



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



LORENA SOARES ANDRADE ZANATTA

REPARO ÓSSEO EM RATOS DIABÉTICOS.
EFEITO DA LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA.

UBERLÂNDIA

2020

LORENA SOARES ANDRADE ZANATTA

**REPARO ÓSSEO EM RATOS DIABÉTICOS.
EFEITO DA LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado a
Faculdade de Odontologia da Universidade
Federal de Uberlândia, como requisito parcial
para obtenção do título de Bacharel em
Odontologia

Orientadora: Prof^a. Dra. Paula Dechichi
Coorientadora: Ms. Jessyca Figueira Venâncio

UBERLÂNDIA

2020

Dedico este trabalho a todos aqueles que
apesar das circunstâncias lutam pelos seus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela vida, pelo amor e sustento, por permitir que eu experimentasse tantos milagres durante a jornada acadêmica. Agradeço por renovar minhas forças e por me ajudar a prosseguir.

Agradeço à minha avó Maria Soares, por me inspirar a estudar, por cada oração e por me apoiar independentemente da situação.

Agradeço ao meu esposo Lucas Zanatta por viver comigo este sonho, em meio aos desafios da vida, permaneceu ao meu lado.

Agradeço à minha filha Rebeca Zanatta por me inspirar tanto a prosseguir, e por todas as aulas que você assistiu comigo. Chego na etapa final deste curso, também para te ensinar a persistir e para que de alguma forma proporcione melhores oportunidades para você.

Agradeço à minha família, meus tios e primos que estiveram comigo em todas as etapas. Tia Mary, tia Cris, tia Maria e tio Wlhinderson que me ajudaram em tudo que eu precisava. Agradeço à minha prima Leida por toda ajuda e por me proporcionar um meio de transporte para que eu pudesse vir para a faculdade, o que facilitou conciliar os estudos com a maternidade. Às minhas primas Karine, Marcela e Vanisse, pelo carinho e amizade.

Agradeço à minha sogra Luci, por me ajudar a cuidar da Rebeca, por acreditar nos meus sonhos e me apoiar. Ao meu sogro Antônio e cunhados Mathias e Ana pelo apoio.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Paula Dechichi, pela oportunidade de participar dos seus Projetos de Pesquisa. Agradeço por me ensinar tanto, como profissional e como ser humano. Por ser tão compreensiva durante toda essa jornada. Obrigada por cada orientação, pelo seu exemplo, e por me ajudar a acreditar que seria possível concluir esta etapa.

Agradeço à minha coorientadora Ms. Jessyca Venâncio, por me ensinar e pela paciência durante a etapa de aprendizagem. Ao Dr. Pedro Henrique Limirio, sempre disposto a ajudar com tanta dedicação. Aos colegas de pesquisa, Camila Rodrigues, Pedro Gomes, Marina Faggione e Amanda por todo apoio.

Agradeço à Profa. Dra. Alessandra Maia e Prof. Dr. Sérgio Vitorino, que me ouviram e me ajudaram tantas vezes na coordenação.

Agradeço meu amigo Lucas Décio, pela cumplicidade e amizade como meu parceiro de clínica e estudos durante toda a graduação. Minha amiga Stefanya Dias, por me ajudar de todas as formas possíveis. A todos meus colegas da graduação, que estiveram comigo e se mobilizaram para me ajudar em um dos momentos mais difíceis da minha vida.

Agradeço aos meus discipuladores Milene e Gustavo Miranda, por toda ajuda e por entenderem que eu precisaria dedicar mais tempo aos estudos para conseguir finalizar a graduação.

Agradeço aos meus amigos de vida e fé: Silvia, Aureliano, Ester, Franciele, Jean, Henri e Jani. Vocês ajudaram a tornar a jornada mais leve.

À Ester, Fabrício, Lilian e Advaldo, e aos 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).

À Divisão de Assistência e Orientação Social (DIASE) e a Diretoria de Promoção de Igualdades e Apoio Educacional (DIPAE) da Universidade Federal de Uberlândia.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), também pelo financiamento desta pesquisa.

Ao Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) e à Rede de Biotérios de Roedores (REBIR) 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.

“O futuro pertence àqueles que
acreditam na beleza de seus sonhos.”

Eleanor Roosevelt

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar a evolução do reparo ósseo de lesões em fêmures de ratos diabéticos, submetidos à laserterapia de baixa potência (LTBP). Vinte e quatro ratos foram divididos em dois grupos: Normoglicêmicos (N) e Diabéticos (D), havendo para cada grupo três períodos de análise: 3, 5 e 7 dias. Os animais do grupo D foram induzidos ao diabetes *mellitus* (DM) por injeção intravenosa de estreptozotocina (60mg/kg). Trinta dias após a indução, foram criados defeitos ósseos nos fêmures de todos os animais. A LTBP iniciou imediatamente após o procedimento cirúrgico e foi realizada a cada 48h, apenas no fêmur esquerdo. O fêmur direito não recebeu tratamento, sendo considerado grupo controle. Os animais foram sacrificados 3, 5 e 7 dias, após a cirurgia. Os fêmures foram removidos e separados em quatro subgrupos: Normoglicêmicos, Diabéticos, Normoglicêmicos-LTBP e Diabéticos-LTBP. Em seguida, os fêmures foram fixados em paformaldeído 4% em PBS 0,1M, desmineralizados em EDTA e processados para inclusão em parafina. Os cortes histológicos de 5µm de espessura foram corados em hematoxilina e eosina e, posteriormente, digitalizados. O reparo ósseo foi avaliado considerando o preenchimento da lesão por tecido ósseo neoformado, presença de coágulo, tecido de granulação e espessura das trabéculas ósseas na área da lesão. O grupo Diabético apresentou maior presença de coágulo residual, tecido de granulação e menor espessura de trabéculas, comparado aos grupos normoglicêmicos e Diabéticos-LTBP, nos respectivos períodos experimentais. O reparo ósseo do grupo Diabético-Laserterapia foi, aparentemente, semelhante ao grupo Normoglicêmico. Os resultados mostraram que o diabetes prejudicou o processo de reparo ósseo e a LTBP favoreceu a neoformação óssea nos diabéticos.

Palavras Chaves: Reparo ósseo. Laserterapia de Baixa Potência. Diabetes *Mellitus*.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the bone repair evolution of lesions in femurs of diabetic rats, submitted to low power laser therapy (LTBP). Twenty-four rats were divided into two groups: Normoglycemic (N) and Diabetic (D), with three analysis periods for each group: 3, 5 and 7 days. Group D animals were induced to diabetic *mellitus* by intravenous injection of streptozotocin (60mg / kg). Thirty days after induction, bone defects were created in the femurs of all animals. LTBP started immediately after the surgical procedure and was performed every 48 hours, only in the left femur. The right femur did not receive treatment, being considered a control group. The animals were sacrificed 3, 5 and 7 days after surgery. The femurs were removed and separated into four subgroups: Normoglycemic, Diabetic, Normoglycemic-LTBP and Diabetic-LTBP. Then, the femurs were fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1M PBS, demineralized in EDTA and processed for embedded in paraffin. The 5 µm thick histological sections were stained with hematoxylin and eosin, and digitalized. Bone repair was assessed considering the filling of the lesion by newly formed bone tissue, presence of clot, granulation tissue, and bone trabeculae thickness. The Diabetic group showed a greater presence of residual clot, granulation tissue and less thick trabeculae, compared to the normoglycemic and Diabetic-LTBP groups, in the respective experimental periods. Bone repair in the Diabetic-Laser therapy group was apparently like the Normoglycemic group. The results showed that diabetes impaired the bone repair process and LTBP improved bone neoformation in diabetics.

Keywords: Bone Repair. Low Level Laser Therapy. Diabetes *Mellitus*.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVO	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1. Procedimento Experimental.....	16
3.2. Indução do Diabetes <i>Mellitus</i> (DM)	17
3.3. Procedimento cirúrgico	18
3.4. Laserterapia	19
3.5. Obtenção e processamento histológico dos espécimes	19
3.6. Análise histológica	21
4. RESULTADOS	23
4.1. Análise histológica qualitativa	23
4.2. Análise Semiquantitativa.....	26
5. DISCUSSÃO	28
6. CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
ANEXO	40

1. INTRODUÇÃO

O reparo ósseo constitui um processo altamente complexo, envolvendo uma série de eventos biológicos, que determinam a restauração da integridade do tecido ósseo (ORYAN *et al.*, 2015).

O tecido ósseo é um conjuntivo especializado constituído por matriz orgânica extracelular mineralizada, células e líquido intersticial (DIMITRIOU *et al.*, 2011). A mineralização da matriz confere a este tecido dureza, permitindo-lhe desempenhar importantes funções de sustentação de tecidos moles, proteção de órgãos vitais, conter a medula óssea e fornecer suporte para os músculos esqueléticos (NANCI, 2012; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2017). Os ossos também funcionam como depósito de lipídeos, cálcio, fosfato, magnésio, e outros íons importantes, contribuindo para a osmolaridade dos fluidos corporais. Externamente os ossos são revestidos por perióstio, e internamente pelo endóstio, ambos com células osteogênicas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2017).

Os osteoblastos são responsáveis por sintetizar e secretar a matriz orgânica (osteóide), regular sua mineralização e recrutar e ativar os osteoclastos, responsáveis pela reabsorção da matriz óssea. Ao longo da formação da matriz óssea alguns osteoblastos podem ser incorporados a essa matriz tornando-se osteócitos. Essas células ficam aprisionadas em lacunas na matriz mineralizada e, atualmente, são reconhecidas como uma fase celular transitória. Os osteócitos podem se comunicar entre si e com as células da superfície óssea por meio de seus prologamentos contidos nos canalículos que partem das lacunas. Por meio dessa rede funcional, os osteócitos exercem importante papel devido à sua capacidade de funcionarem como sensores de tensão e estresse, sinais importantes na manutenção da integridade da estrutura óssea (BURGER, KLEIN-NULEND *et al.*, 2003; KNOTHE TATE, ADAMSON *et al.*, 2004).

