



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



CAMILA RODRIGUES BORGES LINHARES

**EFEITO DA OXIGENAÇÃO HIPERBÁRICA NO PROCESSO DE
REPARO ÓSSEO E NA QUANTIDADE DE MASTÓCITOS EM
RATOS DIABÉTICOS**

UBERLÂNDIA

2017

CAMILA RODRIGUES BORGES LINHARES

**EFEITO DA OXIGENAÇÃO HIPERBÁRICA NO PROCESSO DE
REPARO ÓSSEO E NA QUANTIDADE DE MASTÓCITOS EM
RATOS DIABÉTICOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
a Faculdade de Odontologia da UFU, como
requisito parcial para obtenção do título de
Graduado em Odontologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Paula Dechichi

UBERLÂNDIA

2017



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

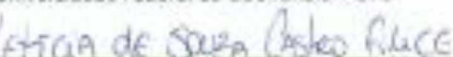
ATA DA COMISSÃO JULGADORA DA DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DO (A) DISCENTE **Camila Rodrigues Borges Linhares** DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA.

No dia treze de junho de 2017, reuniu-se a Comissão Julgadora aprovada pelo Colegiado de Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para o julgamento do Trabalho de Conclusão de Curso apresentado pelo (a) aluno (a) **Camila Rodrigues Borges Linhares**, COM O TÍTULO: **"EFEITO DA OXIGENAÇÃO HIPERBÁRICA NO PROCESSO DE REPARO ÓSSEO EM RATOS DIABÉTICOS"**. O julgamento do trabalho foi realizado em sessão pública compreendendo a exposição, seguida de arguição pelos examinadores. Encerrada a arguição, cada examinador, em sessão secreta, exarou o seu parecer. A Comissão Julgadora, após análise do Trabalho, verificou que o mesmo encontra-se em condições de ser incorporado ao banco de Trabalhos de Conclusão de Curso desta Faculdade. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas da Graduação, legislação e regulamentação da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos e lavrada a presente ata, que após lida e achada conforme, foi assinada pela Banca Examinadora.

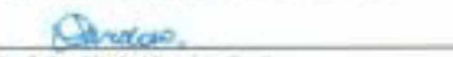
Uberlândia, 13 de junho de 2017



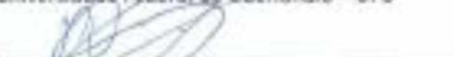
Profa. Dra. Paula Dechichi Barbar
Universidade Federal de Uberlândia – UFU



Profa. Dra. Leticia de Souza Castro Filice
Universidade Federal de Uberlândia – UFU



Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso
Universidade Federal de Uberlândia – UFU



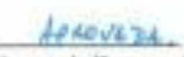
Pedro Henrique Justino de Oliveira Limirio
Aluno de doutorado – PPGQ/UFU



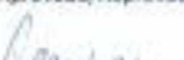
Aprovado/Reprovado



Aprovado/Reprovado



Aprovado/Reprovado



Aprovado/Reprovado

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família
que tanto amo, por todo amor,
carinho, paciência e apoio.

Agradecimentos

Um ciclo se encerra, e esse fim, me remete ao começo, um começo de euforia do sonho realizado de passar no vestibular. Porém, o caminho não foi fácil, aprendi a conviver, a não desistir de lutar, a tentar novamente, e a superar. Houveram momentos em que a vontade de desistir aparecia, entretanto, a fé em Deus, me deu forças para continuar. Mas, se hoje eu comemoro essa vitória, esta se deve aos que estiveram comigo durante esses anos.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Paula Dechichi**, a qual tenho um sentimento de gratidão profundo que vou levar para o resto da vida, agradeço a ela pela oportunidade de realizar esse trabalho, pelos quatro anos e meio de iniciação científica, por toda paciência, atenção e dedicação que teve comigo durante todo o desenvolvimento do trabalho. Por me fazer ser cada dia mais apaixonada pela histologia e me fazer amar o mundo da pesquisa. Além disso, pelos tantos ensinamentos, por ser essa pessoa dedicada, ser quase uma mãe na faculdade por mim, excelente orientadora, exemplo de profissional, a qual me é fonte de inspiração do que um dia ainda quero ser.

Agradeço à minha Mãe, **Cristina Rodrigues**, que me apoiou nas alegrias e tristezas, que teve paciência, que me foi porto seguro nos momentos difíceis, e que me é fonte de inspiração, e perseverança. Agradeço a ela por todos sacrifícios que fez por mim, os quais permitiram que eu estivesse aqui.

Agradeço a meu Pai, **Renato Linhares**, que mesmo com a distância, por morarmos em cidades tão distantes, sempre se fez presente e me apoiou nas dificuldades.

A meus familiares, em especial a minha tia **Mirela Rodrigues**, a minha avó **Emirena Rodrigues**, a minha tia **Cristiane Rodrigues**, e a minha Madrinha e também tia **Marluce Rodrigues**, por todo apoio, por serem uma extensão da minha casa, e por sempre acreditarem em mim.

À minha prima, **Marina Rodrigues**, a qual é minha prima, mas o sentimento é de irmã. 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.

À minha grande amiga de sala e parceira de clínica, **Graziely Borges**, pela amizade, companheirismo, pela paciência de me escutar horas reclamando do mesmo problema seja qual fosse o horário. Por todo apoio, pelos conselhos, pelos momentos bons, por ser minha dupla em tantas clínicas. E ainda, ser tão compreensiva com minhas dificuldades na clínica, por várias vezes me acolher tão bem em sua casa e me permitir fazer de sua casa uma extensão da minha.

A meus amigos de sala, **Paulo Zanuto**, **Marcelo Garcia**, **Juliana Goulart** e **Amanda Marques** pelos bons momentos, pela amizade e companheirismo nesses cinco anos de curso.

À grande amiga que fiz durante minha iniciação científica, **Pâmella Dias**. Obrigada pela amizade e pela grande ajuda no desenvolvimento do trabalho.

Aos outros integrantes do grupo NERT (Núcleo de Estudo em Reparo Tecidual), em especial à **Anna Carolina, Huberth Rocha, Pedro Limírio, Mariana Bergamini, Jessyca Venâncio e Noemi Cristina**.

À **Ester Borges**, técnica do laboratório de histologia, a qual fiz grande amizade e, que por coincidência do destino, vim a descobrir que era minha vizinha. Obrigada pelo companheirismo, pela amizade, pelos vários momentos que compartilhamos dentro e fora do laboratório. Por ser ponto de apoio em todos momentos que precisei, por todas as caronas, por ser minha confidente, por escutar por horas eu desabafar sobre um mesmo assunto, seja o horário que fosse, com carinho e atenção. Obrigada também, pelos valiosos conselhos que me deu, o qual me permitiu ser uma pessoa melhor hoje.

Aos grandes amigos que fiz no laboratório de histologia da UFU, por eu passar tantas horas no laboratório, tive a oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas, **Ângelo Alves, Marisol Pallete, Natália Carnevalli, Layane Alencar, Carlos Trindade, Yusmaris Cariaco, Marcos Paulo, Rômulo Oliveira e Mariele Venâncio**. Obrigada pela amizade que ultrapassa os limites do laboratório, por serem porto seguro, pelas risadas, pelos momentos de descontração fora do laboratório, por todo apoio e companheirismo durante essa minha jornada.

Aos velhos amigos, **Aline Borges, Letícia Cristina, Carolina Alvarenga, Laura Ferreira, Mariane Gomes, e Cleverson Cassiano**, os quais eu conheço desde a minha infância, com quem pude contar e compartilhar essa caminhada, agradeço por todas as risadas, conversas, pelos desabafos, pelos conselhos, pelo apoio e por tantos momentos que compartilhamos.

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 à **Profa. Dra. Flaviana Rocha, à Profa. Dra. Andreia Gomes, ao Prof. Dr. Sérgio Vitorino, e à Profa. Dra. Juliana Bisinotto**.

Aos funcionários da UFU, **Fabício Araújo, Juscélia Alemar, Mário Zann, Murilo Vieira, e aos demais funcionários**, pela disposição em ajudar quando necessário.

“Tão importante quanto terminar é saber recomeçar. A vida é uma sequência de termos e começos. E o que guardamos desse tempo, serão nossa força para a próxima página da nossa história que a vida nos apresenta!” (Autor desconhecido)

Epígrafe

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

Sumário

Resumo	09
Abstract	10
Introdução	11
Objetivo	14
Metodologia	14
Resultados	25
Discussão	36
Conclusão	38
Referências bibliográficas	38

Resumo

A diabetes Mellitus (DM) é uma doença metabólica que se caracteriza por hiperglicemia decorrente de alterações na secreção e/ou na ação da insulina. A hiperglicemia crônica compromete o metabolismo, a estrutura e o reparo ósseo. O presente estudo avaliou os efeitos da Oxigenação Hiperbárica (OH) no reparo ósseo e na quantidade de mastócitos em lesão de fêmur em ratos diabéticos. Trinta e dois animais foram divididos em quatro grupos (n=8): Controle (C); Controle + OH (CH); Diabetes (D) e Diabetes + OH (DH). Nos animais do grupo D e DH foi induzido DM por injeção intravenosa de estreptozotocina. Trinta dias depois, foram realizados defeitos ósseos nos fêmures e os grupos CH e DH foram submetidos diariamente à OH. Após 7 dias, os animais foram sacrificados, os fêmures removidos, desmineralizados e processados para inclusão em parafina. Os cortes histológicos obtidos foram corados em Hematoxilina e Eosina (HE), Tricrômico de Mallory (TM) e azul de toluidina (AT). Em HE, utilizando uma grade de 144 pontos, foi quantificado, em porcentagem: matriz óssea, coágulo, tecido de granulação e vasos sanguíneos. Em TM, utilizando imagens binárias, foi quantificada a porcentagem total de matriz óssea neoformada. E, os mastócitos foram quantificados nos cortes em AT. A Análise histológica mostrou de forma geral que o grupo D apresentou mais coágulo e tecido de granulação; menos vasos sanguíneos e matriz óssea em relação aos outros grupos. Os grupos com OH (CH e DH) apresentaram menos coágulo e tecido de granulação; mais vasos sanguíneos e matriz óssea quando comparados aos grupos sem OH. Em relação à quantidade de mastócitos, o grupo CH apresentou maior quantidade dessas células que os demais grupos. Este estudo mostrou que a oxigenação hiperbárica melhora o reparo ósseo em animais diabéticos e aumenta a quantidade de mastócitos em animais normoglicêmicos.

