

PÂMELLA COELHO DIAS

**Efeito da oxigenação hiperbárica no reparo ósseo de ratos
diabéticos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do título de Mestre em Odontologia na Área de Clínica Odontológica Integrada.

Uberlândia, 2016

PÂMELLA COELHO DIAS

**Efeito da oxigenação hiperbárica no reparo ósseo de ratos
diabéticos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do título de Mestre em Odontologia na Área de Clínica Odontológica Integrada.

Orientadora: Profa. Dra. Paula Dechichi

Co-orientadora: Profa. Dra. Karen Renata Nakamura Hiraki

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Paula Dechichi

Profa. Dra. Ana Paula Coelho Balbi

Prof. Dr. Sérgio Rocha Bernardes

Uberlândia, 2016

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

D541e
2016 Dias, Pâmella Coelho, 1990
 Efeito da oxigenação hiperbárica no reparo ósseo de ratos diabéticos
 / Pâmella Coelho Dias. - 2016.
 61 p. : il.

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

1. Odontologia - Teses. 2. Diabetes - Teses. 3. Ossos - Teses. 4.
Oxigenoterapia - Teses. I. Dechichi, Paula. II. Hiraki, Karen Renata
Nakamura. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
Graduação em Odontologia. IV. Título.

CDU: 616.314

Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de: Dissertação de Mestrado Acadêmico nº 298 – COPOD

Data: 29/02/2016

Discente: Pâmella Coelho Dias, Matrícula: 11412ODO013

Título do Trabalho: Efeito da oxigenação hiperbárica no reparo ósseo de ratos diabéticos.

Área de concentração: Clínica Odontológica Integrada.

Linha de pesquisa: Processo de reparo.

Projeto de Pesquisa de vinculação: Processo de reparo.

As quatorze horas do dia vinte e nove de fevereiro do ano de 2016 no Anfiteatro Bloco 8C, Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em janeiro 2016, assim composta: Professores Doutores: Ana Paula Coelho Balbi (UFU); Sérgio Rocha Bernardes (ILAPEO); e Paula Dechichi (UFU) orientador(a) do(a) candidato(a) **Pâmella Coelho Dias**.

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa Dra. Paula Dechichi apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de argüição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor (a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos (às) examinadore (a)s, que passaram a arguir o (a) candidato (a). Ultimada a argüição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais.

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o (a) candidato(a) **A**provado(a).

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às **17** horas e **15** minutos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Profa. Dra. Ana Paula Coelho Balbi – UFU



Prof. Dr. Sérgio Rocha Bernardes – ILAPEO



Profa. Dra. Paula Dechichi – UFU

Orientador (a)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família que tanto amo:
minha mãe Maria Madalena, meu pai José Patrocínio
(*in memoriam*) e meu irmão Marlon, por todo amor,
carinho e apoio.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por iluminar e abençoar meu caminho e me amparar nos momentos difíceis.

À minha mãe e melhor amiga **Maria Madalena**, por me incentivar, aconselhar e sempre me ajudar em tudo que eu preciso. Essa vitória também é sua!

Ao meu pai **José Patrocínio**, que embora não esteja mais aqui, sempre será meu maior exemplo e inspiração.

Ao meu irmão **Marlon**, pela amizade, companheirismo, por todos bons momentos que passamos juntos, pelos conselhos e por sempre ajudar no que eu preciso.

À **Profa. Dra. Paula Dechichi**, por todos ensinamentos, por ser uma excelente orientadora, dedicada, atenciosa, por sempre ajudar quando precisamos e ser o exemplo de profissional que pretendo ser. Muito obrigada por tudo.

À **Profa. Dra. Karen Renata Nakamura Hiraki**, pela co-orientação e por toda ajuda e apoio no projeto.

À **Profa. Dra. Ana Paula Coelho Balbi** e ao **Ms. Richarlisson Borges de Moraes** pela ajuda e orientação na parte do projeto referente ao diabetes.

À **Profa. Dra. Flaviana Soares Rocha** e ao **Prof. Dr. Jonas Dantas Batista** por toda contribuição a minha formação acadêmica e serem exemplo de competência e dedicação.

Aos professores **Dr. Roberto Bernardino**, **Dr. Carlos José Soares**, **Dr. Paulo Quagliatto**, **Dr. Paulo Vinícius**, **Dr. Denildo de Magalhães**, **Dr. Sérgio Vitorino**, **Dr. Adriano Loyola**, **Dr. Robinson Sabino**, **Dra. Letícia Filice**, **Dra. Priscilla Barbosa Ferreira Soares**, que, cada um de alguma forma, contribuíram para o meu crescimento profissional.

À Profa. Dra. Juliana Bisinotto Gomes Lima por me orientar na parte clínica desde o 6º período da faculdade até o Mestrado e pelo exemplo de dedicação e amor a Odontologia.

Aos demais **professores do programa de pós-graduação** por todos ensinamentos proporcionados nestes dois anos de Mestrado.

Aos colegas de Mestrado **Huberth e Pedro Limirio** que se tornaram queridos amigos nestes dois anos de convivência. Agradeço pela amizade e por toda ajuda durante a pesquisa.

À minha querida amiga **Ludiele**, pela nossa amizade, que se estende desde a graduação. Agradeço por todos bons momentos juntas, pela ajuda, pelos conselhos e pela parceria nos seminários do Mestrado.

Aos amigos do mestrado **Valessa, Pedro Spini, Victor, Camila Ferreira, Fernanda Lopes, Marcela** pelos bons momentos juntos, tanto na hora de montar os seminários, como nas festinhas e viagens.

Aos demais **amigos do Mestrado** pela amizade e convivência ao longo destes dois anos.

Às minhas queridas amigas de faculdade, em especial **Beatriz e Silvana**, que apesar da distância são presença constante em minha vida.

Aos meus amigos de longa data **Cintya, Ana Flávia, Juliane, Taiany, Tuany, MÁyda, Camila e Alfredo**, pelo apoio e amizade.

À **Camila Linhares e Mariana Bergamini**, que se tornaram minhas grandes amigas durante o Mestrado. Obrigada pela amizade e pela ajuda no desenvolvimento do trabalho.

A todos os outros **integrantes do NERT** (Núcleo de Estudo em Reparo Tecidual) especialmente à **Anna Carolina, Noemi e Nilson Neto**.

Aos **colegas do Laboratório de Histologia** pela agradável convivência.

À **Ester, Fabrício, Juscélia, Graça, Brenda, Mário** e demais funcionários pela colaboração e disposição em ajudar no que precisávamos.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia (FOUFU).

Ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Ao Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo financiamento desta pesquisa e pela minha bolsa de estudos.

Ao Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia.

À Área de Ciências Fisiológicas (ARFIS) do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia.

À Área de Histologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia.

Aos professores da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia por todos ensinamentos.

Aos funcionários do Laboratório de Histologia, ARFIS e CPBio pelo apoio na parte experimental da pesquisa.

*“As chaves do êxito: escolha algo que lhe apaixone,
dê o melhor de si mesmo e não deixe escapar as
oportunidades”*

Benjamim Franklin

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	1
RESUMO	3
ABSTRACT	6
1. INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO	9
2. PROPOSIÇÃO	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Animais	21
3.2. Modelo de rato diabético	21
3.3. Procedimento cirúrgico e HBO	22
3.4. Obtenção dos espécimes e processamento histológico	25
3.5. Análise histológica e histomorfométrica	26
3.6. Análise estatística	28
4. RESULTADOS	29
4.1. Média da glicemia, peso corporal e consumo de água e ração dos animais diabéticos	30
4.2. Análise histológica	31
4.3. Análise histomorfométrica	33
5. DISCUSSÃO	36
6. CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	45
ANEXO I	56
ANEXO II	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% – Porcentagem
± – Mais ou menos
°C – Grau Celsius
ATA – Atmosfera absoluta
bFGF – Fator de crescimento de fibroblastos básico
BMD – Densidade mineral óssea
BMPCs – Células progenitoras da medula óssea
BMPs – Proteínas morfogenéticas ósseas
Cbfa1 – Fator de ligação central alfa1
cm – Centímetro
Dlx-5 – Gene homólogo ao *distal-less* 5
DM – Diabetes mellitus
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
EPCs – Células progenitoras endoteliais
FGF-2 – Fator de crescimento de fibroblastos-2
g – Grama
HBO – Oxigenoterapia hiperbárica
HE – Hematoxilina-Eosina
HIF-1 – Fator indutor de hipóxia-1
IGF-1 – Fator de crescimento semelhante à insulina-1
IL – Interleucina
M-CSF – Fator estimulador de colônias de macrófagos
mg/dl – Miligramma por decilitro
mg/kg – Miligramma por quilograma
ml – Mililitro
ml/kg – Mililitro por quilograma
mm – Milímetro
mmHg – Milímetros de mercúrio
MSCs – Células-tronco mesenquimais
OPG – Osteoprotegerina
PPAR γ – Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama

PTH – Paratormônio

RAGE – Receptor dos produtos finais de glicosilação avançada

RANK – Receptor ativador do fator nuclear κβ

RANK-L – Ligante do receptor ativador do fator nuclear κβ

Runx-2 – Fator de transcrição relacionado à Runt-2

STZ – Estreptozotocina

TGF-β – Fator de crescimento transformante β

TNF-α – Fator de necrose tumoral α

UI – Unidade Internacional

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

μ – Micrometro

RESUMO

RESUMO

A hiperglicemia crônica decorrente do diabetes mellitus afeta múltiplos órgãos interferindo na qualidade de vida. No osso, esse quadro altera a resistência e a densidade mineral óssea, além de suprimir a atividade dos osteoblastos, levando a um desequilíbrio no processo de reparo ósseo. A oxigenoterapia hiperbárica (HBO) é sugerida como tratamento adjacente para aceleração do reparo ósseo. O presente estudo avaliou os efeitos da HBO na quantidade de mastócitos e na neoformação óssea em estágio inicial do reparo ósseo em ratos diabéticos e normoglicêmicos. A hipótese do estudo foi que a HBO poderia melhorar o reparo ósseo em osso de indivíduo diabético. Os animais foram divididos em quatro grupos iguais: Controle (C); Controle + HBO (CH); Diabetes (D) e Diabetes + HBO (DH). O diabetes foi induzido com estreptozotocina (65mg/kg) e trinta dias após a indução foram criados defeitos ósseos nos fêmures de todos animais. A HBO iniciou-se imediatamente após o procedimento cirúrgico, sendo realizada diariamente por 7 dias, nos grupos CH e DH. Sete dias após a cirurgia, todos os animais foram submetidos à eutanásia. As diáfises dos fêmures foram removidas, fixadas, desmineralizadas e processadas para inclusão em parafina. Os cortes semi-seriados obtidos foram corados em Hematoxilina-Eosina (HE), Tricrômico de Mallory e Azul de Toluidina. Nos cortes em HE foi realizada análise qualitativa, onde foram avaliados os aspectos morfológicos do reparo ósseo na área da lesão, observando presença de coágulo, células inflamatórias e tecido de granulação, além de tipo de tecido ósseo, morfologia das células e organização e espessura das trabéculas ósseas. Nos cortes em Tricrômico de Mallory e Azul de Toluidina foram obtidas porcentagem de matriz óssea neoformada e quantidade de mastócitos, respectivamente. A análise qualitativa mostrou que o grupo CH apresentou estágio mais avançado de reparação óssea comparado ao grupo C, apresentando trabéculas ósseas mais espessas e maior preenchimento ósseo na área da lesão. Nos grupos D e DH a lesão mostrou-se parcialmente preenchida com tecido ósseo neoformado, com trabéculas mais finas e poucas áreas associadas a osteoclastos, em comparação ao grupo controle. A análise histomorfométrica, mostrou aumento significativo na neoformação óssea ($p<0,001$) comparando os grupos CH ($38,08 \pm 4,05$) e C

($32,05 \pm 5,51$); C e D ($24,62 \pm 2,28$) e CH e DH ($27,14 \pm 4,21$). Nos animais normoglicêmicos houve aumento significativo da quantidade de mastócitos ($p<0,05$) comparando os grupos C ($8,06 \pm 5,15$) e CH ($21,06 \pm 4,91$). Em conclusão, este estudo demonstrou que o diabetes comprometeu a reparação óssea e que a oxigenoterapia hiperbárica foi capaz de aumentar a neoformação óssea e a quantidade de mastócitos apenas em animais normoglicêmicos.

Palavras-chave: Reparo ósseo, Diabetes mellitus; Oxigenoterapia hiperbárica; Mastócitos.

