



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA- RENORBIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

CYBELLE DA SILVA NERY

**USO COMBINADO DE TERAPIA COM CÉLULAS MESENQUIMAIS DA MEDULA
ÓSSEA E ULTRASSOM PULSADO DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE O
PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE FRATURA DE FÊMUR DE RATOS
DIABÉTICOS**

Recife

2019

CYBELLE DA SILVA NERY

**USO COMBINADO DE TERAPIA COM CÉLULAS MESENQUIMAIS DA MEDULA
ÓSSEA E ULTRASSOM PULSADO DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE O
PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE FRATURA DE FÊMUR DE RATOS
DIABÉTICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO)/ Ponto focal: Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia em Saúde.

Área de concentração:
Biotecnologia em Saúde.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Sílvia Regina Arruda de Moraes.

Recife

2019

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Nery, Cybelle da Silva

Uso combinado de terapia com células mesenquimais da medula óssea e ultrassom pulsado de baixa intensidade sobre o processo de cicatrização de fratura de fêmur de ratos diabéticos / Cybelle da Silva Nery. - 2019.

109 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Regina Arruda de Moraes.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Recife, 2019.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Diabete melittus. 2. Células-Tronco. 3. Ultrassom. I. Moraes, Silvia Regina Arruda de (orientadora). II. Título.

2.

616.462

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-242

CYBELLE DA SILVA NERY

**USO COMBINADO DE TERAPIA COM CÉLULAS MESENQUIMAIS DA
MEDULA ÓSSEA E ULTRASSOM PULSADO DE BAIXA INTENSIDADE
SOBRE O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE FRATURA DE FÊMUR DE
RATOS DIABÉTICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Área de Concentração Biotecnologia em Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Aprovada em: 31/05/2019

BANCA EXAMINADORA

Dra. Silvia Regina Arruda de Moraes
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Maria Tereza dos Santos Correia
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Deniele Bezerra Lós
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Márcio Almeida Bezerra
Universidade Federal do Ceará

Dr. José Lamartine de Andrade Aguiar
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho, com todo amor e carinho:

À minha mãe, *Elizabeth Arcelina da Silva Nery*, pelo incentivo diário, pelo maior exemplo de fé, de garra de viver, de que devemos sempre persistir e lutar por nossos objetivos e amor incondicional por mim.

Aos meus avós maternos, *Sebastiana Maria da Silva (In Memoriam)* e *Elias Manoel da Silva (In Memoriam)*, cuja doce lembrança do convívio sempre me alegra.

À nova geração da família, Cecília, Theo, Ian e Ivy nascidos na época da defesa da tese, e a Rael, Iza, Wri e João Rafael (Meu picthquinho) nascidos na época da publicação da tese, que eles tenham coragem e sabedoria para ir mais além.

AGRADECIMENTOS

O doutorado foi um sonho profissional que mentalizei após a primeira aula de anatomia do curso de graduação em Fisioterapia. Como todo sonho nem sempre sai como idealizamos, muitos foram os altos e baixos no decorrer dessa caminhada mas com a Graça de Deus e com a ajuda de muita gente, ele se tornou possível. Com imensa gratidão eu agradeço...

A Deus, meu Pai e Amigo. Agradeço a Ti, Senhor, por guiar meus passos e fortalecer-me na luta de cada dia. Obrigada pela sabedoria em todas as horas, pelas oportunidades e pelos anjos que encontrei durante esta caminhada. És para mim *“Tão certo como o ar que eu respiro, tão certo como o amanhã que se levanta”*.

À Nossa Senhora, por interceder por mim sempre. Eu sei que o Teu amor vela por mim. Em Ti confio plenamente.

À minha Mãe, *Elizabete Nery*, minha Amiga, meu Porto Seguro. Agradecer é pouco por tudo que a Sra faz por mim. A Sra sabe o que esse doutorado representa e como a trajetória foi turbulenta em todos os aspectos. Obrigada pelo seu amor incondicional, pela paciência nas horas difíceis, pelo esforço e dedicação para o meu crescimento pessoal e profissional. A Sra é o meu exemplo!

Ao meu noivo, Rafael Moraes, pelo seu amor, cumplicidade e incentivo constantes. #PartiuCasar

Ao meu irmão, *Fyllipe Nery* e a minha cunhada, *Wanessa Monteiro*, por me proporcionarem a titulação da qual tenho mais orgulho, a de ser Tia e Madrinha de Cecília. Minha Flor, meu Amor.

Aos meus familiares, pela compreensão e ajuda em todos os momentos.

À minha orientadora, Silvia Regina Arruda de Moraes, também responsável pela missão que aqui se cumpre. Como eu lhe aperreei durante esse doutorado. Serei eternamente grata pela sua compreensão nos momentos mais difíceis, pelos conhecimentos transmitidos e pela serenidade e companheirismo com que conduziu esta orientação. Obrigada pela confiança e paciência! *A construção do conhecimento*

não apenas se traduz nas páginas deste texto hoje entregue, mas na maturidade de toda uma vida a seguir.

As minhas amigas, desde o tempo da faculdade, *Caroline Damascena* e *Camilla Rodrigues* pelas palavras de otimismo e mansidão, pelos momentos de amizade e trocas de conhecimento.

Aos colegas fisioterapeutas do HR e da IPESU que me socorriam nas correrias do doutorado, por toda a amizade, compreensão e solidariedade.

Aos meus *amigos* do LAPLAN, em especial a Victor, Sara, Ingrid, Tânia, Héliida, Misael, Diana e Bia por toda a ajuda nos procedimentos, alegria nas infindáveis cirurgias, comprometimento nos ultrassons e pelas incontáveis conversas.

Aos ex-Laplanianos, Márcio, Deni, Kamilla, Silvia Luana, Laylla, Marina Lira, Tamires, Marina Cerqueira, Wenddy, Paulinha, Elvis, Diogo, por toda amizade.

À professora *Maria Luiza*, pela paciência e disponibilidade durante a realização dos procedimentos densitométricos deste trabalho.

Ao professor *José Lamartine de Andrade Aguiar*, que tive o prazer de conhecer nesta caminhada e que muito contribuiu com sua experiência.

Ao Laboratório de Polímeros, em especial ao engenheiro *Magno Felipe* pela ajuda e disposição para realização dos ensaios mecânicos.

Ao Laboratório de Biofísica de Membranas e Células-tronco Dr. Oleg Krasilnikov (Departamento de Biofísica-UFPE), em especial ao mestrando *Wyndly Daniel* pela ajuda constante e solidariedade científica.

Ao Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Renal e Laboratório de Fisiopatologia Renal (Departamento de Fisiologia- UFPE), em especial ao Professor *Lécio* e a doutoranda *Juliane* que abriram as portas dos seus Laboratórios para mim. Obrigada.

À *cada ratinho* que, sem querer, assumiu um compromisso comigo mantendo-se vivo até o fim do experimento.

Muito Obrigada!

*“Dono de toda ciência, sabedoria e poder
Oh dá-me de beber da água da fonte da vida
Antes que o ar já houvesse
Ele já era Deus
Se revelou ao seus, do crente ao ateu
Ninguém explica Deus”
Ninguém explica Deus (Preto no Branco)*

RESUMO

O diabetes *mellitus* (DM) afeta o tecido ósseo promovendo alterações no processo de osteogênese, ocasionando osteopenia e aumentando a fragilidade à fratura. A terapia com células mesenquimais derivadas da medula óssea (CTMs-MO) e a terapia com ultrassom pulsado de baixa intensidade (US) são uma alternativa para auxiliar no processo de cicatrização. O estudo objetivou avaliar o efeito da terapia CTMs-MO associado com US sobre peso, glicemia, densidade mineral óssea (DMO) biomecânicos. 77 ratos da linhagem *Wistar*, foram distribuídos em oito grupos: Os animais foram distribuídos aleatoriamente em oito grupos: Grupo Controle Placebo (GCP, n=11), Grupo Diabético Placebo (GDP, n=11), Grupo Controle Ultrassom (GCU, n=12), Grupo Diabético Ultrassom (GDU, n=12), Grupo Controle Terapia Celular (GCTcP, n=7), Grupo Diabético Terapia Celular (GDTcP, n=8), Grupo Controle Terapia Celular e Ultrassom (GCTcU, n=8) e Grupo Diabético Terapia Celular e Ultrassom (GDTcU, n=8). Aos 60 dias de vida os animais foram induzidos ao diabetes experimental por Estreptozotocina; intraperitoneal; 60mg/Kg) e aos 74 dias, foi realizada uma fratura aberta do fêmur direito. Nos grupos com terapia celular (GCTcP, GCTcU, GDTcP e GDTcU) uma suspensão de células foi administrada no interior do canal medular do fêmur, após a promoção da fratura. Do primeiro até o 24º dia pós-cirúrgico, foi iniciado, nos grupos que realizaram o tratamento com ultrassom, a aplicação do ultrassom terapêutico (SONOPULSE-lbramed), sete vezes/semana, 20 minutos/dia, com frequência de 1MHz, frequência de repetição de pulso de 100Hz, duração de pulso de 2ms - razão de 1:5, ciclo de trabalho de 20% e intensidade de 0,5 w/cm². Após o término do protocolo, os animais foram eutanasiados e os fêmures coletados para análise da densidade mineral óssea e ensaio biomecânico de flexão em três pontos onde foram avaliados a área de secção transversa (AST), força máxima, tensão máxima, deformação máxima e módulo elástico. O peso corporal e glicemia foram aferidos semanalmente para acompanhamento. Em relação ao acompanhamento ponderal e glicemia, não foram observadas diferenças entre os grupos no período pré-indução. Na primeira e sexta semana após a indução do diabetes, os animais dos grupos diabéticos apresentaram pesos corporais inferiores e índices glicêmicos superiores quando comparados aos animais dos grupos controles (p<0,05). A DMO apresentou valores aumentados nos animais dos grupos (GCTcP, GDTcP, GCTcU e GDTcU) quando comparados aos

seus respectivos controles (GCP- $p=0,002$ e GDP- $p<0,001$). Quanto aos parâmetros biomecânicos, não houve diferença na força máxima ($p>0,05$). No entanto, foi observada um aumento na AST ($p<0,001$) e redução na tensão máxima ($p\leq 0,03$) e no módulo elástico ($p=0,041$) nos fêmures dos animais do GCTcP e GDTcP em relação aos seus controles (GCP e GDP) e redução da deformação máxima de GCTcP, GDTcP, GCTcU e GDTcU quando comparados com os seus controles (GCP e GDP). Conclui-se que o uso combinado da terapia CTMs-MO com a terapia US mostrou-se útil em promover um aumento da DMO dos fêmures supondo início de reparo ósseo. Entretanto, em relação aos parâmetros biomecânicos avaliados não foram observadas diferenças entre os grupos com associação de ambas as terapias.

Palavras chaves: Células-tronco mesenquimais; Diabetes *Mellitus*; Fratura; Parâmetros biomecânicos; Ratos; Ultrassom.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) affects bone tissue by promoting changes in the osteogenesis process, causing osteopenia and increasing fracture fragility. Therapy with bone marrow-derived mesenchymal cells (MsC-BM) and low-intensity (US) pulsed ultrasound therapy are an alternative to assist in the healing process. The aim of the study was to evaluate the effect of US associated MsC-BM therapy on biomechanical weight, blood glucose and bone mineral density (BMD). The animals were randomly assigned to eight groups: Placebo Control Group (PCG, n = 11), Placebo Diabetic Group (PDG, n = 11), Ultrasound Control Group (UCG, n = 11) = 12), Diabetic Group Ultrasound (DGU, n = 12), Control Group Cell Therapy (CGCT, n = 7), Diabetic Group Cell Therapy (DGCT, n = 8), Control Group Cell Therapy and Ultrasound (CGCTU, n= 8) and Diabetic Group Cell Therapy and Ultrasound (DGCTU, n = 8). At 60 days of age the animals were induced to experimental diabetes by streptozotocin; intraperitoneal; 60mg / kg) and at 74 days, an open fracture of the right femur was performed. In cell therapy groups (CGCT, DGCT, CGCTU and DGCTU) a cell suspension was administered into the medullary canal of the femur after fracture promotion. From the first to the 24th postoperative day, the ultrasound application (SONOPULSE-Ibramed), seven times / week, 20 minutes / day, with a frequency of 1MHz, was started in the groups that underwent ultrasound treatment. 100Hz pulse repetition, 2ms pulse duration - 1: 5 ratio, 20% duty cycle, and intensity of 0.5 w / cm². After the end of the protocol, the animals were euthanized and the femurs were collected for analysis of bone mineral density and biomechanical bending test at three points where the cross-sectional area (CSA), maximum strength, maximum stress, maximum deformation, and modulus elastic. Body weight and blood glucose were measured weekly for follow-up. Regarding weight monitoring and glycemia, no differences were observed between the groups in the pre-induction period. In the first and sixth week after the induction of diabetes, the animals of the diabetic groups presented lower body weights and higher glycemic indexes when compared to the animals of the control groups (p <0.05). The BMD presented increased values in the animals of the groups (CGCT, DGCT, CGCTU and DGCTU) when compared to their respective controls (PCG-p = 0.002 and PDG-p <0.001). Regarding biomechanical parameters, there was no difference in maximal strength (p> 0.05). However, an increase in CSA (p <0.001) and reduction in maximal stress

($p \leq 0.03$) and elastic modulus ($p = 0.041$) in females of the CGCT and DGCT) animals were observed in relation to their controls (PCG and PDG) and reduction of the maximum deformation of CGCT, DGCT, CGCTU and DGCTU when compared to their controls (PCG and PDG). It is concluded that the combined use of MsC-BM therapy with US therapy has proved to be useful in promoting an increase in BMD of femurs assuming bone repair onset. However, in relation to the biomechanical parameters evaluated, no differences were observed between the groups with association of both therapies.

Keywords: Diabetes Mellitus; Fracture; Biomechanical parameters; Rats; Mesenchymal stem cells; Ultrasound.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Gráfico: carga x deformação; tensão x deformação.....	24
Figura 2 –	Estágios histológicos “temporais” de reparo de fratura.....	25
Figura 3 –	O processo mesengênico.....	29
Figura 4 –	Indução ao diabetes experimental.....	32
Figura 5 –	Cirurgia de fratura do fêmur.....	34
Figura 6 –	Protocolo de obtenção de células mesenquimais da medula óssea de fêmur de ratos	
	A. Remoção das epífises e lavagem do canal ósseo.....	35
	B. Adição de Histopaque e da suspensão de células no tubo Falcon.....	35
	C. Adição das células e do DMEM.....	36
	D. Adição de Histopaque e da suspensão de células no Falcon e condicionamento na garrafa de cultura.....	36
Figura 7 –	Procedimento de ultrassom aplicado no local da fratura.....	37
Figura 8 –	Obtenção de radiografia do fêmur.....	38
Figura 9 –	Imagens utilizadas para mensuração da densidade mineral do fêmur.....	39
Figura 10 –	Ensaio mecânico. A - Avaliação da área de secção transversa do fêmur. B - Máquina de ensaio mecânico EMIC modelo DL 10000 com o fêmur posicionado para o ensaio de flexão em três pontos.....	40
Tabela 1 –	Acompanhamento dos índices glicêmico por grupos durante a Pré-indução, 1º semana e 6º semana Pós-indução.....	59
Tabela 2 –	Valores da DMO por grupo.....	59
Tabela 3 –	Dados do ensaio mecânico por grupo.....	59
Tabela 1 –	Peso corpóreo por grupos durante a Pré-indução e 1º semana e 6º semana da Pós-indução.....	69
Tabela 2 –	Índices glicêmico por grupos durante a Pré-indução, 1º semana e 6º semana Pós-indução.....	70

Tabela 3 –	Valores da DMO por grupo segundo o método.....	70
Tabela 4 –	Valores dos parâmetros avaliados no ensaio biomecânico por grupo.....	71
Figura 1 –	Percentages of sample loss, fracture achievement, mortality on the 1 ^o post-operative day and comminuted fractures and bone fragmentation on OFG (n=29) and CFG (n=29).....	100

LISTA DE SIGLAS

AST	Área de Secção Transversa
CTM	Células-tronco Mesenquimais
DMO	Densidade Mineral Óssea
DM	Diabetes <i>Mellitus</i>
DMG	DM gestacional
GCP	Grupo Controle Placebo
GDP	Grupo Controle Terapia Celular
GCTcU	Grupo Controle Terapia Celular e Ultrassom
GCU	Grupo Controle Ultrassom
GDP	Grupo Diabético Placebo
GDTcP	Grupo Diabético Terapia Celular
GDTcU	Grupo Diabético Terapia Celular e Ultrassom
GDU	Grupo Diabético Ultrassom
KHz	Kilohertz
MHz	Megahertz
RENORBIO	Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia
CTMs-MO	Terapia com Células Mesenquimais Derivadas da Medula Óssea
US	Ultrassom
LIPUS	Ultrassom Pulsado de Baixa Intensidade
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	OBJETIVOS.....	20
1.1.1	Objetivo Geral.....	20
1.1.2	Objetivos Específicos.....	20
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
3	MÉTODO.....	31
3.1	LOCAL DO ESTUDO E ASPECTOS ÉTICOS.....	31
3.2	AMOSTRA/GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	31
3.3	INDUÇÃO AO DIABETES <i>MELLITUS</i> TIPO 1 E AVALIAÇÃO CLÍNICA.....	32
3.4	PROTOCOLO MEDICAMENTOSO.....	33
3.5	PROTOCOLO DA FRATURA DO FÊMUR.....	33
3.6	OBTENÇÃO E ADMINISTRAÇÃO DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA.....	34
3.7	PROTOCOLO DO ULTRASSOM.....	36
3.8	EUTANÁSIA E COLETA DO MATERIAL.....	37
3.9	OBTENÇÃO DAS IMAGENS RADIOGRÁFICAS DIGITAIS.....	38
3.10	AVALIAÇÃO DA DENSIDADE MINERAL ÓSSEA EM MM/AL.....	38
3.11	ANÁLISE BIOMECÂNICA.....	39
3.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
4	RESULTADOS.....	42
4.1	ARTIGO ORIGINAL 1- “ULTRASSOM DE BAIXA INTENSIDADE NA REPARAÇÃO DE FRATURA ABERTA DE FÊMUR EM RATOS DIABÉTICOS”.....	43
4.2	ARTIGO ORIGINAL 2 - “USO COMBINADO DE TERAPIA COM CÉLULAS MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA E ULTRASSOM PULSADO NA REPARAÇÃO DA FRATURA DE FÊMUR DE RATOS DIABÉTICOS”.....	60
5	CONCLUSÃO.....	80
	REFERÊNCIAS.....	81
	APÊNDICE A –ARTIGO TÉCNICA CIRÚRGICA - “<i>Comparison between two surgery techniques of rat fêmur fracture</i>”.....	92
	ANEXO A – PARCER DO COMITÊ DE ÉTICA.....	104

ANEXO B – ARTIGO PUBLICADO.....	105
ANEXO C – ARTIGO PUBLICADO.....	106
ANEXO D – PUBLICAÇÃO PARALELA.....	107
ANEXO E – PUBLICAÇÃO PARALELA.....	108
ANEXO F – PUBLICAÇÃO PARALELA.....	109

1 INTRODUÇÃO

Esta tese faz parte de uma linha de pesquisa desenvolvida no Laboratório de Plasticidade Neuromuscular - Departamento de Anatomia da UFPE, que se dedica ao estudo das comorbidades resultantes do diabetes sobre as estruturas do aparelho locomotor, mediante experimentações com modelos animais.

Em um estudo anterior realizado por nosso grupo de pesquisa, foi verificado comprometimento das estruturas que compõem o aparelho locomotor a partir da constatação de um estado de fragilidade tendínea em animais com diabetes crônica experimental não controlada (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Concomitantemente, buscamos uma intervenção capaz de tentar reverter o quadro diabético e assim avaliamos o benefício do exercício aeróbico em esteira (OLIVEIRA *et al.*, 2012) e de natação de caráter preventivo (BEZERRA *et al.*, 2013) e terapêutico (NERY, 2013) sobre a resposta biomecânica do tendão de animais diabéticos experimentalmente.

A partir desses resultados, objetivamos ampliar a investigação as demais estruturas do aparelho locomotor e constatamos, através de testes biomecânicos, um estado de fragilidade óssea (SILVEIRA, 2014) em animais com diabetes experimental.

A osteopenia, observada no quadro diabético, promove uma diminuição da massa óssea que tem influência direta no processo de cicatrização da fratura. Dentre as terapias que poderiam reverter este déficit no processo de cicatrização, a literatura aponta o ultrassom pulsado de baixa intensidade, uma vez que há sinais de sua contribuição sobre processo de diferenciação de células mesenquimais de animais saudáveis, mas não em diabéticos experimentalmente.

Para investigarmos a cicatrização foi necessário provocar uma lesão óssea, desta forma iniciou-se o estudo com a técnica de fratura, mais comumente encontrada na literatura, a fechada (VIALLE *et al.*, 2004), entretanto esta apresentou alta taxa de mortalidade e morbidades no trans e pós-operatório o que motivou uma alteração na metodologia com a utilização de uma técnica de fratura aberta com a Serra de Gigli, a fim de garantir uma maior eficácia e padronização da abordagem, resultando um artigo da técnica cirúrgica (apêndice A) intitulado – **“Comparison between two surgery techniques of rat femur fracture”**, com o objetivo de comparar os resultados das duas técnicas cirúrgicas (fratura fechada e aberta) no fêmur de ratos *Wistar* em termos de perdas amostrais, eficácia da técnica da fratura

durante a primeira execução, taxa de mortalidade no pós-operatório precoce e tardio associado a um protocolo medicamentoso na tentativa de melhorar o processo de cicatrização e consolidação óssea e reduzir a morbimortalidade dos animais.

O efeito do ultrassom sobre o processo de cicatrização é comprovado na literatura, através de diferentes protocolos terapêuticos, tanto em animais quanto em pacientes como evidenciado por Bayat *et al.*, (2018) através de uma revisão sistemática. A partir daí, verificamos se o efeito combinado da terapia com células mesenquimais derivadas da medula óssea e do ultrassom pulsado de baixa intensidade seria capaz de acelerar a reparação da fratura de fêmur de ratos induzidos experimentalmente ao diabetes tipo 1.

Para assegurar as células mesenquimais na região no sítio da fratura foi necessário a utilização de uma membrana biocompatível e que não comprometesse a utilização do ultrassom e nem a cicatrização óssea. Nesse sentido, foi utilizado o biopolímero produzido a partir de melaço de cana-de-açúcar através de síntese bacteriana (*Zoogloea sp*) na Estação Experimental de cana-de-açúcar de Carpina/ Universidade Federal Rural de Pernambuco e a partir disso, foi possível testar a hipótese da tese de que o efeito combinado da terapia com células mesenquimais derivadas da medula óssea e do ultrassom pulsado de baixa intensidade seria capaz de acelerar a reparação da fratura de fêmur de ratos induzidos experimentalmente ao diabetes tipo 1, que resultou o artigo original 2.

Atendendo, às normas vigentes do Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) para a elaboração da TESE, o presente exemplar foi estruturado como se segue:

- Objetivos
- Referencial teórico
- Métodos
- Resultados – apresentados no formato de dois artigos originais:

Artigo Original 1, intitulado – “**Low intensity ultrasound in the repair of open fracture of femur in diabetic rats**”, teve como objetivo avaliar o efeito do ultrassom pulsado de baixa intensidade na cicatrização da fratura aberta de fêmur de ratos diabéticos

Artigo Original 2, intitulado – “**Uso combinado de terapia com células mesenquimais da medula óssea e ultrassom pulsado na reparação da fratura de fêmur de ratos diabéticos**”, teve como objetivo avaliar o efeito do ultrassom

pulsado de baixa intensidade associado à terapia com células mesenquimais no reparo da fratura aberta de fêmur de ratos diabéticos.

- Conclusões
- Referências

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito combinado da terapia com células mesenquimais derivadas da medula óssea e do ultrassom pulsado de baixa intensidade sobre a reparação da fratura de fêmur de ratos induzidos experimentalmente ao diabetes.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o peso e glicemia dos animais diabéticos e controles submetidos a fratura aberta do fêmur com e sem utilização de terapia com ultrassom e células-tronco mesenquimais da medula óssea.
- Avaliar a densidade mineral óssea em mmAl através da área do calo ósseo dos fêmures de animais diabéticos e controles submetidos à fratura aberta do fêmur com e sem utilização de terapia com ultrassom e células-tronco mesenquimais da medula óssea.
- Avaliar as propriedades biomecânicas dos fêmures de animais diabéticos ou controle submetidos a uma fratura aberta do fêmur com e sem utilização de terapia com ultrassom e células-tronco mesenquimais da medula óssea através da aferição da área de secção transversa, módulo elástico, força máxima, tensão máxima e deformação máxima a partir do ensaio mecânico de flexão em três pontos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

O DIABETES MELLITUS E O TECIDO ÓSSEO

O DM é uma doença crônica complexa que requer cuidados contínuos com estratégias de redução de risco multifatoriais além do controle glicêmico (ADA, 2019). Caracterizada como uma desordem metabólica proveniente de um distúrbio no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos como resultado da deficiência absoluta ou relativa de insulina gerando um quadro de hiperglicemia (DINIZ *et al.*, 2008; DeFRONZO *et al.*, 2015). Em todo o planeta, mais de 425 milhões de pessoas têm diabetes e a estimativa em 2045 atinja cerca de 629 milhões de pessoas. Essa estimativa inclui pessoas com e sem o diagnóstico da doença e de diferentes faixas etárias sendo observado mais de 98 milhões entre 65 a 79 anos e 327 milhões de 20 a 64 anos de idade. Na América do Sul e Central, em 2045, este número aumentará em 62%. No Brasil, atualmente, mais de 12 milhões de pessoas são diabéticas e estima-se proporções cada vez maiores (IDF, 2017). Além de ser responsável por um aumento da morbidade, redução da qualidade de vida e elevação da taxa de mortalidade é maior do que a soma dos óbitos causados por doenças infecciosas (IDF, 2015; WHO, 2016).

A classificação e diagnóstico do DM é complexa e tem sido objeto de muita consulta, debates e revisões ao longo de décadas (IDF, 2017). Esta é baseada na etiologia e não na forma de tratamento (ADA, 2017). Segundo a *American Diabetes Association* (ADA, 2017) existem quatro tipos de diabetes: o DM tipo 1, DM tipo 2, DM gestacional e outros tipos específicos de diabetes.

No DM tipo 1 ocorre a destruição das células beta pancreáticas, responsáveis pela secreção de insulina. Pode ser autoimune (DM1A), confirmada pela positividade de um ou mais autoanticorpos, resultado da destruição imunomediada das células, presença de marcadores de autoimunidade meses ou anos antes do diagnóstico clínico. A forma idiopática (DM1B) é caracterizada pelo desenvolvimento da cetoacidose e ausência de marcadores de autoimunidade na circulação (IDF, 2015; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2016).

O DM tipo 2 corresponde a 90 a 95% de todos os casos, sua etiologia é multifatorial e complexa por envolver componentes genético e ambiental principalmente a obesidade e o sedentarismo. Neste a ação e secreção da insulina

apresentam-se alterados, bem como a produção de glicose hepática a qual provoca uma resistência à insulina (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2016; ADA, 2017; SKYLER et al., 2017).

O DM gestacional (DMG) é o diabetes diagnosticado no segundo ou terceiro trimestre da gravidez, caracterizado por intolerância a insulina, não evidente antes da gestação (ADA, 2017).