Os osteoclastos, são células gigantes resultantes da fusão de células do sistema fagocitário mononuclear na medula óssea. Os osteoclastos por sua vez, dão origem aos monócitos e os macrófagos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2017). A maturação dos osteoclastos é estimulada pelo mediador RANKL expresso em osteoblastos. Na ocorrência de lesões ósseas, citocinas pró-inflamatórias, como IL1 e

TNF- α , influenciam a ação dos osteoblastos e liberação do RANKL, estimulando assim, a maturação e ação dos osteoclastos no processo de reabsorção e remodelação óssea (TANAKA *et al.*, 2005).

Macroscopicamente, os ossos podem ser compactos (cortical), sem cavidades visíveis, ou esponjoso (trabecular), formado por trabéculas que delimitam pequenas cavidades, ocupadas por medula óssea. Ambos, ossos compacto e esponjoso, têm a mesma estrutura histológica, ou seja, possuem as mesmas células e matriz óssea. Histologicamente, o tecido ósseo pode ser imaturo (primário) ou maduro (secundário ou lamelar), o que os diferencia, basicamente, é a organização tridimensionais de suas fibrilas colágenas (FREITAS, 2001; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2017).

O tecido ósseo imaturo é o primeiro a ser formado durante a osteogênese e em processos de reparo ósseo. A matriz produzida pelos osteoblastos neste estágio não possui organização definida, apresentando fibrilas de colágeno entrelaçadas com grande número de osteócitos distribuídos de maneira irregular, no interior da matriz óssea neoformada (YU *et al.*, 1997; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2017).

Progressivamente, osteoclastos e osteoblastos substituem o tecido ósseo primário por secundário ou lamelar. Nesse, as fibrilas colágenas são organizadas em lamelas, dispostas paralelamente umas às outras ou de forma concêntrica, em torno de um canal central, canal de Havers, por onde correm vasos sanguíneos e nervos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2017).

Os ossos são estruturas dinâmicas, crescem, remodelam-se e mantêm-se ativos durante toda a vida do organismo. A constante remodelação do tecido ósseo é realizada pelas células ósseas, responsáveis pela constante formação, reabsorção, reparação e manutenção da microarquitetura óssea (NANCI, 2012). A regeneração óssea é um dos processos de reparo mais importantes do corpo, considerando que poucos órgãos são aptos a realizar a regeneração (GIANNOUDIS *et al.*, 2011).

Quando o osso é lesionado, pode ocorrer a ruptura do periósteo e endósteo, destruição da matriz (SCHROEDER & MOSHEIFF, 2011) e o rompimento de vasos sanguíneos, causando hemorragia local, que preencherá a área da lesão, originando o coágulo. O coágulo, é essencial para os eventos inflamatórios que se seguem objetivando o reparo tecidual (CONSOLARO, 2009). O processo inflamatório local é necessário para a evolução do processo de reparação, iniciado em resposta à injúria promovendo angiogênese, estímulo à produção de fator de crescimento endotelial

vascular (VEGF) e osteogênese. Além da fase inflamatória, ocorre a fase reparadora, com a formação de tecido fibroso e ósseo, finalizando com a remodelação óssea (SFEIR *et al.*, 2005). O tecido ósseo tem uma grande capacidade de regeneração, normalmente sendo possível restaurar sua arquitetura e propriedades mecânicas. Contudo, essa capacidade pode ser prejudicada se o suprimento sanguíneo for deficiente, ocorrer instabilidade mecânica ou competição com tecidos de alta proliferação (PINHEIRO & GERBI, 2006). Também, dependendo da extensão da lesão ou comprometimento por radioterapia ou doenças sistêmicas, como o diabetes, a regeneração óssea pode ser limitada (BATISTA *et al.*, 2015).

Diabetes *mellitus* (DM) corresponde a um grupo de doenças metabólicas que se caracterizam pelo quadro de hiperglicemia crônica, decorrente de alterações na secreção e/ou ação da insulina. Estima-se que cerca de 463 milhões de pessoas em todo o mundo sejam portadoras dessa doença e que em 2045 esse número aumente para quase 700 milhões. No Brasil calcula-se aproximadamente 16 milhões de pessoas sejam diabéticas. Cerca de 50% dos portadores de diabetes desconhecem o diagnóstico (IDF, 2019).

As altas concentrações plasmáticas de glicose, características do diabetes, conduzem ao desenvolvimento de degenerações crônicas como cardiopatia, nefropatia, retinopatia e neuropatia. Como consequência, a DM é considerada a principal causa de cegueira, insuficiência renal, neuropatias debilitantes e doenças cardiovasculares (BARBOSA *et al.*, 2009). A hiperglicemia apresenta sintomas como poliúria, polidipsia, perda de peso, polifagia e visão turva ou por complicações agudas que podem levar a cetoacidose diabética. Estudos apontam que diabéticos possuem maior predisposição a inflamação, maior incidência de fístulas, deiscências, hérnias incisionais e complicações cardiovasculares em procedimentos cirúrgicos (GROOS *et al.*, 2002).

As características celulares e moleculares do tecido ósseo também são alteradas sob condições de DM. Sugere-se que não apenas a funcionalidade dos osteoblastos pode estar comprometida no microambiente diabético, mas também que as células osteoprogenitoras podem mudar seu destino de diferenciação na direção da linhagem adipogênica, aumentando assim a quantidade de tecido adiposo no processo de reparação (HAMMAN *et al.*, 2011; BROWM *et al.*, 2014). O *turnover* ósseo também pode ser alterado na presença da DM, tendo impacto negativo na formação óssea ou reabsorção óssea (STARUP-LINDE, 2015). Além disso, a geração

de produtos finais de glicação avançada (AGEs) devido à presença de hiperglicemia é capaz de alterar a matriz óssea e reduzir a qualidade óssea (LIMIRIO *et al.*, 2018).

Em diabéticos, a região de reparo apresenta maior quantidade de coágulo e tecido de granulação, juntamente com redução na neoformação óssea (IKI *et al.*, 2017). O arranjo trabecular apresenta trabéculas ósseas mais finas, caracterizando comprometimento no reparo ósseo (PARK & KANG, 2012). Além disso, a formação e a função dos osteoblastos está comprometida, levando a redução da deposição da matriz óssea, problemas na mineralização e atraso no processo de reparo ósseo como um todo, além de redução do fluxo sanguíneo e da densidade microvascular (SANTANA *et al.*, 2003; GRAVES *et al.*, 2003).

Em normoglicêmicos, na fase inflamatória do processo de reparação óssea, ocorre secreção do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e de interleucinas (IL), que estimulam osteoblastos a produzir o Fator estimulador de colônia (M-CSF). Esse último irá atuar na medula óssea, estimulando a proliferação de células precursoras de osteoblastos (GERSTENFELD *et al.*, 2003). Em indivíduos diabéticos, a fase inflamatória é prolongada, retardando assim o reparo tecidual (AL- WATBAN., 2001). O impacto do DM no reparo de fraturas ósseas representa um problema importante para pacientes que sofrem de diabetes, pois pode ocorrer complicações clínicas pós-cirúrgicas, aumento de risco de infecção e amputação e aumento da mortalidade (SAITO *et al.*, 2014; FURST *et al.*, 2016).

Embora existam muitos estudos sobre a reparação óssea, ainda são necessárias investigações sobre os mecanismos envolvidos e possíveis terapias coadjuvantes que possam otimizar esse processo, especialmente, em situações adversas, como no diabetes. Diversas terapias complementares têm sido sugeridas na tentativa de melhorar a qualidade do processo de reparo ósseo como aplicação de estímulos químicos, utilização de biomateriais, proteínas morfogenéticas ósseas, bem como o uso de estímulos físicos, ultra-sonografia, campos eletromagnéticos e a fotobioestimulação (PRETEL *et al.*, 2007).

Dentre essas terapias, a laserterapia de baixa potência (LTBP) tem sido sugerida para melhorar o reparo ósseo, especialmente em condições adversas, como lesões extensas ou em osso comprometido por radioterapia ou doenças sistêmicas (BATISTA, 2014; SANTINONI *et al.*, 2017). Pesquisadores de várias áreas da saúde têm verificado a contribuição da LTBP no reparo de tecidos duros (BATISTA, 2015) e moles (WALKER, 2000), tais como, em feridas cirúrgicas, fraturas ósseas, pós-cirúrgico de extrações dentárias, tratamento de osteonecrose do maxilar, defeitos

periodontais e pós-operatório de enxertos ósseos (SANTINONI *et al.*, 2017).

A LTBP é uma radiação altamente concentrada, não invasiva, e não ionizante que, em contato com diferentes tecidos, promove efeitos fotobiomoduladores (ZANCANELA, 2009). Laser é uma abreviação na língua inglesa para *light amplification by stimulated emission of radiation*, ou seja, amplificação da luz por emissão estimulada de radiação (ROBERTSON, *et al.*, 2009). O dispositivo utilizado na LTBP produz radiação eletromagnética com características específicas: ela é monocromática, com comprimento de onda muito bem definido; coerente, todos os fótons que compõem o feixe emitido estão em fase; e colimada, propaga-se como um feixe de ondas praticamente paralelas. Os fótons que a compõem são todos da mesma cor e com o mesmo comprimento de onda, isto faz com que ela tenha uma luz pura, sendo esta uma característica muito importante, devido à absorção seletiva do tecido *in vivo* (AGNE, 2017).

