

JESSYCA FIGUEIRA VENÂNCIO

**Efeito da laserterapia de baixa potência no reparo
ósseo em ratos com *diabetes mellitus* tipo 1**

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, 2018

Jessyca Figueira Venâncio

Efeito da laserterapia de baixa potência no reparo ósseo em ratos com *diabetes mellitus* tipo 1

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: Prof.^a Dr.^a Paula Dechichi

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Paula Dechichi

Prof.^a Dr.^a Priscilla Barbosa Ferreira Soares

Prof.^a Dr.^a Roberta Rezende Rosa

UBERLÂNDIA, 2018

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

- V448e
2018 Venâncio, Jessyca Figueira, 1991
 Efeito da laserterapia de baixa potência no reparo ósseo em ratos
 com diabetes mellitus tipo 1 / Jessyca Figueira Venâncio. - 2018.
 41 f. : il.
- Orientadora: Paula Dechichi.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
 Programa de Pós-Graduação em Odontologia.
 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.150>
 Inclui bibliografia.
1. Odontologia - Teses. 2. Diabetes - Teses. 3. Lasers em
 odontologia - Teses. 4. Ossos - Teses. I. Dechichi, Paula. II.
 Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
 Odontologia. III. Título.

CDU: 616.314



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



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 nº327– COPOD

Data: 08/02/2018

Discente: JESSYCA FIGUEIRA VENÂNCIO Matrícula: 11612ODO018

Título do Trabalho: **Efeito da laserterapia de baixa potência no reparo ósseo de ratos diabéticos**

Área de concentração: Clínica Odontológica Integrada.

Linha de pesquisa: Processo de reparo

As oito horas e trinta minutos do dia **oito de fevereiro do ano de 2018** no Anfiteatro do Bloco 4L, Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em janeiro de 2018, assim composta: Professores Doutores: Priscilla Barbosa Ferreira Soares (UFU); Roberta Rezende Rosa (UNITRI); e Paula Dechichi (UFU) orientador(a) do(a) candidato(a) **Jessyca Figueira Venâncio**.

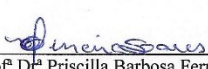
Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa Dra. Paula Dechichi apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme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

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

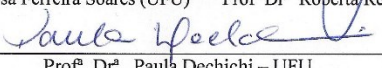
Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o (a) candidato(a) A provado(a).

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 10 horas e 40 minutos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.


Profª Drª Priscilla Barbosa Ferreira Soares (UFU)


Profª Drª Roberta Rezende Rosa (UNITRI)


Profª. Drª. Paula Dechichi – UFU
Orientador (a)

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha família:
Minha mãe Jacimar, meu Pai Marcos e
meu irmão Marcos Júnior, por todo o apoio.
À minha companheira Luiza, por todo amor
e carinho.

AGRADECIMENTOS

À Deus por em todos os momentos da minha vida me amparar em sua infinita bondade.

Aos meus pais Marcos e Jacimar, por toda a dedicação e amor, por me incentivarem a continuar estudando e sempre buscando um futuro melhor.

Ao meu irmão Marcos Júnior por todo companheirismo e afeto, por ser um bom irmão e sempre me apoiar.

À minha companheira Luiza Garcia, por todo amor e carinho que sempre teve comigo, pela paciência e estar ao meu lado nos dias bons e dias difíceis, por passar finais de semanas e noites nos laboratórios comigo, sempre me ajudando em tudo que fosse preciso. Obrigada por sempre apoiar meus sonhos e ir atrás deles comigo.

Aos meus Avós que nunca mediram nenhum esforço para me ajudarem nos meus estudos e que, mesmo não entendendo a pós-graduação e a sua finalidade, nunca duvidaram da minha competência e sempre se orgulharam de mim, apoiando meus sonhos.

Aos meus Bisavós, alguns recentemente deixaram essa vida, mas sempre foram um exemplo de vida e superação para toda a família e especialmente pra mim.

À minha tia Jucilaine, que sempre investiu e me deu total apoio nos meus estudos e carreira profissional. Obrigada por sempre ser como uma mãe pra mim e sempre estar ao meu lado.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Paula Dechichi, por ser um exemplo de pessoa e de profissional, aprendi muito ao seu lado e vou levar seus princípios sempre comigo.

Ao meu maior e melhor amigo Rafael Resende, que se tornou um irmão. Exemplo de dedicação, de companheirismo e de amizade. Admiro muito a pessoa e o profissional que se tornou e tenha certeza que tenho você como um exemplo a seguir.

À minha amiga Liliane Cecília, uma irmã, amiga incomparável e sempre presente. Obrigada por sempre me apoiar e sonhar junto comigo. Obrigada pelos conselhos, puxões de orelha e brincadeiras que só a gente entende.

À minha amiga Isabela Lima, amizade que se estende desde o ensino médio. Obrigada por todos os momentos bons que passamos juntas, por sempre me aconselhar nos momentos que mais preciso.

Ao meu amigo José Arthur, amigo para toda hora, que sempre que precisei estava disposto a me ajudar em tudo o que fosse preciso. Obrigada pelo carinho.

Ao meu colega de pesquisa e amigo Dr.^o Gustavo Rabelo, por toda amizade e companheirismo na vida pessoal e por todos os ensinamentos e vivência juntos no laboratório.

À Prof.^a Dr.^a Priscilla Barbosa Soares, por toda a ajuda e ensinamentos durante o decorrer dos experimentos no micro-ct.

À Prof.^a Dr.^a Flaviana Soares Rocha, ao Prof.^o Dr.^o Jonas Dantas Batista e ao Prof.^o Dr.^o Lair Mambrini por toda contribuição a minha formação acadêmica e serem exemplo de competência, dedicação e profissionalismo que sempre seguirei.

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

Aos colegas de pesquisa Ms Pedro Limirio, Camila Linhares, Anna Carolina, Nilson Neto, Lorena Zanatta, Layza Maria, Brenda Ponce e Marina Foggioni. Obrigada por toda ajuda e momentos juntos.

À Ester, Fabrício, Juscélia, Graça, Brenda, Advaldo, John e Bruno e demais técnicos laboratoriais e 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 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela minha bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo financiamento desta pesquisa.

Ao Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) 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, CBEA e CPBio pelo apoio na parte experimental da pesquisa.

EPÍGRAFE

*“Nós somos o que fazemos
repetidamente. A excelência,
portanto, não é um ato, mas um
hábito.”*

Aristóteles

Sumário

Lista de abreviatura e siglas.....	1
Resumo	3
Abstract.....	5
1. Introdução	6
2. Proposição.....	14
3. Material e Métodos	15
3.1 Procedimento experimental	15
3.2 Indução de Diabetes Mellitus Tipo 1	15
3.3 Procedimento cirúrgico e laserterapia	16
3.4 Obtenção dos espécimes.....	18
3.5 Análise por meio de Microtomografia Computadorizada	18
3.6 Análises histológicas.....	20
3.7 Análise estatística	20
4. Resultados.....	21
4.1 Análises por meio de Micro-CT	21
4.2 Análises histológicas.....	22
5. Discussão	24
6. Conclusão	29
7. Referências.....	30
8. Anexos	41

Lista de abreviatura e siglas

% – Porcentagem

± – Mais Ou Menos

°C – Grau Celsius

g – Gramas

mg - Miligramas

cm – Centímetros

mm – Milímetros

mW – MiliWatts

μ - Micro

UI – Unidade Internacional

β– Beta

α- Alfa

DM – *Diabetes Mellitus*

DMT1 - *Diabetes Mellitus* Tipo 1

DMT2 - *Diabetes Mellitus* Tipo 2

DMG – *Diabetes Mellitus* Gestacional

DMO – Densidade Mineral Óssea

TGF-β – Fator de Crescimento Tumoral Básico

BMPS – Proteínas Morfogenéticas Ósseas

Rank-L – Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kβ

IL - Interleucina

LTBP – Laserterapia de Baixa Potência

ATP – Adenosina Trifosfato

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

RNA - Ácido Ribonucleico

Micro-Ct – Microtomografia Computadorizada

STZ – Estreptozotocina

BV/TV – Volume Ósseo

BS/BV – Superfície Óssea do Volume Ósseo

Tb.Th – Espessura das Trabéculas

Tb.N – Número de Trabéculas

Tb.Sp – Separação das Trabéculas

Conn.Dn – Grau de Conectividade Das Trabéculas

ROI – Região de Interesse

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

HE – Hematoxilina e Eosina

Resumo

A laserterapia de baixa potência é uma radiação não ionizante altamente concentrada que tem sido usada para fins terapêuticos. O presente estudo avaliou o efeito da laserterapia de baixa potência no reparo ósseo de ratos diabéticos. Cinco animais foram submetidos à indução de *diabetes mellitus* tipo 1DMT1 e outros cinco animais permaneceram saudáveis. Após 4 semanas, foram criados defeitos ósseos nos fêmures de todos os animais. Os fêmures esquerdos receberam laserterapia e os fêmures direito não receberam tratamento. Sete dias após a cirurgia, os animais foram sacrificados, os fêmures foram removidos e divididos em 4 grupos (n = 5), como segue: Saudável (fêmur direito-animais saudáveis); Saudável + Laser (fêmur esquerdo-animais saudáveis submetidos à laserterapia); Diabético (fêmur direito-animais diabéticos); Diabético + Laser (fêmur esquerdo-animais diabéticos submetidos à laserterapia). Os fêmures foram analisados por microtomografia computadorizada (micro-CT) e por análise histológica qualitativa. Nas análises por micro-CT, os grupos diabéticos apresentaram menores valores de BV/TV, Tb.Th, Tb.N, Conn.Dn do que animais saudáveis ($p < 0,05$). No entanto, houve aumento dos valores de BS/BV, Tb.Sp e SMI nos grupos diabéticos em comparação aos saudáveis ($p < 0,05$). O grupo Diabético + Laser mostrou aumento de Tb.Sp e redução de Conn.Dn comparado ao grupo Diabético ($p < 0,05$). Na análise histológica, todos os grupos apresentaram tecido ósseo primário na área de defeito. O grupo saudável apresentou mais coágulo residual e tecido de granulação comparado ao Saudável + Laser. Nos grupos saudáveis, o tecido ósseo neoformado apresentou trabéculas mais espessas em relação aos grupos diabéticos. No grupo diabético, observou-se grandes áreas de coágulo e tecido de granulação, bem como poucas trabéculas em relação aos demais grupos. No grupo Saudável + Laser, houve menos extensão de coágulo e quantidade de tecido de granulação comparado ao Diabético. O reparo ósseo do Diabético + Laser foi aparentemente semelhante ao grupo Saudável. Os resultados mostraram que o diabetes diminuiu o processo de reparo ósseo e a laserterapia de baixa potência foi um tratamento importante para minimizar o processo inflamatório em todos os

grupos. E, apesar de não alterar o volume ósseo a LTBP interferiu na morfologia estrutural do tecido ósseo neoformado nos grupos saudável e diabético.