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

Abstract

Diabetes Mellitus (DM) is a metabolic disease characterized by hyperglycemia due to changes in insulin secretion and / or action. Chronic hyperglycemia compromises bone metabolism, structure, and repair. The present study evaluated the effects of Hyperbaric Oxygen therapy (HO) in bone repair and in the mast cells amount in diabetic rats femur. Thirty-two animals were divided into four groups (n=8): Control (C); Control + HO (CH); Diabetes (D) and Diabetes + HO (DH). In D and DH groups, DM was induced by intravenous injection of streptozotocin. Thirty days later, it was performed bone defect in the femurs and the CH and DH groups were submitted to HO daily. After 7 days, the animals were sacrificed, the femurs were removed, demineralized and paraffin embedded. The histological sections obtained were stained in Hematoxylin and Eosin (HE), Mallory's Trichrome (TM) and toluidine blue (AT). At HE, it were used 144 points grid to quantify (percentage): bone matrix, blood clot, granulation tissue and blood vessels. At TM, it was quantified the total bone matrix neoformed percentage, using binary images. The mast cells were quantified at AT stain. Histological analysis showed in the D group more blood clot and granulation tissue; and less blood vessels and bone matrix compared to the other groups. The OH groups (CH and DH) showed less blood clot and granulation tissue; and more blood vessels and bone matrix when compared to groups without OH. The CH group showed more mast cells than the other groups. This study showed that hyperbaric oxygen therapy improves bone repair in diabetic animals and increases the mast cells amount in normoglycemic animals.

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

1.Introdução

O metabolismo e o reparo ósseo são comprometidos em indivíduos com diabetes Mellitus (DM). A DM é uma doença metabólica que se caracteriza pelo quadro de hiperglicemia decorrente de alterações na secreção e/ou na ação da insulina. A doença pode ser classificada de diversas formas, porém a maioria dos casos são DM tipo 1 e DM tipo 2, sendo a maior prevalência de DM tipo 2 (Ada, 2010). O diabetes mellitus tipo 1 é caracterizado como uma doença auto-imune causada por danos para as células b 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 auto-imunes. Esses fatores levam à apoptose das células B e uma falta absoluta de insulina no soro, que causa glicemia elevada (Wang 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). Os fatores relacionados à esse aumento são hiperglicemia, alterações vasculares (Strotmeyer et al, 2007) diminuição significativa da densidade mineral óssea, dos níveis de osteocalcina sérica e da resistência biomecânica (Khazai et al., 2009). Estudos de reparo de fraturas em ratos realizados por Follak (2003) demonstraram que o prejuízo da DM foi bem mais severo em ratos diabéticos mal compensados.

O tecido ósseo quando lesado desencadeia um processo denominado de reparo ou reparação óssea, que consiste em três fases: fase inflamatória, fase reparadora e fase de remodelação. A fase inflamatória é caracterizada pela formação de um 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 com grande mobilização de neutrófilos e macrófagos provocado pela liberação de substâncias quimiotáticas. Imediatamente após, inicia-se a fase reparadora com o aparecimento de um 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, as quais 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 ou endocondrítica, resultando em um osso imaturo.. Na fase remodeladora, processos de reabsorção e neoformação ocorrem até que a região lesionada retorne as características morfológicas, biomecânicas e funcionais que possuíam antes da lesão (Pospisilová, 1982).

Em diabéticos, a fase inflamatória do reparo ósseo é mais prolongada, a qual é indicada como responsável pelo retardo no processo de reparo tecidual em diabéticos (Al-Watban et al., 2006). Há evidências de que o nível de controle glicêmico está associado com a saúde óssea. Um déficit de osteoblastos é um fator importante para a osteopenia em diabéticos mal compensados. A hiperglicemia prejudica a função dos osteoblastos, além disso, um deficiente controle glicêmico, também afeta a resposta de osteoclastos, prejudicando então, o reparo ósseo (Antonopoulou et al., 2013).

Na fase inflamatória da 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, 2003b). Os mastócitos, células que participam ativamente do processo inflamatório, contêm as proteases triptase e quinase, bem como várias citocinas e quimiocinas que contribuem para a inflamação e reparação tecidual, como TNF- α , a prostaglandina (PG), leucotrieno (LT), monócito proteína quimioatratante (MCP), macrófago proteína inflamatória (MIP) e as interleucinas (ILs) (Ramirez-GarciaLuna JL et al., 2017).

Os mastócitos promovem a reparação óssea, possivelmente recrutando células endoteliais durante a fase inflamatória e coordenando células anabólicas e catabólicas durante a remodelação tecidual. Em conjunto, os dados indicam que os mastócitos têm um impacto positivo na reparação óssea (Ramirez-GarciaLuna JL et al., 2017). Pesquisas mostraram que o processo de reparo acontece na presença ou ausência dos mastócitos, porém, em sua ausência o reparo é mais lento e de pior qualidade (Behrends et al., 2014). Os mastócitos participam em três fases da reparação de feridas: na reação inflamatória, na angiogênese e na reabsorção de matriz extracelular (Babaei et al., 2016). Em ratos diabéticos com deficiência mastocitária observa-se hiperglicemia acelerada e redução de expressão de IL-10, TGF- β , e IL-6, no tecido pancreático (Carlos et al., 2015).

Pensando em formas de melhorar e acelerar o processo de reparo ósseo, uma das terapias coadjuvantes sugerida é a oxigenação hiperbárica (OH). Ela consiste na oferta de oxigênio puro (100%) em ambiente pressurizado a nível acima da pressão atmosférica, sendo normalmente de duas a três atmosferas a mais, procedimento realizado no interior de câmara hiperbárica. A OH é indicada para tratamento de feridas de difícil cicatrização, infecções graves, danos causados por irradiação e feridas hipóxicas, como úlceras diabéticas (Jan et al., 2009; Rodrigues & Marra, 2004).

Estudos relataram que a OH aumenta a quantidade de oxigênio dissolvido no sangue e promove a angiogênese no tecido lesado, aumentando então a quantidade de oxigênio e de nutrientes entregue ao ferimento, o que acelera o processo de reparo (Jan et al., 2009). Outros estudos demonstram que a OH aumenta 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). Também, a OH contribui para uma maior quantidade de formação óssea e menor formação de tecido fibroso (Jan et al., 2009).

Em diabéticos, a OH reduz a hiperglicemia. A redução do nível de açúcar no sangue foi correlacionado à redução na percentagem de lesão nas células β no pâncreas. Acredita-se que a OH possa ter efeito regenerador nas células β , pois seu efeito é mantido em longo prazo (Prabowo et al., 2014). A OH é capaz de neutralizar os efeitos da hiperglicemia e isquemia, e o atraso no reparo de feridas em animais diabéticos, acelerando significativamente o processo de reparação. Acredita-se que em ambientes de isquemia e hiperglicemia ocorra redução na deposição de colágeno nos estágios iniciais de reparo, e que a OH neutraliza esse efeito (André-Lévigne et al., 2016). Assim, o presente estudo partiu da hipótese de que a oxigenoterapia hiperbárica melhora o reparo ósseo em ratos diabéticos.

2.Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito da oxigenação hiperbárica nos eventos biológicos do reparo ósseo, em fêmures de ratos diabéticos.

2.2. Objetivos Específicos

- quantificar coágulo, tecido de granulação, vasos sanguíneos e matriz óssea na área da lesão, por meio de análise histomofométrica em cortes corados em hematoxilina e eosina, utilizando grade de 144 pontos.

- quantificar a porcentagem de matriz óssea total neoformada na área da lesão, por meio de análise histomofométrica em cortes corados em tricrômico de Mallory, utilizando imagens binárias.

- quantificar mastócitos na área da lesão, por meio de análise histomofométrica em cortes corados em azul de toluidina.

3.Metodologia

3.1. Delineamento experimental

Neste estudo foram utilizados 32 ratos machos *Rattus norvegicus*, da linhagem Wistar, clinicamente saudáveis 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 divididos em quatro grupo de acordo com o quadro abaixo

Condição experimental (Grupos: n=08)	Descrição
Controle (C)	Animais saudáveis
Controle + Hiperbárica (CH)	Animais saudáveis, submetidos à oxigenação hiperbárica
Diabético (D)	Animais diabéticos
Diabético + Hiperbárica (DH)	Animais diabéticos, submetidos à oxigenação hiperbárica

Trinta dias após a indução do diabetes com estreptozotocina (65mg/kg), em todos os animais foram criados defeitos ósseos em ambos os fêmures. Os animais dos grupos CH e DH, foram submetidos a sessões diárias de oxigenação hiperbárica, iniciadas imediatamente após o procedimento cirúrgico. Todos os animais foram sacrificados 7 dias após a cirurgia, os fêmures foram removidos e submetidos aos processamentos específicos para as análises histológicas.

3.2. Indução de Diabetes Mellitus (DM)

A indução do DM nos animais foi feita com administração de estreptozotocina (STZ) (Sigma Aldrich) por via intravenosa na dosagem de 65mg/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 diabetes mellitus tipo 1 (Delfino, 2002).

Após 24h de jejum, os animias foram anestesiados por via intraperitoneal utilizando 0,07ml/100g do relaxante muscular cloridrato de xilazina 2% e 0,1ml/100g do anestésico e analgésico cloridrato de quetamina 10%. Em seguida, a STZ foi administrada por via endovenosa através de punção da veia peniana. Os animais permaneceram acondicionados em caixas com maravalha em estantes climatizadas, com ração e água *ad libitum*. 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 200mg/dL foram considerados diabéticos. Após este período, aqueles que não

atingiram a meta glicêmica foram sacrificados. Nos animais hiperglicêmicos foi administrado 1 UN de insulina NPH (Humulin N®, Lilly) por via subcutânea, em dias alternados, visando diminuir o risco de morte dos animais. 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 CH e DH.

3.3. 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 periósteo, que foi incisado e descolado ao longo da área óssea a ser operada. O fêmur foi dividido visualmente em três, sendo a região mediana, o local de eleição para a realização da lesão óssea. 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. A sutura foi realizada por planos com fio cirúrgico monofilamento nylon 4-0 (Fig. 1). No período pós-operatório foi administrado paracetamol em gotas para analgesia (10 gotas em 20 ml de água), durante quatro dias.

