

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA BUCOMAXILOFACIAL

NATÁLIA PRADELLA CIGNACHI

**EFEITO DO DIABETES TIPO 1 NA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA EM DEFEITOS CRITICOS EM
FÊMUR DE CAMUNDONGOS: RELEVÂNCIA DOS RECEPTORES B₁ DAS CININAS**

Porto Alegre
2014

NATÁLIA PRADELLA CIGNACHI

EFEITO DO DIABETES TIPO 1 NA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA EM DEFEITOS CRÍTICOS EM FÊMUR DE CAMUNDONGOS: RELEVÂNCIA DOS RECEPTORES B₁ DAS CININAS

Linha de pesquisa: Diagnóstico e Terapêutica Aplicadas

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, na área de CTBMF, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof^{ca}. Dra. Maria Martha Campos

Porto Alegre

2014

Dedicatória

À minha família, meu bem mais sagrado.
Lauro, tu foi o maior incentivador para a inscrição no mestrado. Pai, se estou completando hoje esta etapa é por tua causa e por tua ajuda.
Irdes, tu é o pilar da família, sempre que precisamos de algo, lá está a mãezinha, que de pequena só tem a altura. Forte e pronta para tudo.
E a neném da família, Amanda, minha irmã, minha amiga, minha sócia e colega de profissão. Quem acompanha teus passos sabe quanto tu cresce a cada dia que passa e o quanto posso contar contigo.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Prof^a. Dra. Maria Martha Campos que além de minha orientadora, teve um papel especial de confidente em alguns momentos pessoais de dificuldade. Agradeço pela paciência em desmistificar todas as dúvidas que me assombravam em relação ao nosso trabalho. Por me mostrar a existência desse caminho maravilhoso, que é a pesquisa, tanto em animais quanto a pesquisa laboratorial. Sorte a minha de tê-la como orientadora.

À Prof^a. Dra. Adriana Etges por me receber na UFPEL de braços abertos, mesmo com muitos compromissos na sua agenda, conseguiu me ajudar de uma forma muito gentil na condução de uma parte do nosso trabalho.

À Prof^a. Dra. Karen Cherubini pelo acolhimento em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Vinícius Duval pela orientação na aquisição de imagens de imunohistoquímica.

À Prof^a. Dra. Fernanda B. Morrone, o meu agradecimento.

Ao Prof. Dr. Ricardo Smidt, que acompanha minha trajetória. Obrigada pelo incentivo para seguir o caminho acadêmico.

As meninas, Kesiane M. Costa, Helena Filipinni, Natália F. Nicoletti, Paula Seadi, Priscila Pail e Raquel Freitas obrigada pela ajuda nos experimentos e pelas horas de conversas e momentos de risadas.

Aos meninos, André Santos Junior, Gustavo B. Machado, Izaque Maciel e Rodrigo Braccini agradeço o apoio nos assuntos em que eu não tinha conhecimento.

Ao meu avô, Ângelo P. Pradella, que partiu antes do término deste trabalho.

Agradeço o apoio das minhas amigas de infância assim como daquelas que a Odontologia me presenteou.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, representado pelo seu Diretor Prof. Dr. Alexandre Bahlis pela excelente estrutura e qualidade de ensino proporcionada.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontologia da PUCRS em nome da Prof^a. Dra. Ana Maria Spohr, pelas oportunidades durante o curso de Mestrado.

À Secretaria de Graduação e Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da PUCRS.

Ao Instituto de Toxicologia e Farmacologia da PUCRS, pela utilização das dependências para realização dos experimentos com animais.

À Luciana A. Ferreira responsável pelo processamento das amostras e ajuda da confecção das lâminas.

À Ivana N. Hanemann, da UFPEL pela ajuda na realização do procedimento de imunohistoquímica nas lâminas.

À Raquel M. Oliveira pela disponibilidade de tempo para ajudar no processo de coloração das lâminas.

Aos colegas de Mestrado e Doutorado de Odontologia pela amizade e apoio durante o curso.

À CAPES, pelo apoio financeiro disponibilizado através da bolsa no último ano do Mestrado, indispensável para o término deste curso.

RESUMO

Os efeitos da deleção gênica do receptor B₁ das cininas na regeneração óssea foram avaliados em camundongos com diabetes tipo 1 induzida por estreptozotocina, submetidos a um modelo de defeito crítico no fêmur. Como resultado da indução de diabetes nos camundongos *wild-type* C57/BL6, houve um decréscimo do peso corporal e hiperglicemia em relação ao grupo não-diabético da mesma cepa. Os animais diabéticos, com ausência do receptor B₁ apresentaram perda do peso corporal e, uma prevenção parcial da hiperglicemia. Camundongos diabéticos do tipo 1 tiveram um atraso na regeneração óssea, apresentando um tecido conectivo desorganizado na região correspondente ao defeito crítico, quando comparados a extensas áreas de tecido ósseo recém-formado em camundongos WT C57/BL6 não diabéticos. Camundongos B₁R nocaute, diabéticos ou não diabéticos, exibiram níveis de regeneração óssea semelhantes aos observados no grupo controle WT C57/BL6. A melhora na regeneração óssea nos animais sem o receptor B₁ foi confirmada pela análise da quantidade de colágeno. Camundongos WT C57/BL6 diabéticos apresentaram uma redução acentuada da distribuição de colágeno na região do defeito ósseo, enquanto que os animais B₁RKO diabéticos exibiram níveis de colágeno similares àqueles observados nos camundongos não diabéticos, tanto WT C57/BL6, quanto B₁RKO. A melhora da regeneração óssea nos camundongos diabéticos sem o receptor B₁ não parece estar associado à atividade osteoclástica diminuída. Ademais, nenhuma diferença marcante foi encontrada nos níveis de fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) ou, na imunomarcção para as proteínas do sistema RANK/RANKL/OPG, em todos grupos experimentais avaliados. Os resultados

deste trabalho fornecem novas evidências a respeito da relevância dos receptores B_1 no diabetes do tipo 1, especialmente no que diz respeito ao seu papel na regeneração óssea após procedimentos cirúrgicos.

DESCRITORES¹

Cininas, osso, Diabetes Mellitus tipo 1, camundongos.

¹DeCS- Descritores em Ciências da Saúde, disponível em <http://decs.bvs.br>

ABSTRACT

The effects on kinin B₁ receptor (B₁R) deletion were examined on bone regeneration in streptozotocin (STZ)-type-1 diabetic mice, subjected to a model of femoral critical-size defect. Diabetes induction in wild-type C57/BL6 (WT C57/BL6) mice was allied to decrease of body weight and hyperglycemia, in relation to the non-diabetic group of the same strain. The lack of B₁R did not affect STZ-elicited body weight loss, although it partially prevented hyperglycemia. Type-1 diabetic mice presented a clear delay in bone regeneration, with large areas of loose connective tissue within the region corresponding to the defects, when compared to wide areas of newly-formed woven bone in non-diabetic WT C57/BL6 mice. Notably, either non-diabetic or diabetic B₁R knockout (B₁RKO) mice displayed bone regeneration levels comparable to that seen in control WT C57/BL6 mice. The improved bone regeneration in animals lacking B₁R was further confirmed by analysis of collagen contents. WT C57/BL6 STZ-diabetic mice presented a marked reduction of collagen contents within the bone defect gap, whereas diabetic B₁RKO displayed collagen levels comparable to those observed in non-diabetic WT C57/BL6 or B₁RKO mice. The enhanced bone regeneration in diabetic mice lacking B₁R does not seem to be associated to lessened osteoclast activity, as no prominent difference was detected in the levels of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) positivity, or even in the immunolabeling for the proteins of the RANK/RANKL/OPG system throughout all the experimental groups. Data brings novel evidence on the relevance of B₁R under type-1 diabetes, especially concerning its role in bone regeneration after surgical procedures.

DESCRIPTORS²

Bradykinin B₁ Receptor, bone regeneration, type 1 Diabetes Mellitus, mice.

²MeSH- Medical Subject Headings, available at: www.nlm.nih.gov/mesh

LISTA DE FIGURAS E IMAGENS

Imagem 1: Área correspondente ao defeito ósseo confeccionado no fêmur de camundongos da linhagem C57/BL6. (A) Localização da área antes do procedimento; (B) Defeito ósseo crítico instalado.

Figure 1. Body weight gain and blood glucose levels in WT and B1RKO in STZ-induced type 1 diabetes. The weight gain was calculated at different time-points, as the percentage of increase in relation to the individual body weight at the beginning of experiments. The blood glucose levels are provided in mg/dl. Data is presented as the mean \pm standard error mean of 7-10 animals per group. *P<0.05; **P<0.01 denotes significance in relation to the respective control group (ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test).

Figure 2. Representative images of H&E staining throughout different experimental groups (upper panels), and semi-quantitative analysis of the percentage of newly-formed bone in comparison to the total analyzed area (lower panel). Data is presented as the mean \pm standard error mean of 7-10 animals per group. *P<0.05 denotes significance in relation to the respective control group (ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test).

Figure 3. Representative images of Masson's trichrome staining throughout different experimental groups (upper panels), and semi-quantitative analysis of the percentage of newly-formed bone in comparison to the total analyzed area (lower panel). Data is presented as the mean \pm standard error mean of 7-10 animals per group. *P<0.05 denotes significance in relation to the respective control group (ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test).

Figure 4. Representative images of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining throughout the four different evaluated experimental groups. The arrows indicate positive labeling. The images are representative of analysis of 7-10 animals per group.

Figure 5. Representative images of immunohistochemical analysis for RANK expression throughout different experimental groups (upper panels), and quantitative analysis of the number of positive cells/field (lower panel). Data is presented as the mean \pm standard error mean of 7-10 animals per group.

Figure 6. Representative images of immunohistochemical analysis for RANKL expression throughout different experimental groups (upper panels), and quantitative analysis of the number of positive cells/field (lower panel). Data is presented as the mean \pm standard error mean of 7-10 animals per group.

Figure 7. Representative images of immunohistochemical analysis for OPG expression throughout different experimental groups (upper panels), and quantitative analysis of the number of positive cells/field (lower panel). Data is presented as the mean \pm standard error mean of 7-10 animals per group.

LISTA DE ABREVIATURAS

Osteoblasto- OB

Osteoclastos- OC

Ativador nuclear Kappa-b- RANK

Ligante do ativador nuclear Kappa-b- RANKL

Osteoprotegerina- OPG

Diabetes Mellitus- DM

Estreptozotocina- STZ

Bradicinina- BK

Enzima Conversora da Angiotensina- ECA

Hematoxilina & Eosina- H&E

Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato- TRAP

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
OBJETIVOS	25
<i>Objetivo geral</i>	25
<i>Objetivos específicos</i>	25
ARTIGO DE PESQUISA	26
<i>Página inicial</i>	27
<i>Abstract</i>	28
<i>Introduction</i>	29
<i>Methods</i>	31
<i>Results</i>	35
<i>Discussion</i>	38
<i>References</i>	43
<i>Legend to Figures</i>	50
CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	60
<i>ANEXO A- Carta de aprovação pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia/PUCRS</i>	68
<i>ANEXO B- Carta de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais/PUCRS</i>	69
<i>ANEXO C- Comprovante de submissão do manuscrito ao Periódico PNAS</i>	70

INTRODUÇÃO

O osso é classificado como um tecido conjuntivo especializado, formado por 60% a 70% de material inorgânico e, 30% a 35% de material orgânico, dos quais, 90% são representados pelas fibras colágenas (1). Sua principal função é de resistência, dependente não somente da quantidade de tecido ósseo, mas, também, de sua qualidade.

O tecido ósseo é renovado frequentemente em resposta a uma série de estímulos do processo de remodelação. Este processo não está totalmente entendido, mas inclui danos ao osso em resposta ao desgaste normal, a mudanças no peso corporal, atividade física, além da liberação de citocinas ou fatores de crescimento ,devido a alterações nos níveis hormonais (2).

A osteogênese é determinada por uma sequência de eventos que iniciam pelas células osteoprogenitoras e sua diferenciação em pré-osteoblastos. Estes, por sua vez, tornam-se osteoblastos maduros, com altos índices de fosfatase alcalina, osteocalcina e colágeno. Dentre os fatores responsáveis pela formação dos osteoblastos estão as proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) (3,4).