Os tipos específicos de diabetes são devido a outras causas decorrentes, por exemplo, de síndromes monogênicas do diabetes (tais como diabetes neonatal), doenças do pâncreas exócrino (como a fibrose cística) e drogas ou diabetes induzido por produtos químicos (como o uso de glicocorticoides, no tratamento HIV / AIDS, ou após o transplante de órgãos) (ADA, 2017).

A Hiperglicemia, presente no quadro diabético, quando não controlada ao longo do tempo, pode causar danos a vários sistemas do corpo, favorecendo a instalação de complicações crônicas micro e macrovasculares (BJERG et al., 2018), dentre elas, comprometimento do aparelho locomotor, contribuindo para um declínio do estado geral de saúde, pela ruptura nas estruturas osteomiotendínea e presença de osteopenia óssea (AKTURK et al., 2002; AKTURK et al., 2007; LIAO et al., 2014; JACKULIAK et al., 2014).

Muitos mecanismos têm sido sugeridos para explicar a osteopenia associada ao diabetes, dentre eles mudanças na sinalização celular causadas pela hiperglicemia, inflamação associada ao diabetes, alterações nos fatores de crescimento e hormônios endócrinos circulantes, maior estresse oxidativo e morte celular elevada (KEMINK et al., 2000; McCABE, 2007; KAYAL et al., 2009).

A associação entre diabetes mellitus, hiperglicemia e osteopenia foi descrita pela primeira vez no final da década de 1920 (MORRISON & BOGAN, 1927), desde então, muitos estudos clínicos e experimentais vieram fornecer evidências dessa tríade e suas repercussões. A diminuição da Densidade mineral óssea (DMO) e massa óssea reduzida no DM já foi comprovada tanto em estudos clínicos com humanos (MIAO et al., 2005; AHMED et al., 2006; MIAZGOWSKI et al., 2007; ABDALRAHAMAN et al., 2015) quanto em estudos com animais (EINHORN et al., 1988; VERHAEGHE et al., 1990; HOU; ZERNICKE; BARNARD, 1991, 1993; REDDY et al., 2001; MOTYL; MCCABE, 2009) e propicia que os portadores do DM tipo 1 uma maior vulnerabilidade as alterações esqueléticas, como a um maior risco de

lesões ósseas, osteoporose e fraturas osteoporóticas (VESTERGAARD, 2007; MONTAGNANI; GONNELLY, 2013; ZEMEL, 2013; JANGHORBANI, *et al.*, 2007).

Apesar das fortes evidências da associação do DM tipo 1 com baixa massa óssea diabética e risco de fraturas, os mecanismos subjacentes à osteopenia diabética ainda não estão totalmente elucidados, não podendo ser estimada apenas pela DMO reduzida (EINHORN *et al.*, 1988; VERHAEGHE *et al.*, 1990; REDDY *et al.*, 2001). O efeito do DM tipo 1 sobre as propriedades mecânicas e materiais do osso também representa um dos fatores importantes relacionados ao risco de fratura (REDDY *et al.*, 2001).

PROPRIEDADES ESTRUTURAS E BIOMECÂNICAS DO OSSO

Estudos que avaliaram as propriedades biomecânicas através de ensaios mecânicos, em ratos diabéticos demonstraram que independentemente do tamanho e da geometria do osso, estes são inferiores e com menor capacidade de receber estresse, são menos rígidos e menos resistentes à flexão e a torção, apresentando diminuição da força óssea e alterações em outras propriedades biomecânicas, o que pode contribuir para o alto risco de fratura associado ao DM (DIXIT; EKSTRÖM, 1980; HOUGH *et al.*, 1981; SHIRES *et al.*, 1981; EINHORN *et al.*, 1988; VERHAEGHE *et al.*, 1990; HOU; ZERNICKE; BARNARD, 1993; MATTILA; KNUUTTILA; SVANBERG, 1998; REDDY *et al.*, 2001; FOLLAK *et al.*, 2004; PRISBY *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2009).

Há vários parâmetros biomecânicos que podem ser usados para caracterizar a integridade do osso. A relação chave é aquela entre a carga aplicada a uma estrutura e o deslocamento em resposta à carga representado pela curva do gráfico carga x deformação (figura 1A) que permite analisar as propriedades estruturais do osso e através da curva tensão x deformação relativa (*stress – strain*) (Figura 1B) pode-se analisar as propriedades biomecânicas ósseas.

A partir destas curvas, é possível identificar e quantificar parâmetros biomecânicos inerentes ao osso e que podem caracterizar suas propriedades (COWIN, 2001) tais como: força máxima (N) – máximo de carga suportada passivamente pelo osso durante a compressão; deformação máxima (mm) – o máximo de alongamento imposto ao osso até a completa fratura; energia – quantidade de energia armazenada pela deformação elástica do osso; tensão

máxima (MPa) – calculada pelo quociente da força máxima suportada pela área de seção transversal do osso, identifica a quantidade de tensão suportada pelas estruturas intrínsecas do osso; Deformação específica (%) – taxa de alongamento desempenhado pelo osso, calculada pelo quociente entre o comprimento inicial (mm) pelo comprimento final (mm) multiplicado por 100; Módulo elástico (MPa) – determinada pela inclinação encontrada na curva tensão x deformação, a qual representa a viscoelasticidade óssea ou rigidez representativa do osso enquanto material biológico.

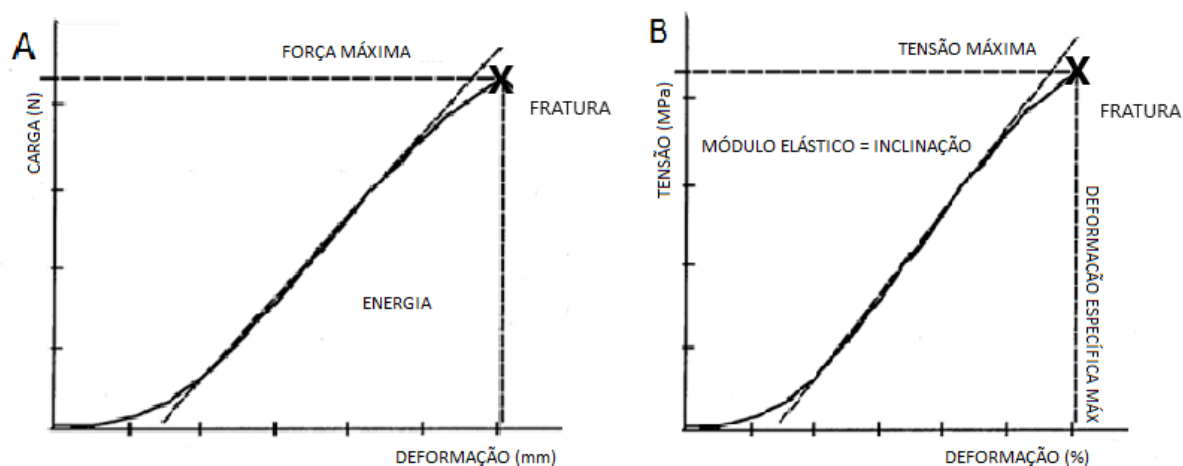
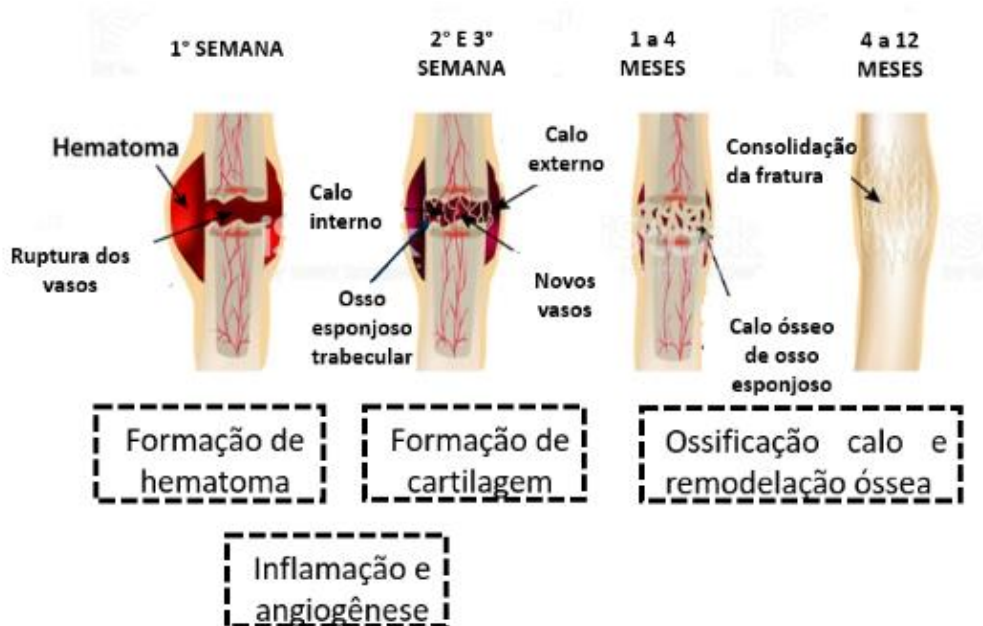


Figura 1 - A) Curva carga x deformação; B) Curva tensão x deformação
(Fonte: Adaptada de COWIN, 2001)

O PROCESSO DE REPARAÇÃO ÓSSEA E O DIABETES

A cicatrização de uma fratura é um processo complexo e envolve uma cascata de síntese e ativação de moléculas derivadas da matriz e de células que coordenam a restauração da estabilidade mecânica no sítio da fratura. Há cinco estágios histológicos “temporais” de reparo de fratura: formação de hematoma, inflamação, angiogênese, formação de cartilagem e remodelação óssea (Figura 2).

Figura 2 - Estágios histológicos “temporais” de reparo de fratura



Fonte: adaptada de <https://pt.depositphotos.com/243395500/stock-illustration-stages-healing-bone-fracture-formation.html>

Após o desenvolvimento da fratura, há a formação de um hematoma e ativação de uma resposta inflamatória na área ao redor da lesão óssea com agregação de plaquetas e liberação de fatores de crescimento e as citocinas (EINHORN, 1995; TSIRIDIS, UPADHYAY, GIANNOUDIS, 2007; DINIZ *et al.*, 2008). Dentro de 2 a 5 dias, ocorre a formação de calo mole, através da elaboração de uma matriz básica de colágeno tipo II, na área entre os fragmentos da fratura e a formação de calo duro, com calcificação da matriz cartilaginosa (PHILLIPS, 2005). Do 6º ao 10º dia, há um aumento na proliferação celular, que diminui em seguida. Na fase de proliferação, ocorre a diferenciação de células-tronco mesenquimais (CTMs) em condrócitos que geram cartilagem e osteoblastos, que por sua vez formam os ossos (GERSTENFELD *et al.*, 2003a; GERSTENFELD *et al.*, 2003b). O calo mole começa a se calcificar, a proliferação celular cessa, os condrócitos deste calo começam a sofrer apoptose. A remodelação, dar-se-á através da ocorrência de ciclos contínuos de formação e reabsorção, com recuperação da arquitetura óssea original (KAGEL; EINHORN, 1996; PHILLIPS, 2005).

Há indícios, tanto clinicamente como experimentalmente, que o diabetes promove retardo na cicatrização de fratura ocasionando uma redução na massa

óssea (LODER, 1988; FUNK et al., 2000). Experimentalmente, o diabetes induzido por estreptozotocina compromete a cicatrização de fratura (MACEY *et al.*, 1989), causando um retardo na recuperação da força estrutural e material em fêmures com fraturas cicatrizadas em ratos (FUNK *et al.*, 2000).

Vários fatores de risco estão associados à cicatrização óssea prejudicada como a presença de doença sistêmica, idade avançada, abuso e álcool ou medicamentos prescritos como o uso crônico de esteroides ou quimioterápicos (KAGEL, EINHORN, 1996; GASTON & SIMPSON, 2007; NAIK et al., 2009; BISHOP et al., 2012; OEI et al., 2015).

Muitos mecanismos têm sido propostos para explicar a maior incidência de cicatrização retardada e não-união de fraturas no diabetes. Estes incluem redução do suprimento sanguíneo e da angiogênese (DINIZ *et al.*, 2008), resposta inflamatória mais severa (SALVI *et al.*, 1997; WETZLER *et al.*, 2000), decréscimo na síntese de colágeno (GOOCH *et al.*, 2000), distúrbio no processo de mineralização (FOLLAK; KLOTING; MERK, 2005) e um desequilíbrio entre a reabsorção óssea pelos osteoclastos e a deposição óssea pelos osteoblastos (HE *et al.*, 2004; SUZUKI *et al.*, 2005). Outro fator contribuinte podem ser os produtos finais da glicação avançada (AGEs), presentes em níveis altos em indivíduos diabéticos, que intensificam os eventos inflamatórios (BARBOSA, OLIVEIRA, SEARA, 2008) e retardam a cicatrização de feridas (GOOVA *et al.*, 2001). Também há evidências de que o diabetes prejudique a formação de cartilagem durante a cicatrização de fraturas através da diferenciação e proliferação reduzida de condrócitos (KAYAL *et al.*, 2007). Em geral, espera-se que estes mecanismos afetem uma ou mais fases envolvidas na consolidação da fratura (FUNK et al., 2000; BEAM, PARSONS, LINS, 2002)

O ULTRASSOM E O REPARO ÓSSEO EM ANIMAIS

O termo ultrassom refere-se a propagação de uma onda acústica cuja frequência é maior do que a faixa audível, geralmente de alguns décimos de kHz a vários décimos de um MHz. Dependendo da frequência, do nível de energia acústica e/ ou da pressão emitida pela fonte, as aplicações podem ser categorizadas como diagnósticas ou terapêuticas, onde as intensidades diagnósticas (média espacial e temporária) estão abaixo de 100 mW / cm² (PADILLA et al., 2014).

O ultrassom pode influenciar os tecidos de diferentes maneiras e assim induzir efeitos biológicos, a partir dos efeitos térmicos da deposição de calor, ou efeitos não térmicos como cavitação ou força de radiação (MITRAGOTRI, 2005). Entre os regimes diagnósticos e terapêuticos está o chamado LIPUS ou ultrassom de baixa intensidade, no limite superior das intensidades de diagnóstico, transmitido de maneira pulsada (PADILLA et al., 2014). Inúmeros estudos têm utilizado o ultrassom pulsado de baixa intensidade como estratégia terapêutica com o objetivo de otimizar o processo de cicatrização de fraturas (GEBAUER et al., 2002; PILLA, 2002; YANG et al., 2005; COORDS et al., 2011; FUNG et al., 2012; HARRISON et al., 2016; WU et al., 2018; BAYAT et al., 2018). Estudos com animais evidenciaram um aumento médio no processo de consolidação da fratura fechada e aberta (GEBAUER et al., 2002; PILLA et al., 2002).

O mecanismo através do qual o ultrassom é capaz de afetar o processo de cura da fratura tem sido cada vez mais investigado. Teorias sugerem que este é capaz de gerar forças mecânicas capazes de afetar a cicatrização (WILLIAMS, 1992), que o osso trabecular é capaz de se adaptar às exigências mecânicas (GOODSHIP, CUNNINGAM, KENWRIGHT, 1998), que atua nas reações celulares envolvidas (AZUMA et al., 2001; ZHOU et al., 2016), nas vias de sinalização ou na expressão de genes críticos atuantes nas vias de transdução do sinal importantes no processo de cicatrização (PARVIZI et al., 2002; ZHOU et al., 2004).

As evidências apontam que o ultrassom pulsado de baixa intensidade é capaz de acelerar o processo de cicatrização de fraturas agindo nas reações celulares envolvidas em todas as etapas deste processo (AZUMA et al., 2001); atuar na ativação de integrinas formando complexos de adesão focais que ativam então vias de sinalização envolvidas na síntese de DNA de certos tipos de células como osteoblastos e fibroblastos (ZHOU et al., 2004); e promover a expressão de genes críticos e proteínas relacionadas com a cicatrização de fraturas, tais como agregana, IGF (Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1), e TGF- β (O Fator de transformação do crescimento beta), este último um importante fator de crescimento ósseo que estimula a atividade osteoblástica e aumenta a formação de matriz óssea (RUBIN et al., 2001; ZIMMERMANN et al., 2005). Além disso, há evidências de que o ultrassom, in vitro, é capaz de promover a migração (JIANG et al., 2018) e diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em condrócitos e estimular

a produção de matriz extracelular (NISHIKORI *et al.*, 2002; EBISAWA *et al.*, 2004; SCHUMANN *et al.*, 2006).

AS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (CTMS) E O BIOPOLÍMERO DA CANA DE AÇÚCAR

Os tecidos biológicos são constituídos basicamente por duas populações celulares distintas, as diferenciadas e as não diferenciadas. As diferenciadas são formadas pela presença de células com características específicas, que apresentam como função principal a atividade fisiológica tecidual, enquanto que as não diferenciadas, também conhecidas por células-tronco mesenquimais (CTMs), são as responsáveis pelo crescimento e reparo após lesão de órgãos e tecidos (TOHILL e TERENGUI, 2004), podem ser isoladas de vários tecidos e possuem a capacidade de diferenciação em diversas linhagens de células mesenquimais especializadas (BARRY, MURPHY, 2004).

Nos últimos anos, atenção especial tem sido dada a essas células devido à sua função de manutenção da integridade do tecido, resposta a lesões e restauração das mesmas, através de reparação e regeneração de tecidos (GRANERO-MOLTO *et al.*, 2011; BARTOLD *et al.*, 2019). Inicialmente, o seu potencial de diferenciação em múltiplas linhagens de células (efeito autócrino) gerou mais interesse, porém, mais recentemente, a sua capacidade de definir e manipular o meio ambiente através da oferta e liberação de moléculas bioativas (propriedades parácrinas) vem chamando atenção (GRANERO-MOLTO *et al.*, 2009; BIANCO; ROBEY; SIMMONS, 2008).

As CTMs podem ser encontradas em vários tecidos de mamíferos, como a medula óssea, tecido adiposo, músculo estriado esquelético (células satélites), ósseo (trabéculas e periósteo), tendíneo, polpa dentária, cordão umbilical humano, e fluido amniótico, além de órgãos como cérebro, fígado (células ovas), rins (células epiteliais tubulares), pulmão (pneumócitos tipo II), pâncreas (células- β) e pele (células-tronco epiteliais), funcionando como verdadeiros reservatórios de células reparativas nestes tecidos (Figura 3) (BARRY e MURPHY, 2004; GROVE, BRUSCIA e KRAUSE *et al.*, 2004; KOLF, CHO e TUAN, 2007; CHEN, SHAO, XIANG *et al.*, 2008). As CTMs podem ser isoladas a partir de diferentes fontes como da medula

óssea (MO) e de outros tecidos adultos (MEIRELLES; CHAGASTELLES; NARDI, 2006).

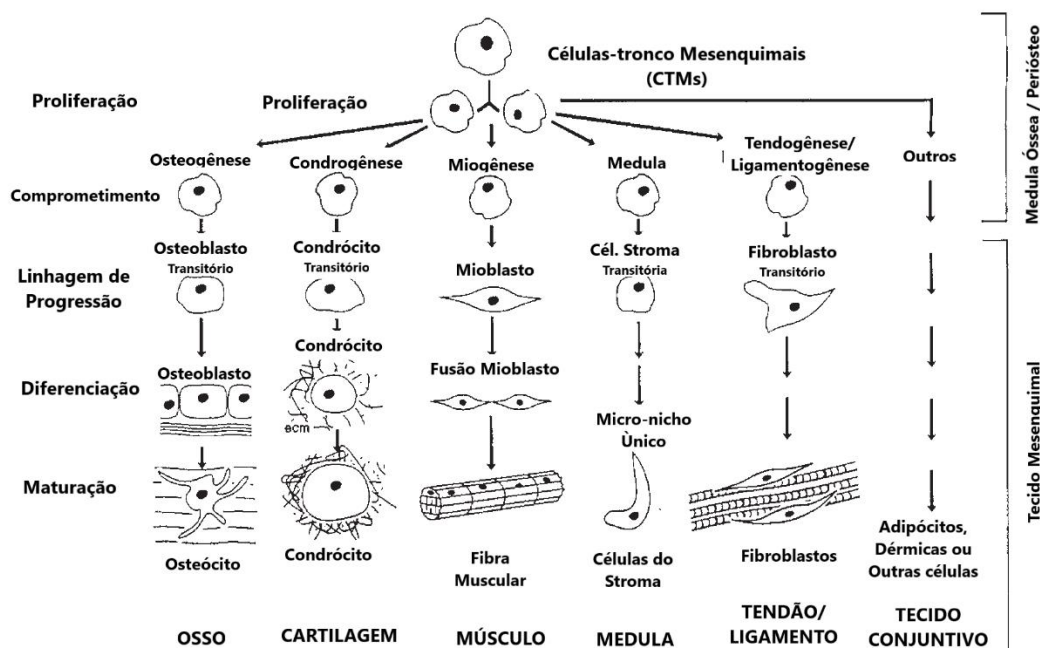


Figura 3 - O processo mesengênico. Diferenciação das células-tronco mesenquimais (Fonte: <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ten.2005.11.1198>)

Tanto as CTMs derivadas da medula óssea (CTMs-MO) quanto as derivadas do tecido adiposo (CTMs-TA) apresentam capacidade de diferenciação em osteoblastos e adipócitos (KERN et al., 2006; PENG et al., 2008; REBELATTO et al., 2008). Durante o processo de cicatrização óssea, fatores de crescimento são produzidos por macrófagos e células estruturais, levando à migração exógena e à diferenciação de CTMs residentes (células osteoprogenitoras) em osteoblastos, tendo papel importante na cicatrização (DONG et al., 2017). Alguns estudos demonstraram que estas células, após serem administradas sistemicamente, podem diferenciar-se em tipos de CTMs maduras e migrar para o local da fratura de ratos, melhorando a cicatrização (GRANERO-MOLTO et al., 2008; GRANERO-MOLTO et al., 2009; TIAN et al., 2015; SUENAGA et al., 2015; FRASCA et al., 2017; ZHOU et al., 2018). Além disso, as CTMs podem regular a resposta regenerativa do osso e de outros tecidos através da secreção de fatores tróficos (MEIRELLES; CAPLAN; NARDI, 2008).

Tão importante quanto a seleção das células, são os mecanismos utilizados para acondicioná-las nos defeitos ósseos. Para tanto, a utilização de materiais

biocompatíveis com o objetivo de manter as CTMs na região próxima ao foco da fratura e melhorar a resposta cicatricial do tecido ósseo, os biomateriais são cada vez mais utilizados. Para este ser ideal, deve apresentar uma composição química biocompatível, para não gerar reações adversas; promover interação celular e desenvolvimento tecidual; ser biodegradável ou bioabsorvível; apresentar propriedades mecânicas favoráveis para sustentar cargas e alta resistência ao desgaste e auxiliar na reparação tecidual (MAYER et al., 2011; FRASCA et al., 2017).

Dentre os componentes naturais mais utilizados para a produção do biopolímero tem-se o colágeno (MURRAY et al., 2007), submucosa de intestino delgado de porco (SUCKOW et al., 2007), fibras de seda (JIN et al., 2004), à base de quitosano (FUNAKOSHI et al., 2006) e de celulose bacteriana (SHAH et al., 2013; RAJWADE; PAKNIKAR; KUMBHAR, 2015). Dentro deste contexto de biomateriais há o biopolímero da cana-de-açúcar sintetizado, em 1990, na Estação Experimental de Cana de Açúcar de Carpina, da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE. Este biopolímero contém em sua estrutura glicose, em maior concentração, e a celulose sendo produzido de duas maneiras: ou por síntese natural através da fotossíntese de plantas ou por síntese microbiana (PATERSON-BEEDLE et al., 2000b; MOHITE; PATIL, 2014). A única matéria prima utilizada para a produção de sua celulose é o melaço da cana de açúcar, através da bactéria *Zoogloea sp.* (PINTO et al., 2016).

Devido a essas características, o biopolímero *in natura*, com açúcares residuais, vem sendo utilizado com sucesso em muitos estudos em diversas áreas da cirurgia como em curativos no tratamento de feridas acidentais em cães (COELHO et al., 2002), cicatrização de feridas cutâneas (MONTEIRO et al., 2007), na reconstrução vascular (MARQUES et al., 2007), como substituto da membrana timpânica (MAYER et al., 2011), na reconstrução do parênquima renal (TAVARES et al., 2014), na correção da incontinência urinária (SILVEIRA et al., 2014), entre outras; sob diferentes apresentações e estados físicos: membrana (LIMA et al., 2005; MARQUES et al., 2007; MAYER et al., 2011; SILVEIRA et al., 2014), película (MONTEIRO et al., 2007), esponja (TAVARES et al., 2014), gel (CORDEIRO-BARBOSA et al., 2012; AUGUSTO et al., 2014).

3 MÉTODO

3.1 LOCAL DO ESTUDO E ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Plasticidade Neuromuscular (Departamento de Anatomia - UFPE), no Laboratório de biofísica de membranas e células-tronco Dr. Oleg Krasilnikov (Departamento de Biofísica-UFPE), Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Renal e Laboratório de Fisiopatologia Renal (Departamento de Fisiologia- UFPE), Laboratório de Radiologia Odontológica (Departamento de Odontologia- UFPE) e Laboratório de Engenharia Química (Departamento de Engenharia Química – UFPE). O estudo foi aprovado na Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEa-UFPE), processo nº 23076.031594/2016-98 (ANEXO A).

3.2 AMOSTRA/GRUPOS EXPERIMENTAIS

A amostra foi composta por 77 ratos da raça *Rattus Novergicus Albinus*, da linhagem *Wistar*, com idade de 60 dias de vida, provenientes do Biotério do Departamento de Nutrição – UFPE, mantidos em gaiolas com 3 animais, ciclo de luz invertido claro/escuro de 12 horas e temperatura de $23^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ no biotério do Departamento de Anatomia - UFPE. Os ratos receberam uma dieta através de ração apropriada (Presence® - Purina) e água *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em oito grupos: Grupo Controle Placebo (GCP, n=11), animais saudáveis submetidos à fratura aberta de fêmur e tratados com ultrassom desligado; Grupo Diabético Placebo (GDP, n=11), animais diabéticos submetidos à fratura aberta de fêmur e tratados com ultrassom desligado; Grupo Controle Ultrassom (GCU, n=12), animais saudáveis submetidos à fratura aberta de fêmur e tratados com ultrassom; Grupo Diabético Ultrassom (GDU, n=12), animais diabéticos submetidos à fratura aberta de fêmur e tratados com ultrassom; Grupo Controle Terapia Celular (GCTcP, n=7), animais saudáveis submetidos à fratura aberta de fêmur, tratados com células mesenquimais e ultrassom desligado; Grupo Diabético Terapia Celular (GDTcP, n=8), animais diabéticos submetidos à fratura aberta de fêmur e tratados com células mesenquimais e ultrassom desligado; Grupo Controle Terapia Celular e Ultrassom (GCTcU, n=8), animais saudáveis submetidos à fratura aberta de fêmur, tratados com células mesenquimais e

ultrassom; e Grupo Diabético Terapia Celular e Ultrassom (GDTcU, n=8), animais diabéticos submetidos à fratura aberta de fêmur, tratados com células mesenquimais e ultrassom.

3.3 INDUÇÃO AO DIABETES *MELLITUS* TIPO 1 E AVALIAÇÃO CLÍNICA

Antes da indução ao diabetes, foi realizada a verificação da glicose sanguínea (Glicosímetro Kit Accu-Chek Active) após jejum de 12h. Aos 60 dias de vida, após a aferição da glicemia, os animais dos grupos diabéticos (GDP, GDU, GDTcP, GDTcU), foram induzidos ao diabetes pela administração única, via intraperitoneal, de uma solução de Estreptozotocina (STZ- Shimadzu®), diluída em tampão citrato de sódio a 10mM e pH 4,5, na dose de 60mg/kg de peso do animal (Figura 4). Os animais dos grupos saudáveis (GCP, GCU, GCTcP, GCTcU) receberam doses equivalentes da solução tampão citrato de sódio objetivando o nivelamento do estresse físico ofertado para os grupos diabéticos. Ao final de 30 minutos após o tratamento os animais puderam alimentar-se normalmente (DALL'AGO et al., 2002).