ABSTRACT

ABSTRACT

The chronic state of hyperglycemia due to diabetes mellitus affects multiples organs impairing life quality. In bone, diabetes alters strength and mineral density and also suppresses the osteoblast activity, leading to an unbalanced bone healing process. Hyperbaric oxygen therapy (HBO) is suggested as an adjuvant treatment to accelerate bone repair. This study evaluated the effects of HBO in the number of mast cells and in new bone formation at the initial stage of bone repair in normoglycemic and diabetic rats. It was hypothesized that HBO treatment may improve bone repair in diabetic bone. The rats were equally divided in four groups: Control (C); Control + HBO (CH); Diabetes (D) and Diabetes + HBO (DH). Diabetes was induced by streptozotocin (65mg/kg) and femoral bone defects were created thirty days after diabetes induction in all groups. HBO initiated immediately after surgery procedure and was performed daily, for 7 days, in the CH e DH groups. Seven days after surgery, all animals were euthanized. The femur diaphyses were removed, fixated, decalcified and processed for paraffin embedding. The semi-serial histological sections obtained were stained with Hematoxylin-Eosin (HE), Mallory Trichrome and Toluidine Blue. The qualitative analysis was conducted in the histology slides stained with HE, where it was evaluated the morphological aspects of bone repair in the lesion area, observing the presence of clot, inflammatory cells, granulation tissue, type of bone tissue, morphology of bone cells, and thickness and organization of bone trabeculae. In the slides stained with Mallory Trichrome and Toluidine Blue were evaluated the percentage of new bone formation and number of mast cells, respectively. The qualitative analysis showed that the CH group presented a more advanced stage of bone repair compared to the C group, showing thicker trabeculae and greater bone filling of the lesion area. In D and DH group, the lesion area was partially filled with new bone formation tissue and presented thinner trabeculae and fewer areas associated to osteoclasts compared to control group. The histomorphometric analysis showed a significant improvement in new bone formation ($p<0.001$) comparing CH (38.08 ± 4.05) and C (32.05 ± 5.51); C and D (24.62 ± 2.28 and CH and DH (27.14 ± 4.21) groups. In the normoglycemic rats there was a significant increasing in the number of mast cells ($p<0.05$)

comparing C (8.06 ± 5.15) and CH (21.06 ± 4.91) groups. In conclusion, this study showed that diabetes impaired bone repair and HBO was only able to increase new bone formation and the number of mast cells in the normoglycemic animals.

Keywords: Bone repair; Diabetes mellitus; Hyperbaric oxygen therapy; Mast cells.

INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

1. INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

O principal constituinte do esqueleto denomina-se tecido ósseo, que é um tipo especializado de conjuntivo, formado por células e material extracelular mineralizado, a matriz óssea. Funciona como um reservatório de cálcio, fosfato e outros íons e é responsável por manter a homeostase desses elementos nos líquidos corporais (Junqueira & Carneiro, 2013).

Apesar da rigidez e aparente inatividade, o tecido ósseo é muito dinâmico, apresentando um processo combinado de formação e reabsorção, denominado de remodelação óssea. Este processo é contínuo e fisiológico, permitindo que o tecido ósseo se renove constantemente em resposta aos estímulos internos (como hormônios) e externos (como atividade física) sofrendo inclusive reparação (Gartner & Hiatt, 2007).

O reparo ósseo pode ser descrito como um processo regenerativo (Ferguson *et al.*, 1999) que envolve a atuação das células imunes e hematopoiéticas da medula óssea, juntamente com células precursoras vasculares e ósseas, incluindo células-tronco mesenquimais (MSCs) recrutadas dos tecidos adjacentes e também da circulação (Tsiridis *et al.*, 2007). É responsável por restaurar a continuidade tecidual sem necessariamente aumentar o volume do osso (Ai-Aql *et al.*, 2008) e sofre influência de mecanismos biomecânicos, bioquímicos, hormonais e celulares, além de fatores de natureza patológica (Kalfas, 2001).

Esse evento biológico começa com um processo inflamatório e migração de MSCs na região lesionada. Em seguida ocorre a proliferação e diferenciação das MSCs em células das linhagens condrogênica e osteogênica em resposta a fatores de crescimento e citocinas liberadas por plaquetas e células inflamatórias (Deschaseaux *et al.*, 2009). Com a formação da matriz cartilaginosa, esta se mineraliza e progressivamente é reabsorvida, ocorrendo então sua substituição por tecido ósseo primário. Posteriormente, este tecido sofre remodelação e o calo ósseo inicial é substituído por tecido ósseo secundário, restabelecendo dessa forma, a anatomia e fisiologia óssea normal (Gerstenfeld *et al.*, 2003).

O processo de reparo é regulado por um complexo conjunto de moléculas sinalizadoras e citocinas pró-inflamatórias, além de membros da família dos fatores de crescimento transformante β e fatores angiogênicos (Ai-Aql *et al.*, 2008).

As citocinas pró-inflamatórias atuam na iniciação do reparo e são produzidas imediatamente após o dano, agindo por um período de tempo limitado. Dentre os fatores envolvidos nesse processo de reparo os mais relatados na literatura são: RANKL, OPG, M-CSF, IL-1, IL-6, TNF- α , BMPs, TGF- β e VEGF (Kon *et al.*, 2001; Cho *et al.*, 2002; Street *et al.*, 2002; Ai-Aql *et al.*, 2008).

O processo de reparo ósseo também pode ser influenciado pela presença dos mastócitos (Chiappetta & Gruber, 2006). Essas células são derivadas da medula óssea (Farahani *et al.*, 2010; Dahlin & Hallgren, 2015) e localizam-se próximas aos vasos sanguíneos e principalmente em regiões susceptíveis a infecções, como epitélio, vias aéreas e trato gastrointestinal (Dawicki & Marshall, 2007). Os mastócitos são células ativadas através de estímulo e estão envolvidos nas reações alérgicas mediadas por IgE (Frenzel & Hermine, 2013), além de apresentarem importante papel na modulação das respostas imunes inata e adaptativa (Abraham & John, 2010). Seus grânulos liberam vários tipos de mediadores, como histamina, heparina, fator ativador de plaquetas, prostaglandinas, leucotrienos e citocinas (Chiappetta & Gruber, 2006), que atuam exercendo diversas funções como aumento da permeabilidade do epitélio e endotélio, estimulação da angiogênese e da produção de colágeno e indução de contração da musculatura lisa (Frenzel & Hermine, 2013).

A histamina é o principal produto liberado pelos mastócitos e seu papel tem sido associado a regulação da remodelação óssea em roedores, sendo seu bloqueio relacionado a diminuição do número de osteoclastos (Chiappetta & Gruber, 2006). A heparina, em estudo *in vitro*, também mostrou exercer influência na atividade osteoclástica, aumentando a reabsorção óssea através da inibição da OPG (Irie *et al.*, 2007).

Em estudos experimentais a ausência de mastócitos promoveu um atraso na remodelação óssea e redução na quantidade de neoformação óssea (Silberstein *et al.*, 1991; Behrends *et al.*, 2014), sugerindo que essa célula pode estar envolvida na estimulação e proliferação dos osteoblastos e também no recrutamento dos osteoclastos (Silberstein *et al.*, 1991; Chiappetta & Gruber, 2006).

O osso é capaz de se reparar sem a formação de fibrose cicatricial, (Gerstenfeld *et al.*, 2003), porém alterações sistêmicas, como o diabetes mellitus, podem interferir no processo normal de reparo (Kalfas, 2001).

O diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica caracterizada pelo quadro de hiperglicemia decorrente de alterações na secreção e/ou na ação da insulina. Dentre as diversas formas de DM, a maioria dos casos são DM tipo 1 e DM tipo 2, sendo o último o tipo mais prevalente. O DM tipo 1 é caracterizado pela deficiência total de insulina decorrente da destruição de células-β das ilhotas pancreáticas e é o tipo mais comum em pacientes jovens. O DM tipo 2 geralmente está relacionado à obesidade e caracteriza-se pela combinação de resistência periférica à insulina com redução de secreção das células-β do pâncreas (ADA, 2014).

Além de afetar vasos sanguíneos, nervos, rins e olhos (ADA, 2014), o DM pode interferir no osso através de mecanismos que promovem alterações em fatores de crescimento, como o bFGF (fator de crescimento de fibroblastos básico), levando a um prejuízo no processo de reparo (Kawaguchi *et al.*, 1994) e também na expressão de genes responsáveis pela regulação da diferenciação dos osteoblastos (Lu *et al.*, 2003).

Outras alterações no tecido ósseo em casos de DM incluem osteopenia (Lu *et al.*, 2003); redução da resistência óssea, em virtude de danos nas propriedades mecânicas e arquiteturais do osso (Dede *et al.*, 2014); alterações na densidade mineral óssea (Ma *et al.*, 2012) e maior propensão a fraturas, principalmente em pacientes que apresentam a doença há mais tempo (de Liefde *et al.*, 2005). Isto pode ser explicado pelo fato desses pacientes apresentarem

uma maior prevalência a fatores de risco como por exemplo, falta de equilíbrio, artrite, retinopatia, neuropatia, nefropatia e doenças cardiovasculares (Schwartz *et al.*, 2002; Vestergaard, 2007; Tolosa *et al.*, 2013) ou devido a hiperglicemia estimular uma maior concentração de produtos de glicosilação avançada nas redes de colágeno, causando uma diminuição da resistência óssea (Paul & Bailey, 1996; Vashishth *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002).

A supressão da diferenciação e proliferação dos osteoblastos ou da sua capacidade de formação óssea durante as fases iniciais do processo de reparo ósseo são os principais fatores relacionados a alterações que ocorrem nesse processo em pacientes portadores de DM (Retzepi & Donos, 2010).

Trabalho de revisão reunindo dados de estudos *in vivo* e *in vitro* mostrou que a neoformação óssea e integridade da arquitetura óssea são alteradas pelo DM, levando a um aumento do risco de fraturas e inadequada regeneração do osso (Thrallkill *et al.*, 2005).

O comprometimento do reparo de fraturas ósseas em diabéticos é decorrente de um aumento na taxa de reabsorção da cartilagem, levando a redução do tamanho do calo ósseo e, consequentemente, menor formação óssea e menor resistência mecânica (Kayal *et al.*, 2007). O DM também leva a redução do número de osteoblastos e da taxa de aposição óssea mineral (Verhaeghe *et al.*, 1990).

O tamanho do defeito ósseo mostrou influenciar diretamente o reparo em ratos portadores de DM. Animais diabéticos não compensados não apresentam alterações no reparo ósseo em defeitos ósseos de 0,4mm, porém em defeitos mais amplos, com diâmetro de 0,8 e 1,2 mm, ocorrem desordens no padrão de mineralização, sendo estas mais graves em defeitos maiores que 1,2 mm (Follak *et al.*, 2004).

Experimentos em ratos diabéticos mostram que nesses animais ocorre uma diminuição na síntese de colágeno e comprometimento da proliferação e/ou migração celular, levando a redução da resistência mecânica durante os

estágios iniciais de reparo das fraturas (Macey *et al.*, 1989; Beam *et al.*, 2002), além de redução no *turnover* ósseo (Shyng *et al.*, 2001; Mishima *et al.*, 2002).

Pesquisa avaliando a periodontite em animais, mostrou que ratos diabéticos apresentam maior atividade e quantidade de células osteoclásticas. O DM também provou aumentar a apoptose e diminuir o número de células de revestimento do osso, osteoblastos e fibroblastos do ligamento periodontal, causando uma resposta inflamatória mais persistente, uma maior perda de inserção e maior reabsorção do osso alveolar, além de prejudicar a neoformação óssea (Liu *et al.*, 2006).

Em modelo animal, o DM tipo 1 altera os componentes da medula óssea, levando a alterações na hematopoiese, com geração de maior quantidade de monócitos e menor quantidade de células progenitoras endoteliais (EPCs), colaborando para o aparecimento de complicações vasculares (Hazra *et al.*, 2013). Em outro estudo, utilizando ratos induzidos ao DM pela estreptozotocina, além da redução no número de células osteoprogenitoras da medula óssea, foi observada diminuição da atividade da fosfatase alcalina e menor formação de nódulo mineralizado (Weinberg *et al.*, 2014).

A respeito das alterações do DM tipo 2 sobre a taxa de densidade mineral óssea, há controvérsia entre os estudos (Abdulameer *et al.*, 2012). No trabalho de Chen *et al.* (2013), indivíduos com DM tipo 2 apresentaram desequilíbrio no metabolismo ósseo, com significante redução de densidade mineral óssea (BMD) e dos níveis de osteocalcina, o que pode refletir em prejuízo da função dos osteoblastos e, consequentemente, inadequada formação e renovação óssea. A redução da BMD pode ainda ser agravada pela deficiência de vitamina D (Mao *et al.*, 2014). Em contrapartida, outros estudos afirmam que o DM tipo 2 aumenta a BMD (Dobnig *et al.*, 2006; Vestergaard, 2007), o que pode ser explicado pela hipótese de que a insulina tem um efeito anabólico sobre a formação de tecido ósseo através da interação com o receptor para fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1), presente nos osteoblastos resultando em uma maior massa e tamanho ósseo (Mohan *et al.*, 2003).