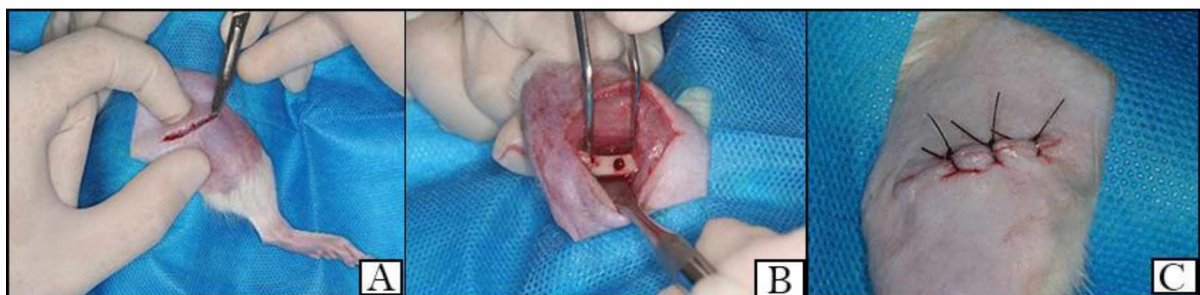


Figura 1: A- Incisão contínua na região coxofemoral do rato. B- Defeito ósseo realizado no fêmur do rato. C- Realização da sutura de pele na região coxofemoral.

3.4. 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). 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. (Fig. 2).



Figura 2: Imagem demonstrativa de sessão de oxigenoterapia hiperbárica

3.5. Obtenção dos espécimes

Os animais foram sacrificados 7 dias após a cirurgia, por meio de aprofundamento anestésico e deslocamento cervical. 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 (Fig. 3). Ao final do processo obteve-se 4 blocos de cada animal, sendo 2 blocos da diáfise esquerda e 2 blocos da diáfise direita.

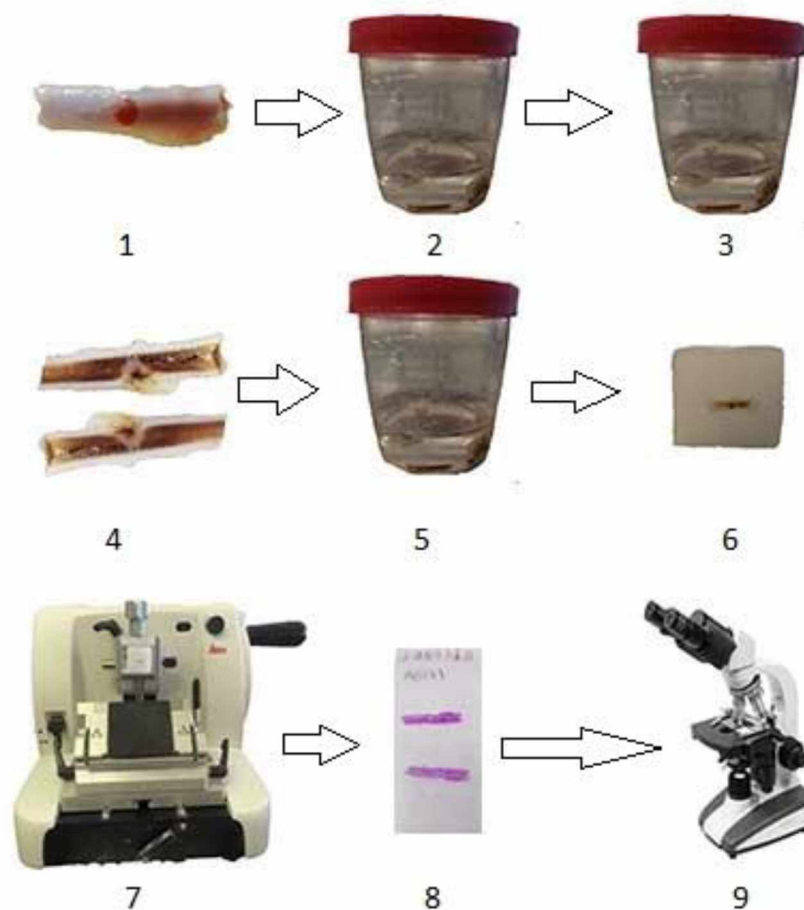


Figura 3: Ilustração do processamento histológico dos fêmures. 1- Diáfise de fêmur coletado. 2- Fixação em solução de paraformaldeído 4%. 3- Desmineralização em solução de EDTA 4,13%. 4- Diáfise dividida em duas metades. 5- Espécimes em solução tampão fosfato 0,1M. 6- Inclusão em parafina. 7- Microtomia dos espécimes. 8- Lâmina

com corte histológico corado em HE. 9- Microscópio utilizado para análise das lâminas histológica.

3.6. Análise histológica qualitativa e histomorfométrica

Para as análises, foram selecionadas 9 lâminas de cada bloco, sendo 3 coradas em Hematoxilina e Eosina (HE), 3 em Azul de toluidina (AT), 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 ainda do software de imagens Aperio ImageScope, delimitou-se três quadrados na região da lesão com a ferramenta Rectangle Tool, e depois extraiu-se de cada região delimitada uma imagem em formato TIFF com uma área de 431x431 com a ferramenta Extract Image 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). A calibração foi feita da seguinte maneira:

1. Abriu-se a imagem da régua salva em 2,5mm
2. Measure
3. Calibration
4. Spatial
5. New (Dar um nome para a régua)
6. Unidade: millimeters
7. Pixels/Unit: Image
8. Medir a régua (régua inteira igual a 1mm)

9. Unidade: 1 (se for régua inteira)

10. Unidade 1 mm vai ser igual a 25.6701~25.780107

Em seguida á calibração, foi gerada uma grade de pontos, da seguinte maneira:

1. Abriu-se sua imagem escaneada na mesma objetiva da régua selecionada
2. Process
3. Grid Mask
4. New
5. Grid: Selecionar Lines, Orthogonal e Spacing em 0.07x 0.07
6. Settings: Escolher a cor do grid (preta)
7. Save as (Abrir pasta dentro de C: IpWiN4/Grid e dar o nome para o grid criado)

Assim, obteve-se uma imagem gradeada com 144 pontos de interseção entre as linhas da grade. A contagem de pontos, foi realizada da seguinte maneira:

1. Measure
2. Manual Tag
3. Classes

* Nomearam-se as classes a serem contadas:

- Coágulo.
- Tecido de granulação
- Vasos sanguíneos.
- Matriz óssea.
- Outros.

4. View: Desmarcar "label"
5. Tag points

Essa análise quantificou a porcentagem de pontos que incidiram que sobre cada parâmetro definido na área de interesse .

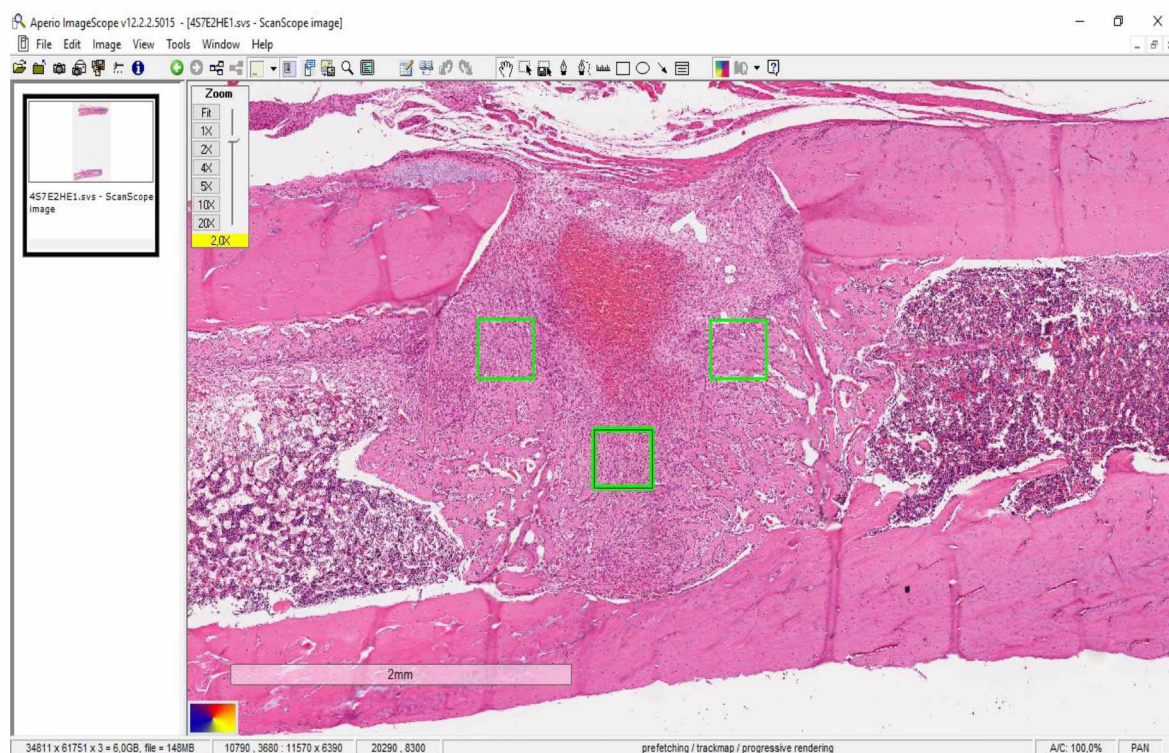


Figura 4: Ilustração da análise histológica quantitativa em HE. Delimitação dos três quadrados na região analisada.

