facto de os leucócitos totais, da análise hematológica, estarem ligeiramente diminuídos nestes mesmos grupos comparativamente com o grupo controlo do respetivo tempo de experiência. Uma explicação possível para a anormal função leucocitária pode ser uma sub-regulação das moléculas de adesão e recrutamento de leucócitos no decorrer do processo inflamatório (Alba-Loureiro et al., 2007). Nos seus estudos, Sakuljaitrong *et al* (2012) obteve valores de leucócitos totais muito semelhantes aos nossos para animais controlo ($3,64 \times 10^3$ células /mm³) e ligeiramente inferiores para os animais diabéticos ($2,15 \times 10^3$ células /mm³).

Tem sido demonstrado que os neutrófilos de pacientes com diabetes têm a capacidade de fagocitose, de libertação de enzimas lisossomais e de produção de espécies reativas de oxigénio diminuídas. Estudos em ratos diabéticos também demonstraram uma redução na migração de neutrófilos e da sua capacidade fagocítica (Alba-Loureiro et al., 2007; Alves et al., 2007). Estas conclusões justificam os nossos resultados, em que a quantidade de neutrófilos é menor no grupo DIAB 48h e maior no CTR 48h. E ainda o facto de a reabsorção das nanopartículas ter sido mais intensa no grupo CTR 48h.

No grupo DIAB 3s observou-se menor quantidade de macrófagos comparativamente com o respetivo grupo controlo, tal facto, pode estar associado com alterações na morfologia e capacidade de adesão destas células (Kaverina et al., 2002; Grando, 2007). Em 2007, Grando realizou um estudo em que avaliou a morfologia e funcionalidade dos macrófagos de ratos wistar diabéticos. Este autor observou que, na situação da diabetes, os macrófagos apresentaram-se em forma esférica, com reduzido número de filopódios e lamelipódios, características de células não ativadas. Os filopódios e lamelipódios estão envolvidos no processo de migração celular, como tal, a diminuição do número destas estruturas apresenta consequências para a capacidade da célula em migrar (Kaverina et al., 2002). Grando, observou ainda que os macrófagos perdiam 54% de capacidade de adesão comparativamente com o grupo controlo. Uma vez que a principal função dos macrófagos é a de fagocitose, o

facto de existir menos quantidade de macrófagos no grupo DIAB 3s, levou a uma menor reabsorção das nanopartículas neste mesmo grupo.

A formação de uma cápsula fibrosa é sinal de uma reação bem estabelecida para os biomateriais implantados e é reconhecida como fase final da reação ao corpo estranho (Sabri et al., 2012). No nosso estudo observou-se a existência de uma cápsula fibrosa de espessura média para os grupos CTR 3s e DIAB 3s, sendo esta ligeiramente mais espessa no grupo CTR 3s. A cápsula fibrosa observada no nosso grupo controlo CTR 3s apresentou menos espessura, comparada com a observada por Lopes (2012) aos 21 dias. Segundo Fournier *et al.* (2003) e Morais *et al.* (2010), a presença de cápsula fibrosa não representa um estado de não biocompatibilidade, no entanto a sua presença é altamente indesejável, uma vez que dificulta o fornecimento de oxigénio e nutrientes para as células encapsuladas.

Observou-se ainda alguma agregação das nano-HAp, sendo que esta foi maior nos grupos diabéticos comparativamente com o respetivo grupo controlo. O grupo DIAB 3s mostrou uma maior intensidade de agregação de nano-HAp que o grupo DIAB 48h. Este facto pode estar associado com a lenta reabsorção das nanopartículas nos grupos diabéticos, e consequentemente uma maior agregação das partículas. Verificou-se também a evidência de sais de cálcio, que podem estar associados com a agregação das nano-HAp ou com a possível deposição de cálcio externo, sendo que pela técnica por nós utilizada (Von Kossa) não é possível saber concretamente a sua proveniência. Existem várias hipóteses, relatadas na literatura, para a ocorrência da deposição de sais de cálcio. Uma delas pode estar associada com a desvitalização celular e acumulação de detritos celulares após a implantação. Uma vez que as células do tecido são desvitalizadas, o fósforo das membranas reage com o fluido extracelular que contém cálcio, resultando assim na formação de cristais fosfato de cálcio (Onuki et al., 2008). Tendo em conta que observamos necrose no centro das nanopartículas no grupo DIAB 3s, esta é uma hipótese possível de ter ocorrido. Uma outra hipótese possível para o mecanismo de calcificação, no caso dos materiais à base de fosfato de cálcio, é que a libertação de Ca^{2+} , PO_4^{3-} e HPO_4^{2-} para os tecidos circundantes pode aumentar a saturação local do fluido biológico, causando a precipitação de apatite carbonatada que incorpora cálcio, fosfato e proteínas (Fricain et al., 2013). Quanto maior a capacidade de o biomaterial absorver água maior a taxa e a extensão da calcificação (Golomb, 1992). Teriam de ser feitos outros estudos adicionais, de modo a confirmar a proveniência dos sais de cálcio. Segundo a literatura, a formação de estruturas calcificadas neste modelo estudado é um sinal de osteoindutividade do material (Parirokh et al., 2011).