Estudos experimentais, *in vitro* e *in vivo*, têm sugerido que a LTBP modula vários processos biológicos em modelos animais. Promovem efeitos de fotobiomodulação celular e respostas terapêuticas induzidas por reações fotoquímicas, fotoelétricas e fotoenergéticas (SANTINONI *et al.*, 2017). A LTBP acelera a reparação tecidual, estimulando a proliferação celular; a síntese de ATP (KARU, 1989) e do colágeno, com formação de procolágeno tipo I e tipo III (PINHEIRO & GERBI, 2009). A LTBP ainda promove o aumento na concentração das β -endorfinas e, conseqüentemente, desencadeia efeito analgésico (MERLI *et al.*, 2005; CHOW *et al.*, 2011).

O estímulo do fotorreceptor citocromo-C-oxidase, promovido pela LTBP aumenta o metabolismo e produção de energia, conseqüentemente aumenta o metabolismo oxidativo mitocondrial. Assim, inicia-se uma cascata de reações celulares que modulam o comportamento biológico, modulando a angiogênese, ação dos macrófagos e linfócitos; a proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno; diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos, entre outros, acelerando o processo de reparação (MERLI *et al.*, 2005; BATISTA *et al.*, 2015; SANTINONI *et al.*, 2017).

Em ratos diabéticos, a LTBP tem apresentado efeito benéfico no reparo ósseo (JAVADIEH *et al.*, 2009; AKYOL *et al.*, 2010), especialmente nas fases iniciais de reparação (PARK & KANG, 2012).

O uso da LTBP em tecido ósseo tem se mostrado efetivo na modulação da inflamação (LIZARELLI *et al.*, 1999), acelerando a proliferação celular (DÖRTBUDAK *et al.*, 2000) e o reparo ósseo (MERLI *et al.*, 2005; BATISTA *et al.*, 2015). Apesar dos resultados positivos, persiste a necessidade de estudos experimentais para melhor elucidação dos mecanismos da LTBP no reparo ósseo, como também, padronização de doses, potência e tempo de exposição à irradiação (ZEIN *et al.*, 2017; SANTINONI *et al.*, 2017).

2. OBJETIVO

1.1 Objetivo Geral

Avaliar a evolução do reparo ósseo de lesões em fêmures de ratos normoglicêmicos e de ratos diabéticos, submetidos à LTBP.

1.2 Objetivo Específico

Analisar, por meio de parâmetros histológicos, a neoformação óssea, espessura das trabéculas ósseas, presença de coágulo e tecido de granulação, na área da lesão em fêmur de ratos normoglicêmicos ou com diabetes tipo I, por meio de análise qualitativa e semiquantitativa.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Procedimento Experimental

Para realização deste estudo experimental, foram utilizados 24 ratos machos *Rattus norvegicus*, da linhagem *Wistar*, clinicamente sadios com pesos entre 200 e 240g, com cerca de 8 semanas de idade. Os animais foram mantidos em estantes climatizadas a temperatura de 22°C e ciclo claro-escuro de 12 horas, com ração e água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com aprovação prévia do CEUA-UFU (026/14). Em 12 animais, foi realizada a indução ao DM e os outros 12 animais permaneceram normoglicêmicos. Após quatro semanas, foram criados defeitos ósseos nos fêmures direito e esquerdo de todos os animais. Imediatamente após a cirurgia e a cada 48h, foi realizada a laserterapia nos fêmures esquerdos de

todos os animais. Os fêmures direitos dos animais não receberam a terapia, sendo considerado controle, em um estudo pareado. Os animais foram sacrificados em intervalos de 3,5 e 7 dias após o procedimento cirúrgico (Tabela 1). Os fêmures foram removidos e separados em quatro subgrupos iguais: Normoglicêmicos, Diabéticos, Normoglicêmicos e LTBP, Diabéticos e LTBP (Tabela 1). Os fêmures foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato, durante 48h, em seguida desmineralizados em EDTA e processados para inclusão em parafina. Os cortes histológicos de 5µm de espessura foram corados em hematoxilina e eosina e, posteriormente, digitalizados. O reparo ósseo foi avaliado por análise qualitativa e semiquantitativa, sendo nessa considerado o preenchimento da lesão por tecido ósseo neoformado, presença de coágulo, tecido de granulação, e espessura das trabéculas ósseas na área da lesão (Tabela 2).

Tabela 1 – Delineamento experimental dos grupos e períodos dos sacrifícios após procedimento cirúrgico.

<i>Grupos</i>	<i>Animais</i>	<i>Descrição</i>	<i>Períodos experimentais</i>
I	12	Normoglicêmicos	3 dias (n=4), 5 dias (n=4), 7 dias (n=4)
II		Normoglicêmicos + Laserterapia	3 dias (n=4), 5 dias (n=4), 7 dias (n=4)
III	12	Diabéticos	3 dias (n=4), 5 dias (n=4), 7 dias (n=4)
IV		Diabéticos + Laserterapia	3 dias (n=4), 5 dias (n=4), 7 dias (n=4)

3.2 Indução ao Diabetes Mellitus (DM)

Os animais do grupo Diabéticos foram induzidos ao diabetes *mellitus* por meio de injeção intravenosa de estreptozotocina, iniciado com jejum de 24 horas, seguido de anestesia via intraperitoneal utilizando 7mg/Kg de xilazina 2% de relaxante muscular e 100mg/Kg de cloridrato de cetamina 10% anestésico e analgésico. Em seguida, foi administrada dose única de estreptozotocina (STZ) de 60 mg/Kg de peso corporal, diluída em tampão citrato 0,01M, por via intravenosa através da veia peniana. A glicemia foi aferida após 24 horas, 7 dias, 15 dias, 30 dias após a indução e no dia do sacrifício, coletando uma gota de sangue da cauda de cada animal e utilizando glicôsimetro (Accu Check Active, Roche, Jaguaré, SP,

Brasil). Os animais que mantiveram níveis de glicemia superiores a 250 mg/dL foram considerados diabéticos e seguiram no estudo.

3.3 Procedimento Cirúrgico

Os animais foram submetidos à anestesia por via intraperitoneal, utilizando 0,07ml/100g do relaxante muscular cloridrato de xilazina 2%, e 0,1ml/100g do anestésico e analgésico cloridrato de cetamina 10%. Após tricotomia da região coxofemoral, foi realizada a antisepsia da região com solução de Gluconato de Clorexidina Degermante (2%). O procedimento cirúrgico foi realizado conforme o descrito por Batista *et al.* 2015. O animal foi posicionado em decúbito lateral, em seguida o acesso cirúrgico ao fêmur foi obtido por meio de uma incisão contínua longitudinal com 2 cm de extensão. A musculatura foi divulsionada até a exposição do periósteo, que foi incisado e descolado ao longo da área óssea a ser exposta. Na região central da metade distal da diáfise do fêmur, 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. A sutura foi realizada por planos com fio cirúrgico monofilamento *nylon* 4-0 (Fig. 1).

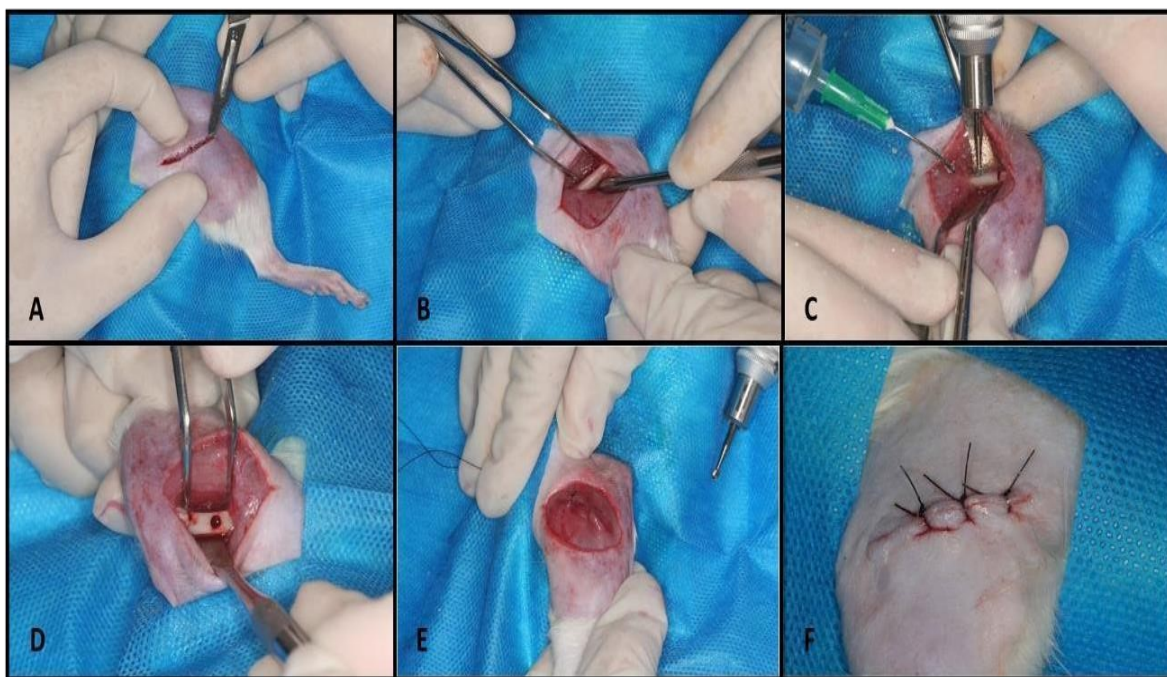


Figura 1 - Cirurgia para criação de defeito ósseo padronizado em fêmur de rato. A – Incisão contínua na região lateral do fêmur. B – Divulsão da musculatura até a exposição do periósteo. C – Rompimento da cortical óssea sob irrigação constante. D – Defeito ósseo criado. E – Sutura da musculatura. F- Sutura em pele. (BATISTA *et al.*, 2015)

3.4 Laserterapia

Para o procedimento de laserterapia foi utilizado o laser de diodo infravermelho (GaAlAs) (Thera-laser III®, DMC Equipamentos, São Carlos, SP/Brasil), com comprimento de onda de $\lambda 830\text{nm}$, potência de 64 mW, diâmetro de feixe de $0,028\text{cm}^2$. A laserterapia foi realizada imediatamente após a cirurgia e a cada 48hs, no fêmur esquerdo dos animais. Para tanto, a ponta do laser foi posicionada perpendicularmente ao longo eixo do fêmur, na condição emissão contínua, em quatro pontos equidistantes (1cm de distância entre os pontos) (Fig. 2). Em cada ponto, foi aplicado durante um minuto a dose de 4 J/cm^2 , totalizando quatro minutos em cada fêmur e a dose total de 16 J/cm^2 por sessão.



