

Efeito do Diabetes Mellitus tipo I na organização espacial das trabéculas ósseas: análise por meio do processo de esqueletonização



Effects of Type I Diabetes Mellitus on the spatial organization of bone trabeculae: analysis by skeletonization

Layza Maria Silva¹,
Jessyca Figueira Venâncio¹,
Adriano de Oliveira Loures²,
Daniella Guedes de
Figueiredo Lopes²,
Paula Dechichi¹,
Gustavo Davi Rabelo²

¹ Faculdade de Odontologia,
Universidade Federal de Uberlândia
– Uberlândia/MG.

² Faculdade de Odontologia,
Universidade Federal de Juiz de
Fora – Juiz de Fora/MG.

✉ **Gustavo Rabelo**
Faculdade de Odontologia –
Campus Universitário
Martelos
CEP: 36036-300
Juiz de Fora - MG
📧 drgustavorabelo@yahoo.com.br

Submetido: 27/11/2018
Aceito: 11/12/2018

RESUMO

Introdução: Diabetes mellitus é uma doença metabólica que afeta vários órgãos-alvo, incluindo os ossos. **Objetivo:** Avaliar pelo método de esqueletonização o efeito do Diabetes mellitus tipo I (DM1) na microarquitetura de osso esponjoso. **Material e métodos:** Quatorze ratos Wistar foram divididos em: Saudável (S, n=7) e Diabético (D, n=7). O DM1 foi induzido por meio de injeção endovenosa de estreptozotocina no grupo D, sendo a confirmação da condição realizada por checagem do nível glicêmico. Os animais foram sacrificados após 35 dias da indução no grupo D, juntamente com os do grupo S. As epífises femorais foram seccionadas, removidas, desmineralizadas e incluídas em parafina. Dois cortes (5 µm) foram obtidos, corados em Hematoxilina e Eosina, e analisados ao Microscópio de Luz. Foi realizada a delimitação interativa das trabéculas ósseas, seguido pelo processo de binarização utilizando threshold global, feita por dois operadores distintos. Depois, foi realizado o processo de esqueletonização para acesso às características das trabéculas e da rede de interconexão entre elas. Os parâmetros avaliados foram: Área óssea em micrômetros quadrados (B.Ar, seguido pela proporção em porcentagem BV/TV), Índice de Modelo estrutural (SMI), Dimensão Fractal (FD), Número de trabéculas (Tb.N), Número de ramos (B.N), Número total de junções (Junc.N), Média de pontos terminais (End.p), Média de extensão de cada ramo (R.Le) e Número de junções triplas (Triple.points.N). **Resultados:** Houve diferença significativa apenas no parâmetro SMI para os diferentes operadores ($p < 0,0001$), sendo o mesmo retirado da análise entre diabetes vs saudável. Houve diferença significativa na quantidade óssea, sendo maior no grupo S ($0,46 \pm 0,09$) comparado ao grupo D ($0,41 \pm 0,07$) ($p = 0,0082$). Os demais parâmetros não mostraram diferença significativa. **Conclusão:** Conclui-se que a área óssea no grupo saudável é maior em comparação ao DM1. Dentro das limitações deste estudo, parece que a distribuição espacial das trabéculas e suas características de interconexão não são alteradas no diabetes.

Palavras-chave: diabetes mellitus experimental, osso e ossos, osso esponjoso, histologia