A biocompatibilidade de um biomaterial deve ser avaliada tendo em conta três fatores. O primeiro é que a resposta específica do indivíduo ao material pode variar dependendo do local da sua aplicação, ou seja, a biocompatibilidade é definida quer pelas características do material quer pela localização na qual o mesmo é implantado. O segundo fator é que o material deve reagir especificamente com os tecidos e não ser ignorado por eles. A reação inflamatória inicial observada na análise das nossas amostras, confirma a ocorrência deste fator com as nanopartículas de hidroxiapatite por nós testadas. O último fator refere-se à degradação do biomaterial, este não deve permanecer indefinidamente no organismo mas ser degradado ao longo do tempo (Williams, 2008; Lopes, 2012). A fagocitose de partículas de hidroxiapatite por células como macrófagos, fibroblastos e osteoblastos foi já demonstrada *in vivo* e *in vitro* (Oliveira et al., 1993). Assim sendo, a elevada redução, às 3 semanas, da quantidade de nano-HAp implantadas no nosso grupo controlo pode ser associada a uma possível biodegradação do material. Nos grupos diabéticos não se observou tão elevada redução da quantidade de nano-HAp, o que poderá ser devido ao facto de a capacidade fagocítica dos macrófagos se encontrar diminuída nesta patologia (Khanna et al., 2010). Segundo o estudo realizado por Lopes (2012), é presumível que por volta dos 40-60 dias toda a nano-HAp tivesse sido absorvida nos grupos controlo. Num outro estudo realizado com hidroxiapatite microgranular, aos 60 dias ainda existiam micropartículas de hidroxiapatite, completamente envolvidas por macrófagos e células gigantes (Oliveira et al., 1993).

A reabsorção é uma característica desejada para biomateriais nos quais o processo de degradação é concomitante com a reposição do osso em formação. Vários estudos têm demonstrado que a reabsorção gradual da hidroxiapatite só se inicia 4 a 5 anos após a implantação, o que tem limitado o seu uso clínico (Guastaldi e Aparecida, 2010). Como tal, podemos supor que o uso de partículas de menor dimensão, para aplicação na regeneração óssea, é mais vantajoso devido a sua maior rapidez de absorção, pois partículas nanoestruturadas são mais facilmente fagocitadas que partículas com estrutura microgranular.

6. Conclusões

Este estudo envolveu a utilização de testes *in vivo* para determinar a biocompatibilidade geral da nano-HAp como um biomaterial na condição de diabetes. Utilizando o modelo de implante subcutâneo em ratos wistar, estudou-se a resposta inflamatória aguda e crônica em dois pontos temporais distintos, respetivamente, 48 horas e 3 semanas.

Os resultados na análise bioquímica permitem concluir que, para as condições estudadas, as alterações verificadas nas concentrações das enzimas hepáticas e dos marcadores de função renal estão relacionadas com a diabetes e não com a toxicidade das nano-HAp.

De acordo com a análise hematológica e dos eventos histopatológicos ocorridos nos períodos de observação propostos neste estudo, é possível concluir que as nano-HAp não causaram reação inflamatória exacerbada em nenhum dos períodos experimentais e que ocorreu reabsorção do biomaterial ao longo do período experimental, sendo que esta foi mais lenta nos animais diabéticos. O fato de ocorrer reabsorção do biomaterial é indicativo de que não houve rejeição do material, o que reforça a biocompatibilidade do material e possibilita o seu uso clínico no futuro.