Células progenitoras da medula óssea (BMPCs) podem dar origem a osteoblastos, através da expressão do fator de transcrição Runx2, ou a adipócitos, através do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ) (Tolosa *et al.*, 2013). O aumento da taxa de PPAR γ em ratos diabéticos tipo 1 sugere que a adiposidade medular pode contribuir para perda óssea (Botolin *et al.*, 2005). Estudo utilizando ratos diabéticos com deficiência parcial à insulina mostrou que efeitos deletérios na microarquitetura de ossos longos estão relacionados à significante redução na capacidade de indução osteogênica das BMPCs, a qual pode ser mediada pela redução da expressão de Runx2 e elevação de PPAR γ , além do aumento da expressão da RAGE (Tolosa *et al.*, 2013), que é um receptor que se liga aos produtos finais da glicosilação avançada contribuindo para redução do reparo ósseo (Santana *et al.*, 2003).

No intuito de acelerar o processo de reparo, algumas opções terapêuticas coadjuvantes tem sido sugeridas, destacando-se entre elas a oxigenoterapia hiperbárica (HBO).

Esse tipo de tratamento consiste em uma pessoa respirar 100% de O₂ enquanto exposta à pressão atmosférica aumentada (Fosen & Thom, 2014). As sessões podem ser realizadas em câmaras individuais, pressurizadas com oxigênio puro, ou ainda em câmaras que comportem várias pessoas (normalmente 2-14 pacientes), onde o paciente respira o oxigênio através de uma máscara facial, *headtent* ou tubo traqueal (Camporesi, 1999; Gill & Bell, 2004; Fosen & Thom, 2014). As pressões aplicadas na câmara são geralmente de 2 a 3 atmosferas absolutas (ATA) e o tempo de tratamento pode se estender entre 1 a 60 ou mais sessões, (Mortensen, 2008) que duram cerca de 1,5-2h cada, podendo ser realizadas uma ou duas vezes ao dia (Fosen & Thom, 2014).

A HBO estabiliza e ativa o fator indutor de hipóxia (HIF-1), que desempenha um importante papel no reparo de feridas através do aumento da proliferação celular (Sunkari *et al.*, 2015). Também exerce efeito sobre vários tipos de células e influencia tanto a angiogênese quanto a vasculogênese (Fosen & Thom, 2014). Estudos mostram que essa terapia aumenta a produção de VEGF em feridas feitas em modelo animal (Sheikh *et al.*, 2000), promove o

aumento da angiogênese, levando a uma melhora na regeneração óssea (Grassmann *et al.*, 2015), aumenta a atividade bactericida dos leucócitos (Gill & Bell, 2004) e atua diretamente como modulador da proliferação fibroblástica (Kang *et al.*, 2004). Além disso, inibe a adesão de leucócitos ao endotélio, de forma a diminuir o dano tecidual; aumenta a motilidade dos leucócitos, melhorando a microcirculação e, através da vasoconstrição e mecanismos da homeostase, é também responsável por reduzir o edema (Mortensen, 2008). Em condições de hipóxia, é capaz de diminuir a infecção e morte celular e manter o tecido viável durante o reparo (Gill & Bell, 2004). Sua indicação terapêutica inclui o tratamento de feridas de difícil cicatrização, infecções graves e danos causados por radiação (Tibbles & Edelsberg, 1996; Goiato *et al.*, 2009).

Em defeitos ósseos na calvária de ratos, a HBO diminui a resposta inflamatória, através da diminuição dos níveis de IL-1 e IL-6, e promove maior osteogênese no grupo tratado devido ao aumento nos níveis de BMP-2, sialoproteína óssea, osteocalcina e IL-10 (Pedersen *et al.*, 2013).

Lin *et al.* (2013) mostrou que a HBO aumenta a proliferação das células estromais da medula óssea, quando estas já estão comprometidas com a linhagem osteoblástica, através da regulação da via Wnt3a/β-catenina, gerando um aumento na taxa de formação óssea.

Outros estudos ainda comprovaram que a HBO acelera o processo de remodelação óssea em fraturas (Kawada *et al.*, 2013) e em defeitos críticos sem colocação de enxerto (Jan *et al.*, 2009), além de reduzir o tempo de reparo em distrações osteogênicas (Salgado *et al.*, 2009).

A aplicação da HBO também vem sendo avaliada para o tratamento de complicações decorrentes do DM. Pesquisa realizada em ratos diabéticos mostrou que a HBO reduz a hiperglicemia, em função da regeneração das células-β do pâncreas e melhora da nefropatia (Prabowo *et al.*, 2014).

Células progenitoras endoteliais (EPCs) tem sua quantidade e funcionalidade prejudicadas pelo DM, porém a HBO aumenta a mobilização

dessas células na vascularização periférica, acelerando o reparo de feridas diabéticas (Gallagher *et al.*, 2006; Prabowo *et al.*, 2014).

Estudo avaliando o efeito da HBO no reparo ósseo peri-implantar em ratos diabéticos, mostrou que a HBO realizada tanto antes como após a colocação dos implantes aumenta a porcentagem de tecido ósseo em contato com o implante (Oliveira *et al.*, 2012). Já os demais estudos associando os efeitos da HBO com o reparo tecidual no DM se limitam ao tecido epitelial (Gallagher *et al.*, 2006; Prabowo *et al.*, 2014; Tuk *et al.*, 2014; Sunkari *et al.*, 2015).

PROPOSIÇÃO

2. PROPOSIÇÃO

Não existem trabalhos na literatura que correlacionam o diabetes mellitus com o reparo ósseo e a oxigenoterapia hiperbárica, desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da oxigenoterapia hiperbárica na quantidade de mastócitos e na neoformação óssea no estágio inicial do reparo ósseo em ratos diabéticos e normoglicêmicos.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Vinte ratos machos *Rattus norvegicus*, da linhagem Wistar, clinicamente sadios, com peso entre 240-280g, foram mantidos no depositário de animais da área de Ciências Fisiológicas (ARFIS) do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) em estantes climatizadas a temperatura de 22°C e ciclo claro-escuro de 12 horas, com ração e água *ad libitum*. Os ratos foram divididos em quatro grupos ($n=5$) de acordo com o tratamento realizado: Controle (C); Controle + HBO (CH); Diabetes (D) e Diabetes + HBO (DH). Todos os animais foram submetidos à cirurgia para criação de defeitos ósseos em ambos os fêmures. Sete dias após a cirurgia, todos os animais foram sacrificados e os fêmures foram retirados para análise.

Este estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (Protocolo 026/2014) e foi conduzido de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.2. Modelo de rato diabético

A indução do DM nos animais foi feita com a administração de estreptozotocina (STZ) (Sigma-Aldrich Corporation, Missouri, USA) por via intravenosa na dosagem de 65mg/kg de peso corporal diluída em tampão citrato. Esta droga produz um efeito tóxico sobre as células pancreáticas, induzindo um modelo de DM tipo 1 (Delfino *et al.*, 2002).

O protocolo de indução do DM iniciou-se mantendo os ratos em jejum absoluto durante 24h. Após este período, foi realizada a anestesia por via intraperitoneal utilizando 0,07ml/100g do relaxante muscular cloridrato de xilazina 2% e 0,1ml/100g do anestésico e analgésico cloridrato de cetamina 10%. Em seguida, a STZ foi administrada por via endovenosa (2ml/kg) através da punção da veia peniana, na dosagem de 65 mg/kg de peso corporal, diluído em tampão citrato (0,01M pH 4,5). Posteriormente, os animais foram acondicionados

em caixas com maravalha em estantes climatizadas, com ração e água *ad libitum*.

Para confirmação da hiperglicemia, foi utilizado um glicosímetro (Accu Check Active, Roche) após 24h e 48h de indução, coletando-se uma gota de sangue da cauda dos animais. Os ratos que apresentaram glicemia maior que 200mg/dl foram considerados diabéticos. Após este período, aqueles que não atingiram o nível glicêmico foram sacrificados por meio de aprofundamento anestésico e deslocamento cervical.

Durante a primeira semana após a indução, os animais diabéticos foram tratados com a aplicação subcutânea de 1UI de insulina R (Regular) (Humulin® R, Lilly, Fegersheim, France) e 1UI de insulina NPH (*Neutral Protamine Hagedorn*) (Humulin® N, Lilly, Fegersheim, France). Após esse período, os ratos receberam dosagens subcutâneas diárias de 1UI de insulina NPH (Humulin® N, Lilly; Fegersheim, France) até o final do experimento. A glicemia e o peso dos animais diabéticos foram monitorados 24h, 15 e 30 dias após a confirmação do diabetes (Tabela 1). Durante a terceira semana após a confirmação, o consumo de água e ração por animal foi mensurado todo dia, por 1 semana (Tabela 2) e o peso de cada rato foi anotado no 1º e 7º dia da terceira semana pós confirmação do diabetes (Tabela 3).

3.3. *Procedimento cirúrgico e HBO*

Um mês após a confirmação do DM, os animais foram submetidos a procedimento cirúrgico para confecção de defeito ósseo em ambos os fêmures. Logo após a cirurgia foi iniciada a HBO nos animais dos grupos CH e DH.

Os animais foram submetidos à anestesia por via intraperitoneal, utilizando 0,07ml/100g do relaxante muscular cloridrato de xilazina 2%, e 0,1ml/100g do anestésico e analgésico cloridrato de cetamina 10%. Após a tricotomia da região coxofemoral, foi realizada a antisepsia da região com solução de clorexidina a 0,2%. A área operatória foi limitada com campo cirúrgico fenestrado de tecido esterilizado, adaptado para o procedimento. O acesso cirúrgico ao fêmur foi obtido por meio de uma incisão contínua longitudinal com

2cm de extensão. Foi feita a divulsão da musculatura até a exposição do periósteo, que foi incisado e descolado ao longo da área óssea a ser exposta. O fêmur foi delimitado em três porções (superior, mediana e inferior), com o objetivo de padronizar a área a ser manipulada, sendo a região mediana, o local de eleição para a realização do experimento. Nesta região realizou-se um defeito ósseo com uma broca esférica nº 8 sob irrigação abundante com solução fisiológica estéril de cloreto de sódio a 0,9%. O defeito criado apresentou diâmetro de aproximadamente 2,3mm e a referência de profundidade da perfuração consistiu no rompimento da cortical óssea até a medula óssea (aproximadamente 2mm). A sutura foi realizada por planos com fio cirúrgico monofilamentado de nylon 5-0 (Figura 1).

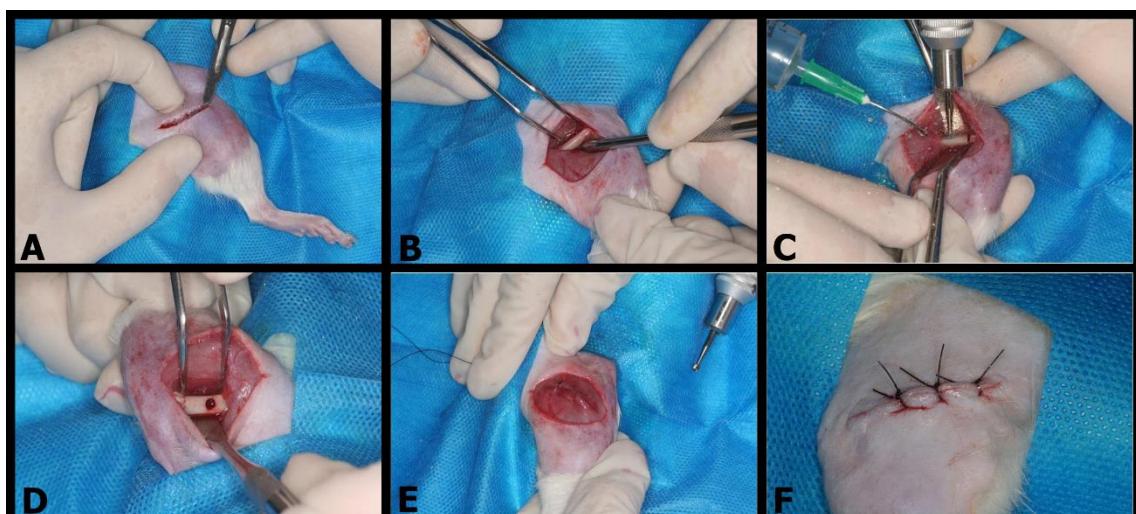


Figura 1. Cirurgia para criação de defeito ósseo padronizado em fêmur de rato. A – Incisão contínua na região lateral do fêmur. B – Divulsão da musculatura até a exposição do periósteo. C – Rompimento da cortical óssea sob irrigação constante. D – Defeito ósseo criado. E – Sutura da musculatura. F – Sutura em pele.