Ao terceiro e sétimo dia após a indução, a glicemia foi verificada, com o intuito de confirmar a instalação do diabetes, sendo considerados diabéticos os animais que apresentaram glicemia superior a 200 mg/dL (CARVALHO et al., 2003). A partir daí a glicose sanguínea foi dosada semanalmente até o fim do experimento a partir da coleta de uma gota de sangue na ponta da cauda do animal através de um glicosímetro Accu-Chek Active. Foi também realizado o acompanhamento do peso corpóreo (balança digital - FILIZOLA, modelo BP6), três vezes por semana, a partir da indução ao diabetes até o último dia do experimento.



Figura 4 - Indução ao diabetes experimental (Fonte: arquivo pessoal)

3.4 PROTOCOLO MEDICAMENTOSO

Todos os animais, duas semanas após a indução, com idade ± 74 dias de vida, foram submetidos a uma fratura aberta do fêmur direito. Para isso, os animais receberam: analgésico (Cloridrato de Tramadol-50mg/ml), via subcutânea, em uma dose de 100mg/ Kg de peso do animal diluído em soro fisiológico 0,9%, em uma proporção de 1:1, 30 minutos antes da cirurgia, 12/12h por 72h no pós-cirúrgico imediato; antibiótico (Enrofloxacin), via subcutânea, administrada em uma dose de 5mg/Kg de peso do animal, logo após a cirurgia, de 24/24h por 4 dias; anti-inflamatório (Meloxicam), via subcutânea, em uma dose de 0,1ml/Kg de peso do animal, logo após a cirurgia e de 24/24h durante 2 dias pós-cirúrgico.

A anestesia dos animais foi realizada com uma solução, via intramuscular, de cloridrato de xilazina a 2% (20 mg, Rompum® – Bayer) e Cloridrato de Ketamina a 10% (50 mg, Ketalar®) em uma quantidade de 0,2 ml da solução para cada 100g de peso do animal.

3.5 PROTOCOLO DE FRATURA DO FÊMUR

Uma vez anestesiados, os animais foram posicionados em decúbito dorsal numa mesa cirúrgica, com o membro posterior direito em extensão. Foi realizada tricotomia póstero-lateral na coxa e joelho direito, assepsia de todo o membro posterior direito, colocação dos campos cirúrgicos estéreis, e iniciados os seguintes procedimentos: incisão de aproximadamente 3 cm longitudinal da coxa até o joelho direito; dissecação por planos e disjunção muscular até ser visualizada a diáfise femoral direita; introdução horizontal da serra de Gigli (30cm em aço inoxidável especial Style, C.Brasil) ao redor do fêmur no meio da diáfise, a partir da qual o fêmur foi serrado até produzir fratura transversa completa do fêmur. Após a fratura, foi realizado um desvio longitudinal para introdução de um fio de Kirschner de 1,0 mm de diâmetro longitudinalmente ao longo do canal medular do fêmur até o trocanter maior, para simulação de uma haste intramedular (Figura 5). A sutura do músculo vasto lateral e da pele foi feita com fio de nylon 4-0. Após os procedimentos cirúrgicos, ainda anestesiados, os ratos foram submetidos a uma dose única, de anestésico (Fentanila 0,5ml/1000g de peso do animal), intramuscular.

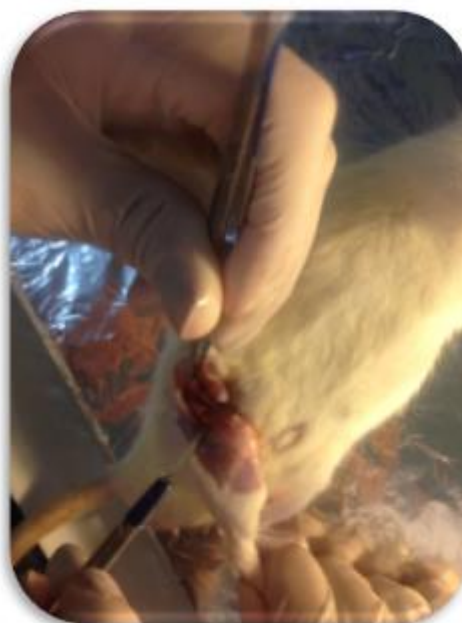


Figura 5 - Cirurgia de fratura do fêmur (Fonte: arquivo pessoal)

3.6 OBTENÇÃO E ADMINISTRAÇÃO DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA

Para a obtenção das células mesenquimais da medula óssea foram utilizados 3 ratos, albinos, *Wistar* e adultos. Os animais doadores foram anestesiados com uma solução de cloridrato de xilazina a 2% (20 mg, Rompum® – Bayer) e Cloridrato de Ketamina (50 mg, Ketalar®) por via intramuscular, em uma quantidade de 0,2 ml da solução para cada 100 g de peso corporal do animal. Após a anestesia, os animais foram eutanasiados com injeção de 1mL de cloreto de potássio (KCl) por via intracardíaca. Para cada animal foi realizada assepsia com álcool 70% e colocados sobre uma bandeja estéril sob fluxo laminar. Foi realizada a incisão para expor o tecido muscular de ambos os membros inferiores e em seguida, os fêmures foram dissecados até ficarem livres de tecidos. Os osso foram colocados em meio de cultura DMEM numa placa de Petri estéril. A partir daí, as epífises foram removidas e o canal medular foi lavado com 10mL de DMEM, através de seringa descartável de 1mL. O conteúdo proveniente do canal ósseo foi colocado em um tubo Falcon de 15mL (Figura 6A).

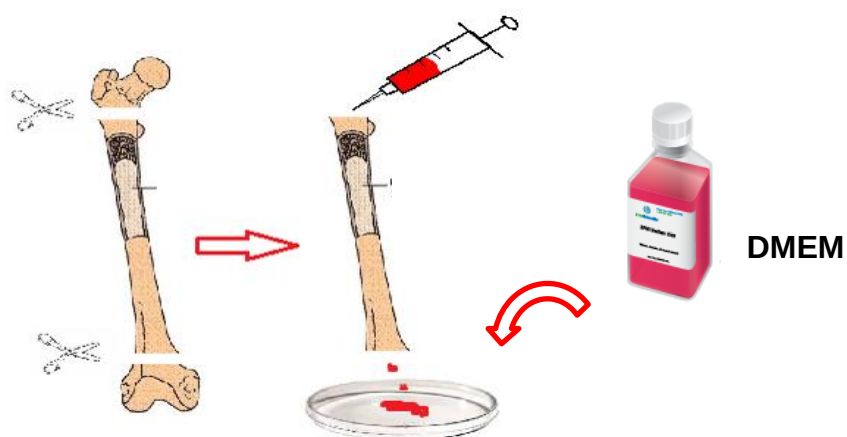


Figura 6A - Remoção das epífises e lavagem do canal ósseo. (Fonte: arquivo pessoal)

A suspensão obtida mantida, em tubo Falcon 50 ml, foi centrifugada (252xg) a 1500 rpm por 10 minutos, em seguida, foi descartado o sobrenadante, resuspendido o precipitado. Em um tubo estéril Falcon foi adicionado 3mL de solução de Histopaque e logo após, adicionado 3mL da suspensão de células pela lateral do tubo para que estas não se misturem com o Histopaque (Figura 6B) e posto na centrífuga 400xg por 30min.

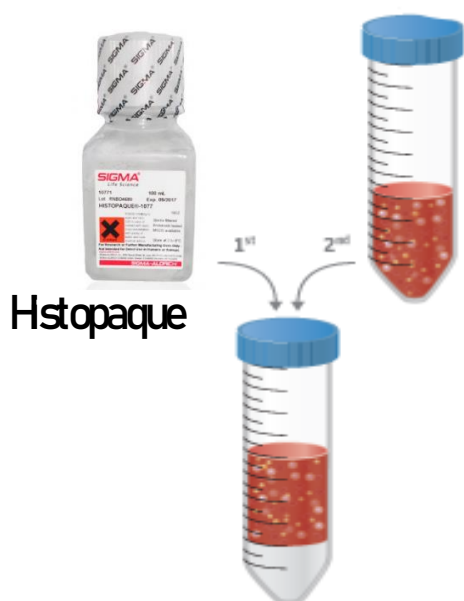


Figura 6B - Adição de Histopaque e da suspensão de células no tubo Falcon. (Adaptada, Fonte: <http://www.irvinesci.com/uploads/images/MS-Cordblood.png>)

Em seguida, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur foi coletado o anel de células (parte turva) e adicionado em um tubo Falcon de 15mL estéril e juntamente com 10mL de DMEM e foi centrifugado novamente por 250xg por 10min (Figura 6C).

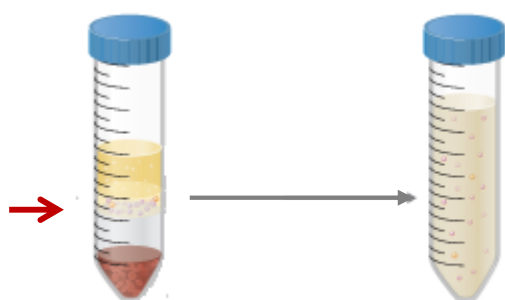


Figura 6C - Adição das células e do DMEM (Adaptada, Fonte: <http://www.irvinesci.com/uploads/images/MSC-cordblood.png>)

Em continuidade, foi descartado o sobrenadante, as células precipitadas foram resuspendidas com 1,5mL de DMEM suplementado e colocar na garrafa de cultura (Figura 6D).

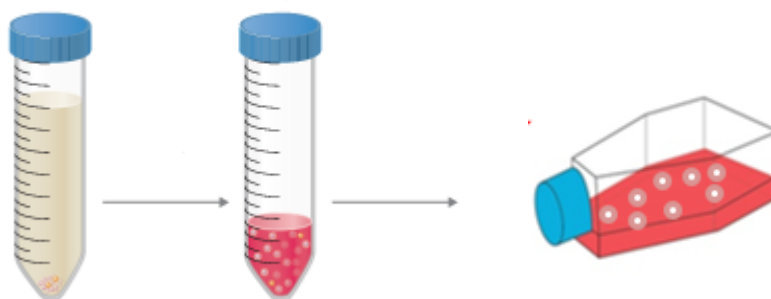


Figura 6D - Adição de Histopaque e da suspensão de células no Falcon e condicionamento na garrafa de cultura. (Adaptada, Fonte: <http://www.irvinesci.com/uploads/images/MSC-cordblood.png>)

No dia da cirurgia, a suspensão de células (células mesenquimais, meio de cultura e matrigel) foi ajustadas para 5×10^6 células/ml para serem administradas no interior do canal medular do fêmur, imediatamente após da promoção da fratura de acordo com o grupo de estudo.

3.7 PROTOCOLO DO ULTRASSOM

Um dia após a realização da fratura foi iniciado o protocolo de tratamento com o ultrassom. O tratamento foi realizado diariamente do 1º ao 24º dia após a fratura, e o tempo diário de aplicação foi de 20 minutos, 7 vezes por semana (AZUMA et al., 2001). O animal foi posicionado em contenção por um pesquisador enquanto outro

era o aplicador da terapia. Com a pata posterior direita tricotomizada, foi aplicado o gel (RMC® gel) para contato e então iniciava-se a terapia (Figura 7). Para os animais dos grupos sem tratamento (GCST e GDST), eram realizados os mesmos procedimentos, porém não foi acrescentada intensidade no equipamento.

O equipamento de ultrassom utilizado foi o SONOPULSE (Ibramed), com cabeçote de aplicação com área efetiva de aplicação com 1cm², programável para uso na modalidade pulsado, com frequência de 1MHz, frequência de repetição de pulso de 100Hz, duração de pulso de 2ms - razão de 1:5, ciclo de trabalho de 20% e intensidade de 0,5 w/cm² (BABUCCU et al., 2014).



Figura 7 - Procedimento de ultrassom aplicado no local da fratura (Fonte: arquivo pessoal)

3.8 EUTANÁSIA E COLETA DO MATERIAL

No 25º dia após a fratura do fêmur, os animais de todos os grupos foram eutanasiados com solução de Xilazina (Rompum® - Bayer) (10mg/Kg) e Cloridrato de Ketamina (Ketalar®) (25mg/kg), 0,10 ml para cada 100g de peso e tiveram seus fêmures direitos desarticulados e dissecados, cuidadosamente para não danificar o local de formação do calo ósseo.

3.9 OBTENÇÃO DAS IMAGENS RADIOGRÁFICAS DIGITAIS

Para cada fêmur direito de cada animal, foi obtida uma imagem radiográfica digital com uma escala de densidade de 1 mm de alumínio de incremento de dez degraus e uma lâmina de chumbo. Para obtenção dessas imagens, foi utilizado o aparelho de raios X periapical Heliodent Plus® (Sirona, Dental Systems NY, EUA) operando a 70Kvp, 10mA, tempo de exposição de 0,03s. A distância foco-receptor de 30cm foi padronizada por meio de uma plataforma de acrílico (Figura 8). O receptor de imagem utilizado foi do tipo CCD (Charge-Coupled Device), com o sistema direto RVG 6100 (Carestream®, Nova York, EUA) e o programa Dental Imaging Software®. Os arquivos foram exportados e salvos no formato TIFF (LOUZADA *et al.*, 2001; MACHADO *et al.*, 2009; DUKIC *et al.*, 2012) .

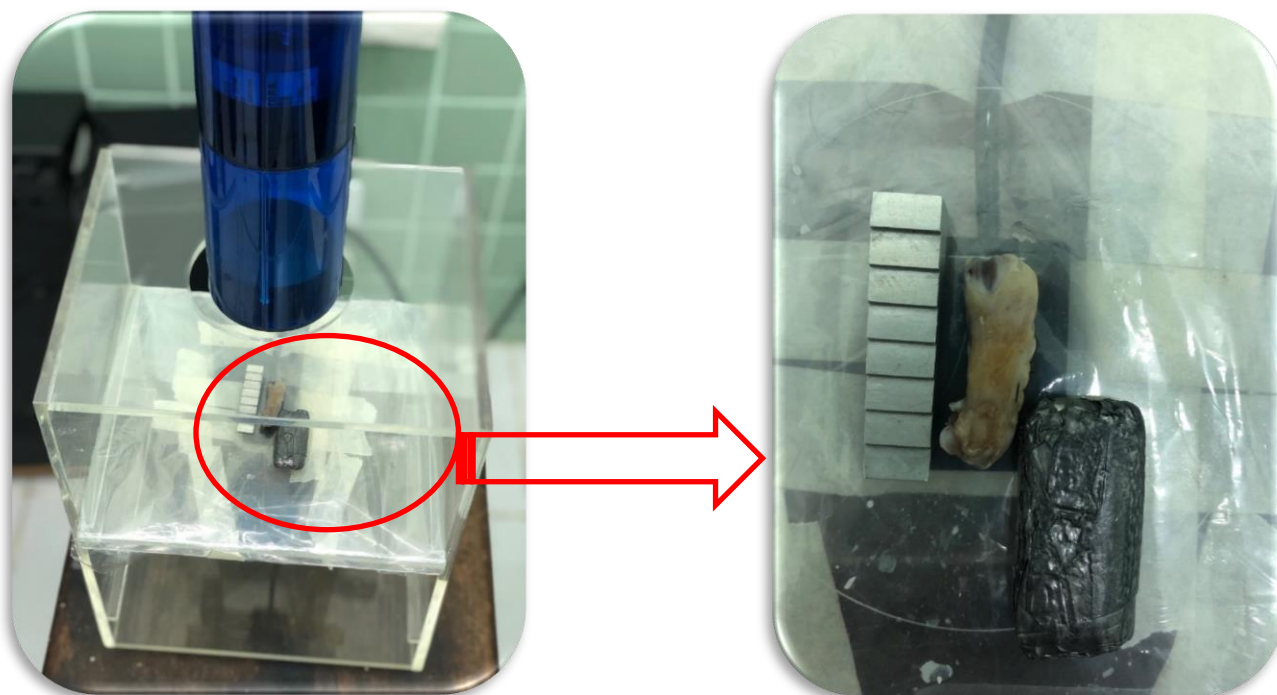


Figura 8 - Obtenção de radiografia do fêmur (Fonte: arquivo pessoal)

3.10 AVALIAÇÃO DA DENSIDADE MINERAL ÓSSEA EM MM/AL

As imagens foram importadas (Figura 9) e abertas no programa image J. Neste programa, foi mensurado com a ferramenta histograma os valores de pixel dos degraus da escala de densidade, do valor da lâmina de chumbo (valor 255) e o valor do tom de cinza da diáfise média do fêmur do animal. Para cada animal, foi aberta uma planilha no programa Excell (versão 2013), no qual foi possível construir um gráfico do inverso do valor de cinza *versus* degrau em mm/AL e então escolhida

uma equação na qual o valor de R2 fosse mais próximo de 1. A partir desta fórmula, foi possível converter o valor de cinza da diáfise média do fêmur do rato em mm/Al (LOUZADA *et al.*, 2001; MACHADO *et al.*, 2009; DUKIC *et al.*, 2012) .

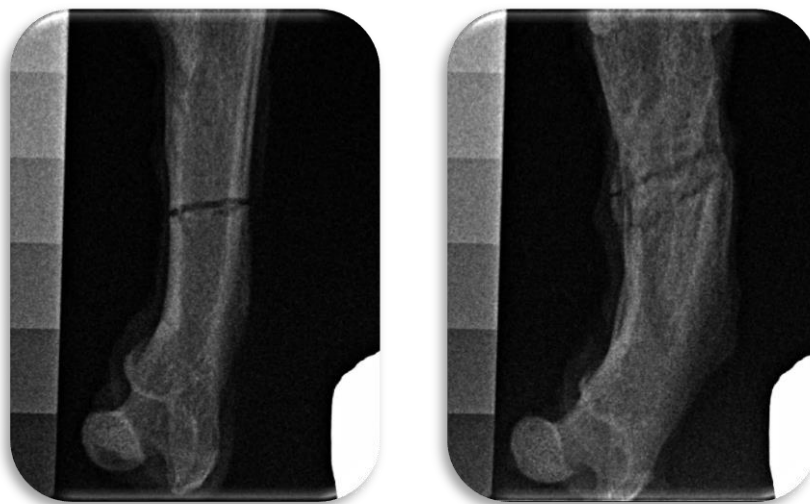


Figura 9 - Imagens utilizadas para mensuração da densidade mineral do fêmur
(Fonte: arquivo pessoal)

3.11 ANÁLISE BIOMECÂNICA

Para realização da avaliação biomecânica, inicialmente foi calculada a área da seção transversal do osso (mm^2) em seu terço medial (Figura 10.A) através da fórmula da elipse (SILVEIRA; NERY, 1999). Em seguida, o fêmur foi colocado na máquina de ensaio mecânico convencional (EMIC modelo DL500) com célula de carga de 500N e submetido ao ensaio mecânico de flexão em três pontos. Para tanto, o fêmur foi posicionado entre dois pinos de apoio, afastados de 15 mm (PRISBY *et al.*, 2008), e um pino de metal superior, que exerce a pressão, foi posicionado no meio da diáfise do fêmur (Figura 10.B). A partir daí ocorreu o ensaio mecânico, com a força aplicada a uma velocidade de 0,5 mm/min e registrada automaticamente por um software acoplado à máquina. Foram avaliados os seguintes parâmetros biomecânicos: módulo elástico (Mpa), tensão máxima (N), força máxima (Mpa) e deformação máxima (mm).

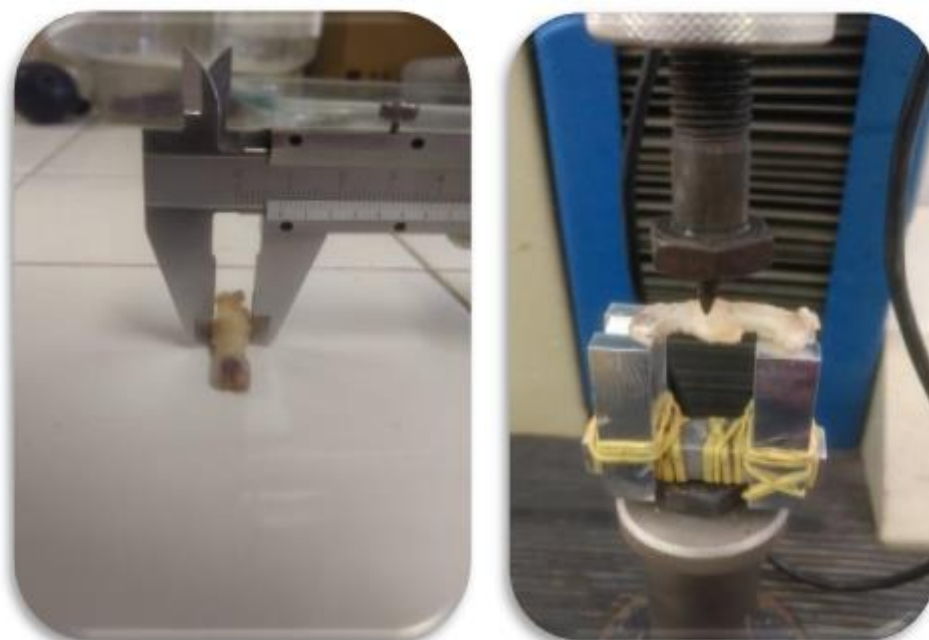


Figura 10 - Ensaio mecânico. **A** - Avaliação da área de secção transversa do fêmur. **B**- Máquina de ensaio mecânico EMIC modelo DL 10000 com o fêmur posicionado para o ensaio de flexão em três pontos. (Fonte: arquivo pessoal)

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram digitados na planilha EXCEL e o programa utilizado para obtenção dos cálculos estatísticos foi o IMB SPSS na versão 23. Após a construção do banco de dados, estes foram analisados descritivamente através das medidas: média, desvio padrão (média $\pm$ DP) e mediana e foram analisadas inferencialmente através dos testes estatísticos.

As verificações das hipóteses de normalidade e de igualdade de variâncias foram através dos testes respectivos de Shapiro-Wilk e F de Levene. Para a comparação entre mais de dois grupos foi utilizado os testes F (ANOVA) ou Kruskal-Wallis e para a comparação entre dois grupos foi utilizado o teste t-Student com variâncias iguais, t-Student com variâncias desiguais ou Mann-Whitney.

A escolha dos testes F (ANOVA) e t-Student ocorreram nas situações de verificação da distribuição normal em cada categoria e os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney no caso de rejeição da normalidade em pelo menos uma das categorias. No caso de diferença significativa pelo teste F (ANOVA) foram utilizados testes de comparações de Tukey se foi verificada igualdade de variâncias e Tamhane se a hipótese de igualdade de variâncias é rejeitada. No caso de diferença

significativa pelo teste de Kruskal-Wallis foram utilizadas comparações do referido teste. A margem de erro utilizada na decisão dos testes estatísticos foi de 5%.

4 RESULTADOS

De acordo com as normas do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO), os resultados obtidos até o momento compõem o Artigo Original 1, intitulado – **“Low intensity ultrasound in the repair of open fracture of femur in diabetic rats”**, teve como objetivo avaliar o efeito do ultrassom pulsado de baixa intensidade na cicatrização da fratura aberta de fêmur de ratos diabéticos. Artigo Original 2, intitulado – **“Uso combinado de terapia com células mesenquimais da medula óssea e ultrassom pulsado na reparação da fratura de fêmur de ratos diabéticos”**, teve como objetivo avaliar o efeito do ultrassom pulsado de baixa intensidade associado à terapia com células mesenquimais no reparo da fratura aberta de fêmur de ratos diabéticos.

4.1 ARTIGO ORIGINAL 1

**ULTRASSOM DE BAIXA INTENSIDADE NA REPARAÇÃO DE FRATURA
ABERTA DE FÊMUR EM RATOS DIABÉTICOS**

Msc. Cybelle da Silva Nery¹ *; Laylla Marjorye Rebouças Bezerra¹; Silvia Luana Ramos Marques³; Marina Lira Cavalcante⁴; PhD. Eduardo José Nepomuceno Montenegro⁵; PhD. Márcio Almeida Bezerra⁶; PhD. Ana Cristina Falcão Esteves⁷; PhD. Silvia Regina Arruda de Moraes⁷

¹Programa de Pós-graduação em Biotecnologia/ RENORBIO; Laboratório de Plasticidade Neuromuscular – LAPLAN, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

²Estudante de Mestrado em Fisioterapia, Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

³Fisioterapeuta, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

⁴Estudante de Mestrado, Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP.

⁵Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

⁶Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal do Ceará – UFC.

⁷Departamento de Anatomia, Laboratório de Plasticidade Neuromuscular – LAPLAN, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

***AUTHOR FOR CORRESPONDENCE:**

Cybelle da Silva Nery

Rua Jonathas de Vasconcelos, 750

51021-140 Recife PE – Brazil

Cell phone +55 (81) 99956-1646

E-mail address: cybellesnery@gmail.com (NERY CS)

Laboratory of Neuromuscular Plasticity – LAPLAN

Resumo

O Diabetes *Mellitus* (DM) afeta o tecido ósseo promovendo alterações no processo de osteogênese, ocasionando osteopenia e aumentando a fragilidade à fratura. A terapia de ultrassom por favorecer o aumento da formação óssea, desponta como uma alternativa para auxiliar no processo de cicatrização. Objetivo: avaliar o efeito do ultrassom com intensidade de 100mW/cm² no processo de cicatrização da fratura de fêmur de ratos diabéticos através da densidade mineral óssea (DMO) e análise biomecânica. Metodologia: 60 ratos da linhagem *Wistar*, foram distribuídos em quatro grupos: GCP (n=16), GCU (n=14), GDP (n=9) e GDU (n=12). Aos 60 dias de vida os animais foram induzidos ao diabetes experimental (injeção de solução de Estreptozotocina, STZ- Shimadzu®; intraperitoneal; 60mg/Kg) e duas semanas após a indução, foi realizada uma fratura aberta do fêmur direito. Do primeiro até o 24º dia pós-cirúrgico, foi iniciado o tratamento com ultrassom SONOPULSE (Ibramed), sete vezes na semana, durante 20 minutos/dia, na modalidade pulsado, com frequência de 1MHz, frequência de repetição de pulso de 100Hz, duração de pulso de 2ms - razão de 1:5, ciclo de trabalho de 20% e intensidade de 0,5 w/cm². Após o término do tratamento, os animais foram eutanasiados e os fêmures coletados para análise da densitometria mineral óssea (DMO) e ensaio biomecânico de flexão em três pontos através da força máxima, tensão máxima, deformação máxima, módulo elástico, área de secção transversa e comprimento do fêmur. Resultados: Na DMO não foram observadas diferenças entre os grupos, entretanto em relação aos parâmetros biomecânicos, apenas a tensão máxima apresentou valores mais elevados no GDU [(1,22 ± 0,63) Mpa] quando comparado com GDP [(0,75 ± 0,61) Mpa] (p=0,032). Conclusão: o protocolo de tratamento de ultrassom com intensidade de 100 mW/cm² promoveu melhora no processo de cicatrização da fratura de fêmur de ratos diabéticos observados através do aumento da tensão máxima.

Palavras chaves: Diabetes *Mellitus*, fratura, osso, parâmetro biomecânicos, ratos, ultrassom.