Os resultados do nosso trabalho sugerem a necessidade de um estudo mais aprofundado, nomeadamente, num período de tempo mais longo, de modo a melhor compreender os processos envolvidos na interação da nano-HAp com o organismo, especialmente na patologia da diabetes.

7. Bibliografia

- Abdel-Gawad, E. I. e S. A. Awwad (2010). Biocompatibility of Intravenous Nano Hydroxyapatite in Male Rats. *Nature and Science* **8**(9).
- Abeeleh, M. A., Z. B. Ismail, K. R. Alzaben, S. Abu-Halaweh, M. K. Al-Essa, J. Abuabeeleh e M. M. Alsmady (2009). Induction of Diabetes Mellitus in Rats Using Intraperitoneal Streptozotocin: A Comparison between 2 Strains of Rats. *European Journal of Scientific Research* **32**(3): 398-402.
- Akbarzadeh, A., D. Norouzian, M. R. Mehrabi, S. Jamshidi, A. Farhangi, A. A. Verdi, S. M. Mofidian e B. L. Rad (2007). Induction of diabetes by Streptozotocin in rats. *Indian J Clin Biochem* **22**(2): 60-64.
- Akinola, O., M. Gabriel, A. Suleiman e F. Olorunsogbon (2012). Treatment of Alloxan-Induced Diabetic Rats with Metformin or Glitazones is Associated with Amelioration of Hyperglycaemia and Neuroprotection. *The Open Diabetes Journal*, 2012 **5**: 8-12.
- Al-Kushi, A. G. (2013). Biochemical and Ultrastructure Changes in the Kidney of Streptozotocin-Induced Diabetic Rat. *Pakistan Journal of Nutrition* **12**(4): 313-321.
- Alba-Loureiro, T. C., C. D. Munhoz, J. O. Martins, G. A. Cerchiaro, C. Scavone, R. Curi e P. Sannomiya (2007). Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus. *Braz J Med Biol Res* **40**(8): 1037-1044.
- Altman, L., K., S. Blumenthal, J., P. Bondy, K., P. Dilts, V., D. Drossman, A., L. Faling, J., E. Frenkel, P., G. Gabbard, O., R. Hoekelman, A., G. Mandell, L., E. Mcconnel, A., F. Plum, G. Rossi, V. e P. Tanser, H. (SD). Manual Merck. Saúde para a família. 1517.
- Alves, C., J. Andion, M. Brandão e R. Menezes (2007). Mecanismos Patogênicos da Doença Periodontal Associada ao Diabetes Melito. *Arq Bras Endocrinol Metabol* **51**(7): 1050-1057.
- Anderson, J. M. (2001). Biological responses to materials. *Annual Review of Materials Research* **31**: 81-110.
- Anderson, J. M. e A. K. McNally (2011). Biocompatibility of implants: lymphocyte/macrophage interactions. *Semin Immunopathol* **33**: 221-233.
- Anderson, J. M., A. Rodriguez e D. T. Chang (2008). Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in Immunology* **20**(2): 86-100.
- Andia, D. C., P. S. Cerri e L. C. Spolidorio (2006). Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. *Revista de Odontologia da UNESP* **35**(2): 191-198.
- Andrade, A., S. C. Pinto, R. S. Oliveira e Orgs. (2002). *Animais de Laboratório: Criação e Experimentação*. Rio de Janeiro. 388.
- Arambasic, J., M. Mihailovic, A. Uskokovic, S. Dinic, N. Grdovic, J. Markovic, G. Poznanovic, D. Bajec e M. Vidakovic (2012). Alpha-lipoic acid upregulates antioxidant enzyme gene expression and enzymatic activity in diabetic rat kidneys through an O-GlcNAc-dependent mechanism. *European Journal of Nutrition*.
- Association, A. D. (2011). Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus *Diabetes Care* **34**(1): S62-S69.
- Baptista, L. S. G. A. (2011). Hematologia e bioquímica sanguínea em jovens de Cegonha-Branca (*Ciconia ciconia*) no estado selvagem. Mestrado, Universidade Técnica de Lisboa. 129.
- Boccafoschi, F., C. Mosca e M. Cannas (2012). Cardiovascular biomaterials: when the inflammatory response helps to efficiently restore tissue functionality? *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*: 1-15.