Os animais receberam sessões de HBO no interior de uma câmara *multiplace* experimental Ecobar 400 (Ecotec Equipamentos e Sistemas Ltda®, Mogi das Cruzes, SP, Brasil). Nesta câmara foram colocados no máximo 6 animais por sessão. Inicialmente havia um período de compressão a 0.3ATA/min até atingir a pressão necessária para HBO. A sessão teve duração de 90 minutos sob pressão de 2,5 ATA (ATA = 1 atmosfera absoluta = 760mmHg). Após esse tempo, seguia-se um período de descompressão a 0.3ATA/min. As sessões de HBO foram iniciadas logo após a finalização do procedimento cirúrgico. No período pós-operatório, as sessões se realizaram diariamente durante 7 dias conforme descrito por Rocha *et al.* (2015) (Figura 2).



Figura 2. Animais durante sessão de oxigenação hiperbárica na câmara experimental.

3.4. Obtenção dos espécimes e processamento histológico

Os animais foram sacrificados 7 dias após a cirurgia, por meio de aprofundamento anestésico e deslocamento cervical, seguindo os princípios da Declaração dos Direitos dos Animais. Foi realizada uma incisão longitudinal acompanhando a cicatriz cutânea existente, e os fêmures foram removidos por desarticulação.

As diáfises dos fêmures esquerdos e direitos foram seccionadas utilizando brocas 702 em alta rotação (Figura 3), sob irrigação constante com soro fisiológico e posteriormente fixadas em formaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M por 48 horas. Em seguida, estes fragmentos foram desmineralizados em solução de EDTA a 4,13% pH 7,4, desidratados em graus crescentes de álcool e então processados para inclusão em parafina pela técnica convencional para as análises histológicas.

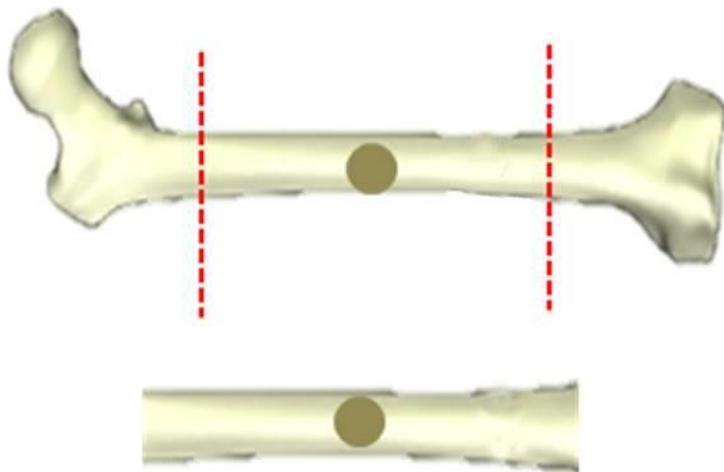


Figura 3. Esquema demonstrando o seccionamento do fêmur.

Foram obtidos cortes histológicos longitudinais semi-seriados de 5 μm de espessura, que foram corados com HE, Azul de Toluidina e Tricrômico de Mallory. A análise qualitativa foi realizada avaliando lâminas histológicas coradas com HE. A análise histomorfométrica foi realizada em cortes corados com Tricrômico de Mallory para avaliação da neoformação óssea e em cortes corados com Azul de Toluidina para quantificação de mastócitos.

3.5. Análise histológica e histomorfométrica

A análise histológica qualitativa avaliou os aspectos morfológicos do reparo ósseo na área da lesão, observando a presença de coágulo, de células inflamatórias e de tecido de granulação, tipo de tecido ósseo, morfologia das células ósseas e a organização e a espessura das trabéculas ósseas.

Na análise histomorfométrica foi quantificada a proporção de preenchimento ósseo dentro do defeito realizado. As imagens histológicas foram digitalizadas utilizando câmera microscópica digital (Leica ICC50, Leica Microsystems. Heerbrugg, Switzerland), acoplada ao microscópio (Leica DM500, Leica Microsystems. Heerbrugg, Switzerland). Cada fotomicrografia foi obtida através da união das imagens de cada defeito ósseo com o software editor de imagens Adobe Photoshop CS6 (Adobe®, Adobe System Inc., San Jose, CA/EUA). Esse mesmo software também foi utilizado para remover toda área de tecido mole da fotomicrografia. Através do software gráfico HL Image 97 ++ (Western Vision Software, Utah/EUA), as imagens de cada lâmina fotografada e editada foram transformadas em imagens binárias e em seguida a região de cada defeito foi delimitada em quatro linhas, estendendo-se das bordas inferiores da cortical óssea lesionada até a cortical oposta através da ferramenta *draw*. Os dados de interesse foram os valores referentes a porcentagem de matriz, fornecidos em pixels, que foram calculados com a ferramenta *measurement* (Figura 4).

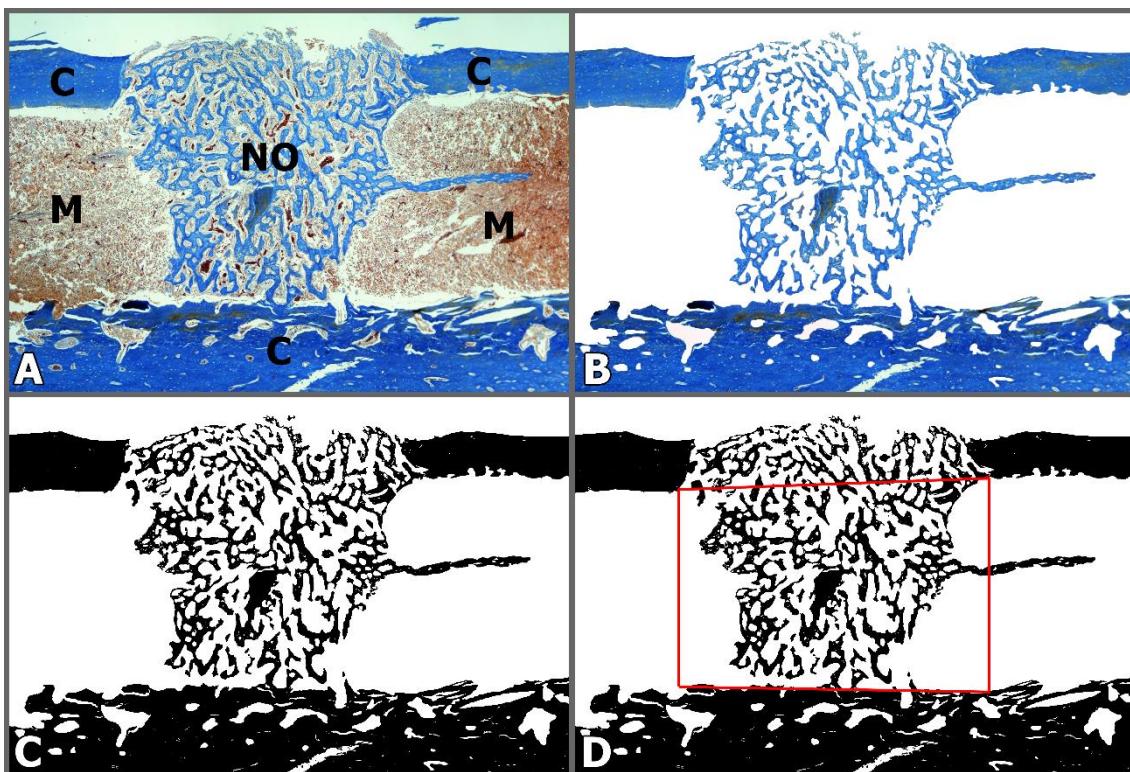


Figura 4. A – Fotomicrografia de secção longitudinal de fêmur mostrando: cortical óssea (C), medula óssea (M) e neoformação óssea (NO). B – Imagem após a remoção do tecido mole. C – Imagem binária. D – Delimitação da região de interesse (retângulo vermelho). Tricrômico de Mallory 4x.

Para a quantificação dos mastócitos, três lâminas histológicas de cada animal coradas com Azul de Toluidina foram selecionadas e analisadas com um microscópio óptico (Olympus BX 50, Shinjuku-ku, Tóquio, Japão) em 40x. Os mastócitos foram identificados pela sua característica de metacromasia, apresentando-se em coloração violeta. A contagem das células foi realizada utilizando método simples-cego de avaliação. Foram contados doze campos, correspondendo a área da lesão e apenas os mastócitos presentes dentro da região de interesse (Figura 5).

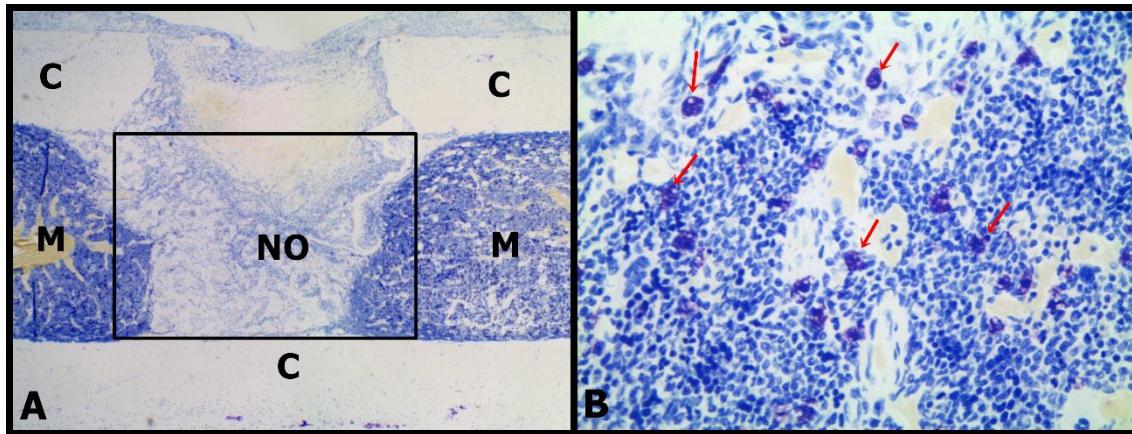


Figura 5. A – Fotomicrografia de secção longitudinal de fêmur mostrando a região da contagem de mastócitos (retângulo preto). Cortical óssea (C), medula óssea (M) e neoformação óssea (NO). B – Mastócitos (setas vermelhas). Azul de Toluidina 4x (A) e 40x (B).

3.6. Análise estatística

A análise estatística foi feita através do software SigmaPlot (SigmaPlot version 12.0 for Windows, Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. Foi utilizada análise de variância (Two Way ANOVA) para comparar as médias dos grupos e o Teste de Tukey para comparação entre grupos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0.05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Média da glicemia, peso corporal e consumo de água e ração dos animais diabéticos

Os animais diabéticos apresentaram perda de peso nos primeiros 15 dias após a indução do diabetes e aumento na glicemia ao longo do experimento (Figura 6). A média de consumo de água e ração na terceira semana após a indução do diabetes é mostrada na Figura 7.

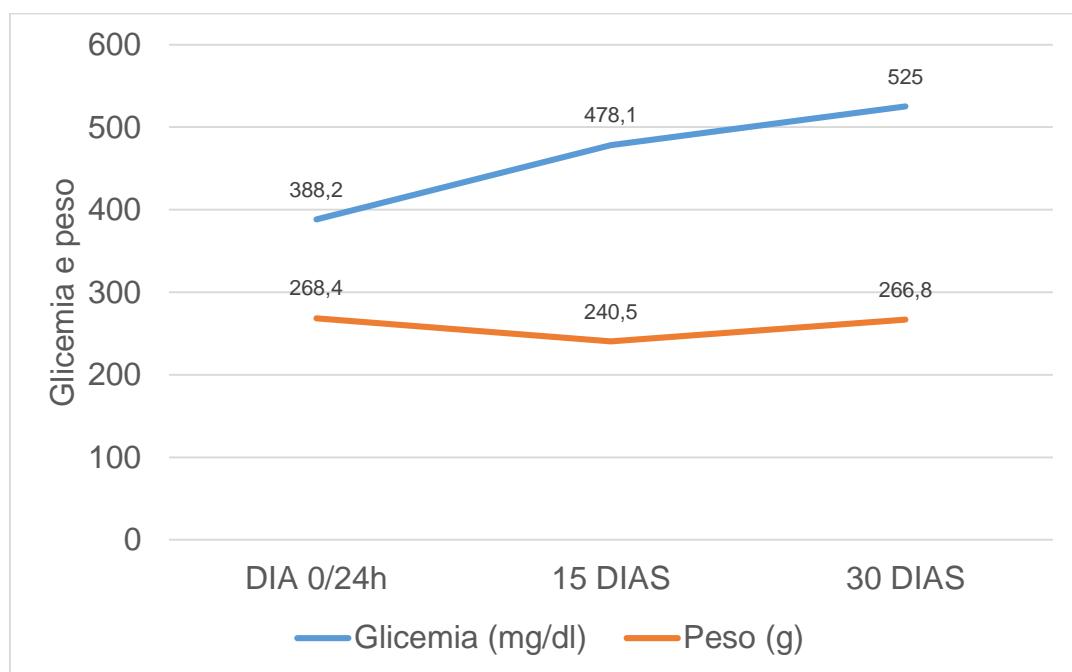


Figura 6. Média da glicemia e peso dos animais diabéticos ao longo do experimento. Dia 0 corresponde ao dia da indução.