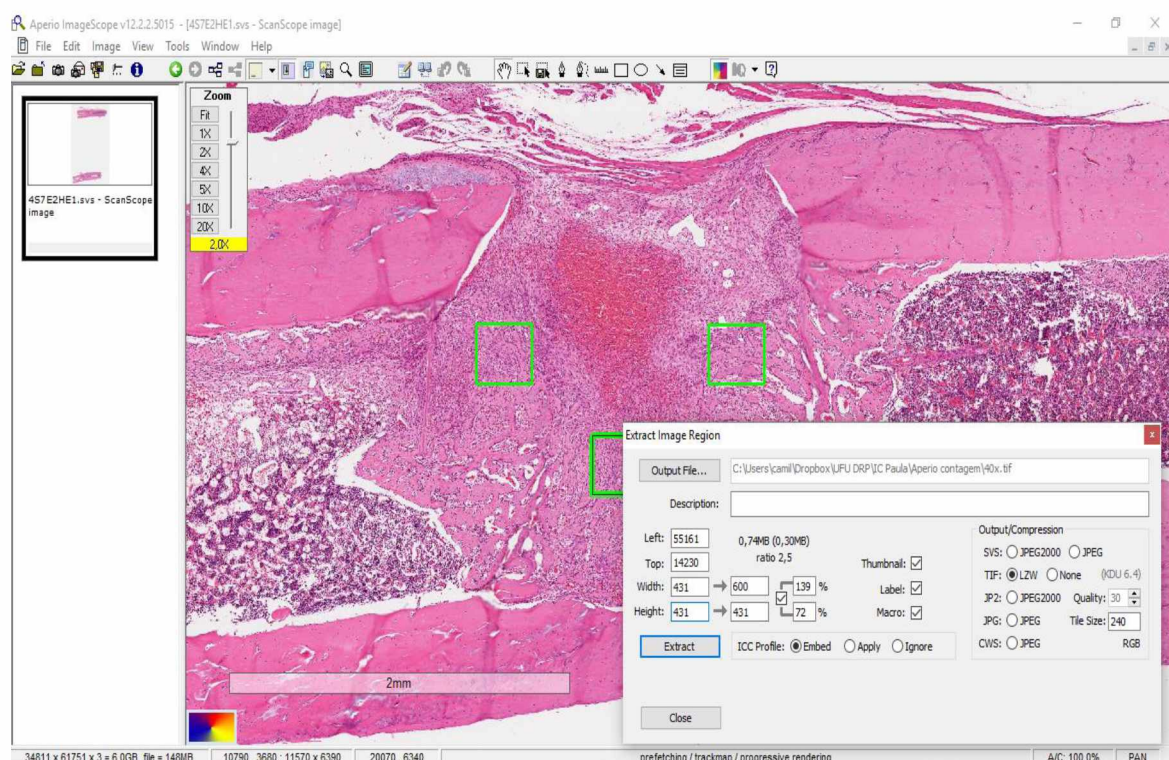


Figura 5: Ilustração da análise histológica quantitativa em HE. Extração da imagem.

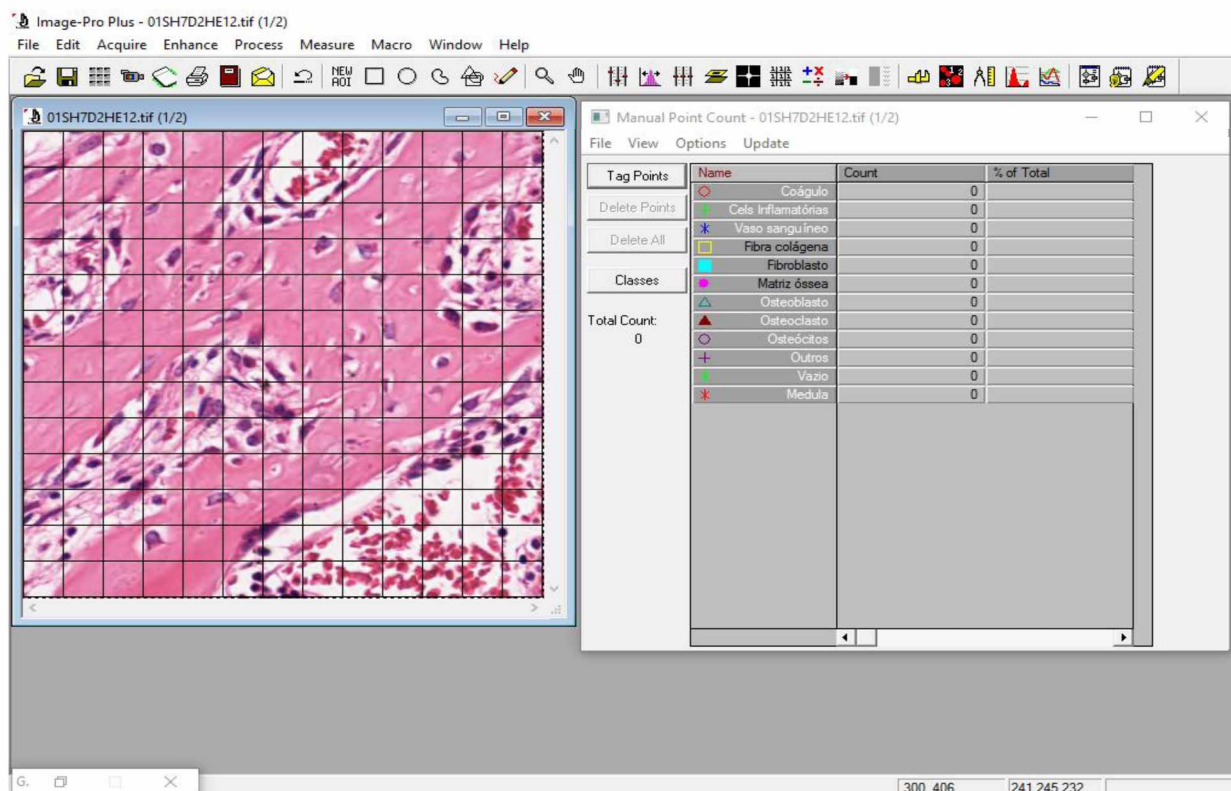


Figura 6: Ilustração da análise histológica quantitativa em HE. Sobreposição da grade de pontos.

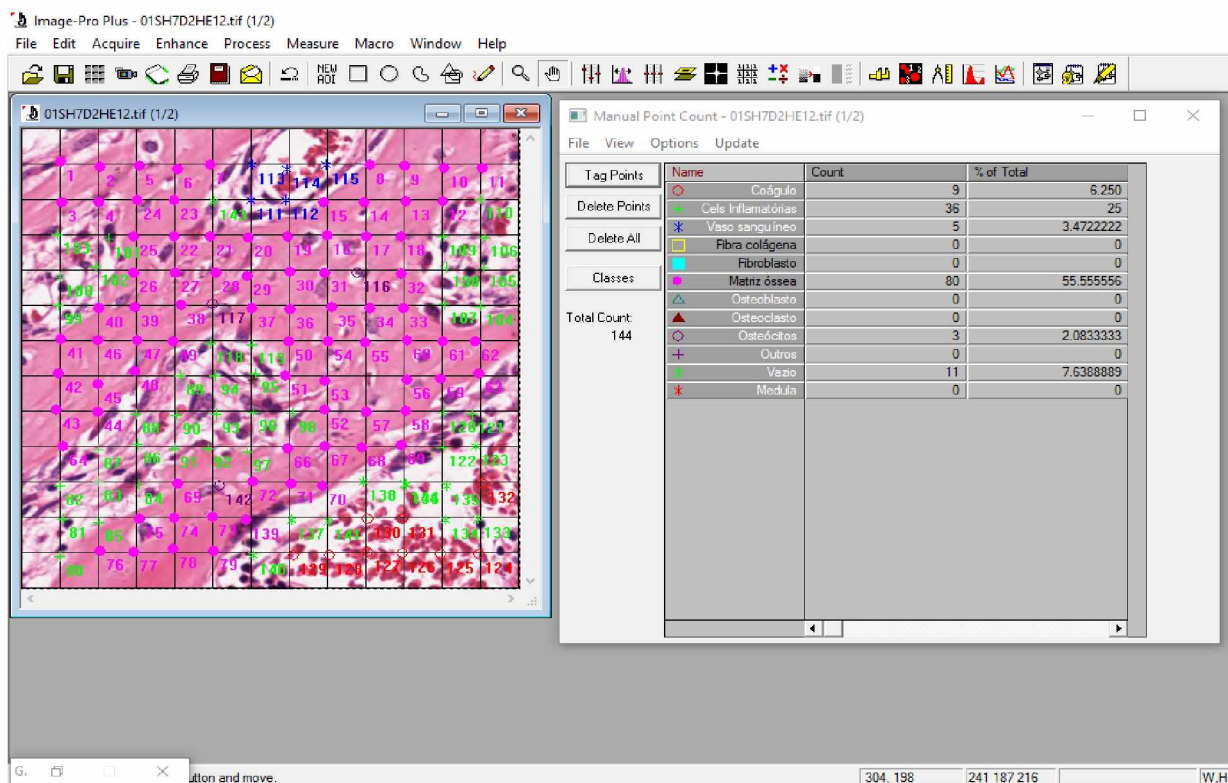


Figura 7: Ilustração da análise histológica quantitativa em HE. Contagem dos pontos.

Para análise da porcentagem 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) para remoção do tecido mole. 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 lesionada até a cortical oposta, por meio da ferramenta *draw*. A porcentagem de matriz óssea neoformada dentro da ROI foi calculada com a ferramenta *measurement*. (Fig. 8)

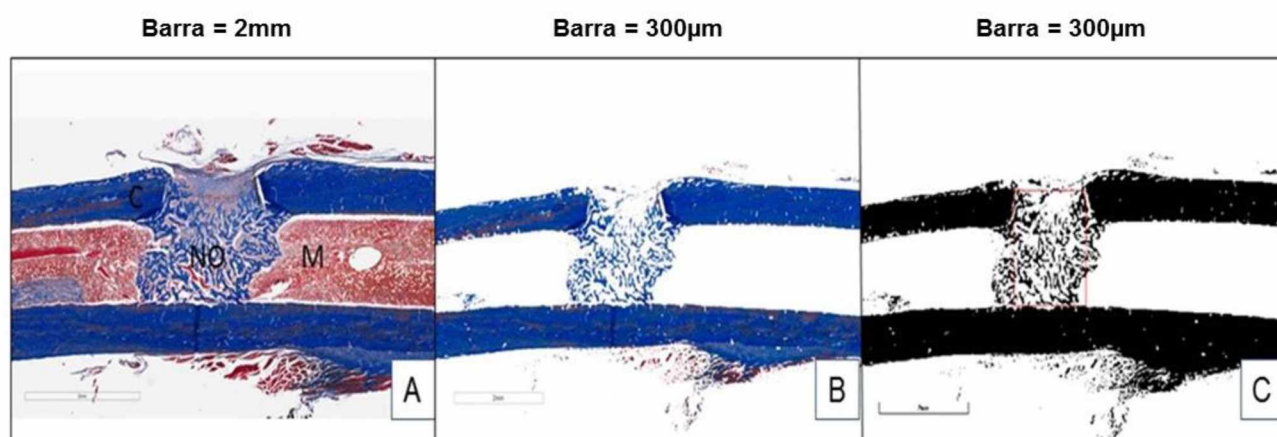


Figura 8: A - Imagem histológica de corte longitudinal de diáfise de fêmur mostrando a cortical (C), medula óssea (M) e neoformação óssea (NO). B – Imagem após a remoção do tecido mole. C – Imagem binária da imagem com delimitação da região de interesse (ROI) do defeito ósseo (linha vermelha). Tricrômico de Mallory.

