

Rodrigo Paschoal Carneiro

**EFEITO DA OXIGENAÇÃO HIPERBÁRICA NA  
QUANTIDADE DE MASTÓCITOS DURANTE O  
REPARO ÓSSEO.**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Odontologia da Universidade Federal de  
Uberlândia, para obtenção do Título de  
Mestre em Clínica Odontológica.

Uberlândia, 2015

Rodrigo Paschoal Carneiro

# **EFEITO DA OXIGENAÇÃO HIPERBÁRICA NA QUANTIDADE DE MASTÓCITOS DURANTE O REPARO ÓSSEO.**

Dissertação apresentada à Faculdade  
de Odontologia da Universidade  
Federal de Uberlândia, para obtenção  
do Título de Mestre em Clínica  
Odontológica.

Orientadora: Profa. Dra. Paula Dechichi  
Co-Orientadora: Profa. Dra. Flaviana Soares Rocha

:

Uberlândia, 2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

C289e  
2015      Carneiro, Rodrigo Paschoal,  
            Efeito da oxigenação hiperbárica na quantidade de mastócitos  
            durante o reparo ósseo / Rodrigo Paschoal Carneiro. - 2015.  
            34 f. : il.

            Orientadora: Paula Dechichi.  
            Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
            Programa de Pós-Graduação em Odontologia.  
            Inclui bibliografia.

            1. Odontologia - Teses. 2. Mastócitos - Teses. 3. Ossos -  
            Regeneração - Teses. I. Dechichi, Paula. II. Universidade Federal de  
            Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDU: 616.314

---

## DEDICATÓRIA

Dedico esta conquista à minha família,  
cujo apoio e amor foram essenciais para alcançar esse objetivo.  
Meu pai Rogério e minha mãe Mirian, exemplos de honestidade, caráter e amor  
que sempre espelhei, minha irmã Maisa que esteve sempre comigo desde o  
momento que saímos de casa em busca dos nossos sonhos.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Primeiramente à Deus, responsável por abençoar meus caminhos.

Aos meus queridos pais, Rogério e Mirian agradecem pelo amor, carinho, dedicação, confiança e por serem exemplos durante minha vida. Por me incentivarem a estudar, buscando meu sonho, e por serem meu alicerce em todos os momentos.

À minha irmã Maisa, uma amiga e companheira, que também tanto nos orgulha em sua trajetória profissional, veterinária de sucesso e de amor incondicional aos animais.

Aos meus avós, tios, primos, e todos os familiares que torcem a cada dia pelo meu melhor e vibram com as minhas vitórias, me sinto honrado por fazer parte dessa família. Meu muito obrigado.

Agradeço em especial minha namorada Mariana, que nos últimos 4 anos esteve ao meu lado em todos os momentos difíceis da minha vida, me apoiando e incentivando a seguir em frente. Após superarmos todos esses obstáculos juntos sei que você é a mulher com quem quero dividir todos os dias da minha vida.

À Profª. Drª. Paula Dechichi, minha orientadora, pela dedicação e paciência, em todos os momentos nesses últimos anos. Profissional e pessoa, com caráter impar, humana e compreensiva, minha eterna admiração e sincera gratidão por tudo.

À Profª. Drª. Flaviana Soares Rocha pelos ensinamentos, apoio na execução de todas as partes desse trabalho, pelo convívio acadêmico durante o mestrado e também durante os três anos de residência em Cirurgia Bucomaxilofacial e por sempre estar disposta a ajudar no que for preciso. Meu muito obrigado, serei eternamente grato.

Ao Prof Dr Carlos José Soares coordenador da Pós Graduação da FOUFU, cujo apoio viabilizou esse trabalho.

Aos amigos e professores da área de CTBMF e Implantodontia, Dr. Darcey Zanetta-Barbosa, Drª Íris Malagoni Marquez, Dr. Fausto Borges, Drª

Cláudia Jordão Silva, Dr. Jonas Dantas Batista, Ms. Lair Mambrini Furtado e Ms. Marcelo Caetano Parreira da Silva, minha eterna gratidão pelos ensinamentos, amizade e confiança durante a residência em CTBMF.

Ao amigo Prof Dr Jonas, pelo incentivo desde o início à realização deste trabalho e por sempre estar disposto a estender a mão para ajudar. Obrigado pelo respeito e amizade.

Aos que são mais do que amigos Gustavo, Paz, Bernardo, Scalia, Marco Túlio, Diogo, Túlio, Ederson, Alexandre, Davison, Ede, que são verdadeiros irmãos presentes em todos os momentos importantes da minha vida.

Aos amigos da residência, Luis Gustavo, Atila, Alexandre, Darcio, Thiago, Lívia, Dimas, Soraya, Renato, Luiz Fernando, Maiolino, que muito me ajudaram para que eu pudesse conciliar as atividades na residência e no mestrado.

Ao Prof Ms Julio Bisinoto, grande amigo, colega profissional, parceiro de caráter ímpar, sempre disposto a escutar e buscar melhor profissionalmente meu muito obrigado pelas oportunidades profissionais que temos construído juntos.

Ao Prof Dr Murilo Menezes, grande amigo e incentivador por buscar a excelência dentro da odontologia, exemplo de profissional e pessoa, a quem agradeço muito pela parceria que temos.

Aos amigos do Mestrado, pela amizade e agradável convivência durante esse período.

À Cidinha, Bethania, Flaviane, Irene, Graça e demais funcionários, pela grande colaboração, dedicação e disposição em atender, da melhor forma possível, às nossas necessidades.

Enfim, meu carinho e sinceros agradecimentos, a todos que de uma forma ou de outra, contribuíram na execução deste trabalho.

## **SUMÁRIO**

Resumo	01
Abstract	02
<b>1. Introdução</b>	<b>03</b>
<b>2. Revisão da literatura</b>	<b>06</b>
<b>3. Proposição</b>	<b>10</b>
<b>4. Material e métodos</b>	<b>11</b>
<b>5. Resultados</b>	<b>18</b>
<b>6. Discussão</b>	<b>26</b>
<b>7. Conclusão</b>	<b>29</b>
<b>Referências</b>	<b>30</b>
<b>Anexos</b>	<b>34</b>

## RESUMO

A oxigenação hiperbárica (HBO) é um tratamento de inalação de oxigênio puro sob pressão que tem sido utilizada para favorecer o reparo de tecidos lesados, bem como na prevenção ou tratamento de necrose tecidual. Essa terapia tem mostrado efeitos positivos no processo de reparo ósseo com aumento da osteogênese e angiogênese. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da HBO no reparo ósseo, por meio de parâmetros histológicos (qualitativos) e histomorfométricos (neoformação óssea e contagem de mastócitos). Foram utilizados 40 ratos separados em quatro grupos com 5 animais cada (Controle e HBO). Foram criados defeitos ósseos no fêmur dos animais e os animais do grupo experimental foram submetidos a sessões de HBO (90 minutos sob pressão de 2,5 ATA). Após 1, 3, 5 e 7 dias os animais foram sacrificados e os fêmures removidos, processados e analisados histologicamente. A HBO reduziu a quantidade de mastócitos apenas no período de 3 dias. Houve diferença significativa na porcentagem de matriz óssea entre os grupos controle e HBO no período de 5 dias. De modo geral, a oxigenação hiperbárica acelerou a resolução do processo inflamatório e o reparo ósseo no período de uma semana.

**Palavras-chave:** reparo ósseo, oxigenação hiperbárica, mastócito.



## **ABSTRACT**

Hyperbaric oxygen (HBO) treatment consists in the inhalation of pure oxygen under pressure, which has been used for improve the repair of damaged tissues as well as in the prevention or treatment of tissue necrosis. This therapy has shown positive effects on bone healing with increased osteogenesis and angiogenesis. This study aimed to evaluate the effect of HBO on bone healing through the evaluation of histological (qualitative) and morphometric (bone formation and mast cell count) parameters. Fourty rats were distributed into four groups with 5 animals each (control and HBO). Bone defects were created and the animals in the experimental group were subjected to HBO sessions (90minutos under 2.5 ATA pressure). After 1, 3, 5 and 7 days the animals were euthanized, femurs were removed, processed and analyzed histologically. HBO reduced the amount of mast cells only in the period of 3 days. There was a significant difference in the percentage of bone matrix between the control group and HBO within 5 days. In general, hyperbaric oxygenation fastened the resolution of inflammation and bone repair within one week.

**Keywords:** bone repair, hyperbaric oxygenation, mast cell.

## 1. INTRODUÇÃO

A Oxigenação Hiperbárica (HBO) é um tratamento na qual o paciente é submetido a uma pressão atmosférica maior que a normal, respirando 100% de oxigênio em uma câmara isobárica<sup>1</sup>. O mecanismo de ação da HBO consiste no aumento da quantidade de oxigênio dissolvido no sangue (Tensão de Oxigênio), estimulando a proliferação celular e neovascularização<sup>2,3</sup>. Estudos têm relatado que a HBO também favorece a osteogênese, o que melhora a qualidade do reparo ósseo<sup>3</sup>.

Considerando que tecido ósseo tem processo de reparo lento, a hiperóxia, como ocorre na terapia hiperbárica, aumenta a quantidade de oxigênio dissolvido no plasma sanguíneo e esta condição interfere positivamente no metabolismo tecidual. Estudos têm relatado que a HBO aumenta a formação óssea, a taxa de deposição mineral e a neovasculogênese<sup>4,5,6</sup>, favorecendo o reparo de fraturas, provavelmente, devido ao aumento do anabolismo ósseo<sup>7,8</sup>. Esse aumento também pode ser observado na aceleração da remodelação óssea e, conseqüentemente, na quantidade das células envolvidas nesse processo.

O reparo é um fenômeno que ocorre para reconstituir áreas desorganizadas ou destruídas por trauma aos tecidos, e envolve células e inúmeros mediadores químicos. A HBO é uma terapia que vai otimizar e acelerar o processo de reparo para restabelecer a fisiologia tecidual, seja por regeneração ou por cicatrização. Durante a regeneração ocorre a reconstituição da parte danificada ou perdida, resultando em estruturas com a mesma arquitetura e função original dos tecidos. Na cicatrização ocorre a reparação da região lesionada por um tecido que não restaura completamente a arquitetura ou função da parte danificada<sup>9</sup>.