Palavras chave: Diabetes mellitus, Laser, Reparo ósseo, Microtomografia computadorizada.

Abstract

Low-level laser therapy is a highly concentrated non-ionizing radiation that has been used for therapeutic purposes. The present study evaluated the effect of low-level laser therapy on the bone repair of diabetic rats. Five animals were subject to type 1 diabetes mellitus T1DM induction and the other five animals remained healthy. After 4 weeks, it was created bone defects in the femurs. Left femurs received laser therapy and the right femur received no treatment. Seven days after surgery, animals were euthanized, the femurs were removed and divided into 4 groups (n=5), as follows: Healthy (right femur); Healthy+Laser (left femur subject to Laser therapy); Diabetic (right femur); Diabetic+Laser (left femur subject to Laser therapy). The femur was analyzed by micro-computerized tomography and by qualitative histological analysis. In the Micro-CT analyses, diabetic groups showed lower values of BV/TV, Tb.Th, Tb.N, and Conn.Dn than non-diabetic animals ($p<0.05$). However, there was increase BS/BV, Tb.Sp and SMI values in diabetic groups compared to non-diabetic groups ($p<0.05$). The Diabetic+Laser showed increase Tb.Sp and decrease Conn.Dn compared to Diabetic group ($p<0.05$). In histological analyses, all groups showed primary bone tissue in defect area. Healthy group presented more residual clot and granulation tissue compared to the Healthy+Laser. In the healthy groups, the neoformation bone tissue presented thicker trabeculae in relation to the diabetic groups. In Diabetic group, large areas of clot and granulation tissue were observed, as well as few trabeculae in relation to the other groups. In the Healthy+Laser group, there was less clot extension and amount of granulation tissue compared to Diabetic. The bone repair of Diabetic+Laser was apparently similar to Healthy group. The results showed that diabetes slowed the bone repair process and low power laser therapy was an important treatment to minimize the inflammatory process in all groups. And although it did not alter the bone volume, LTBP interfered in the structural morphology of the newly formed bone tissue in the healthy and diabetic groups.

Key words: Diabetes mellitus, Laser, Bone repair, Computerized microtomography.

1. Introdução

Diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica que afeta mais de 415 milhões de indivíduos com expectativa que este número dobre em 2040, sendo uma preocupação de saúde pública. DM é definido como um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos, caracterizados por hiperglicemia, resultado de defeitos na secreção de insulina [DM tipo 1 (DMT1)], ação da insulina [DM tipo 2 (DMT2)] ou ambos ¹, incluindo alterações no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas ².

A patogênese do *Diabetes Mellitus* do tipo 1 (DMT1) envolve a destruição autoimune das células β produtoras de insulina do pâncreas, normalmente, levando à deficiência absoluta de insulina. Geralmente, ocorre como consequência de uma quebra na regulação imune, resultando em uma expansão das células T auto-reativas CD41 e CD81 e linfócitos B e ativação do sistema imune inato, que colabora para destruir células beta produtoras de insulina ³. A falta de insulina provoca superprodução de glicose e diminuição da absorção celular de glicose, resultando em hiperglicemia. Esse quadro também leva a aumento na degradação da gordura e oxidação de ácidos graxos, o que provoca superprodução de cetonas ⁴. A superprodução de cetonas leva a cetoacidose diabético, sendo necessário tratamento vitalício com insulina exógena para pacientes com diabetes.⁵

O *Diabetes Mellitus* de Tipo 2 (DMT2) é um distúrbio metabólico caracterizado por hiperglicemia e metabolismo lipídico alterado, resultante de insuficiente secreção ou de resistência dos tecidos à atividade da insulina ⁶. Os defeitos metabólicos que contribuem para o desenvolvimento do DMT2 incluem a incapacidade das células das ilhotas de compensar altos níveis de glicose, que estão associados a excesso de ingestão alimentar, aumento da secreção de glucagon e redução da resposta incretina, expansão, inflamação e hipoadiponectinemina do tecido adiposo, aumento da produção endógena de glicose e desenvolvimento de resistência periférica à insulina ⁷. O excesso calórico crônico é o principal evento patogênico que impulsiona o

desenvolvimento de diabetes tipo 2 em indivíduos suscetíveis a manifestações genéticas e epigenéticas ^{8,9}.

Além dos tipos mais comuns de diabetes (DMT1 e DMT2) existe um terceiro tipo, o Diabetes Mellitus Gestacional (DMG), que é a diabetes diagnosticada no segundo ou terceiro trimestre da gravidez, que não era diabetes claramente evidente antes da gestação¹.

A hiperglicemia crônica causada pelo diabetes pode levar a complicações macrovasculares e microvasculares. As doenças coronárias, cerebrovasculares e periféricas são as comorbidades macrovasculares mais comuns, enquanto retinopatia, neuropatia, nefropatia e anormalidades vasculares foram relatadas como distúrbios microvasculares ^{1,10,11}, assim como susceptibilidade a infecções, reparo tardio dos tecidos e doença periodontal severa¹².

Recentemente, dados epidemiológicos mostraram que os ossos também são órgãos alvo do diabetes. Estudos mostraram baixa densidade mineral óssea e aumento do risco de fraturas ósseas em pacientes DMT1 e DMT2, mesmo em estágios iniciais da doença, particularmente na presença de hiperglicemia não controlada. Também, tem-se o agravante que as fraturas em diabéticos são mais nocivas do que em normoglicêmicos ¹³. Este dano ao esqueleto está relacionado à deficiências no metabolismo ósseo, tanto na formação, como na reabsorção do osso, a qual depende da função normal das células ósseas ¹⁴.

Existe forte evidência de que os ossos de indivíduos DMT1 apresentam menor mineralização ^{15,16}, menor tamanho, espessura ¹⁷⁻²¹ redução de resistência ¹⁷⁻¹⁹ e qualidade óssea ^{17,18,22}. Essas alterações, levam à maior incidência de fratura, em qualquer local ^{16,23}, predominantemente no pescoço femoral ²⁴. Além disso, na presença de diabetes a reparação óssea é mais lenta, provocando atraso na recuperação completa após a fratura ^{25,26}. Também, o DMT1 foi identificado como fator de risco para desenvolvimento ósseo prejudicado. Isso é refletido não apenas no crescimento linear de ossos longos, uma vez que as meninas com DMT1 tendem a ter estatura mais baixa

no final do crescimento linear ²⁰, mas também na DMO (Densidade mineral óssea). ^{16,27}.

O osso é um órgão que exerce funções importantes no corpo, tais como locomoção, suporte e proteção de tecidos moles, armazenamento de cálcio e fosfato e abriga a medula óssea ²⁸. O tecido ósseo participa direta ou indiretamente de todas as funções dos ossos. Esse tecido é um conjuntivo, cuja matriz extracelular é mineralizada e que possui quatro tipos de células: osteoblastos, células do revestimento ósseo, osteócitos e osteoclastos. Apesar de sua aparência inerte, o tecido ósseo é altamente dinâmico, sendo continuamente reabsorvido pelos osteoclastos e neoformado pelos osteoblastos. Há evidências de que os osteócitos atuam como mecanossensores e orquestradores desse processo de remodelação óssea ^{29,30}. A remodelação óssea é um processo altamente complexo pelo qual a matriz mineralizada antiga é substituída por nova, em um ciclo composto por três fases: (1) iniciação da reabsorção óssea por osteoclastos, (2) a transição (ou período de reversão) da reabsorção para a formação, e (3) a formação óssea por osteoblastos. O processo ocorre devido a ações coordenadas de osteoclastos, osteoblastos, osteócitos e células de revestimento ósseo que, em conjunto, formam a estrutura histológica temporária chamada unidade multicelular básica (BMU - Basic Multicellular Unit) ²⁸. A remodelação óssea normal é necessária para a reparação de fraturas e adaptação do esqueleto para uso mecânico, bem como para a homeostase de cálcio ³¹. Por outro lado, um desequilíbrio da reabsorção óssea e da formação resulta em várias doenças ósseas. O equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea é necessário e depende da ação de vários fatores locais e sistêmicos, incluindo hormônios, citocinas, quimiocinas e estimulação biomecânica ^{32,33}.

Quando o tecido ósseo é lesado, é desencadeado uma série de eventos com objetivo de promover a regeneração óssea. As condições locais desfavoráveis (por exemplo, fornecimento de sangue inadequado, lesão de tecido mole ou instabilidade mecânica) e/ou perda extensiva de tecido ósseo podem resultar em falha no reparo ósseo fisiológico com cura retardada, não união ou defeito ósseo persistente ³⁴.

O reparo ósseo pode ocorrer por meio de reparação óssea direta (cura óssea primária ou cura óssea intramembranosa) ou reparação óssea indireta (cura óssea secundária ou cura óssea endocondral) ou uma combinação de ambos ³⁵. Este processo dinâmico complexo requer a orquestração precisa de vários eventos durante quatro estágios sobrepostos ³⁶ com características histológicas distintas: resposta inflamatória, formação de calo cartilaginoso macio, formação de um calo ósseo e união óssea com remodelação. Este processo envolve uma sequência de eventos anabolizantes e catabólicos, alguns dos quais não específicos (produção e remodelação do calo cartilaginoso) e outros específicos (formação do calo ósseo, que é então remodelado em tecido ósseo). Assim, a reabsorção óssea desempenha um papel crucial, e os processos de reabsorção e formação não são separados ou independentes no tempo e no espaço. O resultado final do processo de reparação óssea é a produção pelas células de uma matriz de colágeno, cuja ossificação restaura as propriedades mecânicas normais do osso. Esses estágios histologicamente definidos de reparo ósseo requerem uma série de eventos celulares (migração, proliferação e diferenciação), cuja coordenação é assegurada por citocinas e fatores de crescimento ³⁴.

O reparo ósseo começa após o aparecimento de hematoma como resultado da fratura e lesão nos tecidos moles circundantes, resultante da ativação da cascata de coagulação plasmática e das plaquetas expostas ao ambiente extravascular ³⁷. A formação de hematoma é geralmente seguida por uma resposta inflamatória aguda. É durante esta fase que os macrófagos e as plaquetas desgranuladas infiltram o local e liberam citocinas inflamatórias. Nesta fase inicial, os pré-osteoblastos periostais e osteoblastos locais começam a formar uma nova matriz óssea. As células mesenquimais e os fibroblastos proliferam e estão associados à expressão de fatores de crescimento de fibroblastos. As células mesenquimais e osteoprogenitoras estão associadas à expressão de proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e à família de proteínas TGF- β . À medida que o hematoma amadurece, uma matriz colágena desenvolve e novos vasos sanguíneos podem ser encontrados. Estes novos vasos sanguíneos fornecem um canal para células progenitoras e

fatores de crescimento para a diferenciação de células mesenquimais. Essas células, em última instância, estimulam o desenvolvimento da cartilagem, que mais tarde é convertido em tecido ósseo por meio de ossificação endocondral. Esta cartilagem precoce pode ser identificada pela expressão de colágeno tipo 1 e 2. Os condrócitos locais proliferam, hipertrofiam e expressam fatores que estimulam a mineralização da matriz da cartilagem. A substituição da cartilagem hipertrófica mineralizada em tecido ósseo envolve morte dos condrócitos, aumento do crescimento vascular, diferenciação dos osteoblastos e deposição de matriz óssea sobre a cartilagem calcificada. Ao longo do tempo, a matriz óssea recentemente formada é remodelada por meio de atividade osteoblástica e osteoclástica ³⁵.