Para a quantificação dos mastócitos, 12 lâminas histológicas de cada animal coradas com Azul de Toluidina foram selecionadas e analisadas com um microscópio óptico (Olympus BX 50, Shinjuku-ku, Tóquio, Japão) em 40x. Os mastócitos foram identificados pela sua característica de metacromasia, apresentando-se em coloração violeta. A contagem das células foi realizada utilizando método simples-cego de avaliação. Foram contados doze campos, correspondendo a área total da lesão e apenas os mastócitos presentes dentro da região de interesse.

3.7 Análise estatística

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

4. Resultados

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

Tabela 1 - Valores de glicemia do grupo diabético, medidos após: 24h, 15 dias, 30 dias e 37 dias após a indução

GLICEMIA 24H	GLICEMIA 15 DIAS	GLICEMIA DIA DA CIRURGIA (30 DIAS)	GLICEMIA DIA DA EUTANÁSIA	CONDIÇÃO
350	486	485	517	SEM OH
310	322	207	404	SEM OH
310	303	414	563	SEM OH
319	343	408	595	SEM OH
377	322	426	437	SEM OH

Tabela 2 - Valores da glicemia do grupo diabético com oxigenação hiperbárica, medidos medidos após: 24h, 15 dias, 30 dias e 37 dias após a indução

GLICEMIA 24H	GLICEMIA 15 DIAS	GLICEMIA DIA DA CIRURGIA (30 DIAS)	GLICEMIA DIA DA EUTANÁSIA	CONDIÇÃO
322	393	468	323	COM OH
279	473	450	430	COM OH
332	523	388	370	COM OH
243	531	563	249	COM OH
392	569	535	238	COM OH

4.1. Análise histológica qualitativa

No grupo controle (C) observou-se tecido ósseo primário neoformado preenchendo quase completamente a região de interesse, ou seja, a área da cortical óssea rompida e região do canal medular próxima a essa. As trabéculas ósseas neoformadas estendiam-se da borda da cortical óssea rompida até a cortical íntegra oposta, interconectadas, delimitando pequenas cavidades preenchidas com medula óssea. 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. 9 – A,B,C).

No grupo controle com hiperbárica (CH), observou-se os mesmos aspectos morfológicos do grupo controle sem hiperbárica. Porém, no grupo CH 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 C (Fig 9 – D,E,F).

No grupo diabético (D), a região de interesse mostrou-se parcialmente preenchida por trabéculas ósseas neoformadas com aspectos morfológicos semelhantes ao grupo C. 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 9 – G,H,I).

No grupo diabético com hiperbárica (DH), observou-se trabéculas ósseas neoformadas preenchendo parcialmente a região de interesse e aspectos morfológicos muito semelhantes ao grupo controle, 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 menos áreas de hemorragia na área da lesão (Fig 9 – J,K,L).

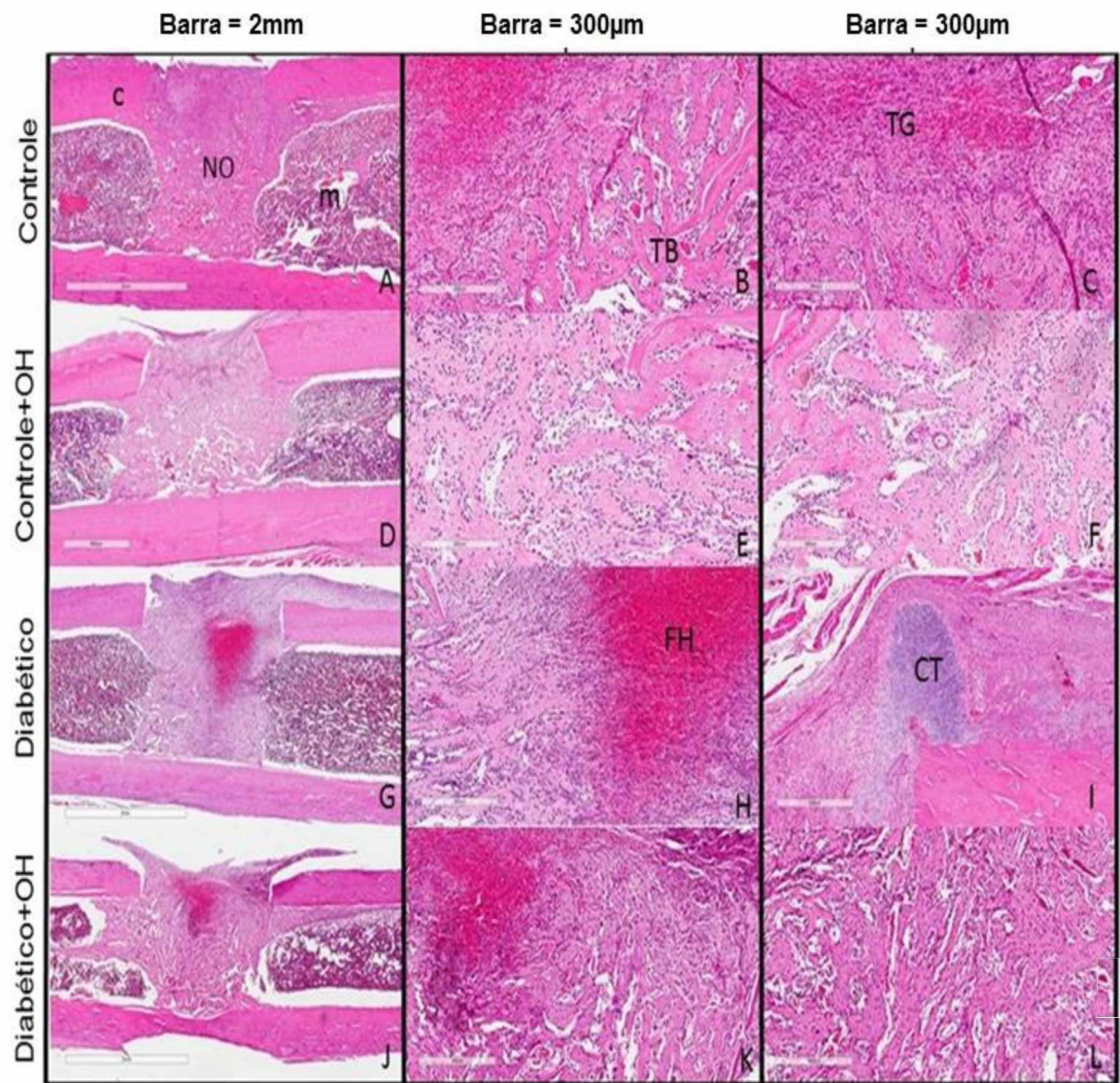


Figura 9: Imagem histológica de corte longitudinal de fêmur mostrando: cortical (C), medula óssea (M) e neoformação óssea (NO), trabécula óssea (TB), cartilagem (CT), tecido de granulação (TG), foco de hemorragia (FH). Hematoxilina e Eosina.

4.2 Análise histomorfométrica

4.2.1 Análise histológica quantitativa em Hematoxilina e Eosina

Em relação ao parâmetro coágulo, o grupo CH ($4,39 \pm 0,87$) apresentou menor porcentagem de região de coágulo, sendo significativamente menor que os grupos DH ($16,93 \pm 1,59$) e C ($20,47 \pm 5,11$) (Fig. 10).

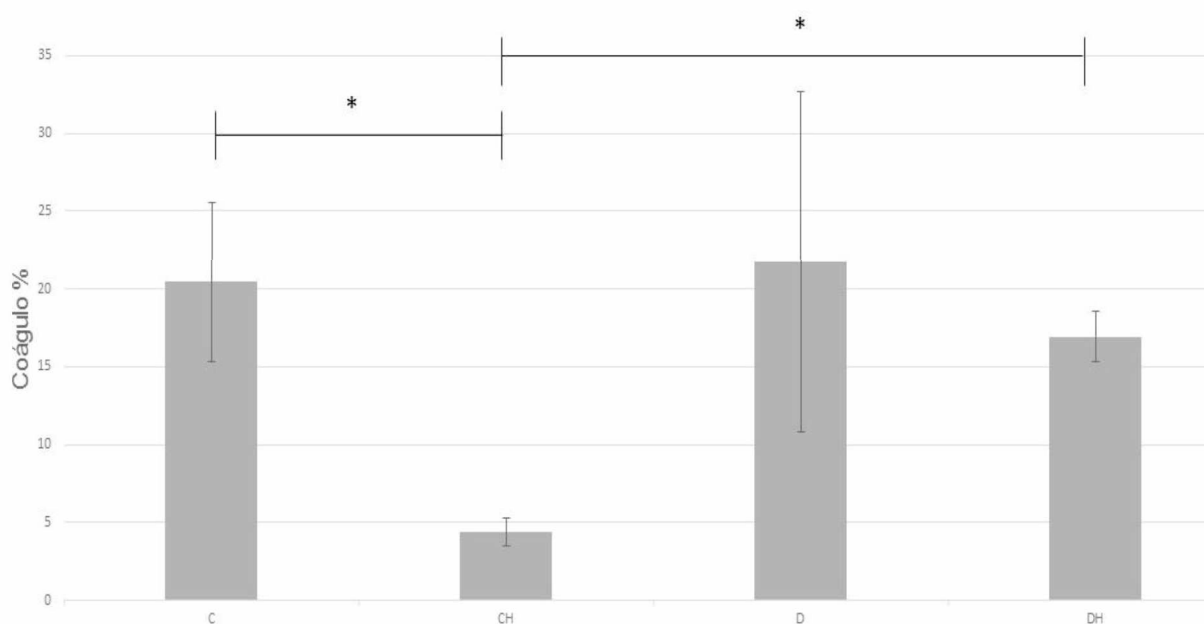


Figura 10: Porcentagem de região de coágulo nos grupos: controle (C), controle com oxigenação hiperbárica (CH), diabetes (D), diabetes com oxigenação hiperbárica (DH), 7 dias após o procedimento cirúrgico. * $p < 0,05$

Em relação ao parâmetro tecido de granulação, o grupo CH ($81,41 \pm 17,64$) apresentou menor porcentagem de tecido de granulação, sendo significativamente menor que o grupo C ($116,77 \pm 2,40$).