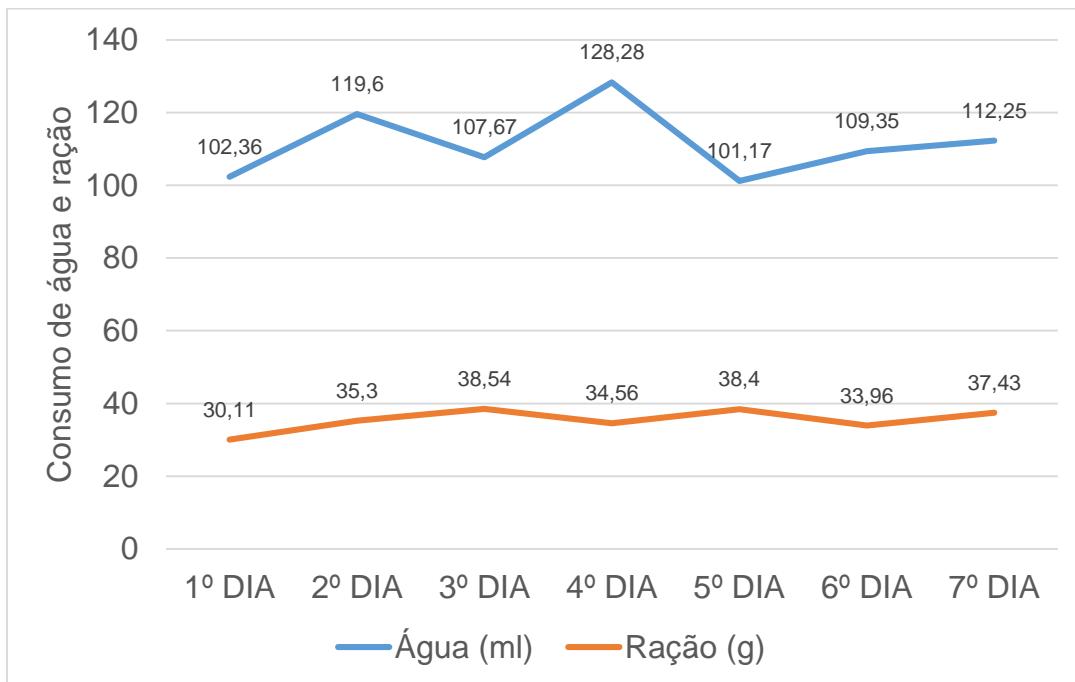


Figura 7. Média do consumo de água e ração pelos animais diabéticos ao longo da terceira semana após a indução do diabetes.

4.2. Análise histológica

No Grupo Controle, a lesão óssea mostrou-se parcialmente preenchida por trabéculas ósseas neoformadas constituídas de tecido ósseo primário. Essas trabéculas estendiam-se desde a cortical óssea lesionada até a cortical oposta íntegra, porém sem preencher completamente a área da lesão. As trabéculas ósseas mostraram-se mais espessas nas regiões mais próximas à tábua óssea íntegra e preencheram o espaço do canal medular nessa área. Observou-se osteoblastos ovoides e volumosos revestindo a matriz óssea e áreas focais apresentando osteoclastos associados a lacunas de Howship. Essas áreas de remodelação óssea foram mais frequentes nas trabéculas ósseas mais espessas. Na área da lesão óssea observou-se focos de hemorragia e tecido ricamente celularizado e vascularizado, onde foram observados osteoblastos jovens (recém-diferenciados) associados à área da matriz osteóide. As trabéculas ósseas neoformadas estenderam-se além da área da lesão óssea e preencheram parcialmente o canal medular (Figura 8).

Nos animais do Grupo Controle + HBO observou-se trabéculas ósseas neoformadas preenchendo quase completamente a área da lesão óssea. Essas trabéculas mostraram-se mais espessas e apresentaram mais áreas com atividade osteoclástica. Na área da lesão foram observadas poucas hemárias extravasadas. Ainda nessa área notou-se grande quantidade de osteoblastos jovens associados a matriz osteóide. Comparando com o Grupo Controle, os animais do Grupo Controle + HBO apresentaram-se em estágio mais avançado de reparo ósseo (Figura 8).

No Grupo Diabetes, a área da lesão óssea estava parcialmente preenchida por poucas trabéculas ósseas. Nessa área, observou-se presença de coágulo sanguíneo e tecido ricamente vascularizado com osteoblastos recém-diferenciados associados a matriz osteóide. As trabéculas ósseas mostraram-se mais finas e com poucas áreas associadas a osteoclastos. Notou-se atraso no reparo ósseo quando comparado ao Grupo Controle (Figura 8).

O Grupo Diabetes + HBO apresentou trabéculas ósseas preenchendo parcialmente a área da lesão óssea. Essas trabéculas estenderam-se desde a tábuia óssea íntegra até a tábuia lesionada. Alguns animais ainda mostraram coágulo sanguíneo na área da lesão. Nesta área, observou-se osteoblastos volumosos depositando matriz osteóide, mas poucos osteoclastos associados às trabéculas ósseas (Figura 8).

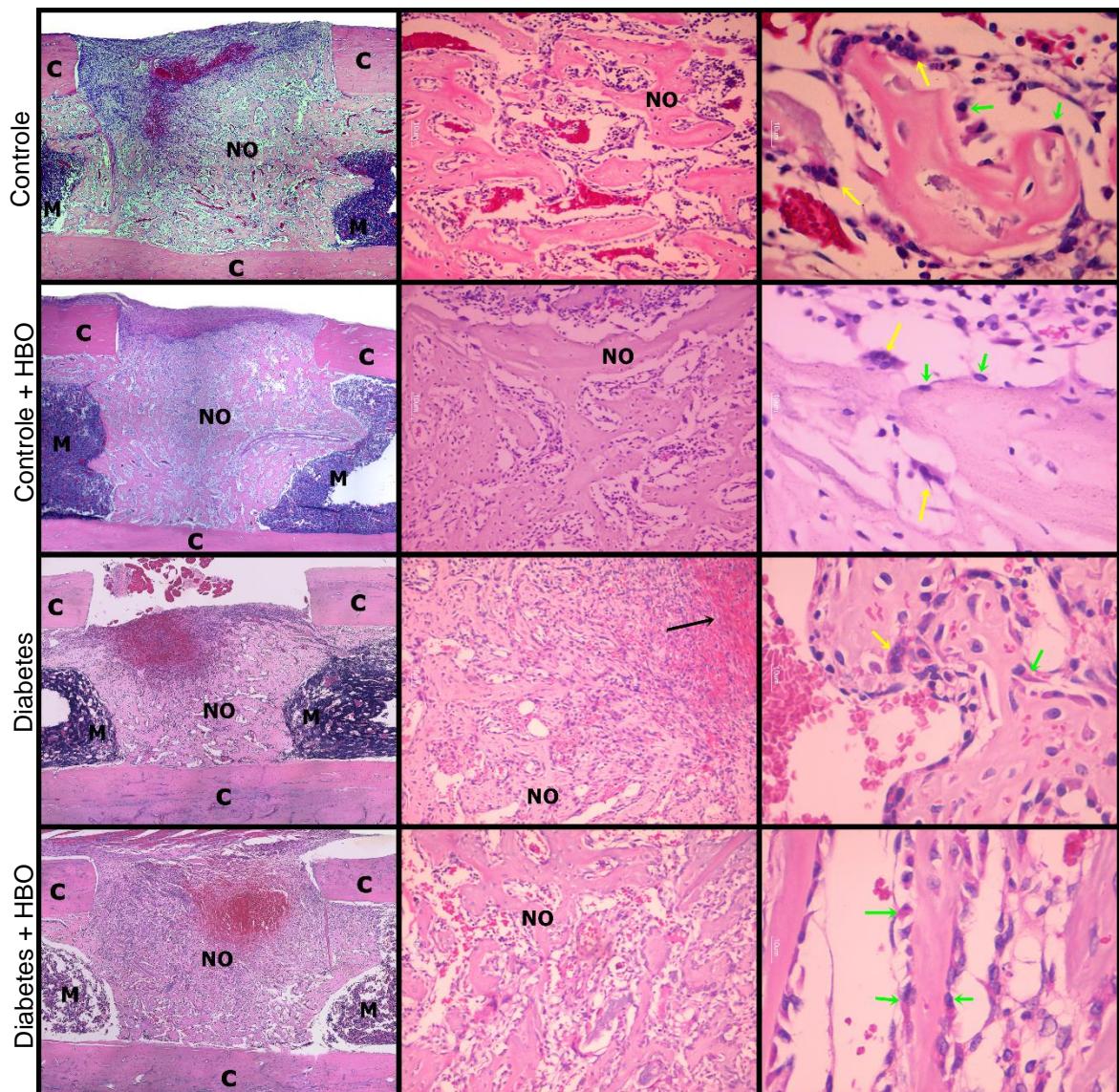


Figura 8. Fotomicrografias de secção longitudinal de fêmur. Cortical óssea (C), medula óssea (M), neoformação óssea (NO), remanescente de coágulo (seta preta), osteoblastos (setas verdes), osteoclastos (setas amarelas). HE, ampliação original 4x, 10x e 40x.

4.3. Análise histomorfométrica

A porcentagem de neoformação óssea foi estatisticamente maior no grupo C ($32,05 \pm 5,51$) comparado ao D ($24,62 \pm 2,28$) e no grupo CH ($38,08 \pm 4,05$)

comparado ao DH ($27,14 \pm 4,21$). A terapia por oxigenação hiperbárica aumentou de forma significativa a neoformação óssea no grupo CH em comparação com o grupo C, porém não houve diferença estatística entre os grupos DH e D (Figura 9).

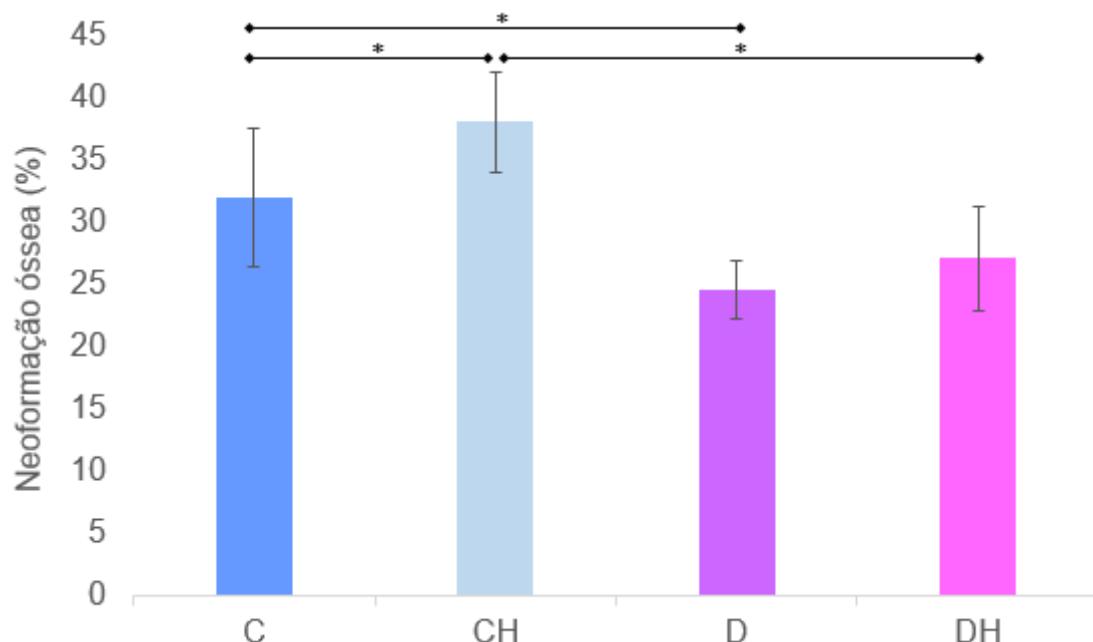


Figura 9. Porcentagem de neoformação óssea nos grupos avaliados. Controle (C), Controle + HBO (CH), Diabetes (D), Diabetes + HBO (DH). Dados expressos em média \pm desvio padrão. * $p<0,001$.