Figura 2 - Aplicação do laser de baixa potência no fêmur esquerdo. (BATISTA *et al.*, 2015)

3.5 Obtenção e processamento histológico dos espécime

Após 3, 5 e 7 dias do procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos à eutanásia. Conforme os princípios da Declaração Universal sobre Bem-estar dos Animais, foi realizado o aprofundamento anestésico utilizando xilazina 2%, associado a cetamina 10%, seguido de luxação cervical. Em seguida, foi realizada incisão longitudinal contínua, acompanhando a cicatriz cutânea existente, e os fêmures foram removidos por desarticulação. As epífises dos fêmures foram seccionadas (para facilitar a fixação), utilizando disco diamantado dupla face, sob irrigação com soro fisiológico. Todos os fragmentos ósseos (epífises e diáfises) foram fixados em paraformaldeído 4% em Tampão Fosfato 0,1M, por 48 horas. Em seguida, estes fragmentos foram desmineralizados em solução de EDTA a 4% durante 5 semanas, e então processados para inclusão em parafina pela técnica de rotina para análises histológicas (Fig. 3).

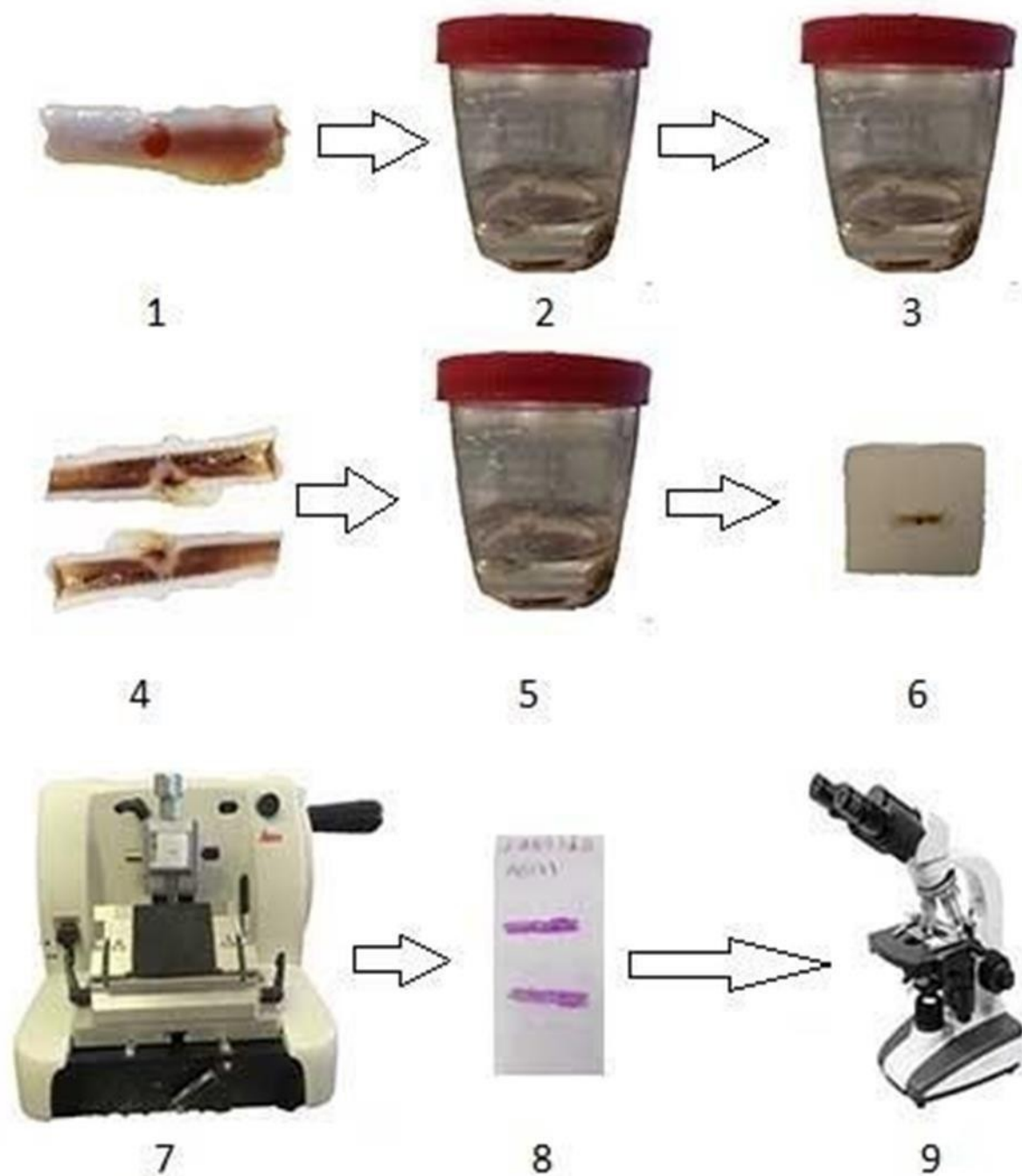


Figura 3 - Ilustração do processamento histológico dos fêmures. 1- Diáfise de fêmur coletado. 2- Fixação em solução de paraformaldeído 4%. 3- Desmineralização em solução de EDTA 4,13%. 4- Diáfise dividida em duas metades. 5- Espécimes em solução tampão fosfato 0,1M. 6- Inclusão em parafina. 7- Microtomia dos espécimes. 8- Lâmina com corte histológico corado em HE. 9- Microscópio utilizado para análise das lâminas histológica.

3.6 *Análise Histológica*

Os blocos de parafina foram cortados utilizando o micrótomo rotativo/semiautomático Leica Biosystems RM2245 (Leica®, Nussloch, Alemanha), para obtenção de cortes com cinco micrômetros de espessura, os quais foram corados em hematoxilina e eosina (HE). As imagens histológicas de quatro lâminas histológicas foram escaneadas, utilizando um scanner digital ScanScope AT Turbo® (Leica Biosystems Nussloch, Shinjuku-ku, Nußloch / Alemanha). Em seguida, foram realizadas análises qualitativas e semiquantitativas das imagens.

Na análise qualitativa foram avaliados os aspectos morfológicos do reparo ósseo na área da lesão, considerando a organização e a espessura das trabéculas ósseas neoformadas, tipo de tecido ósseo, morfologia das células ósseas e presença de coágulo e tecido de granulação.

Na análise semiquantitativa (histomorfométrica) foram avaliados o preenchimento da lesão por tecido ósseo neoformado, presença de coágulo, tecido de granulação, e espessura das trabéculas ósseas na área da lesão. Para cada parâmetro foi atribuído valor (score) de acordo com os critérios apresentados na tabela 2, sendo a análise realizada de forma cega pelo examinador.

Tabela 2 – Parâmetros e critérios utilizados na atribuição de valores (score) para análise histomorfométrica.

Score	0	1	2	3	4
Preenchimento da lesão	Ausência de neoformação óssea na área da lesão.	Neoformação óssea preenchendo até 25% da área da lesão.	Neoformação óssea preenchendo entre 25% e 50% da área da lesão.	Neoformação óssea preenchendo entre 50% e 75% da área da lesão.	Neoformação óssea preenchendo entre 75% e 100% da área da lesão.
Presença de coágulo	Ausência de coágulo na área da lesão.	Coágulo preenchendo até 25% da área da lesão.	Coágulo preenchendo entre 25% e 50% da área da lesão.	Coágulo preenchendo entre 50% e 75% da área da lesão.	Coágulo preenchendo entre 75% e 100% da área da lesão.
Tecido de granulação	Ausência de tecido de granulação na área da lesão.	Pequena quantidade de tecido de granulação na área da lesão.	Grande quantidade de tecido de granulação na área da lesão.		
Espessura das trabéculas	Ausência de trabéculas ósseas na área da lesão.	Trabéculas ósseas delgadas na área da lesão.	Trabéculas ósseas espessas na área da lesão.		

4. RESULTADOS

Durante o período experimental, os animais diabéticos mantiveram hiperglicemia (glicemia média de 486,29 mg/dl), redução de peso, polifagia, polidipsia e poliúria. De forma geral, em todos os grupos, foi verificada progressão do reparo ósseo, ainda que com atraso nos grupos diabéticos. No período de 3 dias, predominou a presença de coágulo e a partir de 5 dias a neoformação óssea foi evidente, e mais expressiva em 7 dias. O reparo ósseo ocorreu a partir da periferia da lesão, por atividade dos osteoblastos, constituindo um tecido ósseo do tipo primário.