O reparo ósseo direto, ou intramembranoso, se inicia pela formação de coágulo sanguíneo, descrito como o principal evento histológico inicial do processo de reparação óssea em roedores e primatas ³⁸. A formação de coágulo é descrita como um passo fundamental para o início do processo de reparação, uma vez que as plaquetas formadoras de coágulos possuem uma série de fatores de crescimento ³⁹. À medida que o processo de reparação evolui, o coágulo de sangue é gradualmente reabsorvido e substituído por tecido de granulação, caracterizado histologicamente como uma matriz extracelular provisória, povoada por numerosas células inflamatórias, associada a uma marcada proliferação de fibroblastos e células endoteliais ^{40,41}. Posteriormente, uma redução do infiltrado inflamatório é acompanhada por substituição gradual do tecido de granulação por tecido conjuntivo maduro ^{42,43}. Este estágio é caracterizado por intensa atividade de fibroblastos que sintetizam matriz extracelular, resultando no aumento do conteúdo de fibras colágenas associadas a aumento adicional na densidade dos vasos sanguíneos ^{43,44}. À medida que ocorre o aumento de fibras colágenas, diminui a população celular e vasos sanguíneos caracterizando a fase de maturação do tecido conjuntivo. Paralelamente à maturação do tecido conjuntivo, observa-se aumento gradativo de osteoblastos e matriz óssea, seguido pela presença de osteoclastos responsáveis pela remodelação do tecido neoformado ⁴⁵⁻⁴⁷.

Como mencionado anteriormente, DMT1 é o resultado de uma destruição de células β -pancreáticas, por mecanismo autoimune, que leva à ausência de secreção de insulina. Devido a isso, a única terapia para o tratamento de DMT1 é a administração de insulina exógena ao longo de toda a vida ⁴⁸. A fragilidade dos ossos é uma característica do DMT1 e DMT2, mas os mecanismos que resultam nesse desenvolvimento aparentemente se diferenciam um do outro ^{25,49}. Caracterizado pela diminuição no crescimento ósseo linear durante a puberdade, diminuição da densidade mineral óssea (DMO) durante a idade adulta, a DMT1 ainda pode vir a resultar no aumento da osteoporose e de fraturas, bem como o atraso da reparação óssea ⁵⁰.

Observou-se que os osteoblastos no DMT1 no conjunto são submetidos a transdiferenciação, desdiferenciação e morte celular por defeitos na função da célula estromal da medula óssea.^{25,50} No entanto, uma explicação plausível para a função de osteoblasto reduzida é evidenciada por níveis elevados de Dickkopf-1 em T1DM, um inibidor conhecido da via de sinalização Wnt/ β -catenina. ⁵¹ A via de sinalização de Wnt/ β -catenina regula a diferenciação e a função dos osteoblastos, visto que sua regulação decrescida em modelos de ratos, foi correlacionada com a redução da densidade mineral óssea e aumento da frequência de apoptose de osteócitos ⁵¹.

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 ^{52,53}, além de redução no turnover ósseo ^{54,55}.

Em contraste, os osteoclastos nos modelos de ratos diabéticos tipo 1 demonstraram hipersensibilidade aos efeitos do RANKL, um dos dois principais mediadores da diferenciação dos osteoclastos, sendo o segundo o fator estimulante das colônias de macrófagos. Consequentemente, isso provoca uma reabsorção óssea extensiva devido a expressão positiva da catepsina K, da metaloproteinase-9 da matriz (MMP-9) e dos mediadores solúveis para osteoclastos ⁵⁶. O processo de reabsorção óssea é iniciado pela ligação da

proteína integrina osteoclástica alfa-V-beta 3 (aVb3) à superfície óssea, proteína altamente específica para a superfície dos osteoclastos e fundamental para a sua atividade de reabsorção óssea.⁵⁷

No intuito de acelerar o processo de reparo, algumas opções terapêuticas coadjuvantes têm sido sugeridas, destacando-se entre elas a laserterapia de baixa potência (LTBP), que foi desenvolvida como um tratamento promissor para a aceleração do metabolismo ósseo⁵⁸, sendo proposta para melhorar o processo de reparação óssea⁵⁹. Envolve a aplicação de uma radiação eletromagnética não ionizante, altamente concentrada e não invasiva, que é monocromática, coerente e direcional^{60,61}. O método de fototerapia usando raio laser de baixa potência suporta efetivamente o tratamento convencional e traz uma melhoria significativa na qualidade de vida em pacientes portadores da diabetes⁶².

O princípio de ação da LTBP é na sua eficácia ao nível celular, melhorando processos bioquímicos e moleculares, envolvidos na reparação de tecidos. Os processos estimulados pela LTBP incluem a proliferação celular^{63,64}, a síntese de proteínas e colágenos⁶⁵, reparação de feridas^{66,67}, diferenciação de osteoblastos e condrócitos⁶⁸, regeneração celular⁶⁹, remodelação óssea, reparo da função nervosa após lesão, equilíbrio da função hormonal, regulação da imunidade e do sistema linfático, redução da inflamação e do edema e alívio da dor⁷⁰. Além disso, o LTBP aumenta o fluxo sanguíneo, reforça o processo de revitalização, diminui o risco de infecção, reforça as atividades metabólicas e melhora a reparação dos tecidos lesados^{71,72}.

Estudos demonstraram que LTBP é capaz de modular o metabolismo celular e estimular a respiração mitocondrial, particularmente na produção de oxigênio molecular e síntese de ATP⁷³⁻⁷⁵. Esses efeitos produzem aumento na síntese de proteína reguladora do DNA, RNA e ciclo celular, que estimulam a proliferação celular^{74,76}.

A LTBP no osso pode aumentar a proliferação celular, devido a sua capacidade de estimulação tecidual, e ainda, acelerar a consolidação de

fraturas ⁷⁷. Além disso, alguns estudos mostram o efeito positivo da LTBP na massa óssea de ratos com osteoporose e diabetes ^{73,77} e potencial osteogênico ^{73,75,77}. Está bem estabelecido que, a LTBP é capaz de interagir o com tecido ósseo, modulando as reações bioquímicas das células ósseas e estimulando a respiração mitocondrial. As modificações no metabolismo celular levam a uma maior produção de oxigênio molecular e síntese de ATP ⁷⁸. Além disso, evidências sugerem que LTBP aumenta a migração e diferenciação de células ósseas para o local da irradiação, culminando no aumento da produção de colágeno e mineralização da matriz extracelular ^{74,76,79}.

O potencial osteogênico do LTBP foi demonstrado por muitos estudos ^{73,75,77}. No entanto, a existência de uma janela de especificações em certos comprimentos de onda e dosagens de energia também é bem conhecida ^{73,75,77}. Isso significa que uma energia adequada precisa ser oferecida ao tecido para determinar modificações fisiológicas e consequentemente, efeitos estimulantes para o tecido ⁸⁰.

A literatura atual é principalmente focada em modelos não-cirúrgicos ou características biomecânicas do osso diabético e, em menor grau, reparo da fratura óssea na presença de diabetes mellitus. Considerando que reparo de fraturas e outras lesões ósseas possuem mecanismos diferentes, que compartilham características básicas, observa-se poucas pesquisas experimentais investigando a influência do LTBP na reparação de defeitos ósseos em modelos com DM ¹¹.

2. Proposição

O presente estudo hipotetizou que a laserterapia de baixa potência acelera e melhora a qualidade do tecido ósseo neoformado em lesões ósseas de ratos diabéticos. Portanto, o objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da laserterapia de baixa potência (LTBP) no reparo ósseo de ratos diabéticos e normoglicêmicos.

3. Material e Métodos

3.1 Procedimento experimental

Neste estudo foram utilizados dez ratos Wistar machos, pesando 220 a 240 g (cerca de 8 semanas de idade) mantidos em gaiolas com um ciclo claro-escuro de 12 horas e condições de temperatura controladas ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com alimentos padrão e água *ad-libitum*. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ciências e Ética da Universidade Federal de Uberlândia, Brasil, e foi realizada de acordo com as disposições da Lei nº 11.794, Decreto nº 6.899 e Legislação complementar do Conselho Nacional Brasileiro de Controle de Animal Orientações sobre Experimentação (CONCEA).

Em cinco animais foi realizada indução de DMT1 e os outros cinco animais permaneceram saudáveis. Após 4 semanas, foram criados defeitos ósseos nos fêmures direito e esquerdo de todos os animais. Imediatamente após a cirurgia e a cada 48h os fêmures esquerdos foram submetidos a laserterapia de baixa potência. Sete dias após a cirurgia, os animais foram sacrificados, os fêmures foram removidos e divididos em 4 grupos ($n = 5$), como segue: Saudável (fêmur direito dos animais saudáveis); Saudável + Laser (fêmur esquerdo dos animais saudáveis submetidos à laserterapia); Diabético (fêmur direito dos animais diabéticos); Diabético + Laser (fêmur esquerdo dos animais diabéticos submetidos à laserterapia). Os fêmures foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato, durante 48h. Em seguida, foi realizado micro tomografia computadorizada (MicroCT) e análise histológica.

3.2 Indução de Diabetes Mellitus Tipo 1

O protocolo de indução DMT1 começou por manter os ratos em jejum durante 24 horas. A anestesia foi realizada através da via intraperitoneal utilizando 7mg/Kg de xilazina 2% de relaxante muscular e 100mg/Kg de cloridrato de cetamina 10% anestésico e analgésico. Em seguida, uma única dose de estreptozotocina (STZ) foi administrada por via intravenosa através de

uma punção da veia peniana a uma dose de 60 mg/Kg de peso corporal, diluída em tampão citrato 0,01M. A hiperglicemia foi aferida por um glicôsimetro (Accu Check Active, Roche, Jaguaré, SP, Brasil) após 24 horas; uma semana; 15 dias, 30 dias e 37 dias após a indução, coletando uma gota de sangue da cauda de cada animal. Os animais que mantiveram níveis de glicose no sangue superiores a 250 mg/dL foram considerados diabéticos. Os animais que não atingiram o nível glicêmico seriam excluídos do estudo, neste estudo nenhum animal foi excluído por reversão. Foi realizada a administração de 1UI de insulina a cada 48h (dias alternados) para evitar altas taxas de mortalidade por hiperglicemia.

3.3 Procedimento cirúrgico e laserterapia

Trinta dias após a indução do diabetes, foram criados defeitos ósseos em ambos os fêmures de todos os animais. Após anestesia, como descrito para a indução do DMT1, foi iniciado o procedimento cirúrgico ⁸¹. Com o animal posicionado em decúbito lateral, o fêmur foi exposto por meio de uma incisão longitudinal de 2cm. O defeito ósseo padronizado de 2,3mm foi criado usando broca esférica nº8, e a profundidade de perfuração foi limitada à ruptura da cortical (aproximadamente 2mm). Posteriormente, as camadas musculares e cutâneas foram suturadas com nylon 4-0 (Figura 1).

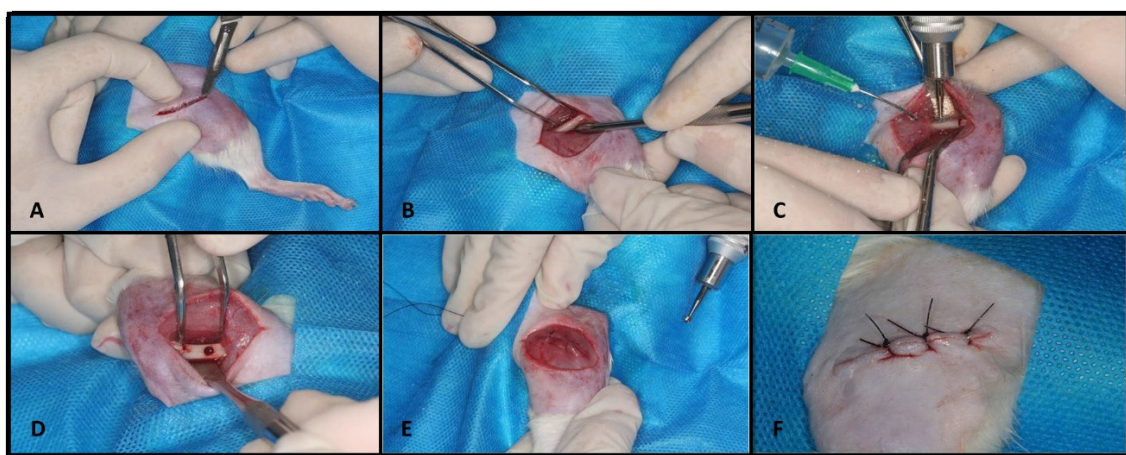


Figura 1. Cirurgia para criação de defeito ósseo padronizado em fêmur de rato. A – Incisão contínua na região lateral do fêmur. B – Divulsão da musculatura até a exposição do periósteo. C – Rompimento da cortical óssea sob irrigação constante. D – Defeito ósseo criado. E – Sutura da musculatura. F –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

Os animais dos grupos Saudável + Laser e Diabéticos + Laser foram submetidos à laserterapia de baixa potência na perna esquerda ⁸² usando um laser de infravermelho (Thera-laser III - DMC Equipamentos/São Carlos - SP - Brasil), $\lambda 808\text{nm}$, 64mW , onda contínua, diâmetro de feixe de $0,028\text{cm}^2$. A aplicação foi em quatro pontos equidistantes (1cm), em volta da região central da sutura (provável centro da lesão). Cada ponto recebeu uma dose de 4J/cm^2 (1min), totalizando 16J/cm^2 por sessão (4min), sendo a ponta do laser posicionada perpendicular ao longo eixo do osso (Figura 2).

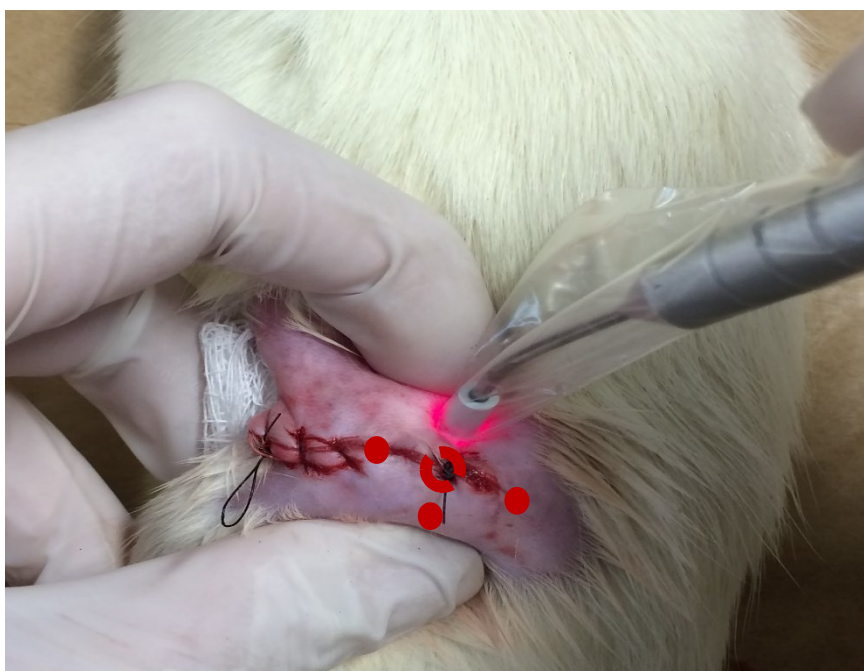


Figura 2. Aplicação do laser de baixa potência no fêmur esquerdo.

A primeira sessão foi realizada imediatamente após a finalização do procedimento cirúrgico. No pós-operatório, o laser foi aplicado transcutaneamente a intervalos de 48 h durante sete dias, resultando em quatro sessões. Após 7 dias da cirurgia, os animais foram submetidos a eutanásia por injeção intraperitoneal com tiopental e lidocaína de sódio, seguida de luxação cervical, em conformidade com os princípios da Declaração Universal sobre Bem-estar dos Animais.

3.4 Obtenção dos espécimes

Após a eutanásia, os fêmures foram desarticulados; as epífises foram removidas com disco diamantado dupla face e os espécimes foram imediatamente fixados em solução de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato, durante 48h.



Figura 3. Fêmur após a desarticulação e remoção das epífises.

3.5 Análise por meio de Microtomografia Computadorizada

A região da lesão no fêmur foi escaneada usando micro tomografia computadorizada (μ CT-SkyScan 1272, Bruker, Kontich, Bélgica), com um tamanho de voxel isotrópico nominal de $8\mu\text{m}$ (fonte de raios-X de 90 kVp, 111 μA). A reconstrução foi feita em 3D pelo software nRecon (versão 1.6.10.1, SkyScan, Bruker, Bélgica), smoothing 1 e ring artifact correction 2. Depois disso, foram analisados no software CTAn (versão 1.14.4.1, SkyScan, Bruker, Bélgica), utilizando um threshold (superior 255 e inferior 65) (Figura 3). Os parâmetros utilizados para analisar a área de reparo ósseo foram: BV/TV (Fração do volume ósseo [%] - Razão do volume ósseo segmentado para o volume total da região de interesse); BS/BV (Superfície óssea específica [mm^2/mm^3] - Razão da superfície óssea segmentada para o volume ósseo segmentado); Tb.Th (Espessura Trabecular [mm] - Espessura média das trabéculas, avaliada usando métodos 3D diretos); Tb.N (Número de Trabéculas [$1/\text{mm}$] - Medida do número médio de trabéculas por unidade de comprimento); Tb.Sp (Separação Trabecular [mm] - Distância média entre as trabéculas, avaliada usando métodos 3D diretos); Conn.Dn (Densidade de conectividade

[1/mm³] - Medida do grau de conectividade das trabéculas normalizadas pelo volume total da região de interesse).

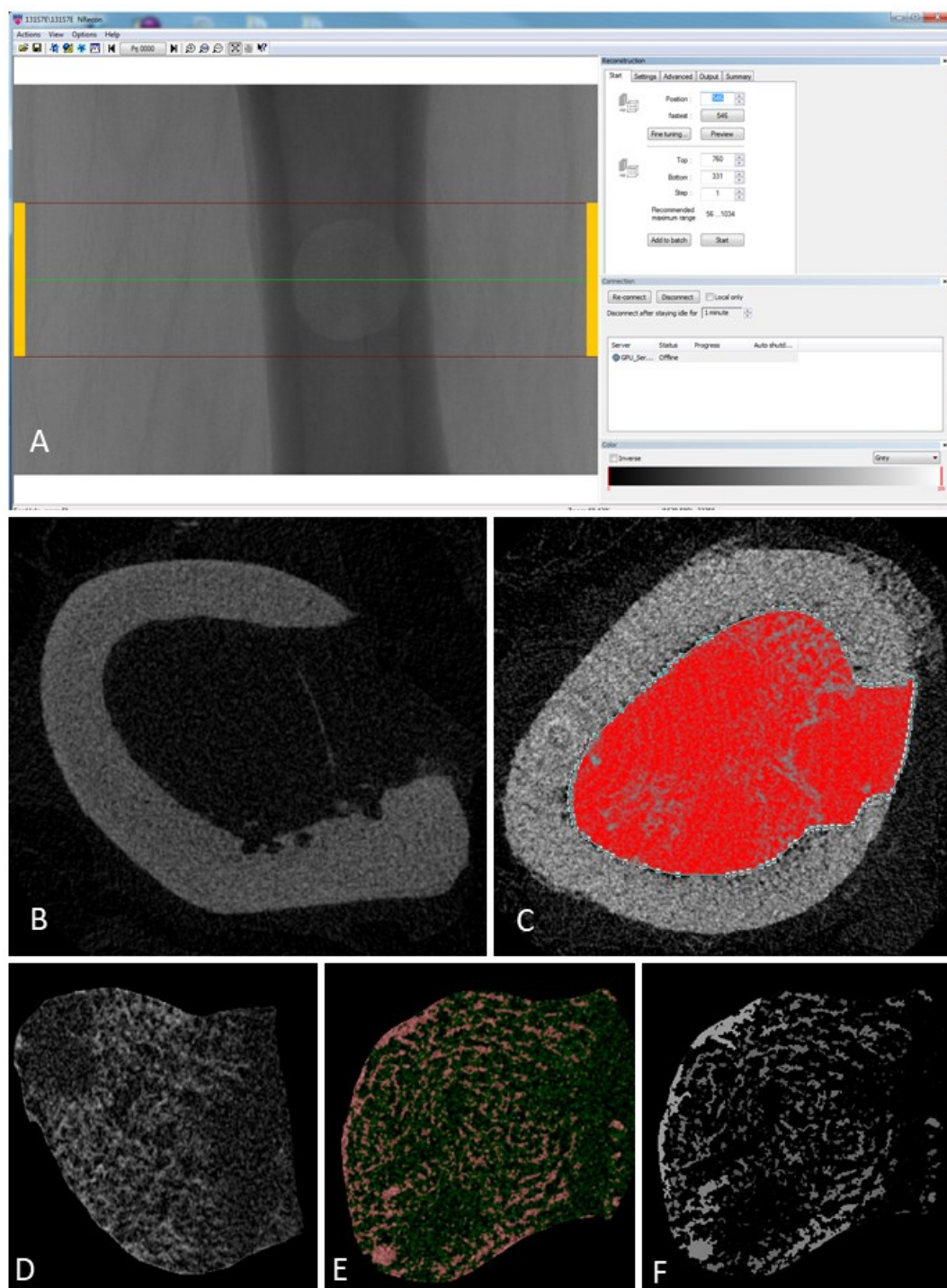


Figura 4. Etapas executadas para análise por micro tomografia computadorizada. A – Pós-escaneamento, software NRecon que foi utilizado para delimitação da área e dos ajustes para a reconstrução em 3D. B - Corte

transaxial evidenciando cortical óssea e área da lesão. C - Delimitação da região de interesse (ROI) contendo área da lesão e espaço medular. D - ROI (RAW Image). E - Binarização – Threshold: Upper 255 e Lower 65. F - Imagem binária final para a análise dos parâmetros de morfometria.

3.6 Análises histológicas

Após as análises por meio de micro-CT, as diáfises dos fêmures foram descalcificadas em EDTA 4%, por 5 semanas e processados para inclusão em parafina. A partir de cada espécime foram obtidas 4 cortes histológicos semi-seriados (5µm) que foram corados em Hematoxilina-Eosina (HE). As imagens histológicas dos defeitos ósseos foram digitalizadas, utilizando um scanner digital ScanScope AT Turbo® (Leica Biosystems Nussloch, Shinjuku-ku, Nußloch / Alemanha).

Na análise histológica qualitativa, a área da lesão óssea foi avaliada considerando o tipo de tecido ósseo neoformado, a morfologia das células ósseas, a presença de coágulo e a espessura das trabéculas ósseas, em uma análise comparativa.

3.7 Análise estatística

A análise foi realizada utilizando o software estatístico Sigma Plot 13.1® (Systat Software Inc, San Jose, CA, EUA). Os resultados obtidos em análises de Micro-CT foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e Anova Two Way Repeat Measure seguido do teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $\alpha < 0,05$.

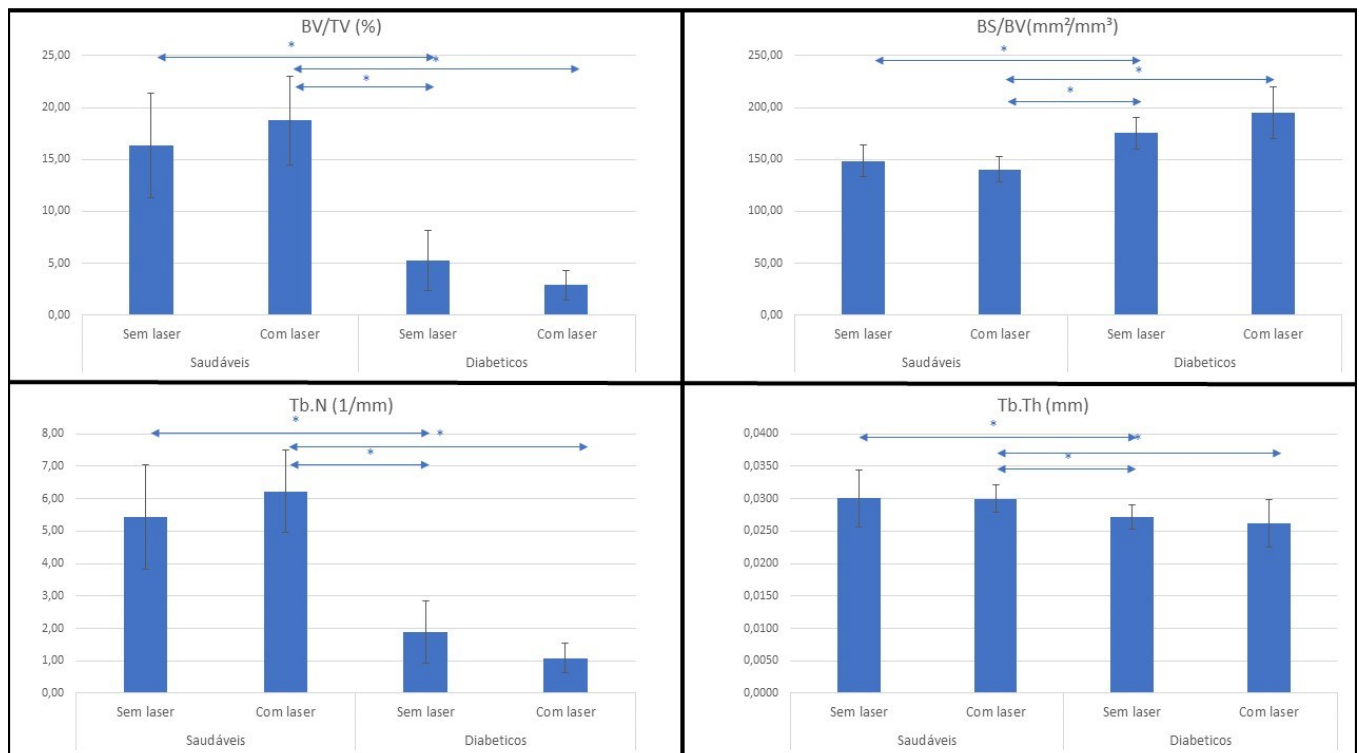
4. Resultados

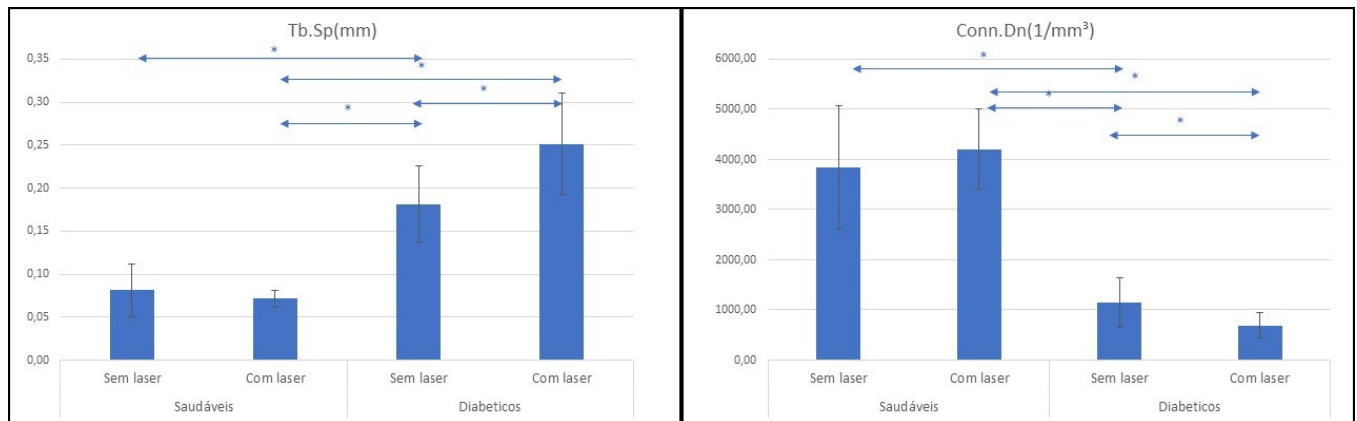
Ao longo do procedimento experimental, os animais diabéticos mantiveram hiperglicemia (glicemia média de 486,29 mg / dl), redução de peso, polifagia, polidipsia e poliúria, observados pelo aumento da ingestão de alimentos e água e excreção urinária.

4.1 Análises por meio de Micro-CT

Nas análises por meio de Micro-CT, os grupos diabéticos apresentaram valores menores de BV/TV, Tb.Th, Tb.N, Tb.Sp e Conn.Dn que os animais saudáveis ($p < 0,05$). No entanto, houve aumento dos valores de BS/BV nos grupos diabéticos em comparação com grupos saudáveis ($p < 0,05$). O grupo Diabético + Laser mostrou aumento Tb.Sp e redução de Conn.Dn em comparação com o grupo Diabético ($p < 0,05$). (Gráficos 1).

Gráficos 1. Média e desvio padrão dos parâmetros analisados no micro-ct.





* Diferenças estatisticamente significantes

4.2 Análises histológicas

A análise histológica de todos os grupos mostrou tecido ósseo primário neoformado na área do defeito ósseo. O grupo saudável apresentou mais coágulo residual e tecido de granulação em comparação com o grupo Saudável + Laser. De forma geral, os grupos saudáveis apresentaram tecido ósseo neoformado com trabéculas mais espessas em relação aos grupos diabéticos. No grupo diabético, observou-se grandes áreas de coágulo e tecido de granulação, bem como poucas trabéculas em relação aos demais grupos. No grupo Saudável + Laser, houve menor extensão de coágulo e quantidade de tecido de granulação em comparação com Diabético. O reparo ósseo do Diabético + Laser foi aparentemente semelhante ao grupo Saudável. (Figura 4)

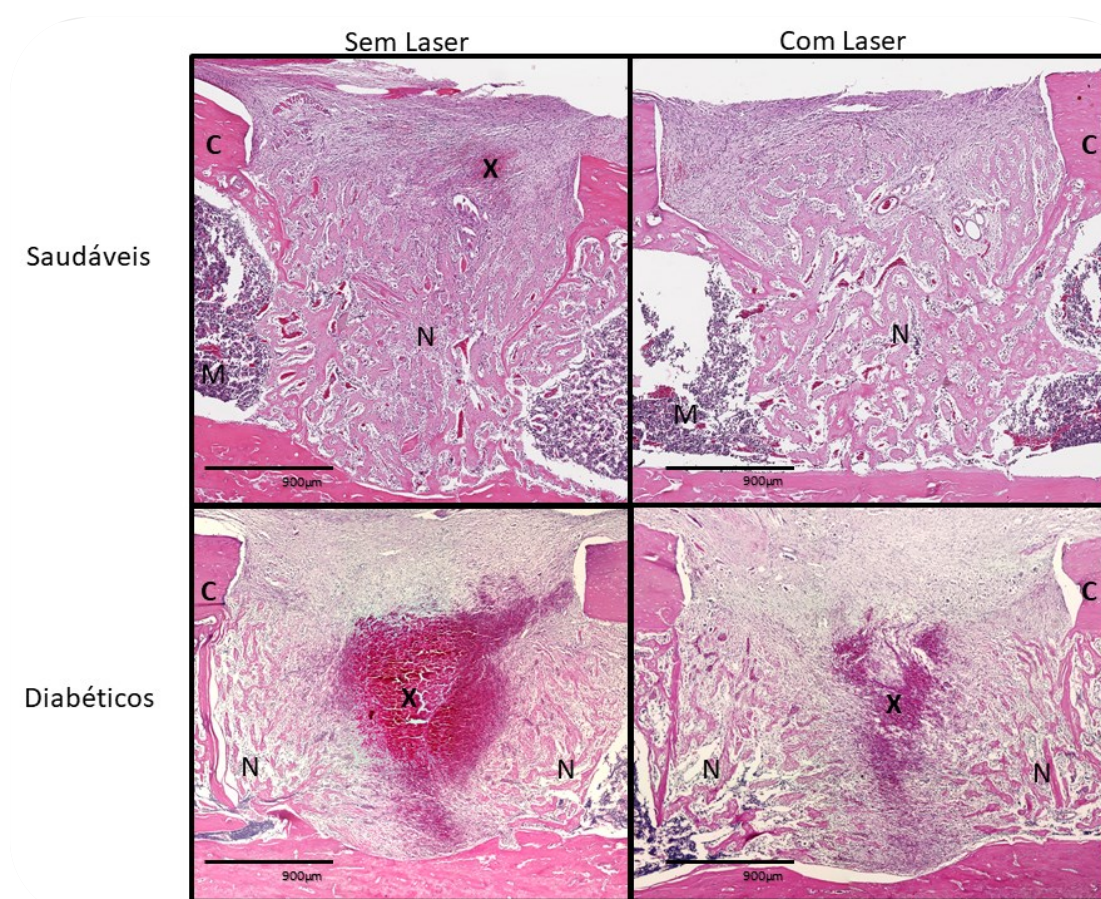


Figura 5. Imagens histológicas da área da lesão na diáfise do fêmur de rato (Hematoxilina-Eosina), mostrando: C - Osso cortical. M - Medula óssea. N – Osso neo-formado. X – Coágulo residual.

5. Discussão

O presente estudo avaliou o efeito da laserterapia de baixa potência (LTBP) no reparo ósseo, em ratos diabéticos. Pesquisas em diabetes têm utilizado amplamente roedores como modelo experimental. Esses animais apresentam vantagens de serem de pequeno porte, de fácil alojamento, se adaptarem bem a novos ambientes, além de terem alta taxa de reprodução e fácil manuseio. No presente estudo, além dos fatores mencionados, foram escolhidos ratos machos para evitar possíveis efeitos na reparação óssea, decorrentes de alterações hormonais presentes em fêmeas ¹¹.

A indução de diabetes em animais de laboratório, principalmente em ratos, pela STZ tornou-se uma ferramenta valiosa na pesquisa em diabetes, sendo usada por muitos pesquisadores ^{11,78,83,84}. Apesar do elevado número de publicações que utilizaram o modelo de diabetes induzido por STZ, ainda faltam protocolos padronizados, havendo grande variabilidade na dose, via de administração, tamanho da amostra, além de escassas informações sobre morbidade e mortalidade dos animais e taxas de sucesso da droga ⁸⁵.

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 ^{11,85}. Em relação à injeção IV, estudos geralmente administram STZ na veia peniana ^{78,85,86} ou na veia da cauda ^{55,87,88}. No nosso estudo, a STZ administrada via IV (60 mg/kg) através da veia peniana forneceu um modelo diabético eficaz, com um elevado nível de hiperglicemia em todos os animais e taxa de reversão insignificante.

Neste estudo, a administração de 1 UI insulina diariamente procurou evitar elevadas taxas de mortalidade por hiperglicemia, sendo essa insuficiente para tratar o diabetes. Ao longo do procedimento experimental, os animais dos grupos diabéticos mantiveram hiperglicemia (glicemia média de 486,29 mg/dl), sendo similar a outros estudos ^{11,78,89}. Clinicamente os animais apresentaram

poliúria, visualmente observado pela grande quantidade de urina na maravalha das gaiolas, as quais tinham que ser trocadas diariamente, enquanto as gaiolas dos animais saudáveis eram trocadas duas vezes por semana.

No modelo de diabetes experimental utilizado neste estudo, os defeitos ósseos foram criados depois de trinta dias da indução do diabetes, a fim de avaliar o reparo em osso comprometido pelo DMT1. O mesmo modelo foi realizado em outros estudos, resultando em significativas alterações ósseas, tais como: diminuição do volume (osteopenia), diminuição do número de células osteoprogenitoras na medula e redução na formação do osso ^{90,91}. O defeito ósseo de 2,3 mm de diâmetro, utilizado em nosso estudo, foi suficiente para observar alterações significativas na neoformação óssea em diabéticos, uma vez que foi observado menor quantidade de osso neoformado no grupo dos diabéticos.

No presente estudo, a análise histológica mostrou trabéculas mais finas e menor quantidade de neoformação óssea nos animais diabéticos, além de maior quantidade de coágulo e de tecido de granulação. O T1DM reduz a formação do osso, acarretando em menor massa óssea e alterações no reparo ^{90,92}. 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 a animais sadios e animais diabéticos compensados ⁷⁸.

Há evidência de que os pacientes com DMT1 apresentam menor mineralização óssea ^{15,16}, ossos menores e mais finos ¹⁷⁻²⁰ com redução da força ¹⁷⁻¹⁹ e qualidade ósseas ^{17,18,22}. Indivíduos com T1DM apresentaram diminuição da densidade óssea mineral (DOM), no entanto, sabe-se que a fragilidade óssea não resulta apenas da redução da matriz, mas também de alterações microestruturais e dos componentes intrínsecos do osso, como colágeno e suas ligações ⁹³.

Na análise com Micro-CT, os parâmetros BV/TV (% volume ósseo neoformado/ volume ósseo total), Tb.Th (Espessura média das trabéculas),

Tb.N (Número de Trabéculas) e Conn.Dn (Densidade de conectividade) foram menores nos grupos Diabético e Diabético + Laser. Assim, na área de reparo ósseo, os diabéticos apresentaram menor: volume ósseo, espessura trabecular, número de trabéculas e grau de conectividade entre as trabéculas, o que está de acordo com a análise histológica. O DMT1 atrasa o processo de regeneração óssea ⁹⁴, o que tem sido atribuído à disfunção de leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e fibroblastos, fase inflamatória mais longa, diminuição de colágeno e biossíntese de glicosaminoglicanos ⁹⁵. Também, estudos demonstraram que o diabetes diminui a proliferação e diferenciação de células osteoblásticas e condrocíticas, levando à formação de calos menores, em fraturas, com diminuição da formação de cartilagem e osso ^{26,96}.

Os parâmetros Tb.Sp (Separação Trabecular) e BS/BV (Superfície óssea/ volume ósseo neoformado) mostraram valores maiores no grupo diabético. A análise histológica também mostrou trabéculas ósseas mais delgadas e separadas entre si.

A ausência de significância estatística em relação ao volume ósseo considerando a laserterapia (Saudável vs saudável + Laser e Diabético vs Diabético + Laser) foi um achado interessante, uma vez que era esperado maior quantidade de osso neoformado depois do uso do laser. Diferenças significantes foram encontradas nos outros parâmetros da análise microtomográfica (Tb.Sp e Conn.Dn nos diabéticos), mostrando influencia desta terapia na organização arquitetural do osso formado, e não na sua quantidade. Ainda, o comportamento distinto entre os grupos em relação à laserterapia foi evidenciado nesta análise, considerando que após o uso do laser, os animais diabéticos apresentaram-se com maior separação trabecular e menor conectividade⁹⁷. No entanto, deve-se considerar que a microtomografia, mesmo sendo uma técnica de alta resolução, ainda apresenta limitações, por exemplo a escolha de um limiar global de definição do que é ou não tecido ósseo e da delimitação manual da área a ser avaliada ⁹⁸. Na avaliação do osso neoformado, que apresenta densidade menor e variável quando comparado ao osso cortical, essas limitações de técnica podem sub ou superestimar o tecido avaliado ⁹⁹.

No intuito de acelerar o processo de reparo, algumas opções terapêuticas coadjuvantes têm sido sugeridas, destacando-se entre elas a laserterapia de baixa potência (LTBP). O protocolo seguido neste estudo ⁸², que mostraram aumento do reparo tecidual em todos os grupos que receberam a laserterapia. Os animais foram submetidos à irradiação logo após o procedimento cirúrgico, sendo aplicado posteriormente, com intervalos de 48 horas, durante o período de 7 dias.

Em nosso estudo observou-se, pela análise histológica qualitativa, que a LTBP proporcionou redução significativa na intensidade da resposta inflamatória em animais diabéticos e não diabéticos. Apoiando nossos achados, os efeitos moduladores semelhantes da irradiação laser na inflamação durante o curso do tempo de reparação óssea em defeitos de ratos diabéticos foram relatados recentemente ^{100,101}. Essa regulação negativa da inflamação provavelmente está relacionada ao efeito inibitório da energia do laser nos mediadores químicos proinflamatórios de liberação, como TNF- α , IL-1 β e IL-6 ¹⁰². Mais recentemente, a observação histológica do aumento da vascularização e da diminuição da inflamação, além do aumento das trabéculas ósseas, também foi relatada como resultado da irradiação a laser de baixo nível após osteotomia parcial do osso tibial em modelo murinho ^{103,104}. Na análise histológica qualitativa, o grupo diabético com laser mostrou menor quantidade de coágulo e tecido de granulação que o grupo diabético, apresentando aspecto histológico semelhante ao grupo saudável. Um estudo ⁷⁸ também encontrou, em sua análise morfométrica, menor concentração de osso neoformado na região de reparo ósseo e redução significativa também na cortical óssea, o que reafirma os resultados encontrados neste trabalho. O mecanismo preciso relativo à atividade moduladora induzida por LTBP na reparação óssea ainda está sob investigação. Acredita-se que, no tecido submetido a baixas doses de radiação, os cromóforos intracelulares, como porfirinas e citocromos, são capazes de absorver a energia da luz e convertê-la em energia metabólica, resultando na produção de um gradiente de prótons eletroquímico transmembranoso na cadeia respiratória. Assim, a LTBP é capaz de melhorar a formação óssea por estimulação direta do metabolismo

osteoblástico, com consequente aumento da síntese proteica (particularmente colágeno) e dos níveis celulares de adenosina trifosfato ¹⁰⁵.

O presente estudo contribuiu para o entendimento dos efeitos da laserterapia no reparo ósseo de ratos diabéticos, porém mais estudos são necessários para esclarecer os mecanismos de ação da laserterapia no processo de reparo tecidual.