Os mastócitos apresentaram-se como células grandes, com núcleo central, localizados principalmente na periferia da lesão. A contagem de mastócitos mostrou que o Grupo Controle + HBO apresentou mais mastócitos que os demais grupos. A análise estatística mostrou diferença significativa na quantidade de mastócitos entre os grupos CH ($21,06 \pm 4,91$) e C ($8,06 \pm 5,15$). Também houve diferença entre o grupo CH e DH ($9,60 \pm 7,18$). Não houve diferença estatística entre os grupos D ($9,00 \pm 4,99$) e DH e D e C (Figura 10).

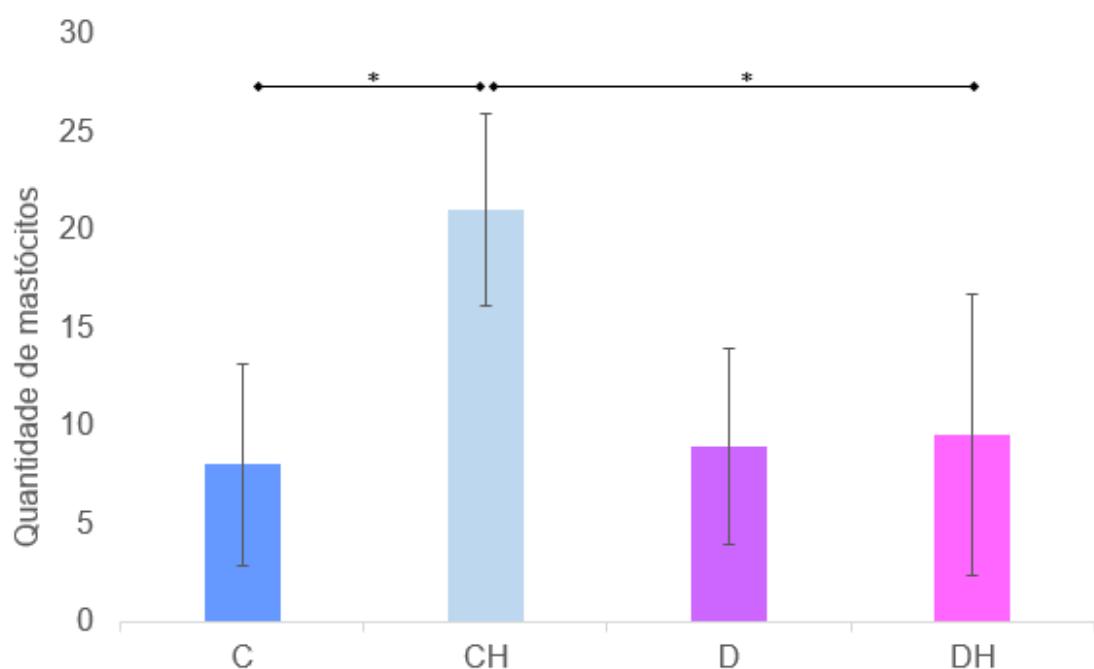


Figura 10. Quantidade de mastócitos nos grupos avaliados. Controle (C), Controle + HBO (CH), Diabetes (D), Diabetes + HBO (DH). Dados expressos em média \pm desvio padrão. * $p<0,05$.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o efeito da oxigenoterapia hiperbárica no reparo ósseo em animais diabéticos. O modelo experimental de indução do diabetes com STZ foi eficaz, sendo esse um método bem estabelecido para diabetes experimental em ratos (Calabria *et al.*, 2013), visto que a sua ação é efetiva na maioria das linhagens de roedores (Deeds *et al.*, 2011). A STZ é um análogo da glicose e causa toxicidade das células beta por meio de alquilação de DNA, levando a inibição da secreção de insulina, gerando um modelo diabético insulino-dependente (Lenzen, 2008).

Apesar do elevado número de publicações que utilizaram o modelo de diabetes induzido por STZ, ainda há falta de protocolos padronizados para a sua utilização, com uma grande variabilidade na dose, via de administração, tamanho da amostra, além de escassas informações sobre a morbidade e mortalidade dos animais e taxas de sucesso da droga (Deeds *et al.*, 2011). A STZ é normalmente administrada por via intraperitoneal (IP) ou por via intravenosa (IV). A injeção intraperitoneal é um método rápido e simples de administração, no entanto uma injeção acidental fora do local ideal pode aumentar a morbidade e reduzir o sucesso de indução do diabetes (Deeds *et al.*, 2011). Em relação à injeção IV, estudos geralmente administram STZ na veia peniana (Deeds *et al.*, 2011; Calabria *et al.*, 2013) ou na veia da cauda (Joffe *et al.*, 1999; Mishima *et al.*, 2002; Tay *et al.*, 2005). Tay *et al.* (2005) demonstraram que a injeção de STZ via IV em camundongos fornece um modelo diabético mais estável e reproduzível do que a injeção IP. No nosso estudo, a STZ administrada via IV (65 mg/kg) através da veia peniana forneceu um modelo diabético eficaz, com um elevado nível de hiperglicemia em todos os animais.

Neste estudo, a administração de insulina foi realizada diariamente, a fim de evitar elevadas taxas de mortalidade por hiperglicemia e, embora a insulina tenha sido administrada todos os dias, a dose de 1UI não foi suficiente para tratar o diabetes, caracterizando os grupos com DM deste estudo como animais descompensados. O valor médio da glicemia nos ratos diabéticos variou entre 388mg/dl e 525mg/dl, estando em acordo com o estudo de Kayal *et al.* (2007).

Na literatura existem diferentes protocolos de administração de insulina com finalidade de reduzir mortalidade pelo diabetes (Mishima *et al.*, 2002; Abeeleh *et al.*, 2009; Weinberg *et al.*, 2014).

Clinicamente, os animais diabéticos apresentaram poliúria, polidipsia e polifagia. Os valores referentes ao consumo de água (101,17ml a 128,28ml) e ração (30,11g a 38,54g) dos animais diabéticos confirmam os achados clínicos e contrastam com a média de consumo encontrada na literatura acerca dos animais normoglicêmicos que é de 30±5ml para água e de 10-15g para consumo de ração (Verhaeghe *et al.*, 1990; Akbarzadeh *et al.*, 2007).

O DM tipo 1 reduz a formação do osso, acarretando em menor massa óssea e alterações no reparo (Mao *et al.*, 2014; Weinberg *et al.*, 2014). Estudo utilizando ratos diabéticos mostrou que esses animais, quando em estado metabólico descompensado, apresentam severas desordens na mineralização óssea, além de atrasos na diferenciação celular e piora das propriedades biomecânicas do osso, quando comparados com animais sadios e animais diabéticos compensados (Follak *et al.*, 2005).

No modelo de diabetes experimental aplicado neste estudo, os defeitos ósseos foram criados depois de trinta dias da indução do diabetes, a fim de permitir a avaliação dos efeitos do DM no osso. O mesmo modelo foi realizado em outros estudos, resultando em significativas alterações ósseas, tais como perda óssea (osteopenia), diminuição do número de células osteoprogenitoras na medula óssea e redução na formação do osso (Shyng *et al.*, 2001; Botolin *et al.*, 2005; Weinberg *et al.*, 2014). Nesse estudo, o defeito ósseo de 2,3mm de diâmetro foi suficiente para causar alterações significativas na neoformação óssea de ratos diabéticos em comparação aos animais não-diabéticos. Esse resultado está em acordo com Follak *et al.* (2004) que mostrou que defeitos maiores que 1,2mm promovem desordens na mineralização nos primeiros 14 dias do reparo em osso diabético.

O diabetes mellitus inibe a atividade dos osteoblastos e reduz o potencial de formação do osso, levando a um desequilíbrio no processo de reparo ósseo

(Retzepi & Donos, 2010). O DM também reduz o volume de osso trabecular e a taxa de deposição óssea mineral (Verhaeghe *et al.*, 1990), além de diminuir a formação óssea durante a reparação de fraturas em decorrência de um aumento na reabsorção da cartilagem e maior atividade dos osteoclastos (Kayal *et al.*, 2007). A perda óssea também é atribuída a uma supressão na maturação e função de osteoblastos e adiposidade óssea aumentada (Botolin *et al.*, 2005).

No presente estudo, o comprometimento no reparo ósseo dos animais diabéticos foi observado pela presença de trabéculas ósseas mais finas, menores áreas de remodelação e reduzida neoformação óssea, comparado aos animais normoglicêmicos. Mao *et al.* (2014) mostrou que o diabetes atrasa o reparo ósseo e reduz os níveis de FGF-2 e IGF-1. O FGF-2 regula a proliferação dos pré-osteoblastos e a diferenciação e função dos osteoblastos (Long, 2012), além de aumentar a regeneração óssea e a angiogênese (Behr *et al.*, 2012; Kigami *et al.*, 2013). O IGF-1 aumenta a quantidade e a função dos osteoblastos (Long, 2012) e regula positivamente a formação de massa óssea (Crane & Cao, 2014). Sendo assim, a redução dos níveis desses fatores de crescimento poderia ser responsável pelo comprometimento da neoformação do osso em diabéticos.

Estudos demonstram que o DM afeta a quantidade e a função das EPCs, prejudicando o processo de cicatrização em feridas. EPCs recrutadas para áreas de feridas diferenciam-se em canais vasculares, portanto, o diabetes leva ao comprometimento da vasculogênese (Gallagher *et al.*, 2006) que é essencial no processo inicial do reparo ósseo. Estudo realizado em roedores mostrou que o DM altera a hematopoiese levando ao aumento da geração de monócitos inflamatórios e redução do potencial de reparação vascular (Hazra *et al.*, 2013).

A HBO tem seus efeitos baseados nas leis dos gases (leis de Boyle, Dalton e Henry) e nos efeitos fisiológicos e bioquímicos da hiperóxia (Gill & Bell, 2004). Durante o tratamento, as tensões de oxigênio arterial podem variar de 1000-1600mmHg enquanto que nos tecidos esses valores ficam próximos a 400mmHg (Ambiru *et al.*, 2008). Esse aumento da concentração de oxigênio atua estimulando processos de reparação e regeneração em algumas condições, como o aumento da angiogênese (Grassmann *et al.*, 2015). Somado a isso, a

própria pressão apresenta um efeito terapêutico em alguns casos de lesões de descompressão e embolia gasosa iatrogênica (Mortensen, 2008).

As indicações do uso de HBO são bem estabelecidas nos casos de hipóxia e quando a microcirculação precisa ser restaurada, porém seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente esclarecido, resultando em falta de protocolos padronizados para sua utilização (Gallagher *et al.*, 2006). Estudos experimentais mostraram que a HBO aumenta a síntese de VEGF (Sheikh *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2006), o que pode estimular a angiogênese e a produção de tecido de granulação (Gallagher *et al.*, 2006). Além disso, a HBO acelera os estágios iniciais do reparo ósseo, estimulando a proliferação celular e reduzindo o edema e o dano inflamatório (Rocha *et al.*, 2015).

Neste estudo, o tratamento por oxigenação hiperbárica aumentou a neoformação óssea nos animais normoglicêmicos, o que está de acordo com a análise histológica, que mostrou trabeculado ósseo mais espesso e muitas áreas da atividade osteoclástica no grupo CH, sugerindo aceleração na reparação óssea. *In vitro*, a HBO previne os efeitos de hipóxia, aumentando a atividade da fosfatase alcalina e a mineralização do nódulo ósseo; e acelerando as taxas de diferenciação de osteoblastos, através do aumento de Runx-2 e da expressão de colágeno tipo I (Al Hadi *et al.*, 2015). Outros estudos, avaliando aposição óssea mineral e taxa de formação óssea (Kawada *et al.*, 2013) e reparo de defeito ósseo em fêmur (Rocha *et al.*, 2015) mostraram um aumento na formação do osso em cinco dias de tratamento com HBO. Além disso, a HBO provou aumentar a neoformação óssea em defeitos na diáfise preenchidos com enxertos ósseos autólogos e melhorar a angiogênese (Grassmann *et al.*, 2015). Esses achados confirmam que a HBO é um valioso tratamento adjuvante para acelerar o reparo ósseo.

No presente estudo, não foi observada diferença significativa na neoformação óssea após a HBO em animais diabéticos. Em contraste, a HBO apresentou resultados positivos na reparação óssea peri-implantar de ratos diabéticos (Oliveira *et al.*, 2012). Neste modelo experimental o diâmetro dos implantes instalados foi de 1,5mm, o qual é suficiente para causar alterações

significativas no processo de reparo (Follak *et al.*, 2005). No entanto, neste estudo os implantes foram instalados 7 dias após a indução do diabetes e os animais foram submetidos a 10 sessões de HBO antes ou depois da instalação do implante. Embora a eutanásia desses animais tenha ocorrido 28 dias após o procedimento, resultado diferente poderia ter sido encontrado se os implantes fossem instalados em períodos mais tardios após a indução do DM.