4.1 Análise histológica qualitativa

A imagens histológicas mostraram tecido ósseo tipo primário em formação, com osteoblastos na superfície, com morfologia de células em atividade de síntese proteica, e muitos osteócitos incluídos na matriz óssea. Foi possível visualizar a descontinuidade em uma das corticais, compatível com os defeitos ósseos confeccionados.

O processo de neoformação óssea, apresentou-se mais evidente nos períodos 5 e 7 dias em todos em grupos. Entre as trabéculas neoformadas observou-se organização de tecido medular. Não foram observados ocorrência de necrose ou reabsorção óssea inflamatória no interior do defeito ósseo.

Nos fêmures de animais normoglicêmicos com LTBP, no período de 3 dias, observou-se, moderada presença de infiltrado inflamatório e coágulo sanguíneo. Já no período de 5 dias, verificou-se a evolução do reparo com a redução do coágulo e presença de tecido de granulação. Foi observado também, organização do tecido medular, associado ao tecido ósseo neoformado. No período de 7 dias, a área da lesão estava quase completamente preenchida por tecido ósseo neoformado com trabéculas mais espessas e praticamente sem coágulo residual (Fig.4). Aparentemente, o reparo ósseo no grupo normoglicêmicos com LTBP estava adiantado em relação ao grupo normoglicêmico sem LTBP.

A análise histológica, em geral mostrou que o processo de reparo foi mais lento

no grupo diabético. No período de 3 dias, verificou-se intensa presença de infiltrado inflamatório e coágulo sanguíneo. No período de 5 dias, foi observado a presença de fibras colágenas, porém com pouco tecido ósseo neoformado e ainda intensa presença de coágulo e de tecido de granulação. Em 7 dias, também foi verificado a presença de coágulo residual. Houve a neoformação óssea, porém, trabéculas ósseas mais finas comparado aos grupos normoglicêmicos (Fig. 5).

Nos fêmures de animais diabéticos que receberam a LTBP, no período de 3 dias, observou-se, intensa presença de infiltrado inflamatório e coágulo sanguíneo. Já no período de 5 dias, pode-se verificar a evolução do reparo com a redução do coágulo e menor presença de tecido de granulação, comparado ao grupo diabético sem LTBP. Igualmente, em 7 dias, estava presente tecido ósseo neoformado com trabéculas mais espessas comparado ao grupo diabético sem LTBP (Fig. 5).

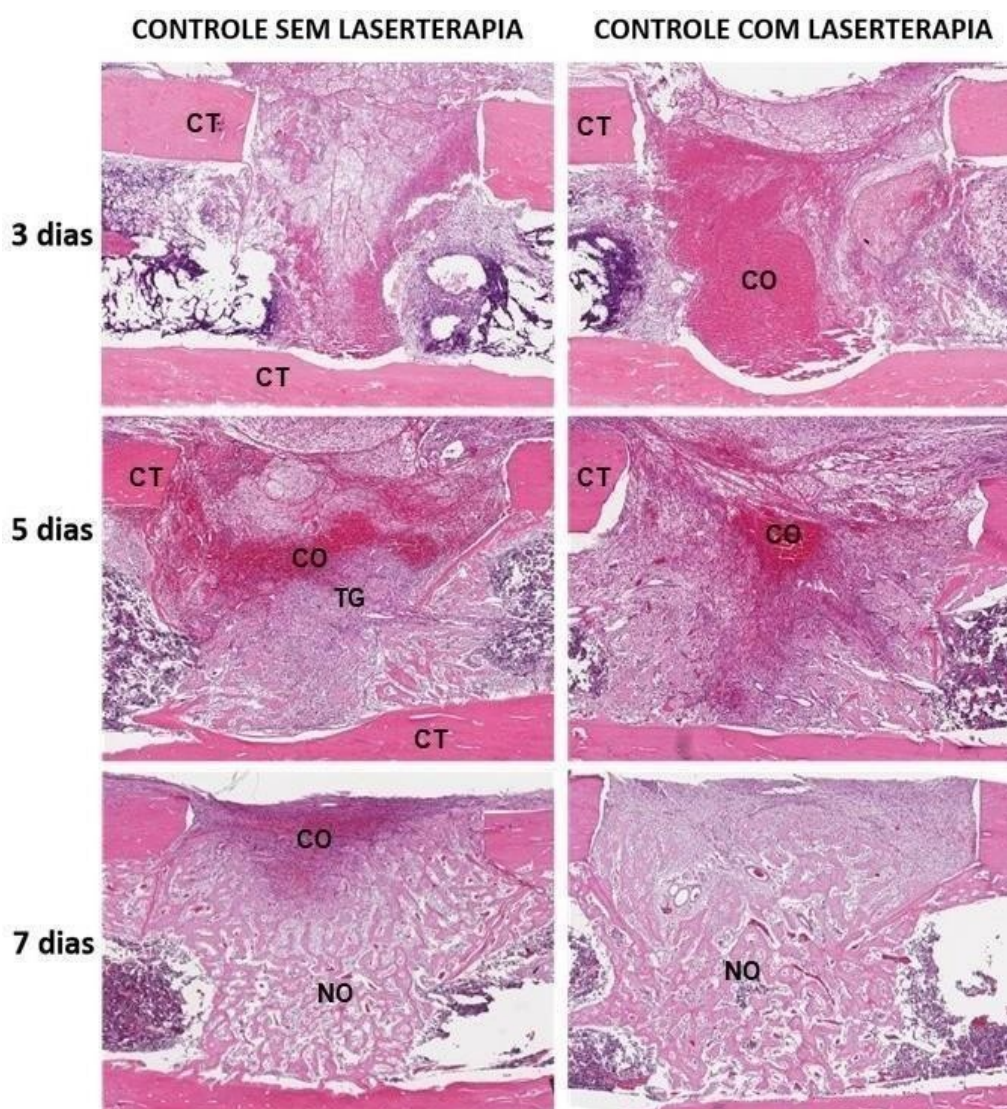


Figura 4 - Imagens histológicas de corte longitudinal de fêmur do grupo normoglicêmico, com e sem LTBP, nos três períodos de análise. Cortical óssea (CT), coágulo sanguíneo (CO) neoformação óssea (NO), tecido de granulação (TG). Hematoxilina e Eosina (ampliação original 20X).

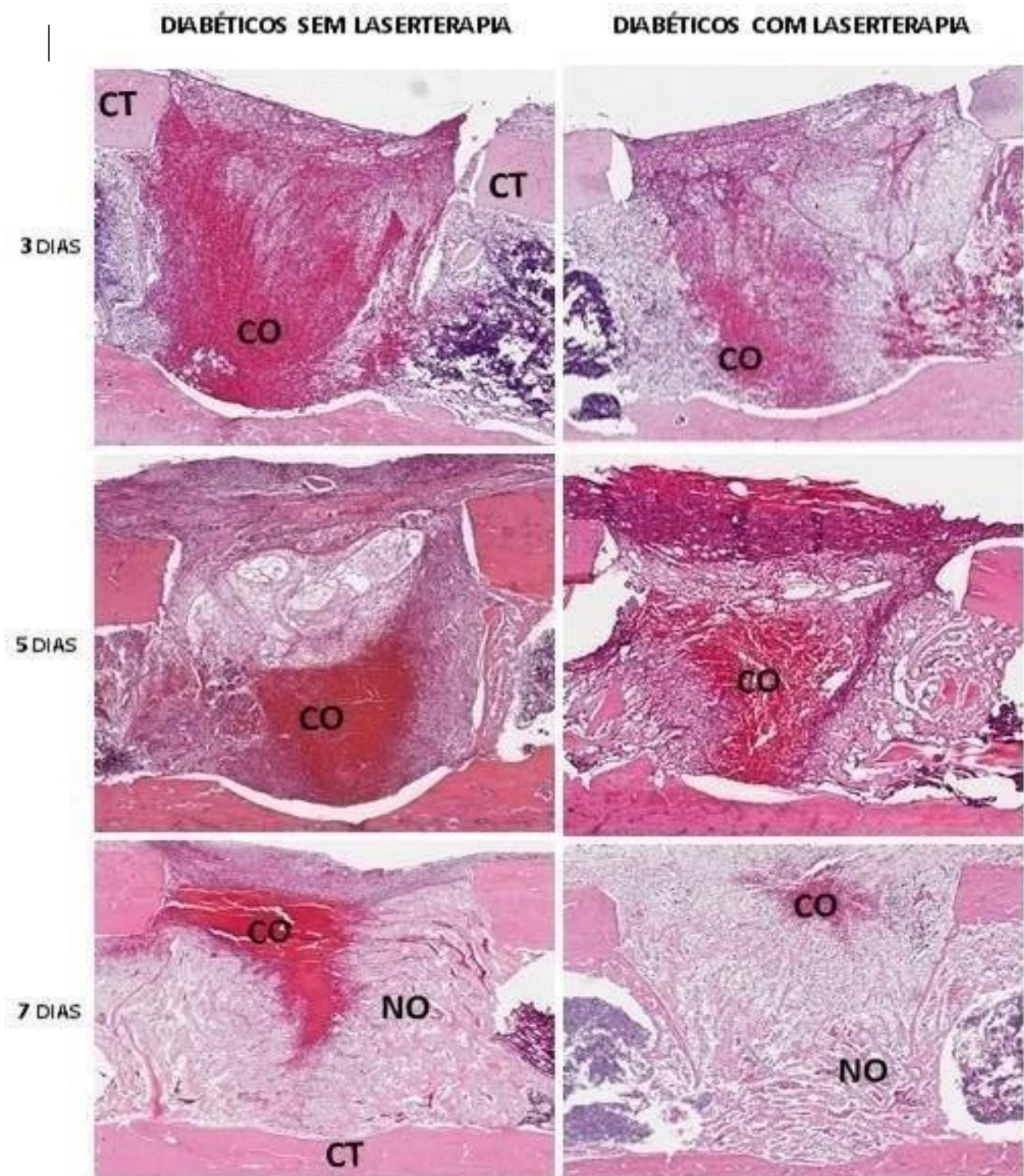


Figura 5 - Imagens histológicas de corte longitudinal de fêmur do grupo Diabético, com e sem laserterapia, nos três períodos de análise. Cortical óssea (CT), coágulo sanguíneo (CO) neoformação óssea (NO), tecido de granulação (TG). Hematoxilina e Eosina (ampliação original 20X).