O grupo DH ($81,45 \pm 26,80$) apresentou menor porcentagem, sendo significativamente menor que o grupo D ($125,38 \pm 4,05$) (Fig. 11).

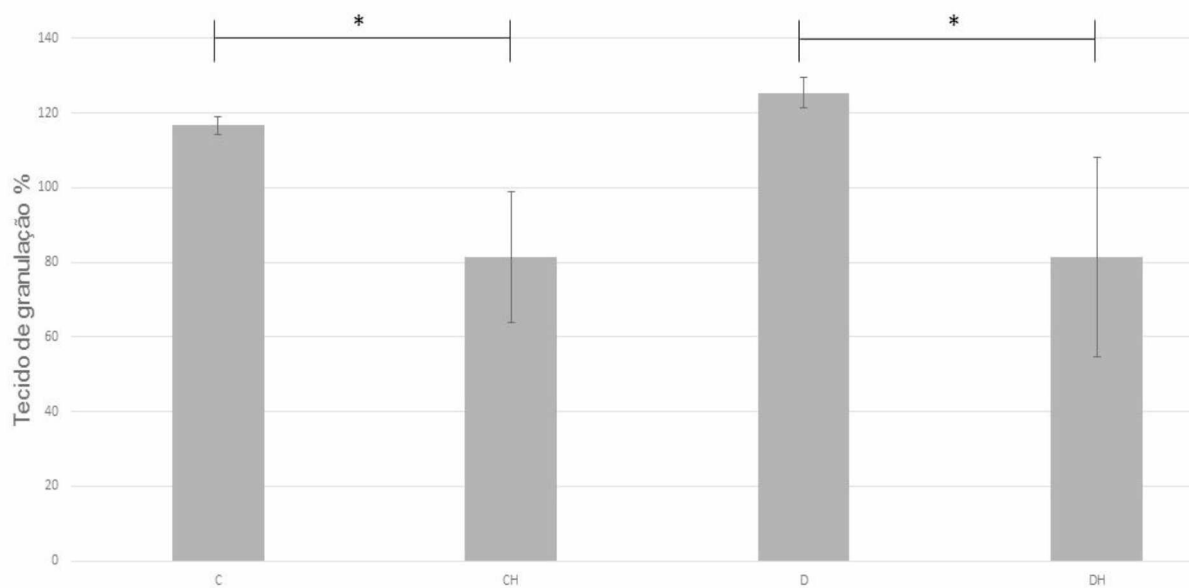


Figura 11: Porcentagem de região de tecido de granulação nos grupos controle (C), controle com oxigenação hiperbárica (CH), diabetes (D), diabetes com oxigenação hiperbárica (DH) em 7 dias após o procedimento cirúrgico.* $p < 0,05$

Em relação ao parâmetro vaso sanguíneo, o grupo D ($2,61 \pm 0,70$) apresentou menor porcentagem de vasos sanguíneos, sendo significativamente menor que os grupos C ($12,70 \pm 2,56$) e DH ($9,69 \pm 2,23$).

O grupo CH ($16,31 \pm 5,67$) apresentou maior porcentagem de vasos sanguíneos, sendo significativamente maior que o grupo DH ($9,69 \pm 2,23$) (Fig. 12).

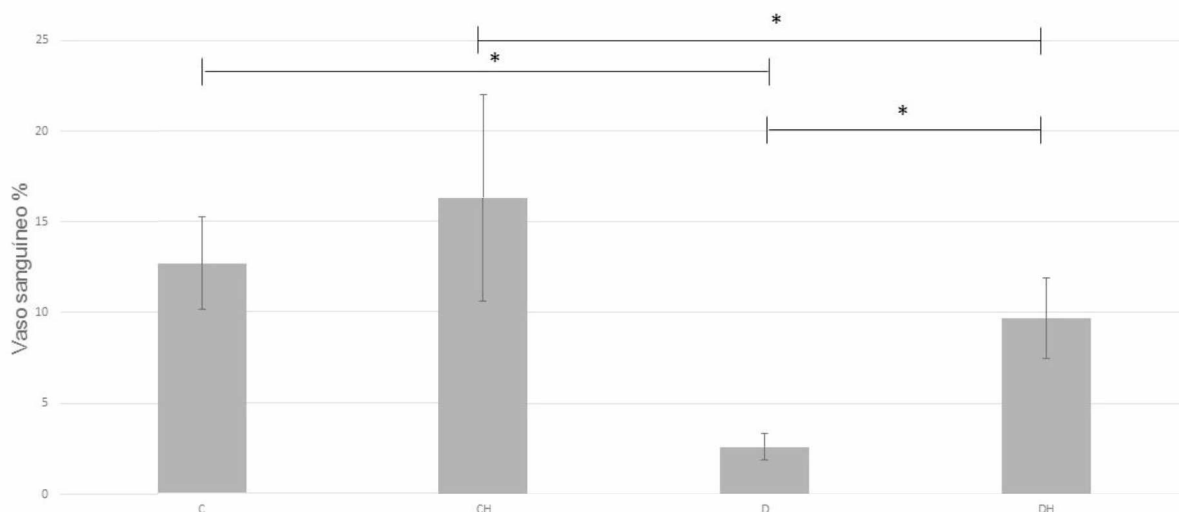


Figura 12: Porcentagem de vasos sanguíneos nos grupos controle (C), controle com oxigenação hiperbárica (CH), diabetes (D), diabetes com oxigenação hiperbárica (DH) em 7 dias após o procedimento cirúrgico.* $p < 0,05$

Em relação ao parâmetro matriz óssea, o grupo D ($85,11 \pm 8,36$) apresentou menor porcentagem de matriz óssea, sendo significativamente menor que os grupos C ($106,9 \pm 3,36$) e DH ($106,07 \pm 4,65$).

O grupo CH ($107,04 \pm 10,33$) apresentou maior porcentagem de matriz óssea, sendo significativamente maior que o grupo DH ($106,07 \pm 4,65$) (Fig. 13)

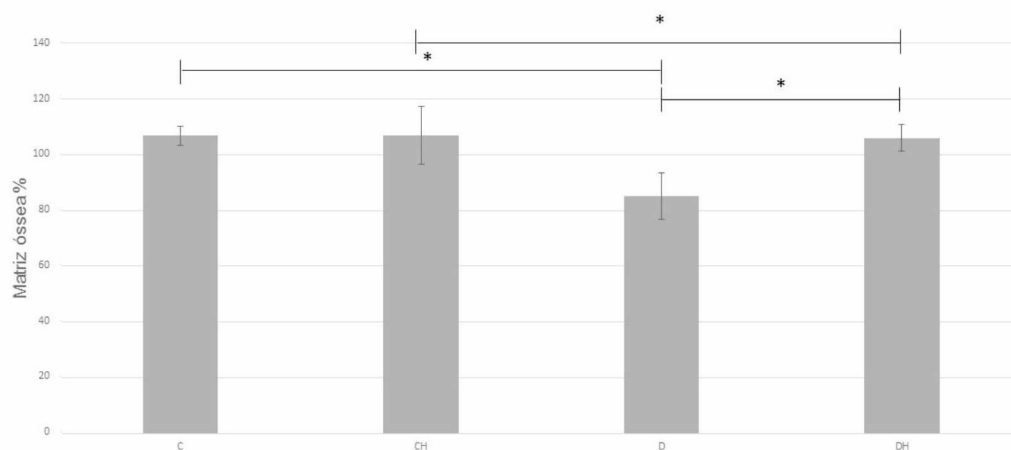


Figura 13: Porcentagem de matriz óssea nos grupos controle (C), controle com oxigenação hiperbárica (CH), diabetes (D), diabetes com oxigenação hiperbárica (DH) em 7 dias após o procedimento cirúrgico.* $p < 0,05$

4.2.2 Análise histológica quantitativa em Tricrômico de Mallory

O grupo D ($14,70 \pm 3,70$) apresentou a menor porcentagem de matriz óssea neoformada, sendo significativamente menor que os grupos C ($24,12 \pm 2,40$) e DH ($22,02 \pm 3,60$).

O grupo DH ($22,02 \pm 3,60$) apresentou porcentagem de matriz significativamente maior que o grupo D. Não houve diferença significativa de porcentagem de matriz óssea neoformada entre os grupos C e CH, C e DH, CH e D, CH e DH (Fig. 14).