Durante o processo de reparo tecidual existe uma cronologia de fatores: inflamação e coagulação do sangue; formação de um tecido de granulação e; remodelação tecidual. Inicialmente no processo de reparo existe a formação do coágulo sanguíneo, com a presença de plaquetas contendo fatores de crescimento, além de células inflamatórias. Imediatamente, inicia-se a

formação de uma rede de fibrina, que favorece a migração de células circundantes ao tecido formando-se um infiltrado inflamatório. Gradualmente, ocorre invasão de fibroblastos que têm origem a partir da diferenciação de células mesenquimais, bem como proliferação de novos vasos sanguíneos, originados a partir de células endoteliais, formando o tecido de granulação. Com o passar do tempo, o tecido de granulação origina um tecido conjuntivo fibroso, ainda não totalmente maduro, que irá sofrer um processo de maturação e remodelação, com reorganização das fibras colágenas<sup>10</sup>.

O reparo do tecido ósseo apresenta uma sequência de eventos semelhantes, mas por ser um conjuntivo cuja matriz extracelular é mineralizada, ele apresenta algumas particularidades em seu reparo. Quando o osso é lesionado, ocorre rompimento do periósteo, de vasos sanguíneos, destruição de matriz, da medula óssea e morte de células ósseas. No local da lesão, ocorre sangramento e formação de coágulo, estabelecendo um espaço hipóxico ( $PO_2 = 5$  a  $10\text{mmHg}$ ) e acidótico ( $pH 4$  a  $6$ ), constituído de eritrócitos, fibrina, adjacentes a células ósseas, mesenquimais e plaquetas, que liberam mediadores químicos, como PDGF(Fator de crescimento derivado de plaquetas), FGF(Fatores de crescimento de Fibroblastos), TGF(Fator de transformação de crescimento)<sup>9</sup>.

Na região da lesão óssea, forma-se um tecido necrótico que estimula intensa resposta inflamatória, caracterizada por vasodilatação, exsudação do plasma, leucócitos e células mesenquimais. No início do reparo, os macrófagos removem restos celulares e matriz alterada e em seguida, ocorre resposta proliferativa intensa do periósteo e do endósteo, com neoformação de tecido conjuntivo e também de novos vasos sanguíneos, caracterizando a formação de tecido de granulação. A neovascularização é característica do processo, sendo que os novos vasos sanguíneos podem ser identificados no tecido de granulação.

Com o decorrer do tempo, os osteoblastos sintetizam matriz orgânica, rica em colágeno tipo I, a qual sofrerá mineralização, posteriormente. A extensão e a atividade do reparo ósseo dependem da quimiotaxia e ativação de macrófagos e posterior proliferação e diferenciação de células

osteoprogenitoras em osteoblastos<sup>9</sup>. As células osteoprogenitoras, apesar de serem encontradas na medula óssea, têm sua localização específica na porção do estroma, sendo células mesenquimais não-hematopoiéticas, mas de linhagem osteogênica<sup>11</sup>. Uma vez diferenciadas em osteoblastos, elas são responsáveis por produzir matriz orgânica e controlarem o processo de mineralização óssea. Inicialmente, os osteoblastos sintetizam matriz não mineralizada, que contém inúmeros osteócitos e fibrilas colágenas dispostas sem organização definida, caracterizando o tecido ósseo imaturo. Os osteócitos ocupam lacunas no interior desta matriz óssea, desempenhando função importante na manutenção da matriz.

O processo de reparo ósseo continua, com a formação de tecido ósseo maduro, que apresenta organização das fibrilas colágenas em lamelas ou camadas, menor número de osteócitos incluídos na matriz mineralizada e maior conteúdo mineral. Neste momento, os osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea, possuem um papel importante. Esses são células multinucleadas, que se localizam na superfície da matriz, sendo ativos no processo de remodelação óssea<sup>12</sup>.

Mesmo após a formação do tecido ósseo maduro, o osso mantém um processo combinado e constante de formação e reabsorção. Esta remodelação é determinada pela carga genética e se mostra dependente da regulação e influências endócrinas, bioquímicas e ambientais<sup>13</sup>. Mesmo no adulto, o tecido ósseo é metabolicamente ativo e a manutenção da matriz é resultado do balanço de atividades de síntese e reabsorção, que refletem as atividades antagonistas de osteoblastos e osteoclastos.

O reparo ósseo é influenciado por vários fatores tais como o tipo de osso (cortical ou trabecular), local e severidade da lesão ou dano ao tecido ósseo, presença de infecção, fixação durante o reparo, idade, estado de saúde geral e nutricional dos indivíduos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

A oxigenoterapia hiperbárica (HBO) é uma modalidade terapêutica que consiste na administração de oxigênio puro a 100 % numa pressão ambiente maior do que ao nível do mar, entre 2 à 3 ATA, utilizando-se uma câmara isobárica, ou seja que mantém a pressão constante, projetada para essa finalidade. As câmaras hiperbáricas podem ser individuais ou múltiplas. A HBO promove uma elevação da quantidade de oxigênio dissolvido no sangue (Tensão de Oxigênio) em decorrência da elevação da pressão dentro da câmara, auxiliando a oxigenação tecidual<sup>14</sup>. Tem sido empregada como terapia adjuvante em casos de embolias gasosas, gangrena, infecções necrotizantes de tecidos moles, isquemias agudas, queimaduras e osteomielites.

A HBO tem sido utilizada também, na tentativa de minimizar os riscos de ORN (Osteoradionecrose) e obter sucesso no pós-operatório de procedimentos cirúrgicos que envolvam manipulação de tecidos ósseos previamente irradiados<sup>15,16</sup>, sendo recomendado a aplicação de protocolos de HBO em pacientes que necessitam de intervenção na região oral, como exodontia. Embora ainda não haja consenso na literatura a respeito da HBO para essa finalidade, existe um vasto campo a ser explorado sobre essa terapia e seus efeitos no tecido ósseo de maneira geral, tanto em relação à arquitetura óssea quanto ao reparo tecidual.

Os princípios atribuídos à eficiência da HBO estão relacionados à sua capacidade de estimular o aumento da vascularização através da angiogênese e da capacidade osteogênica proporcionada pela maior disponibilidade de oxigênio para as células, estimulando a proliferação dos fibroblastos, interferindo na síntese de colágeno e assim favorecendo o reparo tecidual<sup>3</sup>. Além destes benefícios, o aumento da tensão de oxigênio disponível possui atividade bactericida e bacteriostática, potencializando a capacidade fagocitária dos glóbulos brancos<sup>17</sup>. Assim, alguns trabalhos demonstram que a OHB, acelera a incorporação de enxertos ósseos livre de vascularização<sup>18</sup>, favorece a reparação de defeitos ósseos críticos<sup>2</sup>, estimula a vascularização e formação óssea<sup>19</sup>, altera o metabolismo ósseo acelerando o processo de reparo pelo

aumento do anabolismo<sup>5</sup>, mesmo em fraturas onde ocorra a não-união e formação de pseudoartrose<sup>4</sup>, ou em tecidos ósseos biologicamente comprometidos, como o irradiado<sup>8,18</sup>. As complicações decorrentes das sessões de HBO são mínimas, incluindo miopia transitória, barotrauma da orelha média e convulsões. Contra-indicações absolutas para a HBO incluem neurite óptica, história de doença pulmonar bolhosa ou bolhas pulmonares congênitas<sup>20</sup>.

Os protocolos de aplicação da HBO ainda não estão muito bem definidos, trabalhos determinando qual o número ideal de sessões para a obtenção dos benefícios desta terapia ainda não foram desenvolvidos. Porém sabe-se que por atuar desde as fases iniciais do reparo tecidual a HBO, vai ter relação direta com algumas células e mediadores inflamatórios.

O mastócito foi citado pela primeira vez a 50 anos atrás por Lindholm em 1969, como uma célula responsável por atuar nas fases iniciais da reparação óssea<sup>21</sup>. A partir daí começou-se a dar importância para o papel dos mastócitos no processo de reparo. Estas células desempenham suas funções através da liberação de mediadores químicos contidos em seus grânulos citoplasmáticos<sup>21</sup>. Os mastócitos colaboram com as reações imunes e têm um papel fundamental na inflamação já que possuem grande quantidade de histamina, substância responsável para o alívio imediato após um trauma, sendo assim uma célula importante durante o processo de reparo ósseo<sup>13</sup>. Além disso, os grânulos contêm proteoglicanas, leucotrienes e citocinas com TNF e IL-1 a IL-6. Durante a lesão tecidual ocorre a liberação das citocinas, fatores de crescimento e produtos do ácido araquidônico, que também participam dos fenômenos vasculares. Dentre as citocinas mais importantes estão a interleucina-1, o TNF e o Interferon gama, que vão manter a permeabilidade vascular de forma mais duradoura.<sup>21</sup>

Os mastócitos derivam de um sub-conjunto de células-tronco encontradas na medula óssea que dão origem a todas as células hematopoiéticas, exceto as da linhagem linfóide. Ao contrário de todas as outras células mielóides, que entram na circulação, os mastócitos maduros migram para o tecido conjuntivo (pele) ou mucosa (intestino) tecidos onde eles

se encontram dormentes até serem ativados. Os mastócitos sensibilizados pela interação com IgE na ausência de um antígeno específico respondem por um período de tempo a baixas concentrações de antígenos através do processo de degranulação e liberação de proteases como triptase, quimase e carboxipeptidase<sup>22</sup>. O complemento de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas liberadas pelos mastócitos incluem mediadores importantes da proliferação, diferenciação e de migração celular, que são essenciais a regeneração óssea<sup>23</sup>.

A ação de agentes agressores desencadeia imediatamente a desgranulação do mastócito, que pode também ser induzida pela interação com algum antígeno. Outro fator que induz a desgranulação mastocitárias é o calor e o trauma, facilitando a liberação de Histamina facilitando o acoplamento de receptores H<sub>1</sub> nas células endoteliais, principalmente as vênulas desencadeando fenômenos bioquímicos responsáveis pela contração dos microfilamentos em seu citoesqueleto. A contração das células endoteliais resultará no aumento dos diâmetros das fenestrações nas junções interendoteliais, consequentemente aumento da permeabilidade vascular, acompanhada de vasodilatação<sup>23</sup>.