A oxigenoterapia hiperbárica mobiliza células-tronco progenitoras por um mecanismo dependente de óxido nítrico para promover o reparo de feridas (Goldstein *et al.*, 2006; Thom *et al.*, 2006). Em relação ao tecido mole, a HBO melhora a cicatrização de feridas em ratos diabéticos, reduz a hiperglicemia e nefropatia (Prabowo *et al.*, 2014) e modula o HIF-1, contribuindo para melhorar o processo de reparo em feridas diabéticas (Sunkari *et al.*, 2015). Apesar dos resultados positivos encontrados após o uso da oxigenoterapia hiperbárica em outros tecidos prejudicados pelo diabetes, a ação do DM no tecido ósseo parece ter afetado o mecanismo de ação da HBO, visto que não houve melhora do reparo ósseo no grupo DH, usando este modelo experimental.

O DM afeta a expressão de Cbfa1/Runx2 e de Dlx-5, que são fatores de transcrição envolvidos na regulação da diferenciação dos osteoblastos, resultado que pode explicar a neoformação óssea limitada em diabéticos (Lu *et al.*, 2003). Outros estudos mostraram que o DM reduz o número de células osteoprogenitoras na medula óssea (Weinberg *et al.*, 2014) e aumenta a expressão de RAGE em células associadas à atividade formadora de osso (Santana *et al.*, 2003).

Os mastócitos podem ter participação importante na remodelação óssea uma vez que a deficiência destas células está associada com estado de remodelação óssea diminuída e o seu acúmulo, como nos casos de mastocitose, é responsável por perda óssea acelerada (Chiappetta & Gruber, 2006).

Pesquisa avaliando número e distribuição de mastócitos em pulmão de rato em condição de hiperóxia em pressão normal observou que o número de mastócitos é aumentado e sua distribuição encontra-se principalmente ao redor

dos vasos (Brock & Di Giulio, 2006). No presente estudo, avaliando tecido ósseo, a HBO foi capaz de aumentar a quantidade de mastócitos nos animais normoglicêmicos, sendo a presença dessas células, em virtude do modelo experimental utilizado, observada predominantemente na periferia da lesão. Esse resultado complementou os demais achados desse estudo, indicando que estas células participam na melhora do reparo ósseo, porém de forma desconhecida. A reparação óssea em ratos deficientes em mastócitos apresenta pouca formação óssea e presença de tecido conjuntivo denso na área da lesão, comprometendo o reparo ósseo (Behrends *et al.*, 2014).

No presente estudo a HBO não foi capaz de aumentar a quantidade de mastócitos nos animais diabéticos como observado nos grupos normoglicêmicos. Isso sugere que a hiperglicemia pode ter interferido na atividade mastocitária impedindo que os efeitos da HBO se manifestassem nessa condição. Ainda não existem estudos que relacionam os mastócitos no reparo ósseo em condição de DM, porém estudo avaliando feridas cutâneas mostrou que o DM atrasa o aumento dos mastócitos na fase de remodelação do reparo, além de comprometer a neovascularização e regressão vascular nas fases proliferativa e de remodelação, respectivamente, indicando que a redução dos mastócitos no diabetes pode estar diretamente ligada a esses eventos (Nishikori *et al.*, 2014).

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que o diabetes comprometeu a reparação óssea e que, após 7 dias, a oxigenoterapia hiperbárica foi capaz de aumentar a neoformação óssea e a quantidade de mastócitos apenas em animais normoglicêmicos.

A realização de 7 sessões diárias de oxigenação hiperbárica 30 dias após a confirmação do diabetes não foi suficiente para promover uma melhora significativa no reparo ósseo de defeitos cirúrgicos de 2,3mm dos animais diabéticos nesse modelo experimental.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

- Abdulameer SA, Sulaiman SA, Hassali MA, Subramaniam K, Sahib MN. Osteoporosis and type 2 diabetes mellitus: what do we know, and what we can do? **Patient Prefer Adherence.** 2012;6:435-48.
- Abeeleh MA, Ismail ZB, Alzaben KR, Abu-Halaweh SA, Al-Essa MK, Abuabeeleh J, et al. Induction of Diabetes Mellitus in Rats Using Intraperitoneal Streptozotocin: A Comparison between 2 Strains of Rats. **Eur J Sci Res.** 2009;32(3):398-402.
- Abraham SN, St John AL. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. **Nat Rev Immunol.** 2010;10(6):440-52.
- ADA. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care.** 2014;37 Suppl 1:81-90.
- Ai-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. **J Dent Res.** 2008;87(2):107-18.
- Akbarzadeh A, Norouzian D, Mehrabi MR, Jamshidi S, Farhangi A, Verdi AA, et al. Induction of diabetes by Streptozotocin in rats. **Indian J Clin Biochem.** 2007;22(2):60-4.
- Al Hadi H, Smerdon GR, Fox SW. Hyperbaric oxygen therapy accelerates osteoblast differentiation and promotes bone formation. **J. Dent.** 2015;43(3):382-8.
- Ambiru S, Furuyama N, Aono M, Otsuka H, Suzuki T, Miyazaki M. Analysis of risk factors associated with complications of hyperbaric oxygen therapy. **J Crit Care.** 2008;23(3):295-300.
- Beam HA, Parsons JR, Lin SS. The effects of blood glucose control upon fracture healing in the BB Wistar rat with diabetes mellitus. **J Orthop Res.** 2002;20(6):1210-6.

Behr B, Sorkin M, Lehnhardt M, Renda A, Longaker MT, Quarto N. A comparative analysis of the osteogenic effects of BMP-2, FGF-2, and VEGFA in a calvarial defect model. **Tissue Eng. Part A.** 2012;18(9-10):1079-86.

Behrends DA, Cheng L, Sullivan MB, Wang MH, Roby GB, Zayed N, et al. Defective bone repair in mast cell deficient mice with c-Kit loss of function. **Eur. Cells Mater.** 2014;28(209-21); discussion 21-2

Botolin S, Faugere MC, Malluche H, Orth M, Meyer R, McCabe LR. Increased bone adiposity and peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma2 expression in type I diabetic mice. **Endocrinology.** 2005;146(8):3622-31.

Brock TG, Di Giulio C. Prolonged exposure to hyperoxia increases perivascular mast cells in rat lungs. **J Histochem Cytochem.** 2006;54(11):1239-46.

Calabria LK, Vieira da Costa A, da Silva Oliveira RJ, Ramos Deconte S, Nascimento R, de Carvalho WJ, et al. Myosins Are Differentially Expressed under Oxidative Stress in Chronic Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Brains. **ISRN Neurosci.** 2013.

Camporesi EM. Hyperbaric oxygen therapy: applications in the trauma patient. . **Anesthesiology Clinics of North America.** 1999;17(1):311-23.

Chen H, Li X, Yue R, Ren X, Zhang X, Ni A. The effects of diabetes mellitus and diabetic nephropathy on bone and mineral metabolism in T2DM patients. **Diabetes Res Clin Pract.** 2013;100(2):272-6.

Chiappetta N, Gruber B. The role of mast cells in osteoporosis. **Semin. Arthritis Rheum.** 2006;36(1):32-6.

Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. **J Bone Miner Res.** 2002;17(3):513-20.

Crane JL, Cao X. Function of matrix IGF-1 in coupling bone resorption and formation. **J. Mol. Med. (Berl.)**. 2014;92(2):107-15.

Dahlin JS, Hallgren J. Mast cell progenitors: origin, development and migration to tissues. **Mol. Immunol.**. 2015;63(1):9-17.

Dawicki W, Marshall JS. New and emerging roles for mast cells in host defence. **Curr. Opin. Immunol.**. 2007;19(1):31-8.

de Liefde II, van der Klift M, de Laet CE, van Daele PL, Hofman A, Pols HA. Bone mineral density and fracture risk in type-2 diabetes mellitus: the Rotterdam Study. **Osteoporos Int.**. 2005;16(12):1713-20

Dede AD, Tournis S, Dontas I, Trovas G. Type 2 diabetes mellitus and fracture risk. **Metab.**. 2014;63(12):1480-90.

Deeds MC, Anderson JM, Armstrong AS, Gastineau DA, Hiddinga HJ, Jahangir A, et al. Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. **Lab Anim.**. 2011;45(3):131-40.

Delfino VDA, Figueiredo JF, Matsuo T, Favero ME, Matni AM, Mocelin AJ. Streptozotocin-induced diabetes mellitus: long-term comparison of two drug administration routes. **J Bras Nefrol.**. 2002;24(1):31-6.

Deschaseaux F, Sensebe L, Heymann D. Mechanisms of bone repair and regeneration. **Trends Mol Med.**. 2009;15(9):417-29.

Dobnig H, Piswanger-Solkner JC, Roth M, Obermayer-Pietsch B, Tiran A, Strele A, et al. Type 2 diabetes mellitus in nursing home patients: effects on bone turnover, bone mass, and fracture risk. **J Clin Endocrinol Metab.**. 2006;91(9):3355-63.

Farahani SS, Navabazam A, Ashkevari FS. Comparison of mast cells count in oral reactive lesions. **Pathol. Res. Pract.**. 2010;206(3):151-5.

Ferguson C, Alpern E, Miclau T, Helms JA. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? **Mech Dev.** 1999;87(1-2):57-66.

Follak N, Kloting I, Merk H. Influence of diabetic metabolic state on fracture healing in spontaneously diabetic rats. **Diabetes Metab Res Rev.** 2005;21(3):288-96.

Follak N, Kloting I, Wolf E, Merk H. Histomorphometric evaluation of the influence of the diabetic metabolic state on bone defect healing depending on the defect size in spontaneously diabetic BB/OK rats. **Bone.** 2004;35(1):144-52

Fosen KM, Thom SR. Hyperbaric oxygen, vasculogenic stem cells, and wound healing. **Antioxid Redox Signal.** 2014;21(11):1634-47.

Frenzel L, Hermine O. Mast cells and inflammation. **Jt. Bone Spine.** 2013;80(2):141-5.

Gallagher KA, Goldstein LJ, Thom SR, Velazquez OC. Hyperbaric oxygen and bone marrow-derived endothelial progenitor cells in diabetic wound healing. **Vascular.** 2006;14(6):328-37.

Gartner LP, Hiatt JL. **Tratado de Histologia em cores.** Rio de Janeiro: Elsevier; 2007.

Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. **J Cell Biochem.** 2003;88(5):873-84.

Gill AL, Bell CN. Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes. **QJM.** 2004;97(7):385-95.

Goiato MC, Santos DM, Danelon M, Pesqueira AA, de Carvalho Dekon SF, Fajardo RS. Hyperbaric oxygen: therapy for patients with maxillofacial implants? **J Craniofac Surg.** 2009;20(5):1519-22.

Goldstein LJ, Gallagher KA, Bauer SM, Bauer RJ, Baireddy V, Liu ZJ, et al. Endothelial progenitor cell release into circulation is triggered by hyperoxia-induced increases in bone marrow nitric oxide. **Stem Cells**. 2006;24(10):2309-18.

Grassmann JP, Schneppendahl J, Hakimi AR, Herten M, Betsch M, Logters TT, et al. Hyperbaric oxygen therapy improves angiogenesis and bone formation in critical sized diaphyseal defects. **J. Orthop. Res.** 2015;33(4):513-20.

Hazra S, Jarajapu YP, Stepps V, Caballero S, Thinschmidt JS, Sautina L, et al. Long-term type 1 diabetes influences haematopoietic stem cells by reducing vascular repair potential and increasing inflammatory monocyte generation in a murine model. **Diabetologia**. 2013;56(3):644-53.

Irie A, Takami M, Kubo H, Sekino-Suzuki N, Kasahara K, Sanai Y. Heparin enhances osteoclastic bone resorption by inhibiting osteoprotegerin activity. **Bone**. 2007;41(2):165-74.

Jan A, Sandor GK, Brkovic BB, Peel S, Evans AW, Clokie CM. Effect of hyperbaric oxygen on grafted and nongrafted calvarial critical-sized defects. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 2009;107(2):157-63.

Joffe IL, Travers KE, Perreault-Micale CL, Hampton T, Katz SE, Morgan JP, et al. Abnormal cardiac function in the streptozotocin-induced non-insulin-dependent diabetic rat: noninvasive assessment with doppler echocardiography and contribution of the nitric oxide pathway. **J Am Coll Cardiol**. 1999;34(7):2111-9.

Junqueira LC, Carneiro J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara; 2013.