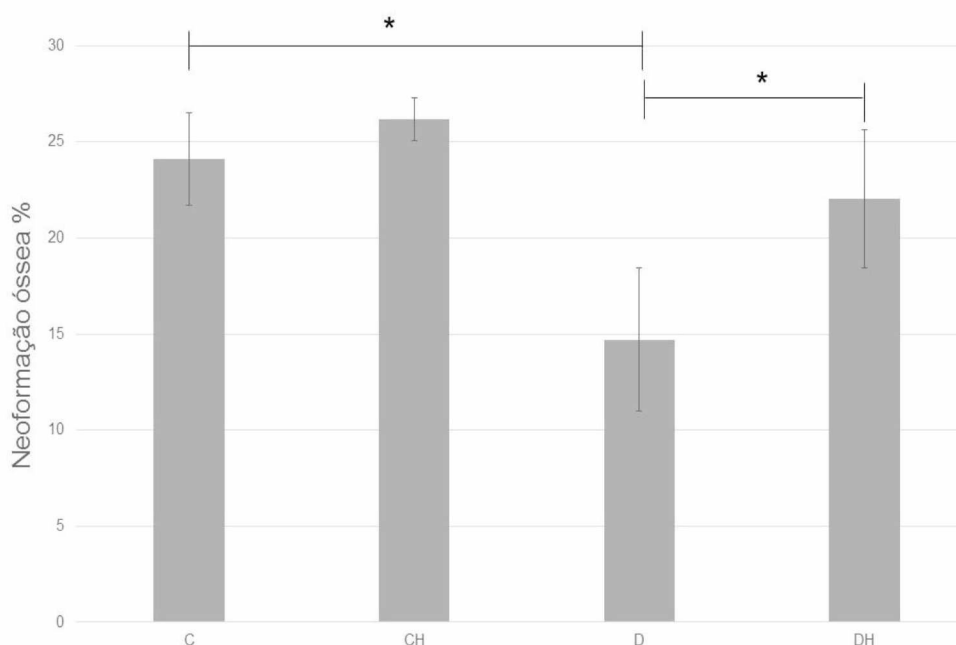


Figura 14: Porcentagem de neoformação de matriz óssea nos grupos controle (C), controle com oxigenação hiperbárica (CH), diabetes (D), diabetes com oxigenação hiperbárica (DH) em 7 dias após o procedimento cirúrgico.* $p < 0,05$

4.2.3 Análise histológica quantitativa em Azul de Toluidina (Contagem de mastócitos)

Os mastócitos apresentaram-se como células globosas, de citoplasma metacromático, com granulações citoplasmáticas evidentes, localizados entre as células presentes na área da lesão (Fig. 15 e 16)

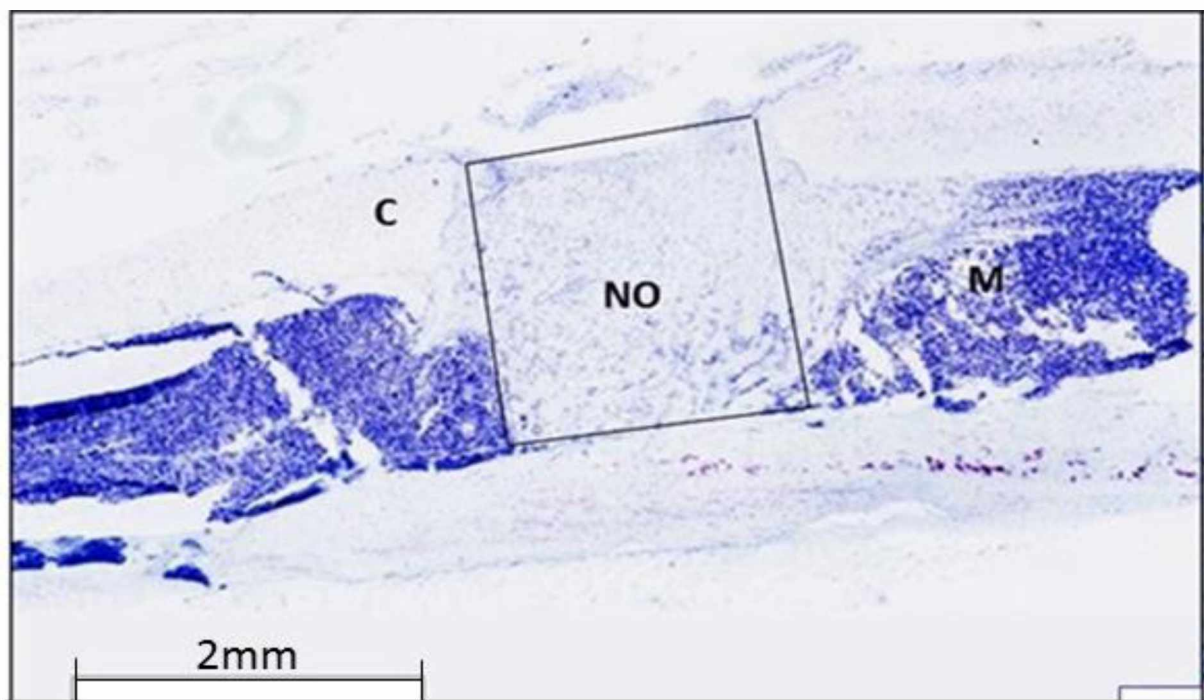


Figura 15: Imagem histológica de corte longitudinal de fêmur mostrando a cortical (C), medula óssea (M) e neoformação óssea (NO). Azul de toluidina.

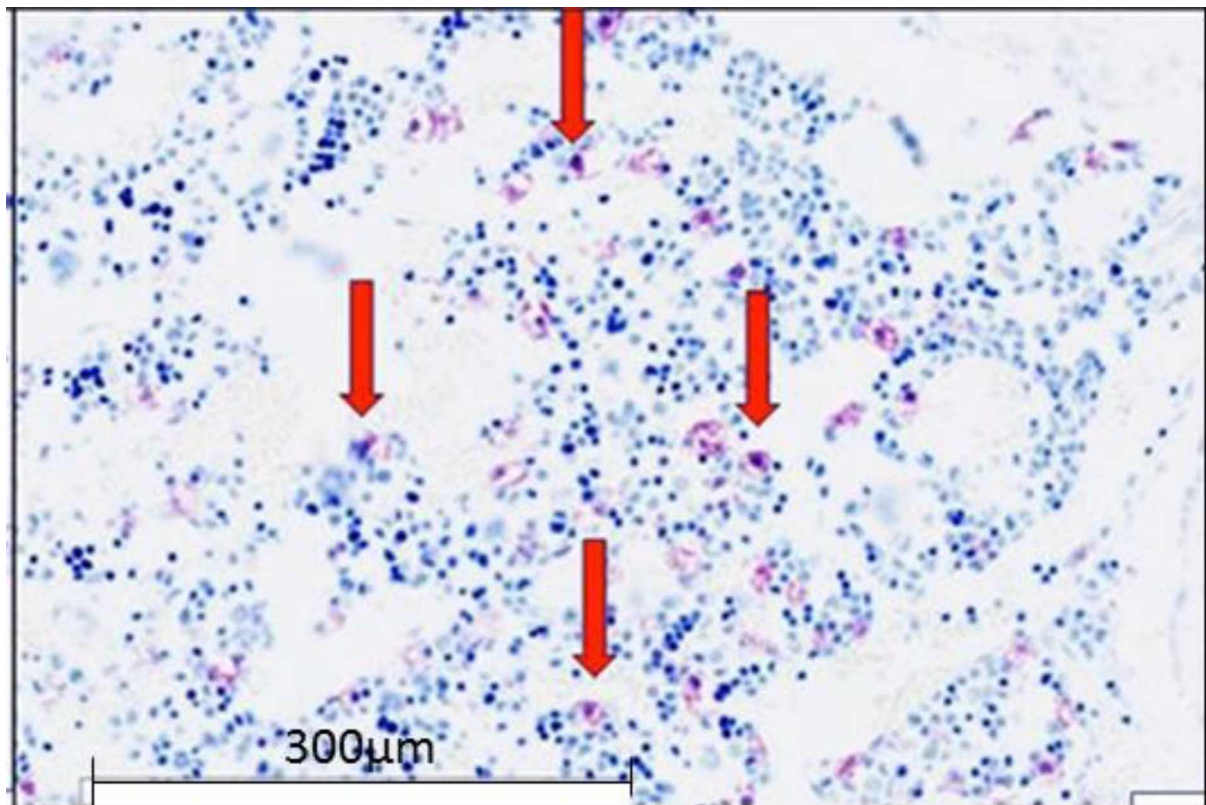


Figura 16: Imagem histológica de corte longitudinal de fêmur mostrando a cortical (C), medula óssea (M) e neoformação óssea (NO). Detalhe da região da lesão evidenciando os mastócitos (setas). Azul de toluidina.

O grupo CH ($180,50 \pm 45,25$) apresentou quantidade de mastócitos significativamente maior que os grupos C ($34,41 \pm 9,16$) e DH ($42,16 \pm 25,93$). (Fig. 17).

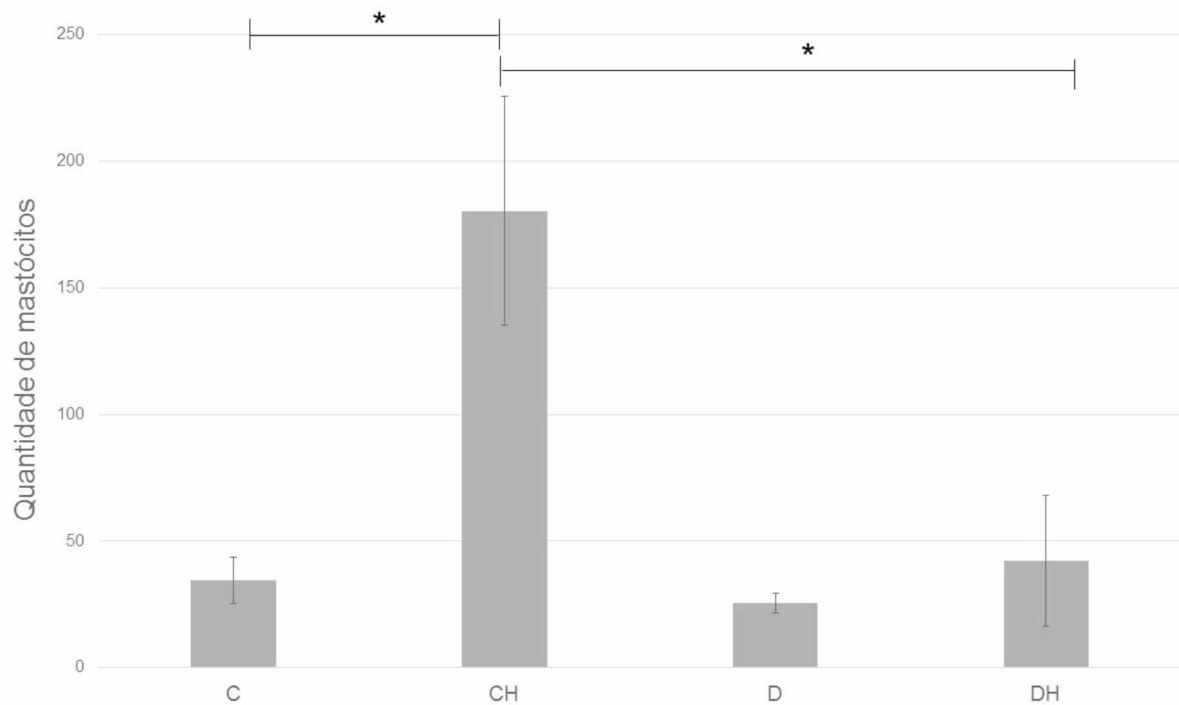


Figura 17: Quantidade de mastócitos nos grupos controle (C), controle com oxigenação hiperbárica (CH), diabetes (D), diabetes com oxigenação hiperbárica (DH) em 7 dias após o procedimento cirúrgico. . * $p < 0,05$

5. Discussão

O presente estudo avaliou o efeito da oxigenação hiperbárica (OH) na população de mastócitos e no reparo ósseo em animais saudáveis e diabéticos. A hipótese do estudo foi confirmada, pois a OH melhorou o reparo ósseo em animais diabéticos. As análises histológicas qualitativa e quantitativa mostraram que o DM atrasa o reparo e a OH melhora o reparo ósseo 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 (Delfino, 2002). 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 replicam a diabetes tipo 1, de modo mais estável e próximo da doença, com baixas taxa de reversão e mortalidade (Deeds et al., 2011).