Em um estudo realizado em ratos jovens com fraturas de fêmur com alta mobilidade, foram identificados mastócitos adjacente aos canais vasculares penetrados na cartilagem após 2 semanas do início do reparo ósseo (Banovac et al., 1995). Entretanto, um pico de mastócitos foram observados no tecido conjuntivo adjacente aos osteoclastos ativos com 6 semanas após o início do reparo ósseo, sugerindo eles desempenham um papel em das etapas e períodos distintos durante a consolidação da fratura.<sup>24</sup>

Nagle em 1995 mostrou em um estudo que o locus W no cromossomo 5 do rato é alelo com o c-Kit proto-oncogene, que codifica um receptor para o fator de células estaminais (SCF) ou ligando-Kit . A sinalização pelo fator de células estaminais através da célula receptora da superfície da tirosina-quinase c-kit foi identificado como um fator de sobrevivência para células hematopoiéticas, que durante o passo a passo do processo de enriquecimento mostraram que a maioria das células progenitoras, incluindo aquela para os

mastócitos, expressa altos níveis de c-kit<sup>25</sup>. O gene KitW / W-v nos camundongos transportam uma mutação no domínio de tirosina-quinase do receptor de c-kit que resulta em deficiência de mastócitos, anemia, esterilidade e redução do número de neutrófilos e basófilos<sup>26</sup>.

Num estudo com alta resolução em tomografia computadorizada quantitativa periférica (pQCT) e testes biomecânicos para caracterizar os fêmures de ratos KitW / Wv, determinou-se que a massa óssea e geometria, mas não a densidade, foram comprometidos levando à diminuição da capacidade de carga suporte em comparação com ratos de tipo selvagem com o gene<sup>27</sup>. O gene KitW-sh / HNhrJaeBsmJ, doravante chamado KitW-sh, em ratos que carregam uma mutação inversa nos elementos reguladores do gene que codifica o receptor de c-kit, resulta em uma profunda deficiência em mastócitos na ausência de outras deficiências principais.<sup>28</sup>

A proposta mais aceita é de que os mastócitos digerem o tecido de granulação, para permitir a angiogênese nas fases iniciais do reparo e promover a substituição de tecido ósseo compacto<sup>23</sup>. Durante a fase inflamatória do reparo ósseo mastócitos maduros são recrutados para o tecido de granulação, isso promove a liberação de vários fatores angiogênicos, incluindo fatores de células tronco, fatores de crescimento vascular endotelial, fatores de crescimento derivado de plaquetas e fatores de crescimento de fibroblastos, bem como as proteases, tais como triptase e quimiase<sup>23</sup>. Estes fatores induzem a proliferação, diferenciação e fusão de células vasculares endoteliais nos novos canais vasculares, degradando a matriz tecidual do calo mole para permitir o seu crescimento<sup>26</sup>.

Behrends (2014) mostrou que a neovascularização do calo ósseo foi prejudicado claramente nos ratos com o gene de inativação de mastócitos, em 1 e 2 semanas de pós-operatório. Um déficit de vascular também foi visto no sétimo dia de pós-operatório em ratos sem o receptor de quimiocina para CCL2 submetidos à correção de uma lesão óssea de tibia instável<sup>21</sup>. E como o esperado, da fase de progressão "inflamatória" a fase "angiogênica" da lesão, o reparo foi prejudicado antes que ocorresse a substituição de tecido cartilaginoso para osso compacto<sup>21</sup>.



### **3. PROPOSIÇÃO**

O presente estudo teve como o objetivo comparar, em modelo experimental de ratos, os efeitos da HBO no reparo ósseo avaliando a neoformação óssea e quantidade de mastócitos.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 40 ratos machos *Rattus norvegicus*, da linhagem *Wistar* clinicamente sadios com peso entre 250 a 300g. Os animais foram mantidos no Biotério da Universidade Federal de Uberlândia em gaiolas apropriadas e tratados com ração e água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas do COBEA, com aprovação prévia do CEUA-UFU (nº028/12). Os animais foram separados aleatoriamente em dois grupos distintos: grupo controle e grupo oxigenação hiperbárica - HBO, conforme descrito no Quadro 1. Em todos os animais foram criados defeitos ósseos nos fêmures e o período de sacrifício foi de 1, 3, 5 ou 7 dias após a confecção do defeito ósseo.

**Quadro 1**

1 dia	3 dias	5 dias	7 dias
Controle (n=5)	Controle (n=5)	Controle (n=5)	Controle (n=5)
HBO (n=5)	HBO (n=5)	HBO (n=5)	HBO (n=5)

Para o procedimento cirúrgico os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de 100 mg / kg de cetamina e 3 mg / kg de cloridrato de xilazina e colocados em posição supina. O acesso cirúrgico ao fêmur foi obtido por meio de incisão contínua longitudinal com 2 cm de extensão. A musculatura foi divulsionada até a exposição do periósteo, que foi incisado e descolado ao longo da área óssea de interesse. Na região mediana do fêmur foi realizado um defeito ósseo com uma broca esférica nº 8 sob irrigação abundante com solução fisiológica estéril de cloreto de sódio a 0,9%. A referência de profundidade da perfuração se deu pelo rompimento da cortical óssea. Foi colocada uma amarria com fio de sutura Nylon 4-0, a uma distância de 5 mm do defeito ósseo como referência para facilitar a localização do mesmo. Em seguida, foi feita sutura por planos com fio de sutura Nylon 4-0 (Figura 1). No período pós-operatório foi administrado paracetamol em gotas para analgesia (10 gotas em 20 ml de água).

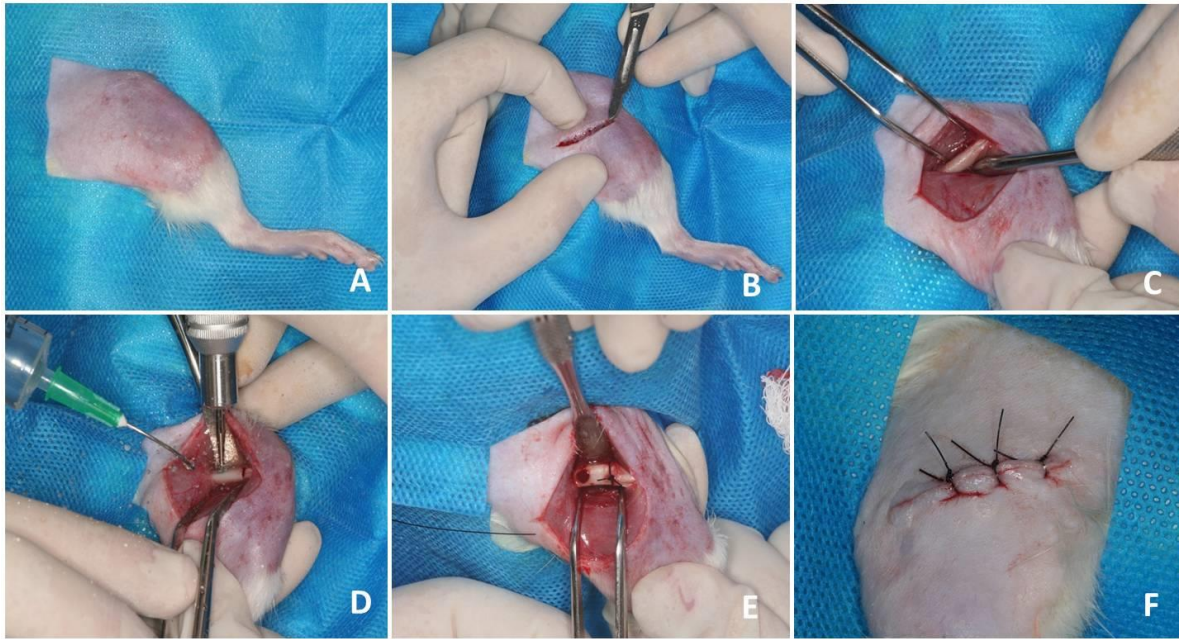
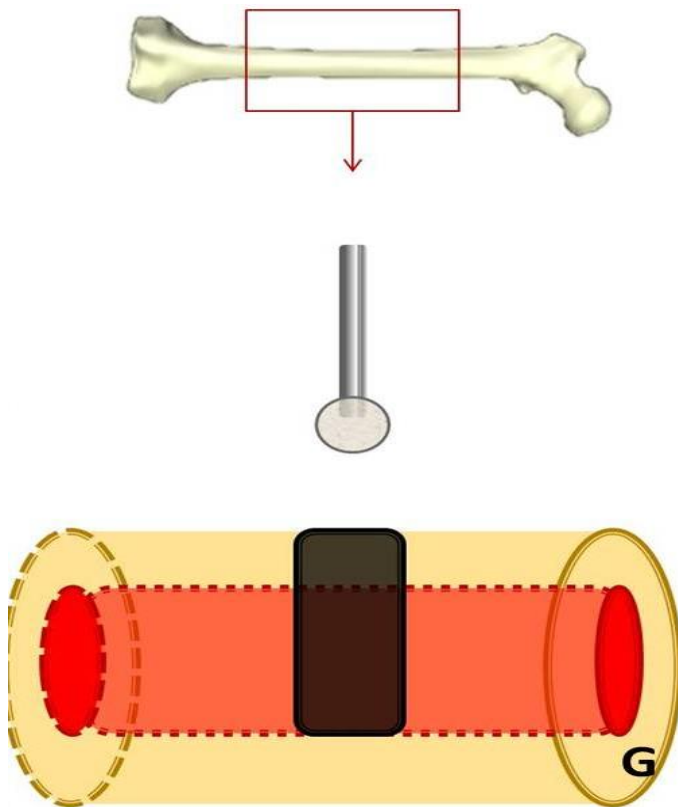


Figura 1: Etapas cirúrgicas para confecção do defeito ósseo. (A) Tricotomia. (B) Incisão em pele. (C) Exposição da área do fêmur. (D) Perfuração com broca esférica. (E) Defeito ósseo e amarra de referência. (F) Sutura. (G) Esquema demonstrativo da profundidade da perfuração.



As sessões de HBO foram realizadas no interior de câmaras experimentais Ecobar 400 (Ecotec Equipamentos e Sistemas Ltda®, Mogi das Cruzes, SP, Brasil). Inicialmente, houve um período de compressão 0.3ATA/min até atingir a pressão necessária para OH. A sessão teve duração de 90 minutos sob pressão de 2,5 ATA (ATA = 1 atmosfera absoluta = 760mmHg). Após, seguiu um período de descompressão a 0.3ATA/min. As sessões foram iniciadas logo após finalização do procedimento cirúrgico e realizadas diariamente durante 1, 3, 5 ou 7 dias, conforme o subgrupo (Figura 2).