Quando os osteoblastos estão em intensa atividade sintética, suas formas modificam-se, lembrando um cubo, tornando-se achatados, com redução da basofilia citoplasmática. Uma vez aprisionado pela matriz óssea recém-sintetizada, o osteoblasto recebe o nome de osteócito (5-6). Os osteócitos são células com forma estrelada, que estão inseridos na matriz óssea mineralizada, mas permanecem em contato com as outras células ósseas, por um processo altamente controlado (5-6). Portanto, essas células derivadas dos osteoblastos são residentes em lacunas da matriz óssea. Apesar dos osteócitos não apresentarem a função de secretar a matriz

óssea, eles permanecem produzindo as substâncias necessárias à manutenção do osso.

Os osteoclastos são células especializadas na reabsorção da matriz óssea e se originam de monócitos hematopoiéticos e macrófagos (7-8). Os fatores reguladores da função dos osteoclastos são: fator estimulador da colônia de monócitos (CFS-1), fator de diferenciação dos osteoclastos (ODF), interleucinas (IL), vitamina D3, fator de necrose tumoral (TNF) e, partículas ósseas mineralizadas contendo osteocalcina (7, 9). O ODF é um membro da super-família do fator de necrose tumoral e foi denominado mais recentemente de TNFSF-11; porém, possui outras denominações, tais como TRANCE, RANK-L ou ODF/TNFSF-11 (10-11).

O RANKL, produzido por células de linhagem osteoblástica e por linfócitos T ativados, é o fator essencial para a formação, fusão, ativação e sobrevivência dos osteoclastos, levando à reabsorção óssea (10). Os efeitos do RANKL são contrabalanceados através da OPG que atua como um receptor solúvel neutralizador (10). RANKL e OPG (receptor osteoprotegerina) são regulados por vários hormônios (glicocorticóides, vitamina D, estrogênio), citocinas (TNF α , IL-1, IL-4, IL-6, IL-11 e IL-17) e, fatores de transcrição mesenquimal (tais como cbfa-1). Anormalidades do sistema RANKL/OPG implicam na patogênese da osteoporose pós-menopausa, artrite reumatoide, doença de Paget, doença periodontal, tumores ósseos benignos e malignos, metástases ósseas e hipercalcemia. De forma interessante, a administração do OPG é capaz de prevenir ou atenuar esses transtornos em modelos animais (10).

A maioria dos fatores que induz a expressão de RANKL pelos osteoblastos também regula a expressão de OPG (12). Entretanto, mesmo que alguns dados

sejam contraditórios, no geral, quando a expressão de RANKL está sobre-regulada, OPG é regulada ou não induzida com a mesma intensidade como RANKL, de tal modo que mudanças na relação RANKL/OPG favorecem a osteoclastogênese (13,14).

A matriz orgânica é formada de colágeno, principalmente do tipo 1, proteoglicanas e glicoproteínas adesivas. Por outro lado, a matriz inorgânica é composta por íons fosfato, cálcio e, em menor quantidade, bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato. A união do fosfato e do cálcio forma cristais com estrutura de hidroxiapatita que, quando associados às fibras colágenas, fornecem a resistência e a dureza características do tecido ósseo (15). O colágeno do tipo 1, além de ser o maior componente da matriz óssea, está intimamente associado à cicatrização e à regeneração. Portanto, mudanças na estrutura do colágeno podem afetar as propriedades mecânicas do osso e aumentar a susceptibilidade a fratura. (16).

Vários fatores locais e sistêmicos controlam a formação e a reabsorção óssea. Dentre os sistêmicos, destacam-se os hormônios de crescimento e hormônios tireoidianos, os glicocorticoides, o paratormônio, a calcitonina e a vitamina D. Entre os fatores locais, podem-se citar a prostaglandina E_2 (PGE_2), a $IL-1\beta$, o interferon-gama ($INF\gamma$), o fator de crescimento de transformação beta ($TGF\beta$), o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), o fator de crescimento epidérmico (EGF), o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), o fator de crescimento fibroblástico (FGF) e o fator de crescimento derivado do esqueleto (SGF) (9).

As anormalidades na remodelação óssea ocorrem em algumas das doenças mais comuns, tais como osteoporose, doença periodontal, artrite reumatoide, insuficiência renal crônica, osteólise induzida por tumores e osteopetrose (1,6). Embora estas alterações sejam comuns, na maioria dos casos, pouco se sabe sobre

os mecanismos responsáveis pela disfunção da remodelação óssea que as caracteriza (9).

O aumento nos níveis de paratormônio, produzido pela paratireoide (hiperparatireoidismo), leva a um aumento do número de osteoclastos com consequente estímulo à reabsorção óssea (1). Já, a calcitonina, produzida pela tireoide, inibe a atividade osteoclástica com diminuição da reabsorção óssea (1). A integridade estrutural do osso pode estar comprometida pela necessidade do metabolismo normal do cálcio e por estados patológicos, alterando assim, estrutura e massa ósseas. Este fenômeno pode ser especialmente notado na estrutura óssea no período pós-menopausa, em que ocorre um decréscimo dos níveis de estrogênio. Como o osso perde massa, as comunicações entre o trabeculado ósseo também são perdidas. Dentre os marcadores mais utilizados para a caracterização de atividade osteoclástica, destaca-se o TRAP (do inglês, *tartrate-resistant acid phosphatase*) (17).

O diabetes é uma doença metabólica resultante de defeitos na secreção de insulina e/ou em sua ação (18). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, mais de 350 milhões de pessoas em todo o mundo poderão ser diagnosticadas com Diabetes Mellitus até o ano de 2025 (19, Pan et al., 2014). Os sintomas como poliúria, polidipsia, perda de peso, polifagia e visão turva são resultantes das variações dos níveis glicêmicos. A hiperglicemia crônica está associada ao dano, disfunção e falência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (20).

O diabetes pode ser classificado como tipo 1 ou tipo 2. No diabetes do tipo 1, ocorre destruição das células beta do pâncreas, usualmente por um processo autoimune (forma autoimune; tipo IA) ou menos comumente por causas

desconhecidas (forma idiopática; tipo IB) (21,22). Na forma autoimune, há um processo de insulinite e estão presentes auto-anticorpos circulantes (anticorpos anti-descarboxilase do ácido glutâmico, anti-ilhotas e anti-insulina). Como não há insulina na circulação em concentrações ideais, a absorção de glicose fica prejudicada, sendo necessário fazer a reposição de insulina (23).

No diabetes do tipo 2 a associação entre um fator hereditário e a obesidade apresentam maior importância do que no tipo 1. Apesar desses pacientes produzirem insulina normalmente suas células são incapazes de usar toda essa insulina secretada pelo pâncreas, fazendo com que seus níveis permaneçam altos no sangue, o que é conhecido como resistência à insulina (24). O principal motivo que faz os níveis de glicose permanecerem altos é a incapacidade das células musculares e adiposas em utilizarem toda insulina secretada pelo pâncreas. Os sintomas do diabetes tipo 2 são pronunciados, sendo que o tratamento deve ser cauteloso, em virtude dos riscos de complicações cardiovasculares em longo prazo (25).

O pâncreas é o órgão responsável pela produção de insulina. Este hormônio faz a regulação dos níveis de glicose no sangue (glicemia) (26). As células β -pancreáticas são responsáveis por sintetizar e secretar a insulina. Visando manter a glicemia constante, o pâncreas também produz outro hormônio antagônico à insulina, o glucagon. Quando os níveis glicêmicos ficam baixos, mais glucagon é secretado, visando restabelecer os níveis de glicose na circulação. A insulino-terapia causa alterações no hormônio da paratireoide, no metabolismo da vitamina D e na absorção do cálcio (27).

Independente do tipo, os pacientes diabéticos têm um baixo potencial de cicatrização dos tecidos moles e ósseos, devido à redução do metabolismo de

proteínas e aos prejuízos da função neutrofílica (26). A perda óssea não está vinculada apenas a um aumento da atividade osteoclástica. A hiperglicemia inibe a diferenciação osteoblástica e altera o hormônio da paratireoide, que regula o metabolismo do fósforo e do cálcio (28). Isso produz um efeito deletério na matriz óssea, afetando a aderência, o crescimento e acúmulo da matriz extracelular (29).

Existem substâncias químicas (aloxana e estreptozotocina) capazes de produzir radicais livres que destroem as células β -pancreáticas, induzindo diabetes do tipo 1 (30). O antibiótico estreptozotocina (STZ) causa degranulação das células produtoras de insulina, promovendo o aparecimento do diabetes. O núcleo glicérico, presente na estrutura das células beta, permite a entrada da STZ e o grupo nitrosúria, também presente nas células, promove o acúmulo de substâncias tóxicas e, conseqüente morte destas células (31).

A indução de diabetes pela STZ pode ser constatada em 24 h após a administração intraperitoneal deste agente. As alterações fisiológicas manifestadas são hiperglicemia, glicosúria, polidipsia, polifagia e poliúria. A hiperglicemia plasmática aumenta a absorção de glicose pelos néfrons dos rins, levando a um aumento da excreção de glicose na urina (glicosúria), gerando um aumento da pressão osmótica e maior retenção de água na urina (poliúria). Conseqüentemente, a ingestão de água é aumentada (polidipsia). O aumento do consumo de ração (polifagia) pode ser associado ao comprometimento do transporte de glicose para as células em virtude da falta de insulina, sendo que o animal aumenta a ingestão de ração para suprir a falta de energia celular; mesmo assim, ocorre perda progressiva de peso corporal (32).

No início da doença, a redução da formação óssea em diabéticos está mais relacionada com um menor número de osteoblastos, os quais funcionam normalmente. Em se tratando dos animais diabéticos, uma relação normal e diretamente proporcional é observada entre os eventos de formação da matriz óssea e de mineralização óssea. Porém, ao longo do tempo, a menor produção de matriz óssea, devido ao menor número de osteoblastos presentes no osso, gera distúrbios na atividade dos osteoblastos, fato observado nas alterações das taxas da síntese da matriz do colágeno e/ou mineralização óssea (33).

GRAVES *et al.* (2005) (34) observaram um aumento da expressão de mediadores inflamatórios em ratos CD-1 que se tornaram diabéticos pelo tratamento com STZ e ratos dB/dB, que desenvolvem espontaneamente diabetes tipo 1, em comparação com ratos normoglicêmicos. Verificou-se uma resposta inflamatória mais prolongada em ambos os modelos de diabetes, pela ação de duas quimiocinas, a proteína quimiotática de macrófagos (MCP)-1 e a proteína inflamatória do macrófago (MIP)-2, que atraem macrófagos e células polimorfonucleares, como também, estimulam a liberação de TNF α . Resultados semelhantes foram obtidos por WETZLER *et al.* (2000) e LU *et al.* (2004) (35,36).

As cininas são peptídeos biologicamente ativos que participam da resposta inflamatória, promovendo vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, extravasamento plasmático e migração celular (36-39). Estão presentes em condições como sepse, dano pós-isquêmico, asma, pancreatite, cistite, alergia, diabetes, artrite reumatóide, colite, gastrite e câncer, além de causarem dor e hiperalgesia (39-46). Também apresentam ações fisiológicas, participando do

controle da pressão arterial, relaxamento e contração da musculatura lisa e natriurese (40-46).

A cascata de formação das cininas compreende mecanismos bem caracterizados. As cininas são formadas a partir de α -globulinas chamadas cininogênios. São conhecidos três tipos de cininogênios que diferem em tamanho, função e estrutura. O cininogênio de alto peso molecular (High Molecular Weight Kininogen, HMWK) é uma proteína plasmática com massa molecular de 120 kDa e dá origem à bradicinina (BK). O cininogênio de baixo peso molecular (Low Molecular Weight Kininogen, LMWK) tem massa molecular de 66 kDa e origina a calidina (Lys-BK), além da BK, estando amplamente distribuído nos tecidos, em fibroblastos e em outras estruturas celulares do tecido conjuntivo. O terceiro tipo de cininogênio, tipo T, corresponde ao HMWK e é encontrado apenas em ratos (47,48).