INTRODUÇÃO

O Diabetes *Mellitus* (DM) é uma síndrome metabólica caracterizada por uma hiperglicemia que desencadeia comorbidades em diversos tecidos, incluindo o ósseo. As alterações na densidade mineral e na estrutura óssea eleva o risco de osteoporose com consequente fragilidade à fratura, alterando a osteogênese e promovendo a osteopenia (NAPOLI et al., 2017; SUNDARARAGHAVAN et al., 2017; CHALAS et al., 2016; YAN et al., 2013).

Mecanismos têm sido sugeridos para explicar a osteopenia associada ao diabetes. Dentre estes estão as alterações na sinalização celular, inflamação associada ao DM, alterações dos fatores de crescimento e hormônios endócrinos, maior estresse oxidativo e morte celular (KAYAL et al., 2009; McCABE, 2007; KEMINK et al., 2000). A redução na formação de osteoblastos e da atividade de remodelamento ósseo retarda o processo de cicatrização das fraturas e favorece uma redução na formação do calo ósseo (SINGH et al., 2017; KO et al., 2015; GASTON & SIMPSON, 2007).

A cicatrização de uma fratura é um processo fisiológico complexo, baseado em mecanismos de proliferação e diferenciação de células e tecidos, envolvendo fatores de crescimento, citocinas inflamatórias, osteoclastos e osteoblastos, dentre outros (SINGH et al., 2017). A cicatrização ocorre em quatro estágios, nos quais são, inflamação local, formação do calo mole, formação do calo duro e por último o remodelamento (KAGEL & EINHORN, 1996). Nos ratos diabéticos, este processo de cicatrização, apresenta-se com atraso no reparo ósseo, redução do osso alveolar, produção de calos menores e mecanicamente mais fracos, que irá repercutir em menor força mecânica (PADULA et al., 2003; REDDY et al., 2001; FUNK et al., 2000; MACHWATE et al., 1994).

Dentre as terapias utilizadas na cicatrização de fraturas, a de ultrassom de baixa intensidade tem-se demonstrado benéfica, estimulando modificações na permeabilidade da membrana celular aumentando a vascularização e acelerando a cicatrização da fratura, além de atuar durante o reparo ósseo na ossificação endocondral, processo de conversão de calo cartilaginoso macio em calo duro e mineralizado, aumentando a estabilidade mecânica de cicatrização da fratura (CLAES & WILLIE, 2007; JINGUSHI et al., 2007; EI-MOWAFI & MOHSEN, 2005; LEUNG et al., 2004; RAWOOL, et al, 2003; HADJIARGYROU et al., 1998). Em animais diabéticos observou-se que o ultrassom de baixa intensidade acelera a cicatrização de fratura por aumentar a neovascularização (COORDS et al, 2011) e melhorar as propriedades mecânicas do calo (GEBAUER, et al., 2002), aumentando o tamanho deste e a formação de cartilagem, atuando assim na proliferação celular (KOBAYASHI et al., 2009) revertendo as alterações ósseas decorrentes do quadro metabólico do DM.

Entretanto não foi encontrado na literatura pesquisada estudos que avaliem o ultrassom com a intensidade utilizada na prática clínica, comum nos equipamentos comerciais de ultrassom em Fisioterapia, uma vez que os equipamentos específicos para animais usam $30\text{mW}/\text{cm}^2$. Portanto, o presente estudo pretendeu avaliar o efeito do ultrassom com intensidade de $0,5\text{W}/\text{cm}^2$ na cicatrização da fratura de fêmur de ratos diabéticos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Local do Estudo

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Plasticidade Neuromuscular (Departamento de Anatomia - UFPE) e no Laboratório de Engenharia Química

(Departamento de Engenharia Química – UFPE). O estudo foi aprovado na Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEa-UFPE), processo nº 23076.031594/2016-98.

Amostra/Grupos Experimentais

A amostra foi composta por 46 ratos machos da raça *Rattus Novergicus Albinus*, da linhagem *Wistar*, com idade de 60 dias de vida, mantidos em gaiolas, ciclo de luz invertido claro/escuro de 12 horas e temperatura de 23°+/-1°C. Os ratos receberam uma dieta através de ração apropriada (Presence® - Purina) e água *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: Grupo Controle Placebo (GCP, n=11, animais saudáveis, submetidos à fratura aberta de fêmur e ao ultrassom placebo; Grupo Diabético Placebo (GDP, n=11), animais diabéticos e submetidos à fratura aberta de fêmur e ao ultrassom placebo; Grupo Controle Ultrassom (GCU, n=12), animais saudáveis, submetidos à fratura aberta de fêmur e tratados com ultrassom; Grupo Diabético Ultrassom (GDU, n=12), animais diabéticos, submetidos à fratura aberta de fêmur e tratados com ultrassom.

Indução ao Diabetes

Aos 60 dias de vida, após jejum de 12h, os animais dos grupos GDP e GDU, foram induzidos ao diabetes pela administração única, via intraperitoneal, de uma solução de Estreptozotocina (STZ- Shimadzu®), diluída em tampão citrato de sódio a 10mM e pH 4,5, na dose de 60mg/kg de peso do animal. Os animais dos grupos não diabéticos receberam doses equivalentes da solução tampão citrato de sódio

objetivando o nivelamento do estresse físico ofertado para os grupos diabéticos. Ao final de 30 minutos após o tratamento os animais puderam alimentar-se normalmente (DALL'AGO et al., 2002).

Antes da indução ao diabetes, foi realizada a verificação da glicose sanguínea (Glicosímetro Kit Accu-Chek Active) após jejum de 12h. Ao terceiro e sétimo dia após a indução, a glicose também foi verificada, com o intuito de confirmar a instalação do diabetes, sendo considerados diabéticos os animais que apresentaram glicemia superior a 200 mg/dL (CARVALHO et al., 2003). A partir daí a glicose sanguínea foi dosada semanalmente até o fim do experimento a partir da coleta de uma gota de sangue na ponta da cauda do animal através de um glicosímetro Accu-Chek Active. Foi também realizado o acompanhamento do peso corpóreo (balança digital - FILIZOLA, modelo BP6), três vezes por semana, a partir da indução ao diabetes até o último dia do experimento.

Protocolo de fratura do fêmur e medicamentoso

Todos os animais, duas semanas após a indução, com idade ± 74 dias de vida, foram submetidos a uma fratura aberta do fêmur direito. Para isso, os animais receberam: analgésico (Cloridrato de Tramadol-50mg/ml), via subcutânea, em uma dose de 100mg/ Kg de peso do animal diluído em soro fisiológico 0,9%, em uma proporção de 1:1, 30 minutos antes da cirurgia, 12/12h por 72h no pós-cirúrgico imediato; antibiótico (Enrofloxacina), via subcutânea, administrada em uma dose de 5mg/Kg de peso do animal, logo após a cirurgia, de 24/24h por 4 dias; anti-inflamatório (Meloxicam), via subcutânea, em uma dose de 0,1ml/Kg de peso do animal, logo após a cirurgia e de 24/24h durante 2 dias pós-cirúrgico.

A anestesia dos animais foi realizada com uma solução, via intramuscular, de cloridrato de xilazina a 2% (20 mg, Rompum® – Bayer) e Cloridrato de Ketamina a 10% (50 mg, Ketalar®) em uma quantidade de 0,2 ml da solução para cada 100g de peso do animal. Uma vez anestesiados, os animais foram posicionados em decúbito dorsal na mesa cirúrgica, com o membro posterior direito em extensão. Foi realizada tricotomia póstero-lateral na coxa e joelho direito, assepsia de todo o membro posterior direito, colocação dos campos cirúrgicos estéreis, e iniciados os seguintes procedimentos: incisão de aproximadamente 3 cm longitudinal da coxa até o joelho direito; dissecação por planos e disjunção muscular até ser visualizada a diáfise femoral direita; introdução horizontal da serra de Gigli (30cm em aço inoxidável especial Style, C.Brasil) ao redor do fêmur no meio da diáfise, a partir da qual o fêmur é serrado até produzir fratura transversa completa do fêmur.

Após a fratura, foi realizado um desvio longitudinal para introdução de um fio de Kirschner de 1,0 mm de diâmetro longitudinalmente ao longo do canal medular do fêmur até o trocanter maior, para simulação de uma haste intramedular. A sutura do músculo vasto lateral e da pele foi feita com fio de nylon 4-0. Após os procedimentos cirúrgicos, ainda anestesiados, os ratos foram submetidos a uma dose única, de anestésico (Fentanila 0,5ml/1000g de peso do animal), intramuscular.

Tratamento com ultrassom

Um dia após a realização da fratura foi dado início ao protocolo de tratamento com o ultrassom pulsado. O tratamento foi realizado diariamente do 1º ao 24º dia após a fratura, e o tempo diário de aplicação foi de 20 minutos, 7 vezes por semana (AZUMA et al., 2001).

O animal era posicionado em contenção com a pata posterior direita tricotomizada, era aplicado o gel (RMC® gel) para contato e então iniciava-se a terapia. Para os animais dos grupos sem tratamento (GCP e GDP), eram utilizados os mesmos procedimentos, porém não era acrescentada intensidade no equipamento.

O equipamento de ultrassom utilizado foi o SONOPULSE (Ibramed), com cabeçote de aplicação com área efetiva de aplicação com 1cm², programável para uso na modalidade pulsado, com frequência de 1MHz, frequência de repetição de pulso de 100Hz, duração de pulso de 2ms - razão de 1:5, ciclo de trabalho de 20% e intensidade de 0,5 w/cm² tendo como emissão final 100mW/cm² (BABUCCU et al., 2014).

Eutanásia e coleta do material

No 25º dia após a fratura do fêmur, os animais de todos os grupos foram eutanasiados com solução de Xilazina (Rompum® - Bayer) (10mg/Kg) e Cloridrato de Ketamina (Ketalar®) (25mg/kg), 0,10 ml para cada 100g de peso e tiveram seus fêmures direitos desarticulados e dissecados, cuidadosamente para não danificar o local de formação do calo ósseo. Os fêmures foram encaminhados para a análise densitométrica.

Obtenção das imagens radiográficas digitais

Para cada fêmur direito de cada animal, foi obtida uma imagem radiográfica digital com uma escala de densidade de 1 mm de alumínio de incremento de dez degraus e uma lâmina de chumbo. Para obtenção dessas imagens, foi utilizado o aparelho de raios X periapical Heliodent Plus® (Sirona, Dental Systems NY, EUA)

operando a 70Kvp, 10mA, tempo de exposição de 0,03s. A distância foco-receptor de 30cm foi padronizada por meio de uma plataforma de acrílico. O receptor de imagem utilizado foi do tipo CCD (Charge-Coupled Device), com o sistema direto RVG 6100 (Carestream®, Nova York, EUA) e o programa Dental Imaging Software®. Os arquivos foram exportados e salvos no formato TIFF (LOUZADA *et al.*, 2001; MACHADO *et al.*, 2009; DUKIC *et al.*, 2012) .

Avaliação da densidade mineral óssea em mm/AL

As imagens foram importadas e abertas no programa image J. Neste programa, foi mensurado com a ferramenta histograma os valores de pixel dos degraus da escala de densidade, do valor da lâmina de chumbo (valor 255) e o valor do tom de cinza da diáfise média do fêmur do animal. Para cada animal, foi aberta uma planilha no programa Excell (2013), no qual foi possível construir um gráfico do inverso do valor de cinza X degrau em mm/AL e então escolhida uma equação na qual o valor de R² fosse mais próximo de 1. A partir desta fórmula, foi possível converter o valor de cinza da diáfise média do fêmur do rato em mm/AL (LOUZADA *et al.*, 2001; MACHADO *et al.*, 2009; DUKIC *et al.*, 2012) .

Análise biomecânica

Para a avaliação biomecânica, o fêmur foi colocado na máquina de ensaio mecânico convencional (EMIC modelo DL500) com célula de carga de 500N (Newton) e submetido ao ensaio mecânico de flexão em três pontos. Para tanto, o fêmur foi posicionado entre dois pinos de apoio, afastados de 15 mm (PRISBY *et al.*, 2008), e um pino de metal superior, que exerce a pressão, foi posicionado no meio da diáfise do fêmur. A partir daí ocorreu o ensaio mecânico de flexão em três pontos,

com a força aplicada a uma velocidade de 0,5 mm/min e registrada automaticamente por um software acoplado à máquina. Foram avaliados os seguintes parâmetros biomecânicos: módulo elástico (Mpa), tensão máxima (N), força máxima (Mpa) e deformação máxima (mm).

Análise estatística

Com os dados obtidos foi construído um banco de dados e posteriormente analisados através do software IMB SPSS na versão 23. Para comparação entre duas amostras foi utilizado o teste t-Student com variâncias iguais, t-Student com variâncias desiguais ou Mann-Whitney conforme a confirmação da normalidade. Para comparação entre grupos, Para a comparação entre mais de dois grupos foi utilizado os testes F (ANOVA) ou Kruskal-Wallis. Para análise post hoc foi utilizado o Teste de Tukey. Para as variáveis não normais, foi utilizado o Teste de Kruskal-Wallis seguido comparações do referido teste. Os dados foram expressos em média, desvio padrão ($\pm$ DP) e mediana. O nível de significância foi de 5%.

RESULTADOS

Durante todo o experimento foram registradas as seguintes perdas amostrais: GCP-11, GDP-12, GCTcP-8, GCTcU-2, GDTcP-4 e GDTcU-4 animais, decorrentes de não instalação do DM experimental, complicações tais como dor pós-cirúrgica não sanada com o protocolo medicamentoso, feridas expostas que levassem sofrimento ao animal e consolidação viciosa da fratura.

Os animais diabéticos (GDP e GDU) obtiveram índices glicêmicos superiores (Tabela 1) quando comparados aos seus controles (GCP e GCU) ratificando o estado diabético dos animais induzidos experimentalmente.

Em relação a DMO, não foram observadas diferenças entre os grupos diabéticos quando comparados aos seus controles (Tabela 2)

Os resultados do ensaio mecânico mostraram que o GDU apresentou valores aumentados de tensão máxima quando comparado ao GDP e de área de secção transversa e deformação máxima em relação ao GCU, não sendo observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) para os parâmetros força máxima, módulo elástico e área de secção transversa entre os grupos avaliados (Tabela 3).

DISCUSSÃO

A glicemia dos animais diabéticos mostrou-se elevada logo após a indução dos animais até o final do experimento, demonstrando a instalação do diabetes experimental pela solução de Estreptozotocina na dose de 60 mg/Kg do animal, não havendo reversão do quadro diabético, conforme o que já foi descrito na literatura (PATROCÍNIO-SILVA, et al., 2016; FURMAN, 2015; ROCHA et al., 2013; CARVALHO, et al., 2003).

A análise da DMO ocorre através da espessura em milímetros de alumínio (mm/Al) das imagens radiográficas. Não foram observadas diferenças entre os grupos diabéticos e controles, independente da utilização do ultrassom. O que pode ser explicado pelo tempo de diabetes dos animais, não ter sido suficiente para induzir alterações na DMO (ERDAL et al., 2011) e/ou o protocolo de ultrassom utilizado não ter sido capaz de alterar a proliferação celular no calo ósseo, como observado por GEBAUER et al., (2002).

Por outro lado, a baixa qualidade do osso diabético não pode ser detectada apenas por alteração da DMO (EINHORN et al., 1988; VERHAEGHE et al., 1990; REDDY et al., 2001). Segundo Reddy et al. (2001), a integridade biomecânica dos

ossos é um dos fatores mais importantes relacionados com o risco de fratura. Os resultados do presente estudo demonstraram que a terapia utilizada com ultrassom promoveu um aumento da tensão máxima dos fêmures que sofreram o processo de fratura no grupo diabético evidenciando uma maior capacidade de suportar a carga imposta. Tais resultados eram esperados pelo fato da tensão máxima sofrer consequências das alterações da área de secção transversa (COWIN, 2001). Como não houve alteração da força máxima entre os grupos, a redução da área de secção transversa do GDU colaborou com o aumento da tensão máxima. Gebauer et al., (2002) observaram que o ultrassom pulsado de baixa intensidade acelera a cicatrização de fraturas de DM através da melhora dos parâmetros biomecânicos de rigidez e torque do calo de fratura nos animais diabéticos corroborando nossos resultados.

Apesar de não ter sido observado diferença quanto a alteração na rigidez do tecido ósseo em relação ao módulo elástico, os animais do GDU apresentaram um aumento na deformação máxima quando comparado ao GCU, o ultrassom parece ter estimulado no aumento da capacidade de resistir ao estresse de compressão evidenciando uma melhora biomecânica com a utilização desta terapia (HART et al., 2001; GEBAUER et al., 2002; RUSSO, 2009).

Quanto aos demais parâmetros biomecânicos, não foram encontradas diferenças estatísticas no presente estudo, supõem-se que a diferença encontrada com relação aos outros estudos esteja relacionada à intensidade do ultrassom utilizada (30mW/cm^2), o tipo de animal utilizado no estudo (modificados geneticamente ao DM), e o uso de terapia insulínica para controle do estado diabético (PICKE et al, 2016). Findik et al., (2014) encontraram alteração

biomecânica supondo uma melhora da cicatrização, porém a técnica utilizada relacionada ao osso foi a promoção de um defeito ósseo controlado com broca padrão, além de ser utilizada intensidade de 30mW/cm², contrastando com a fratura aberta promovida no presente estudo e a intensidade de 0,5W/cm² também sendo considerada de baixa intensidade (PADILLA et al., 2014).

Não foram encontradas diferenças estatísticas quando comparado os grupos sem tratamento (GDP x GCP) como demonstrado por estudos anteriores (COORDS et al., 2010; CHEUNG et al., 2012). Apesar de um deles ter utilizado um modelo animal com fratura osteoporótica, possuindo características semelhantes a um modelo diabético com relação às alterações ósseas, o que levaria a alterações dos parâmetros biomecânicos (NAPOLI et al., 2017). A grande variabilidade dos dados quanto às complicações do diabetes nos animais do GDP pode ter influenciado a ausência de diferença entre os grupos.

CONCLUSÃO

O ultrassom terapêutico pulsado de baixa intensidade 0,5W/cm² pareceu estimular nos animais diabéticos uma maior tensão e deformação máxima do fêmur.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Azuma Y, Ito M, Harada Y, Takagi H, Ohta T, Jingushi S. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates rat femoral fracture healing by acting on the various cellular reactions in the fracture callus. *J Bone Miner Res* 2001. Apr; 16 (4):671-80.

Babuccu C, Keklikoglu N, Baydogan M, Kaynar A. cumulative effect of low-level laser therapy and low-Intensity pulsed ultrasound on bone repair in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2014 Jun; 43 (6): 769-76.

Carvalho EN, Carvalho NAS, Ferreira LM. Experimental model of induction of diabetes mellitus in rats. *Acta Cir Bras* 2003; 18: 60-4.

Chalas R, Rudzka O, Wójcik-Chęcińska I, Vodanović M. The impact of type 1 diabetes on the development of the craniofacial mineralized tissues (bones and teeth): literature review. *Folia Morphol (Warsz)* 2016; 75(3):275-280.

Cheung WH, Chin WC, Qin L, Leung KS. Low Intensity Pulsed Ultrasound Enhances Fracture Healing in Both Ovariectomy-Induced Osteoporotic and Age-Matched Normal Bones. *J Orthop Res* 2012 Jan; 30 (1):129-36.

Claes L, Willie B. The enhancement of bone regeneration by ultrasound. *Prog Biophys Mol Biol* 2007 Jan-Apr; 93(1-3):384-98.

Coords M, Breitbart E, Paglia D, et al. The Effects of Low-Intensity Pulsed Ultrasound Upon Diabetic Fracture Healing. *J Orthop Res* 2011 Feb; 29(2):181-8.

Cowin, C. Bone mechanics handbook. CRC press, 2001.

Dall'Ago P, Silva VO, De Angelis KL, Irigoyen MC, Fazan R Jr, Salgado HC. Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin diabetic rats. *Braz J Med Biol Res* 2002 Jul; 35(7):843-9.

Dukic W, B Delija, Derossi D, Dadic I. Radiopacidade de materiais dentários compostos usando um sistema de raios-X digital. *Dent Mater J* 2012; 31: 47–53.

Einhorn, T. A. et al. The mineral and mechanical properties of bone in chronic experimental diabetes. *J Orthop Res* 1988. v. 6, n. 3, p. 317-23.

El-Mowafi H, Mohsen M. The effect of low-intensity pulsed ultrasound on callus maturation in tibial distraction osteogenesis. *Int Orthop* 2005 Apr; 29(2):121-4.

Erdal N, Gürgül S, Kavak S, Yildiz A, Emre M. Deterioration of Bone Quality by Streptozotocin (STZ)-Induced Type 2 Diabetes Mellitus in Rats. *Biol Trace Elem Res* 2011, v. 140, p. 342–353.

Findik Y, Baykul T. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on autogenous bone graft healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2014 Mar; 117(3):e255-60.

Funk JR, Hale JE, Carmines D, et al. Biomechanical evaluation of early fracture healing in normal and diabetic rats. *Journal of Orthopaedic Research* 2000. v. 18, n. 1, p. 126-132.

Furman, BL. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Curr Protoc Pharmacol* 2015. 70:5.47.1-5.47.20. doi:10.1002/0471141755.ph0547s70.

Gaston MS, Simpson AH. Inhibition of fracture healing. *J Bone Joint Surg Br* 2007 Dec; 89(12):1553-60.

Gebauer GP, Lin SS, Beam HA, Vieira P, Parsons JR. Low-intensity pulsed ultrasound increases the fracture callus strength in diabetic BB Wistar rats but does not affect cellular proliferation. *J Orthop Res* 2002 May; 20(3):587-92.

Hadjiargyrou M, McLeod K, Ryaby JP, Rubin C. Enhancement of fracture healing by low intensity ultrasound. *Clin Orthop Relat Res* 1998 Oct;(355 Suppl):S216-29.

Hart, K. J. et al. Swim-trained rats have greater bone mass, density, strength, and dynamics. *J Appl Physiol*, v. 91, p. 1663-8, 2001.

Jingushi S, Mizuno K, Matsushita T, Itoman M. Low-intensity pulsed ultrasound treatment for postoperative delayed union or nonunion of long bone fractures. *J Orthop Sci* 2007 Jan;12(1):35-41.

Kagel EM, Einhorn T A. Alterations of fracture healing in the diabetic condition. *Iowa Orthop J* 1996. v. 16, p. 147.

Kayal RA, Alblowi J, McKenzie E., et al. Diabetes causes the accelerated loss of cartilage during fracture repair which is reversed by insulin treatment. *Bone* 2009. 44(2), 357-363.

Kemink, SA. et al. Osteopenia in insulin-dependent diabetes mellitus: Prevalence and aspects of pathophysiology. *J Endocrinol Invest* 2000, v. 23, p. 295–303.

Ko KI, Coimbra LS, Tian C, et al. Diabetes reduces mesenchymal stem cells in fracture healing through a TNF α -mediated mechanism. *Diabetologia* 2015 Mar; 58(3):633-642.

Kobayashi Y, Sakai D, T Iwashina, Iwabuchi S, Mochida J. Low-intensity pulsed ultrasound stimulates cell proliferation, proteoglycan synthesis and expression of growth factor-related genes in human nucleus pulposus cell. *Eur Cell Mater* 2009.17 (3): 15-22.

Leung KS, Lee WS, Cheung WH, Qin L. Lack of efficacy of low-intensity pulsed ultrasound on prevention of postmenopausal bone loss evaluated at the distal radius in older Chinese women. *Clin Orthop Relat Res* 2004 Oct;(427):234-40.

Louzada MJQ, et al. Densitometria óptica radiográfica em análise da densidade óssea em mandíbulas de coelhos castrados. *Rev Fac Odontol Lins* 2001, v. 13, n. 1, p. 33-8.

Machado LHA, et al. Avaliação da reabsorção óssea de membros torácicos pela técnica de densitometria óptica em imagens radiográficas no hiperparatireoidismo renal canino. *Vet Zootec* 2009, v. 16, n. 2, p. 325-34.

Machwate M, Zerath E, Holy X, Pastoureau P, Marie PJ. Insulin-like growth factor-I increases trabecular bone formation and osteoblastic cell proliferation in unloaded rats. *Endocrinology* 1994. v. 134, n. 3, p. 1031-1038.

McCabe LR. Understanding the pathology and mechanisms of type I diabetic bone loss. *J Cell Biochem* 2007, v. 102, p. 1343-57.

Napoli N, Chandran M, Pierroz DD, et al. Mechanisms of diabetes mellitus-induced bone fragility. *Nat Rev Endocrinol* 2017. Apr; 13(4):208-219.

Padilla, F., Puts, R., Vico, L., Raum, K. Stimulation of bone repair with ultrasound: a review of the possible mechanic effects. *Ultrasonics* v. 54, n. 5, p. 1125-1145, 2014.

Padula EDO, Andrade ML, Giordano V, Ramalho MV. Aspectos morfológicos do processo de consolidação de fratura em ratos diabéticos. *Rev Bras Ortop* 2003, v. 38, n. 3, p. 127-36.

Patrocínio-Silva TL, Souza AM, Goulart RL, Pegorari CF, Oliveira JR, Fernandes KR *et al.* Low-level laser therapy associated to a resistance training protocol on bone tissue in diabetic rats. *Arch Endocrinol Metab* 2016 Oct; 60(5):457-464.

Picke AK, et al. Bone defect regeneration and cortical bone parameters of type 2 diabetic rats are improved by insulin therapy. *Bone* 2016. v. 82, p. 108-115.

Prisby RD, Swift JM, Bloomfield SA, Hogan HA, Delp MD. Altered bone mass, geometry and mechanical properties during the development and progression of type 2 diabetes in the Zucker diabetic fatty rat. *J Endocrinol* 2008 Dec; 199(3):379-88.

Rawool NM, Goldberg BB, Forsberg F, Winder AA, Hume E. Power Doppler assessment of vascular changes during fracture treatment with low-intensity ultrasound. *J Ultrasound Med* 2003 Feb; 22(2):145-53.

Reddy, G. K., Stehno-Bittel, L., Hamade, S., & Enwemeka, C. S. The biomechanical integrity of bone in experimental diabetes. *Diabetes research and clinical practice* 2001, v. 54, n. 1, p. 1-8.

Rocha RE, Coelho I, Pequito DC, *et al.* Interval training attenuates the metabolic disturbances in type 1 diabetes rat model. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2013 Nov; 57(8):594-602.

Russo, C. R. The effects of exercise on bone. Basic concepts and implications for the prevention of fractures. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, v. 6, p. 223-228, 2009.

Singh V. Medicinal plants and bone healing. *Natl J Maxillofac Surg.* 2017 Jan-Jun; 8(1):4-11.

Sundararaghavan V, Mazur MM, Evans B, Liu J, Ebraheim NA. Diabetes and bone health: latest evidence and clinical implications. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2017. Mar; 9(3):67-74.

Verhaeghe, J. et al. Bone and mineral metabolism in BB rats with long-term diabetes: Decreased bone turnover and osteoporosis. *Diabetes* 1990, v. 39, p. 477-482.

Yan W, Li X. Impact of diabetes and its treatments on skeletal disease. *Front Med* 2013 Mar; 7(1):81-90.

Tabela 1: Acompanhamento dos índices glicêmico por grupos durante a Pré-indução, 1º semana e 6º semana Pós-indução.