Kalfas IH. Principles of bone healing. **Neurosurg Focus**. 2001;10(4):1-4.

Kang TS, Gorti GK, Quan SY, Ho M, Koch RJ. Effect of hyperbaric oxygen on the growth factor profile of fibroblasts. **Arch. Facial Plast. Surg.** 2004;6(1):31-5.

Kawada S, Wada E, Matsuda R, Ishii N. Hyperbaric hyperoxia accelerates fracture healing in mice. **PLoS One**. 2013;8(8):e72603.

Kawaguchi H, Kurokawa T, Hanada K, Hiyama Y, Tamura M, Ogata E, et al. Stimulation of fracture repair by recombinant human basic fibroblast growth factor in normal and streptozotocin-diabetic rats. **Endocrinology**. 1994;135(2):774-81.

Kayal RA, Tsatsas D, Bauer MA, Allen B, Al-Sebaei MO, Kakar S, et al. Diminished bone formation during diabetic fracture healing is related to the premature resorption of cartilage associated with increased osteoclast activity. **J Bone Miner Res**. 2007;22(4):560-8.

Kigami R, Sato S, Tsuchiya N, Yoshimakai T, Arai Y, Ito K. FGF-2 angiogenesis in bone regeneration within critical-sized bone defects in rat calvaria. **Implant Dent**. 2013;22(4):422-7.

Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, et al. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. **Journal of Bone & Mineral Research**. 2001;16(6):1004-14.

Lee CC, Chen SC, Tsai SC, Wang BW, Liu YC, Lee HM, et al. Hyperbaric oxygen induces VEGF expression through ERK, JNK and c-Jun/AP-1 activation in human umbilical vein endothelial cells. **J. Biomed. Sci.** 2006;13(1):143-56.

Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**. 2008;51(2):216-26.

Lin SS, Ueng SW, Niu CC, Yuan LJ, Yang CY, Chen WJ, et al. Hyperbaric oxygen promotes osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells by regulating Wnt3a/beta-catenin signaling--an in vitro and in vivo study. **Stem Cell Res**. 2013;12(1):260-74.

Liu R, Bal HS, Desta T, Krothapalli N, Alyassi M, Luan Q, et al. Diabetes enhances periodontal bone loss through enhanced resorption and diminished bone formation. **J Dent Res.** 2006;85(6):510-4

Long F. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 2012;13(1):27-38.

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.

Ma L, Oei L, Jiang L, Estrada K, Chen H, Wang Z, et al. Association between bone mineral density and type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. **Eur J Epidemiol.** 2012;27(5):319-32

Macey LR, Kana SM, Jingushi S, Terek RM, Borretos J, Bolander ME. Defects of early fracture-healing in experimental diabetes. **J Bone Joint Surg Am.** 1989;71(5):722-33.

Mao L, Tamura Y, Kawao N, Okada K, Yano M, Okumoto K, et al. Influence of diabetic state and vitamin D deficiency on bone repair in female mice. **Bone.** 2014;61(102-8).

Mishima N, Sahara N, Shirakawa M, Ozawa H. Effect of streptozotocin-induced diabetes mellitus on alveolar bone deposition in the rat. **Arch Oral Biol.** 2002;47(12):843-9.

Mohan S, Richman C, Guo R, Amaar Y, Donahue LR, Wergedal J, et al. Insulin-like growth factor regulates peak bone mineral density in mice by both growth hormone-dependent and -independent mechanisms. **Endocrinology.** 2003;144(3):929-36.

Mortensen CR. Hyperbaric oxygen therapy. **Current Anaesthesia & Critical Care.** 2008;19(5):333-7.

Nishikori Y, Shiota N, Okunishi H. The role of mast cells in cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic mice. **Arch Dermatol Res.** 2014;306(9):823-35.

Oliveira PA, Oliveira AM, Pablos AB, Costa FO, Silva GA, Santos JN, et al. Influence of hyperbaric oxygen therapy on peri-implant bone healing in rats with alloxan-induced diabetes. **J Clin Periodontol.** 2012;39(9):879-86.

Paul RG, Bailey AJ. Glycation of collagen: the basis of its central role in the late complications of ageing and diabetes. **Int J Biochem Cell Biol.** 1996;28(12):1297-310.

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;42(7):907-14

Prabowo S, Nataatmadja M, Hadi JP, Dikman I, Handajani F, Tehupuring SE, et al. Hyperbaric Oxygen Treatment in a Diabetic Rat Model Is Associated with a Decrease in Blood Glucose, Regression of Organ Damage and Improvement in Wound Healing. **Health.** 2014;6(15):1950-8.

Retzepi M, Donos N. The effect of diabetes mellitus on osseous healing. **Clin. Oral Implants Res.** 2010;21(7):673-81.

Rocha FS, Gomes Moura CC, Rocha Rodrigues DB, Zanetta-Barbosa D, Nakamura Hiraki KR, Dechichi P. Influence of hyperbaric oxygen on the initial stages of bone healing. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.** 2015;120(5):581-7.

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;62(12):1568-72.

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(6):1502-10

Schwartz AV, Hillier TA, Sellmeyer DE, Resnick HE, Gregg E, Ensrud KE, et al. Older women with diabetes have a higher risk of falls: a prospective study. **Diabetes Care.** 2002;25(10):1749-54.

Sheikh AY, Gibson JJ, Rollins MD, Hopf HW, Hussain Z, Hunt TK. Effect of hyperoxia on vascular endothelial growth factor levels in a wound model. **Arch. Surg.** 2000;135(11):1293-7.

Shyng YC, Devlin H, Sloan P. The effect of streptozotocin-induced experimental diabetes mellitus on calvarial defect healing and bone turnover in the rat. **Int J Oral Maxillofac Surg.** 2001;30(1):70-4.

Silberstein R, Melnick M, Greenberg G, Minkin C. Bone remodeling in W/Wv mast cell deficient mice. **Bone.** 1991;12(4):227-36.

Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV, Jr., Ferrara N, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2002;99(15):9656-61.

Sunkari VG, Lind F, Botusan IR, Kashif A, Liu ZJ, Yla-Herttula S, et al. Hyperbaric oxygen therapy activates hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1), which contributes to improved wound healing in diabetic mice. **Wound Repair Regen.** 2015;23(1):98-103.

Tay YC, Wang Y, Kairaitis L, Rangan GK, Zhang C, Harris DC. Can murine diabetic nephropathy be separated from superimposed acute renal failure? **Kidney Int.** 2005;68(1):391-8.

Thom SR, Bhopale VM, Velazquez OC, Goldstein LJ, Thom LH, Buerk DG. Stem cell mobilization by hyperbaric oxygen. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** 2006;290(4):H1378-86

Thrailkill KM, Lumpkin CK, Jr., Bunn RC, Kemp SF, Fowlkes JL. Is insulin an anabolic agent in bone? Dissecting the diabetic bone for clues. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 2005;289(5):E735-45.

Tibbles PM, Edelsberg JS. Hyperbaric-oxygen therapy. **N Engl J Med.** 1996;334(25):1642-8.

Tolosa MJ, Chuguransky SR, Sedlinsky C, Schurman L, McCarthy AD, Molinuevo MS, et al. Insulin-deficient diabetes-induced bone microarchitecture alterations are associated with a decrease in the osteogenic potential of bone marrow progenitor cells: preventive effects of metformin. **Diabetes Res Clin Pract.** 2013;101(2):177-86.

Tsiridis E, Upadhyay N, Giannoudis P. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? **Injury.** 2007;38 Suppl 1(S11-25).

Tuk B, Tong M, Fijneman EM, van Neck JW. Hyperbaric oxygen therapy to treat diabetes impaired wound healing in rats. **PLoS One.** 2014;9(10):e108533.

Vashishth D, Gibson GJ, Khouri JI, Schaffler MB, Kimura J, Fyhrie DP. Influence of nonenzymatic glycation on biomechanical properties of cortical bone. **Bone.** 2001;28(2):195-201.

Verhaeghe J, van Herck E, Visser WJ, Suiker AM, Thomasset M, Einhorn TA, et al. Bone and mineral metabolism in BB rats with long-term diabetes. Decreased bone turnover and osteoporosis. **Diabetes.** 1990;39(4):477-82.

Vestergaard P. Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes--a meta-analysis. **Osteoporos Int.** 2007;18(4):427-44.

Wang X, Shen X, Li X, Agrawal CM. Age-related changes in the collagen network and toughness of bone. **Bone.** 2002;31(1):1-7

Weinberg E, Maymon T, Moses O, Weinreb M. Streptozotocin-induced diabetes in rats diminishes the size of the osteoprogenitor pool in bone marrow. **Diabetes Res Clin Pract.** 2014;103(1):35-41.

ANEXO I

ANEXO I

Tabela 1. Peso e glicemia dos animais diabéticos ao longo do experimento

ANIMAL	PESO NO DIA DA INDUÇÃO	GLICEMIA 24H APÓS A INDUÇÃO	PESO 15 DIAS	GLICEMIA 15 DIAS	PESO 30 DIAS	GLICEMIA 30 DIAS
9	276g	445mg/dl	257g	563mg/dl	248g	600mg/dl
18	272g	418mg/dl	261g	412mg/dl	280g	599mg/dl
24	313g	308mg/dl	286g	509mg/dl	287g	368mg/dl
25	273g	452mg/dl	242g	467mg/dl	251g	414mg/dl
52	262g	445mg/dl	120g	463mg/dl	244g	513mg/dl
2	251g	394mg/dl	249g	581mg/dl	261g	570mg/dl
5	257g	369mg/dl	245g	521mg/dl	262g	454mg/dl
31	250g	338mg/dl	235g	420mg/dl	274g	600mg/dl
32	255g	345mg/dl	260g	442mg/dl	283g	532mg/dl
34	275g	368mg/dl	250g	403mg/dl	278g	600mg/dl

Tabela 2. Consumo de água (ml) e ração (g) por animal durante a terceira semana após a confirmação do diabetes

ANIMAL	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7
2	76,6ml	103,3ml	106,6ml	103,3ml	71,6ml	95,5ml	93,8ml
	25,6g	36,6g	39,6g	33,8g	36,8g	33,9g	36,7g
5	76,6ml	103,3ml	106,6ml	103,3ml	71,6ml	95,5ml	93,8ml
	25,6g	36,6g	39,6g	33,8g	36,8g	33,9g	36,7g
31	118ml	142ml	110ml	156ml	123ml	123ml	129,6ml
	31,8g	35,6g	39,1g	33,6g	38,7g	35,5g	37,1g
32	118ml	142ml	110ml	156ml	123ml	123ml	129,6ml
	31,8g	35,6g	39,1g	33,6g	38,7g	35,5g	37,1g
34	118ml	142ml	110ml	156ml	123ml	123ml	129,6ml
	31,8g	35,6g	39,1g	33,6g	38,7g	35,5g	37,1g
9	95ml	115ml	127,5ml	141,2ml	102,5ml	112,5ml	123,7ml
	30,5g	41,2g	38g	39,9g	33,7g	36,5g	37,2g
18	96ml	108ml	106ml	106ml	76ml	103ml	96ml
	15,6g	35,2g	36,9g	33,1g	35,6g	29,2g	35,2g
24	111,2ml	126,2ml	97,5ml	135ml	102,5ml	117,5ml	106,2ml
	39,9g	36,4g	40,4g	37,6g	42,6g	38,3g	43,3g
25	111,2ml	126,2ml	97,5ml	135ml	102,5ml	117,5ml	106,2ml
	39,9g	36,4g	40,4g	37,6g	42,6g	38,3g	43,3g
52	103ml	88ml	105ml	91ml	116ml	83ml	114ml
	28,6g	23,8g	33,2g	29g	39,8g	23g	30,6g

Tabela 3. Peso por animal no 1º e 7º dia da terceira semana após a confirmação do diabetes

ANIMAL	DIA 1	DIA 7
2	249g	267g
5	245g	273g
31	235g	273g
32	260g	301g
34	250g	284g
9	257g	269g
18	261g	277g
24	286g	287g
25	242g	234g
52	120g	231g

ANEXO II

ANEXO II



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



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 026/14, sobre o projeto de pesquisa intitulado “Efeito da oxigenação hiperbárica e do laser de baixa potência no reparo e biomecânica em osso de ratos diabéticos”, 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 Agosto de 2014**.

(We certify that the protocol nº 026/14, about “Efeito da oxigenação hiperbárica e do laser de baixa potência no reparo e biomecânica em osso de ratos diabéticos”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES ON ANIMAL RESEARCH as regulations of National Advice of Control and Animal Experimentation (CONCEA) and approved by Ethics Commission on Use of Animals (CEUA) – Federal University of Uberlândia in 29/08/2014).

Uberlândia, 29 de Agosto de 2014.

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU