

Camila Rodrigues Borges Linhares

**Melhoria da regeneração óssea em ratos diabéticos tipo I submetidos à
oxigenoterapia hiperbárica**

*Bone regeneration improvement in diabetes type I rats, submitted to
hyperbaric oxygen therapy*

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

Uberlândia, 2019

Camila Rodrigues Borges Linhares

**Melhoria da regeneração óssea em ratos diabéticos tipo I submetidos à
oxigenoterapia hiperbárica**

*Bone regeneration improvement in diabetes type I rats, submitted to
hyperbaric oxygen therapy*

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

Orientadora: Profa. Dra. Paula Dechichi

Banca Examinadora:
Prof. Dr. Gustavo Davi Rabelo
Dr. Pedro Henrique Justino Oliveira Limirio
Profa. Dra. Paula Dechichi

Uberlândia, 2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

L755 2019	<p>Linhares, Camila Rodrigues Borges, 1994- Melhoria da regeneração óssea em ratos diabéticos tipo I submetidos à oxigenoterapia hiperbárica [recurso eletrônico] / Camila Rodrigues Borges Linhares. - 2019.</p> <p>Orientadora: Paula Dechichi. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Odontologia. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2019.2502 Inclui bibliografia.</p> <p>1. Odontologia. I. Dechichi, Paula , 1965-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Odontologia. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 616.314</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

ATA DA DEFESA

07/01/2020

SEI/UFU - 1705740 - Ata de Defesa - Pós-Graduação



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Av. Pará, 1720, Bloco 4L, Anexo B, Sala 35 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34) 3225-8115/8108 - www.ppgoufu.com - copod@umuarama.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Odontologia				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico - PPGO				
Data:	Dezenove de dezembro de dois mil e dezenove	Hora de início:	14:20	Hora de encerramento:	16:55
Matrícula do Discente:	11812ODO005				
Nome do Discente:	Camila Rodrigues Borges Linhares				
Título do Trabalho:	Melhoria da regeneração óssea em ratos diabéticos tipo I submetidos à oxigenoterapia hiperbárica				
Área de concentração:	Clínica Odontológica Integrada				
Linha de pesquisa:	Processo de reparo				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Processo de reparo				

Reuniu-se no Anfiteatro/Sala 23 - Bloco 4L Anexo A, Campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Odontologia assim composta: Professores Doutores: Pedro Henrique Justino Oliveira Limirio (UFU); Gustavo Davi Rabelo (UFSC) e Paula Dechichi Barbar (UFU) orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Paula Dechichi Barbar, 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(as) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz 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. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Paula Dechichi Barbar, Professor(a) do Magistério Superior**, em 19/12/2019, às 16:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Pedro Henrique Justino Oliveira Limirio, Usuário Externo**, em 19/12/2019, às 16:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Davi Rabelo, Usuário Externo**, em 19/12/2019, às 16:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1705740** e o código CRC **337AA4CD**.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu marido,
à meus pais, à minha família
e aos meus amigos
que tanto amo, por todo amor,
carinho, paciência e apoio.

AGRADECIMENTOS

Como já diria o músico e compositor Tom Jobim “Fundamental é mesmo o amor, é impossível ser feliz sozinho”. Eu deixo aqui meus sinceros agradecimentos a todos que durante minha vida, e principalmente nesses dois anos contribuíram e tornaram possível que eu chegasse a esse momento.

Agradeço à minha mãe **Cristina Rodrigues**, a qual primeiramente me deu a vida, tornando possível a minha existência. E também por todo cuidado, carinho, esforço e sacrifícios que fez durante toda sua vida (os quais não foram poucos), para que eu pudesse me formar como pessoa, e estar aqui hoje. A ela, que é meu exemplo de força e perseverança, deixo aqui meu muito obrigada.

Agradeço ao meu marido **Igor Gonçalves**, que foi uma pessoa fundamental nesse processo, sendo meu melhor amigo, apoio, colo, ouvido, carinho, dando conselhos, tendo paciência, e sendo a única pessoa que me conhece e me aceita totalmente, com todos meus defeitos e qualidades, sempre me ajudando e incentivando a seguir em frente, sendo melhor e mais forte. Sem ele, a caminhada seria muito mais difícil, e por isso sou eternamente grata.

Agradeço a minha prima **Marina Rodrigues**, que é para mim como se fosse a irmã que eu nunca tive. Pela amizade, pelo companheirismo, por ser minha confidente, melhor amiga, por me apoiar, pelos conselhos, pelas risadas, e mesmo com toda distância que a vida impôs entre nós, por se fazer tão presente.

Agradeço ao meu pai **Renato Linhares**, que mesmo com a distância sempre me ajudou e me apoiou em minhas dificuldades.

Agradeço a minha amiga, antiga parceira de clínica e agora parceira da vida **Graziely Borges**. Pela amizade, companheirismo, colo, apoio, pelas risadas, pela paciência, e por sempre me ajudar e estar comigo seja qual for a dificuldade. Uma amizade que começou durante a graduação, mas que com certeza, eu quero e vou levar para o resto da vida.

A meus familiares, em especial a minha avó **Emirena Rodrigues**, pela excelente criação que me proporcionou, e também a minhas tias **Mirela Rodrigues**, **Cristiane Rodrigues**, a minha Madrinha e também tia **Marluce Rodrigues**, e ao meu irmão **Rodrigo Capanema**, por todo apoio, por serem uma extensão da minha casa, e por sempre acreditarem em mim.

À minha grande amiga, **Ester Cristina**, cuja a amizade foi fruto do ambiente acadêmico, mas que acabou se estendendo para a vida pessoal, e que com certeza quero e espero que essa amizade se estenda para toda a vida. Agradeço por todo apoio, companheirismo, confidências, pelas inúmeras risadas e situações que passamos juntas, por todas as broncas que me deu e que me ajudaram muito a crescer, pelas incontáveis

caronas que me deu, facilitando imensamente meu deslocamento, por nunca medir esforços e sempre estar pronta para ajudar, por estar comigo nos momentos bons e ruins, e por muitas vezes deixar a vida, às vezes é tão pesada, mais leve, fácil e agradável. Por isso, e por outros vários motivos, deixo aqui minha eterna gratidão, e a imensa admiração profissional e pela pessoa que é. Seu exemplo me é fonte de inspiração diariamente.

À **Marisol Pallette**, uma grande amiga que fiz na convivência comum do laboratório, e que espero levar para o resto da vida. Agradeço pela amizade, companhia, apoio, pela melhor risada que eu já escutei, que só ela tem. Por todas as broncas que me deu e me ajudou a crescer, por sempre me incentivar a ser melhor, e que me é um exemplo de vida, espalhando alegria e felicidade onde passa com sua mais gostosa risada. Meu muito obrigada por tudo, o mundo é pequeno para uma pessoa tão grande e com tão bom coração como o seu.

À **Aline Borges**, minha amiga desde a infância, pessoa com quem sempre pude contar e compartilhar essa caminhada. Agradeço por todas as risadas, conversas, pelos desabafos, pelos conselhos, pelo apoio e por tantos momentos que compartilhamos.

À **Yusmaris Caricaco**, a quem tenho tanto apreço, agradeço por todas as risadas, companheirismo, por toda a ajuda dentro e fora do laboratório, pela parceria e compartilhamento de informações que trocamos no laboratório, pelo tempo que tivemos sendo vizinhas, por todos os churrascos e celebrações que tivemos, pela amizade, e por ser um exemplo de pessoa e pesquisadora, e por ter um dos corações mais puros e sinceros que já conhecia, o qual me é fonte de inspiração.

À **Layane Alencar**, grande amizade fruto do convívio diário no laboratório, o meu muito obrigada, por todo companheirismo, paciência, amizade, risadas, apoio, confidências, e por muitas vezes me acolher com tanto carinho e amor. Um exemplo de pessoa e mãe, que um dia quero ser.

Ao **Marcos Paulo**, amigo que fiz no começo da minha graduação durante minha primeira iniciação científica. Pessoa a qual me foi muito importante durante toda essa caminhada. Agradeço pela amizade durante todos esses anos, pelo apoio tanto emocional quanto científico, pelas risadas e por todos os momentos bons que compartilhamos.

Aos amigos que fiz no laboratório de histologia da UFU, **Rosiane Nascimento, Anna Isabel, Bellisa de Freitas, Carlos Trindade, Natália Carnevalli, Mariele Venâncio, e Rômulo Oliveira**. Obrigada pela amizade que ultrapassa os limites do laboratório, pelas risadas, pelos momentos de descontração fora do laboratório, por todo apoio e companheirismo durante essa minha jornada.

Ao meu grande amigo de graduação **Paulo Zanuto**, pelos bons momentos, pela amizade, por todo apoio, risadas, conselhos, momentos e companheirismo compartilhados durante esses 7 anos de amizade. E mesmo que atualmente estejamos mais distantes fisicamente, continua se fazendo tão presente. Sua amizade é de extrema importância para mim.

À **Marcelo Garcia**, meu amigo de graduação e também de mestrado, por ser parceiro de tantos trabalhos, pelo companherismo e pela amizade por todos esses anos.

Aos meus companheiros de grupo de pesquisa, **Pedro Limirio e Jessyca Venâncio**. Por todo apoio, ajuda e companherismo que tornaram o trabalho mais leve, agradável, e que muito contribuíram para a realização desse trabalho durante todos esses anos. Mostrando o verdadeiro significado da força que tem o trabalho em equipe.

Aos amigos e ex-companheiros de grupo de pesquisa, **Pâmella Dias e Huberth Rocha**, o qual por muito tempo me foram apoio, e o qual a amizade se estendeu além da parte acadêmica.

Aos funcionários da UFU, **Fabrcio Araújo, Brenda Rodrigues, Murilo Vieira, Loyane Bertagnolli** e aos demais funcionários, pela disposição em ajudar quando necessário.

Aos **mestres**, que contribuíram no meu desenvolvimento profissional, dando-me a condição de uma visão crítica, para que não tropeçássemos na obscuridade da ignorância, em especial ao **Prof. Dr. Sérgio Vitorino**, e **Prof. Dr. Adriano Loyola**. E agradeço também aos demais **professores do programa de pós graduação da faculdade de odontologia da UFU**.

Agradeço em especial e imensamente a minha orientadora, **Profa. Dra. Paula Dechichi**, a qual eu tenho profunda admiração e gratidão por todo apoio durante todos esses anos. Cumprindo brilhantemente seu papel de orientadora, de forma humana, com muita paciência, dedicação e carinho. Sendo exemplo não somente como profissional, mas também como de ser humano.

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.**

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

**À Rede de Biotérios de Roedores da UFU (REBIR) da Universidade Federal de
Uberlândia.**

**Ao Departamento de Biologia Celular, Histologia e Embriologia 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, REBIR e CPBio pelo apoio na parte
experimental da pesquisa.**

EPIGRAFE

“Nós somos aquilo que fazemos repetidamente.
A excelência, portanto, não é um feito.
É um hábito”

Aristóteles

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS	1
RESUMO	3
ABSTRACT	4
1. INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO.....	5
2. PROPOSIÇÃO	8
3. MATERIAL E MÉTODOS	9
4. RESULTADOS.....	17
5. DISCUSSÃO.....	22
6. CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS	26

LISTA DE ABREVIATURAS

% – 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

D – Diabetes

DH – Diabetes + oxigenação hiperbárica

Dlx-5 – Gene homólogo ao *distal-less 5*

DM1 – Diabetes mellitus tipo 1

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

EPCs – Células progenitoras endoteliais

FGF-2 – Fator de crescimento de fibroblastos-2

g – Grama

OH – 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 – Miligrama por decilitro

mg/kg – Miligrama por quilograma

ml – Mililitro

ml/kg – Mililitro por quilograma

mm – Milímetro

mmHg – Milímetros de mercúrio
MSCs – Células-tronco mesenquimais
MT – Tricrômico de Mallory
N – Normoglicêmico
NH – Normoglicêmico + oxigenação hiperbárica
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 $\kappa\beta$
RANK-L – Ligante do receptor ativador do fator nuclear $\kappa\beta$
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

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia devido a alterações na secreção e/ou ação da insulina. A hiperglicemia crônica compromete o metabolismo, a estrutura e o reparo ósseo. Terapias adjuvantes têm sido propostas a fim de melhorar a estrutura e o reparo ósseo em condições desfavoráveis, como ocorre no DM1. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da oxigenoterapia hiperbárica (OH) na regeneração óssea em fêmures de ratos com DM1. Trinta e dois animais foram divididos em quatro grupos (n = 8): não diabéticos (N); não diabético + OH (NH); diabético (D) e diabético + OH (DH). Nos grupos diabéticos, o DM1 foi induzido por injeção intravenosa de estreptozotocina (50 mg/kg). Trinta dias depois, foi realizado defeito ósseo em ambos os fêmures e os grupos com OH foram submetidos à sessões diárias de oxigenação hiperbárica. Após 7 dias, os animais foram eutanaziados, os fêmures foram removidos, desmineralizados e incluídos em parafina. Os cortes histológicos obtidos foram corados em Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricrômico de Mallory (MT). Em HE, a análise histomorfométrica foi realizada utilizando uma grade de 144 pontos para quantificar (porcentagem): matriz óssea, coágulo sanguíneo, tecido de granulação e vasos sanguíneos. Em MT, a análise histomorfométrica foi realizada para quantificar a porcentagem total de área de matriz óssea neoformada. A análise histomorfométrica mostrou que no grupo D havia mais coágulo sanguíneo e tecido de granulação, e menos vasos sanguíneos e matriz óssea comparado aos outros grupos. Os grupos com oxigenação hiperbárica mostraram menos coágulo sanguíneo e tecido de granulação, e mais vasos sanguíneos e matriz óssea comparado aos grupos que não receberam a terapia. O presente estudo mostrou que a terapia com oxigenação hiperbárica diminuiu os efeitos negativos da hiperglicemia em ratos diabéticos, melhorando a regeneração óssea.

Palavras-chave: Regeneração óssea; Diabetes mellitus, Tipo 1; Oxigenação hiperbárica.

ABSTRACT

Type 1 diabetes mellitus (DM1) is a metabolic disease characterized by hyperglycemia due to changes in insulin secretion and / or action. Chronic hyperglycemia compromises bone metabolism, structure and repair. Adjuvant therapies have been proposed in order to improve structure and bone repair under unfavorable conditions, as occurs in DM1. The aim of the present study was to evaluate the hyperbaric oxygen therapy (HO) effects on bone regeneration in femurs of rats with T1DM. Thirty-two animals were divided into four groups (n = 8): non-diabetic (N); non-diabetic + HO (NH); diabetic (D) and diabetic + HO (DH). In diabetic groups, DM1 was induced by intravenous injection of streptozotocin (50 mg/kg). Thirty days later, bone defect was performed in both femurs and groups with HO were submitted to daily sessions. After 7 days, the animals were euthanized, the femurs were removed, demineralized and embedded in paraffin. The histological sections obtained were stained with Hematoxylin and Eosin (HE) and Mallory Trichrome (MT). In HE, histomorphometric analysis was performed using a 144-point grid to quantify (percentage): bone matrix, blood clot, granulation tissue, and blood vessels. In MT, histomorphometric analysis was performed to quantify the total percentage bone matrix area. Histomorphometric analysis showed that in group D there was more blood clot and granulation tissue, and less blood vessels and bone matrix compared to the other groups. The groups with HO showed less blood clot and granulation tissue, and more blood vessels and bone matrix compared to the groups without HO. The present study showed that hyperbaric oxygen therapy reduces the negative hyperglycemia effects in diabetic rats, improving bone regeneration.

Keywords: Bone regeneration; Diabetes Mellitus, Type 1; Hyperbaric oxygenation.

1. INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença metabólica que se caracteriza pelo quadro de hiperglicemia decorrente de alterações na secreção e/ou na ação da insulina. Atualmente, estima-se que a população mundial com diabetes é da ordem de 415 milhões de pessoas e que deverá atingir 642 milhões em 2040 (International Diabetes Federation, 2015). A doença pode ser classificada de diversas formas, porém estima-se que apenas 10% dos casos sejam de DM tipo 1 e DM gestacional, e que a grande maioria dos casos, cerca de 90%, seja de DM tipo 2. (American Diabetes Association, 2015). O diabetes mellitus tipo 1 é caracterizado como uma doença imunomediada causada por danos nas células β pancreáticas produtoras de insulina com ou sem tecido funcional residual. São muitas as causas do diabetes tipo 1, incluindo infecção viral, efeitos de drogas e reação auto-imunes. Esses fatores levam à apoptose das células β pancreáticas e uma falta de insulina no sangue, aumentando a glicemia (Wang et al., 2017). Enquanto que, DM tipo 2 é um distúrbio metabólico caracterizado pelo elevado nível de glicose no sangue, resistência à insulina e relativa falta de insulina, causados em consequência da obesidade e da falta de exercício físico (International Diabetes Federation, 2015). Apesar do DM tipo 1 ser menos frequente que o DM tipo 2, os prejuízos aos órgãos causados pelo tipo 1 tendem a ser mais graves, uma vez que essa doença aparece em indivíduos muito jovens, os quais permanecem diabéticos a maior parte da vida (Sociedade Brasileira de diabetes, 2018).

A hiperglicemia crônica leva a várias alterações no metabolismo, estrutura, remodelação e reparo ósseos (Napoli et al., 2017). Estudos recentes relatam que tanto a DM tipo 1 e 2 estão associadas a aumento do risco de fratura óssea (Graves et al., 2011), pois a hiperglicemia altera negativamente a matriz óssea, reduzindo significativamente densidade mineral óssea e os níveis de osteocalcina sérica (Wang et al., 2017). Estudos sugerem que esse comprometimento se deve ao excesso de produtos finais de glicação avançada (AGEs) no sangue. O acúmulo de AGEs no esqueleto ósseo torna o osso mais frágil, com reduzida resistência e, portanto, com maior risco a fratura (MacLean et al. 2019).

O tecido ósseo é um tipo especializado de conjuntivo constituído por células e material extracelular mineralizada (matriz óssea). As células ósseas são: os osteoblastos, responsáveis pela formação da matriz óssea, os quais se localizam na superfície da matriz; os osteócitos com função de manutenção da matriz, localizados em lacunas no interior da matriz; e os osteoclastos, células gigantes, móveis e multinucleadas que tem capacidade de reabsorção de matriz minealizada, participando dos processos de reparação e remodelação óssea (Junqueira & Carneiro, 2017).

Sendo um importante componente do sistema esquelético, o tecido ósseo participa diretamente das funções dos ossos, tais como: alojar e proteger a medula óssea (local de formação das células do sangue); apoiar músculos esqueléticos, transformando contrações em movimentos úteis; constituir um sistema de alavanca, que amplia as forças geradas na contração muscular; funcionar como depósito de cálcio, fosfato e outros íons, liberando ou armazenando a fim de manter a constância desses íons nos líquidos corporais; absorção de toxinas e metais pesados, minimizando assim seus efeitos adversos em outros tecidos (Junqueira & Carneiro, 2017).

Quando lesado, o tecido ósseo é capaz de regeneração, fenômeno que demonstra sua permanente vitalidade (Katchburian; Arana, 2004; Lynch; Genko & Marx, 1999). A regeneração óssea é um termo aplicado ao processo biológico em que a estrutura e a função do tecido lesado ou perdido são completamente restaurados (Junqueira & Carneiro, 2017). O processo de regeneração óssea, consiste em três fases características: fase inflamatória, fase reparadora e fase de remodelação. A fase inflamatória é caracterizada pela formação do coágulo sanguíneo que envolve as superfícies ósseas no local da lesão, estendendo-se pelo periósteo e cavidades medulares próximas, acompanhadas de edema mais ou menos intenso. Instala-se, assim, um processo inflamatório agudo, que dura cerca de cinco dias, com grande mobilização de neutrófilos e macrófagos provocado pela liberação de substâncias quimiotáticas. Imediatamente após, inicia-se a fase reparadora, que tem duração de aproximadamente dez dias com o aparecimento de grande número de fibroblastos produtores de colágeno tipo III responsáveis pela formação de um tecido fibroso, no qual as fibras colágenas envolvem a região lesionada. À medida que a ação dos macrófagos prossegue, uma nova rede capilar é formada oriunda das células endoteliais remanescentes dos vasos rompidos e das células mesenquimais indiferenciadas. Essas células invadem a região do coágulo, juntamente

com fibroblastos e osteoblastos, para formar, rapidamente, um novo tecido ósseo no local, por um processo de ossificação intramembranosa, resultando em um osso imaturo. Este processo tem duração de aproximadamente cinco dias. Em seguida, na fase remodeladora, processos de reabsorção e neoformação combinados ocorrem até que a região lesionada retorne as características morfológicas, biomecânicas e funcionais que possuíam antes da lesão (Mitchell, 2012). O tempo para reparação total da lesão óssea depende de vários fatores como tamanho da lesão e condições sistêmicas do indivíduo. A regeneração óssea, portanto, é um processo complexo que envolve várias sinalizações celulares, que levam à proliferação, migração e aumento de funções celulares. Em indivíduos com diabetes mellitus, esse processo é comprometido (Wang et. Al 2017).

No processo de reparo ósseo, a resposta inflamatória que sucede a lesão é importante para a rápida reparação da ferida, porém no indivíduo diabético, ocorre retardo no influxo de células inflamatórias para o local. Em seguida, quando as células estão estabelecidas, ocorre um estado de inflamação crônico, que dificulta a deposição de componentes da matriz, a remodelação e o fechamento da ferida. A hiperglicemia é responsável pela alteração no processo inflamatório, além de comprometer a função de osteoblastos e osteoclastos, levando ao retardo de todo o processo de reparo (Napoli et al. 2017).

Novas formas de tratamento têm sido investigadas e propostas para melhorar o processo de reparo ósseo, especialmente, em condições desfavoráveis, como no diabetes. A oxigenação hiperbárica (OH) tem sido sugerida como terapia coadjuvante para acelerar o processo de reparo, pois tem mostrado resultados promissores. Ela consiste na oferta de oxigênio puro (100%) em ambiente pressurizado em nível acima da pressão atmosférica, sendo normalmente de duas a três atmosferas a mais, procedimento realizado no interior de câmara hiperbárica (Dias et al., 2018).

Estudos relataram que a OH aumenta a quantidade de oxigênio no sangue e promove angiogênese em tecido lesado, aumentando a quantidade de oxigênio e de nutrientes no local lesado (Jan et al.,2009), acelerando o processo reparo em tecidos moles (Kalani et al., 2002) e mineralizados (Rocha et al. 2015). Em feridas de pé diabéticos, a OH acelerou a taxa de cicatrização, reduziu a necessidade de amputação dos pés com feridas, e aumentou o número de feridas que são completamente curadas no

acompanhamento a longo prazo (Kalani et al., 2002). Em tecido ósseo, a OH mostrou melhora nas propriedades mecânicas ósseas, aumentando a força e rigidez do fêmur em animais com DM tipo I (Limirio et al. 2018). Outros estudos demonstram que a OH, em camundongos saudáveis, aumentam a taxa de aposição mineral óssea e interfere positivamente na reabsorção do calo ósseo e na consolidação da fratura, acelerando o processo de remodelação óssea nessa situação (Kawada et al., 2013). E também, a OH contribui para uma maior quantidade de formação óssea e menor formação de tecido fibroso (Jan et al, 2009).

Em situações de baixa oxigenação e hiperglicemia ocorre atraso no processo de reparo, devido a redução na deposição de colágeno nos estágios iniciais. Estudos mostraram que a OH tem a capacidade de minimizar esses efeitos, acelerando significativamente o processo de reparação de ferida em pata de rato (André-Lévigne et al., 2016). Poucos estudos investigaram os efeitos da oxigenoterapia hiperbárica em reparo ósseo em diabéticos, quantificando parâmetros inflamatórios importantes, para identificar os efeitos da terapia nas diferentes fases do reparo ósseo.

2. PROPOSIÇÃO

Avaliar o efeito da oxigenação hiperbárica nos eventos biológicos do reparo ósseo, em fêmures de ratos com diabetes tipo 1, utilizando análise histomorfométrica, por meio de grade de pontos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

A amostragem final utilizada neste estudo foi de 32 ratos machos *Rattus norvegicus*, da linhagem Wistar, clinicamente sadios com peso entre 200 e 250g (cerca de 8 semanas), mantidos em depósito de animais em estantes, com ração e água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto foi aprovado pelo Comitê de ética na utilização de animais CEUA-UFU (Nº026/14). Os animais foram separados em quatro grupos como demonstrado na tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição dos grupos experimentais

Condição experimental (Grupos: n=08)	Descrição
Não-diabético (N)	Animais normoglicêmicos
Não-diabético + OH (NH)	Animais normoglicêmicos, submetidos à oxigenação hiperbárica
Diabético (D)	Animais diabéticos
Diabético +OH (DH)	Animais diabéticos, submetidos à oxigenação hiperbárica

Trinta dias após a indução do diabetes com estreptozotocina (50 mg/kg), em todos os animais foram criados defeitos ósseos em ambos os fêmures. Os animais dos grupos NH e DH, foram submetidos a sessões diárias de oxigenação hiperbárica, iniciadas imediatamente após o procedimento cirúrgico. Todos os animais foram eutanaziados 7 dias após a cirurgia, os fêmures foram removidos e processados para inclusão em parafina e análises histológicas ao microscópio de luz.

3.2. Indução de Diabetes Mellitus (DM1)

A indução do DM nos animais foi realizada por administração de estreptozotocina (STZ) (Sigma Aldrich) por via intravenosa na dosagem de 50 mg/kg de peso corporal, diluída em 2 ml de tampão citrato. Esta droga produz um efeito tóxico sobre as células pancreáticas, induzindo um modelo de DM tipo 1 (Delfino, 2002).

Previamente à indução, os animais foram mantidos em jejum por 24h. Em seguida, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal utilizando 7 mg/kg do relaxante muscular cloridrato de xilazina 2% e 10 mg/kg do anestésico e analgésico cloridrato de quetamina 10%. Em seguida, a STZ foi administrada por via endovenosa através de punção da veia peniana. Após 24h da indução, para confirmação da hiperglicemia, coletou-se uma gota de sangue da cauda dos animais e a glicemia foi aferida em glicosímetro (Accu Check Active, Roche). Os animais que apresentaram glicemia maior que 300 mg/dL foram considerados diabéticos. A glicemia dos animais do grupo D e DH foram medidas após 24h, 15 dias, 30 dias e no dia da eutanásia.

Após 30 dias da indução do DM os animais foram submetidos a procedimento cirúrgico para confecção de defeito ósseo nos fêmures esquerdo e direito. Logo após a cirurgia foi iniciada a oxigenoterapia hiperbárica nos grupos NH e DH.

3.3. Mensuração de peso e de consumo de água e ração

Nos períodos de 24h, 15 dias, 30 dias e 37 dias, após a indução, os animais foram pesados em uma balança digital modelo B1600 (MicroNal, São Paulo, SP, Brasil). O consumo de água e ração foram medidos diariamente, durante duas semanas (segunda e terceira semanas após a indução). A ração foi pesada em uma balança digital modelo B1600 (MicroNal, São Paulo, SP, Brasil) e o consumo de água foi medido com uma proveta de 1L. Esse procedimento foi realizado às 7h da manhã, de forma que o consumo de ração (gramas) e água (ml) eram a diferença entre os valores do dia anterior e o dia subsequente.

3.4. Procedimento cirúrgico

Os animais foram submetidos a anestesia por via intraperitoneal, como citado anteriormente no item 3.2. O acesso cirúrgico ao fêmur foi obtido por meio de incisão contínua longitudinal com 2cm de extensão. A musculatura foi divulsionada até a exposição do perióstio, que foi incisado e descolado ao longo da área óssea a ser operada. O defeito ósseo foi realizado na diáfise na região próxima à metáfise distal do fêmur. Nesta região, foi realizado um defeito ósseo com broca esférica nº 8 sob irrigação abundante com solução fisiológica estéril de cloreto de sódio a 0,9%. A referência de profundidade da perfuração foi o rompimento da cortical óssea, cerca de 2mm. A sutura foi realizada por planos com fio cirúrgico monofilamento nylon 4-0 (Fig. 1).

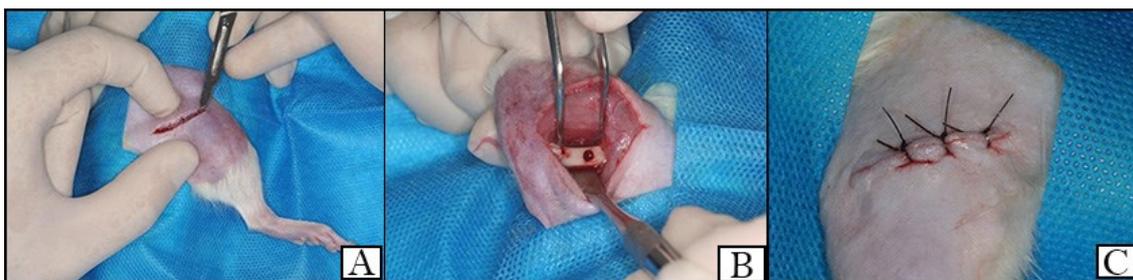


Figura 1: A- Incisão contínua na região coxofemoral do rato. B- Defeito ósseo realizado no fêmur do rato. C- Realização da sutura de pele na região coxofemural.

3.5. Oxigenação Hiperbárica (OH)

Os animais receberam sessões de OH no interior de câmaras “multiplaces” experimentais Ecobar 400 (Ecotec Equipamentos e Sistemas Ltda®, Mogi das Cruzes, SP, Brasil) (Fig. 2). Inicialmente, houve um período de compressão 0.3ATA/min até atingir a pressão necessária para OH. A sessão teve duração de 90 minutos sob pressão de 2,5 ATA (ATA = 1 atmosfera absoluta = 760mmHg). Em seguida, houve um período de descompressão a 0.3ATA/min. As sessões de OH foram diárias, iniciando logo após a finalização do procedimento cirúrgico, totalizando 7 sessões.



Figura 2: Imagem demonstrativa de sessão de oxigenoterapia hiperbárica

3.6. Obtenção dos espécimes

Os animais foram eutanaziados 7 dias após a cirurgia, por meio de aprofundamento anestésico com quetamina 10% (10 mg/kg) e xilazina 2% (7 mg/kg), com posterior uso de Tiopental (60 mg/kg) associado com Lidocaína (10 mg/ml). Em seguida, foi realizada incisão longitudinal acompanhando a cicatriz cutânea existente e os fêmures foram removidos por desarticulação.

As epífises dos fêmures foram removidas utilizando brocas 702 em alta rotação, sob irrigação com soro fisiológico e as diáfises foram fixadas em paraformaldeído 4% em Tampão Fosfato 0,1M, por 48 horas. Em seguida, as diáfises foram desmineralizadas em solução de EDTA a 4,13% pH 7,4 por cerca de 4 semanas. Após a desmineralização, as diáfises foram seccionadas ao meio, paralelamente ao longo eixo, e então processadas para inclusão em parafina, pela técnica convencional. Ao final do processo obteve-se 4 blocos de cada animal, sendo 2 blocos da diáfise esquerda e 2 blocos da diáfise direita.

3.7. Análise histológica qualitativa e histomorfométrica

Para as análises, foram selecionadas 6 lâminas de cada bloco, sendo 3 coradas em Hematoxilina e Eosina (HE), e 3 em Tricrômico de Mallory (TM). Todos os cortes histológicos foram escaneadas com scanner Aperio AT Turbo (Copyright © 2013 Leica Biosystems Imaging, Inc. All Rights Reserved) no aumento de 20x. As imagens histológicas digitalizadas foram visualizadas utilizando o programa de leitura de imagens Aperio ImageScope (Copyright © Aperio Technologies, Inc. 2003-2014. All Rights Reserved) e convertidas para TIFF, de forma a possibilitar a análise em outros softwares.

As imagens histológicas coradas em HE foram utilizadas para realização da análise qualitativa e quantitativa. Na análise qualitativa foi avaliado o processo de reparo, por meio de análise descritiva. Para análise quantitativa, utilizando-se software de imagens Aperio ImageScope, delimitou-se três quadrados situados na região da lesão, sendo dois logo abaixo das corticais rompidas e um central acima da cortical oposta. Assim, com a ferramenta Rectangle Tool, extraiu-se de cada região delimitada uma imagem em formato TIFF com uma área de 431x431 com a ferramenta Extract Imagem Region. Cada imagem foi aberta no programa Image-Pro Plus Version 4.5 e, antes de iniciar a análise propriamente dita da imagem em HE, foi realizada a calibração da Régua Image Pro (Fig. 4 a 7). Em seguida à calibração, foi gerada uma grade de 144 pontos para quantificação de: Coágulo (rede de fibras composta por glóbulos sanguíneos, plaquetas e plasma, que aderem a superfície lesada do vaso sanguíneo), Tecido de granulação (tecido conjuntivo propriamente dito, com presença de fibroblastos, vasos sanguíneos, leucócitos, e neutrófilos, predominantemente polimorfonucleares), Vasos sanguíneos (vasos revestidos por endotélio) e Matriz óssea. Essa análise quantificou a porcentagem de pontos que incidiram sobre cada elemento presente na área de interesse. A região de interesse (ROI), a ser analisada utilizando a grade de pontos, foram três imagens extraídas da área da lesão óssea (Fig 3).

Após a extração das imagens a serem analisadas (ROI), utilizando a ferramenta Grid Mask do software, foi inserida sobre a imagem histológica a grade de 144 pontos, na qual foram contados cada elemento definido quando esse aparecia sob um ponto (interseção das linhas da grade) (Fig 4).

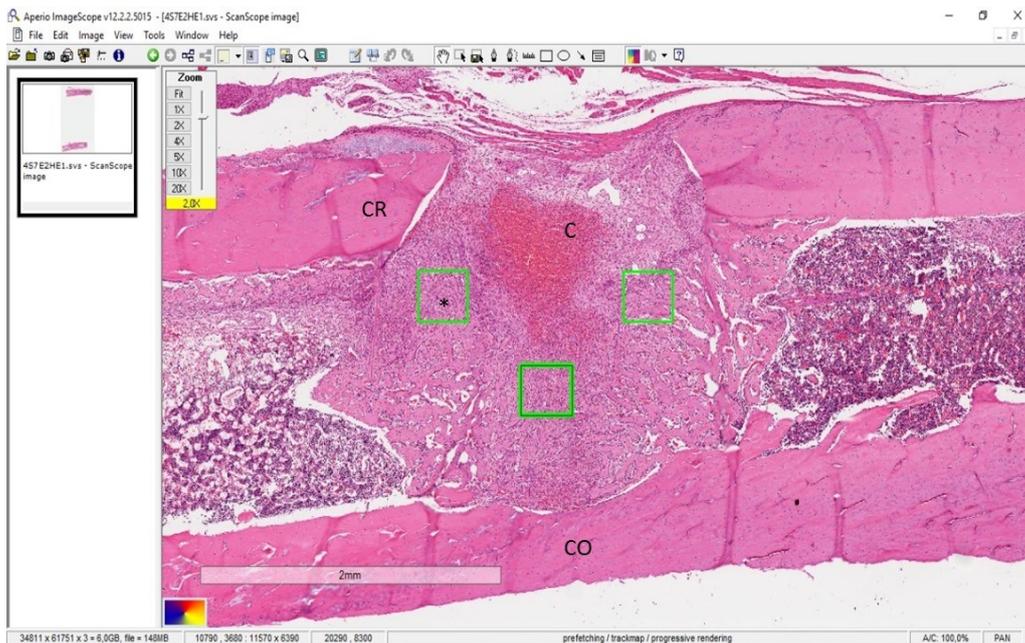


Figura 3: Imagem histológica (HE) de corte longitudinal de fêmur na área da lesão óssea, evidenciando cortical rompida (CR), cortical oposta (CO), coágulo (C), região de neoformação óssea (*) e região de interesse (quadrados verdes).

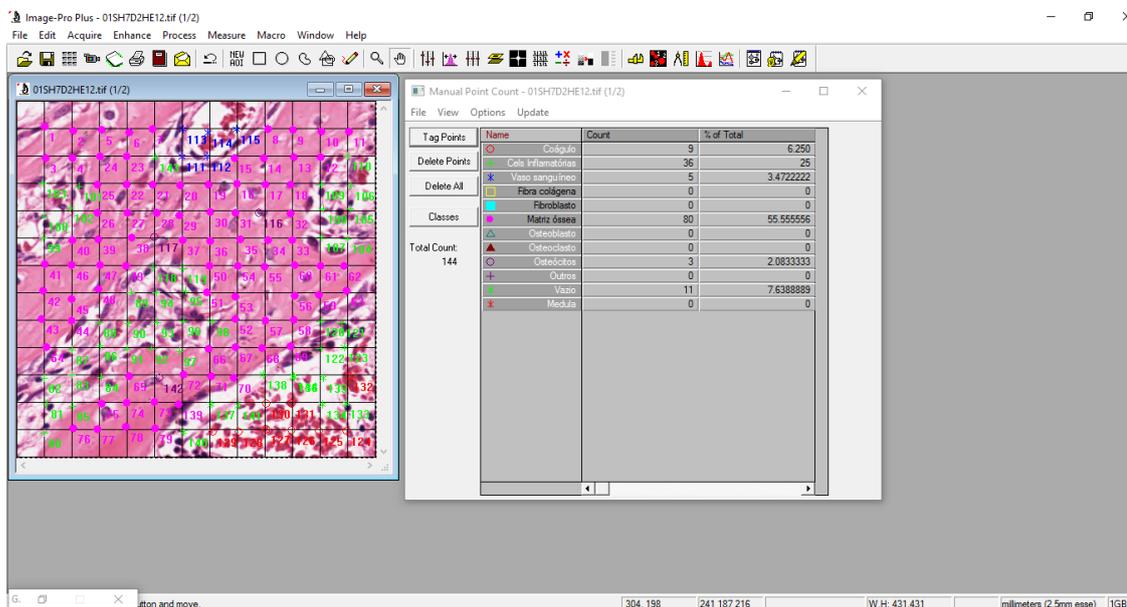


Figura 4: Imagem gerada pelo software Image pro plus, ilustrando a grade de pontos sobre a imagem histológica e a quantificação dos elementos (coágulo, tecido de granulação, vasos sanguíneos e matriz óssea).

Para análise da porcentagem total de matriz óssea neoformada na região de interesse, foram utilizadas 12 imagens histológicas de cada animal coradas em Tricrômico de Mallory. As imagens digitalizadas foram submetidas ao software editor de imagens Adobe Photoshop CS6 (Adobe®, Adobe System Inc., San Jose, CA/EUA) (Fig. 5) para remoção do tecido mole (Fig. 6). Em seguida, por meio do software gráfico HL Image 97 ++ (Western Vision Software, Utah/EUA), as imagens foram convertidas em imagens binárias e a região de interesse (ROI) foi delimitada por quatro linhas, estendendo-se das bordas da cortical óssea rompida até a superfície interna da cortical óssea oposta, por meio da ferramenta draw. A porcentagem de matriz óssea neoformada dentro da ROI foi calculada com a ferramenta measurement (Fig. 7).

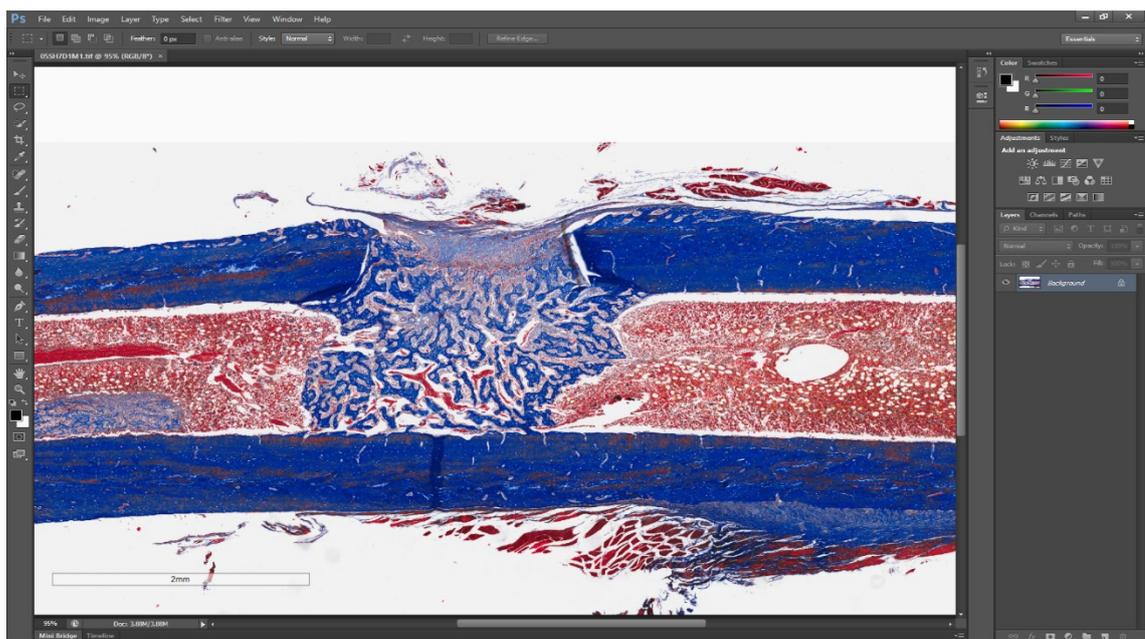


Figura 5 - Imagem histológica (tricrômico de Mallory) digitalizada de corte longitudinal de diáfise de fêmur no software editor de imagens Adobe Photoshop CS6.

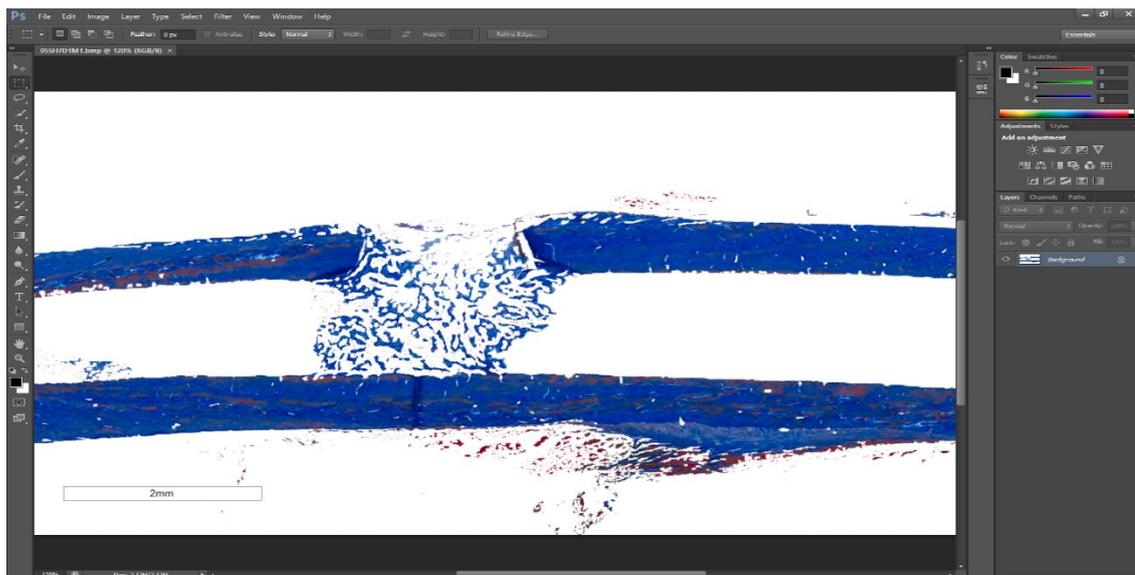


Figura 6 – Imagem histológica digitalizada de corte longitudinal de diáfise de fêmur submetida ao software editor de imagens Adobe Photoshop CS6, já com toda região de tecido mole removida.

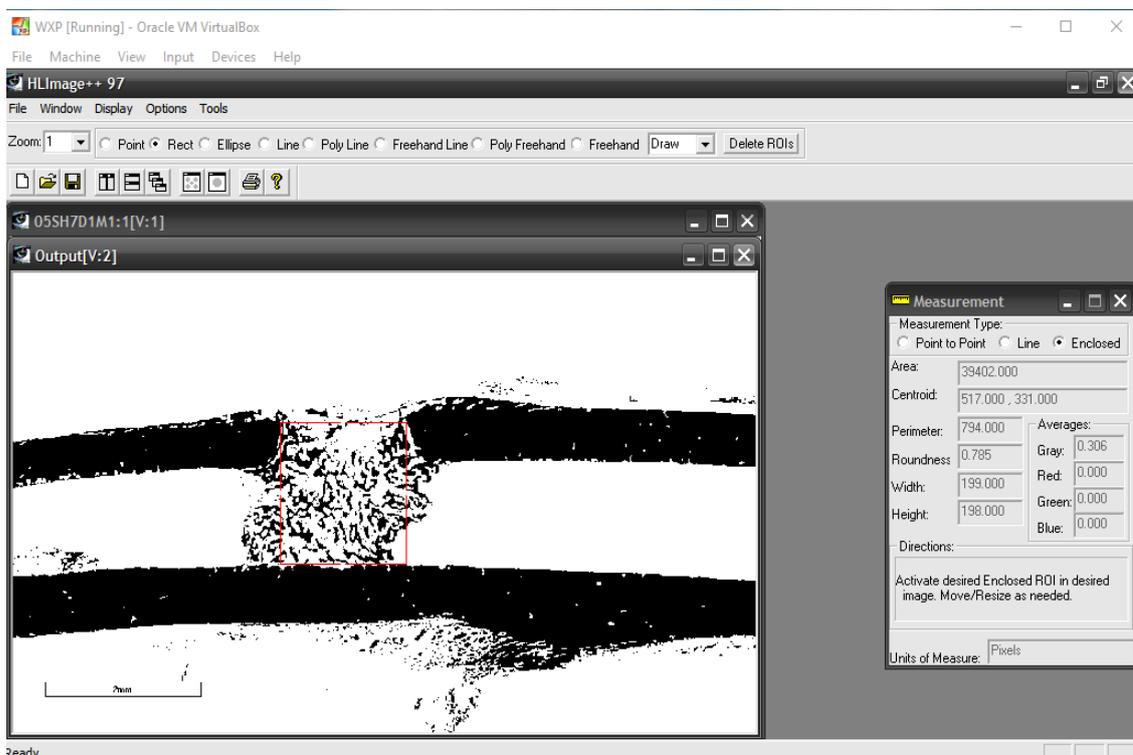


Figura 7 – Imagem histológica digitalizada de corte longitudinal de diáfise de fêmur submetida ao software gráfico HL Image 97 ++, já em formato de imagem binária e com a região de interesse delimitada (retângulo vermelho).

3.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software SigmaPlot (SigmaPlot version 12.5 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 $\alpha < 0.05$.

4. RESULTADOS

Durante o desenvolvimento experimental do projeto, poucos animais não ficaram diabético, esse fato foi devido à falha na técnica de indução, e alguns morreram após a cirurgia. O índice de falha nesses aspectos foi cerca de 15% e esses animais foram respostos a fim de atingir-se-se o “n” amostral total de 32.

Os animais diabéticos apresentaram aumento no consumo de água e de alimentos (Tabela 1) e houve diminuição do peso (Tabela 2). A glicemia plasmática ficou em torno de 300 a 520 mg / dL ao longo de todo o experimento (Tabela 3).

Tabela 1 – Valores referentes ao consumo de água e de alimentos dos animais dos diferentes grupos, medidos durante o experimento.

Consumo/Grupos	Não-diabético (N)	Não-diabético +OH (NH)	Diabético (D)	Diabético +OH (DH)
Ração	131,83 \pm 8,37	84,33 \pm 56,13	210,50 \pm 64,54	181,83 \pm 32,82
Água	253,66 \pm 29,30	245,83 \pm 42,00	616,66 \pm 296,92	750 \pm 225,29

Tabela 2 – Valores referentes ao peso dos animais dos diferentes grupos, medidos durante o experimento

Peso (g) /Grupos	Não-diabético (N)	Não-diabético +OH (NH)	Diabético (D)	Diabético +OH (DH)
Dia 0	248,60 ± 19,43	256,2 ± 31,61	258 ± 3,67	267,2 ± 3,20
Dia 15	299,60 ± 4,27	321,80 ± 16,50	260,80 ± 13,75	263,80 ± 21,20
Dia 30	352,40 ± 6,06	354 ± 8,21	231,40 ± 21,99	281,40 ± 28,31
Dia 37	343,40 ± 13,50	353,40 ± 9,20	274 ± 8,88	276,60 ± 27,39
Média total	311 ± 47,56	321,35 ± 45,96	256,05 ± 17,85	272,35 ± 8,07

Tabela 3 – Média dos valores de glicemia dos grupos, medidos após: 24h, 15 dias, 30 dias e 37 dias após a indução, em mg/dll.

Glicemia (mg/dl)/Grupos	Não-diabético (N)	Não-diabético +OH (NH)	Diabético (D)	Diabético +OH (DH)
Dia 0	96,1 ± 6,7	96,5 ± 6,4	333,2 ± 26,3	313,6 ± 50,4
Dia 15	97,2 ± 11,8	97,6 ± 7,3	322,5 ± 16,3	541,0 ± 67,8
Dia 30	96,8 ± 5,7	100,4 ± 11,8	416,0 ± 9,1	549,0 ± 69,3
Dia 37	92,2 ± 10,47	83,4 ± 6,18	558,33 ± 39,2	270,0 ± 46,2
Média total	95,6 ± 2,3	94,4 ± 7,5	332,5 ± 22,8	419,1 ± 146,6

4.1. Análise histológica qualitativa

No grupo normoglicêmico (N) observou-se tecido ósseo primário neoformado preenchendo quase completamente a região da lesão óssea (cortical óssea rompida e região do canal medular). As trabéculas ósseas neoformadas estendiam-se da borda da

cortical óssea rompida até a cortical íntegra oposta, interconectadas, delimitando pequenas cavidades preenchidas com tecido medular. As trabéculas ósseas mostraram-se mais espessas nas regiões mais próximas da tábua óssea oposta íntegra. Osteoblastos com morfologia compatível com células em intensa atividade de síntese proteica foram observados revestindo as trabéculas ósseas. Também foram observados muitos osteócitos incluídos na matriz recém produzida. Poucos osteoclastos foram observados associados à matriz óssea. Na área da lesão foram observados focos de hemorragia e, adjacente a esses, havia tecido ricamente celularizado e vascularizado (tecido de granulação) (Fig. 11 – A e B).

No grupo normoglicêmico com hiperbárica (NH), observou-se os mesmos aspectos morfológicos do grupo sem hiperbárica. Porém, no grupo NH observou-se trabéculas ósseas mais espessas, blastema ósseo mais desenvolvido, maior quantidade de osteoclastos associados à matriz recém formada, poucos focos de hemorragia e tecido de granulação mais organizado, comparado ao grupo N (Fig 8 – C e D).

No grupo diabético (D), a área da lesão mostrou-se parcialmente preenchida por trabéculas ósseas neoformadas com aspectos morfológicos semelhantes ao grupo N. Porém, no grupo D observou-se extensas áreas de coágulo, menor quantidade de tecido de granulação, poucos osteoclastos e áreas de cartilagem associadas ao perióstio (Fig 8 – E e F).

No grupo diabético com hiperbárica (DH), observou-se trabéculas ósseas neoformadas preenchendo parcialmente a área da lesão, e aspectos morfológicos muito semelhantes ao grupo N, com presença de área de coágulo e focos de hemorragia. Em relação ao grupo diabético sem hiperbárica, o grupo DH apresentou trabéculas ósseas mais espessas, e menor área de hemorragia. na área da lesão (Fig 8 – G e H).

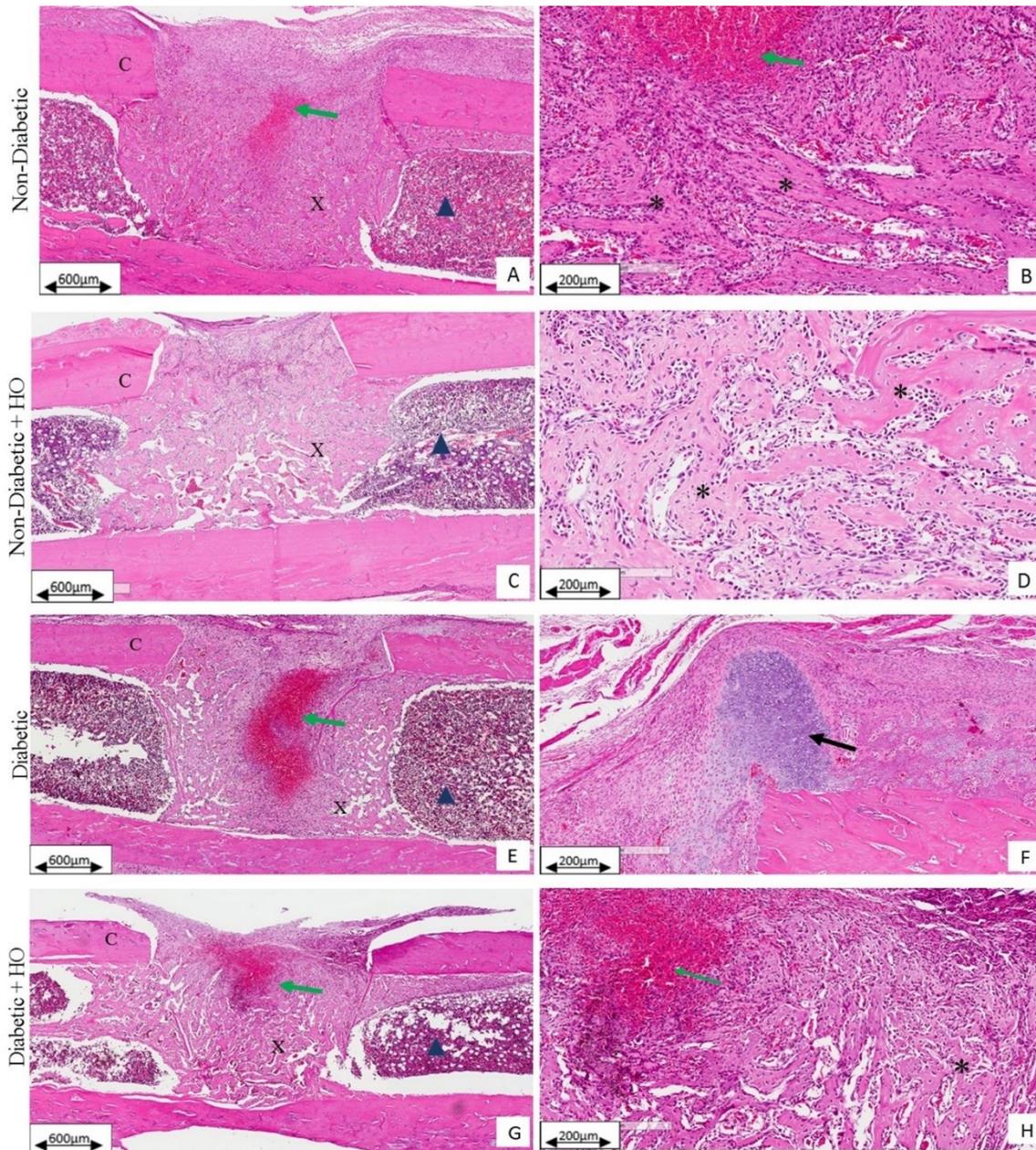


Figure 8: Corte longitudinal de fêmur mostrando cortical óssea (C), neoformação óssea (X), trabéculas óssea (*), tecido de granulação (triângulo azul), foco de hemorragia (seta verde) e cartilagem associada ao periósteo (seta preta). Hematoxilina-Eosina.

Análise histomorfométrica

Os resultados histomorfométricos são mostrados na Tabela 5. A análise histomorfométrica (HE) mostrou menor porcentagem de área de coágulo no NH comparado com DH ($p = 0,03$) e N ($p < 0,01$) (Figura 9A). No parâmetro vasos sanguíneos, D e DH apresentaram valores menores quando comparados aos grupos N ($p < 0,01$) e NH ($p = 0,04$), respectivamente. Além disso, o grupo DH apresentou porcentagem maior de vasos sanguíneos em comparação ao grupo D ($p = 0,03$) (Figura 9C). O parâmetro tecido de granulação mostrou que NH e DH apresentaram valores menores comparados aos grupos N e D ($p < 0,01$), respectivamente (Figura 12B). A análise da matriz óssea em HE (Figura 9D) e MT (Figura 9E) mostraram que o grupo D apresentou valores menores comparado aos grupos N ($p < 0,01$) e DH ($p < 0,01$).

Tabela 5: Médias referente ao valores do parâmetros analisados, em porcentagem.

Parâmetros/Grupos	Não-diabético (N)	Não-diabético +OH (NH)	Diabético (D)	Diabético +OH (DH)
Coágulo	20.47 ± 5.1 ^{Bb}	4.3 ± 0.8 ^{Aa}	21.7 ± 10.9 ^{Bb}	16.9 ± 1.5 ^{Bb}
Vasos sanguíneos	12.7 ± 2.5 ^{Aa}	16.3 ± 5.6 ^{Aa}	2.6 ± 0.7 ^{Bc}	9.6 ± 2.2 ^{Bb}
Tecido de granulação	38.9 ± 0.8 ^{Ab}	33.5 ± 14.6 ^{Aa}	41.7 ± 1.3 ^{Ab}	27.1 ± 8.9 ^{Aa}
Matriz óssea (HE)	36.7 ± 1.1 ^{Aa}	36.8 ± 1.2 ^{Aa}	28.3 ± 2.7 ^{Bb}	36.2 ± 1.5 ^{Aa}
Matriz óssea (MT)	24.1 ± 2.4 ^{Aa}	26.1 ± 1.1 ^{Aa}	14.7 ± 3.7 ^{Bb}	22.0 ± 3.6 ^{Aa}

Nas linhas, letras maiúsculas indicaram diferenças significativas para o fator diabético e letras minúsculas indicaram diferença significativa para oxigenoterapia hiperbárica ($p < 0,05$). HE - Hematoxilina e Eosina / MT - Tricromo de Mallory.

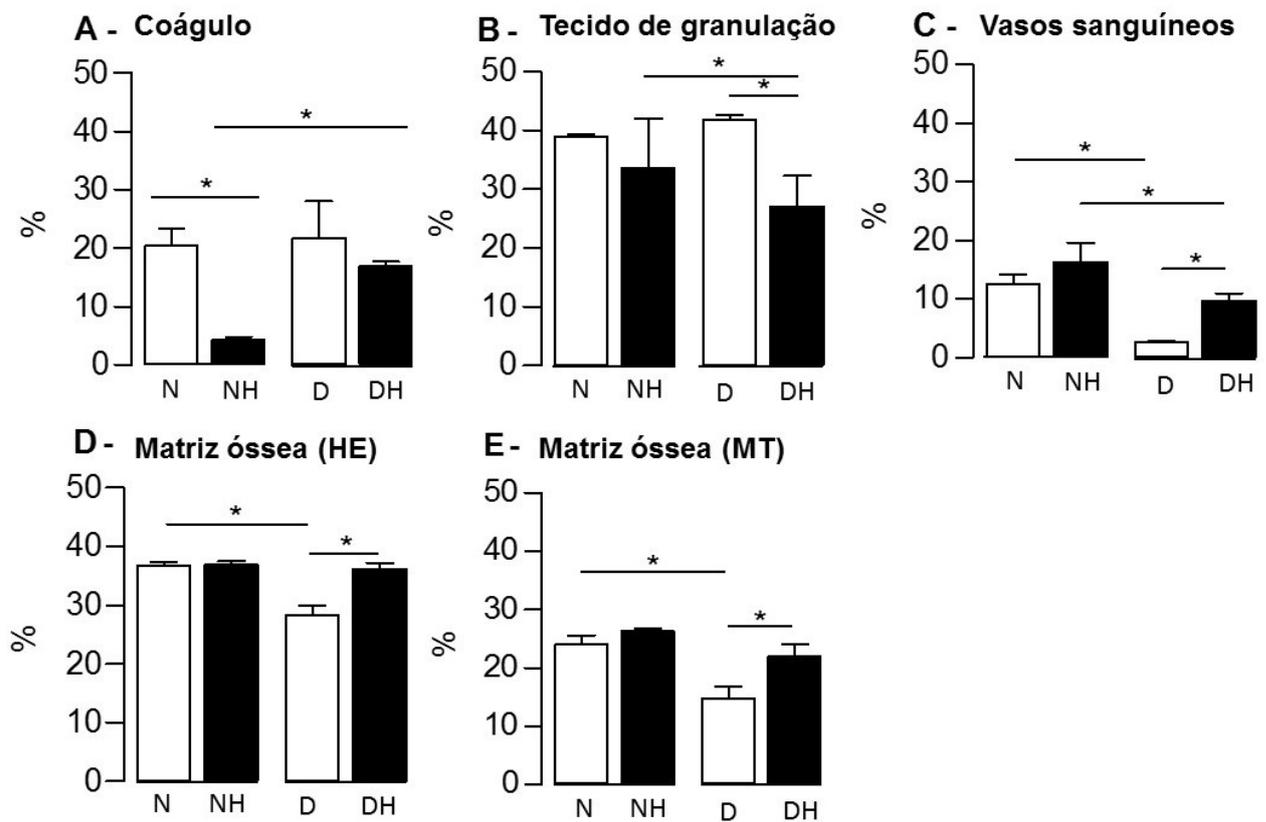


Figura 12: Análise histomorfométrica dos parâmetros nos diferentes grupos. * P <0,05.

Não diabéticos (N), Não diabéticos com OH (NH), Diabéticos (D), Diabéticos com OH (DH).

5. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o efeito da oxigenação hiperbárica (OH) no reparo ósseo em animais normoglicêmicos e diabéticos. Os resultados das análises histológicas qualitativa e quantitativa mostraram que o DM1 atrasa o reparo e que a OH melhora o processo de regeneração óssea em diabéticos.

Nesse estudo, a indução da DM foi feita através da administração de estreptozotocina (STZ) por via intravenosa. Esta droga produz um efeito tóxico sobre as células pancreáticas, induzindo um modelo de diabetes mellitus tipo 1 (Deeds et al. 2011). A diabetes tipo 1 é mais semelhante ao diabetes humano, pois as células β produtoras de insulina no pâncreas ainda têm certo grau de função (Prabowo et al., 2014). A via

intravenosa e a droga de escolha, são atualmente a combinação que replica o diabetes tipo 1, de modo mais estável e próximo da doença, com baixas taxas de reversão e mortalidade (Deeds et al., 2011). Os efeitos do diabetes tipo 1 são mais deletérios e com repercussão tecidual maior, quando comparada aos efeitos do diabetes tipo 2 (Da Jing et al. 2017). Há evidências que mesmo após a normalização da glicemia, os efeitos deletérios permanecem, sendo sugerido que o estresse oxidativo causado pela doença, tenha o papel central (Reis et. al 2008).

No presente estudo, os animais diabéticos submetidos à terapia com OH apresentaram diminuição dos níveis de glicose após a cirurgia. Acredita-se que esse mecanismo se dá através de um efeito regenerador OH nas células β , uma vez que a redução da glicemia é mantida a longo prazo (Prabowo et al., 2014). Apesar do DM1 reduzir substancialmente o número de células β pancreáticas, algumas células restantes ainda têm algum grau de função (Fotino, 2013; Prabowo et al., 2014). Portanto, é possível que a OH reduza a hiperglicemia devido à redução da lesão nas células β do pâncreas. Alguns estudos mostraram que o uso da OH pode diminuir significativamente o estresse oxidativo e a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), reduzir a apoptose e aumentar a proliferação de células β (Fotino, 2013; Faleo, 2012; Rajagopalan, 2012; Prabowo et al., 2014.) Assim, o aumento da produção de insulina reduz os níveis glicêmicos, aproximando-se da condição sistêmica de normalidade (Lu et al., 2008).

A análise histológica da área da lesão do presente estudo foi complexa, considerando que a área da lesão era extensa (cerca de $400 \mu\text{m}^2$) e o processo de reparo não é homogêneo em toda essa extensão da lesão. Assim, nesse estudo escolheu-se a metodologia de análise histológica quantitativa por gradeamento (grade de 144 pontos), a qual permite obter-se a porcentagem de cada elemento escolhido para análise, em uma dada área. Essa escolha teve como objetivo padronizar as áreas de análise, para evitar a limitação relativa do fato da área de reparo ser extensa e heterogênea, além de poder variar de espécime para espécime. Além de contornar essa dificuldade, a metodologia permite quantificar diversos parâmetros como foi feito nesse estudo, no qual foi quantificado matriz óssea, coágulo, tecido de granulação e vasos sanguíneos (Vieira, 2013). Por sua vez, a análise histomorfométrica, utilizando os cortes histológicos corados em Tricrômico de Mallory, possibilitou quantificar a neoformação óssea total na área do reparo. Essa estratégia de análise é bastante interessante pois quantifica a formação total permitindo a

comparação real entre grupos normoglicêmicos e diabéticos, em relação ao desfecho final do reparo que é a neoformação óssea (Batista et al., 2014).

As análises histológicas qualitativa e quantitativa mostraram que o grupo diabético apresentou maior quantidade de coágulo, trabéculas menos espessas, maior quantidade de tecido de granulação, menor quantidade de vasos sanguíneos e de matriz óssea neoformada comparado aos outros grupos. Esses achados estão relacionados ao fato do DMI prolongar a fase inflamatória (Napoli et al. 2017), e também prejudicar a formação e função de osteoblastos e osteoclastos (Palermo et al. 2018), atrasando todo o processo de reparo ósseo. Alguns estudos sugerem que a hiperglicemia altera a formação e função de osteoblastos e osteoclastos, com consequente aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS), juntamente com o acúmulo produtos finais de glicação avançada (AGEs). Esse situação causa danos permanentes aos tecidos, provocando disfunção endotelial e prejuízo à sinalização em processos celulares, como crescimento, apoptose, migração e remodelação da matriz extracelular (Reis et al. 2008).

A análise histológica mostrou também que a OH melhora o processo de reparo ósseo em diabéticos, uma vez que os resultados nesse grupo foram semelhantes aos do grupo normoglicêmico. Provavelmente, porque em diabéticos, a OH reduza a hiperglicemia (Prabowo et al., 2014), além de aumentar a quantidade de oxigênio dissolvido no sangue e promover angiogênese no tecido lesado. Assim, a OH aumenta a quantidade de oxigênio e de nutrientes entregues ao ferimento, o que acelera o processo de reparo (Jan et al.,2009; Rocha et al, 2015). Alguns estudos demonstraram que a oxigenoterapia hiperbárica controla a permeabilidade vascular, diminui o edema tecidual e reduz danos inflamatórios, tendo resultados positivos na neoformação óssea (Jan et al., 2009). A OH também é capaz de minimizar os efeitos negativos causados pela hiperglicemia e isquemia em diabéticos na deposição do colágeno, aproximando os diabéticos à condição dos normoglicêmicos e permitindo a deposição de colágeno de forma adequada nos estágios iniciais do reparo (André-Lévigne et al., 2016). Esse efeito está associado ao aumento na diferenciação osteoblástica e redução de osteoclastos, sendo importante na regeneração óssea (Rocha et al.,2015). Esse fato pode justificar a melhora do reparo ósseo observado no grupo diabético com OH do presente estudo.

A oxigenoterapia hiperbárica também regula positivamente os níveis de mRNA, de Wnt3a, β -catenina, e Runx2, aumentando a diferenciação osteogênica das células estromais da medula óssea (BMSC), bem como seu efeito sobre a via de sinalização Wnt3a/ β -catenin (Lin et al., 2013). Como o DM1 compromete o metabolismo e o reparo ósseos os efeitos positivos da OH, principalmente nos períodos iniciais do reparo (Rocha et al, 2015), podem ter contribuído com a melhora do reparo no grupo diabético os colocando a uma situação muito próxima ao grupo normoglicêmico.

Nossos achados confirmaram estudos anteriores (Okubo et al., 2001; Wu, Malda, Crawford e Xiao, 2007) e aumentaram o conhecimento sobre os efeitos dos mecanismos da OH no processo inicial de reparo ósseo. Os resultados apresentados neste estudo em animais, juntamente com outros estudos em humanos (Kalani et al., 2002) sugerem que a OH é uma estratégia valiosa e segura que pode ser usada para aprimorar e melhorar as terapias clínicas regenerativas desenvolvidas para o diabetes. No entanto, mais estudos são necessários para entender os mecanismos relacionados ao aumento do potencial replicativo de células β expostas à terapia com OH.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que a doença diabetes mellitus Tipo 1 atrasa o processo de regeneração óssea e a terapia por oxigenação hiperbárica, reduz os níveis de glicose no sangue e aumenta número de vasos sanguíneos, melhorando a regeneração óssea em animais diabéticos. Portanto, a oxigenação hiperbárica é um tratamento importante para minimizar os efeitos deletérios do diabetes no processo de regeneração óssea.

REFERÊNCIAS

1. Andre-Levigne D, Modarressi A, Pignel R, Bochaton-Piallat ML, Pittet-Cuenod B. Hyperbaric oxygen therapy promotes wound repair in ischemic and hyperglycemic conditions, increasing tissue perfusion and collagen deposition. *Wound repair and regeneration* : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society. 2016 Nov;24(6):954-65. PubMed PMID: 27684570. <https://doi.org/10.1111/wrr.12480>
2. Batista JD, Zanetta-Barbosa D, Cardoso SV, Dechichi P, Rocha FS, Pagnoncelli RM. Effect of low-level laser therapy on repair of the bone compromised by radiotherapy. *Lasers in medical science*. 2014 Nov;29(6):1913-8. PubMed PMID: 24913422. <https://doi.org/10.1007/s10103-014-1602-8>
3. Capla JM, Grogan RH, Callaghan MJ, Galiano RD, Tepper OM, Ceradini DJ, et al. Diabetes impairs endothelial progenitor cell-mediated blood vessel formation in response to hypoxia. *Plastic and reconstructive surgery*. 2007 Jan;119(1):59-70. PubMed PMID: 17255657. <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000244830.16906.3f>
4. 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. *Laboratory animals*. 2011 Jul;45(3):131-40. PubMed PMID: 21478271. Pubmed Central PMCID: 3917305. <https://doi.org/10.1258/la.2010.010090> . <https://doi.org/10.1258/la.2010.010090>
5. Dias PC, Limirio P, Linhares CRB, Bergamini ML, Rocha FS, Morais RB, et al. Hyperbaric Oxygen therapy effects on bone regeneration in Type 1 diabetes mellitus in rats. *Connective tissue research*. 2018 Nov;59(6):574-80. PubMed PMID: 29378458. <https://doi.org/10.1080/03008207.2018.1434166>
6. Faleo G, Fotino C, Bocca N, Molano RD, Zahr-Akrawi E, Molina J, et al. Prevention of autoimmune diabetes and induction of beta-cell proliferation in NOD mice by hyperbaric oxygen therapy. *Diabetes*. 2012 Jul;61(7):1769-78. PubMed PMID: 22566533. Pubmed Central PMCID: 3379675. <https://doi.org/10.2337/db11-0516>
7. Fotino C, Molano RD, Ricordi C, Pileggi A. Transdisciplinary approach to restore pancreatic islet function. *Immunologic research*. 2013 Dec;57(1-3):210-21. PubMed PMID: 24233663. <https://doi.org/10.1007/s12026-013-8437-4>

8. Graves D, Alblowi J, Paglia D, O'Connor J, Lin S. Impact of Diabetes on Fracture Healing. *Journal of Experimental & Clinical Medicine*. 2011 02/01;3:3-8. <https://doi.org/10.1016/j.jecm.2010.12.006>
9. Ijichi H, Taketomi A, Yoshizumi T, Uchiyama H, Yonemura Y, Soejima Y, et al. Hyperbaric oxygen induces vascular endothelial growth factor and reduces liver injury in regenerating rat liver after partial hepatectomy. *Journal of hepatology*. 2006 Jul;45(1):28-34. PubMed PMID: 16513203. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2005.12.021>
10. 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 surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2009 Feb;107(2):157-63. PubMed PMID: 18805720. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2008.07.010>
11. Jing D, Yan Z, Cai J, Tong S, Li X, Guo Z, et al. Low-1 level mechanical vibration improves bone microstructure, tissue mechanical properties and porous titanium implant osseointegration by promoting anabolic response in type 1 diabetic rabbits. *Bone*. 2018 Jan;106:11-21. PubMed PMID: 28982588. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.10.001>
12. Junqueira LCU, Carneiro J. *Histologia básica: textos e atlas: Guanabara-Koogan*; 2008.
13. Kalani M, Jorneskog G, Naderi N, Lind F, Brismar K. Hyperbaric oxygen (OH) therapy in treatment of diabetic foot ulcers. Long-term follow-up. *Journal of diabetes and its complications*. 2002 Mar-Apr;16(2):153-8. PubMed PMID: 12039398. Epub 2002/06/01. eng. [https://doi.org/10.1016/S1056-8727\(01\)00182-9](https://doi.org/10.1016/S1056-8727(01)00182-9)
14. Kawada S, Wada E, Matsuda R, Ishii N. Hyperbaric hyperoxia accelerates fracture healing in mice. *PloS one*. 2013;8(8):e72603. PubMed PMID: 23967323. Pubmed Central PMCID: 3743787. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072603>
15. Limirio P, da Rocha Junior HA, Morais RB, Hiraki KRN, Balbi APC, Soares PBF, et al. Influence of hyperbaric oxygen on biomechanics and structural bone matrix in type 1 diabetes mellitus rats. *PloS one*. 2018;13(2):e0191694. PubMed PMID: 29451877. Pubmed Central PMCID: 5815582. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191694>
16. Lin D, Li Q, Li W, Duckmanton N, Swain M. Mandibular bone remodeling induced by dental implant. *Journal of biomechanics*. 2010 Jan 19;43(2):287-93. PubMed PMID: 19815211. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2009.08.024>

17. Lu MP, Wang R, Song X, Chibbar R, Wang X, Wu L, et al. Dietary soy isoflavones increase insulin secretion and prevent the development of diabetic cataracts in streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutrition research*. 2008 Jul;28(7):464-71. PubMed PMID: 19083447. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2008.03.009>
18. MacLean M, Derk J, Ruiz HH, Juranek JK, Ramasamy R, Schmidt AM. The Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) and DIAPH1: Implications for vascular and neuroinflammatory dysfunction in disorders of the central nervous system. *Neurochemistry international*. 2019 Jun;126:154-64. PubMed PMID: 30902646. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.03.012>
19. Mitchell RN. *Robbins & Cotran: fundamentos de patologia*: Elsevier; 2012.
20. Napoli N, Chandran M, Pierroz DD, Abrahamsen B, Schwartz AV, Ferrari SL, et al. Mechanisms of diabetes mellitus-induced bone fragility. *Nature reviews Endocrinology*. 2017 Apr;13(4):208-19. PubMed PMID: 27658727. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.153>
21. 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 Apr 1;48(4):733-40. PubMed PMID: 21185416. Pubmed Central PMCID: 3062641. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2010.12.016>
22. Okazaki K, Yamaguchi T, Tanaka K, Notsu M, Ogawa N, Yano S, et al. Advanced glycation end products (AGEs), but not high glucose, inhibit the osteoblastic differentiation of mouse stromal ST2 cells through the suppression of osterix expression, and inhibit cell growth and increasing cell apoptosis. *Calcified tissue international*. 2012 Oct;91(4):286-96. PubMed PMID: 22903508. <https://doi.org/10.1007/s00223-012-9641-2>
23. Palermo A, D'Onofrio L, Buzzetti R, Manfrini S, Napoli N. Pathophysiology of Bone Fragility in Patients with Diabetes. *Calcified tissue international*. 2017 Feb;100(2):122-32. PubMed PMID: 28180919. <https://doi.org/10.1007/s00223-016-0226-3>
24. Prabowo S, Nataatmadja M, Hadi JP, Dikman I, Handajani F, Tehupuring SEJ, 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;Vol.06No.15:9. <https://doi.org/10.4236/health.2014.615228>

25. Rajagopalan G, Kudva YC, David CS. Is H₂O₂ a cool treatment for type 1 diabetes? *Diabetes*. 2012 Jul;61(7):1664-6. PubMed PMID: 22723274. Pubmed Central PMCID: 3379652. <https://doi.org/10.2337/db12-0527>
26. Reis JS, Veloso CA, Mattos RT, Purish S, Nogueira-Machado JA. Estresse oxidativo: revisão da sinalização metabólica no diabetes tipo 1. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2008;52:1096-105. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302008000700005>
27. 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 surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*. 2015 Nov;120(5):581-7. PubMed PMID: 26324750. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2015.06.039>
28. Sander AL, Henrich D, Muth CM, Marzi I, Barker JH, Frank JM. In vivo effect of hyperbaric oxygen on wound angiogenesis and epithelialization. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2009 Mar-Apr;17(2):179-84. PubMed PMID: 19320885. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00455.x>
29. Wang X, Liu L, Zhang W, Zhang J, Du X, Huang Q, et al. Serum metabolome biomarkers associate low-level environmental perfluorinated compound exposure with oxidative /nitrosative stress in humans. *Environmental pollution*. 2017 Oct;229:168-76. PubMed PMID: 28599201. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.04.086>
30. Wu D, Malda J, Crawford R, Xiao Y. Effects of hyperbaric oxygen on proliferation and differentiation of osteoblasts from human alveolar bone. *Connective tissue research*. 2007;48(4):206-13. PubMed PMID: 17653977. <https://doi.org/10.1080/03008200701458749>
31. Wysokinski D, Pawlowska E, Blasiak J. RUNX2: A Master Bone Growth Regulator That May Be Involved in the DNA Damage Response. *DNA and cell biology*. 2015 May;34(5):305-15. PubMed PMID: 25555110. <https://doi.org/10.1089/dna.2014.2688>