- Cardoso, D. A., J. A. Jansen e S. C. G. Leeuwenburgh (2012). Synthesis and application of nanostructured calcium phosphate ceramics for bone regeneration. *Journal of biomedical materials research* **100B**(8): 2316-2326.
- Chaput, J. P. e A. Tremblay (2009). The glucostatic theory of appetite control and the risk of obesity and diabetes. *Int J Obes (Lond)* **33**(1): 46-53.
- Chatzigeorgiou, A., A. Halapas, K. Kalafatakis e E. Kamper (2009). The Use of Animal Models in the Study of Diabetes Mellitus. *In Vivo* **23**(2): 245-258.
- Chiara, G., F. Letizia, F. Lorenzo, S. Edoardo, S. Diego, S. Stefano, B. Eriberto e Z. Barbara (2012). Nanostructured Biomaterials for Tissue Engineered Bone Tissue Reconstruction. *Int J Mol Sci* **13**(1): 737-757.
- Clarke, B. (2008). Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **3**: S131-S139.
- Claudino, M., D. S. Ceolin, S. Alberti, T. M. Cestari, C. T. Spadella, I. R. Rubira-Bullen, G. P. Garlet e G. F. de Assis (2007). Alloxan-induced diabetes triggers the development of periodontal disease in rats. *PLoS One* **2**(12): e1320.
- Cologna, A. J., L. V. Lima, S. Tucci, Jr., H. J. Suaid, R. B. Reis, L. F. Tirapelli, A. A. Rodrigues, Jr. e A. C. Martins (2008). Cyclosporine action on kidneys of rats submitted to normothermic ischaemia and reperfusion. *Acta Cir Bras* **23 Suppl 1**: 36-41.
- Costa, A. C. F. M., M. G. Lima, L. H. M. A. Lima, V. V. Cordeiro, K. M. S. Viana, C. V. Souza e H. L. Lira (2009). Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos* **4**(3): 29-38.
- Culina, S., V. Brezar e R. Mallone (2013). Insulin and type 1 diabetes: immune connections. *Eur J Endocrinol* **168**(2): R19-31.
- Delfino, V. D. A., J. F. Figueiredo, T. Matsuo, M. E. Favero, A. M. Matni e A. Mocelin (2002). Streptozotocin-induced diabetes mellitus: long-term comparison of two drug administration routes. *J Bras Nefrol* **24**(1): 31-36.
- Ding, T., Y. Xue, H. Lu, Z. Huang e J. Sun (2012). Effect of particle size of hydroxyapatite nanoparticles on its biocompatibility. *IEEE Trans Nanobioscience* **11**(4): 336-340.
- Doblare, M., J. M. Garcia e M. J. Gomez (2004). Modelling bone tissue fracture and healing: a review. *Engineering Fracture Mechanics* **71**(13-14): 1809-1840.
- Duarte, R. (2002). *Diabetologia Clínica*. 441.
- Elgazar, A. F., A. A. REzq e H. M. Bukhari (2013). Anti-Hyperglycemic Effect of Saffron Extract in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *European Journal of Biological Sciences* **5**(1): 14-22.
- Elias, J. A. Z., V. D. A. Delfino, D. S. Barbosa, B. A. Fabris e T. Matsuo (2008). Effects of Ramipril and Simvastatin on the Oxidative Stress of Diabetic Rats. *Arq Bras Endocrinol Metabol* **52**(7): 1131-1138.
- Etuk, E. U. (2010). Animals models for studying diabetes mellitus. *Agriculture and Biology Journal of North America* **1**(2): 130-134.
- Fauci, A., S., E. Braunwald, D. kasper, L., S. hauser, L, D. Longo, L., J. jamenson, L. e J. loscalzo (2009). *Harrinson Medicina Interna*. 2754.
- Fournier, E., C. Passirani, C. N. Montero-Menei e J. P. Benoit (2003). Biocompatibility of implantable synthetic polymeric drug carriers: focus on brain biocompatibility. *Biomaterials* **24**(19): 3311-3331.
- Fricain, J. C., S. Schlaubitz, C. Le Visage, I. Arnault, S. M. Derkaoui, R. Siadous, S. Catros, C. Lalande, R. Bareille, M. Renard, T. Fabre, S. Cornet, M. Durand, A. Leonard, N. Sahraoui, D. Letourneur e J. Amedee (2013). A nano-hydroxyapatite--pullulan/dextran polysaccharide composite macroporous material for bone tissue engineering. *Biomaterials* **34**(12): 2947-2959.