4.2 Análise Semiquantitativa

A análise histológica de todos os grupos mostrou tecido ósseo primário neoformado na área do defeito ósseo, ao longo dos períodos experimentais. O grupo Diabéticos, em todos os períodos, apresentou maior presença de coágulo residual e tecido de granulação, comparado aos outros grupos. De forma geral, os grupos normoglicêmicos apresentaram tecido ósseo neoformado com trabéculas mais espessas em relação aos grupos diabéticos (Tabela 3).

No grupo Normoglicêmico + LTBP (7 dias), houve menor extensão de coágulo e quantidade de tecido de granulação. O reparo ósseo do Diabético + LTBP foi aparentemente semelhante ao grupo Normoglicêmico (Tabela 4 e 5).

A análise histológica semiquantitativa geral mostrou que no grupo diabético o processo de reparo foi mais lento que o grupo normoglicêmico. No período de 5 dias, o grupo normoglicêmico já mostrou neoformação óssea evidente e redução de áreas de coágulo, enquanto que no grupo diabético havia extensa área de coágulo. Em 7 dias, no grupo normoglicêmico foi possível observar a área da lesão quase completamente preenchida por tecido ósseo neoformado, enquanto que nos diabéticos ainda havia áreas de coágulo (Tabela 4).

Tanto nos animais do grupo normoglicêmico quanto diabéticos, a LTBP promoveu melhora no processo de reparo ósseo. Esse aspecto foi observado pela presença de trabéculas ósseas mais espessas no grupo normoglicêmico + LTBP e pela redução de áreas de coágulo e aumento de neoformação óssea no grupo diabético + LTBP (Tabela 6). Foi possível identificar uma maior atividade de neoformação óssea nos grupos Normoglicêmicos e nos grupos que receberam laserterapia. Nesses, observou-se maior quantidade de tecido ósseo neoformado e uma melhor distribuição do mesmo na área do reparo.

Tabela 3 – Análise semiquantitativa (média de n=4) do preenchimento da lesão com neoformação óssea em todos os grupos e períodos (Score *).

<i>Preenchimento da Lesão com Neoformação Óssea (%)</i>			
	3 dias	5 dias	7 dias
Normoglicêmicos	1	2	3
Normoglicêmicos + LTBP	1	2	4
Diabéticos	1	1	2
Diabéticos + LTBP	1	2	3

*Scores: 1 = 0-25%, 2 = 26-50%, 3 = 26-50%, 4 = 51-75%, de neoformação óssea na área da lesão

Tabela 4 - Análise semiquantitativa (média de n=4) da presença de coágulo na lesão em todos os grupos e períodos (Score *).

<i>Presença de coágulo na Lesão (%)</i>			
	3 dias	5 dias	7 dias
Normoglicêmicos	4	3	2
Normoglicêmicos + LTBP	3	3	1
Diabéticos	4	4	2
Diabéticos + LTBP	4	3	2

* Scores: 0 - Ausência de coágulo na área da lesão; 1 - Coágulo preenchendo até 25% da área da lesão; 2 - Coágulo preenchendo entre 25% e 50% da área da lesão; 3 - Coágulo preenchendo entre 50% e 75% da área da lesão; 4 - Coágulo preenchendo entre 75% e 100% da área da lesão.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliado o reparo ósseo em ratos normoglicêmicos e ratos diabéticos em três períodos diferentes, sendo comparado o reparo de lesões em fêmures que receberam LTBP com os que não receberam a terapia. Os principais parâmetros analisados foram neoformação óssea, espessura das trabéculas ósseas, presença de coágulo e tecido de granulação. As análises histológicas qualitativa e semiquantitativa mostraram que a LTBP melhora o reparo ósseo dos ratos diabéticos.

O animal escolhido para a realização do experimento foi o rato macho da espécie *Rattus norvegicus*, raça *Wistar*. A escolha deve-se ao fato de a espécie possuir dados fundamentais bem conhecidos como curvas de crescimento do animal, do crânio, do esqueleto e de vários órgãos (BIOTÉRIO DE PRODUÇÃO E EXPERIMENTAÇÃO DA FCF-IQ/USP, 2020). Tais dados foram obtidos por meio de várias pesquisas realizadas com a espécie e estão contidas no livro "*The Rat: Data and References Tables for the Albino Rat (Mus norvegicus albinis) and the Norway Rat (Mus norvegicus)*" (DONALDSON, 1915). Ratos da raça *Wistar* são considerados de fácil manipulação e apresentam, em geral, baixa incidência tumoral e a alopecia (BIOTÉRIO DE PRODUÇÃO E EXPERIMENTAÇÃO DA FCF-IQ/USP, 2018).

O anestésico utilizado foi a quetamina 10%, associada ao relaxante muscular cloridrato de xilazina 2%. A quetamina é um agente anestésico dissociativo (CRUZ *et al.*, 2000), que estimula, indiretamente, o sistema cardiovascular, sendo, também, inotrópico positivo, além de causar aumento da pressão arterial, da frequência e do débito cardíaco (VALADÃO, 2002). A xilazina é um $\alpha 2$ agonista, que, no sistema cardiovascular, inicialmente leva a um aumento de pressão arterial seguido de hipotensão, diminui a frequência e o débito cardíacos (ALLEN & DOWNEY, 1983). Assim, a associação de quetamina e xilazina auxilia o controle da pressão arterial e frequência cardíaca.

A indução da DM foi feita através da administração de estreptozotocina (STZ) por via intravenosa. A droga produz um efeito tóxico sobre as células pancreáticas, induzindo um modelo de diabetes *mellitus* tipo 1 (MOSTAFAVINIA *et al.*, 2018). A DM tipo 1, é mais semelhante ao diabetes humano, pois as células β produtoras de insulina no pâncreas ainda têm certo grau de função. O modo mais estável e próximo da doença, com baixas taxa de reversão e mortalidade, mencionados na literatura tem sido a combinação da via intravenosa e a droga de STZ (JAVADIEH *et al.*, 2009).

O defeito ósseo criado, de 2,3mm de diâmetro e 2,0mm de profundidade aproximadamente, é suficiente para causar alterações significativas na estrutura óssea (FOLLAK *et al.*, 2004), sendo possível verificar as fases do processo de reparo ósseo. Uma lesão nesse tecido requer que a loja seja preenchida por um coágulo sanguíneo e que espaços medulares sejam abertos para que as células do endóstio e também do perióstio possam invadir o tecido de granulação e fazer parte dele no lugar dos fibroblastos. Esta representa uma das principais razões para os cuidados com as margens cirúrgicas durante procedimentos operatórios nos ossos (CONSOLARO, 2009).

Na fase inicial do reparo ósseo há intensa proliferação celular, sendo um período caracterizado por osteogênese ativa, com aumento da atividade osteoblástica e intensa deposição de matriz óssea. (ROCHA *et al.*, 2015). Em todos os períodos, o grupo diabético observou maior quantidade de coágulo, trabéculas mais finas e menor quantidade de matriz óssea neoformada. Esses achados estão relacionados ao fato de o DM prolongar a fase inflamatória (AL- WATBAN *et al.*, 2006) e também prejudicar a formação e função de osteoblastos e osteoclastos (FOLLAK *et al.*, 2004), atrasando todo o processo de reparo ósseo.

No grupo diabético verificou-se a presença de trabéculas ósseas mais finas, em 5 e 7 dias, menor neoformação óssea, maior quantidade de tecido de granulação e maior quantidade de coágulo, quando comparado aos animais normoglicêmicos, caracterizando comprometimento no reparo ósseo (PARK & KANG, 2012). Estes achados podem estar relacionados ao fato de o DM diminuir a proliferação e diferenciação de células osteoblásticas, além de redução dos níveis séricos de osteocalcina e da resistência biomecânica no reparo em indivíduos diabéticos (KAYAL *et al.*, 2007). O impacto no reparo ósseo, pode representar um problema importante para os pacientes diabéticos, ocasionando atraso na cicatrização, possível não união óssea, maior risco de complicações clínicas como infecções, amputações e mortalidade (MARIN *et al.*; 2018).

A aceleração do reparo foi evidente nos grupos com LTBP, especialmente nos diabéticos que receberam LTBP, em 7 dias observou-se neoformação óssea estendendo-se até a cortical oposta, com aumento significativo da porcentagem de neoformação óssea e menor presença de coágulo, quando comparado ao grupo normoglicêmico (Controle).