6. Conclusão

Os resultados mostraram que o diabetes diminuiu o processo de reparo ósseo e a laserterapia de baixa potência foi um tratamento importante para minimizar o processo inflamatório em todos os grupos. E, apesar de não alterar o volume ósseo a LTBP interferiu na morfologia estrutural do tecido ósseo neoformado nos grupos saudável e diabético

7. Referências

1. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes - 2017. *Diabetes Care*. 2017;40(Supplement 1):S33–43.
2. Park JJ, Kang KL. Effect of 980-nm GaAlAs diode laser irradiation on healing of extraction sockets in streptozotocin-induced diabetic rats: A pilot study. *Lasers Med Sci*. 2012;27(1):223–30.
3. Bluestone JA, Herold K, Eisenbarth G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. Vol. 464, *Nature*. 2010. p. 1293–300.
4. Kelly MA, Rayner ML, Mijovic CH, Barnett AH. Molecular aspects of type 1 diabetes. *Mol Pathol*. 2003;56(1):1–10.
5. Xie Z, Chang C, Zhou Z. Molecular Mechanisms in Autoimmune Type 1 Diabetes: a Critical Review. *Clin Rev Allergy Immunol* [Internet]. 2014;47(2):174–92. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12016-014-8422-2>
6. King S, Klineberg I, Levinger I, Brennan-Speranza TC. The effect of hyperglycaemia on osseointegration: a review of animal models of diabetes mellitus and titanium implant placement. Vol. 11, *Archives of Osteoporosis*. 2016.
7. Nolan CJ, Damm P, Prentki M. Type 2 diabetes across generations: From pathophysiology to prevention and management. In: *The Lancet*. 2011. p. 169–81.
8. Prentki M, Nolan CJ. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* [Internet]. 2006;116(7):1802–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16823478>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1483155>
9. DeFronzo RA. From the triumvirate to the ominous octet: A new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. In: *Diabetes*. 2009. p. 773–95.
10. Ahmed N. Advanced glycation endproducts - Role in pathology of diabetic complications. Vol. 67, *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2005. p. 3–21.
11. Yildirimturk S, Sirin Y, Soluk Tekkesin M, Gurler G, Firat D. The effects of low-level laser therapy on the healing of bone defects in streptozotocin-induced diabetic rats: A

- histological and morphometric evaluation. *J Cosmet Laser Ther.* 2017;19(7):397–403.
12. Gomes MF, da Graças Vilela Goulart M, Giannasi LC, Hiraoka CM, de Fátima Santana Melo G, de Sousa AGV, et al. Effects of the GaAlAs diode laser (780 nm) on the periodontal tissues during orthodontic tooth movement in diabetes rats: histomorphological and immunohistochemical analysis. *Lasers Med Sci.* 2017;32(7):1479–87.
 13. Rubin MR. Skeletal fragility in diabetes. Vol. 1402, *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2017. p. 18–30.
 14. Kalaitzoglou E, Popescu I, Bunn RC, Fowlkes JL, Thraillkill KM. Effects of Type 1 Diabetes on Osteoblasts, Osteocytes, and Osteoclasts. Vol. 14, *Current Osteoporosis Reports.* 2016. p. 310–9.
 15. Eller-Vainicher C, Zhukouskaya V V., Tolkachev Y V., Koritko SS, Cairolì E, Grossi E, et al. Low bone mineral density and its predictors in type 1 diabetic patients evaluated by the classic statistics and artificial neural network analysis. *Diabetes Care.* 2011;34(10):2186–91.
 16. 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.
 17. Silva MJ, Brodt MD, Lynch MA, McKenzie JA, Tanouye KM, Nyman JS, et al. Type 1 diabetes in young rats leads to progressive trabecular bone loss, cessation of cortical bone growth, and diminished whole bone strength and fatigue life. *J Bone Miner Res* [Internet]. 2009;24(9):1618–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19338453>
 18. Nyman JS, Even JL, Jo CH, Herbert EG, Murry MR, Cockrell GE, et al. Increasing duration of type 1 diabetes perturbs the strength-structure relationship and increases brittleness of bone. *Bone.* 2011;48(4):733–40.
 19. Erdal N, Gürgül S, Demirel C, Yildiz A. The effect of insulin therapy on biomechanical deterioration of bone in streptozotocin (STZ)-induced type 1 diabetes mellitus in rats. *Diabetes Res Clin Pract.* 2012;97(3):461–7.
 20. Roggen I, Gies I, Vanbesien J, Louis O, De Schepper J. Trabecular bone mineral density and bone geometry of the distal radius at completion of pubertal growth in childhood

- type 1 diabetes. *Horm Res Paediatr*. 2013;79(2):68–74.
21. Saha MT, Sievänen H, Salo MK, Tulokas S, Saha HH. Bone mass and structure in adolescents with type 1 diabetes compared to healthy peers. *Osteoporos Int*. 2009;20(8):1401–6.
 22. Armas LAG, Akhter MP, Drincic A, Recker RR. Trabecular bone histomorphometry in humans with Type 1 Diabetes Mellitus. *Bone*. 2012;50(1):91–6.
 23. Zhukouskaya V V., Eller-Vainicher C, Vadzianava V V., Shepelkevich AP, Zhurava I V., Korolenko GG, et al. Prevalence of morphometric vertebral fractures in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2013;36(6):1635–40.
 24. Guariguata L. Estimating the worldwide burden of type 1 diabetes. *DiabetesVoice*. 2011;56(2):6–8.
 25. Zhukouskaya V V., Eller-Vainicher C, Shepelkevich AP, Dydysko Y, Cairoli E, Chiodini I. Bone health in type 1 diabetes: Focus on evaluation and treatment in clinical practice. Vol. 38, *Journal of Endocrinological Investigation*. 2015. p. 941–50.
 26. Retzepi M, Donos N. The effect of diabetes mellitus on osseous healing. Vol. 21, *Clinical Oral Implants Research*. 2010. p. 673–81.
 27. Khazai NB, Beck GR, Umpierrez GE. Diabetes and fractures: An overshadowed association. Vol. 16, *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*. 2009. p. 435–45.
 28. Florencio-Silva R, Sasso GRDS, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. Vol. 2015, *BioMed Research International*. 2015.
 29. Karsenty G, Kronenberg HM, Settembre C. Genetic Control of Bone Formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* [Internet]. 2009;25(1):629–48. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.cellbio.042308.113308>
 30. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res*. 2011;26(2):229–38.
 31. Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF. The osteocyte: An endocrine cell . . . and more. Vol. 34, *Endocrine Reviews*. 2013. p. 658–90.

32. Crockett JC, Mellis DJ, Scott DI, Helfrich MH. New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: Focus on the RANK/RANKL axis. Vol. 22, *Osteoporosis International*. 2011. p. 1–20.
33. Phan TCA, Xu J, Zheng MH. Interaction between osteoblast and osteoclast: Impact in bone disease. Vol. 19, *Histology and Histopathology*. 2004. p. 1325–44.
34. Rosset P, Deschaseaux F, Layrolle P. Cell therapy for bone repair. Vol. 100, *Orthopaedics and Traumatology: Surgery and Research*. 2014.
35. Borrelli J, Pape C, Hak D, Hsu J, Lin S, Giannoudis P, et al. Physiological challenges of bone repair. Vol. 26, *Journal of Orthopaedic Trauma*. 2012. p. 708–11.
36. Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. Vol. 19, *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2008. p. 459–66.
37. Loi F, Córdova LA, Pajarinen J, Lin T hua, Yao Z, Goodman SB. Inflammation, fracture and bone repair. Vol. 86, *Bone*. 2016. p. 119–30.
38. Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: Mechanisms and interventions. Vol. 11, *Nature Reviews Rheumatology*. 2015. p. 45–54.
39. Könnecke I, Serra A, El Khassawna T, Schlundt C, Schell H, Hauser A, et al. T and B cells participate in bone repair by infiltrating the fracture callus in a two-wave fashion. *Bone*. 2014;64:155–65.
40. Cardaropoli G, Araujo M, Lindhe J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* [Internet]. 2003;30(9):809–18. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1034/j.1600-051X.2003.00366.x/asset/j.1600-051X.2003.00366.x.pdf?v=1&t=i3chmnfh&s=ad847aab8b7f5181119d01197034a74431075ef3>
41. Kanyama M, Kuboki T, Akiyama K, Nawachi K, Miyauchi FM, Yatani H, et al. Connective tissue growth factor expressed in rat alveolar bone regeneration sites after tooth extraction. *Arch Oral Biol*. 2003;48(10):723–30.
42. Lin Z, Rios HF, Volk SL, Sugai J V., Jin Q, Giannobile W V. Gene Expression Dynamics

- During Bone Healing and Osseointegration. *J Periodontol* [Internet]. 2011;82(7):1007–17. Available from: <http://www.joponline.org/doi/10.1902/jop.2010.100577>
43. Rodrigues MTV, Cardoso CL, Carvalho PSP de, Cestari TM, Feres M, Garlet GP, et al. Experimental alveolitis in rats: microbiological, acute phase response and histometric characterization of delayed alveolar healing. *J Appl Oral Sci* [Internet]. 2011;19(3):260–8. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-77572011000300015&lng=en&tling=en
 44. Vieira AE, Repeke CE, De Barros Ferreira S, Colavite PM, Biguetti CC, Oliveira RC, et al. Intramembranous bone healing process subsequent to tooth extraction in mice: Micro-computed tomography, histomorphometric and molecular characterization. *PLoS One*. 2015;10(5).
 45. Schipani E, Maes C, Carmeliet G, Semenza GL. Regulation of osteogenesis-angiogenesis coupling by HIFs and VEGF. Vol. 24, *Journal of Bone and Mineral Research*. 2009. p. 1347–53.
 46. Kanczler JM, Oreffo ROC. Osteogenesis and angiogenesis: The potential for engineering bone. Vol. 15, *European Cells and Materials*. 2008. p. 100–14.
 47. Carano RAD, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. Vol. 8, *Drug Discovery Today*. 2003. p. 980–9.
 48. Wong CY, Martinez J, Dass CR. Oral delivery of insulin for treatment of diabetes: status quo, challenges and opportunities. *J Pharm Pharmacol*. 2016;68(9):1093–108.
 49. Merlotti D, Gennari L, Dotta F, Lauro D, Nuti R. Mechanisms of impaired bone strength in type 1 and 2 diabetes. Vol. 20, *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2010. p. 683–90.
 50. Thrailkill KM. Is insulin an anabolic agent in bone? Dissecting the diabetic bone for clues. *AJP Endocrinol Metab* [Internet]. 2005;289(5):E735–45. Available from: <http://ajpendo.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpendo.00159.2005>
 51. Tsentidis C, Gourgiotis D, Kossiva L, Marmarinos A, Doulgeraki A, Karavanaki K. Increased levels of Dickkopf-1 are indicative of Wnt/ β -catenin downregulation and lower osteoblast signaling in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus, contributing to lower bone mineral density. *Osteoporos Int*. 2017;28(3):945–53.