- Funk, J. R., J. E. Hale, D. Carmines, H. L. Gooch e S. R. Hurwitz (2000). Biomechanical evaluation of early fracture healing in normal and diabetic rats. *J Orthop Res* **18**(1): 126-132.
- Golomb, G. (1992). Calcification of polyurethane-based biomaterials implanted subcutaneously in rats: role of porosity and fluid absorption in the mechanism of mineralization. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*: 272-277.
- Grando, F. C. C. (2007). Avaliação morfológica e funcional de macrófagos de ratos *wistar* diabéticos suplementados com lectina de soja. Mestrado, Universidade Federal do Paraná. 67.
- Graves, D. T., J. Alblowi, D. N. Paglia, J. P. O'Connor e S. Lin (2011). Impact of Diabetes on Fracture Healing. *Journal of Experimental and Clinical Medicine* **3**(1): 3-8.
- Guastaldi, A. C. e A. H. Aparecida (2010). Fosfatos de cálcio de interesse biológico: Importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos *Química Nova* **33**(6): 1352-1358.
- Gutierrez, M., M. A. Lopes, N. S. Hussain, A. T. Cabral, L. Almeida e J. D. Santos (2006). Substitutos Ósseos. *Arquivos de Medicina* **19**(4): 153-162.
- Gutowska, I., Z. Machoy e B. Machalinski (2005). The role of bivalent metals in hydroxyapatite structures as revealed by molecular modeling with the HyperChem software. Wiley Periodicals, Inc.: 788-793.
- Hernández-Gil, I. F. T., M. A. A. Gracia, M. C. Pingarrón e L. B. Jerez (2006). Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* **11**(1): E47-51.
- Hing, K. A. (2004). Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* **362**(1825): 2821-2850.
- Hoftieze, V. e A. Carpenete (1973). Comparison of Streptozotocin and Alloxan-Induced Diabetes in Rat, Including Volumetric Quantitation of Pancreatic-Islets. *Diabetologia* **9**(3): 178-184.
- Howarth, F. C., M. Jacobson, M. Shafiullah e E. Adeghate (2005). Long-term effects of streptozotocin-induced diabetes on the electrocardiogram, physical activity and body temperature in rats. *Exp Physiol* **90**(6): 827-835.
- Isola, J. G. M. P. (2012). Bone Structure and Regeneration-Literature Review. *Revista Científica De Medicina Veterenária* **18**: 1-12.
- Junqueira, L. C. e J. Carneiro (2004). Tecido ósseo: *Histologia Básica*. 488.
- Kaverina, I., O. Krylyshkina e J. V. Small (2002). Regulation of substrate adhesion dynamics during cell motility. *Int J Biochem Cell Biol* **34**(7): 746-761.
- Khanna, S., S. Biswas, Y. Shang, E. Collard, A. Azad, C. Kauh, V. Bhasker, G. M. Gordillo, C. K. Sen e S. Roy (2010). Macrophage dysfunction impairs resolution of inflammation in the wounds of diabetic mice. *PLoS One* **5**(3): e9539.
- Kidambi, S. e S. B. Patel (2008). Diabetes mellitus: considerations for dentistry. *J Am Dent Assoc* **139** *Suppl*: 8S-18S.
- Kim, H. K. (2012). *Ecklonia cava* Inhibits Glucose Absorption and Stimulates Insulin Secretion in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2012**: 1-7.
- King, A. J. F. (2012). The use of animal models in diabetes research. *British Journal of Pharmacology* **166**(3): 877-894.
- Kirsten, V. R., P. Sesterheim e D. Saitovitch (2010). Animal models for type 1 diabetes studies. *Medicina* **43**(1): 3-10.
- Kuzuya, T., S. Nakagawa, J. Satoh, Y. Kanazawa, Y. Iwamoto, M. Kobayashi, K. Nanjo, A. Sasaki, Y. Seino, C. Ito, K. Shima, K. Nonaka e T. Kadowaki (2002). Report of the

- Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* **55**(1): 65-85.
- Layden, B. T., V. Durai e W. L. Lowe (2010). G-Protein-Coupled Receptors, Pancreatic Islets, and Diabetes. *Diabetes. Nature Education* **3**(9).
- Li, Y. Y., H. H. Liu, H. L. Chen e Y. P. Li (2012). Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate STZ-induced pancreas damage in type 1 diabetes. *Biomed Mater Eng* **22**(1-3): 97-103.
- Lopes, J. F. S. (2012). Avaliação da biocompatibilidade da hidroxiapatite nanoparticulada no subcutâneo de ratos. Doutorado, Universidade de São Paulo. 127.
- McCracken, M. S., R. Aponte-Wesson, R. Chavali e J. E. Lemons (2006). Bone associated with implants in diabetic and insulin-treated rats. *Clin Oral Implants Res* **17**(5): 495-500.
- Morais, J. M., F. Papadimitrakopoulos e D. J. Burgess (2010). Biomaterials/Tissue Interactions: Possible Solutions to Overcome Foreign Body Response. *American Association of Pharmaceutical Scientists* **12**(2): 188-196.
- Motskin, M., D. M. Wright, K. Muller, N. Kyle, T. G. Gard, A. E. Porter e J. N. Skepper (2009). Hydroxyapatite nano and microparticles: correlation of particle properties with cytotoxicity and biostability. *Biomaterials* **30**(19): 3307-3317.
- Navarro, M., A. Michiardi, O. Castano e J. A. Planell (2008). Biomaterials in orthopaedics. *J R Soc Interface* **5**(27): 1137-1158.
- Neto, R. T. M., I. Mello, A. B. S. Moretti, C. R. C. Raobazza e A. A. C. Pereira (2008). In vivo qualitative analysis of the biocompatibility of different cyanoacrylate-based adhesives. *Oral Pathology* **22**(1): 43-47.
- Ohno, T., F. Horio, S. Tanaka, M. Terada, T. Namikawa e J. Kitoh (2000). Fatty liver and hyperlipidemia in IDDM (insulin-dependent diabetes mellitus) of streptozotocin-treated shrews. *Life Sci* **66**(2): 125-131.
- Okon, U. A., D. U. Owo, N. E. Udokang, J. A. Udobang e C. E. Ekpenyong (2012). Oral Administration of Aqueous Leaf Extract of *Ocimum Gratissimum* Ameliorates Polyphagia, Polydipsia and Weight Loss in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *American Journal of Medicine and Medical Sciences* **2**(3): 45-49.
- Oliveira, D. T., J. M. Granjeiro, L. Maeda, M. Chacon, M. A. Fonseca, E. M. Taga e M. S. L. Taga (1993). Hidroxiapatite microgranular: Comportamento biológico em tecido subcutâneo de ratos. *Rev.Odontol.* **22**(2): 197-202.
- Oliveira, L. S. A. F., C. S. Oliveira, A. P. L. Machado e F. P. Rosa (2010). Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. *Revista de Ciências Mèdicas e Biológicas* **9**(1): 37-44.
- Onuki, Y., U. Bhardwaj, F. Papadimitrakopoulos e D. J. Burgess (2008). A review of the biocompatibility of implantable devices: current challenges to overcome foreign body response. *J Diabetes Sci Technol* **2**(6): 1003-1015.
- Osinubi, A. A., O. G. Ajayi e A. E. Adesiyun (2006). Evaluation of the anti-diabetic effect of aqueous leaf extract of *tapinanthus butungii* in male sprague-dawley rats. *Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences* **16**(1): 41-47.
- Parirokh, M., B. Mirsoltani, M. Raouf, H. Tabrizchi e A. A. Haghdoost (2011). Comparative study of subcutaneous tissue responses to a novel root-end filling material and white and grey mineral trioxide aggregate. *Int Endod J* **44**(4): 283-289.
- Parizi, A. M., G. Jelodar, H. Moslemi, A. K. Tafti e M. J. Emami (2010). Influence of hydroxyapatite on fracture healing in diabetic rats: biomechanical and radiographic studies. *Veterinarski Arhiv* **80**(1): 113-120.
- Pinheiro, L. S., A. D. de Melo, A. E. Andreatzi, L. C. de Caires, M. B. Costa e R. M. G. Garcia (2011). Protocol of Insulin Therapy For Streptozotocin-Diabetic Rats Based on