Os processos estimulados pela LTBP incluem a estimulação da produção de ATP mitocondrial, proliferação celular, a síntese de proteínas e colágenos, diferenciação de osteoblastos e condrócitos. (KARU, 1989; MERLI *et al.*, 2005; TAJALI *et al.*, 2010). Esses efeitos, por sua vez, levarão a outros efeitos fisiológicos com uma maior profundidade e extensão considerados efeitos secundários. Entre os efeitos secundários estão: aumento da microcirculação e de mediadores químicos, com vasodilatação que pode se manifestar à menor distância dependendo da potência de irradiação; aumento da tonicidade local, reparo da função nervosa após lesão, equilíbrio da função hormonal, regulação da imunidade e do sistema linfático. Tais efeitos aceleram os processos de reparação do tecido ósseo, diminui o risco de infecção, reforça as atividades metabólicas e redução da dor (AGNE, 2013; TUNER & HODES, 2010).

Atualmente, não existe um protocolo estabelecido ou parâmetros ópticos preconizados na literatura, usando por vezes, fluências altas e baixas conseguindo resultados satisfatórios. Os parâmetros mais utilizados situam-se nas fluências baixas, pois acredita-se que doses elevadas poderiam inibir e prejudicar o processo de reparo (PIRES-OLIVEIRA. *et al.*, 2010). Os protocolos de *laser* para remodelação óssea são variados na literatura. No presente estudo foi escolhido o comprimento (830 nm), cujo objetivo era atingir o tecido ósseo. O laser de diodo infravermelho tem comprimento de onda de 800-980 nm (COLUZZI, 2000). Os comprimentos de onda de 600-700 nm tem a capacidade de penetração nos tecidos mais superficiais, já espectros entre 780-950 nm penetram em tecidos mais profundos (KARU & KALVAKOV, 2005). Os animais foram submetidos a irradiação logo após o procedimento cirúrgico, sendo aplicado posteriormente, com intervalos de 48 horas, durante os períodos de 3,5 e 7 dias, estando de acordo com o protocolo sugerido por Nascimento *et al.* (2015). O protocolo de irradiação utilizando 4 J / cm², tem se mostrado eficaz nos casos em que uma rápida e eficaz reparação óssea é desejada (PINHEIRO *et al.*, 2006).

O presente estudo contribuiu para o entendimento dos efeitos da laserterapia no reparo ósseo, porém mais investigações são necessárias para melhor esclarecer os mecanismos de ação da fotobiomodulação no processo de reparo tecidual. Tal como, a definição de protocolos e suas variações, de acordo com o estado fisiológico e capacidade proliferação celular do organismo.

6. CONCLUSÃO

A Laserterapia de Baixa Potência melhora o reparo ósseo em ratos diabéticos, otimizando as fases iniciais do reparo, reduzindo os efeitos deletérios do diabetes. Esses efeitos da Laserterapia são mais evidentes no período de 7 dias após de reparo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNE, J.E. **Eletro Termo Foto Terapia** - 4. ed. Santa Maria, 2017

AKYOL, U.K; GÜNGÖRMUS, M. **Effect of biostimulation on healing of bone defects in diabetic rats**. Photomedicine and Laser Surgery. v. 28, n. 3, p. 411-416, 2010.

ALLEN, D.G.; DOWNEY, R.S. **Echocardiographic assessment of cats anesthetized with xylazine-sodium pentobarbital**. Can. J. Comp. Med. Vet. Sci., v.47, p.281-283, 1983

ALMEIDA, J.D.; CARVALHO, Y.R.; et al. **Estudo da reparação óssea e mandíbula de ratos**. Rev. Fac. Odontol. São José dos Campos, v.3, n.1, jan. /jun., 2000.

AL-WATBAN, F.A.H., ANDRES, B.L. **Laser photons and pharmacological treatments in wound healing**. Laser Therapy. 2001; 12:1-9

BARBOSA, J.H.P; OLIVEIRA, S.L; SEARA, L.T. **Dietetics advanced glycation end-products and chronic complications of diabetes**. Rev. Nutr., Campinas, 22(1):113-124, jan./fev., 2009

BATISTA, J.D.; SARGENTINI-NETO, S.; DECHICHI, P.; ROCHA, F.S.; PAGNOCELLI, R.M. **Low-level laser therapy on bone repair: is there any effect outside the irradiated field?** Lasers in Medical Science, v. 30, p. 1569-1574, 2015.

BATISTA, J.D.; SARGENTINI-NETO, S.; DECHICHI, P. et al. **Low-level laser therapy on bone repair: is there any effect outside the irradiated field**. Lasers Med Science (2015) 30: 1569.

BATISTA, J.D.; ZANETTA-BARBOSA, D.; CARDOSO, S. V.; DECHICHI, P; ROCHA, F.S.; PAGNONCELLI, R.M. **Effect of low-level laser therapy on repair of the bone compromised by radiotherapy**. November 2014, Volume 29, Issue 6, pp 1913– 1918

BIOTÉRIO DE PRODUÇÃO E EXPERIMENTAÇÃO DA FCF-IQ/USP: Disponível em: http://www.biot.fm.usp.br/index.php?mpg=03.00.00&tip=rato&id_ani=17&caract=s im. Acesso em: 27 Out 2020

BURGER, E.H.; KLEIN, N. **"Strain-derived canalicular fluid flow regulates osteoclast activity in a remodelling osteon-a proposal."** J Biomech 36(10): 1453-1459, 2003

BROWN, M.L.; YUKATA, K.; FARNSWORTH, C.W; CHEN, D.G.; AWAD, H.; HILTON, M.J; et al. **Delayed fracture healing and increased callus adiposity in a C57BL/6J murine model of obesity-associated type 2 diabetes mellitus.** PLoS One (2014) 9(6):e99656. doi:10.1371/journal.pone.0099656

CARVALHO, P.S.L.; PEREIRA, G.G; PETRUS, L.C., SOARES, E.C.; MICHIMA, L.E.; LARSSON, M.H.M.A. **Avaliação de alguns parâmetros ecocardiográficos do gato-do-mato (*Leopardus tigrinus*), mantido em cativeiro e submetido à anestesia com xilazina e quetamina.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.59, n.3, p.695-699, 2007

CHOW, R.; ARMATI, P.; LAAKSO, E.L.; BJORDAL, J.M.; BAXTER, G.D. **Inhibitory effects of laser irradiation on peripheral mammalian nerves and relevance to analgesic effects: a systematic review.** Photomedicine and Laser Surgery. v. 29, n. 6, p. 365-381, 2011.

COLUZZI, D.J. **An overview of laser wavelengths used in dentistry.** Dent Clin North Am. v. 44, p.753–765, 2000.

CONSOLARO, A. **Inflamação e Reparo.** 1st ed. Maringá: Ed. Dental Press; 2009.

CRUZ, M.L.; LUNA, S.P.L.; CASTRO, G.B. et al.. **A preliminar trial comparison of several anesthetic techniques in cats.** Can. Vet. J., v.41, p.481-485, 2000

DAHLIN, C. Scientific background of guided bone regeneration. In: BUSER, D.; DAHLIN, C.; SCHENK, R. K. **Guided bone regeneration in implant dentistry.** Chicago: Quintessence, 1994. Cap. 2, p. 31-48.

DIMITROU, R.; JONES, E.; MCGONALE, D.; et al.. **Bone regeneration: current concepts and future directions.** BMC Medicine. v. 9, n. 66, p. 2-10, 2011.

DONALDSON, H.H. **The rat; reference tables and data for the albino rat (*Mus norvegicus albinus*) and the Norway rat (*Mus norvegicus*).** Series: Memoirs of the Wistar institute of anatomy and biology, no. 6, 1915.
<https://doi.org/10.5962/bhl.title.1036>.

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

FOWLKES, J.; BUNN, R. C.; LIU, L.; WAHL, E.C.; COLEMAN, E.C., COCKRELL, G.E.; PERRIEN, D.S.; LUMPKIN, C.K.; THRAILKILL, K.M. **Runt-Related Transcription Factor 2 (RUNX2) and RUNX2-Related Osteogenic Genes Are Down-Regulated throughout Osteogenesis in Type 1 Diabetes Mellitus.** Endocrinology. 2008 Apr; 149(4): 1697–1704. doi: 10.1210/en.2007-1408: 10.1210/en.2007-1408

FREITAS, I.G.F. **Ação do laser de HeNe na osteogênese [Tese].** Campinas Faculdade de Engenharia Elétrica e Computação da Universidade Estadual de Campinas; 2001

FULZELE, K.; RIDDLE, R.C.; DIGIROLAMO, D.J.; CAO, X.; WAN, C.; CHEN, D.; FAUGERE, M.C.; AJA, S.; HUSSAIN, M.A.; BRÜNING, J.C.; CLEMENS, T.L. **Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition.** Cell. 2010 Jul 23;142(2):309-19. doi: 10.1016/j.cell.2010.06.002.

FURST, J.R., BANDEIRA, L.C., FAN, W.W.; AGARWAL, S.; NISHIYAMA, K.K; MCMAHON, D.J., et al. **Advanced glycation endproducts and bone material**

strength in type 2 diabetes. J Clin Endocrinol Metab (2016) 101(6):2502–10.
doi:10.1210/jc. 2016-1437

GERSTENFELD, L.C. **Impaired fracture healing in the absence of TNF-alpha signaling: the role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption.** Journal of Bone and Mineral Research. Washington, p. 1584-1592. set. 2003b.

GIANNOUDIS, P.; JONES, E.; EINHORN, T. **Fracture healing and bone repair injury.** International Journal Care Injured, v. 42, p. 549-50. 2011

GRAVES, D.T.; LU, H.; KRAUT, D.; GERSTENFELD, L.C. **Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation.** Endocrinology. 2003;144(1):346-52.