ABSTRACT

Introduction: Diabetes is a metabolic disease that affects several target-organs, including bone. **Objective:** Analyze the effects of Diabetes Mellitus Type 1 (DM1) on the trabecular bone microarchitecture by using the skeletonization process. **Material and methods:** Fourteen Wistar rats were divided in two groups: Health (S, n=7) and Diabetic (D, n=7). DM1 was induced with streptozotocin in D group, and glycemic levels were tested on peripheral blood samples. After 35 days, the animals were euthanized and had their femurs removed. The epiphysis were decalcified and embedded in paraffin. Five microns sections were stained in Hematoxylin and Eosin, and analyzed at the light microscope. Bone trabeculae were manually delimited, and then the binarization process with a global threshold was performed for each image. The whole process were conducted by two operators separately. Skeletonization was applied to binary images in order to evaluate the trabeculae characteristics and their network. Bone area (B.Ar), Bone proportion (BV/TV) Structure Model Index (SMI), Fractal Dimension (FD), Trabeculae number (Tb.N), Mean branches (B.N), Mean junction points (Junc.N), Mean End-points (End.p), Mean branches length (B.Le), and Mean triple points (Triple.points.N) were evaluated. **Results:** There was a significant difference only for SMI between different operators ($p < 0.0001$), being this parameter excluded for the evaluation between health and diabetic groups. There was a significant difference between S and D for bone area, with S (0.46 ± 0.09) higher than D (0.41 ± 0.07) ($p = 0.0082$). The other parameters analyzed were not significantly different. **Conclusion:** Bone trabecular area was higher in health compared with diabetes. Within the limitations of this study, one could suggest that there are no alterations of the spatial distribution of the trabeculae with their network and their inner structural characteristics.

Keywords: diabetes, bone, trabecular bone, histology



INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia crônica como principal sintoma (TANAKA et al., 2018). Pacientes com diabetes tipo 1 (DM1) apresentam menor densidade mineral óssea e apresentam alto risco de fraturas (LECKA-CZERNIK, 2017). Além do volume ósseo reduzido, outros parâmetros de qualidade óssea também estão significativamente alterados nessa doença (MANSUR et al., 2015). Estudos relacionando qualidade óssea e DM1 têm avaliado diversos parâmetros de composição e microarquitetura, em ambas as regiões, cortical e trabecular.

O osso esponjoso consiste de uma rede de trabéculas ósseas, que delimitam pequenos espaços ocupados por tecido medular, e cuja organização espacial é altamente anisotrópica (SALMON et al., 2015). O uso da histomorfometria, utilizando parâmetros de microarquitetura, permite avaliar alguns parâmetros relacionados à qualidade óssea e remodelação, identificando alterações no arranjo estrutural e também no turnover ósseo (CHAVASSIEUX; ARLLOT; MEUNIER, 2001). Estudos recentes têm preconizado o uso de medições microarquiteturais obtidas pela análise histológica por meio do uso de novos algoritmos e análises computacionais, que por sua vez propiciam análise de várias características bidimensionais das trabéculas ósseas, como: espessura, conectividade e sua distribuição espacial (GUGGENBUHL et al., 2006).

Nestas análises computacionais, uma avaliação promissora aplicada em estudos recentes é a eskeletonização, que tem sido amplamente utilizada em grande número de aplicativos de processamento de imagens, visão computacional e gráfica, incluindo: modelagem, animação de objetos, compactação de dados e correspondência de formas (SAHA et al., 2018). A eskeletonização propicia a análise dos componentes de uma imagem por meio da transformação destes em uma estrutura linear principal, oferecendo uma representação compacta de um objeto, preservando importantes características topológicas, geométricas e mantendo todas as suas características essenciais (CHEN et al., 2016). Dalle Carbonare et al. (2005) demonstraram a aplicação da eskeletonização no osso trabecular, evidenciando que o perfil das trabéculas e suas conexões, caracterizado em uma rede de componentes lineares, permitiu a identificação dos pontos de conexões ou junções, dos segmentos trabeculares e dos pontos terminais.

Mesmo com a aplicação desta técnica já bem fundamentada na literatura, poucos são os estudos que revelam uma aplicabilidade direta em situações distintas na avaliação da microarquitetura óssea comparando grupos específicos. Ainda, há desafios envolvidos com a eskeletonização na avaliação de imagens ósseas e

quanto à interpretação dos resultados obtidos nestas mensurações. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do Diabetes mellitus tipo I (DM1) na microarquitetura de osso esponjoso, pelo método de eskeletonização, mensurando parâmetros estruturais e de interconexão das trabéculas ósseas.

MÉTODOS

Foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, sadios e com peso entre 200 e 250g. Os animais foram mantidos no depositário de animais em estantes climatizadas a temperatura de 22°C e ciclo claro-escuro de 12 horas, com ração e água ad libitum. Estes animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: a) grupo teste, com ratos diabéticos (n=9); b) grupo controle, com ratos saudáveis (n=9). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com aprovação prévia da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA (Protocolo: 026/14).

No grupo teste, a indução do DM1 nos animais foi feita pela administração da droga Estreptozotocina (STZ, Sigma, St. Louis, Missouri, EUA), por via intravenosa na dosagem de 60mg/kg de peso corporal diluída em tampão citrato. Após jejum de 24h iniciou-se o protocolo de indução. Foi realizada a anestesia por via intraperitoneal utilizado 7 mg/Kg do relaxante muscular cloridrato de xilazina 2% e 100 mg/Kg do anestésico e analgésico cloridrato de cetamina 10%. Em seguida foi administrada a droga STZ por via endovenosa através de punção da veia peniana. Após a administração os animais foram acomodados em caixas contendo maravalha em estantes climatizadas e alimentados normalmente. A hiperglicemia foi confirmada 24h após a indução por meio de coleta do sangue da cauda dos animais. Posteriormente, foi realizada nova aferição glicêmica no período de uma semana e 14 dias. Os animais que apresentaram glicemia maior que 250 mg/dl foram considerados diabéticos.

Após 35 dias da indução de DM1 os animais foram sacrificados, por meio de aprofundamento anestésico e deslocamento cervical, seguindo os princípios da Declaração dos Direitos dos Animais. A remoção dos fêmures foi feita por desarticulação, as epífises foram removidas e fixadas em paraformaldeído 4%. As epífises femorais direitas foram incluídas no estudo, totalizando nove epífises por grupo: a) grupo saudável - S (n=9) e grupo diabético - D (n=9). Após a fixação, as peças foram descalcificadas utilizando solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 10% (pH 7.4). Posteriormente, as mesmas foram processadas para inclusão em parafina pela técnica convencional. De cada bloco foram obtidos dois cortes de 5 µm de espessura, compreendendo osso cortical e trabecular. Todos os cortes foram corados em Hematoxilina e Eosina (HE) e analisados ao Microscópio de Luz.

Na região trabecular, abaixo do disco epifisário, foram selecionadas aleatoriamente duas áreas compreendendo a região de trabéculas ósseas. As imagens foram capturadas com aumento original de 20x (Figura 1A). Trinta e seis imagens foram capturadas por grupo para realização de análise histomorfométrica, juntamente com a caracterização morfológica e organizacional das trabéculas ósseas. A captura das imagens foi realizada por um operador único.

As imagens histológicas foram inseridas no software ImageJ (ImageJ 1.52a, Wayne Rasband, National Institute of Health, USA), e foi realizado processo de segmentação interativa das trabéculas, onde as mesmas foram delimitadas manualmente, sendo cada uma delas correspondente à uma região de interesse (ROI) (Figura 1B). Posteriormente, as ROIs foram agrupadas e excluídas da imagem, utilizando a ferramenta Fill no Plugin ROI Manager, deixando todas as áreas correspondentes ao tecido ósseo na cor branca (valor 255) e todas as demais

estruturas, incluindo tecido mole, foram convertidas para cor preta (valor 0), caracterizando assim o processo de binarização (Figura 1C). Após a obtenção das imagens binárias, foi mensurada a área óssea (B.Ar, μm^2), e os valores anotados para comparação entre os grupos. Foi também anotado o número total de trabéculas em cada imagem (Tb.N). Posteriormente, foi realizado o processo de esqueletonização para cada imagem binária.

Na parte de ferramentas de processamento do software ImageJ (Process), foi selecionado dentro da seção Binary a ferramenta Skeletonize. Esta ferramenta permite transformar as trabéculas ósseas em estruturas lineares, com definição dos seus ramos principais e ramos secundários. Cada trabécula então tem sua estrutura esqueletonizada, permitindo avaliar sua distribuição no espaço e as características de sua organização espacial, no que se refere à distribuição de seus ramos e suas respectivas conexões (Figura 1D).

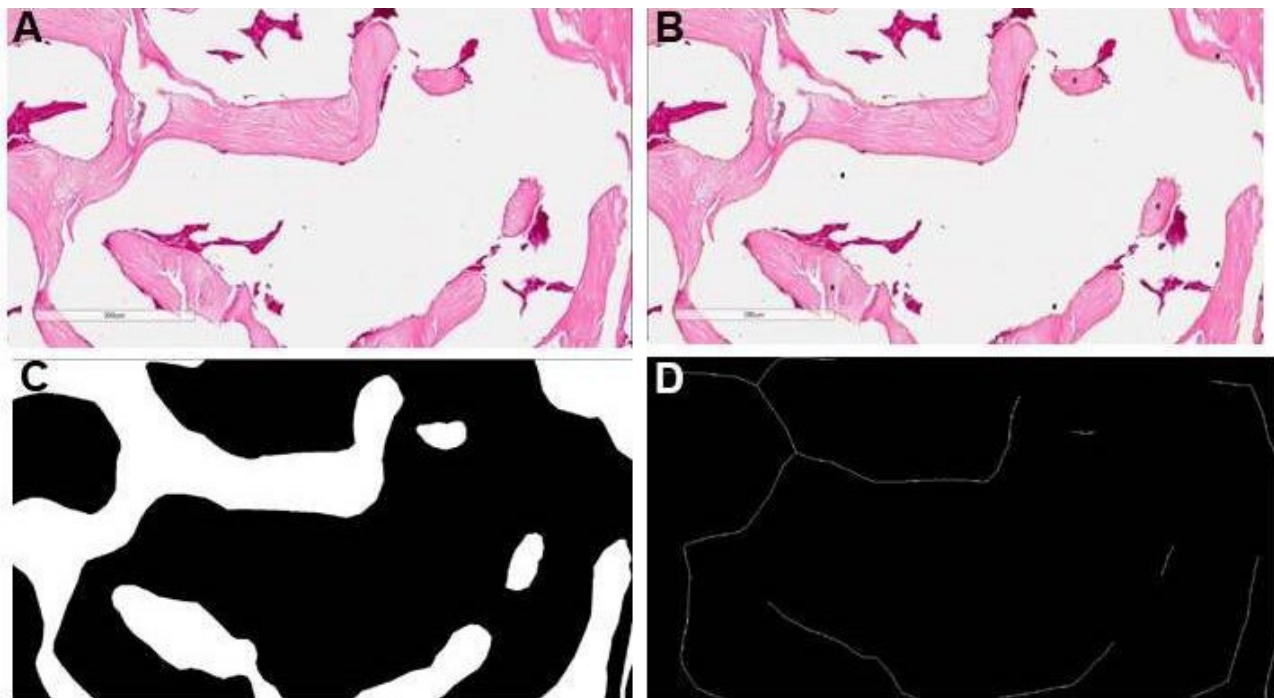


Figura 1: A) Fotomicrografia do osso esponjoso (H&E, Ampliação original 20X); B) Segmentação interativa das trabéculas ósseas – contorno em amarelo claro (H&E, Ampliação original 20X); C) Binarização das trabéculas ósseas; D) Esqueletonização da imagem binária.

Para análise desta distribuição espacial trabecular e das características inerentes a cada trabécula, as imagens esqueletonizadas eram avaliadas pelo plugin BoneJ (DOUBE et al., 2010). Este plugin de download livre permite realizar várias análises do osso cortical e trabecular, e no caso específico deste trabalho, foi utilizada a ferramenta Analyse Skeleton no osso trabecular, que permite contar e medir os ramos esqueléticos das trabéculas e suas junções (pontos de conexão). Tanto o processo de segmentação interativa prévio à binarização, quanto o processo de esqueletonização, foram realizados por dois operadores distintos (Operador 1

e 2), previamente calibrados para utilização do software e dos plug-ins.

Os parâmetros avaliados foram: Porcentagem de área óssea em micrômetros quadrados, seguido do cálculo da análise da proporção de osso (BV/TV, calculado pela área óssea dividida pelo total de tecido analisado), Índice de Modelo estrutural (SMI), Dimensão Fractal (FD), Número de trabéculas (Tb.N), Número de ramos (B.N), Número total de junções (Junc.N), Média de pontos terminais (End.p), Média de extensão de cada ramo (B.Le) e Número de junções triplas (Triple.points.N).

Na análise estatística, foi realizado teste D'Agostino & Pearson omnibus normality test para averiguar a distribuição dos dados, seguido pelo teste de Mann Whitney para comparação entre Operador 1 vs Operador 2, e também entre grupo saudável vs grupo diabético. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Os dados foram organizados em média \pm desvio padrão / mediana.

RESULTADOS

Nas imagens histológicas foram observadas trabéculas ósseas circundadas por tecido medular. Estas trabéculas apresentavam coloração eosinofílica, inúmeras lacunas com osteócitos e alguns canais esporádicos preenchidos por vasos sanguíneos. A morfologia dessas trabéculas era bem variada e suas superfícies apresentavam-se arredondadas (estruturas formando ângulos côncavos e convexos).

Na avaliação qualitativa do arranjo espacial destas trabéculas, foi observado que as áreas escolhidas mais

próximas ao disco epifisário apresentavam trabéculas mais espessas, anastomosadas e com maior número de ramos, enquanto que as trabéculas encontradas mais próximas à região de transição para diáfise eram mais finas, esparsas e com menor número de ramos. Nos processos de binarização e esqueletonização foi observada a transformação das trabéculas em suas respectivas estruturas lineares, identificando visualmente os pontos de junção, os segmentos e os pontos terminais de cada região da trabécula. Por ramos se entende que no processo de esqueletonização foi possível identificar porções distintas da trabécula principal, porções estas que eram projetadas da estrutura principal da trabécula. Em alguns casos esporádicos, foi observado que por vezes, uma trabécula única na imagem original, apresentava depois da esqueletonização a presença de pequenos ramos emergentes.

Na análise estatística dos parâmetros avaliados, não foi observada diferença significativa entre Operador 1 e Operador 2, exceto pelo Índice de Modelo Estrutural (SMI) (Tabela 1).

Tabela 1: Comparação entre os dois operadores que realizaram o processo de segmentação interativa e binarização

| Parâmetros | Total: 36 imagens | | |
|------------|------------------------|------------------------|-----------|
| | Operador 1 | Operador 2 | p |
| BV/TV | 0,06 + 0,05 / 0,05 | 0,05 + 0,03 / 0,04 | 0,68 |
| SMI | 0,46 \pm 0,12 / 0,44 | 0,11 \pm 0,17 / 0,08 | < 0,0001* |
| FD | 1,12 \pm 0,04 / 1,11 | 1,13 \pm 0,05 / 1,12 | 0,71 |
| Tb.N | 2,65 \pm 1,58 / 2,00 | 2,60 \pm 1,80 / 2,00 | 0,64 |
| B.N | 5,28 \pm 3,66 / 4,00 | 6,47 \pm 5,95 / 4,66 | 0,54 |
| Junc.N | 2,33 \pm 2,09 / 1,50 | 3,14 \pm 3,43 / 2,00 | 0,31 |

Média + DP / Mediana. Teste de Mann Whitney. *Diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$

Dessa forma, para a comparação entre os grupos saudável e diabético este parâmetro foi descartado. Comparando as características trabeculares entre S e D, foi observada diferença significativa apenas para

o volume ósseo ($p = 0,0082$), com maior proporção de matriz óssea no grupo S ($0,46 \pm 0,09$) comparado ao grupo D ($0,41 \pm 0,07$). Nos demais parâmetros não houve diferença significativa entre D e S (Tabela 2).

Tabela 2: Comparação entre os parâmetros de qualidade óssea trabecular entre grupo Diabético e grupo Saudável

| Parâmetros | Grupos | | p |
|-----------------|------------------------|------------------------|---------|
| | D (n=9) | S (n=9) | |
| BV/TV | 0,41 \pm 0,07 / 0,40 | 0,46 \pm 0,09 / 0,46 | 0,0082* |
| FD | 1,12 \pm 0,04 / 1,12 | 1,12 \pm 0,04 / 1,10 | 0,18 |
| Tb.N | 2,64 \pm 1,32 / 3,00 | 2,40 \pm 1,40 / 2,00 | 0,30 |
| B.N | 6,06 \pm 4,90 / 4,00 | 5,73 \pm 5,02 / 4,30 | 0,97 |
| Junc.N | 2,91 \pm 2,77 / 1,60 | 2,60 \pm 2,92 / 2,00 | 0,75 |
| End.p | 3,44 \pm 1,86 / 3,00 | 3,66 \pm 1,50 / 3,50 | 0,28 |
| B.Le | 135 \pm 106 / 142 | 179 \pm 161 / 157 | 0,16 |
| Triple.points.N | 2,85 \pm 2,79 / 1,60 | 2,60 \pm 2,92 / 2,00 | 0,91 |

Média + DP / Mediana. Teste de Mann Whitney. *Diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

A avaliação da microarquitetura óssea no Diabetes representa um alvo importante de diversos estudos atualmente, principalmente na tentativa de elucidar mecanismos que levam a uma condição de pior qualidade óssea nos indivíduos acometidos por esta doença metabólica altamente prevalente. Quando é necessário avaliar a arquitetura óssea em alta resolução, estudos experimentais em animais são recomendados para acessar alguns parâmetros de arranjo microarquitetural por meio de análises histológicas. A condução de estudos experimentais *in vivo* nos animais possibilita identificar alterações que seriam impossíveis de serem acessadas em outros tipos de estudo, como exemplo as mudanças arquiteturais e de composição no osso depois da instalação do diabetes (LIMIRIO et al., 2018). No presente estudo, a análise de um grupo de parâmetros que interfere na qualidade óssea trabecular no osso longo trouxe nova luz ao conhecimento das modificações ósseas no DM1, evidenciando menor quantidade óssea no diabetes quando comparado ao grupo saudável, sem mudanças significativas na organização espacial das trabéculas. Ainda, a utilização de métodos computacionais de imagens biológicas, representada neste estudo pela esqueletonização aplicada nas imagens histológicas, possibilitou identificar características inerentes às trabéculas ósseas e sua organização, propiciando melhor entendimento dessa rede de conectividade entre elas e suas ramificações.

Para realizar a segmentação interativa das trabéculas o pesquisador necessita ter domínio do conteúdo que deseja avaliar. Neste estudo, a delimitação trabecular foi executada por dois operadores diferentes em momentos distintos, não mostrando contrariedade nos parâmetros avaliados, exceto pelo SMI. Tal resultado divergente na análise do SMI em imagens histológicas bidimensionais não foi inesperado, uma vez que esse parâmetro é utilizado para medir hastes e placas no osso trabecular explorando a mudança na curvatura da superfície que ocorre quando uma estrutura varia de planar (SMI = 0) ou cilíndrica (SMI = 3) para esférica (SMI = 4) (SALMON et al., 2015). Como nossa análise trata-se de imagem em 2D, o SMI tende a ficar mais próximo de 0 pelo formato achatado que as trabéculas apresentam em uma visualização bidimensional, não apresentado desta forma uma real capacidade de avaliar a forma trabecular, como acontece em imagens tridimensionais. Os dados que foram encontrados do SMI indicam que o operador 2 delimitou as trabéculas de forma que o contorno fosse mais caracterizado por ângulos agudos e com interrupções abruptas, enquanto que o operador 1 delimitou as superfícies trabeculares lançando mão de contornos mais arredondados, permitindo maior interpretação de ângulos côncavos e convexos. Portanto, o SMI se mostrou como um parâmetro subjetivo para avaliar as trabéculas em imagens em 2D, sendo este excluído

para análise dos grupos S x D.

Em relação aos outros parâmetros, a falta de diferença significativa entre operadores mostra homogeneidade nos critérios ao delimitar a área de interesse (área óssea), além de coerência na identificação das trabéculas (evidenciado pelo número igual de trabéculas nas duas análises), revelando o potencial do uso da segmentação e esqueletonização para trabalhos de qualidade óssea. Ainda, pesquisadores podem utilizar estes métodos computacionais de forma padronizada, por meio do ImageJ. Também de forma interessante, a dimensão fractal não foi diferente nas comparações entre operadores e entre diabetes versus saudável, o que mostra sua aplicabilidade de forma independente da quantidade de tecido ósseo, sendo esta relacionada à organização das estruturas que compõe o osso trabecular. A falta de significância na comparação da dimensão fractal foi acompanhada pela ausência de diferença entre as características morfológicas das trabéculas, o que mostra conformidade entre os parâmetros e sugere a indicação do seu uso, também nas imagens histológicas. Em análises imaginológicas, tanto de alta (tomografias) ou menor (radiografias) resolução, a dimensão fractal tem se mostrado eficaz na diferenciação entre saúde e doença, e entre condições de melhor ou pior qualidade óssea (ÖNEM; BAKSI; SOĞUR, 2012; RABELO et al., 2018).

A esqueletonização é uma metodologia para caracterizar e quantificar microestruturas complexas oferecendo uma representação compacta de um objeto em uma estrutura linear, preservando importantes características topológicas e microestruturais da mesma (SAHA et al., 2018; ZHOU et al., 2016). Sua aplicabilidade na avaliação da qualidade óssea se caracteriza pelo uso deste método na avaliação das características inerentes às trabéculas ósseas, principalmente quanto às suas características individuais e também nas características globais considerando a rede de interconexão destas estruturas. As trabéculas ósseas são transformadas em estruturas lineares, com definição dos seus ramos principais e ramos secundários, permitindo avaliar sua distribuição no espaço. No caso específico deste estudo, o osso trabecular foi avaliado quanto à contagem de trabéculas, seus ramos esqueléticos e suas junções. Os resultados não apresentaram diferença significativa entre o grupo S em relação ao grupo D, considerando todas as informações que a esqueletonização fornece. Mesmo com uma diferença significativa entre a quantidade óssea, o arranjo espacial da microarquitetura trabecular não foi diferente no diabetes.

Em relação à doença em estudo, o diabetes mellitus é caracterizado como uma condição que pode causar diversas alterações no metabolismo ósseo, por vezes levando a uma diminuição em sua formação. Estudos apontam que a influência da acumulação de produtos finais da glicação avançada na matriz orgânica, presentes no diabetes, atuam reduzindo a formação óssea (SROGA;

WU; VASHISHTH, 2015; TANG; VASHISHTH, 2010). Níveis elevados de esclerostina, o mais potente inibidor da formação óssea, foram encontrados em pacientes diabéticos (GENNARI et al., 2012). A osteocalcina, que modula a produção osteoblástica, pode se apresentar de forma reduzida no diabético, aumentando risco à ocorrência de fraturas ósseas (FARR; KHOSLA, 2016). O aumento dos níveis de serotonina periférica derivada do intestino contribui para a diminuição na formação óssea (KASPERK; GEORGESCU; NAWROTH, 2017). A falta de efeitos anabólicos da insulina sobre o metabolismo de células mesenquimais podem ser uma causa importante para um metabolismo ósseo perturbado na diabetes de tipo 1 (THRAILKILL et al., 2005). Em uma revisão de literatura, foi mostrado que em modelo murino de animais que carecem do receptor de insulina, o número de células formadoras de osso mostrou-se insuficiente, especificamente em osteoblastos (KEENAN; MADDALONI, 2016). Em consonância com todos estes estudos mencionados, encontramos diminuição da área óssea nos ratos diabéticos, o que remete à situação que menos osso trabecular poderia ser um indicativo de menor qualidade óssea, também relacionado à maior propensão a fraturas, estas últimas que comumente ocorrem nos ossos longos.

CONCLUSÃO

Conclui-se que as alterações metabólicas no diabetes refletem em uma menor quantidade óssea trabecular. Para avaliação da microarquitetura óssea, neste modelo experimental, a análise de imagens histológicas utilizando o método de segmentação e posterior esqueletonização possibilitou identificar características trabeculares de estrutura e organização espacial. Este método computacional de avaliação permitiu revelar que mesmo com menor quantidade óssea, sugere-se que a organização espacial das trabéculas e a interconexão destas estruturas em uma rede de conectividade parece não se alterar no diabetes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Instituto de Ciências Biomédicas - ICBIM e ao Centro de Pesquisa de Biomecânica, Biomateriais e Biologia Celular – CPBio/FOUFU, ambos da Universidade Federal de Uberlândia. Ainda, os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG.

REFERÊNCIAS

CHAVASSIEUX, P.; ARLOT, M.; MEUNIER, P. J. Clinical use of Bone Biopsy. Osteoporosis. Second Edi ed. [S.l.]: **Academic Press**, 2001.

CHEN, C. et al. Trabecular bone characterization on the continuum of plates and rods using in vivo MR imaging and volumetric topological analysis. **Physics in Medicine and Biology**, v. 61, n. 18, p. N478–N496, 2016.

DALLE CARBONARE, L. et al. Bone microarchitecture evaluated by histomorphometry. **Micron**, v. 36, n. 7-8, p. 609-16, 2005.

DOUBE, M. et al. BoneJ: Free and extensible bone image analysis in ImageJ. **Bone**, v. 47, n. 6, p. 1076-9, 2010.

FARR, J. N.; KHOSLA, S. Determinants of bone strength and quality in diabetes mellitus in humans. **Bone**, v. 82, p. 28–34, 2016.

GENNARI, L. et al. Circulating Sclerostin levels and bone turnover in type 1 and type 2 diabetes. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 97, n. 5, p. 1737-44, 2012.

GUGGENBUHL, P. et al. Texture analysis of X-ray radiographs of iliac bone is correlated with bone micro-CT. **Osteoporosis International**, v. 17, n. 3, p. 447–454, 2006.

KASPERK, C.; GEORGESCU, C.; NAWROTH, P. Diabetes Mellitus and Bone Metabolism. **Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes**, v. 125, n. 4, p. 213-7, 2017.

KEENAN, H. A.; MADDALONI, E. Bone Microarchitecture in Type 1 Diabetes: It Is Complicated. **Current Osteoporosis Reports**, v. 14, n. 6, p. 351–358, 2016.

LECKA-CZERNIK, B. Diabetes, bone and glucose-lowering agents: basic biology. **Diabetologia**, v. 60, n. 7, p. 1163–1169, 2017.

LIMIRIO, P. H. J. O. et al. Influence of hyperbaric oxygen on biomechanics and structural bone matrix in type 1 diabetes mellitus rats. **PLoS one**, v. 3, n. 2, e0191694, 2018.

MANSUR, S. A. et al. Stable Incretin Mimetics Counter Rapid Deterioration of Bone Quality in Type 1 Diabetes Mellitus. **Journal of Cellular Physiology**, v. 230, n. 12, p. 3009–3018, 2015.

ÖNEM, E.; BAKSI, G.; SOĞUR, E. Changes in the Fractal Dimension, Feret Diameter, and Lacunarity of Mandibular Alveolar Bone During Initial Healing of Dental Implants. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 27, n. 5, p. 1009–13, 2012.

RABELO, G. D. et al. Cortical Fractal Analysis and Collagen Crosslinks Content in Femoral Neck After Osteoporotic Fracture in Postmenopausal Women: Comparison with Osteoarthritis. **Calcified Tissue International**, v. 102, n. 6, p. 644-650, 2018.

SAHA, P. K. et al. Fuzzy Object Skeletonization: Theory, Algorithms, and Applications. **IEEE Transactions on Visualization and Computer Graphics**, v. 24, n. 8, p. 2298–2314, 2018.

SALMON, P. L. et al. Structure model index does not measure rods and plates in trabecular bone. **Frontiers in Endocrinology**, v. 6, n. OCT, p. 1-10, 2015.

SROGA, G. E.; WU, P. C.; VASHISHTH, D. Insulin-like growth factor 1, glycation and bone fragility: Implications for fracture resistance of bone. **PLoS one**, v. 10, n. 1, e0117046, 2015.

TANAKA, H. et al. Characteristics of bone strength and metabolism in type 2 diabetic model Tsumura, Suzuki, Obese Diabetes mice. **Bone Reports**, v. 9, p. 74-83, 2018.

TANG, S. Y.; VASHISHTH, D. Non-enzymatic glycation alters microdamage formation in human cancellous bone. **Bone**, v. 46, n. 1, p. 148-154, 2010.

THRAILKILL, K. M. et al. Bone formation is impaired in a model of type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 54, n. 10, p. 2875-2881, 2005.

ZHOU, B. et al. In vivo precision of digital topological skeletonization based individual trabecula segmentation (ITS) analysis of trabecular microstructure at the distal radius and tibia by HR-pQCT. **Pattern Recognition Letters**, v. 76, p. 83-89, 2016.