- a Study of Food Ingestion and Glycemic Variation. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science* **38**(2): 117-127.
- Pizzi, S. D., R. Madonna, M. Caulo, G. L. Romani, R. De Caterina e A. Tartaro (2012). MR Angiography, MR Imaging and Proton MR Spectroscopy In-Vivo Assessment of Skeletal Muscle Ischemia in Diabetic Rats. *PLoS One* **7**(9).
- Queiroz, A. C., J. D. Santos e F. J. Monteiro (2005). Development of a system to adsorb drugs onto calcium phosphate materials. *J Mater Sci Mater Med* **16**(7): 641-646.
- Ratner, D. B., A. S. Hoffman, F. J. Schoen e J. E. Lemons (2004). *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. 879.
- Rohilla, A. e S. Ali (2012). Alloxan Induced Diabetes: Mechanisms and Effects. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences* **3**(2): 819-823.
- Sabri, F., J. D. Boughter, Jr., D. Gerth, O. Skalli, T. C. Phung, G. R. Tamula e N. Leventis (2012). Histological evaluation of the biocompatibility of polyurea crosslinked silica aerogel implants in a rat model: a pilot study. *PLoS One* **7**(12): e50686.
- Saeed, M. K., Y. Deng e R. Dai (2008). Attenuation of Biochemical Parameters in Streptozotocin-induced Diabetic Rats by Oral Administration of Extracts and Fractions of *Cephalotaxus sinensis*. *J. Clin. Biochem. Nutr* **42**: 21-28.
- Sakakura, C. E., R. Morgonar e E. M. Júnior (2005). A Influência do Diabetes Mellitus na Implantodontia. Uma Revisão de Literatura. *Revista Internacional de Periondontia Clínica* **2**(4): 29-36.
- Sakata, N., G. Yoshimatsu, Tsuchiya.H, S. Egawa e M. Unno (2012). Animal Models of Diabetes Mellitus for Islet Transplantation. *Experimental Diabetes Research* **2012**: 1-11.
- Sakuljaitrong, S., S. Chomko, C. Talubmook e N. Buddhakala (2012). Effect of flower extract from lotus (*Nelumbo nucifera*) on haematological values and blood cells characteristics in streptozotocin-induced diabetic rats. *ARNP Journal of Science and Technology* **2**(11): 1049-1054.
- Santana, R. B., L. Xu, H. B. Chase, S. Amar, D. T. Graves e P. C. Trackman (2003). A role for advanced glycation end products in diminished bone healing in type 1 diabetes. *Diabetes* **52**(6): 1502-1510.
- Seeley, R. R., T. D. Stephens e P. Tate (2003). *Sistema Esquelético: Ossos e Tecido Ósseo :Anatomia e Fisiologia*. 1118.
- Skelin, M., M. Rupnik e A. Cencic (2010). Pancreatic Beta Cell Lines and their Applications in Diabetes Mellitus Research. *Altex-Alternatives to Animal Experimentation* **27**(2): 105-113.
- Stepien, E. (2011). Acceleration of New Biomarkers Development and Discovery in Synergistic Diagnostics of Coronary Artery Disease. *Coronary Angiography* **18**: 353-374.
- Subramani, K., S. Pathak e H. Hosseinkhani (2012). Recent Trends in Diabetes Treatment Using Nanotechnology. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* **7**(1): 85-95.
- Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological Research* **50**(6): 537-546.
- Talbot, S., H. B. Gariépy, J. Saint-Denis e R. Couture (2012). Activation of kinin B1 receptor evokes hyperthermia through a vagal sensory mechanism in the rat. *Journal of Neuroinflammation* **9**(214): 1-10.
- Tirgan, N., G. A. Kulp, P. Gupta, A. Boretsky, T. A. Wiraszka, B. Godley, R. G. Tilton e M. Motamedi (2012). Nicotine Exposure Exacerbates Development of Cataracts in a Type 1 Diabetic Rat Model. *Experimental Diabetes Research* **2012**: 1-7.