GROSS, J.L.; SILVEIRO, S.P.; CAMARGO, J.L.; REICHELT, A.J.; AZEVEDO, M. **Diabetes Melito: Diagnóstico e Avaliação do Controle Glicêmico.** Arq Bras Endocrinol Metab vol, 46 nº 1, Fevereiro, 2002.

HAMANN, C.; GOETTSCH, C.; METTELSIEFEN, J.; HENKENJOHANN, V.; RAUNER, M.; HEMPEL, U. **Delayed bone regeneration and low bone mass in a rat model of insulin-resistant type 2 diabetes mellitus is due to impaired osteoblast function.** Am J Physiol Endocrinol Metab (2011) 301(17):E1220–8.
doi:10.1152/ajpendo.00378.2011

IDF. **Diabetes Atlas Update.** International Diabetes Federation . n. 9, 2019.

IKI, M.; FUJITA, Y.; KOUDA, K.; YURA, A.; TACHIKI, T.; TAMAKI, J.; WINZENRIETH, R.; SATO, Y.; MOON, J.S.; OKAMOTO, N.; KURUMATANI, N. **Hyperglycemia is associated with increased bone mineral density and decreased trabecular bone score in elderly.** Elsevier. M. Iki et al.. / Bone 105 (2017) 18–25, 2017

JAVADIEH, F.; BAYAT, M.; ABDI, S.; MOHSENIFAR, Z.; RAZI, S. **The effects of**

infrared lowlevel laser therapy on healing of partial osteotomy of tibia in streptozotocininduced diabetic rats. Photomedicine and Laser Surgery. v. 27 n. 4, p. 641-646, 2009.

KARU, T.I.; **Laser biostimulation: a photobiological phenomenon.** J Photochem Photobiol B. 1989 Aug; 3(4):638-40.

KARU, T.I.; KALYAKOV, S.F. **Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy.** Photomed Laser Surg. v. 23, p. 355–361, 2005.

KNOTHE TATE, M. L.; ADAMSON, J. R., et al. (2004). **"The osteocyte."** The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 36(1): 1-8.

JUNQUEIRA, L.C.U; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas.** 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

LIMIRIO, P. H. J. O.; LINHARES, C. R. B.; BERGAMINI, M. L.; ROCHA, F. S.; MORAIS, R. B.; BALBI, A. P. C.; HIRAKI, K. R. N.; DECHICHI, P. **Hyperbaric Oxygen therapy effects on bone regeneration in Type 1 diabetes mellitus in rats.** Connective Tissue Research, v. -, p. 1-7, 2018

LIZARELLI, R.F.Z; LAMANO-CARVALHO, T.L.; BRENTGANI, L.G. **Histometrical evaluation of the healing of the dental alveolus in rats after irradiation with a low-powered GaAlAs laser.** In: BIOS'99 International Biomedical Optics Symposium. 1999

MARIN, C., LUYTEN, F. P., VAN DER SCHUEREN, B., KERCKHOFS, G., & VANDAMME, K. (2018). **The Impact of Type 2 Diabetes on Bone Fracture Healing.** Frontiers in Endocrinology, 9. doi:10.3389/fendo.2018.00006

MERLI, L.A.; SANTOS, M.T.; GENOVESE, W.J.; FALOPPA, F. **Effect of low-intensity laser irradiation on the process of bone repair.** Photomedicine and Laser Therapy. v. 23, n. 2, p. 212-215, 2005.

MOSTAFAVINIA, A.; MASTERI, R.F.; ABDOLLAHIFAR, M.A.; GHATREHSAMANI, M.; GHOREISHI, S.K., HAJIHOSSAINLOU, B.; CHIEN, S.; DADRAS, S.; REZAEI, F.; BAYAT, M. **Evaluation of the effects of photobiomodulation on partial osteotomy in streptozotocin-induced diabetes in rats.** Photomed Laser Surg. 2018 Aug;36(8):406-414. doi: 10.1089/pho.2018.4438. Epub 2018 May 31.

ORYAN, A.; MONAZZAH, S.; BIGHAM-SADEGH, A. Bone Injury and Fracture Healing Biology. Biomed Environ Sci. 28:57-71, 2015.

PARK, J.J.; KANG, K.L. **Effect of 980-nm GaAlAs diode laser irradiation on healing of extraction sockets in streptozotocin-induced diabetic rats: a pilot study.** Lasers in Medical Science. v. 27, n. 1, p. 223-230, 2012.

PINHEIRO, A.L.; GERBI, M.E. **Photoengineering of bone repair processes.** Photomed Laser Surg.v. 24, n. 2, p.169-178, apr.2006.

PINHEIRO, A.L.; MARTINEZ GERBI, M.E; LIMEIRA JR, F.A.; PONZI, E.A.C.; MARQUES, A.M.; CARVALHO, C.M.; SANTOS, R.C.; OLIVEIRA, P.C.; NÓIA, M.; RAMALHO, L.M. **Bone repair following bone- grafting hydroxyapatite guided bone regeneration and infra-red laser photobiomodulation: a histological study in a rodent model.** Lasers in Medical Science. v. 24, n. 2, p. 234-240, 2009.

PIRES-OLIVEIRA, D.A.; OLIVEIRA, R.F.; AMADEI, S.U.; PACHECO, C.; ROCHA, R.F.**Laser 904 nm action on bone repair in rats with osteoporosis.** Osteoporos Int. v.12, p.2109- 14, 2010

PRETEL, H., LIZARELLI, R. F. Z., & RAMALHO, L. T. O. (2007). **Effect of low-level laser therapy on bone repair: Histological study in rats.** Lasers in Surgery and Medicine, 39(10), 788–796. doi:10.1002/lsm.20585

ROBERTSON, V. et al.. **Eletroterapia explicada: princípios e prática.** 4.ed. São Paulo: Elsevier, 2009

SAITO, M.; KIDA, Y.; KATO, S.; MARUMO, K. **Diabetes, collagen, and bone quality.**

Curr Osteoporos Rep (2014) 12(2):181–8. doi:10.1007/s11914-014-0202-7

SANTANA, R.B.; XU, L.; CHASE, H.B.; AMAR, S.; GRAVES, D.T.; TRACKMAN, P.C. **A role for advanced glycation end products in diminished bone healing in type 1 diabetes.** Diabetes. 2003;52(6):1502-10

SANTINONI, C.S.; OLIVEIRA, H.F.F.; BATISTA, V.E.S.; LEMOS, C.A.A.; VERRI, F. **R.Influence of low-level laser therapy on the healing of human bone maxillofacial defects: A systematic review.** Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology 169 (2017) 83–89, 2017

SCHMIDT-BLEEK, K.; SCHELL, H. et al. (2012). **"Inflammatory phase of bone healing initiates the regenerative healing cascade."** Cell Tissue Res 347(3): 567-573.

SCHROEDER, J.E.; MOSHEIFF, R. **Tissue engineering approaches for bone repair: concepts and evidence.** Injury, v. 42, n. 6, p. 609-13. 2011.

SFEIR, C. Fracture Repair. **Bone regeneration and repair.** Lieberman JR, Friedlaender GE, editors. Totowa, 2005.

STARUP-LINDE, J., VESTERGAARD, P. **Biochemical bone turnover markers in diabetes mellitus – a systematic review.** Bone (2015) 82:69–78. doi:10.1016/j.bone.2015.02.019

TANAKA, Y.; NAKAYAMADA, S.; OKADA, Y. **Osteoblasts and Osteoclasts in Bone Remodeling and Inflammation.** Current Drug Targets - Inflammation & Allergy, 2005, 4, 325-328

TAJALI, B.S.; MACDERMID, J.C.; HOUGHTON, P.; GREWAL, R. **Effects of low power laser irradiation on bone healing in animals: a meta-analysis.** J Orthop Surg Res. v.4, 2010.

THRAILKILL, K.M.; LIU, L.; WAHL, E.C.; BUNN, R.C.; PERRIEN, D.S.; COCKRELL, G.E.; SKINNER, R.A.; HOGUE, W.R.; CARVER, A.A.; FOWLKES, J.L.; ARONSON, J.; LUMPKIN JR., C.K. **Bone Formation is Impaired in a Model of Type 1 Diabetes.** Diabetes, v.54, n.10, p.2875-2881, 2005a.

TUNER, J.; HODE, L. **The New Laser Therapy Handbook.** Prima Books AB, Tallinn, Estônia, 2010.

VALADAO, C.A.A. **Anestésicos dissociativos.** In: FANTONI, D. T.; CORTOPASSI, S.R.G. Anestesia em cães e gatos. São Paulo: Roca, 2002. P.165-173.

WALKER, M.D. et al. **Effect of low-intensity laser irradiation (660nm) on a radiation impaired wound-healing model in murine skin.** Lasers Surg Med, v. 26, n. 1, p. 41-47, 2000.

YU, W.; NAIM, J.O.; LANZAFAMI, R.J. **Effects of photostimulation on wound healing in diabetic mice.** Lasers in Surgery and Medicine, v. 20, n.1, p. 56–63, 1997

ZANCANELA, D.C. **Avaliação do uso do laser e processos fotodinâmicos na estimulação e crescimento celular de osteoblastos. Avaliação fotofísica e fotobiológica na presença e ausência de fármacos fotossensíveis.** São Paulo, 2002. DOI: 10.11606/D.59.2009.tde-23062009-100126

ZEIN, R., SELTING, W., BENEDICENTI, S. **Effect of Low-Level Laser Therapy on Bone Regeneration During Osseointegration and Bone Graft.** Photomedicine and Laser Surgery. DOI:10.1089/pho.2017.4275, 201

ANEXO



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