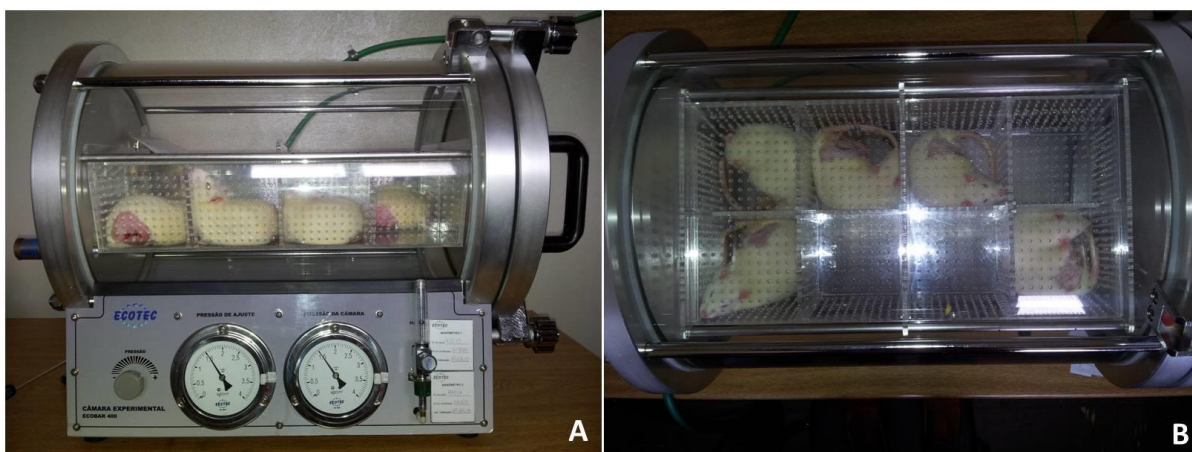


Figura 2: (A-B) Posicionamento dos animais para as sessões de oxigenação hiperbárica.

Os animais foram submetidos à eutanásia 1, 3, 5 ou 7 dias após a cirurgia, por aprofundamento anestésico seguido por deslocamento cervical, seguindo os princípios da Declaração dos Direitos dos Animais. Foi realizada uma incisão longitudinal acompanhando a cicatriz cutânea existente, ao longo dos fêmures operados. Os fêmures foram removidos por desarticulação e seccionados utilizando brocas 702 em alta rotação, sob irrigação com soro fisiológico.

Os fragmentos ósseos contendo o defeito foram fixados em paraformaldeído 4% em Tampão Fosfato 0,1M por 48 horas, desmineralizados

com solução de EDTA a 10% pH 7,4, e então processados para inclusão em parafina pela técnica convencional. Inicialmente foram selecionadas 3 lâminas de cada fêmur coradas em Hematoxilina e Eosina. O estudo morfológico das lâminas foi realizado com o emprego da microscopia óptica (microscópio óptico modelo *BX50 Olympus®*, Olympus Imaging America Inc. Shinjuku-ku, Tóquio/Japão), visando análise descritiva das lâminas histológicas.

Na análise histomorfométrica foi avaliada a quantidade de mastócitos e a neoformação óssea na região do defeito pelo mesmo examinador, em estudo cego. Para essa finalidade foram selecionadas 3 lâminas de cada fêmur coradas em Azul de Toluidina (para quantificação dos mastócitos) e 3 lâminas coradas em Tricrômio de Mallory (para quantificação da neoformação óssea). Os mastócitos foram identificados com objetiva de 40X no microscópio binocular Nikon Eclipse E2000 (Nikon®, Nikon do Brasil, São Paulo, Brasil) em 13 campos, na região do defeito ósseo e sua periferia conforme demonstrado na Figura 3.

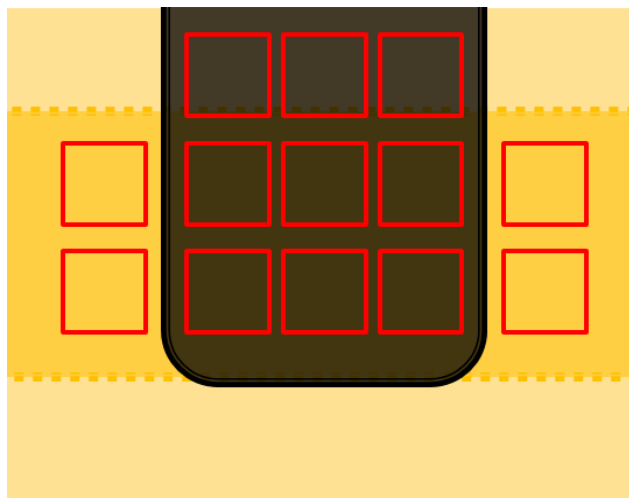


Figura 3: Esquema demonstrativo dos campos (em vermelho) utilizados para contagem dos mastócitos na região do defeito ósseo (em preto) e na periferia do defeito ósseo (região medular em amarelo).

Para avaliação da neoformação óssea, as imagens histológicas foram capturadas com objetiva de 4X utilizando o programa de captura de imagens Motic Live Imaging Module (Motic®, British Columbia, Canada) e microscópio



binocular Nikon Eclipse E2000 acoplado à câmera Moticam Pro 252B (Motic®, British Columbia, Canada) ligada a um computador. Em seguida, as imagens de cada defeito ósseo foram unidas e segmentadas no software editor de imagens Adobe Photoshop CS2 (Adobe®, Adobe System Inc., San Jose, CA/EUA) e analisadas utilizando HL Image 2005++. A segmentação corresponde à apagar o tecido mole, permanecendo apenas o tecido de interesse na imagem (neste caso, tecido ósseo). Nas imagens, segmentadas, a região de interesse (ROI) que corresponde ao defeito ósseo foi delimitada com a ferramenta drawn e a porcentagem de matriz óssea dentro desta área foi quantificada com a ferramenta measurement conforme descrito por Batista et al. (2014) (Figura 4). Também foi realizada análise semi-quantitativa, com avaliação dos seguintes parâmetros: 1-Presença de neoformação óssea se estendendo até a cortical oposta na ROI; 2- Presença de neoformação óssea se estendendo além da ROI.

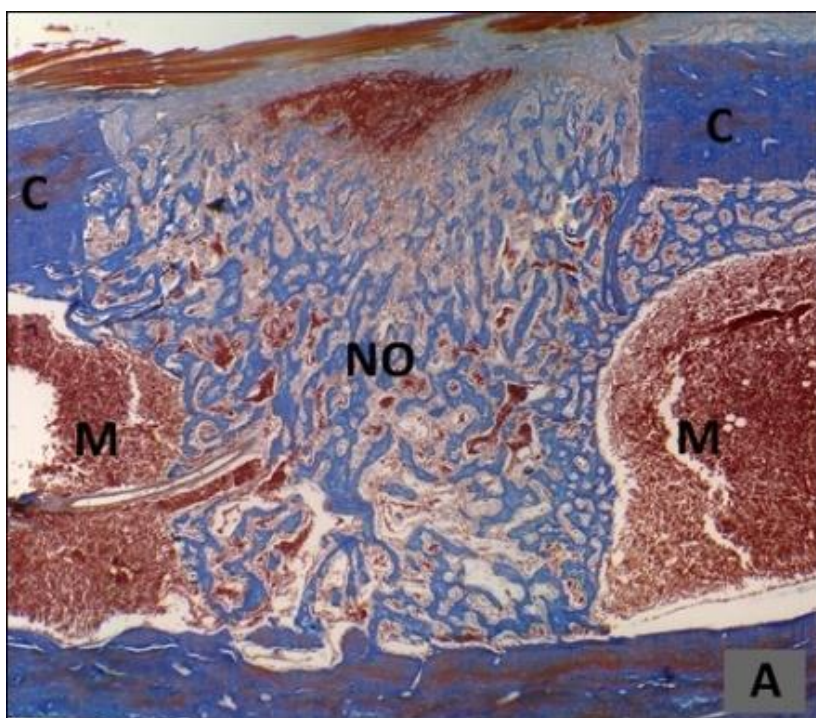
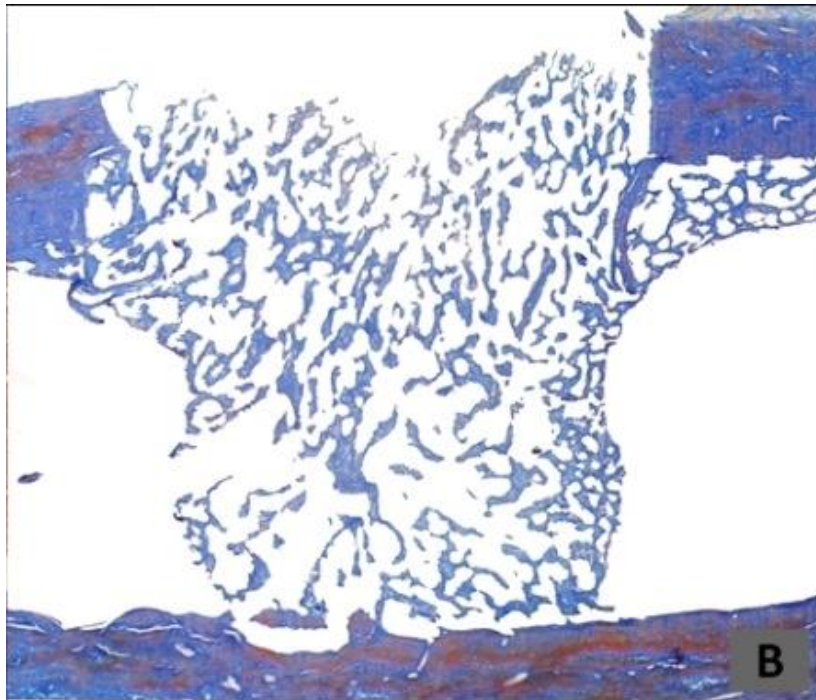
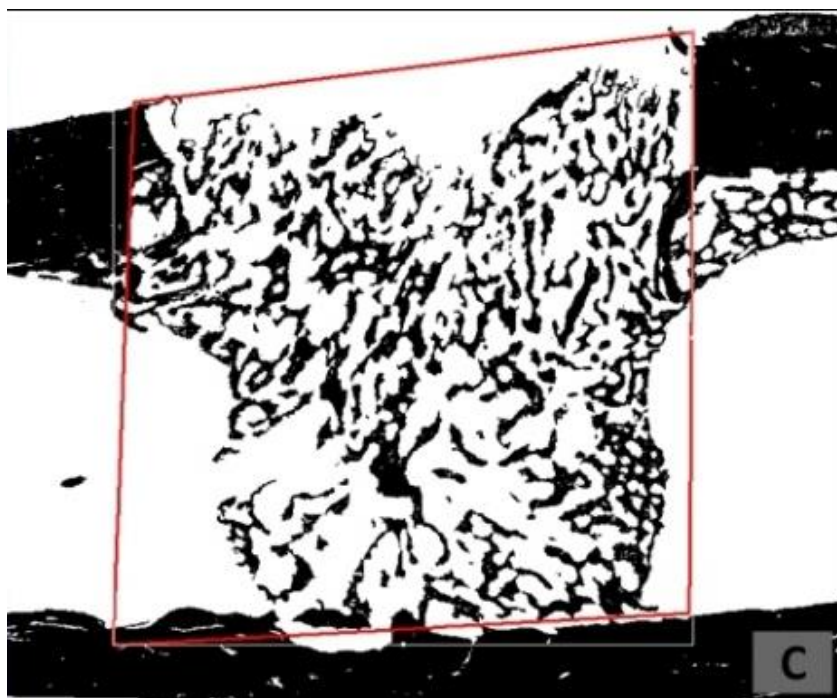


Figura 4: A - Fotomicrografia de uma seção longitudinal de fêmur mostrando cortical óssea (C), medula óssea (M) e neoformação óssea (NO).