Os cininogênios são clivados por proteases chamadas calicreínas que são encontradas no sangue (calicreína plasmática) ou nas glândulas exócrinas (calicreína tecidual). A calicreína plasmática é produzida no fígado e circula na sua forma inativada, chamada de pré-calicreína ou fator de Fletcher. Após sua clivagem, dependente da ativação do fator de Hagemann (fator XII da coagulação sangüinea), é formada a enzima ativa. A calicreína plasmática age então sobre o HMWK liberando BK. Este processo está aumentado durante a resposta inflamatória (48).

A BK tem uma meia-vida plasmática muito curta, que varia entre 10 e 50 segundos. As cininases pertencem a um grupo de enzimas responsáveis pelo metabolismo e degradação das cininas. A cininase II, conhecida também como enzima conversora da angiotensina (ECA), é encontrada na membrana das células endoteliais e age sobre as cininas, removendo o dipeptídeo da porção C-terminal e

originando metabólitos inativos. A endopeptidase neutra e a aminopeptidase plasmática também exercem um papel importante no metabolismo das cininas. A primeira está presente nas células epiteliais e utiliza um mecanismo semelhante ao da cininase II para inativar a BK (47,49). Já a aminopeptidase é capaz de converter a Lys-BK em BK, através da clivagem da porção N-terminal (50).

A cininase I, conhecida como arginina carboxipeptidase, é representada pela carboxipeptidase N (plasma) e carboxipeptidase M (membrana) e apresenta um papel menor na degradação da BK. Entretanto, essa enzima é responsável pela remoção da arginina da porção C-terminal da BK e da Lys-BK gerando os metabólitos ativos des-Arg⁹-BK e Lys-des-Arg⁹-BK, respectivamente. A cininase II possui maior afinidade pela BK e pela Lys-BK do que a cininase I, o que sugere que a formação dos metabólitos ativos não ocorre sob condições fisiológicas. De fato, a formação desses metabólitos está presente em exsudatos inflamatórios, onde a formação de fibrina aumenta a atividade da cininase I em relação à cininase II (51,52).

Depois de liberados, a BK e seus metabólitos podem ativar dois subtipos de receptores acoplados a proteína G, chamados de B₁ e B₂ (45, 53-56). A existência dos receptores B₁ e B₂ foi confirmada por estudos de clonagem e de deleção gênica (45,55, 57).

Os receptores B₂ são expressos constitutivamente na maior parte dos tecidos e apresentam alta afinidade pela BK e pela Lys-BK. Por outro lado, os receptores B₁ não são comumente expressos em condições normais, com exceção do sistema nervoso central, mas são rapidamente induzidos após estímulos como inflamação, infecção ou trauma e apresentam afinidade pelos metabólitos ativos des-Arg⁹-BK e Lys-des-Arg⁹-BK.

Considerando o perfil de indução, é possível inferir que os receptores B₁ representam alvos de grande importância para o desenvolvimento de drogas com potencial antiinflamatório e que poderiam ser úteis para o tratamento de doenças crônicas como asma, artrite, osteoartrite, neuropatias e doença periodontal, entre outras (56, 58). O receptor B₁ tem um baixo nível de expressão nos tecidos saudáveis, tendo sua expressão aumentada após a exposição a citocinas pró-inflamatórias, endotoxinas bacterianas ou níveis elevados de glicose (59,60).

De forma interessante, tem sido demonstrado que os receptores B₁ para as cininas estão envolvidos em várias complicações observadas no diabetes do tipo 1, especialmente nos quadros de neuropatia, nefropatia e retinopatia. Por exemplo, um estudo de Dias et al. (61) demonstrou que o receptor B₁ exibe um papel patológico no estágio inicial da diabetes, aumentando o estresse oxidativo e os mediadores pró-inflamatórios envolvidos na retinopatia e na neuropatia diabéticas. Um trabalho recente conduzido por Masao KA et al. (62) demonstrou que a deleção gênica dos receptores B₁ e B₂ das cininas resulta em uma redução marcante da densidade óssea, tanto em ratos diabéticos, como não-diabéticos, evidenciando a importância das cininas e seus receptores na mineralização óssea. Por outro lado, estudos prévios *in vitro* demonstraram que a estimulação dos receptores B₁ e B₂ em osteoblastos aumenta a expressão do RANKL, o que indicaria a participação destes receptores nos processos de osteoclastogênese e reabsorção óssea (63, 64,65). Foi demonstrado mais recentemente que a deleção gênica do receptor B₁ resultou em um aumento da perda óssea em um modelo de periodontite induzida por ligadura, em camundongos não diabéticos (Gonçalves-Zillo et al 2013). Curiosamente, ainda não há trabalhos que tenham investigado a correlação entre neoformação óssea e

diabetes tipo 1 e receptores B_1 das cininas. Desta forma, o presente estudo investigou os efeitos da deleção gênica do receptor B_1 das cininas em animais diabéticos, após a confecção de defeito crítico no fêmur (Imagem 1).

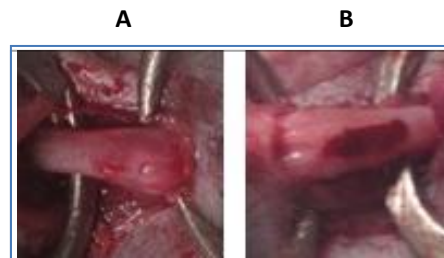


Imagem 1: Área correspondente ao defeito ósseo confeccionado no fêmur de camundongos da linhagem C57/BL6. (A) Localização da área antes do procedimento; (B) Defeito ósseo crítico instalado.

OBJETIVOS

Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar a neoformação óssea em animais com diabetes do tipo 1, bem como, verificar a relevância dos receptores B₁ para as cininas neste processo.

Objetivos específicos

- a) Avaliar a neoformação óssea em animais *wild-type* diabéticos em relação aos controles.
- b) Verificar a neoformação óssea em animais diabéticos com deleção gênica dos receptores B₁ para as cininas em comparação ao grupo controle B₁.
- c) Avaliar marcadores de reabsorção óssea nos diferentes grupos experimentais.

ARTIGO DE PESQUISA

O artigo a seguir intitula-se *“Kinin B₁ receptor lack influences bone healing in a mouse model of femur critical-size defect in streptozotocin-induced type-1 diabetes”* e foi submetido a *Proceedings of the National Academy of Sciences- PNAS* (Fator de impacto 9,737; Qualis A1 Internacional, Área de Odontologia, CAPES).

Kinin B₁ receptor lack influences bone healing in a mouse model of femur critical-size defect in streptozotocin-induced type-1 diabetes

Short Title: B₁ receptor and bone healing in type-I diabetes

Natália P. Cignachi^a, João B. Pesquero^b, Rogério B. Oliveira^a, Adriana Etges^c, Maria M. Campos^{a,d}

^aSchool of Dentistry and ^dInstitute of Toxicology and Pharmacology, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, Partenon, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

^bDepartment of Biophysics, Federal University of São Paulo, Rua Pedro de Toledo, 669, CEP 04039-032, São Paulo, SP, Brazil.

^cDepartment of Oral Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Rua Gonçalves Chaves, 457, 96015-560, Pelotas, RS, Brazil.

Corresponding Author: Maria Martha Campos, School of Dentistry/Institute of Toxicology and Pharmacology, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, Partenon, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone number: 55 51 3320 3562; Fax number: 5551 3320 3626. E-mail: camposmmartha@yahoo.com; maria.campos@pucrs.br

ABSTRACT

The effects on kinin B₁ receptor (B₁R) deletion were examined on bone regeneration in streptozotocin (STZ)-type-1 diabetic mice, subjected to a model of femoral critical-size defect. Diabetes induction in wild-type C57/BL6 (WT C57/BL6) mice was allied to decrease of body weight and hyperglycemia, in relation to the non-diabetic group of the same strain. The lack of B₁R did not affect STZ-elicited body weight loss, although it partially prevented hyperglycemia. Type-1 diabetic mice presented a clear delay in bone regeneration, with large areas of loose connective tissue within the region corresponding to the defects, when compared to wide areas of newly-formed woven bone in non-diabetic WT C57/BL6 mice. Notably, either non-diabetic or diabetic B₁R knockout (B₁RKO) mice displayed bone regeneration levels comparable to that seen in control WT C57/BL6 mice. The improved bone regeneration in animals lacking B₁R was further confirmed by analysis of collagen contents. WT C57/BL6 STZ-diabetic mice presented a marked reduction of collagen contents within the bone defect gap, whereas diabetic B₁RKO displayed collagen levels comparable to those observed in non-diabetic WT C57/BL6 or B₁RKO mice. The enhanced bone regeneration in diabetic mice lacking B₁R does not seem to be associated to lessened osteoclast activity, as no prominent difference was detected in the levels of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) positivity, or even in the immunolabeling for the proteins of the RANK/RANKL/OPG system throughout all the experimental groups. Data brings novel evidence on the relevance of B₁R under type-1 diabetes, especially concerning its role in bone regeneration after surgical procedures.

Type-1 insulin-dependent diabetes represents an autoimmune disease, affecting more than 350-million people around the world. It commonly manifests in childhood or adolescence, but a series of complications allied to long-term glucose variations are present in the adult life, making the disease a continuous challenge (1). Despite the great advances achieved during the last decades on the comprehension of the pathophysiological mechanisms underlying type-1 diabetes, in addition to improvements of treatment strategies, its global incidence is continuously growing, by reasons that still remain elusive (2; 3). Therefore, research on type-1 diabetes and its associated pathological consequences is a current matter of high interest.

One of the relevant consequences of type-1 diabetes is the altered bone metabolism, with the occurrence of osteopenia and osteoporosis, widely affecting the life quality of patients (4; 5). Remarkably, type-1 diabetes has been related to increased risks of fractures and delayed fracture healing (6; 7; 1). The mechanisms responsible for bone alterations under type-1 diabetes are not completely clarified, but inflammatory changes, including the increase of both serum and bone cytokines, appear to be of high importance in this context (8; 9).

Kinins are peptide mediators implicated in a number of physiological and pathological processes, including pain and inflammation. It is renowned that kinins act by the activation of two distinct G-protein-coupled receptors, called B₁ (B₁R) and B₂ (B₂R) (10; 11). These receptors display very peculiar characteristics, mainly concerning their pattern of expression. In this regard, the B₂R subtype is constitutively expressed throughout many organs, whereas B₁R is not generally present under normal situations, but its expression is induced during inflammatory

states, by means of cytokine-related mechanisms (12; 13). Of high interest, B₁R and B₂R have been pointed out as relevant players in several complications associated to type-1 diabetes, including diabetic nephropathy, retinopathy and pain neuropathy (14; 15; 16; 17). Concerning the bone biology, there is controversial data on the role of kinins and their receptors. In this regard, it was demonstrated that agonist stimulation of either B₁R or B₂R leads to bone resorption in the neonatal mouse bone calvaria, and the activation and expression of both receptors is able to potentiate cytokine-induced inflammatory changes in osteoblastic cell lines and in mouse calvarial bone (18; 19; 20; 21; 22). Otherwise, a study conducted by Kakoki et al. (23) demonstrated that double B₁R/B₂R gene deletion resulted in enhanced kidney injury, neuropathy, and bone mineral density loss, as evaluated in Akita diabetic mice. Furthermore, a protective role for kinin receptors has been also suggested more recently (24), by demonstrating that B₁R knockout (B₁RKO) mice presented an increase of bone resorption following ligature-induced periodontal disease, although the influence of diabetes has not been examined by the authors. Considering the abovementioned pieces of data, the present study was devoted to evaluate whether the genic deletion of the inflammation-related receptor B₁R might influence the bone healing process in a model of femoral critical-size defect, in type-1 diabetic mice. Our results brings novel and interesting evidence, indicating that lack of B₁R helps bone healing in type-1 diabetes. It is tempting to suggest that local measures, such as the local use of B₁R antagonists could improve bone regeneration and implant integration in diabetes

Methods

Animals. Male C57/BL6 wild-type (WT; total N=17) or kinin B₁ receptor knockout (B₁RKO; total N = 17) mice (25 to 32 g) were used in this study. C57/BL6 mice were obtained from Universidade Federal de Pelotas (UFPEL; Pelotas, RS, Brazil) and B₁RKO were supplied by Department of Biophysics, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP-EPM, São Paulo, Brazil). These mice were crossed for ten generations with C57/BL6 mice (39). The animals were housed in groups of four per cage and maintained in controlled temperature (22±2°C) and humidity (60-70%), under a 12 h light-dark cycle, with food and water *ad libitum*. All the experimental procedures were carried the out in accordance with the Guidelines for the Use and Care with Laboratorial Animals from National Institute of Health and ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animal, and were approved by the Local Animal Ethics Committee (protocol number 13/00037). The number of animals and the intensity of noxious stimuli were the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of the experiments.

Induction of type-1 diabetes. WT C57/BL6 and B₁RKO mice were divided in four experimental groups: (1) WT C57/BL6 control (N=7); (2) WT C57/BL6 diabetic (N=10); B₁RKO control (N=7); (4) B₁RKO diabetic (N=10). Type-1 diabetes was induced by five injections of streptozotocin (STZ; 50 mg/kg), once a day, given intraperitoneally (i.p.), dissolved in citrate buffer (50 mM; pH 4.5) (27). Non-diabetic groups received citrate buffer vehicle alone i.p., at the same schedule of administration. The body weight gain was measured periodically throughout the experiments on the basis of individual body weight (in g) at the onset of experiments, considering that B₁RKO

mice are leaner in relation to age-matched control WT C57/BL6 (25). At the end of experimental procedures (33 days after beginning STZ treatment), the animals were euthanized by isoflurane inhalation. The blood was collected and glucose levels were expressed in mg/dl (Accutrend®; Roche Diagnostics).

Femur critical-size defect. All the surgical procedures were performed under aseptic conditions, following seven days of the end of diabetes induction protocol (at the 12nd day), considering the last application of STZ (5th day). The critical-size defects were created according to the methodology previously described by Srouji et al. (40), with slight modifications. Briefly, the animals were anesthetized by an i.p. injection of a mixture of xylazine (10 mg/kg) and ketamine (100 mg/kg). After anesthesia confirmation, the access to the left mouse femur was made through a skin incision (6 to 8 mm in length), followed by muscle divulsion and periosteum detachment. The osteotomy was carried out under irrigation, by using a surgical contra-angle hand-piece (800 rpm), to create a mono-cortical bone defect (4-mm in length and 1-mm in diameter). Following the creation of defect, the soft tissues were sutured in separate layers, and the animals received antibiotic and analgesic post-operative medication. The procedures were performed by a single researcher calibrated before. After 21 days of surgery (at the 33rd day after onset of experimental sessions), the animals were euthanized as described before, and the femurs were removed immediately, cleaned from connecting tissues, and maintained in 4 %-buffered formaldehyde solution during 48 h, for subsequent histological procedures.

General histological procedures. Following fixation procedures, the pieces were decalcified in a 17-% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution, for 6 days, with daily changes, and embedded in paraffin. Six consecutive 4- μ m-thick longitudinal sections were obtained from each femur, for different sets of analysis. Three slides were separated to immunohistochemical analysis, as described in the next section. The remaining three slides were stained with Hematoxyllin-Eosin (H&E), Masson's trichrome (Accustain Mallory's stain kit, Sigma-Aldrich, USA), and tartrate-resistant acid phosphate (Leukocyte TRAP kit, Sigma-Aldrich, USA), respectively. The images were taken with a microscope (Axio Imager A1) coupled to an image capture system (Axio Vision Rel. 4.4 Software Multimedia), both from Imaging Solution Carl Zeiss (Hallbergmoos, Germany). The NIH Image J 1.36b Software was used to semi-quantitatively determine the percentual area of bone formation in relation to the total area in H&E-stained slides. The same software was used for analyzing blue-colored collagen fibers in Mallory-stained slides (200-x magnification, for both stainings). TRAP-stained activated osteoclasts were analyzed only qualitatively under 400-x magnification. The examinations were performed in a blinded manner, on two representative fields corresponding to the area of the defect gap.

Immunohistochemical analysis. Analysis of the RANKL/RANK/OPG system was carried out by the immunoperoxidase method, using paraffin-embedded sections. Briefly, antigen retrieval was performed by immersion of slides in a water bath at 95–98° C in 10 mM trisodium citrate buffer, pH 6.0, for 45 min. The nonspecific binding was blocked by incubating sections for 1 h with goat normal serum diluted in

PBS. As primary antibodies OPG (sc-21038, Santa Cruz Biotechnology), RANK (sc-7626, Santa Cruz Biotechnology) and RANKL (sc-7627, Santa Cruz Biotechnology) were used. After overnight incubation at 4°C with primary antibodies, the slides were washed with PBS and incubated with the secondary antibody Envision plus (Dako Cytomation, Houston, TX, USA), ready to use, for 1 h at room temperature. The sections were washed in PBS, and the visualization was completed by using 3, 3'-diaminobenzidine (Dako Cytomation) in chromogenic solution and counterstained lightly with Harris's Hematoxylin solution. The images were captured by a digital camera (CoolSNAP™ Media Cybernetics, Inc.) connected to an optical microscope (Zeiss Axioskop DS-5 M-L1, Nikon, NY, USA), at 200-x magnification for counting the number of positive brown-marked cells.

Statistical Analysis. Results are presented as the mean \pm SEM of 7 to 10 animals, depending on the experimental group. The statistical comparison between the values was performed by one-way analysis of variance followed by Bonferroni's post-test. P values less than 0.05 ($p < 0.05$) were considered as indicative of significance.

Results

Body weight and glycaemia in type-1 diabetes streptozotocin (STZ) model.

Extending literature data (25), control mice lacking B₁R were leaner in relation to WT C57/BL6 animals, according to the evaluation at 33 days of experimental sessions. STZ-induced type-1 diabetes was associated with a progressive loss of body weight gain, in WT C57/BL6 and B₁RKO mice, when compared to non-diabetic animals of either strain (Fig. 1, upper panel). Of note, WT C57/BL6 STZ-treated mice had a significant increase of glucose levels ($P<0.01$), an effect that was partially reversed by B₁R deletion (Fig. 1; lower panel).

B₁R genic deletion and general improvement of bone healing in type-1 diabetes.

The evaluation of Hematoxyllin & Eosin (H&E)-stained slides demonstrated the predominance of woven bone, filling the area correspondent to the defect gap in non-diabetic WT C57/BL6 mice, in comparison to wide areas of disorganized loose connective tissue in WT C57/BL6 STZ-type-1 diabetic mice. Of high note, the bone formation observed in either non-diabetic or diabetic B₁RKO mice was very similar to that seen in control WT C57/BL6 animals, with large areas of immature bone matrix, pointing out the occurrence of active regeneration process (Fig. 2, upper panels). The semi-quantitative analysis of H&E stained slides confirmed the qualitative examination of images, clearly indicating larger areas of newly-formed bone in control WT C57/BL6 mice, and in both non-diabetic and diabetic B₁RKO mice, in comparison to WT C57/BL6 STZ-type-1 diabetic animals (Fig. 2, lower panel; $P<0.05$). To gain further insights into the potential differences in bone regeneration between WT C57/BL6 and B₁RKO mice during type-1 diabetes, we also carried out an analysis

of the percentage of collagen contents in the area of the defect gap, by using Masson's trichrome staining. The qualitative evaluation clearly revealed that STZ-treated WT C57/BL6 mice presented less areas filled by collagen, which is indicative of delayed bone regeneration and low tissue organization, in comparison to the other experimental groups (Fig. 3, upper panels). The quantification of collagen-rich blue-colored regions by using NIH Image J 1.36b Software corroborated the reduced number of collagen levels in diabetic WT C57/BL6 animals, when compared to control non-diabetic WT C57/BL6 mice ($P < 0.05$). In this case, genic deletion of B_1R was also allied to improved bone healing, as demonstrated by the absence of differences between non-diabetic and diabetic B_1RKO mice (Fig. 3, lower panel).

Deletion of B_1R and osteoclast-related tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) in type-1 diabetes. In this study, we have also performed qualitative evaluation of osteoclast activity, by analyzing TRAP staining. An overall analysis revealed that TRAP activity in WT C57/BL6 diabetic mice was generally similar to that observed in non-diabetic WT C57/BL6 animals, following examination of areas corresponding to the bone defect. Furthermore, a similar profile regarding TRAP staining was noted in non-diabetic and diabetic mice lacking B_1R (Fig. 4). Thus, the differences of bone regeneration between diabetic and non-diabetic WT C57/BL6 mice, and the improvement of bone healing in diabetic mice lacking B_1R does not seem to rely on distinct osteoclast activity profiles among the experimental groups.

Lack of B₁R does not affect RANK/RANKL/OPG axis in critical-size defects under type-1 diabetes. Next, we evaluated the expression of the proteins of the RANK/RANKL/OPG system throughout the four distinct experimental groups, by immunohistochemistry. This set of data did not reveal any significant difference among the experimental groups, regarding the number of immunopositive cells/field for RANK (Fig. 5), RANKL (Fig 6) or OPG (Fig. 7). There were no significant differences when comparing control WT C57/BL6 versus STZ-treated WT C57/BL6 mice, or even when comparing non-diabetic and diabetic mice of both evaluated animals strains.

Discussion

The onset and progression of type-1 diabetes is associated to a series of complications, compromising multiple tissues. Both clinical and pre-clinical studies have broadly demonstrated the increased risk of bone fractures under type-1 diabetes, what is attributed to reduced bone mineral density and alterations of bone matrix proteins (9). Interestingly, it has been suggested that inflammation displays a relevant role on type-1 diabetes-allied bone alterations (8; 26). In this concern, kinins are mediators associated to several pathological alterations, including chronic inflammatory diseases, cancer and diabetes, among others (12; 10; 15). As far we know, there is only one study investigating the relationship between kinin receptors and bone characteristics in diabetes, by using double B_1R/B_2RKO mice (23). Herein, we examined whether the lack of the inflammatory-related kinin B_1R might affect bone regeneration in a model of femoral critical-size defect, in STZ type-1 diabetic mice. Our data shed new lights on the role of kinin receptors in diabetes and bone alterations.

As expected, the induction of type-1 diabetes by the repeated administration of STZ resulted in a marked decrease of body weight gain and significant hyperglycemia, in comparison to control WT C57/BL6 mice (27). Concerning the non-diabetic B_1RKO mice, they were leaner than control WT C57/BL6 mice, as evaluated at the end of the experimental procedures. This data extends previous evidence showing that B_1R deletion results in a slight reduction of body weight, in relation to WT C57/BL6 control mice (25). Otherwise, the genic deletion of B_1R did not protect from reduction in body weight gain under STZ-induced type-1 diabetes, whereas it prevented the hyperglycemia observed in this model. A previous publication (28)

demonstrated that genic deletion of B₁R was able to evidently prevent the thermal nociception allied to STZ-induced type 1 diabetes, although the authors had not investigated the influence of B₁R lacking on body weight loss, or glucose levels after type-1 diabetes induction. Nevertheless, it was demonstrated prior that pharmacological inhibition of B₁R by the selective antagonists R-715 or SSR240612 displayed transitory, but significant effects on STZ-induced hyperglycemia in rats (29), supporting our data on B₁RKO mice and the control of glucose levels.

As the main goal of our study, we evaluated whether B₁R deletion might interfere with bone regeneration in type-1 diabetic mice, presenting a critical-size femoral defect. It is well defined that type-1 diabetes is associated with increased rates of bone fractures, likely due to reduced bone mineral density, as a consequence of poor glycemic control and oxidative stress (7; 6; 4; 9). Herein, we demonstrate that STZ-type-1 diabetic WT C57/BL6 mice presented delayed bone regeneration, as it can be observed on the basis of H&E-stained sections, which demonstrates the presence of great areas filled by loose disorganized tissue in this experimental group. In contrast, WT C57/BL6 mice presented extensive areas of woven bone within the region correspondent to the critical defect, a clear indicative of new bone formation. Some previous reports have provided similar data indicating that type-1 diabetes impaired the bone healing around implants, in both rodent and non-rodent experimental models (30; 31; 32; 33), what points out the clinical relevance of further studies in this area. Of high note, we provide novel evidence showing that diabetic mice lacking B₁R displayed a pattern of bone regeneration similar to that observed in non-diabetic WT C57/BL6 or B₁RKO animals. Therefore, we might suggest that B₁R activation and/or up-regulation could be associated to

deleterious consequences of type-1 diabetes on bone remodeling. This hypothesis can be supported by a series of earlier publications showing the ability of kinins in stimulating bone resorption-related mechanisms, either *in vivo* or *in vitro*, via activation of B₁R or B₂R (18; 19; 20; 21; 22). Nonetheless, our data is somewhat contradictory to the previous publication by Kakoki et al. (23) showing that double B₁R/B₂R deletion resulted in increased bone mineral losses in animals with diabetogenic Akita mutation. This divergence might be explained by several reasons, including (i) the chemical model of type-1 diabetes adopted by us; (ii) the use of B₁RKO mice instead of double B₁R/B₂R KO animals; and (iii) the evaluation of active bone remodeling process, following the creation of a critical-size defect. More recently, it was shown that B₁RKO mice displayed increased bone resorption in a model of ligature-induced periodontitis; however the authors did not assess the influence of diabetes, and there is a clear infectious component in this experimental approach (24), which is not the case of our study.

In the present study, we also examined the levels of collagen throughout the different experimental groups. It is well-known that collagen is essential to provide the ideal properties of bone, such as the mechanical resistance to fractures (34). In this regard, a reduced bone expression of type 1 collagen was described in STZ-type-1 diabetic mice subjected to a model of tibia marrow ablation (35). Similarly, the contents of type I collagen were found diminished in alloxan-type-1 diabetic rabbits after maxillary sinus augmentation (31). Furthermore, it has been recently demonstrated that either genetic or chemical induction of type-1 diabetes leads to decreased expression of collagen II, what is linked to impaired cartilage formation in mice (36). Herein, Masson's trichrome staining revealed a prominent reduction of

collagen levels in WT C57/BL6 STZ-diabetic mice, following the examination of the area corresponding to the bone defect gap, in contrast to non-diabetic control WT C57/BL6 animals. Strikingly, collagen reduction was not evident in diabetic mice presenting B₁R gene deletion, being comparable to that seen in control B₁RKO mice. This experimental evidence helps to explain the differences in bone regeneration between diabetic mice of WT and B₁RKO strains, allowing suggesting a possible role for B₁R in the formation of bone organic matrix and mineralization. It is worth mentioning that B₁R deletion prevented both cardiac inflammation and fibrosis in STZ-elicited type-1 diabetes in mice (37).

As an additional approach, we decided to examine to what extent the lack of B₁R might alter some markers of osteoclast differentiation under type-1 diabetes. Firstly, we evaluated TRAP-stained sections, as an indicative of osteoclast activity. This set of data did not reveal any expressive difference on TRAP staining among all the evaluated groups, independent on diabetes induction or mouse strain. In fact, it was possible to observe positive TRAP staining in most evaluated sections, indicating a great level of bone turnover in our model of femoral critical-size defect. As revised by McCabe et al. (9), the osteoclast markers can be found unaltered, decreased, or even increased in mouse models of type-1 diabetes, what might support our data. For instance, TRAP activity was not found altered in bone tibia obtained from STZ-treated rats, in relation to control-matched animals (38). When analyzed in the light of literature data, our results permit to propose that delayed bone regeneration in STZ-type-1 diabetic animals is likely related to decreased levels of osteoblastic factors (such as type 1 collagen), rather than increased osteoclast activity, at least at the experimental conditions adopted by us. Moreover, the positive effects of B₁R

deletion on diabetes-induced delayed regeneration can be interpreted as the result of anti-hyperglycemic effects, and the consequent improvement of bone matrix remodeling, without alterations of osteoclast activity. In this paper, we have also assessed to what extent the expression of the RANK/RANKL/OPG system might be altered in the areas corresponding to the defect gap under STZ-induced diabetes, in WT C57/BL6 or B₁RKO mice. Extending data on TRAP staining, we were not able to detect any significant difference among the expression of the three evaluated proteins in non-diabetic and diabetic mice of both strains. Concerning B₁R, the study conducted by Gonçalves-Zillo et al. (24) demonstrated an increased number of osteoclasts in animals lacking this receptor, by inducing *in vitro* differentiation of bone marrow cells by M-CSF and RANKL, contrasting to some degree with our data. In fact, the deleterious or potential effects of kinins and their receptor appear to greatly differ, depending on the target organs and pathological conditions that are evaluated (10). Indeed, further studies devoted to explore the influence of B₁R activation on osteoblasts and osteoclast functions remain to be carried out, by using other molecular markers of bone turnover.

Altogether, data present in this study extends previous evidence on the relevance of kinin B₁R under type-1 diabetes, and provide novel evidence on the role of this receptor in bone regeneration. We hope this data might help, in a near future, to develop new therapeutic strategies to provide superior outcomes for type-1 diabetic patients subjected to bone surgeries.

1. Pan H, Wu N, Yang T, He W. Association between bone mineral density and type 1 diabetes mellitus: a meta-analysis of cross-sectional studies. *Diabetes Metab Res Rev.* 2013; doi: 10.1002/dmrr.2508.
2. Egro FM. Why is type 1 diabetes increasing? *J Mol Endocrinol.* 2013; 51(1):R1-13.
3. Vehik K, Ajami NJ, Hadley D, Petrosino JF, Burkhardt BR. The changing landscape of type 1 diabetes: recent developments and future frontiers. *Curr Diab Rep.* 2013; 13(5):642-50.
4. Blakytyn R, Spraul M, Jude EB. Review: The diabetic bone: a cellular and molecular perspective. *Int J Low Extrem Wounds.* 2011; 10(1):16-32.
5. Kurra S, Siris E. Diabetes and bone health: the relationship between diabetes and osteoporosis-associated fractures. *Diabetes Metab Res Rev.* 2011; 27(5):430-5.
6. Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Diabetes and its complications and their relationship with risk of fractures in type 1 and 2 diabetes. *Calcif Tissue Int.* 2009; 84(1):45-55.
7. Khazai NB, Beck GR Jr, Umpierrez GE. Diabetes and fractures: an overshadowed association. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2009; 16(6):435-45.

8. Motyl KJ, Botolin S, Irwin R, Appledorn DM, Kadakia T, Amalfitano A, Schwartz RC, McCabe LR. Bone inflammation and altered gene expression with type 1 diabetes early onset. *J Cell Physiol.* 2009; 218(3):575-83.
9. McCabe L, Zhang J, Raehtz S. Understanding the skeletal pathology of type 1 and 2 diabetes mellitus. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2011; 21(2):187-206.
10. Regoli D, Plante GE, Gobeil F Jr. Impact of kinins in the treatment of cardiovascular diseases. *Pharmacol Ther.* 2012; 135(1):94-111.
11. Whalley ET, Figueroa CD, Gera L, Bhoola KD. Discovery and therapeutic potential of kinin receptor antagonists. *Expert Opin Drug Discov.* 2012; 7(12):1129-48.
12. Calixto JB, Medeiros R, Fernandes ES, Ferreira J, Cabrini DA, Campos MM. Kinin B₁ receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. *Br J Pharmacol.* 2004; 143(7):803-18.
13. Campos MM, Leal PC, Yunes RA, Calixto JB. Non-peptide antagonists for kinin B₁ receptors: new insights into their therapeutic potential for the management of inflammation and pain. *Trends Pharmacol Sci.* 2006; 27(12):646-51.
14. Webb JG. The kallikrein/kinin system in ocular function. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2011; 27(6):539-43.
15. Talbot S, Couture R. Emerging role of microglial kinin B₁ receptor in diabetic pain neuropathy. *Exp Neurol.* 2012; 234(2):373-81.

16. Tomita H, Sanford RB, Smithies O, Kakoki M. The kallikrein-kinin system in diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 2012; 81(8):733-44.
17. Liu J, Feener EP. Plasma kallikrein-kinin system and diabetic retinopathy. *Biol Chem.* 2013; 394(3):319-28.
18. Ljunggren O, Vavrek R, Stewart JM, Lerner UH. Bradykinin-induced burst of prostaglandin formation in osteoblasts is mediated via B₂ bradykinin receptors. *J Bone Miner Res.* 1991; 6(8):807-15.
19. Brechter AB, Lerner UH. Bradykinin potentiates cytokine-induced prostaglandin biosynthesis in osteoblasts by enhanced expression of cyclooxygenase 2, resulting in increased RANKL expression. *Arthritis Rheum.* 2007; 56(3):910-23.
20. Brechter AB, Persson E, Lundgren I, Lerner UH. Kinin B₁ and B₂ receptor expression in osteoblasts and fibroblasts is enhanced by interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha. Effects dependent on activation of NF-kappaB and MAP kinases. *Bone.* 2008; 43(1):72-83.
21. Suzuki Y, Kodama D, Goto S, Togari A. Involvement of TRP channels in the signal transduction of bradykinin in human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; 410(2):317-21.
22. Souza PP, Brechter AB, Reis RI, Costa CA, Lundberg P, Lerner UH. IL-4 and IL-13 inhibit IL-1 β and TNF- α induced kinin B1 and B2 receptors through a STAT6-dependent mechanism. *Br J Pharmacol.* 2013; 169(2):400-12.

23. Kakoki M, Sullivan KA, Backus C, Hayes JM, Oh SS, Hua K, Gasim AM, Tomita H, Grant R, Nossov SB, Kim HS, Jennette JC, Feldman EL, Smithies O. Lack of both bradykinin B₁ and B₂ receptors enhances nephropathy, neuropathy, and bone mineral loss in Akita diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(22):10190-5.
24. Gonçalves-Zillo TO, Pugliese LS, Sales VM, Mori MA, Squaiella-Baptistão CC, Longo-Maugéri IM, Lopes JD, de Oliveira SM, Monteiro AC, Pesquero JB. Increased bone loss and amount of osteoclasts in kinin B₁ receptor knockout mice. *J Clin Periodontol*. 2013; 40(7):653-60.
25. Mori MA, Sales VM, Motta FL, Fonseca RG, Alenina N, Guadagnini D, Schadock I, Silva ED, Torres HA, dos Santos EL, Castro CH, D'Almeida V, Andreotti S, Campaña AB, Sertié RA, Saad MJ, Lima FB, Bader M, Pesquero JB. Kinin B₁ receptor in adipocytes regulates glucose tolerance and predisposition to obesity. *PLoS One*. 2012; 7(9):e44782.
26. Schett G, David JP. The multiple faces of autoimmune-mediated bone loss. *Nat Rev Endocrinol*. 2010; 6(12):698-706.
27. Zauli G, Toffoli B, di Iasio MG, Celeghini C, Fabris B, Secchiero P. Treatment with recombinant tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand alleviates the severity of streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes*. 2010;59(5):1261-5.

28. Gabra BH, Merino VF, Bader M, Pesquero JB, Sirois P. Absence of diabetic hyperalgesia in bradykinin B₁ receptor-knockout mice. *Regul Pept.* 2005; 127(1-3):245-8.
29. Talbot S, Chahmi E, Dias JP, Couture R. Key role for spinal dorsal horn microglial kinin B₁ receptor in early diabetic pain neuropathy. *J Neuroinflammation.* 2010; 7(1):36.
30. Margonar R, Sakakura CE, Holzhausen M, Pepato MT, Alba Jr. RC, Marcantonio Jr. E. The influence of diabetes mellitus and insulin therapy on biomechanical retention around dental implants: a study in rabbits. *Implant Dent.* 2003; 12(4):333-9.
31. Von Wilmowsky C, Stockmann P, Harsch I, Amann K, Metzler P, Lutz R, Moest T, Neukam FW, Schlegel KA. Diabetes mellitus negatively affects peri-implant bone formation in the diabetic domestic pig. *J Clin Periodontol.* 2011; 38(8):771-9.
32. Mao L, Tamura Y, Kawao N, Okada K, Yano M, Okumoto K, Kaji H. Influence of diabetic state and vitamin D deficiency on bone repair in female mice. *Bone.* 2013; S8756-3282(13)00546-2.
33. Molon RS, Morais-Camilo JA, Verzola MH, Faeda RS, Pepato MT, Marcantonio E Jr. Impact of diabetes mellitus and metabolic control on bone healing around osseointegrated implants: removal torque and histomorphometric analysis in rats. *Clin Oral Implants Res.* 2013; 24(7):831-7.