GRUPOS	PRÉ-INDUÇÃO	1ª SEMANA	6ª SEMANA
GCP	92,06 ± 16,33 (89,00)	89,33 ± 9,62 (89,50)	79,94 ± 12,22 (83,00)
GCU	90,80 ± 10,31 (90,50)	88,00 ± 17,32 (83,00)	87,15 ± 13,82 (88,50)
GDP	105,64 ± 30,66 (103,00)	295,64 ± 154,70 (320,00) ^A	454,82 ± 86,68 (424,00) ^A
GDU	98,80 ± 12,24 (100,00)	364,60 ± 71,97 (366,00) ^B	381,67 ± 86,73 (404,00) ^B

Dados expressos em média ± desvio padrão (mediana). Diferença significativa ao nível de 5,0%. GCP (Grupo Controle Placebo), GCU (Grupo Controle Ultrassom), GDP (Grupo Diabético Placebo), GDU (Grupo Diabético Ultrassom). Análise através do Teste Kruskal-Wallis com comparações múltiplas do referido teste (Pré-indução) e teste F(ANOVA) com comparações múltiplas de Tamhane's no caso de diferença significativa (1º e 6º semanas). GDP X GCP (A) p<0,001; GDU X GCU (B) p< 0,001.

Tabela 2 – Valores da DMO por grupo

GRUPOS	DMO [Média ± DP (Mediana)]
GCP	2,38 ± 0,88 (2,28)
GCU	2,34 ± 0,87 (2,39)
GDP	2,56 ± 0,77 (2,69)
GDU	2,50 ± 0,69 (2,72)
Valor de p	p > 0,05

Diferença significativa ao nível de 5,0%. GCP (Grupo Controle Placebo), GCU (Grupo Controle Ultrassom), GDP (Grupo Diabético Placebo), GDU (Grupo Diabético Ultrassom). Análise através do teste F(ANOVA) com comparações múltiplas de Tamhane's.

Tabela 3. Parâmetros do ensaio mecânico por grupo

GUPOS	ÁREA DE SECÇÃO TRANSVERSA	FORÇA MÁXIMA	TENSÃO MÁXIMA	DEFORMAÇÃO MÁXIMA	MÓDULO ELÁSTICO
GCP	59,77 ± 17,93 (60,00)	44,81 ± 18,58 (49,56)	0,75 ± 0,22 (0,80)	42,54 ± 36,24 (33,47)	2,02 ± 0,95 (2,45)
GCU	61,79 ± 9,04 (59,00)	38,93 ± 15,81 (39,44)	0,63 ± 0,28 (0,65)	52,08 ± 34,74 (40,81)	2,01 ± 0,76 (1,91)
GDP	47,00 ± 25,28 (42,00)	30,14 ± 21,38 (19,59)	0,75 ± 0,61 (0,46)	90,46 ± 43,54 (86,50)	1,45 ± 1,58 (0,97)
GDU	44,00 ± 15,87 (36,50) ^(B)	45,87 ± 11,98 (45,64)	1,22 ± 0,63 (1,13) ^(A)	108,66 ± 52,65 (93,33) ^(B)	2,28 ± 1,22 (1,97)

Dados em Média ± DP (Mediana). Diferença significativa ao nível de 5,0%. GCP (Grupo Controle Placebo), GCU (Grupo Controle Ultrassom), GDP (Grupo Diabético Placebo), GDU (Grupo Diabético Ultrassom). Análise através do teste Kruskal Wallis com comparações múltiplas do referido teste ^(A) GDU x GDP, p< 0,032; ^(B) GDU x GCU, p< 0,001.

4.2 ARTIGO ORIGINAL 2

USO COMBINADO DE TERAPIA COM CÉLULAS MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA E ULTRASSOM DE BAIXA INTENSIDADE NO PROCESSO DE REPARAÇÃO DA FRATURA ABERTA DO FÊMUR DE RATOS DIABÉTICOS

Cybelle da Silva Nery¹ *; Victor Franklyn de Oliveira²; Sara Emanuely Veríssimo Santos²; Tamires Nascimento²; Ingrid Mariane de Freitas Santo²; Héli da Cristina Cirilo da Silva²; Wyndly Daniel Cardoso Gaião³; Magno Felipe Holanda Barboza Inácio Teixeira⁴; José Lamartine de Andrade Aguiar⁵; Maria Luiza dos Anjos Pontual⁶; Silvia Regina Arruda de Moraes⁷

¹Programa de Pós-graduação em Biotecnologia/ RENORBIO; Laboratório de Plasticidade Neuromuscular – LAPLAN, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

² Estudante de Fisioterapia, Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

³Laboratório de Biofísica de membranas e células-tronco Dr. Oleg Krasilnikov/ LBM-CT; Departamento de Biofísica, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

⁴Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

⁵Departamento de Cirurgia, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

⁶Departamento de Odontologia, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

⁷Departamento de Anatomia, Laboratório de Plasticidade Neuromuscular – LAPLAN, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

*AUTHOR FOR CORRESPONDENCE:

Cybelle da Silva Nery

Rua Jonathas de Vasconcelos, 750

51021-140 Recife PE – Brazil

Cell phone +55 (81) 99956-1646

E-mail address: cybellesnery@gmail.com (NERY CS)

Laboratory of Neuromuscular Plasticity – LAPLAN

Resumo

Objetivo: avaliar o efeito da terapia com células mesenquimais da medula óssea (CTMs-MO) associado com ultrassom (US) sobre peso, glicemia, densidade mineral óssea (DMO) e biomecânicos. 53 ratos da linhagem *Wistar*, foram distribuídos em seis grupos: Grupo Controle Placebo (GCP, n=11), Grupo Diabético Placebo (GDP, n=11), Grupo Controle Terapia Celular (GCTcP, n=7), Grupo Diabético Terapia Celular (GDTcP, n=8), Grupo Controle Terapia Celular e Ultrassom (GCTcU, n=8) e Grupo Diabético Terapia Celular e Ultrassom (GDTcU, n=8). Aos 60 dias de vida os animais foram induzidos ao diabetes experimental por Estreptozotocina; intraperitoneal; 60mg/Kg) e aos 74dias, foi realizada uma fratura aberta do fêmur direito. Nos grupos com terapia celular (GCTcP, GCTcU, GDTcP e GDTcU) uma suspensão de células foi administrada no interior do canal medular do fêmur, após a promoção da fratura. Do primeiro até o 24° dia pós-cirúrgico, foi iniciado, nos grupos que realizaram o tratamento com ultrassom, a aplicação do ultrassom terapêutico (SONOPULSE- Ibramed), sete vezes/semana, 20 minutos/dia, com frequência de 1MHz, frequência de repetição de pulso de 100Hz, duração de pulso de 2ms - razão de 1:5, ciclo de trabalho de 20% e intensidade de 0,5 w/cm². Após o término do protocolo, os animais foram eutanasiados e os fêmures coletados para análise da densidade mineral óssea e ensaio biomecânico de flexão em três pontos onde foram avaliados a área de secção transversa (AST), força máxima, tensão máxima, deformação máxima e módulo elástico. O peso corporal e glicemia foram aferidos semanalmente para acompanhamento. Estes não apresentaram diferenças entre os grupos no período pré-indução. Na primeira e sexta semana após a indução do diabetes, os animais dos grupos diabéticos apresentaram pesos corporais inferiores e índices glicêmicos superiores quando comparados aos animais dos grupos controles ($p < 0,05$). A DMO apresentou valores aumentados nos animais dos grupos (GCTcP, GDTcP, GCTcU e GDTcU) quando comparados aos seus respectivos controles (GCP- $p = 0,002$ e GDP- $p < 0,001$). Quanto aos parâmetros biomecânicos, não houve diferença na força máxima ($p > 0,05$). No entanto, foi observada um aumento na AST ($p < 0,001$) e redução na tensão máxima ($p \leq 0,03$) e no módulo elástico ($p = 0,041$) nos fêmures dos animais do GCTcP e GDTcP em relação aos seus controles (GCP e GDP) e redução da deformação máxima de GCTcP, GDTcP, GCTcU e GDTcU quando comparados com os seus controles (GCP e GDP). Conclui-se que o uso combinado da terapia CTMs-MO com a terapia US

mostrou-se útil em promover um aumento da DMO dos fêmures supondo início de reparo ósseo. Entretanto, em relação aos parâmetros biomecânicos avaliados não foram observadas diferenças entre os grupos com associação de ambas as terapias.

Palavras chaves: Diabetes *Mellitus*. Fêmur. Fratura. Parâmetros biomecânicos. Ratos. Células-tronco mesenquimais. Ultrassom.

INTRODUÇÃO

O Diabetes *Mellitus* (DM) é uma desordem metabólica caracterizada por distúrbio no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos como resultado da deficiência absoluta ou relativa de insulina gerando um quadro de hiperglicemia (DINIZ *et al.*, 2008; DeFRONZO *et al.*, 2015) favorecendo a instalação de complicações crônicas (BJERG *et al.*, 2018), dentre elas, comprometimento do aparelho locomotor, contribuindo para um declínio do estado geral de saúde, pelas rupturas nas estruturas osteomiotendínea e osteopenia óssea (AKTURK *et al.*, 2002; AKTURK *et al.*, 2007; LIAO *et al.*, 2014; JACKULIAK *et al.*, 2014).

Muitos mecanismos têm sido sugeridos para explicar a osteopenia associada ao diabetes, dentre eles mudanças na sinalização celular causadas pela hiperglicemia, inflamação associada ao diabetes, alterações nos fatores de crescimento e hormônios endócrinos circulantes, maior estresse oxidativo e morte celular elevada (KAYAL *et al.*, 2009; McCABE, 2007; KEMINK *et al.*, 2000).

Clinicamente há indícios que a redução na massa óssea observada no diabetes promove retardo na cicatrização de fratura (LODER, 1988). Além disso, o diabetes induzido experimentalmente por estreptozotocina compromete a cicatrização de fratura (MACEY *et al.*, 1989) e causa retardo na recuperação da força estrutural e material em fêmures com fraturas cicatrizadas em ratos (FUNK *et al.*, 2000).

Evidências apontam que o ultrassom pulsado de baixa intensidade é capaz de acelerar o processo de cicatrização de fraturas agindo nas reações celulares envolvidas em todas as etapas deste processo (AZUMA *et al.*, 2001); atuar nas vias envolvidas na síntese de DNA de certos tipos de células como osteoblastos e fibroblastos (ZHOU *et al.*, 2004); e promover a expressão de genes críticos e proteínas relacionadas com a cicatrização de fraturas, tais como agrecana, IGF, e

TGF- β , este último um importante fator de crescimento ósseo que estimula a atividade osteoblástica e aumenta a formação de matriz óssea (RUBIN *et al.*, 2001; ZIMMERMANN *et al.*, 2005). Além disso, o ultrassom, *in vitro*, é capaz de promover a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em condrócitos e estimular a produção de matriz extracelular (NISHIKORI *et al.*, 2002).

Atualmente, várias estratégias terapêuticas estão sendo testadas na tentativa de beneficiar o processo de cicatrização de fraturas em situações onde este processo é prejudicado ou não ocorre de forma apropriada, como no caso do diabetes. No entanto, até o presente momento, não há relatos de estudos que tenham associado a utilização do ultrassom pulsado de baixa intensidade com a terapia celular com células mesenquimais derivadas da medula óssea (CTMs-MO) com o intuito de promover melhor cicatrização de fraturas no estado diabético. Desta maneira, a proposta do presente estudo foi avaliar o efeito combinado do ultrassom pulsado de baixa intensidade e da CTMs-MO sobre o processo de cicatrização de fratura de fêmur em ratos diabéticos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Local do Estudo

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Plasticidade Neuromuscular (Departamento de Anatomia - UFPE), no Laboratório de biofísica de membranas e células-tronco Dr. Oleg Krasilnikov (Departamento de Biofísica-UFPE), Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Renal e Laboratório de Fisiopatologia Renal (Departamento de Fisiologia- UFPE), Laboratório de Radiologia Odontológica (Departamento de Odontologia- UFPE) e Laboratório de Engenharia Química (Departamento de Engenharia Química – UFPE). O estudo foi aprovado na Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEa-UFPE), processo nº 23076.031594/2016-98.

Amostra/Grupos Experimentais

A amostra foi composta por 53 ratos machos da raça *Rattus Novergicus Albinus*, da linhagem *Wistar*, com idade de 60 dias de vida, mantidos em gaiolas, ciclo de luz invertido claro/escuro de 12 horas e temperatura de 23° $\pm$ 1°C no biotério

do Departamento de Anatomia - UFPE. Os ratos receberam uma dieta através de ração apropriada (Presence® - Purina) e água *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos: Grupo Controle Placebo (GCP, n=11), animais saudáveis submetidos à fratura aberta de fêmur e tratados com o ultrassom desligado; Grupo Diabético Placebo (GDP, n=11), animais diabéticos submetidos à fratura aberta de fêmur e tratados com o ultrassom desligado; Grupo Controle Terapia Celular (GCTcP, n=7), animais saudáveis submetidos à fratura aberta de fêmur, tratados com células mesenquimais e tratados com o ultrassom desligado; Grupo Diabético Terapia Celular (GDTcP, n=8), animais diabéticos submetidos à fratura aberta de fêmur e tratados com células mesenquimais e com ultrassom desligado; Grupo Controle Terapia Celular e Ultrassom (GCTcU, n=8), animais saudáveis submetidos à fratura aberta de fêmur e tratados com células mesenquimais e com ultrassom e Grupo Diabético Terapia Celular e Ultrassom (GDTcU, n=8), animais diabéticos submetidos à fratura aberta de fêmur e tratados com células mesenquimais e com ultrassom.

Indução ao Diabetes e avaliação clínica

Aos 60 dias de vida, após jejum de 12h, os animais dos grupos diabéticos (GDP, GDTcP, GDTcU), foram induzidos ao diabetes pela administração única, via intraperitoneal, de uma solução de Estreptozotocina (STZ- Shimadzu®), diluída em tampão citrato de sódio a 10mM e pH 4,5, na dose de 60mg/kg de peso do animal. Os animais dos grupos não diabéticos receberam doses equivalentes da solução tampão citrato de sódio objetivando o nivelamento do estresse físico ofertado para os grupos diabéticos. Ao final de 30 minutos após o tratamento os animais puderam alimentar-se normalmente (DALL'AGO et al., 2002).

Antes da indução ao diabetes, foi realizada a verificação da glicose sanguínea (Glicosímetro Kit Accu-Chek Active) após jejum de 12h. Ao terceiro e sétimo dias após a indução, a glicose também foi verificada, com o intuito de confirmar a instalação do diabetes, sendo considerados diabéticos os animais que apresentaram glicemia superior a 200 mg/dL (CARVALHO et al., 2003). A partir daí a glicose sanguínea foi dosada semanalmente até o fim do experimento a partir da coleta de uma gota de sangue na ponta da cauda do animal através de um glicosímetro Accu-Chek Active. Foi também realizado o acompanhamento do peso corpóreo (balança

digital - FILIZOLA, modelo BP6), três vezes por semana, a partir da indução ao diabetes até o último dia do experimento.

Protocolo de fratura do fêmur e medicamentoso

Todos os animais, duas semanas após a indução, com idade ± 74 dias de vida, foram submetidos a uma fratura aberta do fêmur direito. Para isso, os animais receberam: analgésico (Cloridrato de Tramadol-50mg/ml), via subcutânea, em uma dose de 100mg/ Kg de peso do animal diluído em soro fisiológico 0,9%, em uma proporção de 1:1, 30 minutos antes da cirurgia, 12/12h por 72h no pós-cirúrgico imediato; antibiótico (Enrofloxacina), via subcutânea, administrada em uma dose de 5mg/Kg de peso do animal, logo após a cirurgia, de 24/24h por 4 dias; anti-inflamatório (Meloxicam), via subcutânea, em uma dose de 0,1ml/Kg de peso do animal, logo após a cirurgia e de 24/24h durante 2 dias pós-cirúrgico.

A anestesia dos animais foi realizada com uma solução, via intramuscular, de cloridrato de xilazina a 2% (20 mg, Rompum® – Bayer) e Cloridrato de Ketamina a 10% (50 mg, Ketalar®) em uma quantidade de 0,2 ml da solução para cada 100g de peso do animal. Uma vez anestesiados, os animais foram posicionados em decúbito dorsal na mesa cirúrgica, com o membro posterior direito em extensão. Foi realizada tricotomia póstero-lateral na coxa e joelho direito, assepsia de todo o membro posterior direito, colocação dos campos cirúrgicos estéreis, e iniciados os seguintes procedimentos: incisão de aproximadamente 3 cm longitudinal da coxa até o joelho direito; dissecação por planos e disjunção muscular até ser visualizada a diáfise femoral direita; introdução horizontal da serra de Gigli (30cm em aço inoxidável especial Style, C.Brasil) ao redor do fêmur no meio da diáfise, a partir da qual o fêmur é serrado até produzir fratura transversa completa do fêmur.

Após a fratura, foi realizado um desvio longitudinal para introdução de um fio de Kirschner de 1,0 mm de diâmetro longitudinalmente ao longo do canal medular do fêmur até o trocanter maior, para simulação de uma haste intramedular. A sutura do músculo vasto lateral e da pele foi feita com fio de nylon 4-0. Após os procedimentos cirúrgicos, ainda anestesiados, os ratos foram submetidos a uma dose única, de anestésico (Fentanila 0,5ml/1000g de peso do animal), intramuscular.

Protocolo da Terapia com Células-tronco Mesenquimais da Medula Óssea (CTMs-MO)

Para a obtenção das células mesenquimais da medula óssea foram utilizados 3 ratos machos, albinos, *Wistar* e adultos. Os animais doadores foram anestesiados com uma solução de cloridrato de xilazina a 2% (20 mg, Rompum® – Bayer) e Cloridrato de Ketamina (50 mg, Ketalar®) por via intramuscular, em uma quantidade de 0,2 ml da solução para cada 100 g de peso corporal do animal. Após a anestesia, os animais foram eutanasiados com injeção de 1mL de cloreto de potássio (KCl) intracardiaca. Para cada animal foi realizada assepsia com álcool 70% e sob fluxo laminar, onde os ossos longos, fêmures foram dissecados até ficarem livres de tecidos.

Em seguida as epífises serão removidas e a medula óssea aspirada com seringa descartável de 3ml, contendo solução salina estéril e heparina. À suspensão obtida será mantida em tubo Falcon 50ml, seguida de centrifugação a 1200 rpm por 30 minutos, desta forma promovendo o isolamento das células mesenquimais por gradiente de ficol. Em continuidade, foi ajustado o volume de células mesenquimais para 40 ml com solução salina estéril e em seguida centrifugação a 1800 rpm, por 10 minutos.

Ao final, ao precipitado que correspondia às células da fração mesenquimal foi acrescentado o meio de cultura (DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino, GIBCO/BRL) adicionado de 100 unidades/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina. As células foram contadas em câmara de Neubauer, obtendo-se uma média de 11×10^6 células por animal. Em seguida foram ajustadas para 5×10^6 células/ml e então introduzidas nos animais de acordo com o grupo de estudo. De acordo com o grupo de estudo, a suspensão de células (células mesenquimais, meio de cultura e matrigel) foi administrada no interior do canal medular do fêmur, imediatamente após da promoção da fratura.

Tratamento com ultrassom pulsado (US)

Um dia após a realização da fratura foi dado início ao protocolo de tratamento com o ultrassom pulsado. O tratamento foi realizado diariamente do 1º ao 24º dia após a fratura, e o tempo diário de aplicação foi de 20 minutos, 7 vezes por semana (AZUMA et al., 2001).

Os animais foram imobilizados manualmente durante o tratamento com ultrassom. Com a pata posterior direita tricotomizada, era aplicado o gel (RMC® gel) para contato e então iniciava-se a terapia. Para os animais dos grupos sem tratamento (GCP e GDP), eram utilizados os mesmos procedimentos, porém o aparelho estava desligado caracterizando o efeito placebo.

O equipamento de ultrassom utilizado foi o SONOPULSE (Ibramed), com cabeçote de aplicação com área efetiva de aplicação com 1cm², programável para uso na modalidade pulsado, com frequência de 1MHz, frequência de repetição de pulso de 100Hz, duração de pulso de 2ms - razão de 1:5, ciclo de trabalho de 20% e intensidade de 0,5 w/cm² (BABUCCU et al., 2014).

Eutanásia e coleta do material

No 25º dia após a fratura do fêmur, os animais de todos os grupos foram eutanasiados com solução de Xilazina (Rompum® - Bayer) (10mg/Kg) e Cloridrato de Ketamina (Ketalar®) (25mg/kg), 0,10 ml para cada 100g de peso e tiveram seus fêmures direitos desarticulados e dissecados, cuidadosamente para não danificar o local de formação do calo ósseo. Os fêmures foram encaminhados para a análise densitométrica.

Obtenção das imagens radiográficas digitais

Para cada fêmur direito de cada animal, foi obtida uma imagem radiográfica digital com uma escala de densidade de 1 mm de alumínio de incremento de dez graus e uma lâmina de chumbo. Para obtenção dessas imagens, foi utilizado o aparelho de raios X periapical Heliodent Plus® (Sirona, Dental Systems NY, EUA) operando a 70Kvp, 10mA, tempo de exposição de 0,03s. A distância foco-receptor de 30cm foi padronizada por meio de uma plataforma de acrílico. O receptor de imagem utilizado foi do tipo CCD (Charge-Coupled Device), com o sistema direto RVG 6100 (Carestream®, Nova York, EUA) e o programa Dental Imaging Software®. Os arquivos foram exportados e salvos no formato TIFF (LOUZADA *et al.*, 2001; MACHADO *et al.*, 2009; DUKIC *et al.*, 2012) .

Avaliação da densidade mineral óssea (DMO) em mm/AL

As imagens foram importadas e abertas no programa image J. Neste programa, foi mensurado com a ferramenta histograma os valores de pixel dos

degraus da escala de densidade, do valor da lâmina de chumbo (valor 255) e o valor do tom de cinza da diáfise média do fêmur do animal. Para cada animal, foi aberta uma planilha no programa Excell (versão 2013), no qual foi possível construir um gráfico do inverso do valor de cinza X degrau em mm/AL e então escolhida uma equação na qual o valor de R2 fosse mais próximo de 1. A partir desta fórmula, foi possível converter o valor de cinza da diáfise média do fêmur do rato em mm/Al (LOUZADA *et al.*, 2001; MACHADO *et al.*, 2009; DUKIC *et al.*, 2012) .

Análise biomecânica

Para a avaliação biomecânica, o fêmur foi colocado na máquina de ensaio mecânico convencional (EMIC modelo DL500) com célula de carga de 500N (Newton) e submetido ao ensaio mecânico de flexão em três pontos. Para tanto, o fêmur foi posicionado entre dois pinos de apoio, afastados de 15 mm (PRISBY *et al.*, 2008), e um pino de metal superior, que exerce a pressão, foi posicionado no meio da diáfise do fêmur. A partir daí ocorreu o ensaio mecânico de flexão em três pontos, com a força aplicada a uma velocidade de 0,5 mm/min e registrada automaticamente por um software acoplado à máquina. Foram avaliados os seguintes parâmetros biomecânicos: área de secção transversa (AST) (mm), módulo elástico (Mpa), tensão máxima (N), força máxima (Mpa) e deformação máxima (mm).

Análise estatística

Os dados estão expressos através de média, desvio padrão ($\pm$ DP) e mediana e foram analisadas inferencialmente através dos testes estatísticos. As verificações das hipóteses de normalidade e de igualdade de variâncias foram através dos testes respectivos de Shapiro-Wilk e F de Levene. Para a comparação entre mais de dois grupos foi utilizado os testes F (ANOVA) ou Kruskal-Wallis e para a comparação entre dois grupos foi utilizado o teste t-Student com variâncias iguais, t-Student com variâncias desiguais ou Mann-Whitney. No caso de diferença significativa pelo teste F (ANOVA) foram utilizados testes de comparações de Tukey se foi verificada igualdade de variâncias e Tamhane se a hipótese de igualdade de variâncias é rejeitada. No caso de diferença significativa pelo teste de Kruskal-Wallis foram utilizadas comparações do referido teste. A margem de erro utilizada na decisão dos testes estatísticos foi de 5%. O programa utilizado para obtenção dos cálculos estatísticos foi o IMB SPSS na versão 23.

RESULTADOS

Durante todo o experimento foram registradas as seguintes perdas amostrais: GCP-11, GDP-12, GCTcP-8, GCTcU-2, GDTcP-4 e GDTcU-4 animais, decorrentes de não instalação DM experimental, complicações tais como dor pós-cirúrgica não sanada com o protocolo medicamentoso, feridas expostas que levassem sofrimento ao animal e consolidação viciosa da fratura.

Avaliação clínica

A evolução ponderal dos animais encontra-se representada na Tabela 1. Não foram observadas diferenças entre os grupos no período pré-indução. A partir da primeira semana após a indução do diabetes, os animais dos grupos diabéticos apresentaram pesos corporais inferiores aos animais dos grupos controles ($p \leq 0,03$), e essas diferenças se mantiveram até o final do estudo (6° semana).

Tabela 1: Peso corpóreo por grupos durante a Pré-indução e 1° semana e 6° semana da Pós-indução.

GRUPOS		PRÉ-INDUÇÃO	PÓS-INDUÇÃO	
			1° SEMANA	6° SEMANA
Controle	Placebo	239,12 ± 43,73 (236,00)	274,76 ± 45,63 (272,00) ^(a)	314,88 ± 45,53 (319,00) ^(a)
	Ultrassom	245,19 ± 37,56 (246,00)	279,37 ± 39,11 (284,00) ^(b)	316,93 ± 39,79 (322,00) ^(b)
Diabético	Placebo	234,40 ± 29,02 (230,00)	249,05 ± 29,61 (245,00) ^(a)	263,05 ± 24,01 (264,50) ^(a)
	Ultrassom	233,52 ± 31,15 (228,00)	230,88 ± 29,57 (226,00) ^(b)	244,32 ± 39,33 (246,00) ^(b)
Valor de p		$p > 0,231$	$p \leq 0,03$	$p < 0,001$

Diferença significativa ao nível de 5,0%. Valores expressos em [Média ± DP (Mediana)]. Análise intergrupo: Grupos Placebo (GCP, GDP, GCTcP, GDTcP) x Grupos Ultrassom (GCTcU e GDTcU). Teste t-Student com variâncias iguais, teste t-Student com variâncias desiguais e teste Mann-Whitney. (a) Grupo Diabético Placebo x Grupo Controle Placebo; (b) Grupo Diabético Ultrassom x Grupo Controle Ultrassom.

O acompanhamento glicêmico dos animais encontra-se representada na Tabela 2. Não foram observadas diferenças entre os grupos no período pré-indução. Porém, após a indução ao diabetes, os níveis glicêmicos dos animais de todos os grupos diabéticos apresentaram-se aumentados ao longo de todo o período experimental, observados na 1° semana e 6° semana pós- indução ($p < 0,001$).

Tabela 2: Índices glicêmico por grupos durante a Pré-indução, 1º semana e 6º semana Pós-indução.

GRUPOS	PRÉ-INDUÇÃO	PÓS-INDUÇÃO	
		1º SEMANA	6º SEMANA
GCP	92,06 ± 16,33 (89,00)	89,33 ± 9,62 (89,50) ^(a)	79,94 ± 12,22 (83,00) ^(a)
GDP	105,64 ± 30,66 (103,00)	295,64 ± 154,70 (320,00) ^(a)	454,82 ± 86,68 (424,00) ^(a)
GCTcP	84,43 ± 13,60 (84,00)	86,14 ± 7,58 (82,00) ^(b)	80,86 ± 9,23 (79,00) ^(b)
GDTcP	100,38 ± 8,16 (102,00)	156,75 ± 64,89 (137,50) ^(b)	397,88 ± 45,52 (384,00) ^(b)
GCTcU	93,75 ± 12,44 (95,50)	91,25 ± 7,81 (94,50) ^(c)	91,63 ± 4,10 (93,00) ^(c)
GDTcU	97,88 ± 11,63 (97,00)	311,25 ± 132,64 (321,00) ^(c)	456,75 ± 59,80 (500,00) ^(c)
Valor de p		p> 0,05	p<0,001

Diferença significativa ao nível de 5,0%. Valores expressos em [Média ± DP (Mediana)]. GCP (Grupo Controle Placebo), GDP (Grupo Diabético Placebo), GCTcP (Grupo Controle Terapia Celular Placebo), GDTcP (Grupo Diabético Terapia Celular Placebo), GCTcU (Grupo Controle Terapia Celular Ultrassom), GDTcU (Grupo Diabético Terapia Celular Ultrassom). Teste F(ANOVA) com comparações múltiplas de Tamhane's e teste Kruskal Wallis com comparações múltiplas do referido teste. (a) GDP x GCP; (b)GDTcP x GCTcP; (c)GDTcU x GCTcU.

Análise da densitometria mineral óssea

Foi observada um aumento da DMO nos animais que fizeram uso da terapia CTMs-MO e US placebo (GCTcP x GCP- p=0,002; GDTcP x GDP- p<0,001) e dos animais com associação de terapia CTMs-MO e US quando comparados aos grupos sem terapia US (GCTcU x GCP- p=0,002; GDTcU x GDP- p<0,001) (Tabela 3).

Tabela 3: Dados da DMO em mmAl por grupos ao final do experimento

GRUPOS	DMO (mmAl)
GCP	2,38 ± 0,88 (2,28) ^{(a)(c)}
GDP	2,56 ± 0,77 (2,69) ^{(b)(d)}
GCTcP	3,66 ± 1,45 (3,87) ^(a)
GDTcP	4,28 ± 0,69 (4,38) ^(b)
GCTcU	4,12 ± 0,85 (4,28) ^(c)
GDTcU	4,25 ± 0,50 (4,23) ^(d)
Valor de p	p ^{(a)(c)} = 0,002; p ^{(b)(d)} < 0,001

Diferença significativa ao nível de 5,0%. Valores expressos em [Média ± DP (Mediana)]. GCP (Grupo Controle Placebo), GDP (Grupo Diabético Placebo), GCU (Grupo Controle Ultrassom), GDU (Grupo Diabético Ultrassom), GCTcP (Grupo Controle Terapia Celular Placebo), GDTcP (Grupo Diabético Terapia Celular Placebo), GCTcU (Grupo Controle Terapia Celular Ultrassom), GDTcU (Grupo Diabético Terapia Celular Ultrassom). Teste F (ANOVA) com comparações múltiplas de Tamhane's e teste Kruskal Wallis com comparações múltiplas do referido teste. (a)GCTcP x GCP; (b)GDTcP x GDP; (c)GCTcU x GCP; (d)GDTcU x GDP.

Efeito da terapia com CTMs-MO na resposta biomecânica do fêmur

Não foram constatadas diferenças na força máxima entre os grupos ($p>0,05$). No entanto, foi observada um aumento na AST ($p< 0,001$) e redução na tensão máxima ($p\leq 0,03$), deformação máxima ($p<0,001$) e módulo elástico ($p=0,041$) nos fêmures dos animais do GCTcP e GDTcP em comparação com os grupos GCP e GDP (Tabela 4).

Efeito combinado da terapia com CTMs-MO e do US de baixa intensidade na resposta biomecânica do fêmur

Os animais do GCTcU e GDTcU apresentaram valores reduzidos de deformação máxima quando comparados com os grupos GCP e GDP. Entretanto, não foram observadas diferenças na AST, força máxima, tensão máxima e módulo elástico entre os GCTcU e GDTcU e os demais grupos ($p>0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4: Valores dos parâmetros avaliados no ensaio biomecânico por grupo

Grupos	AST (mm)	Força Máxima (N)	Tensão Máxima (Mpa)	Deformidade Máxima (mm)	Módulo Elástico (Mpa)
GCP	59,77 ± 17,93 (60,00) ^(a)	44,81 ± 18,58 (49,56)	0,75 ± 0,22 (0,80) ^(a)	42,54 ± 36,24 (33,47) ^{(a)(c)}	2,02 ± 0,95 (2,45) ^(a)
GDP	47,00 ± 25,28 (42,00) ^(b)	30,14 ± 21,38 (19,59)	0,75 ± 0,61 (0,46)	90,46 ± 43,54 (86,50) ^{(b)(d)}	1,45 ± 1,58 (0,97)
GCTcP	106,74 ± 8,68 (101,15) ^(a)	53,30 ± 39,95 (34,31)	0,47 ± 0,47 (0,28) ^(a)	11,16 ± 2,89 (10,59) ^(a)	1,34 ± 2,67 (0,40) ^(a)
GDTcP	86,02 ± 23,26 (84,94) ^(b)	44,08 ± 15,61 (42,27)	0,50 ± 0,26 (0,52)	8,44 ± 1,72 (8,71) ^(b)	1,15 ± 0,67 (1,15)
GCTcU	95,60 ± 26,58 (103,41)	58,14 ± 34,49 (53,39)	0,48 ± 0,29 (0,43)	9,19 ± 3,29 (8,50) ^(c)	1,82 ± 1,29 (1,12)
GDTcU	74,04 ± 18,10 (72,37)	44,81 ± 12,44 (49,88)	0,63 ± 0,19 (0,67)	8,58 ± 1,11 (8,64) ^(d)	1,40 ± 0,78 (0,99)
Valor de p	$p< 0,001$	$p\leq 0,43$	$p\leq 0,03$	$p< 0,001$	$p=0,041$

Diferença significativa ao nível de 5,0%. Valores expressos em [Média ± DP (Mediana)]. GCP (Grupo Controle Placebo), GDP (Grupo Diabético Placebo), GCU (Grupo Controle Ultrassom), GDU (Grupo Diabético Ultrassom), GCTcP (Grupo Controle Terapia Celular Placebo), GDTcP (Grupo Diabético Terapia Celular Placebo), GCTcU (Grupo Controle Terapia Celular Ultrassom), GDTcU (Grupo Diabético Terapia Celular Ultrassom). Teste F(ANOVA) com comparações múltiplas de Tamhane's e teste Kruskal Wallis com comparações múltiplas do referido teste. (a) GCTcP x GCP; (b) GDTcP x GDP; (c) GCTcU x GCP; (d) GDTcU x GDP.

DISCUSSÃO

O presente estudo, usando o uso combinado da terapia CTMs-MO e / ou terapia US no reparo ósseo da fratura de fêmur em animais com e sem DM, mostrou uma diminuição no peso corporal e da glicemia na primeira e sexta semanas pós-

indução nos grupos diabéticos; um aumento da DMO nos animais dos grupos diabéticos e controles que fizeram uso da terapia CTMs-MO com ou sem terapia US; e alterações na AST, tensão máxima, deformação máxima e módulo elástico nos animais dos grupos diabéticos e/ou controles que fizeram uso da terapia CTMs-MO com ou sem terapia US. No entanto, não houve diferença na força máxima nos fêmures entre os grupos.

Os pesos corporais dos animais diabéticos mostraram-se inferiores, a partir da primeira semana após a indução do diabetes até o final do período experimental, em comparação aos pesos dos animais controles. Estes resultados corroboram os achados de outros estudos (SILVA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2012; BORTOLIN et al., 2015; DONMEZ et al., 2016) que atestaram os efeitos deletérios do diabetes sobre o ganho ponderal de animais diabéticos. Estes efeitos podem estar relacionados ao déficit de fatores de crescimento como o IGF-1 (VERHAEGHE et al., 2000) e ao aumento da proteólise e lipólise, alterações características que o estado diabético promove no metabolismo de carboidratos e proteínas do músculo esquelético tendo como consequência a perda de peso do animal e disfunções no catabolismo ósseo (KIMBALL; VARY; JEFFERSON, 1994; BASSO et al., 2005, CAO, 2011, DEVLIN E ROSEN, 2015, KOMORI, 2015).

Na avaliação glicêmica, não houve diferenças entre os grupos durante a pré-indução constatando uma homogeneidade entre os animais no diferentes grupos. No período pós- indução até o fim do experimento, os animais dos grupos diabéticos apresentaram glicemias > 200mg/dL (CARVALHO et al., 2003) quando comparados aos controles, não havendo reversão do quadro diabético, conforme o que já foi descrito na literatura (FURMAN, 2015; PATROCÍNIO-SILVA, et al., 2016).

No presente estudo, o método utilizado para a análise da densitometria mineral óssea foi a técnica da densitometria óssea radiográfica, uma metodologia clássica e bastante reprodutível que apresenta uma boa acurácia graças aos recursos de informática para digitalização e processamento das imagens (LOUZADA et al., 2001), sendo portando utilizada em vários estudos que investigaram alterações no metabolismo ósseo (LOUZADA et al., 2001; MEURER et al., 2003; ZECCHIN et al., 2004; SILVA et al., 2007).

Quanto à DMO não foram observadas diferenças entre os animais dos grupos diabéticos com seus respectivos controles (GDP x GCP; GDTcP x GCTcP; GDTcU x GDTcU). Estes resultados diferem de outros estudos (MANAIA, 2009; SILVA et al.,

2009; ERDAL *et al.*, 2012) que verificaram redução na massa óssea em grupos diabéticos, o que pode ser explicado pela região femoral utilizada para análise e pelo uso combinado com a terapia com CTMs-MO. Van Der Meulen *et al.*, (2006), demonstrou que os fatores que controlam o aumento de massa óssea são particularmente críticos em sítios trabeculares, epífises, talvez mais do que na diáfise cortical, fazendo com que as regiões trabeculares experimentem maior perda óssea e risco de fratura (CULLEN; SMITH; AKHTER, 2001).

Por outro lado, a utilização da terapia com CTMs-MO mostrou ter efeito benéfico sobre a DMO em animais dos grupos controle (GCTcP) e diabético (GDTcP), visto que foi verificada um aumento da densidade óssea dos fêmures dos animais do GCTcP e GDTcP nas regiões da diáfise femoral. Esse aumento pode ser explicado pela grande capacidade de diferenciação osteoblástica que possuem as células mesenquimais derivadas da medula óssea favorecendo o aumento do conteúdo ósseo dos fêmures (PENG *et al.*, 2008; ABUNA *et al.*, 2015). Ichioka *et al.*, (2002) demonstraram que CTMs-MO alogênicas normais poderiam aumentar o osso trabecular e atenuar a perda de DMO após serem diretamente injetadas na cavidade da medula óssea em camundongos com osteoporose. Resultado similar também foi observado em um modelo de osteoporose induzida por ovariectomia (OVX) em ratos após o recebimento de CTMs-MO alogênicas isoladas de ratos saudáveis (OCARINO *et al.*, 2010). Apesar de diferentes formas de indução à osteoporose, esta constitui uma das consequências, a longo prazo, da diabetes mellitus (KEMINK *et al.*, 2000; McCABE, 2007; KAYAL *et al.*, 2009).

Ko *et al.*, (2015), ao analisarem as CTMs durante o reparo da fratura em animais diabéticos observaram que estes apresentaram um retardo no reparo ósseo. Isso aconteceu pelo fato do diabetes interferir com a proliferação de MSC e promover a apoptose das mesmas *in vivo*. No presente estudo a utilização da terapia com CTMs-MO autógena reduz os déficit de células-tronco mesenquimais provocados pela diabetes, dado o papel crítico que as CTMs desempenham na cicatrização óssea, esse déficit pode contribuir significativamente para o efeito negativo do diabetes mellitus no reparo de fraturas.

Em relação a associação de terapia CTMs-MO e US, observou-se um aumento da DMO nos grupos tanto diabético quanto não diabético (GCTcU e GDTcU) quando comparados aos grupos GCP e GDP, respectivamente, constatando o efeito positivo do uso combinado das duas terapias (CTMs-MO + US).

Nossos resultados, podem ser explicados baseando-se no efeito benéfico do ultrassom sobre o reparo ósseo (HARRISON *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2018; BAYAT *et al.*, 2018) e que este associado a terapia com CTMs-MO é capaz de estimular a migração (JIANG *et al.*, 2018) e diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em condrócitos, além de estimular a produção de matriz extracelular (NISHIKORI *et al.*, 2002; EBISAWA *et al.*, 2004; SCHUMANN *et al.*, 2006). Lirani-Galvão *et al.*, (2007), comprovaram uma melhora na reabsorção óssea, como consequência um aumento da massa óssea, dos animais tratados com ultrassom pulsado de baixa intensidade após um protocolo de 20 dias de aplicação, corroborando o efeito benéfico. De acordo com Bayat *et al.*, (2018), o ultrassom apresenta um efeito bioestimulatório sobre osteoblastos, osteócitos e aumentam a proliferação e diferenciação de osteoblastos em diferentes linhas celulares ósseas usadas em estudos *in vitro* e aumenta significativamente o número inicial de células-tronco antes da diferenciação, aumentando assim o número de células diferenciadas para engenharia de tecidos, medicina regenerativa e cicatrização, evidenciando uma melhora na massa óssea.

Quanto à avaliação biomecânica, os resultados do presente estudo indicaram que não foram constatadas diferenças na força máxima entre os grupos. Estes achados corroboram aos de Verhaeghe *et al.* (2000) que não observaram alteração força máxima do teste de flexão em três pontos do fêmur dos diabéticos em relação a ratos controles. Segundo eles, estas diferenças podem ter ocorrido devido à idade de indução dos animais ao diabetes (10 semanas) ou também à duração da doença dos animais (7 semanas), ou seja, o intervalo entre a indução e a análise do osso. A redução na competência biomecânica em ratos diabéticos irá depender da severidade, idade de início e duração do diabetes, além da linhagem dos animais utilizada no estudo (VERHAEGHE *et al.*, 2000; REDDY *et al.*, 2001).

Em relação aos demais parâmetros biomecânicos, foram observados um aumento na AST e uma redução na tensão máxima dos animais dos grupos terapia CTMs-MO sem US (GCTcP e GDTcP). Tais resultados eram esperados pelo fato deste parâmetro está sob influência direta da tensão máxima e esta ser mensurada através da razão entre força e AST, como não houve alteração da força máxima entre os grupos, porém como apresentaram valores aumentados da DMO (PENG *et al.*, 2008; ABUNA *et al.*, 2015) isso pode ter colaborado com o aumento da AST e consequente redução da tensão máxima.

Segundo Jiang et al., (1999), o módulo elástico do tecido ósseo depende em grande parte do seu conteúdo mineral. Esse parâmetro corresponde à rigidez do tecido ósseo, e uma menor rigidez pode ser interpretada como uma menor resistência óssea à deformação quando submetido a uma determinada carga (HART et al., 2001; RUSSO, 2009). Evidenciando uma menor inclinação na curva tensão-deformação e uma menor capacidade de resistir ao estresse de compressão, o que explica uma diminuição no parâmetro de deformação máxima quando comparado aos animais dos grupos controles evidenciando a ausência de melhora biomecânica com a utilização da terapia com CTMs-MO. De forma contrária, Chie et al., (2007) ao utilizarem um ensaio mecânico de torção, observaram que os ossos de animais submetidos a um aloenxerto apresentaram resistência à torção e rigidez equivalente aos fêmures submetidos à isoenxertos com CTMs-MO, entretanto ambos apresentaram melhora biomecânica quando comparados aos grupos placebos.

Quanto ao efeito combinado da terapia CTMs-MO e da terapia US, na resposta biomecânica do fêmur, os animais dos grupos GCTcU e GDTcU apresentaram uma redução da deformação máxima quando comparados com GCP e GDP. Esta redução observada na deformação máxima, pode ter influência do aumento da DMO observado nestes grupos, o que proporcionou um aumento do conteúdo mineral ósseo e consequentemente uma menor deformação quando submetido a tensão (LIRANI-GALVÃO et al., 2007). Entretanto, a ausência de diferenças nos demais parâmetros biomecânicos (AST, força máxima, tensão máxima e módulo elástico) dos GCTcU e GDTcU revela que a grande variabilidade dos dados podem ter influenciado neste resultados, uma vez que, estes mostraram valores similares com os seus controles (GCP e GDP).

CONCLUSÕES

O uso combinado da terapia CTMs-MO com a terapia US mostrou-se útil em promover um aumento da DMO dos fêmures supondo início de reparo ósseo. Entretanto, em relação aos parâmetros biomecânicos avaliados não foram observadas diferenças entre os grupos com associação de ambas as terapias.

REFERÊNCIAS

- ABUNA, Robrigo PF et al. Participation of TNF- α in inhibitory effects of adipocytes on osteoblast differentiation. **Journal of cellular physiology**, v. 231, n. 1, p. 204-214, 2016.
- AKTURK, M. et al. Evaluation of Achilles tendon thickening in type 2 diabetes mellitus. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v. 115, n. 2, p. 92-96. 2007.
- AKTURK, M. et al. Thickness of the supraspinatus and biceps tendons in diabetic patients. **Diabetes Care**, v. 25, n. 2, p. 408. 2002.
- LIRANI-GALVÃO Ana Paula, Vanda Jorgetti, Orivaldo Lopes Da Silva. Comparative Study of How Low-Level Laser Therapy and Low-Intensity Pulsed Ultrasound Affect Bone Repair in Rats. **Photomedicine and Laser Surgery** VOL. 24, NO. 6.2007.
- AZUMA, Y. et al. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates rat femoral fracture healing by acting on the various cellular reactions in the fracture callus. **J Bone Miner Res**, v. 16(4): 671-80. 2001.
- BABUCCU, C. et al. Cumulative effect of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound on bone repair in rats. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 43(6): 769-76. 2014.
- BASSO N, Jia Y, Bellows CG, Heersche JN. 2005. The effect of reloading on bone volume, osteoblast number, and osteoprogenitor characteristics: studies in hind limb unloaded rats. **Bone** 37(3):370-378
- BAYAT, M. **Comparação dos efeitos da LLLT e LIPUS na consolidação da fratura em modelos animais e pacientes: uma revisão sistemática.** Prog Biophys Mol Biol, 2018. doi: 10.1016 / j.pbiomolbio.2018.07.004.
- BJERG, L. et al. Desenvolvimento de complicações microvasculares e efeito de fatores de risco concomitantes no diabetes tipo 1: um modelo multiestado de um estudo observacional de coorte clínica. **Diabetes Care Nov**, v. 41(11): 2297-2305. 2018.
- BORTOLIN RH, et al. Protection against T1DM-Induced Bone Loss by Zinc Supplementation: Biomechanical, Histomorphometric, and Molecular Analyses in STZ-Induced Diabetic Rats. **PLoS One**. 2015 May 1;10(5):e0125349. doi: 10.1371/journal.pone.0125349. PubMed PMID: 25933189; PubMed Central PMCID: PMC4416905.
- CAO JJ. Effects of obesity on bone metabolism. **Journal of orthopaedic surgery and research** 6:30. 2011.
- CARVALHO, E. M. et al. Modelo experimental de indução do *diabetes mellitus* em ratos. Experimental model of induction of diabetes mellitus in rats. **Acta Cir Bras**, v. 18: 60-4.2003.

CULLEN, D. M.; SMITH, R. T.; AKHTER, M. P. Bone-loading response varies with strain magnitude and cycle number. **J Appl Physiol**, v. 91, p. 1971–1976, 2001.

DALL'AGO, P. et al. Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin diabetic rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 35(7): 843-9. 2002.

DEFRONZO, R.A. et al. **International Textbook of Diabetes Mellitus**. 4th Edition, 2 Volume, Wiley-Blackwell. 2015.

DEVLIN MJ, Rosen CJ. 2015. The bone-fat interface: basic and clinical implications of marrow adiposity. **Lancet Diabetes Endocrinol** 3(2):141-147.

DINIZ, S. F. et al. Alloxan-induced diabetes delays repair in a rat model of closed tibial fracture. **Braz J Med Biol Res**, 2008. v. 41, n. 5, p. 373-9.

DONMEZ, BO, Unal, M., Ozdemir, S., Ozturk, N., Oguz, N., & Akkus, O. (2016). Efeitos do tratamento com losartan nas propriedades físico-químicas do osso diabético de ratos. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, 35 (2), 161-170. doi: 10.1007 / s00774-016-0748-9.

DUKIC, W. et al. Radiopacidade de materiais dentários compostos usando um sistema de raios-X digital. **Dent Mater**. J, v. 31: 47–53. 2012.

EBISAWA, Katsumi et al. Ultrasound enhances transforming growth factor β -mediated chondrocyte differentiation of human mesenchymal stem cells. **Tissue engineering**, v. 10, n. 5-6, p. 921-929, 2004.

ERDAL, N. et al. The effect of insulin therapy on biomechanical deterioration of bone in streptozotocin (STZ)-induced type 1 diabetes mellitus in rats. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 97, p. 461-467, 2012.

FUNK, J. R. et al. Biomechanical evaluation of early fracture healing in normal and diabetic rats. **J Orthop Res**, v. 18: 126- 132. 2000.

FURMAN, BL. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. **Curr. Protoc. Pharmacol**. 70:5.47.1-5.47.20. doi:10.1002/0471141755.ph0547s70. 2015.

HARRISON, Andrew et al. Mode & mechanism of low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) in fracture repair. **Ultrasonics**, v. 70, p. 45-52, 2016.

HART, K. J. et al. Swim-trained rats have greater bone mass, density, strength, and dynamics. **J Appl Physiol**, v. 91, p. 1663-8, 2001.

ICHIOKA N, Inaba M, Kushida T, Esumi T, Takahara K, Inaba K, Ogawa R, Iida H, Ikehara S. Prevention of senile osteoporosis in SAMP6 mice by intrabone marrow injection of allogeneic bone marrow cells. **Stem Cells**. 2002; 20(6):542-51.

JACKULIAK P. et al. **Osteoporosis, fractures, and diabetes**. Int J Endocrinol, 2014:820615. 2014.

JIANG, Jingwei et al. Impact on migration of SD rat bone marrow mesenchymal stem cells treated with different intensities of low intensity pulsed ultrasound. **Chinese Journal of Interventional Imaging and Therapy**, v. 15, n. 6, p. 357-362, 2018.

KAYAL, R. A. et al. Diabetes causes the accelerated loss of cartilage during fracture repair which is reversed by insulin treatment. **Bone**, v. 44, n. 2, p. 357-63. 2009.

KEMINK, S. A. et al. Osteopenia in insulin-dependent diabetes *Mellitus*: prevalence and aspects of pathophysiology. **J Endocrinol Invest**, v. 23, p. 295–303. 2000.

KIMBALL SR, Vary TC, Jefferson LS. Regulation of protein synthesis by insulin. **Annu Rev Physiol.**; 56(1): 321-48. 1994

KO KI, Coimbra LS, Tian C, Alblowi J, Kayal RA, Einhorn TA, et al. Diabetes reduces mesenchymal stem cells in fracture healing through a TNF α -mediated mechanism. **Diabetologia**. Mar; 58(3):633-642. 2015.

KOMORI T. Animal models for osteoporosis. **Eur J Pharmacol** 759:287-294. 2015.

LIAO, C. C. et al. Increased risk of fracture and postfracture adverse events in patients with diabetes: two nationwide population-based retrospective cohort studies. **Diabetes Care**, 2014. v. 37:2246-52.

LODER, R. T. The influence of diabetes on the healing of closed fractures. **Clin Orthop**, v. 232, p. 210–216. 1988.

LOUZADA, M. J. Q. et al. Densitometria óptica radiográfica em análise da densidade óssea em mandíbulas de coelhos castrados. **Rev Fac Odontol Lins**, v. 13, n. 1, p. 33-8, **2001**.

MACEY, L. R. et al. **Defects of early fracture-healing in experimental diabetes**. J Bone Joint Sur Am, 1989. v. 71, p. 722–733.

MACHADO, L. H. A. et al. Avaliação da reabsorção óssea de membros torácicos pela técnica de densitometria óptica em imagens radiográficas no hiperparatireoidismo renal canino. **Vet Zootec**, v. 16, n. 2, p. 325-34, **2009**.

MANAIA, C. N. **Estudo da fragilidade em fêmures de ratos diabéticos pela análise densitométrica e biomecânica**. 2009. (Dissertação de mestrado) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araçatuba - SP, 2009.

MCCABE, L. R. Understanding the pathology and mechanisms of type I diabetic bone loss. **J Cell Biochem**, v. 102, p. 1343–57. 2007.

MEURER, M. I. et al. Análise da densidade óssea em região parassinfisária de mandíbulas humanas: comparação entre níveis de cinza em radiografias digitais (Sistema Digora) e unidades Hounsfield, **Rev Odonto Ciência**, v. 18, n. 40, p. 179-86, 2003.

NISHIKORI, T. et al. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on proliferation and chondroitin sulfate synthesis of cultured chondrocytes embedded in Atelocollagen gel. **J Biomed Mater Res**, v. 59, p. 201–206. 2002.

NISHIKORI, T. et al. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on proliferation and chondroitin sulfate synthesis of cultured chondrocytes embedded in Atelocollagen gel. **J Biomed Mater Res**, 2002. v. 59, p. 201–206.

OCARINO Nde M, Boeloni JN, Jorgetti V, Gomes DA, Goes AM, Serakides R. Intra-bone marrow injection of mesenchymal stem cells improves the femur bone mass of osteoporotic female rats. **Connect Tissue Res**. 2010 Dec; 51(6):426-33.

OLIVEIRA, R. R. et al. Aerobic physical training restores biomechanical properties of Achilles tendon in rats chemically induced to diabetes mellitus. **Journal of Diabetes and Its Complications**, v. 26, p. 163–168, 2012.

PATROCÍNIO-SILVA TL, Souza AM, Goulart RL, Pegorari CF, Oliveira JR, Fernandes KR et al. Low-level laser therapy associated to a resistance training protocol on bone tissue in diabetic rats. **Arch Endocrinol Metab**. Oct; 60(5):457-464. 2016.

PENG, Linyi et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. **Stem cells and development**, v. 17, n. 4, p. 761-774, 2008.

PRISBY, R. D. et al. Altered bone mass, geometry and mechanical properties during the development and progression of type 2 diabetes in the Zucker diabetic fatty rat. **J Endocrinol**, v.199 (3): 379-88. 2008.

REDDY, G. K. et al. The biomechanical integrity of bone in experimental diabetes. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 54, n. 1, p. 1-8, 2001.

RUBIN, M. et al. The use of lowintensity ultrasound to accelerate the healing of fractures. **J Bone Joint Surg Am**, v. 83-A, n. 2, p. 259–270. 2001.

RUSSO, C. R. The effects of exercise on bone. Basic concepts and implications for the prevention of fractures. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism**, v. 6, p. 223-228, 2009.

SCHUMANN, D. et al. Treatment of human mesenchymal stem cells with pulsed low intensity ultrasound enhances the chondrogenic phenotype in vitro. **Biorheology**, v. 43, n. 3, 4, p. 431-443, 2006.

SILVA MJ, Brodt MD, Lynch MA, McKenzie JA, Tanouye KM, Nyman JS, Wang X. Type 1 diabetes in young rats leads to progressive trabecular bone loss, cessation of cortical bone growth, and diminished whole bone strength and fatigue life. **J Bone Miner Res**. 2009 Sep;24(9):1618-27. doi: 10.1359/jbmr.090316. Epub 2009 May 30. PubMed PMID: 19338453; PubMed Central PMCID: PMC2730931.

SILVA, A. R. S. et al. Análise da densidade óssea radiográfica de ratos submetidos ao alcoolismo crônico utilizando imagem digital, **Revista Odonto Ciência**, v. 22, n. 55, p. 77-81, 2007.

SILVA, M. J. et al. Type 1 diabetes in young rats leads to progressive trabecular bone loss, cessation of cortical bone growth, and diminished whole bone strength and fatigue life. **J Bone Miner Res**, v. 24, n. 9, p. 1618–27, 2009.

VAN DER MEULEN, M. C. H. et al. Cancellous bone adaptation to in vivo loading in a rabbit model. **Bone**, v. 38, p. 871–877, 2006.

VERHAEGHE, J. et al. Effects of exercise and disuse on bone remodeling, bone mass, and biomechanical competence in spontaneously diabetic female rats. **Bone**, v. 27, n. 2, p. 249-56, 2000.

WU, Suiyi et al. Low-Intensity Pulsed Ultrasound Accelerates Traumatic Vertebral Fracture Healing by Coupling Proliferation of Type H Microvessels. **Journal of Ultrasound in Medicine**, v. 37, n. 7, p. 1733-1742, 2018.

ZECCHIN, K. G. et al. Conventional x-ray densitometry detects osteopenia in ovariectomized young rats. Short communication, **Braz J Oral Sci**, v. 3, n. 8, p. 425-7, 2004.

ZHOU, S. et al. Molecular mechanisms of low intensity pulsed ultrasound in human skin fibroblasts. **J Biol Chem**, v. 279, n. 52, p. 54463–54469. 2004.

ZIMMERMANN, G. et al. TGF-beta1 as a marker of delayed fracture healing. **Bone**, v. 36, n. 5, p. 779–785. 2005.

5 CONCLUSÃO

O protocolo de tratamento de ultrassom de baixa intensidade pareceu estimular nos animais diabéticos uma maior tensão e deformação máxima do fêmur.

O uso combinado da terapia CTMs-MO com a terapia US mostrou-se útil em promover um aumento da DMO dos fêmures supondo início de reparo ósseo. Entretanto, em relação aos parâmetros biomecânicos avaliados não foram observadas diferenças entre os grupos com associação de ambas as terapias.

REFERÊNCIAS

- ABDALRAHAMAN, N. *et al.* Deficits in trabecular bone microarchitecture in young women with type 1 diabetes mellitus. **J. Bone Miner. Res**, 30: 1386– 1393. 2015.
- AHMED, L. A. *et al.* Diabetes mellitus and the risk of non-vertebral fractures: the Tromso study. **Osteoporos Intv**, 17, n. 3, p. 495-500. 2006.
- AKTURK, M. *et al.* Evaluation of Achilles tendon thickening in type 2 diabetes mellitus. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v. 115, n. 2, p. 92-96. 2007.
- AKTURK, M. *et al.* Thickness of the supraspinatus and biceps tendons in diabetic patients. **Diabetes Care**, v. 25, n. 2, p. 408. 2002.
- American Diabetes Association (ADA). Padrões de Assistência Médica em Diabetes - 2019. **Diabetes Care**, 42 (Suplemento 1): S1 - S183. 2019.
- American Diabetes Association (ADA). Standards of medical care in diabetes. **Diabetes Care**, 40(Suppl 1):S1-131. 2017.
- AUGUSTO, R. *et al.* Effect of sugarcane biopolymer gel injected in rabbit vocal fold. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 80, n. 3, p. 220–225, 2014.
- AZUMA, Y. *et al.* Low-intensity pulsed ultrasound accelerates rat femoral fracture healing by acting on the various cellular reactions in the fracture callus. **J Bone Miner Res**, v. 16, p. 671–680. 2001.
- BABUCCU, C. *et al.* Cumulative effect of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound on bone repair in rats. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 43(6): 769-76. 2014.
- BARBOSA, Júnia HP; OLIVEIRA, Suzana L.; SEARA, Luci Tojal. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 52(6): 940-950. 2008.
- BARRY, Frank P.; MURPHY, J. Mary. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 36: 568–584, 2004.
- BARTOLD, M. *et al.* Mesenchymal stem cells and biologic factors leading to bone formation. **Journal of clinical periodontology**, v. 46, p. 12-32, 2019.
- BAYAT, M. *et al.* Comparison of effects of LLLT and LIPUS on fracture healing in animal models and patients: A systematic review. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 132, p. 3-22, 2018.

BEAM, Heather A.; RUSSELL PARSONS, J.; LIN, Sheldon S The effects of blood glucose control upon fracture healing in the BB Wistar rat with diabetes mellitus. **J Orthop Res**, v. 20, n.6, p. 1210–1216. 2002.

BEZERRA, M. A. *et al.* Biomechanical and structural parameters of tendons in rats subjected to swimming exercise. **Int J Sports Med**, v. 34, n. 12, p. 1070-3, 2013.

BIANCO, Paolo; ROBEY, Pamela Gehron; SIMMONS, Paul J. Mesenchymal stem cells: Revisiting history, concepts, and assays. **Cell Stem cell**, v. 2, n.4, p. 313–319. 2008.

BISHOP, J. A. *et al.* Assessment of compromised fracture healing. **J. Am. Acad. Orthop. Surg.**, v. 20(5): 273–282. 2012.

BJERG, L. *et al.* Desenvolvimento de complicações microvasculares e efeito de fatores de risco concomitantes no diabetes tipo 1: um modelo multiestado de um estudo observacional de coorte clínica. **Diabetes Care Nov**, v. 41(11): 2297-2305. 2018.

CARVALHO, E.N. *et al.* Modelo experimental de indução do *diabetes mellitus* em ratos. Experimental model of induction of diabetes *Mellitus* in rats. **Acta Cir. Bras.** São Paulo, v. 18. 2003.

CHEN, Ye *et al.* Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 40, n. 5, p. 815-820, 2008.

COELHO, M. C. de O. C. *et al.* Biopolímero produzido a partir da cana-de-açúcar para cicatrização cutânea. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, p. 11-13, 2002.

COORDS, M. *et al.* The Effects of Low-Intensity Pulsed Ultrasound Upon Diabetic Fracture Healing. **J Orthop Res**, v. 29, n. 2, p. 181-8. 2011.

CORDEIRO-BARBOSA, F. D. A. *et al.* Use of a gel biopolymer for the treatment of eviscerated eyes : experimental model in rabbits. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 75, n. 4, p. 267–272, 2012.

COWIN, C. **Bone mechanics handbook**. CRC press, 2001.

DALL'AGO P, Silva VO, De Angelis KL, Irigoyen MC, Fazan R Jr, Salgado HC. Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin diabetic rats. **Braz J Med Biol Res** Jul; 35(7):843-9. 2002.

DEFRONZO, R.A. *et al.* **International Textbook of Diabetes Mellitus**. 4th Edition, 2 Volume, Wiley-Blackwell. 2015

DINIZ, S. F. *et al.* Alloxan-induced diabetes delays repair in a rat model of closed tibial fracture. **Braz J Med Biol Res**, v. 41, n. 5, p. 373-9. 2008.

DIXIT, Padmakar K.; EKSTROM, Richard A. Decreased breaking strength of diabetic rat bone and its improvement by insulin treatment. **Calcif. Tissue Int.**, v. 32, n. 3, p. 195-199. 1980.

DONG, C.H *et al.* The interplay of transcriptional and post-transcriptional regulation of migration of mesenchymal stem cells during early stages of bone fracture healing. **Eur Rev Med Pharmacol Sci.** Dec;21(24):5542-5547. doi: 10.26355/eurev_201712_13990. PMID: 29271984. 2017.

DUKIC, W. *et al.* Radiopacidade de materiais dentários compostos usando um sistema de raios-X digital. **Dent Mater. J**, v. 31: 47–53. 2012.

EBISAWA, K. *et al.* Ultrasound enhances transforming growth factor β -mediated chondrocyte differentiation of human mesenchymal stem cells. **Tissue engineering**, v. 10, n. 5-6, p. 921-929, 2004.

EINHORN, T. A. *et al.* The mineral and mechanical properties of bone in chronic experimental diabetes. **J Orthop Res**, v. 6, n. 3, p. 317-23. 1988.

EINHORN, Thomas A. Enhancement of fracture-healing. **J Bone Joint Surg Am**, v. 77, p. 940-956. 1995.

FOLLAKE, N. *et al.* Improving metabolic control reverses the histomorphometric and biomechanical abnormalities of an experimentally induced bone defect in spontaneously diabetic rats. **Calcif Tissue Int**, v. 74, n. 6, p. 551-60. 2004.

FOLLAKE, Niels; KLÖTING, Ingrid; MERK, Harry. Influence of diabetic metabolic state on fracture healing in spontaneously diabetic rats. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 21, p. 288–296. 2005.

FRASCA, S. *et al.* Calcium-phosphate ceramics and polysaccharide-based hydrogel scaffolds combined with mesenchymal stem cell differently support bone repair in rats. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 28, n. 2, p. 35, 2017.

FUNAKOSHI, T. *et al.* Rotator cuff regeneration using chitin fabric as an acellular. **Journal of Shoulder and Elbow Surgery**, v. 15, n. 1, p. 112–118. 2006.

FUNG, Chak-Hei *et al.* Effects of different therapeutic ultrasound intensities on fracture healing in rats. **Ultrasound in medicine & biology**, v. 38, n. 5, p. 745-752, 2012.

FUNK, J.R. *et al.* Biomechanical evaluation of early fracture healing in normal and diabetic rats. **J Orthop Res**, v. 18(1): 126– 132. 2000.

GASTON, M. S; SIMPSON, A. H. R. W. Inhibition of fracture healing. **J Bone Joint Surg Br.**, v. 89(12): 1553-60. 2007.

GEBAUER, G. P. *et al.* Low-intensity pulsed ultrasound increases the fracture callus strength in diabetic BB Wistar rats but does not affect cellular proliferation. **J Orthop Res**, v. 20, n. 3, p. 587–592. 2002.

GOOCH, H. L. *et al.* Alterations of cartilage and collagen expression during fracture healing in experimental diabetes. **Connect Tissue Res**, v. 41, p. 81-91. 2000.

GOODSHIP, Allen E.; CUNNINGHAM, James L.; KENWRIGHT, John. Strain rate and timing of stimulation in mechanical modulation of fracture healing. **Clin Orthop Relat Res**, 355 (suppl): S105– S115.1998.

GOOVA, M.T. *et al.* Blockade of receptor for advanced glycation end-products restores effective wound healing in diabetic mice. **Am J Pathol**, v. 159, p. 513-525. 2001.

GRANERO-MOLTO, F. *et al.* Mesenchymal Stem Cells Expressing Insulin-Like Growth Factor-I (MSC^{IGF}) Promote Fracture Healing and Restore New Bone Formation in Irs1 Knockout Mice: Analyses of MSC^{IGF} Autocrine and Paracrine Regenerative Effects. **Stem cells**, v. 29, p. 1537–1548. 2011.

GRANERO-MOLTO, F. *et al.* Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. **Stem Cells**, v. 27, p. 1887–1898. 2009.

GRANERO-MOLTO, F. *et al.* Role of mesenchymal stem cells in regenerative medicine: Application to bone and cartilage repair. **Expert Opin Biol Ther**, v. 8, p. 255–268. 2008.

GROVE, Joanna E.; BRUSCIA, Emanuela; KRAUSE, Diane S. Plasticity of bone marrow–derived stem cells. **Stem cells**, v. 22, n. 4, p. 487-500, 2004.

HARRISON, A. *et al.* Mode & mechanism of low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) in fracture repair. **Ultrasonics**, v. 70, p. 45-52, 2016.

HE, H. *et al.* Diabetes causes decreased osteoclastogenesis, reduced bone formation, and enhanced apoptosis of osteoblastic cells in bacteria stimulated bone loss. **Endocrinology**, v. 145, p. 447-45. 2004.

HOU, Jack C.-H.; ZERNICKE, Ronald F.; BARNARD, R. James. Effects of severe diabetes and insulin on the femoral neck of the immature rat. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 11, n. 2, p. 263-271, 1993.

HOU, Jack C.-H.; ZERNICKE, Ronald F.; BARNARD, R. James.. Experimental diabetes, insulin treatment, and femoral neck morphology and biomechanics in rats. **L Clin Orthop**, v. 264, p. 278-285, 1991.

HOUGH, S. *et al.* Correction of abnormal bone and mineral metabolism in chronic streptozotocin-induced diabetes mellitus in the rat by insulin therapy. **Endocrinology**, v. 108, p. 2228-2234, 1981.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Atlas**. 7th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2015.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**. 8th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2017.

JACKULIAK P. *et al.* Osteoporosis, fractures, and diabetes. **Int J Endocrinol**: 820615. 2014.

JANGHORBANI, M. *et al.* Systematic Review of Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus and Risk of Fracture. **Am J Epidemiol**, v. 166, n. 5, p. 495-505. 2007.

JIANG, J. *et al.* Impact on migration of SD rat bone marrow mesenchymal stem cells treated with different intensities of low intensity pulsed ultrasound. **Chinese Journal of Interventional Imaging and Therapy**, v. 15, n. 6, p. 357-362, 2018.

JIN, H.-J. *et al.* Human bone marrow stromal cell responses on electrospun silk fibroin mats. **Biomaterials**, v. 25, n. 6, p. 1039–1047. 2004.

KAGEL, E. M.; EINHORN, M. A. Alterations of fracture healing in the diabetic condition. **Iowa Orthop J**, v. 16, p. 147-52. 1996.

KAYAL, R. A. *et al.* Diabetes causes the accelerated loss of cartilage during fracture repair which is reversed by insulin treatment. **Bone**, v. 44, n. 2, p. 357-63. 2009.

KAYAL, R. A. *et al.* Diminished bone formation during fracture healing is related to the premature resorption of cartilage associated with increased osteoclast activity. **J Bone Miner Res**, v. 22, n. 4, p. 560-8. 2007.

KEMINK, S. A. *et al.* Osteopenia in insulin-dependent diabetes *Mellitus*: prevalence and aspects of pathophysiology. **J Endocrinol Invest**, v. 23, p. 295–303. 2000.

KERN, S. *et al.* Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem cells**, v. 24, n. 5, p. 1294-1301, 2006.

KOLF, Catherine M.; CHO, Elizabeth; TUAN, Rocky S. Mesenchymal stromal cells: biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis research & therapy*, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2007.

Gerstenfeld, L. C. *et al.* Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. **J. Cell Biochem.**, 88 (5) (2003), pp. 873-884 (b)

Gerstenfeld, L. C. *et al.* Impaired fracture healing in the absence of TNF-alpha signaling: the role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption. **J. Bone Min. Res.**, 18 (9) (2003), pp. 1584-1592 (a)

LIAO, C. C. *et al.* Increased risk of fracture and postfracture adverse events in patients with diabetes: two nationwide population-based retrospective cohort studies. **Diabetes Care**, v. 37:2246-52. 2014.

LIMA, F. R. de *et al.* **Resposta inflamatória a membranas de biopolímero de cana-de-açúcar e telas de polipropileno ® implantadas no peritônio parietal de ratos.** Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco, v. 50, n. 1, p. 37–40, 2005.

LODER, Randall T. The influence of diabetes on the healing of closed fractures. **Clin Orthop**, v. 232, p. 210–216. 1988.

LOUZADA, M. J. Q. Densitometria óptica radiográfica em análise de densidade óssea de mandíbulas de coelhos castrados. **Revista Faculdade Odontologia**, v. 13, n. 1, p. 33-38, 2001.

MACEY, L. R. *et al.* Defects of early fracture-healing in experimental diabetes. **J Bone Joint Sur Am**, v. 71, p. 722–733. 1989.

MACHADO, L. H. A. *et al.* Avaliação da reabsorção óssea de membros torácicos pela técnica de densitometria óptica em imagens radiográficas no hiperparatireoidismo renal canino. **Vet Zootec**, v. 16, n. 2, p. 325-34, 2009.

MARQUES, S. R. de B. *et al.* Um novo substituto vascular : arterioplastia femoral em cães com remendo de membrana de biopolímero de cana-de-açúcar – avaliação hemodinâmica e histopatológica. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 6, n. 4, p. 309–315, 2007.

MATTILA, P. T.; KNUUTTILA, M. L.; SVANBERG, M. J. Dietary xylitol supplementation prevents osteoporotic changes in streptozotocin-diabetic rats. **Metabolism**, v. 47, n. 5, p. 578-583. 1998.

MAYER, D. L. M. *et al.* Sugarcane biopolymer membrane: experimental evaluation in the middle ear. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 77, n. 1, p. 44–50. 2011.

MAYER, D. L. M. *et al.* Sugarcane biopolymer membrane: experimental evaluation in the middle ear. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 77, n. 1, p. 44–50, 2011.

MCCABE, L. R. Understanding the pathology and mechanisms of type I diabetic bone loss. **J Cell Biochem**, v. 102, p. 1343–57. 2007.

MEIRELLES, L. S.; CAPLAN, A. I.; NARDI, N. B. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 26, p. 2287–2299. 2008.

MEIRELLES, L. S.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **J Cell Sci**, v. 119, p. 2204–2213. 2006.

MIAO, J. *et al.* Elevated hip fracture risk in type 1 diabetic patients: a population-based cohort study in Sweden. **Diabet Care**, v. 28, n. 12, p. 2850-2855. 2005.

MIAZGOWSKI, T. *et al.* Bone mineral density and hip structural analysis in type 1 diabetic men. **European Journal of Endocrinology**, v. 156, p. 123-127, 2007.

MITRAGOTRI, S. Healing sound: the use of ultrasound in drug delivery and other therapeutic applications. **Nat. Rev. Drug Discov.**, 4 (3) (2005 Mar), pp. 255-260

MOHITE, Bhavna V.; PATIL, Satish V. A novel biomaterial : bacterial cellulose and its new era applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 61, n. 2, p. 101–110, 2014.

MONTAGNANI, A.; GONNELLI, S. Antidiabetic therapy effects on bone metabolism and fracture risk. **Diab. Obes. Metab.**, v. 15, p. 784-791. 2013.

MONTEIRO, V. L. C. *et al.* Cana-de-açúcar no tratamento de feridas cutâneas por segunda ou terceira intenção. **Medicina Veterinária**, v. 1, n. 1, p. 1–8, 2007.

MORRISON, L. B. & BOGAN, I. K. Desenvolvimento ósseo em crianças diabéticas: um estudo Roentgen. **J. Med. Sci**, v. 174: 313 – 319. 1927.

MOTYL, K.; McCABE, L. R. Streptozotocin, type 1 diabetes severity and bone. **Biol. Proced. Online**, v. 6, n. 9, p. 296-315. 2009.

MURRAY, M. M. *et al.* Enhanced Histologic Repair in a Central Wound in the Anterior Cruciate Ligament with a Collagen–Platelet-Rich Plasma Scaffold. **Journal of orthopaedic research**, v. 25, p. 1007–1017. 2007.

NAIK, A. A. *et al.* Reduced COX-2 expression in aged mice is associated with impaired fracture healing. **J. Bone Miner. Res.**, v. 24(2): 251–264. 2009.

NERY, Cybelle Silva. **Avaliação do treino aeróbio de natação sobre as propriedades biomecânicas do tendão de calcâneo de ratos com diabetes experimental**. 2013. Dissertação (Mestrado em Fisioterapia) – Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2013.

NISHIKORI, T. *et al.* Effects of low-intensity pulsed ultrasound on proliferation and chondroitin sulfate synthesis of cultured chondrocytes embedded in Atelocollagen gel. **J Biomed Mater Res**, v. 59, p. 201–206. 2002.

OEI L. *et al.* Diabetes, diabetic complications, and fracture risk. **Curr. Osteoporos. Rep.**, v. 13(2): 106–115. 2015.

OLIVEIRA, R. R. *et al.* Aerobic physical training restores biomechanical properties of Achilles tendon in rats chemically induced to diabetes mellitus. **Journal of Diabetes and Its Complications**, v. 26, p. 163–168, 2012.

OLIVEIRA, R. R. *et al.* Mechanical Properties of Achilles Tendon in Rats Induced to Experimental Diabetes. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 39, n. 5, p. 1528-34, 2011.

PADILLA, F., PUTS, R., VICO, L., RAUM, K. Stimulation of bone repair with ultrasound: a review of the possible mechanic effects. **Ultrasonics** 54 (5), 1125e1145. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultras.01.004>. Epub 2014 Jan 17. 2014.

PARVIZI, J. *et al.* Calcium signaling is required for ultrasound-stimulated aggrecan synthesis by rat chondrocytes. **J Orthop Res**, v. 20(1): 51– 57. 2002.

PATERSON-BEEDLE, M. *et al.* A cellulosic exopolysaccharide produced from sugarcane molasses by a *Zoogloea* sp. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, n. 4, p. 375-383, 2000.

PENG, L *et al.* Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. **Stem cells and development**, v. 17, n. 4, p. 761-774, 2008.

PHILLIPS, A. M. Overview of the fracture healing cascade. **Injury** 36 (suppl 3): S5– S7. 2005.

PILLA, A. A. Low-intensity electromagnetic and mechanical modulation of bone growth and repair: are they equivalent? **J Orthop Sci**, v. 7, n. 3, p. 420–428. 2002.

PINTO, F. C. M. *et al.* Acute toxicity, cytotoxicity, genotoxicity and antigenotoxic effects of a cellulosic exopolysaccharide obtained from sugarcane molasses. **Carbohydrate Polymers**, v. 137, p. 556–560, 2016.

PRISBY, R.D. *et al.* Altered bone mass, geometry and mechanical properties during the development and progression of type 2 diabetes in the Zucker diabetic fatty rat. **Journal of Endocrinology**, v. 199, p. 379-388. 2008.

RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M.; KUMBHAR, J. V. Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 6, p. 2491–2511. 2015.

REBELATTO, C. K. *et al.* Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. **Experimental Biology and Medicine**, v. 233, n. 7, p. 901-913, 2008.

REDDY, G. K. *et al.* The biomechanical integrity of bone in experimental diabetes. **Diabetes. Res. Clin. Pract.**, v. 54, n. 1, p. 1-8. 2001.

RUBIN, M. *et al.* The use of lowintensity ultrasound to accelerate the healing of fractures. **J Bone Joint Surg Am**, 2001. v. 83-A, n. 2, p. 259–270.

SALVI, G. E. *et al.* Inflammatory mediator response as a potential risk marker for periodontal diseases in insulin-dependent diabetes *Mellitus* patients. **J Periodontol**, v. 68, p. 127-135. 1997.

SCHUMANN, D. *et al.* Treatment of human mesenchymal stem cells with pulsed low intensity ultrasound enhances the chondrogenic phenotype in vitro. **Biorheology**, v. 43, n. 3, 4, p. 431-443, 2006.

SHAH, N. *et al.* Overview of bacterial cellulose composites: A multipurpose advanced material. **Cancer Research**, v. 98, p. 1585–1598. 2013.

SHIRES, R. *et al.* The effect of streptozotocin-induced chronic diabetes mellitus on bone and mineral homeostasis in the rat. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 97, n. 2, p. 231-240. 1981.

SILVEIRA, A. *et al.* Biopolymer membrane of sugarcane: a reality as an option for the correction of urinary incontinence. **Millenium**, v. 46, p. 81–95, 2014.

SILVEIRA, A.C.M. e NERY, C.A.S. Estudo macroscópico e morfométrico do tendão do músculo tibial posterior. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 34, nº 8, pag. 475-480, 1999.

SILVEIRA, P.C.V, 2014. **Comparação do uso de duas modalidades diferentes de treinamento em meio aquático na prevenção do déficit ósseo em ratos diabéticos**. 2014. Dissertação (Mestrado em Fisioterapia) – Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.

SKYLER, J.S. *et al.* Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis. **Diabetes**, v. 66(2):241-55. 2017.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. A. C. Farmacêutica, 2016.

SUCKOW, M. A. *et al.* Repair of experimental Achilles tenotomy with porcine renal capsule material in a rat model. **Journal of materials science. Materials in medicine**, v. 18, n. 6, p. 1105–10. 2007.

SUENAGA, Hideyuki *et al.* Bone regeneration in calvarial defects in a rat model by implantation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cell spheroids. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 26, n. 11, p. 1-9, 2015.

SUZUKI, K. *et al.* Osteoclastic function is accelerated in male patients with type 2 diabetes *Mellitus*: the preventive role of osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin (OCIF/OPG) on the decrease of bone mineral density. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 68, p. 117-125. 2005.

TAVARES, L. H. M. *et al.* Biopolymer Sponge for High Grade Renal Trauma : An Experimental Study in Rabbits. **Journal of Urology**, v. 4, p. 1–6, 2014.

TIAN, Feng *et al.* CXCL13 promotes the effect of bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) on tendon-bone healing in rats and in C3HIOT1/2 cells. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 2, p. 3178-3187, 2015.

TOHILL M, TERENCE G. Stem-cell plasticity and therapy for injuries of the peripheral nervous system. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, 40: 17–24, 2004.

TSIRIDIS, Eleftherios; UPADHYAY, Neil; GIANNOUDIS, Peter. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules?. **Injury**, v. 38, n. 1, p. S11-S25, 2007.

VERHAEGHE, J. *et al.* Bone and mineral metabolism in BB rats with long-term diabetes: Decreased bone turnover and osteoporosis. **Diabetes**, v. 39, p. 477-482. 1990.

VESTERGAARD, P. Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes: a meta-analysis. **Osteoporosis Int.**, v. 18, n. 4, p. 427-444. 2007.

VIALLE E. Produção de fratura padronizada de fêmur em ratos. **Rev Bras Ortop.** 39(6):323-9. 2004.

WETZLER, C. *et al.* Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair. **J Invest Dermatol**, v. 115: 245-253. 2000.

WILLIAMS, J. L. Ultrasonic wave propagation in cancellous and cortical bone: prediction of some experimental results by Biot's theory. **J Acoust Soc Am**, v. 91(2): 1106– 1112. 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global report on diabetes** [Internet]. Geneva; 2016. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257_eng.pdf. Acesso em: 27 junho 2017.

WU, Suiyi *et al.* Low-Intensity Pulsed Ultrasound Accelerates Traumatic Vertebral Fracture Healing by Coupling Proliferation of Type H Microvessels. **Journal of Ultrasound in Medicine**, v. 37, n. 7, p. 1733-1742, 2018.

YANG, R. S. *et al.* Regulation by ultrasound treatment on the integrin expression and differentiation of osteoblasts. **Bone**, v. 36, n. 2, p. 276–283. 2005.

ZEMEL, B. Acréscimo mineral ósseo e sua relação com o crescimento, maturação sexual e composição corporal durante a infância e adolescência. **Mundo Rev. Nutr. Diet**, v. 106: 39 – 45. 2013.

ZHANG, C. *et al.* Clinical analyses of bicytopenia and pancytopenia during pregnancy. **Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi**, v. 44, n. 7, p. 488-491. 2009.

ZHOU, S. *et al.* Molecular mechanisms of low intensity pulsed ultrasound in human skin fibroblasts. **J Biol Chem**, v. 279, n. 52, p. 54463–54469. 2004.

ZHOU, Wanshan; LIU, Qian; XU, Bo. Improvement of bone defect healing in rats via mesenchymal stem cell supernatant. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 15, n. 2, p. 1500-1504, 2018.

ZHOU, Xuan *et al.* Improved human bone marrow mesenchymal stem cell osteogenesis in 3D bioprinted tissue scaffolds with low intensity pulsed ultrasound stimulation. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2016.

ZIMMERMANN, G. *et al.* TGF-beta1 as a marker of delayed fracture healing. **Bone**, v. 36, n. 5, p. 779–785. 2005.

APÊNDICE A – ARTIGO ORIGINAL DA TÉCNICA CIRÚRGICA

COMPARISON BETWEEN TWO SURGERY TECHNIQUES OF RAT FEMUR FRACTURE

MSc. Cybelle da Silva Nery¹, PhD. Júlio Rodrigues Pereira Júnior², PhD. Márcio Almeida Bezerra³, Silvia Luana Ramos Marques¹, Laylla Marjorye Rebouças Bezerra¹, Marina Lira Cavalcante¹, MSc. Waydja Lania Vírginia de Araújo Marinho¹, Waldo Oliveira Monteiro Filho⁴, PhD. Silvia Regina Arruda de Moraes^{1,4}

¹ Postgraduate Program in Biotechnology/ RENORBIO; Neuromuscular Plasticity Laboratory – LAPLAN, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

² Veterinary Medicine Course, Universidade Federal do Piauí – UFPI /CPCE

³ Department of Physiotherapy, Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza-CE

⁴ Department of Anatomy, Universidade Pernambuco de Federal - UFPE

*AUTHOR FOR CORRESPONDENCE:

Cybelle da Silva Nery

Rua Jonathas de Vasconcelos, 750

51021-140 Recife PE – Brazil

Cell phone +55 (81) 99956-1646

E-mail address: cybellenery@gmail.com (NERY CS)

Laboratory of Neuromuscular Plasticity – LAPLAN

ABSTRACT

Objective: To compare two surgical techniques (open and closed fracture) of *Wistar* rats femur in terms of sample loss, the efficacy of fracture technique during the first attempt, early and late post-operative mortality rate associated with a drug protocol.

Methods: 58 male *Rattus Novergicus Albinus*, *Wistar* line, 74 days old were randomly assigned to the groups: Closed Fracture (CFG, n =29) and Open Fracture (OFG, n =29), consisting of animals submitted to closed fracture and open fracture of the femur using the Gigli Saw, respectively. At 74 days of life, they were submitted to a drug protocol followed by diaphysis fracture of the right femur. The CFG was submitted to radiographic analysis to confirm the fracture after radiography. **Results:** OFG showed 48% of sample losses compared to 66% CFG. Regarding the efficacy of the fracture technique, 100% of the OFG was observed when compared to 79% of the CFG. No difference was observed between the groups when comparing mortality rate in the mid and late postoperative periods (after 24h), both obtaining a percentage of 44.8%, but the CFG presented 41% of deaths in the immediate postoperative period, 1^o postoperative day (POD) when compared to OFG (38%). There was a 3% loss in CFG due to bone crumble after fracture. **Conclusion:** The surgical technique of open fracture used in the femur of *Wistar* rats demonstrated a better result than the closed fracture technique because it reduces sample losses and mortality rates in the early postoperative period, as well as increasing the efficacy of the technique during the first attempt.

Keywords: bone fracture; osteotomy; rats; surgical technique.

INTRODUCTION

The techniques of long bone fracture of small animals are increasingly used in order to understand the healing process and bone consolidation, optimization of the different fixation methods, standardizing and enhancement of the selected technique and surgical approach [1-5]. However, aiming to ensure the less experimental bias and turn it replicable, some variables as species, age, line, type and pain sensitivity, likeable effects of a particular agent on specific animals' organs and systems, and surgery nature and duration should be considered [4,6].

The closed fracture model was initially described by Jackson et al., (1970) [7], where the command mechanism for the fracture was performed by a compressed air system. On 1984, Bonnarens & Einhorn [8], based on this protocol, modified the command mechanism avoiding the use of electric accessories and, thus, turned it more standardized. On 2004, Vialle et al. [2], through a device named Fraturactor, projected a trauma mechanism, using a blunt guillotine in order to improve the fracture repetition, in such way that the force was the same on the animal's bone. However, this model still promotes a high level of post-operative complications such as infections, internal bleeding, and high mortality rates, resulting in a great sample loss [9-13].

On the other hand, the open fracture models (osteotomy) show a great interest because they promote a higher control of the fracture site, besides, it demands less applied force. Nevertheless, because there is an exposition of muscles, blood vessels, and nerves, the necessity of higher attention with the risk of infections is needed [7,14-16].

Independently of the type, both fracture surgery techniques, open and closed, still present great post-operative complications, which, inevitably, caused a

decreased survival rate of the animals. Thus, the aim was to compare the results of the two surgery techniques (open and closed fractures) of *Wistar* rats femurs related to sample loss, efficiency of the fracture technique during first attempt, mortality rate on the early and late post-operative period associated to a drug protocol attempting to improve the healing process, bone consolidation, and reduction of the animal's morbimortality.

METHODS

The study was executed on the Laboratorio de Plasticidade Neuromuscular (Anatomy Department – UFPE) in collaboration with the Experimental Surgery Department (UFPE) and Radiology Department (Odontology Department – UFPE) and was approved by the Commission for Ethics in Animal Experimentation, Federal University of Pernambuco, and protocol number 23076.031594/2016-98.

Animals

The sample was composed of 58 male rats, *Rattus Novergicus Albinus* breed, *Wistar* line, aged 74 days of life, kept in cages of 4 rats each, under reversed light/dark cycles of 12 hours and temperature of $23^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, feed with standard diet (Presence® - Purina) and water *ad libitum*. The animals were randomly distributed in two groups: Closed Fracture Group (CFG, n=29), composed by animals submitted to closed femur fracture, using the Closed Fracture Technique, and Open Fracture Group (OFG, n=29), composed by animals submitted to open fracture using the Gigli Saw.

Pre-surgical procedures

All the animals, when aged 74 days, were submitted to diaphyseal fracture of the right femur. To this end, the animals received: anesthetic solution, via intraperitoneal, of Xylazine Cloridrate 2% (20 mg, Rompum® – Bayer) and 10%

Ketamine Hydrochloride (50 mg, Ketalar®) in an amount of 0.2 ml of the solution for each 100g of animal weight; pain killer (Tramadol Hydrochloride 50mg / ml), subcutaneously, at a dose of 100mg for each 1000g of animal weight diluted in saline solution 0.9%, in a ratio of 1: 1, 30 minutes before surgery and 12 / 12h for 72 hours in the immediate post-operative period; antibiotic (Enrofloxacin) subcutaneously at a dose of 5mg for each 1000g of animal weight, 24 hours before surgery and 24 / 24h for 4 days after the surgery and anti-inflammatory (Meloxicam) subcutaneously in one dose of 0.1ml for each 1000g animal weight, 24 hours before surgery and 24 / 24h for 2 days after the surgery.

Surgery techniques

1. Closed Fracture

Once anesthetized, the animals were positioned supine on a surgery table, with the posterior paws in extension. Anterior trichotomy on the knee and posterior of the right hip, asepsis of the whole right lower limb, and placement of surgical drapes were performed, and the following procedures were conducted: incision of approximately 2cm longitudinally on the right knee; dissection by planes until the anterior patella surface; incision of patella's medial retinaculum, followed by its lateral luxation; using an introducer (abocath 16G) an initial bone perforation was performed on the intercondylar space; introduction of a Kirschner wire of 1,0 mm diameter longitudinally through the femur to the major trochanter; perforation of the major trochanter by the Kirschner wire and exteriorization on the hip region, where the Kirschner wire was folded, cut and subcutaneously introduced; and, in the end, the patella was reduced.

The skin suture was sutured with a nylon fiber 4-0. After the surgical procedures, with the animals still numb, the rats were submitted to diaphyseal fracture of the right

femur. By means of standardization of the type and force needed to cause the fracture, the Fracturator device was used, which works as a blunt guillotine, formed by a body, an animal's support, a system to free the bar, and a blunt steel bar of 500g. The device's body consists of a base and two platforms assembled on vertical bars. The two platforms have gaps where the iron bar falls, released from 30 cm height through latch

discharge. The animal was positioned supine, with the posterior paw in abduction and the fracture region (femur diaphysis) positioned over two metallic supports. During the fall, the bar progresses in the middle of the platform gaps, forming its support point, maintaining its trajectory. Its course ends in the middle of the rat's femoral diameter and in the center of the two metallic supports, forming a three-point system, producing a closed and standardized fracture [2].

2. Open fracture with Gigli Saw

Once anesthetized, the animals were positioned supine on a surgery table, with the posterior paws in extension. Trichotomy of the postero-lateral thigh and right knee, asepsis of the whole posterior paw, and placement of surgical drapes were performed, and the following procedures were initialized: lateral incision of approximately 3cm longitudinally from the thigh to the right knee through the shaved skin and fasciae latae from the right knee to the major trochanter. The plane between vastus muscles and ischiotibialis muscles was opened through a muscle disjunction until the right femoral diaphysis was visualized [15], then the Gigli saw was introduced around the femur and the open fracture was reproduced. After the fracture, a longitudinal deviation was made in order to longitudinally introduce a Kirschner wire of 1,00 mm diameter along the femur until the major trochanter. In relation to the

suture of the vastus lateralis, a nylon fiber 5-0 was used, and for the skin, a nylon fiber 4-0 was used.

Euthanasia

After the fracture, the animals from both groups were followed for 24 days and subsequently euthanized with a Xilazyn solution (Rompum® - Bayer) (10mg/Kg) and Ketamin Clorhydrate (Ketalar®) (25mg/kg), 0,10 ml for each 100g weight and after, their right femur was disarticulated and dissected.

Radiological analysis

The closed fracture group, after the fracture execution, had the animals referred to the Radiology Service of the Odontology Department/UFPE in order to confirm the fracture using radiography. The animals, still in numbness were positioned in a way that the right paw was supported on the radiological film. The images were captured by radiological films, periapical ultra-speed, of odontological use, from Kodak on an intra-oral X-ray device Heliodent Plus®, with a 70kvp electrical regime and 10mA. Lateral incidence was used, keeping 30 cm distance from the cone to the object. The exposition time was 0,5cm [17].

RESULTS

The OFG had 48% of sample loss compared with 66% of the CFG. In relation to the fracture technic efficiency, the OFG had 100% utilization; it was observed that all the animals had the bone fracture on the first attempt when compared to 79% of the CFG technique. There was no difference between groups when compared the mortality rate on the early and late (24h post-surgical) post-operative period, where both had 44,8% of losses. However, the CFG has a higher mortality percentage in

the early post-operative period (correspondent 24h post-surgical), 1^oPOD, (41%) when compared to OFG (38%). In addition, there was a loss of 3% on the CFG because of post-fracture bone shattering (Figure 1).

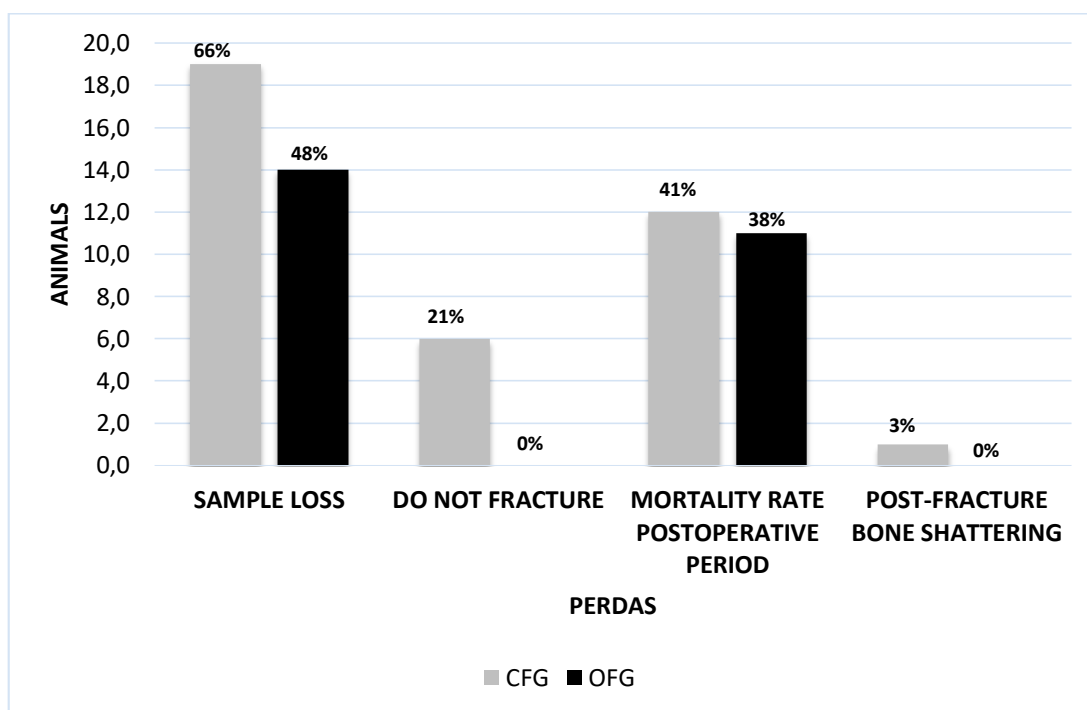


Figure 1. Percentages of sample loss, fracture achievement, mortality on the 1^o post-operative day and comminuted fractures and bone fragmentation on OFG (n=29) and CFG (n=29).

DISCUSSION

This study, where surgery techniques of an open fracture and closed fracture of *Wistar* rats were compared, we observed a reduction of sample loss and mortality rate on early post-operative period on OFG.

According to Committee to update the Guide for Care and Use of Laboratory Animals (2011) [18], the use of anesthetic protocols, adequate analgesic and antibiotic therapy (pre, mid and post-operatively) in surgical procedures or pain induction procedures guarantee a lower surgery time, less mid and post-operative complications acting equally on the animal's well-being and adequate outcome

achievement. Both groups were submitted to drug protocol, aiming to promote adequate analgesic and anesthetic effects, according to Vasbinder & Locke (2016) [19], besides allowing the animals to come back moving during the first hours. Conversely, even though the use of the drug protocol, the CFG presented more mid and post-operative complications due to internal bleeding related to the unsuccessfulness of the fracture on the first attempt (confirmed by bone radiography), resulting in the repetition of the closed fracture procedure, causing sample losses in this group, corroborating with the Kupczik et al., (2009) [12] and Fontes-Pereira (2013) [13] findings, which described a high index of post-operative complications like infections, internal bleeding and high mortality rates. The closed fracture model used in this study is similar to Vialle et al., (2004) [2], where a fixed weight falls from a guillotine on the medial part of the animal's thigh resulting on an immediate, non-perceptive damage, yet existent, of the muscular tissue, nerves and blood vessels, evidencing alterations of the neighbor tissues, thus, corroborating with Fernandes et al., (2004) [11] and Ferreira et al., (2009) [3].

On the contrary, concerning the open fracture, the technique allowed a better visualization of the bone structure that was going to be fractured and a better positioning of the equipment responsible for the fracture, the Gigli saw, providing a transverse or oblique fracture mechanism, in opposition to the CFG, where 3% of those fractures were comminuted, precluding the use of the specimen for analysis, as similarly observed by Aurégan et al., (2013) [20], who found 47 comminuted fractures in 74 animal bones.

CONCLUSION

The open fracture surgery technique used on *Wistar* rat femurs, demonstrated better results than the closed fracture technic because it reduced the sample losses and mortality rates on the early post-operative period, in addition to an increase of the technique efficiency during the first try of fracture.

REFERENCE

- [1] Muller ME, Allgöwer M, Schneider R, Willenegger H, eds. Manual de Osteossíntese. 3a. ed. São Paulo: Manole; 1993.
- [2] Vialle, E et al. Produção de fratura padronizada de fêmur em ratos. Rev Bras Ortop, v. 39, n. 6, p. 323-9, 2004.
- [3] Ferreira, ML et al. Modelo experimental em ratos para o desenvolvimento de pseudoartrose. Rev. Col. Bras. Cir., Rio de Janeiro, v. 36, n. 6, p. 514-8, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-69912009000600010>.
- [4] Histing, T et al. Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. Bone, v. 49, n. 4, p. 591-9, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.07.007>.
- [5] Palacio EP et al . Efeitos do etil-2-cianoacrilato e do butil-2-cianoacrilato no processo de consolidação óssea em ratos. Estudo experimental controlado. Rev. bras. ortop., v. 53, n. 1, p. 53-9, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rboe.2017.11.010>
- [6] Kona-Boun JJ, Silim A, Troncy E. Immunologic aspects of veterinary anesthesia and analgesia. JAVMA. v. 226, n. 1, p. 355–63, 2005. <https://doi.org/10.2460/javma.2005.226.355>
- [7] Jackson RW, Reed CA, Israel JA, Abou-Keer FK, Garside H. Production of a standard experimental fracture. Can J Surg. v. 13, n. 4, p. 415-20, 1970.
- [8] Bonnarens F, Einhorn TA. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. J. Orthop. Res., n. 2, 97-101, 1984. doi:10.1002/jor.1100020115

- [9] Rockwood CA Jr, Green DP, Bucholz RW. Fraturas em adultos. 3a. ed. São Paulo: Manole; 1993,.p.179-91.
- [10] Campbell WC. Cirurgia ortopédica de Campbell. 8a. ed. São Paulo: Manole; 1996.
- [11] Fernandes HJA, Reis FB. Fraturas da diáfise de fêmur. In: Franco SF, Lourenço PRB. Traumatologia ortopédica. Rio de Janeiro: Revinter; 2004. p. 19-30.
- [12] Kupczik, F et al. Influência da ciprofloxacina na consolidação óssea de fraturas de fêmur em ratos. Acta ortop. bras. vol. 17, n. 4, p. 228-31, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-78522009000400007>
- [13] Fontes-Pereira, AJ et al. Efeito do ultrassom terapêutico de baixa intensidade em fratura induzida em tíbia de ratos. Acta ortop. bras. v. 21, n. 1, p. 18-22, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-78522013000100003>.
- [14] Müller SS. Efeito da subnutrição na consolidação da fratura da tíbia no rato: estudo radiológico, anátomo-patológico e bioquímico. [Tese]. Botucatu-SP, Brasil, Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), 1991. 175p.
- [15] Fossum, TW. Small Animal Surgery. 2d. ed. Missouri: Mosby, 2002. p. 1400.
- [16] Muller, SS et al. Análise clínica e biomecânica do efeito do diclofenaco sódico na consolidação da fratura da tíbia no rato. Acta ortop. bras. v. 12, n. 4, p. 197-204, 2004. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-78522004000400001>.
- [17] Diniz, SF. Influência do diabetes mellitus no processo de reparação de fraturas. Estudo experimental em ratos. Dissertação de mestrado. Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2007.
- [18] National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th edition. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/> doi: 10.17226/12910
- [19] Vasbinder MA, Locke P; Introduction: Global Laws, Regulations, and Standards for Animals in Research, ILAR Journal. v. 57, n. 3, p. 261-5, 2016. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilw039>.

- [20] Aurégan JC, Coyle RM, Danoff JR, Burky RE, Akelina Y, Rosenwasser MP. The rat model of femur fracture for bone and mineral research: An improved description of expected comminution, quantity of soft callus and incidence of complications. *Bone Joint Res.* v. 2, n. 8, p. 149–54, 2013. doi:10.1302/2046-3758.28.2000171.

ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife – PE – Brasil
Fones: 2126 8842
cena@ufpe.br

Recife, 20 de setembro de 2018

Ofício nº 82/18

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof.ª Silvia Regina Arruda de Moraes**

Departamento de Anatomia

Centro de Biociências

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 23076.031594/2016-98

Certificamos que a proposta intitulada “**Uso combinado de terapia com células mesenquimais da medula óssea e ultrassom pulsado de baixa intensidade sobre o processo de cicatrização de fratura de fêmur de ratos diabéticos**”, registrada com o nº 23076.031594/2016-98, sob a responsabilidade de Prof.ª **Silvia Regina Arruda de Moraes**- que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 29/08/2018.

Finalidade	☐ Ensino ☒ Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Setembro/2018 a 23 janeiro/2019.
Espécie/linhagem/raça	Ratos heterogênicos Wistar
Nº de animais	240
Peso/Idade	250g / 60 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério do Departamento de Nutrição

Atenciosamente,

Prof. Sebastião R. F. Silva
Vice-Presidente CEUA/UFPE
SIAPE 2345691

ANEXO B – ARTIGO PUBLICADO

Original article

Previous physical exercise slows down the complications from experimental diabetes in the calcaneal tendon

Márcio Almeida Bezerra¹
Cybelle da Silva Nery²
Patrícia Verçoza de Castro Silveira³
Gabriel Nunes de Mesquita²
Thainá de Gomes Figueiredo³
Magno Felipe Holanda Barboza Inácio Teixeira²
Sílvia Regina Arruda de Moraes²

Corresponding author:

Márcio Almeida Bezerra
Department of Physiotherapy, Federal University of
Ceará, Fortaleza
Luiza Miranda Coelho
60811110 Fortaleza, Brazil
E-mail: malmeidab.ufc@gmail.com

¹ Department of Physiotherapy, Federal University of
Ceará, Fortaleza, Brazil

² Federal University of Pernambuco, Brazil

³ Physiotherapist

Muscles, Ligaments and Tendons Journal 2016;6 (1):97-103

ANEXO C – ARTIGO PUBLICADO



ELSEVIER

Brazilian Journal of Physical Therapy

Volume 21, Issue 6, November–December 2017, Pages 400–415



Systematic Review

Effectiveness of resistance exercise compared to aerobic exercise without insulin therapy in patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis

Cybelle Nery ^a, Silvia Regina Arruda De Moraes ^b, Karyne Albino Novaes ^a, Márcio Almeida Bezerra ^c,
Patrícia Verçoza De Castro Silveira ^a, Andrea Lemos ^a  

[Show more](#)<https://doi.org/10.1016/j.bjpt.2017.06.004>[Get rights and content](#)

ANEXO D – PUBLICAÇÃO PARALELA

(Resumo publicado em Anais de Congresso)



**20 a 23
Setembro
2018**

**3ª Feira Internacional
de Fisioterapia**
Centro de Eventos do Ceará
Fortaleza - Ceará - Brasil

Certificado

Certificamos que Victor Franklyn de Oliveira participou do 10º Congresso Internacional de Fisioterapia, realizado em Fortaleza (CE), de 20 a 23 de setembro de 2018, no Centro de Eventos do Ceará, promovido pela **SBF - Sociedade Brasileira de Fisioterapia**, como apresentador(a) do tema-livre “**Ação do ultrassom pulsado na cicatrização de fratura de fêmur induzida em ratos diabéticos**” Cybelle da Silva Nery, Laylla Marjory Rebouças Bezerra, Sílvia Luana Ramos Marques e Sílvia Regina Arruda de Moraes..



Dr. Julius Queiroz
Presidente do 10º Congresso
Internacional de Fisioterapia



Dr. Oséas Florêncio de Moura Filho
Presidente da Sociedade Brasileira
de Fisioterapia

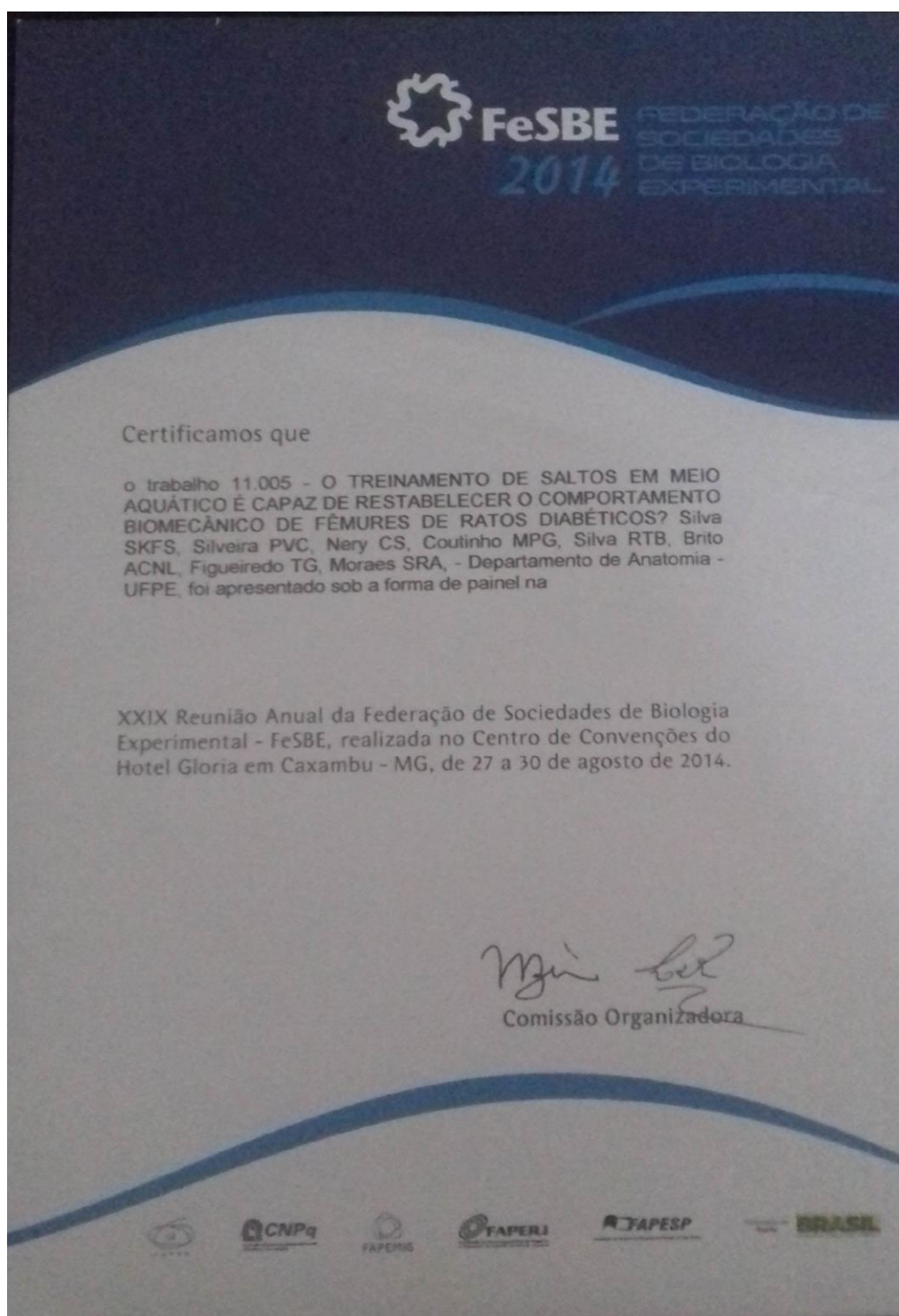


Dr. Wiron Correia Lima Filho
Coordenador Científico
da Sociedade Brasileira
de Fisioterapia



ANEXO E – PUBLICAÇÃO PARALELA

(Resumo publicado em Anais de Congresso)



ANEXO F – PUBLICAÇÃO PARALELA

(Resumo publicado em Anais de Congresso)



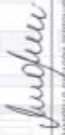
CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho

SHIELD EFFECT OF RESISTENCE JUMPING TRAINING ON BIOMECHANICAL PARAMETERS IN GASTROCNEMIUS MUSCLES OF DIABETIC ANIMALS

dos autores: DENIELE BEZERRA LÓS; MARCOS PAULO GALDINO COUTINHO; CYBELLE DA SILVA NERY; CÂMILLA RODRIGUES DE SOUZA SILVA; SUZY KELLY FERREIRA SILVESTRE DA SILVA; RAFAEL DORNELAS E SILVA; ELVIS DA SILVA RODRIGUES DE FREITAS; WAYDJA LÂNIA VIRGÍNIA DE ARAÚJO MARINHO; ANA CRISTINA FALCÃO ESTEVES, foi apresentado, na modalidade Pôster Digital, no evento XX Congresso da Sociedade Brasileira de Diabetes ocorrido de 11 a 13 de novembro de 2015 no Fiegs em Porto Alegre/RS.

Porto Alegre, 13 de novembro de 2015


 MANOEL D'ALMEIDA BERTOLDO
 Presidente do Comitê Científico


 WALTER NEVES
 Presidente do FIEG


 LUCIANO TSCHIESL
 Presidente do Congresso