B – Imagem após a remoção do tecido mole.



C – Imagem binária da mesma fotomicrografia com a delimitação da área total do defeito ósseo (linha vermelha). Ampliação 4X. Tricrômio de Mallory.

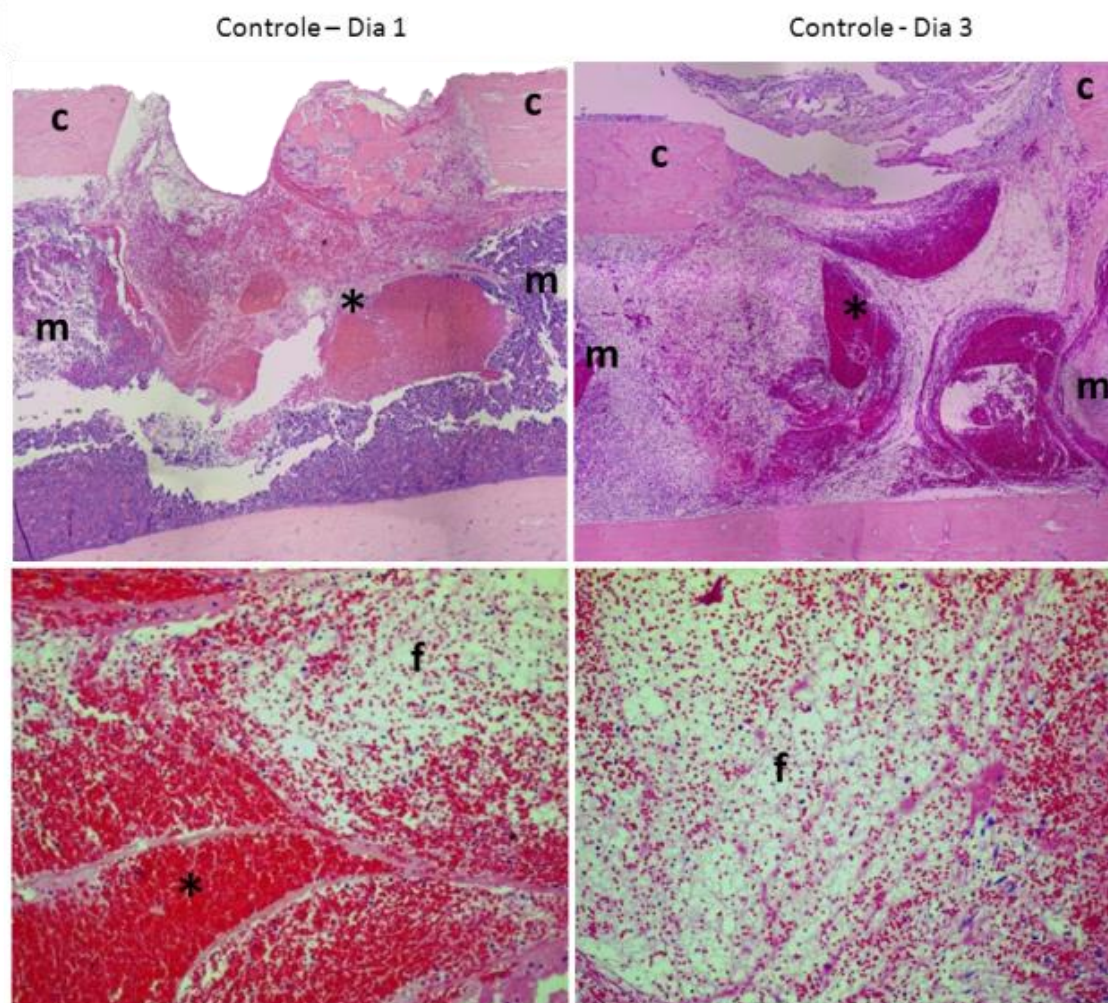
Os dados obtidos foram analisados com o programa GraphPad Prism (GraphPad Prism version 5.0 for Windows, San Diego, CA, USA) utilizando os testes t não-pareado, Mann-whitney e Fischer. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .



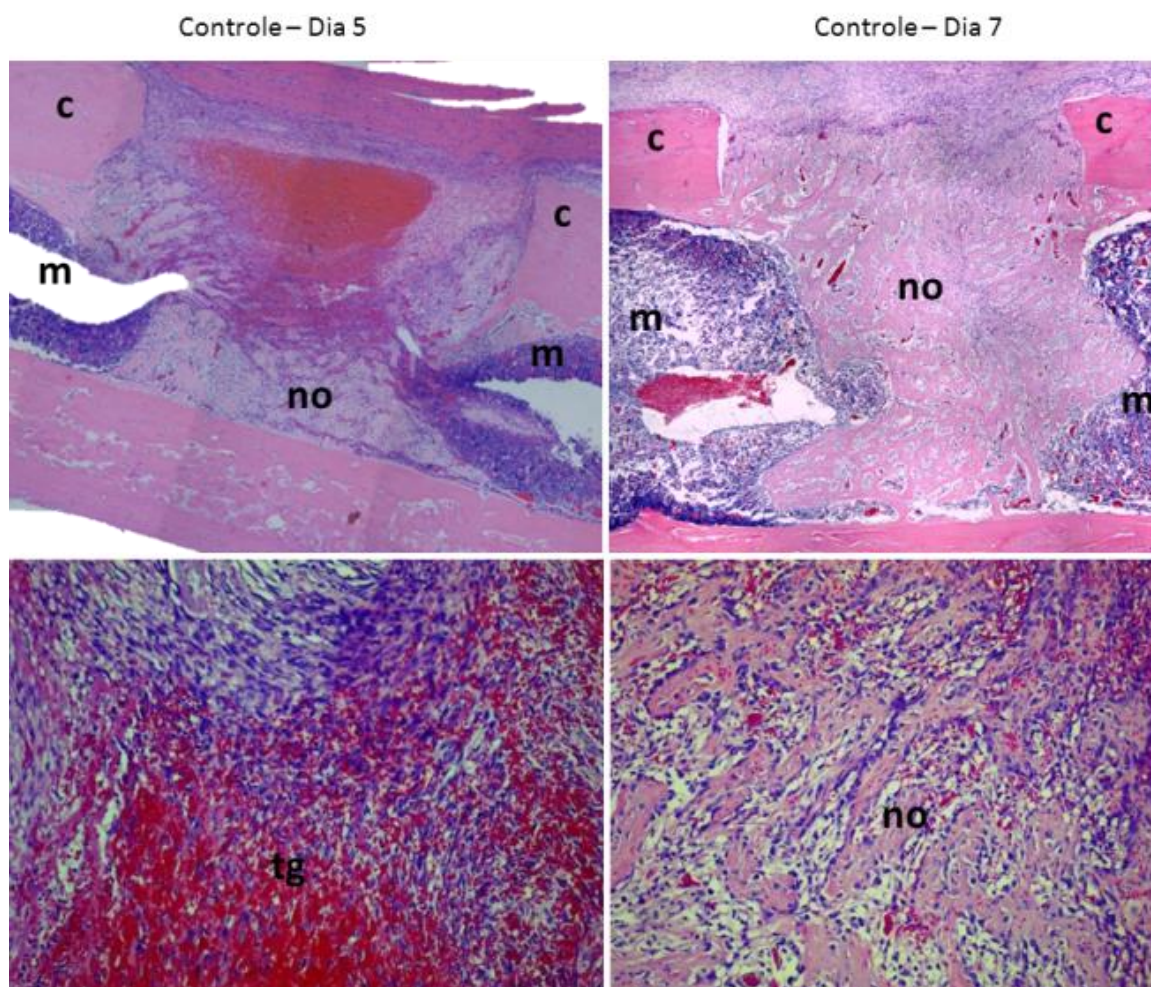
## 5. RESULTADOS

Em ambos os grupos, a análise histológica mostrou no dia 1, presença de coágulo preenchendo o defeito ósseo. No dia 3, no grupo controle, as células inflamatórias começam a invadir o coágulo e, no grupo HBO, uma redução do coágulo foi evidente, com aumento de fibrina delimitando pequenos espaços que continham exsudato (Figuras 1 e 3). No dia 5, no grupo HBO, observou-se a formação de tecido de granulação organizado, com muitas células fusiformes entre vasos neoformados. Além disso, a neoformação óssea foi acelerada quando comparado ao grupo controle. Em ambos os grupos no dia 7, observou-se o tecido ósseo primário preenchendo a área do defeito, estendendo pelo canal medular do fêmur, com um grande número de osteócitos incluídos na matriz óssea. Revestindo a matriz óssea foram observados osteoblastos, cúbicos com acentuada basofilia citoplasmática, indicando intensa atividade de síntese proteica. No grupo controle, havia presença de novos vasos sanguíneos e áreas com tecido de granulação ainda presente. No grupo HBO, havia tecido ósseo preenchendo toda a área do defeito ósseo, com trabéculas já bem definidas evidenciando avanço no processo de remodelação (Figuras 2 e 4).

Os mastócitos apresentavam-se grandes, arredondados e com citoplasma repleto de grânulos que se coram intensamente (Figura 5). Eram mais frequentes na periferia do defeito ósseo, especialmente nos períodos de 1 e 3 dias. Ocasionalmente foram evidenciados mastócitos em desgranulação.

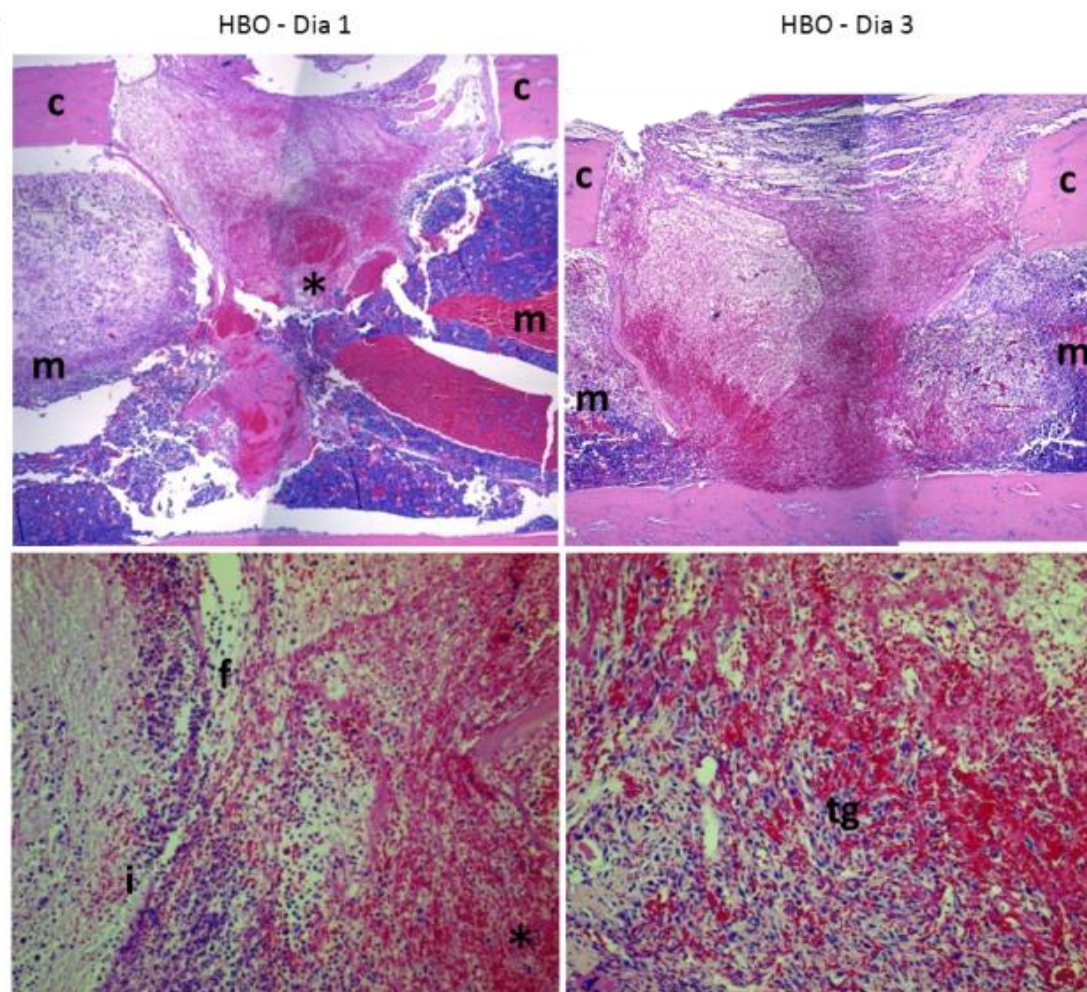


**Figura 1:** Fotomicrografia do defeito ósseo nos grupos controle nos períodos avaliados de 1 e 3 dias. Cortical óssea (c); Canal medular (m); Coágulo (\*); Tecido de granulação (tg); Rede de fibrina (f); Infiltrado inflamatório (i); Neoformação óssea (no). HE, X4 and X10.

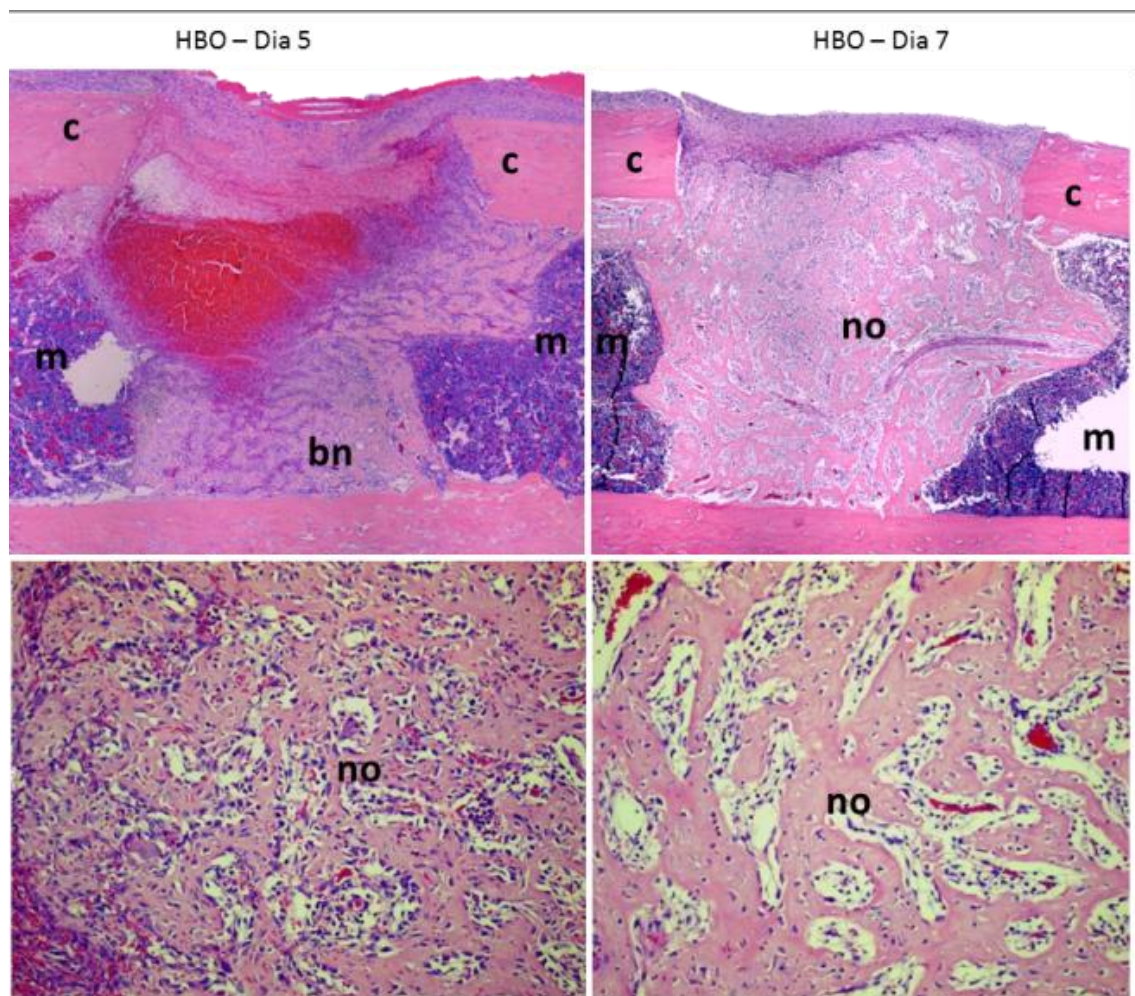


**Figura 2:** Fotomicrografia do defeito ósseo nos grupos controle nos períodos avaliados de 5 e 7 dias. Cortical óssea (c); Canal medular (m); Coágulo (\*); Tecido de granulação (tg); Rede de fibrina (f); Infiltrado inflamatório (i); Neoformação óssea (no). HE, X4 and X10.



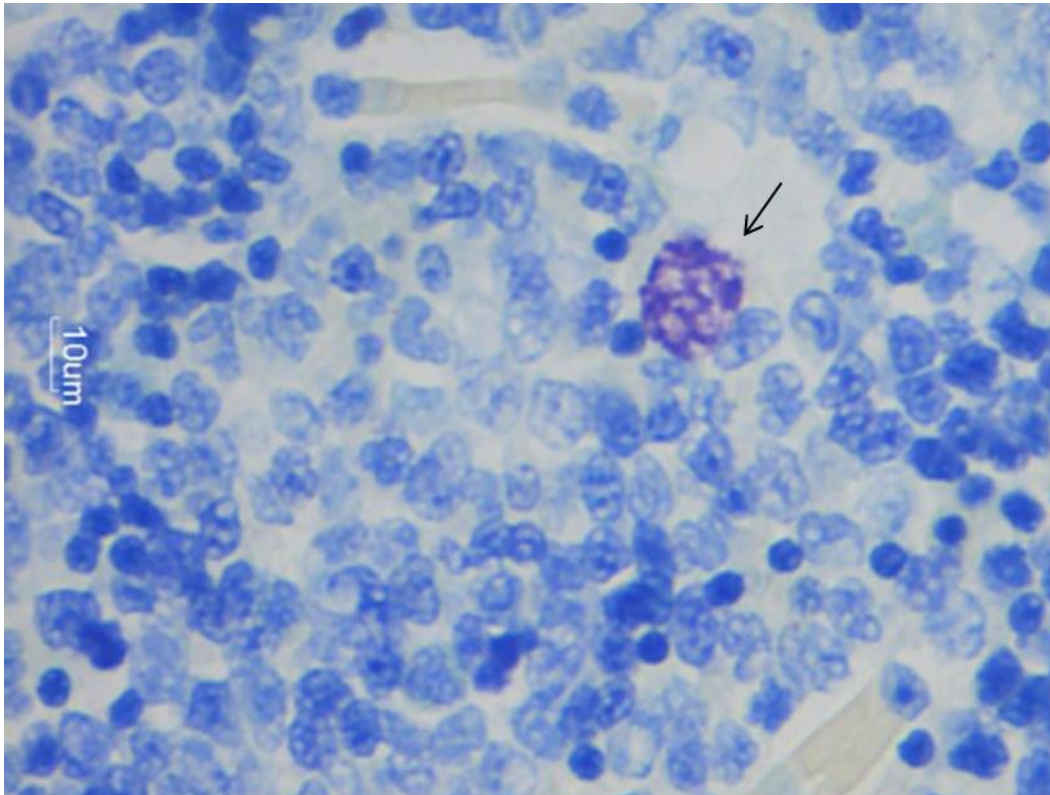


**Figura 3:** Fotomicrografia do defeito ósseo nos grupos HBO nos períodos avaliados de 1 e 3 dias. Cortical óssea (c); Canal medular (m); Coágulo (\*); Tecido de granulação (tg); Rede de fibrina (f); Infiltrado inflamatório (i); Neoformação óssea (no). HE, X4 and X10.



**Figura 4:** Fotomicrografia do defeito ósseo nos grupos HBO nos períodos avaliados de 5 e 7 dias. Cortical óssea (c); Canal medular (m); Coágulo (\*); Tecido de granulação (tg); Rede de fibrina (f); Infiltrado inflamatório (i); Neoformação óssea (no). HE, X4 and X10.

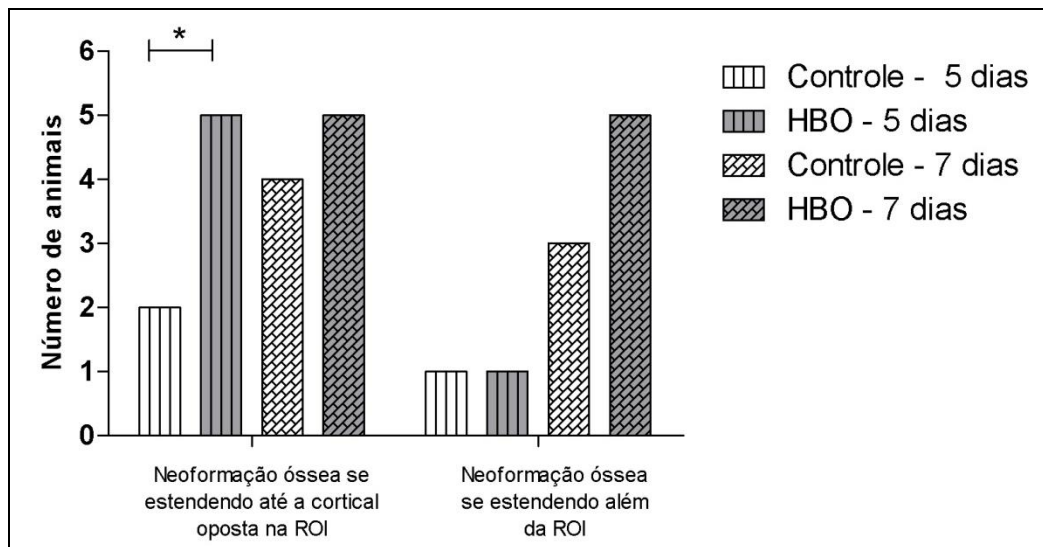




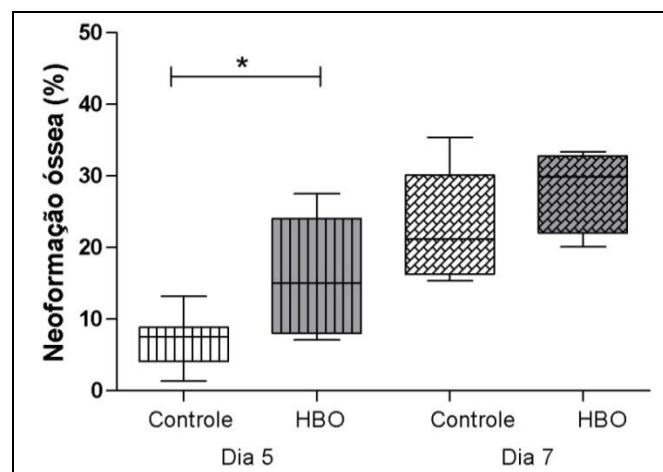
**Figura 5:** Fotomicrografia evidenciando o mastócito (→). Azul de Toluidina. X40.

A neoformação óssea que se estendeu para além dos limites da ROI foi mais evidente no HBO em comparação ao grupo controle, em 5 e 7 dias, embora tal distribuição não tenha sido significativa. A neoformação óssea atingindo a cortical oposta foi significativamente mais evidente no grupo HBO do que no grupo controle em 5 dias (Figura 6).

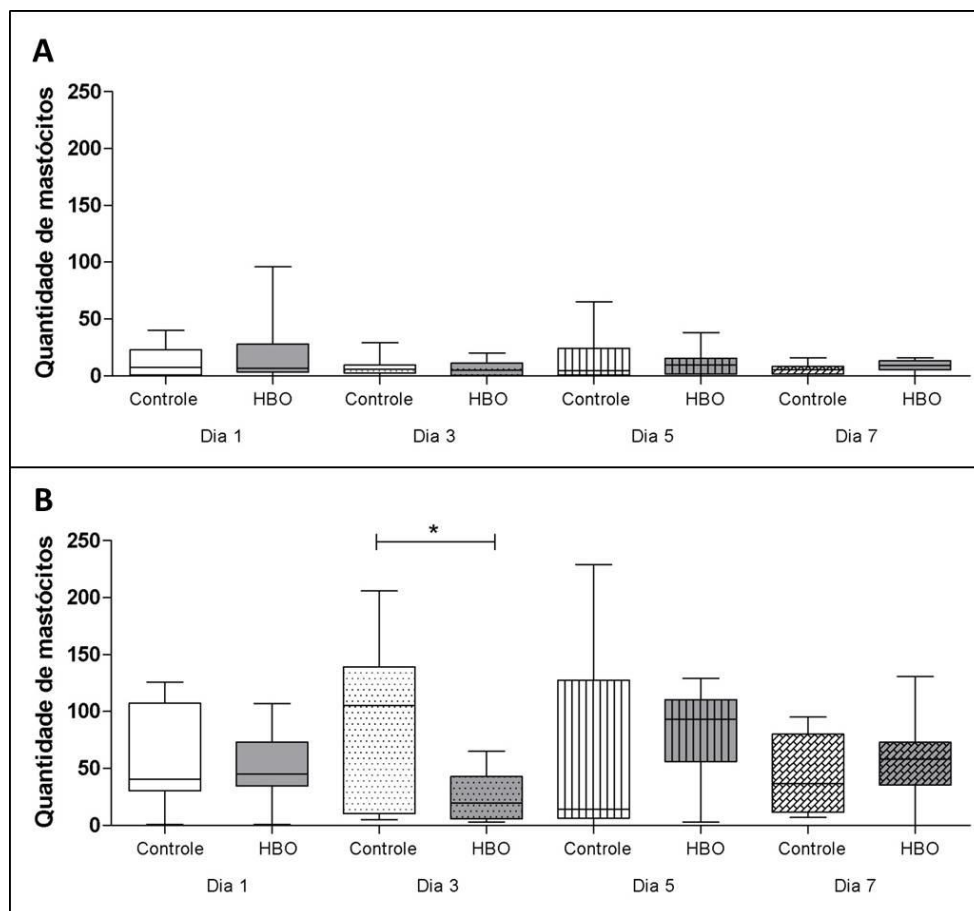
A análise estatística mostrou um aumento significativo na porcentagem de neoformação óssea na HBO ( $15,95 \pm 7,68$ ) quando comparado com o grupo controle ( $7,06 \pm 3,71$ ) em 5 dias. Não houve diferença significativa na porcentagem de neoformação óssea entre o controle ( $23,10 \pm 7,4$ ) e HBO ( $28,10 \pm 5,4$ ) no período de 7 dias (Figura 7). Não houve diferença significativa na quantidade de mastócitos na região do defeito ósseo entre os grupos avaliados. Na periferia do defeito ósseo, houve maior quantidade de mastócitos no grupo controle ( $85,19 \pm 72,49$ ) em relação ao HBO ( $24,57 \pm 20,10$ ), no período de 3 dias. Não houve diferença entre os grupos, nos demais períodos (Figura 8).



**Figura 6:** Parâmetros histológicos semi-quantitativos avaliados nos grupos controle e HBO nos períodos de 5 e 7 dias: Neoformação óssea se estendendo até a cortical oposta na ROI; Neoformação óssea se estendendo além da ROI. (\* $p < 0.05$ ).



**Figura 7:** Porcentagem de neoformação óssea nos grupos controle e HBO nos períodos de 5 e 7 dias. (\* $p < 0.05$ ).



**Figura 8:** Quantificação de mastócitos na região do defeito ósseo (A) e na periferia do defeito ósseo (B) nos grupos controle e HBO.



## 6. DISCUSSÃO

Nesse estudo foi avaliada a influência da oxigenação hiperbárica no reparo inicial de tecido ósseo. Uma terapia que aumente o aporte de oxigênio no local da ferida é interessante, pois aceleraria o reparo devolvendo a função tecidual rapidamente, além de evitar prejuízos no processo natural do reparo. Os benefícios da oxigenação hiperbárica são derivados dos efeitos fisiológicos e farmacológicos do oxigênio em altas doses. A ação fisiológica da HBO tem como alvo tecidos em estado de hipóxia, ou seja, tecidos em menor Pressão de Oxigênio ( $PO_2$ ).

Após um trauma ósseo, há perturbação do suprimento vascular local, formando uma área hipóxica, com pouco fornecimento de sangue e oxigênio. A hipóxia prolongada inibe a proliferação fibroblástica e a síntese de colágeno, afetando diretamente o reparo tecidual<sup>4</sup>. Durante as sessões no interior da câmara, ocorre um estado de hiperoxigenação com elevação da  $PO_2$  em todos os tecidos do corpo. Logo após o término da sessão, a  $PO_2$  retorna aos níveis normais e ocorre a liberação de mediadores químicos que estimulam a síntese de colágeno, angiogênese e osteogênese<sup>8,11</sup>.

Em todos os grupos, a reparação óssea ocorreu como previsto, mas melhores resultados no grupo experimental, onde foi observada uma melhor organização tecidual na área da lesão. A análise morfológica mostra que a HBO acelerou os eventos iniciais da reparação óssea com melhor resolução do processo inflamatório e organização evidente do osso em neoformação.

Sabendo que a HBO é uma terapia que atua diretamente na permeabilidade vascular, promovendo um aumento da vascularização na área da lesão<sup>5,8</sup>, é possível relacionar a quantidade de mastócitos aos benefícios dessa terapia em cada uma das fases do processo inflamatório. A menor quantidade de mastócitos na periferia do defeito observada, no grupo HBO, no período de 3 dias, quando o processo inflamatório atinge seu pico, foi coerente com a análise morfológica. A resolução acelerada da inflamação induzida pela terapia, resultou em um melhor reparo tecidual como um todo, com deposição

precoce de tecido ósseo primário em substituição ao tecido de granulação como observado em 5 dias.

Interessante observar que o mastócito está relacionado não só ao processo inflamatório, mas ao aumento da permeabilidade vascular no local da lesão, o que poderia favorecer a neovasculogênese e o recrutamento de mediadores químicos responsáveis pelo reparo da lesão <sup>12,13,14</sup>. Diante desta hipótese da resolução acelerada do processo inflamatório, poderíamos pensar que essa redução da quantidade de mastócitos no grupo HBO em 3 dias deveria ser mantida nos demais períodos avaliados, o que não foi observado.

No período de 5 e 7 dias, a quantidade de mastócitos foi maior no grupo HBO. Nesses períodos o processo inflamatório já está em resolução e a deposição óssea, bem como remodelação, já estão presentes, o que caracteriza um momento distinto no reparo da lesão. Isso nos faz pensar que o mastócito também esteja relacionado à deposição óssea. De fato, existem relatos na literatura que a deficiência na quantidade de mastócitos gera um atraso na neoformação óssea<sup>12, 13,14</sup>. Sendo assim, nos períodos de 5 e 7 dias quando há evidência de formação óssea, a quantidade de mastócitos maior no grupo HBO poderia ser um indicio de que estas células favoreçam indiretamente a neoformação óssea. De uma maneira geral, os mastócitos promovem aumento da permeabilidade vascular e liberação de mediadores químicos, além de participarem da degradação da matrix extracelular. Consequentemente, isso facilita a formação de novos vasos sanguíneos na área da lesão<sup>19</sup>, e também a osteogênese. Esses eventos resultam em remodelação óssea também precoce, como observado em 7 dias no grupo HBO, onde foi observado melhor definição e organização das trabéculas ósseas.

Entretanto, mesmo diante do evidente avanço na remodelação óssea induzida pela HBO, a diferença numérica na porcentagem de neoformação óssea no grupo HBO em comparação com o grupo controle não foi estatisticamente significativa. É importante considerar que a escolha por defeitos ósseos não críticos em fêmur de rato pode ter influenciado estes resultados. Embora tenha sido observada uma diferença entre os grupos, em

defeitos críticos essa diferença poderia ser mais evidente porque a necessidade da oxigenação hiperbárica seria um requisito para o fechamento de um defeito que não se repararia espontaneamente. Apesar do diâmetro do defeito ser compatível com o tamanho do fêmur do rato, ele continua a ser relativamente pequeno, favorecendo uma reparação rápida do osso em ambos os grupos. Na literatura existem estudos que investigaram a capacidade da OH em promover a reparação óssea de defeitos de tamanho crítico, demonstrando que a terapia permitiu o fechamento de defeitos críticos em calota craniana em coelhos <sup>15,16</sup>.

## **7. CONCLUSÃO**

A HBO reduziu a quantidade de mastócitos no período de 3 dias, onde existe o pico da inflamação, acelerando a resolução do processo inflamatório e consequentemente acelerando o reparo ósseo, com resultados positivos na neoformação óssea, já que o aumento da permeabilidade vascular na área da lesão favorece a chegada de células osteoprogenitoras responsáveis pelo reparo ósseo.

## REFERÊNCIAS

1. Shirley PJ, Ross JAS. Hyperbaric medicine part I: Theory and practice. *Curr Anaesth Crit Care* 2001;12(2):114-20.
2. Jan AM, Sándor GK, Iera D, Mhawi A, Peel S, Evans AW, Clokie CM. Hyperbaric oxygen results in an increase in rabbit calvarial critical sized defects. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006 Feb;101(2):144-9.
3. Fok TC, Jan A, Peel SA, Evans AW, Clokie CM, Sándor GK. Hyperbaric oxygen results in increased vascular endothelial growth factor (VEGF) protein expression in rabbit calvarial critical-sized defects. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008 Apr;105(4):417-22.
4. M, Yurttas Y, Köse O, Demiralp B, Yüksel HY, Kömürcü M. Adjunctive hyperbaric oxygen therapy in the treatment of atrophic tibial nonunion with Ilizarov external fixator: a radiographic and scintigraphic study in rabbits. *Acta Orthop Traumatol Turc.* 2012;46(2):126-31.
5. Kawada S, Wada E, Matsuda R, Ishii N. Hyperbaric hyperoxia accelerates fracture healing in mice. *PLoS One.* 2013 Aug 14;8(8):e72603.
6. Neves PC, Abib Sde C, Neves RF, Pircchio O, Saad KR, Saad PF et al. Effect of hyperbaric oxygen therapy combined with autologous platelet concentrate applied in rabbit fibula fraction healing. *Clinics (Sao Paulo).* 2013 Sep;68(9):1239-46
7. Salgado CJ, Raju A, Licata L, Patel M, Rojavin Y, Wasielewski S et al. Effects of hyperbaric oxygen therapy on an accelerated rate of mandibular distraction osteogenesis. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2009 Dec;62(12):1568-72.

8. Muhonen A, Haaparanta M, Grönroos T, Bergman J, Knuuti J, Hinkka S, Happonen RP. (2004) Osteoblastic activity and neoangiogenesis in distracted bone of irradiated rabbit mandible with or without hyperbaric oxygen treatment. *Int J Oral Maxillofac Surg* 33:173-8
9. Schmidt-Bleek K, Schell H, Schulz N, Hoff P, Perka C, Buttgereit F et al. Inflammatory phase of bone healing initiates the regenerative healing cascade. *Cell Tissue Res*. 2012 Mar;347(3):567-73.
10. Consolaro A. *Inflamação e Reparo*. 1st ed. Maringá: Ed. Dental Press; 2009. Constantino PD, Friedman CD, Steinberg MJ. Irradiated bone and its management. *Otolaryngol Clin North Am*. 1995 Oct;28(5):1021-38.
11. Bianco P, Sacchetti B, Riminucci M. Osteoprogenitors and the hematopoietic microenvironment. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2011 Mar;24(1):37-47.
12. Katchburian E, Arana-Chaves V. *Histologia e Embriologia Oral*. 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 2004.
13. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury*. 2005 Dec;36(12):1392-404. Epub 2005 Aug 15. Review.
14. Thom SR. Hyperbaric oxygen: its mechanisms and efficacy. **Plast Reconstr Surg** 2011;127(Suppl. 1):131S–41S.
15. Clark CL, Strider J, Hall C, Ferguson HW, Armstrong KL, Runner RR, Baur DA. Distraction osteogenesis in irradiated rabbit mandibles with adjunctive hyperbaric oxygen therapy. **J Oral Maxillofac Surg**. 2006 Apr;64(4):589-93

16. Feldmeier JJ. Hyperbaric oxygen for delayed radiation injuries. **Undersea Hyperb Med**. 2004 Spring;31(1):133-45.
17. Jacobson AS, Buchbinder D, Hu K, Urken ML. Paradigm shifts in the management of osteoradionecrosis of the mandible. **Oral Oncol**. 2010 Nov;46(11):795-801
18. Sawai T, Niimi A, Takahashi H, Ueda M. Histologic study of the effect of hyperbaric oxygen therapy on autogenous free bone grafts. **J Oral Maxillofac Surg** 1996;54:975–81.
19. Pedersen TO, Xing Z, Finne-Wistrand A, Hellem S, Mustafa K. Hyperbaric oxygen stimulates vascularization and bone formation in rat calvarial defects. **Int J Oral Maxillofac Surg**. 2013 Jul;42(7):907-14
20. Giebfried JW, Lawson W, Biller HF. Complications of hyperbaric oxygen in the treatment of head and neck disease. **Otolaryngol Head Neck Surg** 1986;94:508–12
21. Behrends DA, Cheng L, Sullivan MB, Wang MH, Roby GB, Zayed N, Gao C, Henderson JE, Martineau PA. Defective bone repair in mast cell deficient mice with c-Kit loss of function. *Eur Cell Mater*. 2014 Oct 6;28:209-21.
22. Amin K. The role of mast cells in allergic inflammation. *Respir Med*. 2012 Jan;106(1):9-14. doi: 10.1016/j.rmed.2011.09.007. Epub 2011 Nov 22. Review.
23. Ito K, Perren SM (2013) Biology of Fracture Healing. In: *AO Principles of Fracture Management* (Ruedi TP, Buckley RE, Moran CG, eds), AO Foundation Publishing, Davos.
24. Banovac K, Renfree K, Makowski AL, Latta LL, Altman RD (1995) Fracture healing and mast cells. *J Orthop Trauma* 9: 482-490.

25. Muguruma Y, Lee MY (1998) Isolation and characterization of murine clonogenic osteoclast progenitors by cell surface phenotype analysis. *Blood* 91: 1272-1279.
26. Galli SJ, Kitamura Y (1987) Genetically mast-cell deficient w/wv and sl/sld mice. Their value for the analysis of the roles of mast cells in biologic responses *in vivo*. *Am J Pathol* 127: 191-198.
27. Cindik ED, Maurer M, Hannan MK, Muller R, Hayes WC, Hovy L, Kurth AA (2000) Phenotypical characterization of c-kit receptor deficient mouse femora using non-destructive high-resolution imaging techniques and biomechanical testing. *Technol Health Care* 8: 267- 275.
28. Grimbaldston MA, Chen CC, Piliponsky AM, Tsai M, Tam SY, Galli SJ (2005) Mast cell-deficient w-sash c-kit mutant kit w-sh/w-sh mice as a model for investigating mast cell biology *in vivo*. *Am J Pathol* 167: 835-848.



## ANEXO 1



Universidade Federal de Uberlândia  
– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



### CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 028/12, sobre o projeto de pesquisa intitulado "Efeito da laserterapia e oxigenoterapia hiperbárica no reparo, microestrutura e resistência biomecânica do osso submetido à radiação ionizante.", sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Paula Dechichi**, está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal conforme regulamentações do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) – UFU em reunião de 29 de Maio de 2012.

(We certify that the protocol nº 028/12, about "Effect of lasertherapy and hyperbaric oxygenotherapy in bone repair, microstructure and resistance after ionizing radiation", agrees with the ETHICAL PRINCIPLES ON ANIMAL RESEARCH and regulations of National Advice of Controlled Animal Experimentation (CONCEA) and approved by Ethics Commission on Use of Animals (CEUA) – Federal University of Uberlândia in 29/05/2012).

Uberlândia, 04 de Junho de 2012.

**Profa. Dra. Ana Elizabeth Janini Custódio**  
Vice Coordenadora Pro Tempore da Comissão de Ética  
Na utilização de animais