34. Viguet-Carrin S, Garnero P, Delmas PD. The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int.* 2006; 17(3):319-36.
35. Lu H, Kraut D, Gerstenfeld LC, Graves DT. Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation. *Endocrinology.* 2003; 144(1):346-52.
36. Coe LM, Zhang J, McCabe LR. Both spontaneous *Ins2(+/-)* and streptozotocin-induced type 1 diabetes cause bone loss in young mice. *J Cell Physiol.* 2013; 228(4):689-95.
37. Westermann D, Walther T, Savvatis K, Escher F, Sobirey M, Riad A, Bader M, Schultheiss HP, Tschöpe C. Gene deletion of the kinin receptor B1 attenuates cardiac inflammation and fibrosis during the development of experimental diabetic cardiomyopathy. *Diabetes.* 2009; 58(6):1373-81.
38. Hie M, Iitsuka N, Otsuka T, Tsukamoto I. Insulin-dependent diabetes mellitus decreases osteoblastogenesis associated with the inhibition of Wnt signaling through increased expression of *Sost* and *Dkk1* and inhibition of Akt activation. *Int J Mol Med.* 2011; 28(3):455-62.
39. Quintão NL, Passos GF, Medeiros R, Paszcuk AF, Motta FL, Pesquero JB, Campos MM, Calixto JB. Neuropathic pain-like behavior after brachial plexus avulsion in mice: the relevance of kinin B₁ and B₂ receptors. *J Neurosci.* 2008; 28(11):2856-63.

40. Srouji S, Ben-David D, Kohler T, Müller R, Zussman E, Livne E. A model for tissue engineering applications: femoral critical size defect in immunodeficient mice. *Tissue Eng Part C Methods*. 2011;17(5):597-606.

Figure Legends

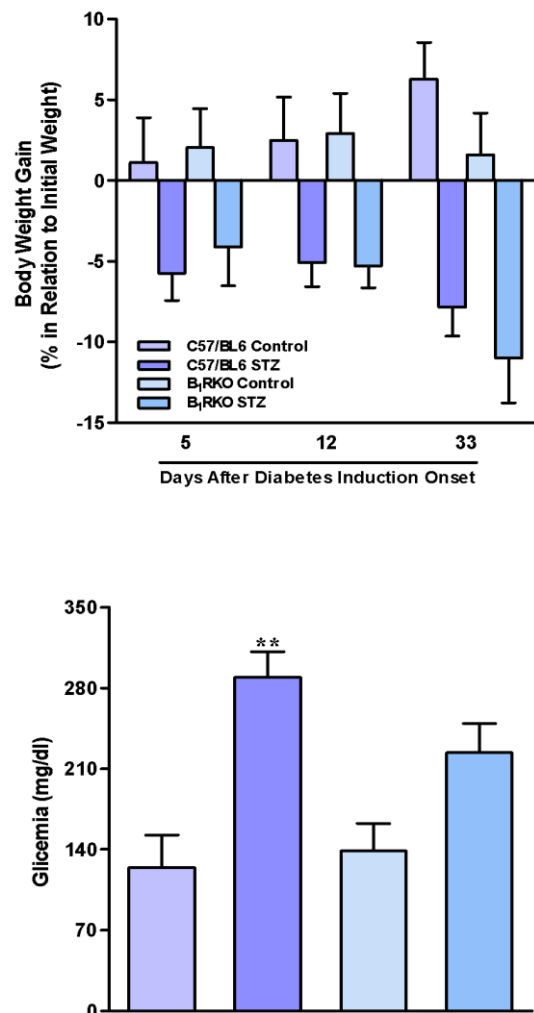


Fig. 1. Body weight gain and blood glucose levels in WT and B₁RKO in STZ-induced type 1 diabetes. The weight gain was calculated at different time-points, as the percentage of increase in relation to the individual body weight at the beginning of experiments. The blood glucose levels are provided in mg/dl. Data is presented as the mean \pm standard error mean of 7-10 animals per group. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ denotes significance in relation to the respective control group (ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test).

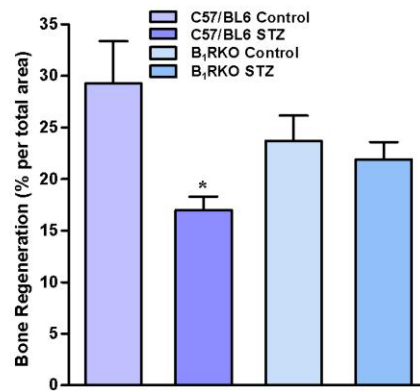
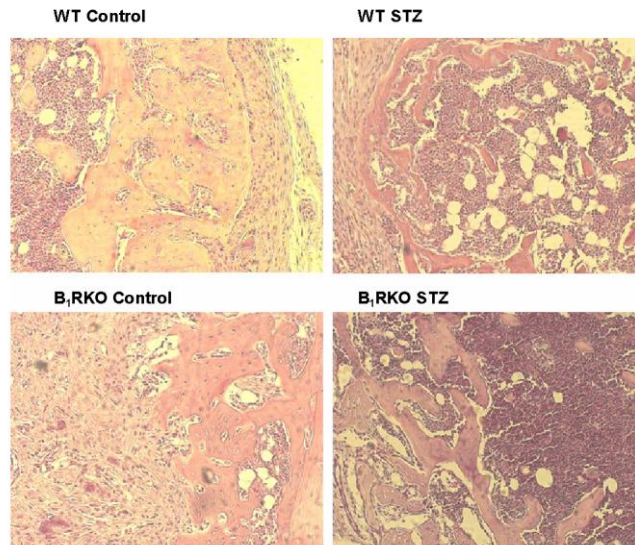


Fig. 2. Representative images of H&E staining throughout different experimental groups (upper panels), and semi-quantitative analysis of the percentage of newly-formed bone in comparison to the total analyzed area (lower panel). Data is presented as the mean \pm standard error mean of 7-10 animals per group. * $P < 0.05$ denotes significance in relation to the respective control group (ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test).

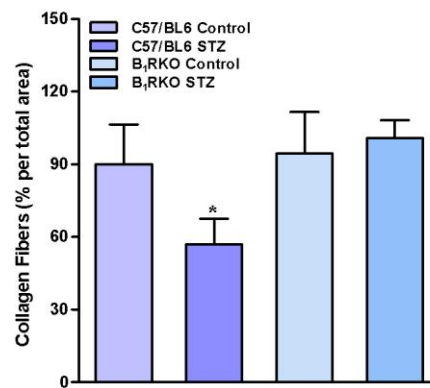
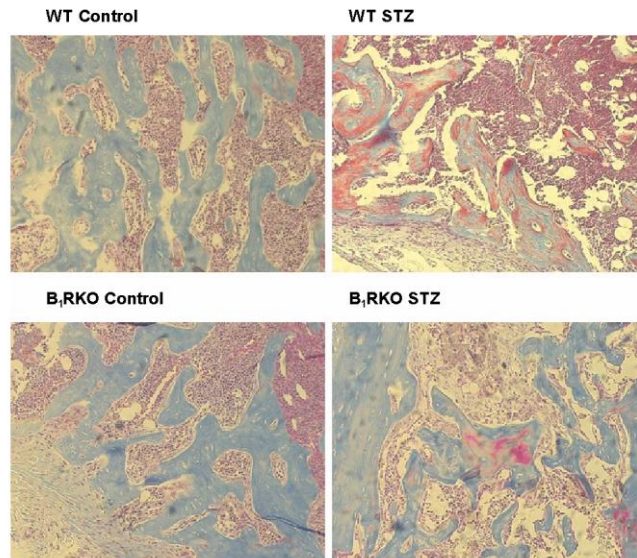


Fig. 3. Representative images of Masson's trichrome staining throughout different experimental groups (upper panels), and semi-quantitative analysis of the percentage of collagen fibers in comparison to the total analyzed area (lower panel). Data is presented as the mean \pm standard error mean of 7-10 animals per group. * $P < 0.05$ denotes significance in relation to the respective control group (ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test).

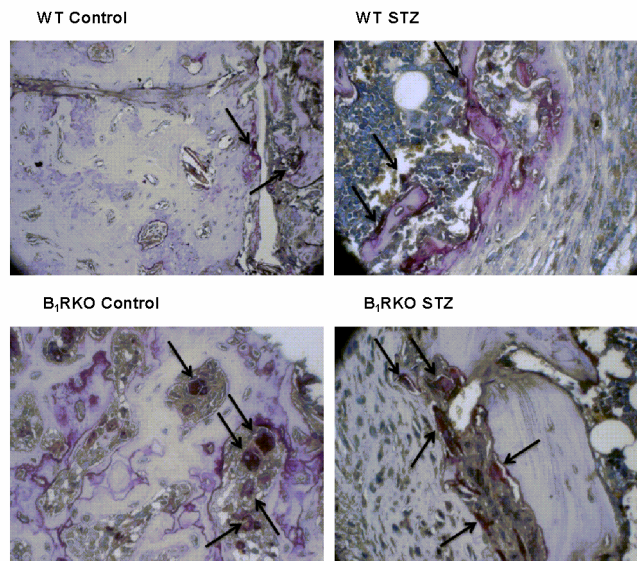


Fig. 4. Representative images of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining throughout the four different evaluated experimental groups. The arrows indicate positive labeling. The images are representative of analysis of 7-10 animals per group.

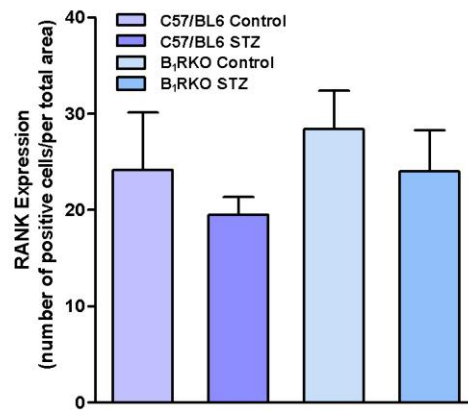
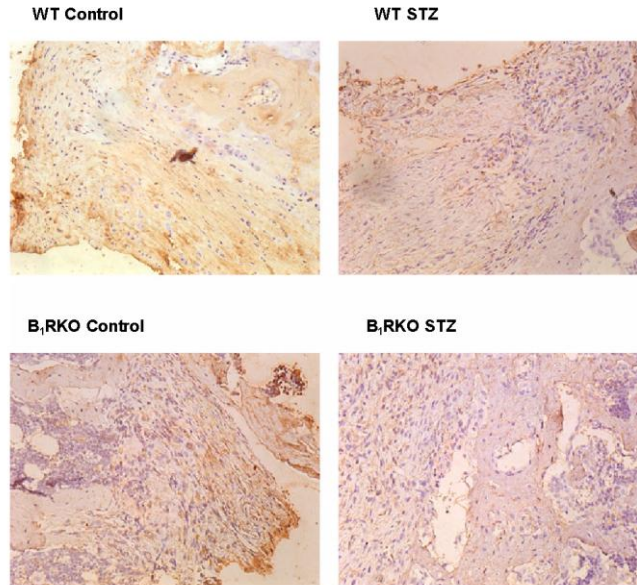


Fig. 5. Representative images of immunohistochemical analysis for RANK expression throughout different experimental groups (upper panels), and quantitative analysis of the number of positive cells/field (lower panel). Data is presented as the mean \pm standard error mean of 7-10 animals per group.

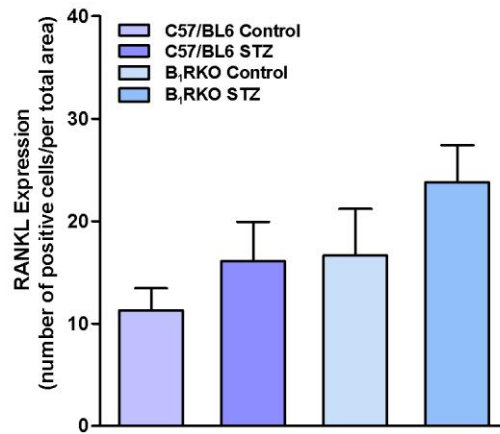
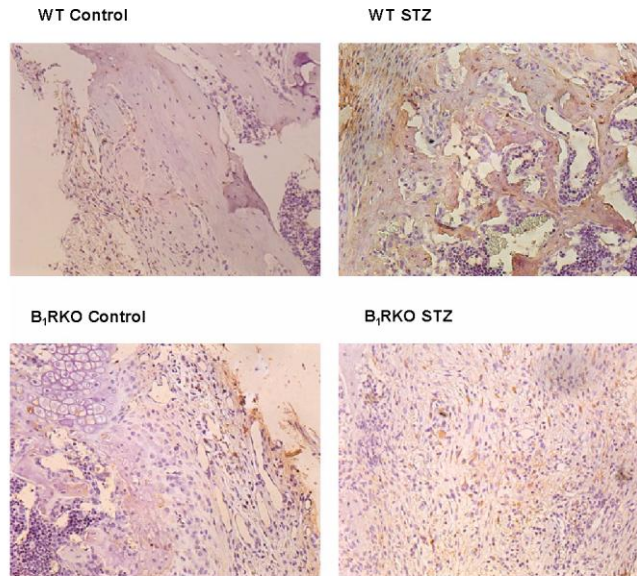


Fig. 6. Representative images of immunohistochemical analysis for RANKL expression throughout different experimental groups (upper panels), and quantitative analysis of the number of positive cells/field (lower panel). Data is presented as the mean \pm standard error mean of 7-10 animals per group.

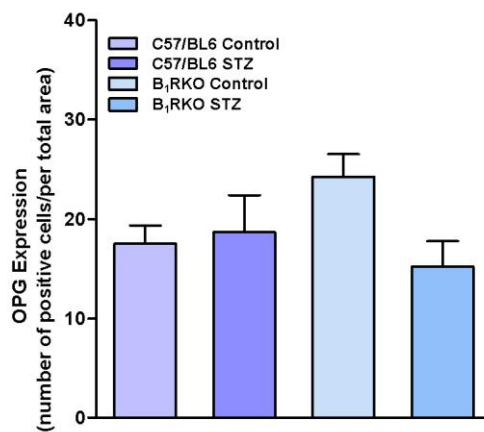
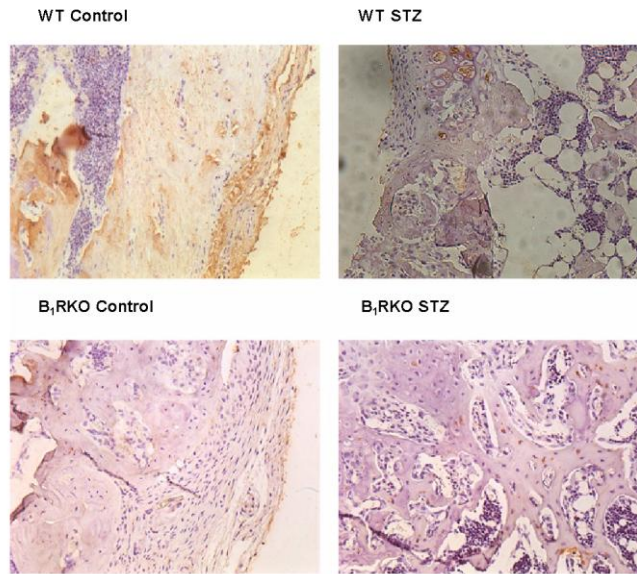


Fig. 7. Representative images of immunohistochemical analysis for OPG expression throughout different experimental groups (upper panels), and quantitative analysis of the number of positive cells/field (lower panel). Data is presented as the mean \pm standard error mean of 7-10 animals per group.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como visto na literatura atualmente, o aumento da prevalência de Diabetes Mellitus na população mundial tem preocupado os profissionais da saúde, inclusive cirurgiões-dentistas, pela repercussão dessa doença, em nível bucal, com manifestações mais severas na periodontite, assim como, interferências no processo de osseointegração de implantes.

Tem-se notado uma diferença de cicatrização, tanto de tecidos moles, quanto ósseos, até mesmo, quando os níveis glicêmicos desses pacientes encontram-se controlados. Os sinais e sintomas do diabetes tipo 1 são mais evidentes que do tipo 2; normalmente, os pacientes desse primeiro grupo desenvolveram a doença precocemente, na infância ou adolescência. Porém, as complicações vão se agravando ao longo da vida.

O diabetes interfere ao nível ósseo, pois ocorre uma desregulação hormonal, como, também uma deficiência na absorção do cálcio e da vitamina D. Notavelmente, o diabetes tipo 1 tem sido associado com um aumento no risco de fraturas e atraso na cicatrização das mesmas. Visto que a perda óssea não está vinculada apenas a um aumento da atividade osteoclástica, tem-se buscado estudar o processo de remodelação óssea de forma integral.

O evento de neoformação e reabsorção óssea é controlado pelos osteoblastos e osteoclastos, respectivamente, através da ativação ou bloqueio do receptor presente na membrana dos osteoblastos (RANK). Curiosamente, os mecanismos relacionados com o desequilíbrio desse sistema ainda não foram totalmente esclarecidos.

Como o diabetes é uma doença metabólica e inflamatória, é possível sugerir a sua interação com peptídeos biologicamente ativos que participam desse processo. Esses peptídeos, chamados cininas, estão presentes em condições inflamatórias decorrentes de algum dano tecidual, como em situações fisiológicas.

A bradicinina e seus metabólitos podem ativar dois tipos de receptores acoplados a proteína G, chamados de B₁ e B₂. No presente trabalho, optou-se estudar o papel do receptor B₁, por ele ser expresso após um processo de inflamação, infecção ou trauma. Considerando esse perfil de indução, os receptores

B₁ são alvos para o desenvolvimento de drogas com potencial antiinflamatório que poderiam ser úteis para doenças crônicas como o diabetes. Este receptor está associado com diversas complicações associadas ao diabetes tipo 1, como nefropatia diabética, retinopatia e dor neuropática.

Quando se trata de biologia óssea, existem dados contraditórios sobre o papel das cininas e seus receptores. Portanto esse trabalho está voltado em avaliar de que forma a deleção gênica do receptor B₁ pode influenciar a cicatrização óssea em um modelo de defeito crítico em fêmur de camundongos.

A realização do procedimento cirúrgico para a confecção do defeito ósseo no fêmur dos camundongos foi adaptado e, baseado em diferentes protocolos já estabelecidos anteriormente. Modelos em calvária de camundongos têm sido amplamente empregados, assim como os de fraturas na região do fêmur. Optou-se pela localização femoral (porém, sem o envolvimento das duas corticais para não utilização de qualquer forma de fixação) por apresentar uma maior quantidade óssea que a calota craniana.

Foi fornecida uma nova evidência neste trabalho; a regeneração óssea (conferida no padrão de coloração H&E) nos animais B₁RKO diabéticos deu-se da mesma forma que outros dois grupos: não-diabéticos WT C57/BL6 e B₁RKO. Sendo assim, podemos sugerir que a ativação e/ou aumento da expressão B₁, pode estar associado a conseqüências deletérias do diabetes tipo 1 na remodelação óssea. Esse dado pode ser confirmado por outras publicações que mostram a habilidade das cininas em estimular mecanismos de reabsorção óssea tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

No presente modelo, parece haver um desequilíbrio do processo de remodelação óssea, predominando a diferenciação osteoblástica, muito mais do que osteoclástica nos animais diabéticos C57/BL6. Por outro lado, os animais com deleção gênica parecem estar protegidos desses efeitos.

Visto nossa dificuldade em conduzir um tratamento adequado aos pacientes desse grupo (diabéticos), compreender, que, o desequilíbrio no processo de regeneração óssea está relacionado à neoformação, abre novos caminhos para tentarmos otimizar o processo, levando a um equilíbrio.

Pode-se concluir que o bloqueio de receptores B₁ pode representar estratégias terapêuticas atraentes para melhorar a formação óssea em pacientes

com diabetes tipo 1, que requerem procedimentos cirúrgicos ósseos assim como a instalação de implantes osseointegrados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

1. Bord S, Horner A, Hembry RM, Reynolds JJ, Compston JE. Production of collagenase by human osteoblasts and osteoclasts in vivo. *Bone*. 1996; 19(1): 35-40.
2. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys*. 2008 15; 473(2): 139-46.
3. Marie PJ. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch Biochem Biophys*. 2008; 15;473(2):98-105.
4. Rosen V, Thies RS, Lyons K. Signaling pathways in skeletal formation: a role for BMP receptors. *Ann N Y Acad Sci*. 1996; 8;785:59-69.
5. Robinson JA, Harris SA, Riggs BL, Spelsberg TC. Estrogen regulation of human osteoblastic cell proliferation and differentiation. *Endocrinology*. 1997; 138(7): 2919-27.
6. Turner CH. Homeostatic control of bone structure: An application of feedback theory. *Bone* 1991; 12:203-7.
7. Perkins SL, Kling SJ. Local concentrations of macrophage colony-stimulating factor mediate osteoclast differentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1995; 269:E1024-E1030.
8. Long MW, Robinson JA, Ashcraft EA, Mann KG. Regulation of human bone marrow-derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors. *J Clin Invest*. 1995; 95(2):881-7.
9. Marks SC. The origin of osteoclast: Evidence, clinical implications and investigative challenges of an extra-skeletal source. *J Pathol* 1983; 12:226-56.

10. Young MF, Ibaraki K, Kerr JM. Molecular and cellular biology of the major noncollagenous proteins in bone. In: Noda M (ed). Cellular and molecular biology of bone. New York: Academic Press; 1993:191-234.
11. Pinero GJ, Farach-Carson MC, Devoll RE, Aubin JE, Brunn JC, Butler WT. Bone matrix proteins in osteogenesis and remodelling in the neonatal rat mandible as studied by immunolocalization of osteopontin, bone sialoprotein, alpha 2HS-glycoprotein and alkaline phosphatase. Arch Oral Biol. 1995; 40(2):145-55.
12. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. Arch Biochem Biophys; 2008; 473(2): 139-46.
13. Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. Endocr Rev. 2008; 29(2):155-92.
14. Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. Cytokine Growth Factor Rev. 2004; 15(6):457-75.
15. Junqueira LC, Carneiro J. Tecido ósseo. In: Junqueira LC, Carneiro J. Histologia básica. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2004. p. 111-128.
16. Viguet-Carrin S, Garnero P, Delmas PD. The role of collagen in bone strength. Osteoporos Int. 2006; 17(3):319-36.
17. Doré-Savard L, Otis V, Belleville K, Lemire M, Archambault M, Tremblay L, Beaudoin JF, Beaudet N, Lecomte R, Lepage M, Gendron L, Sarret P. Behavioral. Medical imaging and histopathological features of a new rat model of bone cancer pain. PLOS One. 2010; 29; 5(10).
18. The Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 1997; 20:1183-97.

19. Hornick T, Aron DC: Preventing and managing diabetic complications in elderly patients. *Cleve Clin J Med* 2008, 75:153-158.
20. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998; 352:837-53.
21. Atkinson MA, Maclaren NK. The pathogenesis of insulin dependent diabetes. *N Engl J Med* 1994; 331:1428-36.
22. Imagawa A, Hanafusa T, Miyagawa J-I, Matsuzawa Y, for the Osaka IDDM Study Group. A novel subtype of type 1 diabetes mellitus characterized by a rapid onset and an absence of diabetes-related antibodies. *N Engl J Med* 2000; 342:301-7.
23. Ward DT, Yau SK, Mee AP, Mawer EB, Miller CA, Garland HO, Riccardi D. Functional, molecular, and biochemical characterization of streptozotocin-induced diabetes. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12:779-90.
24. Figueiredo, D. M.; Rabelo, F. L. A. Diabetes insipidus: principais aspectos e análise comparativa com diabetes mellitus. *Cienc. Biol. Saúde, Londrina*, 2009 v. 30, n. 2, p. 155- 162.
25. Spanheimer RG, Umpierrez GE, Stumpf V. Decreased collagen production in diabetic rats. *Diabetes.* 1988; 37:371-6.
26. Peled M, Ardekian L, Tagger-Green N, Gutmacher Z, Machtei EE. Dental implants in patients with type 2 diabetes mellitus: a clinical study. *Implant Dent.* 2003; 12:116-22.
27. Shires R, Teitelbaum SL, Bergfeld MA, Fallon MD, Slatopolsky E, Avioli LV. The effect of streptozotocin-induced chronic diabetes mellitus on bone and mineral homeostasis in the rat. *J Lab Clin Med.* 1981; 97:231-40.

28. Santana RB, Xu L, Chase HB, Amar S, Graves DT, Trackman PC. A role for advanced glycation end products in diminished bone healing in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2003; 52:1502-10.
29. Weiss RE, Gorn AH, Nimni ME. Abnormalities in the biosynthesis of cartilage and bone proteoglycans in experimental diabetes. *Diabetes*. 1981; 30:670-7.
30. Lekholm U. The use of osseointegrated implants in growing jaws. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1993; 8: 243-4.
31. Murata M, Takahashi A, Saito I, Kawanishi S. Site-specific DNA methylation and apoptosis: induction by diabetogenic streptozotocin. *Biochem Pharmacol*. 1999; 57: 8817.
32. Wong KK, Tzeng ES. Appearance of different diabetic symptoms after streptozocin administration: a comparison study. *Biochem Mol Biol Int*. 1993; 30:1035-41.
33. Goodman WG, Hori MT. Diminished bone formation in experimental diabetes. Relationship to osteoid maturation and mineralization. *Diabetes*. 1984; 33: 825-31.
34. Graves DT, Naguib G, Lu H, Leone C, Hsue H, Krall E. Inflammation is more persistent in type 1 diabetic mice. *J Dent Res*. 2005; 84(4):324-8.
35. Wetzler HP, Snyder JW. Linking pharmacy and laboratory data to assess the appropriateness of care in patients with diabetes. *Diabetes Care*. 2000; 23(11):1637-41.
36. Lu H, Kraut D, Gerstenfeld LC, Graves DT. Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation. *Endocrinology*. 2003; 144: 346-52.
37. Marceau F, Regoli D. Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. *Nat Rev Drug Discov*. 2004; 3:845-852.

38. Hu SW, Huang CH, Huang HC, Lai YY, Lin YY. Transvascular dissemination of *Porphyromonas gingivalis* from a sequestered site is dependent upon activation of the kallikrein/kinin pathway. *J Periodontal Res.* 2006; 41:200-207.
39. Schulze-Topphoff U, Prat A, Bader M, Zipp F, Aktas O. Roles of the kallikrein/kinin system in the adaptive immune system. *Int Immunopharmacol.* 2008; 8(2):155-60.
40. Calixto JB, Medeiros R, Fernandes ES, Ferreira J, Cabrini DA, Campos MM. Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. *Br J Pharmacol.* 2004; 143(7):803-18
41. Marceau F, Regoli D. Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. *Nat Rev Drug Discov.* 2004; 3(10):845-52.
42. Stewart JM. Bradykinin antagonists: discovery and development. *Peptides* 2004; 25:527-532.
43. Ferreira J, Beirith A, Mori MA, Araujo RC, Bader M, Pesquero JB, Calixto JB. Reduced nerve injury-induced neuropathic pain in kinin B1 receptor knock-out mice. *J Neurosci.* 2005; 25(9):2405-12.
44. Fox A, Kaur S, Li B, Panesar M, Saha U, Davis C, Dragoni I, Colley S, Ritchie T, Bevan S, Burgess G, McIntyre P. Antihyperalgesic activity of a novel nonpeptide bradykinin B1 receptor antagonist in transgenic mice expressing the human B1 receptor. *Br J Pharmacol.* 2005; 144(7):889-99.
45. Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Muller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev.* 2005; 57(1):27-77.

46. Wang H, Ehnert C, Brenner GJ, Woolf CJ. Bradykinin and peripheral sensitization. *Biol Chem.* 2006; 387:11-4.
47. Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev.* 1992; 44(1):1-80.
48. Mclean PG, Perreti M, Ahluwalia A. Kinin B1 receptors and the cardiovascular system: regulation of expression and function. *Cardiovasc Res.* 2000; 48:194-210.
49. Gafford JT, Skidgel RA, Erdos EG, Hersh LB. Human kidney "enkephalinase", a neutral metalloendopeptidase that cleaves active peptides. *Biochemistry.* 1983; 21;22(13):3265-71.
50. Guimarães JA, Borges DR, Prado ES, Prado JL. Kinin-converting aminopeptidase from human serum. *Biochem Pharmacol.* 1973; 15;22(24):3157-72.
51. Campbell W, Yonezu K, Shinohara T, Okada H. An arginine carboxypeptidase generated during coagulation is diminished or absent in patients with reumatoid arthritis. *J Lab Clin Invest.* 1990; 115:610-612.
52. Hendriks D, Wang W, Scharpé S, Lommaert MP, van Sande M. Purification and characterization of a new arginine carboxypeptidase in human serum. *Biochim Biophys Acta.* 1990; 1034(1):86-92.
53. Regoli D, Barabé J, Park WK. Receptors for bradykinin in rabbit aortae. *Can J Physiol Pharmacol.* 1977; 55(4):855-67.
54. Regoli D, Barabe J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev.* 1980; 32:1-46.

55. Calixto JB, Cabrini DA, Ferreira J, Campos MM. Kinins in pain and inflammation. *Pain*. 2000; 87(1): 1-5.
56. Campos MM, Leal PC, Nunes RA, Calixto JB. Non-peptide antagonists for kinin B1 receptors: new insight into their therapeutic potential for the management of inflammation and pain. *Trends Pharmacol Sci*. 2006; 27(12): 646-651.
57. Pesquero JB, Bader M. Genetically altered animal models in the kallikrein-kinin system. *Biol Chem*. 2006; 387(2): 119-26.
58. Kuduk SD, Bock MG. Bradykinin B1 receptor antagonists as novel analgesics: a retrospective of selected medicinal chemistry developments. *Curr Top Med Chem*. 2008; 8(16): 1420-30.
59. Marceau F, Hess JF, Bachvarov DR. The B1 receptors for kinins. *Pharmacol Rev*. 1998; 50(3): 357-86.
60. Couture R, Girolami JP. Putative roles of kinin receptors in the therapeutic effects of angiotensin 1-converting enzyme inhibitors in diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol* 2004, 500:467-485.
61. Dias JP, Talbot S, Sénécal J, Carayon P, Couture R. Kinin B1 receptor enhances the oxidative stress in a rat model of insulin resistance: outcome in hypertension, allodynia and metabolic complications. *Plos One*, 2010; 7; 5(9): e12622.
62. Kakoki M, Sullivan KA, Backus C, Hayes JM, Oh SS, Hua K, Gasim AM, Tomita H, Grant R, Nossov SB, Kim HS, Jennette JC, Feldman EL, Smithies O. Lack of both bradykinin B1 and B2 receptors enhances nephropathy, neuropathy, and bone mineral loss in Akita diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 1;107(22):10190-5.

63. Brechter AB, Persson E, Lundgren I, Lerner UH. Kinin B1 and B2 receptor expression in osteoblasts and fibroblasts is enhanced by interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha. Effects dependent on activation of NF-kappaB and MAP kinases. *Bone*. 2008; 43(1): 72-83.

64. Brechter AB, Lerner UH. Bradykinin potentiates cytokine-induced prostaglandin biosynthesis in osteoblasts by enhanced expression of cyclooxygenase 2, resulting in increased RANKL expression. *Arthritis Rheum*. 2007; 56(3): 910-23.

65. Kondo A, Togari A. Activation of osteoblastic functions by a mediator of pain, bradykinin. *Biochem Pharmacol*. 2004; 1;68(7): 1423-31.

66. Zauli G, Toffoli B, di Iasio MG, Celeghini C, Fabris B, Secchiero P. Treatment with recombinant tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand alleviates the severity of streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes*. 2010; 59(5):1261-5.

67. Saueressig F, 2005 Avaliação microscópica do processo de reparo ósseo na presença de enxerto ósseo humano liofilizado mineralizado e desmineralizado e membrana de cortical bovina em calota craniana de ratos [Dissertação] Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2005. 121 p. Mestrado em Odontologia.

ANEXO A- Carta de aprovação pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia- PUCRS



*Comissão Científica e de Ética
Faculdade da Odontologia da PUCRS*

Porto Alegre 07 de maio de 2013

O Projeto de: Dissertação

Protocolado sob n°: 0066/12
Intitulado: Efeito do diabetes tipo I na neoformação óssea em defeitos críticos em fêmur de camundongos: relevância dos receptores B1 das cininas.
Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Maria Martha Campos
Pesquisadores Associados: Natália Pradella Cignachi
Nível: Dissertação / Mestrado

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 07 de maio de 2013.

Este projeto deverá ser imediatamente encaminhado ao CEUA/PUCRS.

Profa. Dra. Karen Cherubini
Vice-Coordenadora da Comissão Científica e de Ética da
Faculdade de Odontologia da PUCRS

ANEXO B- Carta de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais- PUCRS



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

Ofício 55/13 - CEUA

Porto Alegre, 01 de agosto de 2013.


Prezado Sr(a). Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 13/00337, intitulado **“Efeito do diabetes tipo I na neoformação óssea em defeitos críticos em fêmur de camundongos: relevância dos receptores B1 das cininas”**.

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

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

Atenciosamente,


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

Ilma. Sra.
Profª. Maria Martha Campos
FO
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60, sala 314
CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: ceua@pucrs.br

ANEXO C- Comprovante de submissão do manuscrito ao Periódico PNAS

January 23, 2014

Title: "Kinin B1 receptor lack influences bone healing in a mouse model of femur critical-size defect in streptozotocin-induced type-1 diabetes"

Tracking #: 2014-01490

Author(s):

Natália Cignachi (PUCRS)

João Pesquero (UNIFESP)

Adriana Etges (UFPEL)

Rogério Oliveira (PUCRS)

Maria Martha Campos (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul)

Dear Dr. Cignachi,

"Kinin B1 receptor lack influences bone healing in a mouse model of femur critical-size defect in streptozotocin-induced type-1 diabetes," for which you participated as an author, was submitted by Dr. Campos and received in our office on January 23, 2014. The manuscript has been assigned tracking number 2014-01490.

You may check on the status of your manuscript at any time by clicking the link below and selecting the "Check Status" link. Please also check your name and institutional affiliation in the list at the beginning of this email. If the manuscript is accepted for publication, **this is how your name and institutional affiliation will appear on the published article**. To make any corrections to your contact and affiliation information, please click Manuscript Home to get to your desktop and then click the Modify Profile link to get to your profile page. We encourage you to make these corrections as soon as possible to prevent any possible publication errors. If you have any questions or need help, please contact our office.

Please view the manuscript: <http://www.pnascentral.org/cgi-bin/main.plex?el=A4B2CHww2A3FsAw6F7A9TRuWGzPFepDNPMuklsvaWQZ>

PNAS License to Publish is collected for most manuscripts at initial submission. The summary below reflects our records of the PNAS License to Publish type selected by the submitting author at that time. Please contact us immediately at PNASAuthorLicense@nas.edu or 202-334-2679 if this information is incorrect or you have any questions. In the event that your manuscript is withdrawn or not accepted for publication in PNAS, the PNAS License to Publish will be terminated and all rights revert to the author(s). PNAS License to Publish Summary: PNAS License to Publish conveyed to the National Academy of Sciences. PNAS and all authors agree that this agreement will be executed electronically.
PNAS License to Publish Complete: Yes
Date PNAS License to Publish Completed: 2014-01-23

Thank you for submitting to PNAS.

Sincerely yours,

PNAS Editorial Office

(p) 202.334.2679

(f) 202.334.2739

(e) pnas@nas.edu