52. 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* [Internet]. 1989;71(5):722–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2659600>
53. Beam HA, Russell Parsons J, 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.
54. 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.
55. Mishima N, Sahara N, Shirakawa M, Ozawa H. Effect of streptozotocin-induced diabetes mellitus on alveolar bone deposition in the rat. *J Anim Sci*. 2002;80(1):843–9.
56. Catalfamo DL, Calderon NL, Harden SW, Sorenson HL, Neiva KG, Wallet SM. Augmented LPS responsiveness in type 1 diabetes-derived osteoclasts. *J Cell Physiol*. 2013;228(2):349–61.
57. Del Fattore A, Teti A, Rucci N. Osteoclast receptors and signaling. Vol. 473, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2008. p. 147–60.
58. Garcia VG, Da Conceição JM, Fernandes LA, De Almeida JM, Nagata MJH, Bosco AF, et al. Effects of LLLT in combination with bisphosphonate on bone healing in critical size defects: A histological and histometric study in rat calvaria. *Lasers Med Sci*. 2013;28(2):407–14.
59. Kazem Shakouri S, Soleimanpour J, Salekzamani Y, Oskuie MR. Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process. *Lasers Med Sci*. 2010;25(1):73–7.
60. Schindl A, Schindl M, Pernerstorfer-Schön H, Schindl L. Low-intensity laser therapy: a review. *J Investig Med* [Internet]. 2000;48(5):312–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10979236>
61. Prindeze NJ, Moffatt LT, Shupp JW. Mechanisms of action for light therapy: a review of molecular interactions. *Exp Biol Med (Maywood)* [Internet]. 2012;237(11):1241–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23239434>
62. Góralczyk K, Szymańska J, Szot K, Fisz J, Rość D. Low-level laser irradiation effect on endothelial cells under conditions of hyperglycemia. *Lasers Med Sci*. 2016;31(5):825–

- 31.
63. Moore P, Ridgway TD, Higbee RG, Howard EW, Lucroy MD. Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. *Lasers Surg Med*. 2005;36(1):8–12.
64. Gao X, Xing D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *J Biomed Sci*. 2009;16(1).
65. Vinck EM, Cagnie BJ, Cornelissen MJ, Declercq HA, Cambier DC. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. *Lasers Med Sci*. 2003;18(2):95–9.
66. Posten W, Wrone D a, Dover JS, Arndt K a, Silapunt S, Alam M. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. *Dermatol Surg*. 2005;31(3):334–40.
67. Hawkins D, Houreld N, Abrahamse H. Low level laser therapy (LLLT) as an effective therapeutic modality for delayed wound healing. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005. p. 486–93.
68. Arisu HD, Türköz E, Bala O. Effects of Nd:Yag laser irradiation on osteoblast cell cultures. *Lasers Med Sci*. 2006;21(3):175–80.
69. Al-Watban F a H, Zhang XY. The comparison of effects between pulsed and CW lasers on wound healing. *J Clin Laser Med Surg* [Internet]. 2004;22(1):15–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15117482>
70. Agha-Hosseini F, Moslemi E, Mirzaii-Dizgah I. Comparative evaluation of low-level laser and CO2 laser in treatment of patients with oral lichen planus. *Int J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2012;41(10):1265–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0901502712002664>
71. Freddo AL, Rodrigo SM, Massotti FP, Etges A, De Oliveira MG. Effect of low-level laser therapy after implantation of poly-L-lactic/polyglycolic acid in the femurs of rats. *Lasers Med Sci*. 2009;24(5):721–8.
72. Mohammed IFR, Kaka LN, Kaka LN. Promotion of Regenerative Processes in Injured Peripheral Nerve Induced by Low-Level Laser Therapy. *Photomed Laser Surg* [Internet]. 2007;25(2):107–11. Available from:

<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/pho.2006.1090>

73. Bayat M, Abdi S, Javadieh F, Mohsenifar Z, Rashid MR. The effects of low-level laser therapy on bone in diabetic and nondiabetic rats. *Photomed Laser Surg* [Internet]. 2009;27(5):703–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19698018>
74. Karu T. Mitochondrial Mechanisms of Photobiomodulation in Context of New Data About Multiple Roles of ATP. *Photomed Laser Surg* [Internet]. 2010;28(2):159–60. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/pho.2010.2789>
75. Bossini PS, Rennó ACM, Ribeiro DA, Fangel R, Ribeiro AC, Lahoz M de A, et al. Low level laser therapy (830nm) improves bone repair in osteoporotic rats: Similar outcomes at two different dosages. *Exp Gerontol*. 2012;47(2):136–42.
76. Stein a, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg* [Internet]. 2005;23(2):161–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15910179>
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15910179
77. Renno ACM, de Moura FM, dos Santos NSA, Tirico RP, Bossini PS, Parizotto NA. Effects of 830-nm laser light on preventing bone loss after ovariectomy. *Photomed Laser Surg* [Internet]. 2006;24(5):642–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17069497>
78. Patrocínio-Silva TL, Souza AMF de, Goulart RL, Pegorari CF, Oliveira JR, Fernandes KR, et al. Low-level laser therapy associated to a resistance training protocol on bone tissue in diabetic rats. *Arch Endocrinol Metab* [Internet]. 2016;60(5):457–64. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2359-39972016000500457&lng=en&tIng=en
79. Ginani F, Soares DM, Barreto MP e V, Barboza CAG. Effect of low-level laser therapy on mesenchymal stem cell proliferation: a systematic review. *Lasers Med Sci* [Internet]. 2015;30(8):2189–94. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10103-015-1730-9>
80. Medalha CC, Amorim BO, Ferreira JM, Oliveira P, Pereira RMR, Tim C, et al. Comparison of the Effects of Electrical Field Stimulation and Low-Level Laser Therapy on Bone Loss

- in Spinal Cord-Injured Rats. *Photomed Laser Surg* [Internet]. 2010;28(5):669–74. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/pho.2009.2691>
81. Batista JD, Sargenti-Neto S, Dechichi P, Rocha FS, Pagnoncelli RM. Low-level laser therapy on bone repair: is there any effect outside the irradiated field? *Lasers Med Sci*. 2015;30(5):1569–74.
 82. Pinheiro ALB, Martinez Gerbi ME, De Assis Limeira F, Carneiro Ponzi EA, Marques AMC, Carvalho CM, et al. Bone repair following bone grafting hydroxyapatite guided bone regeneration and infra-red laser photobiomodulation: A histological study in a rodent model. *Lasers Med Sci*. 2009;24(2):234–40.
 83. Patrocínio-Silva TL, De Souza AMF, Goulart RL, Pegorari CF, Oliveira JR, Fernandes K, et al. The effects of low-level laser irradiation on bone tissue in diabetic rats. *Lasers Med Sci*. 2014;29(4):1357–64.
 84. Mansur SA, Mieczkowska A, Bouvard B, Flatt PR, Chappard D, Irwin N, et al. Stable Incretin Mimetics Counter Rapid Deterioration of Bone Quality in Type 1 Diabetes Mellitus. *J Cell Physiol*. 2015;230(12):3009–18.
 85. 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. Vol. 45, *Laboratory Animals*. 2011. p. 131–40.
 86. Da Costa AV, Calábria LK, Furtado FB, De Gouveia NM, Oliveira RJDS, De Oliveira VN, et al. Neuroprotective effects of *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk (Sapotaceae) extract on the brains of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Metab Brain Dis*. 2013;28(3):411–9.
 87. Tay YC, Wang Y, Kairaitis L, Rangan GK, Zhang C, Harris DCH. Can murine diabetic nephropathy be separated from superimposed acute renal failure? *Kidney Int*. 2005;68(1):391–8.
 88. Joffe II, 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.
 89. Zhang H, Gan L, Zhu X, Wang J, Han L, Cheng P, et al. Moderate-intensity 4 mT static

- magnetic fields prevent bone architectural deterioration and strength reduction by stimulating bone formation in streptozotocin-treated diabetic rats. *Bone*. 2018;107:36–44.
90. 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.
 91. Botolin S, Faugere M-C, 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.
 92. Mao L, Kawao N, Tamura Y, Okumoto K, Okada K, Yano M, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 is involved in impaired bone repair associated with diabetes in female mice. *PLoS One*. 2014;9(3).
 93. Napoli N, Chandran M, Pierroz DD, Abrahamsen B, Schwartz A V., Ferrari SL. Mechanisms of diabetes mellitus-induced bone fragility. Vol. 13, *Nature Reviews Endocrinology*. 2017. p. 208–19.
 94. Nicodemus KK, Folsom AR. Type 1 and Type 2 Diabetes and Incident Hip Fractures in Postmenopausal Women. *Diabetes Care* [Internet]. 2001;24(7):1192–7. Available from: http://care.diabetesjournals.org/content/24/7/1192.abstract?ijkey=f960e4b5e2fc787ab7e14d64e7346e0d099c8347&keytype=tf_ipsecsha
 95. Al-Watban FAH, Andres BL. Polychromatic LED in Oval Full-Thickness Wound Healing in Non-diabetic and Diabetic Rats. *Photomed Laser Surg* [Internet]. 2006;24(1):10–6. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/pho.2006.24.10>
 96. 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* [Internet]. 2007;22(4):560–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1359/jbmr.070115>
 97. Chappard D, Baslé MF, Legrand E, Audran M. Trabecular bone microarchitecture: A review. Vol. 92, *Morphologie*. 2008. p. 162–70.
 98. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. Vol.

- 25, *Journal of Bone and Mineral Research*. 2010. p. 1468–86.
99. Waarsing JH, Day JS, Weinans H. An improved segmentation method for in vivo μ CT imaging. *J Bone Miner Res*. 2004;19(10):1640–50.
 100. Nascimento MF do, Almeida BM de, Cunha JLS, Valois RBV, Pinheiro JC, Ribeiro MAG, et al. Improvement of bone repair in diabetic rats subjected to 780 nm low-level laser therapy. *Acta Cir Bras*. 2015;30(10):660–7.
 101. Magri AMP, Fernandes KR, Assis L, Mendes NA, da Silva Santos ALY, de Oliveira Dantas E, et al. Photobiomodulation and bone healing in diabetic rats: evaluation of bone response using a tibial defect experimental model. *Lasers Med Sci*. 2015;30(7):1949–57.
 102. Alves AC, Vieira R, Leal-Junior E, dos Santos S, Ligeiro AP, Albertini R, et al. Effect of low-level laser therapy on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2013;15(5):R116. Available from: <http://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar4296>
 103. Babuccu C, Keklikoğlu N, Baydoğan M, Kaynar A. Cumulative effect of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound on bone repair in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014;43(6):769–76.
 104. Sella VRG, do Bomfim FRC, Machado PCD, da Silva Morsoleto MJM, Chohfi M, Plapler H. Effect of low-level laser therapy on bone repair: a randomized controlled experimental study. *Lasers Med Sci*. 2015;30(3):1061–8.
 105. Son J, Kim YB, Ge Z, Choi SH, Kim G. Bone healing effects of diode laser (808 nm) on a rat tibial fracture model. *In Vivo (Brooklyn)*. 2012;26(4):703–10.

8. Anexos



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