- Ugarte, M., M. Brown, K. A. Hollywood, G. J. Cooper, P. N. Bishop e W. B. Dunn (2012). Metabolomic analysis of rat serum in streptozotocin-induced diabetes and after treatment with oral triethylenetetramine (TETA). *Genome Med* **4**(4): 35.
- Ulugol, A., C. Oltulu, O. Gunduz, C. Citak, R. Carrara, M. R. Shaqqaqi, A. M. Sanchez e A. Dogrul (2012). 5-HT7 receptor activation attenuates thermal hyperalgesia in streptozocin-induced diabetic mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **102**(2): 344-348.
- Vats, V., S. P. Yadav e J. K. Grover (2004). Ethanolic extract of *Ocimum sanctum* leaves partially attenuates streptozotocin-induced alterations in glycogen content and carbohydrate metabolism in rats. *J Ethnopharmacol* **90**(1): 155-160.
- Vega-Monroy, M. L. e C. Fernandez-Mejia (2011). Beta-Cell Function and Failure in Type 1 Diabetes. *Type 1 Diabetes - Pathogenesis, Genetics and Immunotherapy* **5**: 93-116.
- Viana, M. S. S. B. (2010). Características hematológicas e ocorrência de hemoparasitas em aves de rapina. Mestrado, Universidade Técnica De Lisboa.
- Villarreal, G., J. Zagorski e S. M. Wahl (2001). Inflammation: Acute. *Nature Publishing Group*: 1-8.
- Vital, C. C., A. P. B. Borges, C. C. Fonseca, A. C. Tsiomis, T. B. Carvalho, E. B. Fontes, M. P. Sena e G. Fófano (2006). Biocompatibilidade e comportamento de compósitos de hidroxiapatita em falha óssea na ulna de coelhos. *Arq. Bras. Mead. Vet. Zootec* **58**(2): 175-183.
- Williams, D. F. (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* **29**(20): 2941-2953.
- Yang, J. Y., M. Y. Kang, S. H. Nam e M. Friedman (2012). Antidiabetic Effects of Rice Hull Smoke Extract in Alloxan-Induced Diabetic Mice. *J Agric Food Chem* **60**(1): 87-94.
- Yeap, S. K., N. M. Ali, H. M. Yusof, N. B. Alitheen, B. K. Beh, W. Y. Ho, S. P. Koh e K. Long (2012). Antihyperglycemic Effects of Fermented and Nonfermented Mung Bean Extracts on Alloxan-Induced-Diabetic Mice. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2012**: 1-7.
- Yoon, J. W. e H. S. Jun (2005). Autoimmune destruction of pancreatic beta cells. *Am J Ther* **12**(6): 580-591.
- Zafar, M. e S. N. U. H. Naqvi (2010). Effects of STZ-Induced Diabetes on the Relative Weights of Kidney, Liver and Pancreas in Albino Rats: A Comparative Study. *International Journal of Morphology* **28**(1): 135-142.
- Zhang, L. e T. J. Webster (2009). Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. *Nanotoday* **4**: 66-80.

Anexo I

Processamento histológico e Inclusão em Parafina

1. Fixação das amostras em solução de formol tamponado, durante 24 h;
2. Desidratação em séries etanólicas crescentes até etanol absoluto;
3. Diafanização em xilol
4. Pré-embebição em parafina líquida;
5. Inclusão em parafina.

Método de coloração Hematoxilina-Eosina

1. Desparafinação dos cortes em xilol;
2. Hidratação em álcoois de concentrações decrescentes;
3. Lavagem em água destilada;
4. Coloração por 2 minutos em hematoxilina;
5. Lavagem em água corrente;
6. Passagem rápida por água destilada;
7. Passagem rápida por álcool a 70%;
8. Coloração por 2 minutos em eosina;
9. Lavagem em água corrente;
10. Desidratação em série alcoólica de concentrações decrescentes;
11. Diafanização em xilol;
12. Montagem da lâmina com Entellan®.

Análise histoquímica

1. Desparafinação dos cortes em xilol;
2. Hidratação em séries alcoólica de concentrações decrescentes;
3. Imersão dos cortes em solução de nitrato de prata a 5% sob luz forte durante 40 minutos;
4. Lavagem das lâminas em água destilada por dois minutos;
5. Tratar pela solução de tiosulfato de sódio a 5%, durante 2 a 3 minutos;
6. Corar pelo vermelho neutro a 1%, por 1 minuto;
7. Lavagem em água destilada;

8. Desidratação das lâminas em série alcoólicas de concentrações crescentes
9. Diafanização em xilol;
10. Montagem da lâmina com Entellan®.