A análise histológica qualitativa e quantitativa mostrou que o grupo diabético apresentou maior quantidade de coágulo, trabéculas mais espessas; maior quantidade de tecido de granulação, menor quantidade de vasos sanguíneos e de matriz óssea neoformada. Esses achados estão relacionados ao fato do DM prolongar a fase inflamatória, (Al-Watban et al., 2006) e também prejudicar a formação e função de osteoblastos e osteoclastos (Antonopoulou et al., 2013), atrasando todo o processo de reparo ósseo.

A análises histológicas mostraram também que a OH melhorou o processo de reparo ósseo em diabéticos, uma vez que os resultados nesse grupo foram semelhantes aos do grupo controle. 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). A OH aproximou o grupo diabético da condição dos animais do grupo normoglicêmicos. 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 neutralizar 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 a aumento de 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 DM 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.

No presente estudo, observou-se aumento de mastócitos nos grupos OH, o que sugere que a oxigenoterapia hiperbárica tem algum efeito na população de mastócitos. A participação dos mastócitos no processo de reparo ósseo não está esclarecida, porém, sabe-se que na ausência de mastócitos o reparo é mais lento e de pior qualidade, resultando em diminuição da força biomecânica e na densidade do tecido ósseo (Behrends et al., 2014).

Os mastócitos participam ativamente de todas as fases de reparação de feridas, desde a inflamação, formação do tecido de granulação e da matriz, até a remodelação, atuando sobre a angiogênese, a permeabilidade vascular e a formação de colágeno (Schaffer F et al., 1995; Babaei et al., 2016). Eles possuem ação biológica decisiva nos mecanismos de lesão tecidual e defesa imunológica. Os estudos indicam que os mastócitos têm um impacto positivo na reparação óssea (Ramirez-GarciaLuna JL et al., 2017). É provável que o aumento da vascularização e permeabilidade vascular tenha favorecido o aumento de mastócito em normoglicêmicos, porém esses fatores não foram suficientes para alterar a população de mastócitos em diabéticos.

No presente estudo a HBO foi capaz de aumentar a quantidade de mastócitos em animais normoglicêmicos e acelerar o reparo ósseo em animais diabéticos. Isso sugere que a HBO pode interferir na atividade mastocitária e esse fato pode ter alguma participação na melhora do processo de reparo.

6. Conclusão

A oxigenação hiperbárica melhora o reparo ósseo em animais diabéticos e aumenta a quantidade de mastócitos em animais normoglicêmicos.

7. Referências

ADAMI S. Bone health in diabetes: considerations for clinical management. **Curr Med Res Opin** 2009;25(5):1057e72

American Diabetes Association. "Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus". **Diabetes Care**, v.33, Suppl. 1: S62; Jan. 2010. Disponível em: http://care.diabetesjournals.org/content/33/Supplement_1/S62.full.pdf+html. Acesso em: 1 janeiro. 2015

ANDRÉ-LÉVIGNE, Dominik et al. Hyperbaric oxygen therapy promotes wound repair in ischemic and hyperglycemic conditions, increasing tissue perfusion and collagen deposition. **Wound Repair And Regeneration**, [s.l.], v. 24, n. 6, p.954-965, 18 out. 2016. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/wrr.12480>.

ANTONOPOULOU, Marianna et al. Diabetes and bone health. **Maturitas**, [s.l.], v. 76, n. 3, p.253-259, nov. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.maturitas.2013.04.004>.

BABAEI, Saeid et al. Effect of Omegaven on mast cell concentration in diabetic wound healing. **Journal Of Tissue Viability**, [s.l.], v. 26, n. 2, p.125-130, maio 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtv.2016.12.001>

BATISTA, AC et al. Quantification of mast cells in different stages of human periodontal disease. **Oral Diseases**, Londres, v. 1, n. 11, p.249-254, jan. 2005.

BEHREND, da et al. Defective bone repair in mast cell deficient mice with C-KIT loss of function. **European Cells And Materials**. Switzerland, p. 209-222. out. 2014.

BOTOLIN S, Faugere MC, Malluche H, Orth M, Meyer R, McCabe LR. Increased bone adiposity and peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma2 expression in type I diabetic mice. **Endocrinology** 2005;146(8):3622e31. 18.

CAKATAY U, Telci A, Kayali R, Akcay T, Sivas A, Aral F. Changes in bone turnover on deoxypyridinoline levels in diabetic patients. **Diabetes Res Clin Pract** 1998;40(2):75e9.

CARLOS, Daniela et al. Mast cells control insulinitis and increase Treg cells to confer protection against STZ-induced type 1 diabetes in mice. **European Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 45, n. 10, p.2873-2885, 14 ago. 2015. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/eji.201545498>.

CORREIA, KVD; MEDRADO, ARAP. Participação dos mastócitos no reapro tecidual em lesões inflamatórias bucais – uma revisão de literatura. **Revista Bahiana de Odontologia**, Salvador, v. 1, n. 4, p.27-36, jun. 2013.

DEEDS, M. et al. Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. **Laboratory Animals**, v. 45, n. 3, p. 131-140, 2011.

DELFINOA VDA, Figueiredob JF, Matsuo T, Favero ME, Matnia AM, Mocelin AJ. Diabetes mellitus induzido por estreptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração. **J Bras Nefrol** 2002;24(1):31-6

FOLLAK N, Klöting I, Merk H, Influence of diabetic metabolic state on fracture healing in spontaneously diabetic rats. **Diabetes Metab Res Rev** 2005; 21: 288–296.

GERSTENFELD, LC et al. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. **Journal Of Cellular Biochemistry**. Massachusetts, p. 873-874. abr. 2003c..

GERSTENFELD, LC et al. 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.

GRAVES, Dana T. et al. Impact of Diabetes on Fracture Healing. **Journal Of Experimental & Clinical Medicine**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.3-8, fev. 2011. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.jecm.2010.12.006. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S1878331710000525?httpAccept=text/x>>. Acesso em: 24 set. 2015.

JAN A, Sándor GK, Brkovic B, 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 Endodontology. v. 107, n. 2, p. 157-163, 2009

JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J. **Histologia Básica.** Rio de Janeiro: Guanabara. p.180-197, 2013.

KAWADA S, Wada E, Matsuda R, Ishii N. Hyperbaric Hyperoxia Accelerates Fracture Healing in Mice. **PloS One.** v. 8, n. 8, p. e72603, 2013.

KEMINK SA, Hermus AR, Swinkels LM, Lutterman JA, Smals AG. Osteopenia in insulin-dependent diabetes mellitus; **prevalence and aspects of pathophysiology.** **J Endocrinol Invest** 2000;23(5):295e303.

KHAZAI NB, Beck Jr GR, Umpierrez GE. Diabetes and fractures: an overshadowed association. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes** 2009;16(6):435e45.14.

LIN SS, Uengc SW.N, Niu CC, Yuanc LJ, Yangc CY, Chenc WJ, Lee MS., Chenb JK. Hyperbaric oxygen promotes osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells by regulating Wnt3a/ β -catenin signaling—An in vitro and in vivo study. **Stem Cell Research**, 2014; 12, 260–274.

MIELLI MPA, Aldrighi JM. Quando indicar a oxigenoterapia hiperbárica ?. **Rev Assoc Med Bras** 2004; 50(3): 229-51.

MUSSEL, R. L. Oliveira et al. Mast cells in tissue response to dentistry materials: an adhesive resin, a calcium hydroxide and a glass ionomer cement. **Journal Of Cellular And Molecular Medicine**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.171-178, abr. 2003. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2003.tb00216.x.

NANCI, A. **Histologia Oral.** Desenvolvimento, estrutura e função. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

POSPISILOVÁ, J. Healing of wounds. *Acta Chir Plast*, v.24, p.293-303, 1982.

PRABOWO, S. 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**, v. 06, n. 15, p. 1950, 2014.

REDDY G, Stehno-Bittel L, Hamade S, Enwemeka C. The biomechanical integrity of bone in experimental diabetes. **Diabetes Res Clin Pract** 2001;54:1e8.

RODRIGUES, MJ; MARRA, AR. Quando indicar a oxigenoterapia hiperbárica? **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 50, n. 3, p.229-251, jun. 2004.

SALE, George E.; MARMONT, Paula. Marrow mast cell counts do not predict bone marrow graft rejection. **Human Pathology**, [s.l.], v. 12, n. 7, p.605-608, jul. 1981. Elsevier BV. DOI: 10.1016/s0046-8177(81)80043-3. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0046817781800433?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 16 ago. 2015.

STROTMEYER ES, Cauley JA. Diabetes mellitus, bone mineral density, and fracture risk. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes** 2007;14(6):429e35.) 16.

Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Relative fracture risk in patients with diabetes mellitus, and the impact of insulin and oral antidiabetic medication on relative fracture risk. **Diabetologia** 2005;48:1292–9.

WANG, W. et al. Effects of Insulin Plus Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists (GLP-1RAs) in Treating Type 1 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Diabetes Therapy**, p. 1-12, 2017.