

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**  
**Programa de Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada às**  
**Ciências da Saúde**

Alexandre Botelho de Abreu Sampaio

**EFEITO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA ASSOCIADO**  
**AO USO DE CARVÃO ATIVADO NO PROCESSO DE**  
**REPARO ÓSSEO EM TÍBIA DE RATOS.**

**São Paulo, SP**  
**2014**

**ALEXANDRE BOTELHO DE ABREU SAMPAIO**

**EFEITO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA ASSOCIADO  
AO USO DE CARVÃO ATIVADO NO PROCESSO DE  
REPARO ÓSSEO EM TÍBIA DE RATOS.**

**Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Biofotônica Aplicada às Ciências  
da Saúde da Universidade Nove  
de Julho, para obtenção do Título  
de Mestre.**

**Área de Concentração: Saúde**

**Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos**

**São Paulo, SP.  
2014**

Sampaio, Alexandre Botelho de Abreu.

Efeito do laser de baixa potência associado ao uso de carvão ativado no processo de reparo ósseo em tíbia de ratos. / Alexandre Botelho de Abreu Sampaio. 2014.

71 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2014.

Orientador (a): Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos.

1. Reparo ósseo. 2. Laser de baixa potência. 3. Carvão ativado. 4. Propriedades mecânicas.

I. Marcos, Rodrigo Labat.

II. Título

CDU 615.8

São Paulo, 17 de dezembro de 2014.

**TERMO DE APROVAÇÃO**

Aluno(a): ALEXANDRE BOTELHO DE ABREU SAMPAIO

Título da Dissertação: "Efeito do laser de baixa potência associado ao uso de carvão ativado no processo de reparo ósseo em tibia de ratos"

Presidente: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS



Membro: PROFA. DRA. RAQUEL APARECIDA CASAROTTO



Membro: PROF. DR. MARCELO TAVARES DE OLIVEIRA



***A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.***

*Albert Einstein*

**Dedicatória:**

*À Roberta, pessoa com quem amo partilhar a vida. Aos meus pais, Affonso e Neusa, origem da inspiração para enfrentar mais este desafio. A minha Avó paterna (in memoriam) pelo exemplo, que não há limite de idade para a absorção de novos conhecimentos.*

**Agradecimentos:**

Agradeço a Deus pela oportunidade de estar realizando este trabalho.

A minha família, pelo incentivo e colaboração, principalmente nos momentos de dificuldade.

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos, pela paciência, dedicação, incentivo e sabedoria que muito me auxiliou para conclusão desta dissertação.

Agradeço aos meus colegas pelas palavras amigas nas horas difíceis, pelo auxílio nos trabalhos e dificuldades e principalmente por estarem comigo nesta caminhada tornando-a mais fácil e agradável.

A esta universidade, seu corpo docente, direção e administração. A todos que direto ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

“Algumas pessoas marcam a nossa vida para sempre, umas porque nos vão ajudando na construção, outras porque nos apresentam projetos de sonho e outras ainda porque nos desafiam a construí-los”.

## Lista de Abreviaturas

CTL - Controle  
NT - Lesão não tratado  
CA - Lesão tratado com carvão ativado  
CA+L - Lesão tratado com associação do carvão ativo e laser 6J.  
HA – Lesão tratado com Hidroxiapatita  
TGF-  $\beta$  – Fator de transformação  $\beta$   
PDGF - Fator de crescimento de derivação plaquetária  
FGF-2 - Fator de crescimento de fibroblasto 2  
VEGF - Fator de crescimento vascular endotelial  
M-CSF - Fator estimulador de colônia de macrófagos  
IL-1 – Interleucina 1  
IL-6 – Interleucina 6  
BMP-2 - Proteína óssea morfogenética 2  
TNF-  $\alpha$  - Fator de necrose tumoral  $\alpha$   
M-CSF - Macrophage colony-stimulating fator  
RANKL - Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand  
BMP-3 - Proteínas morfogenética 3  
BMP-4 - Proteínas morfogenéticas 4  
BMP-7 - Proteínas morfogenéticas 7  
BMP-8 - Proteínas morfogenéticas 8  
°C – graus célsius  
LASER – Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation  
S – Segundos  
W – Watts  
LBP – Laser de Baixa Potência  
g – Grama  
Kg – Kilograma  
Mm – Milímetros  
nm– Nanômetro  
mW – MiliWatt  
cm<sup>2</sup> - Centímetro quadrado  
J – Joule  
J/cm<sup>2</sup> - Joules por centímetro quadrado  
mL – Mililitro  
N – Newton  
RPM – Rotações Por Minuto  
ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay  
 $\mu$ L - 10<sup>-6</sup> Litros  
F<sub>max</sub> - Força de ruptura máxima  
K<sub>s</sub> - Rigidez secante  
D<sub>max</sub> - Descolamento no momento da ruptura máxima  
AsGaAl - Arseneto de Gálio e Alumínio  
ANOVA - análise de variância  
® - Marca Registrada  
% - Porcento  
H E – Hematoxilina eosina  
 $\lambda$  - Comprimento de onda  
 $\mu$ m - Micrometros

## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Esquema dos grupos experimentais.....	22
<b>Figura 2:</b> Defeito induzido pela broca cirúrgica.....	23
<b>Figura 3:</b> Tabela com os parâmetros de irradiação laser.....	23
<b>Figura 4:</b> Dispositivo para ensaio de flexão em 3 pontos .....	24
<b>Figura 5:</b> Gráfico do ensaio de flexão.....	25
<b>Figura 6:</b> Posicionamento do osso tibial para ensaio mecânico.....	26
<b>Figura 7:</b> Corte histológico transversal da tíbia direita do grupo CTL.....	28
<b>Figura 8:</b> Corte histológico transversal da tíbia direita do grupo NT.....	29
<b>Figura 9:</b> Corte histológico transversal da tíbia direita do grupo CA.....	30
<b>Figura 10:</b> Corte histológico transversal da tíbia direita do grupo CA+L.....	31
<b>Figura 11:</b> Corte histológico transversal da tíbia direita do grupo HA.....	32
<b>Figura 12:</b> Níveis de fosfatase alcalina.....	33
<b>Figura 13:</b> Gráfico da força máxima de flexão no momento da ruptura óssea.	34
<b>Figura 14:</b> Gráfico do deslocamento máximo no momento da ruptura óssea..	35
<b>Figura 15:</b> Gráfico da relação entre a força máxima de flexão óssea com o deslocamento máximo no momento da ruptura óssea.....	36

## RESUMO

**Sampaio, ABA.** *Efeito do laser de baixa potência associado ao uso de carvão ativado no processo de reparo ósseo em tibia de ratos /Alexandre Botelho de Abreu Sampaio, 2014.*

Os defeitos ósseos são causados por diversos fatores e o processo de reparo pode ser lento, onde as fases inflamatória, proliferativa e de remodelação deste tecido são extremamente importantes para a qualidade do reparo. Existem diversas terapias onde a principal é a cirúrgica e neste caso, o uso de substitutos ósseos pode ser indicado. No entanto o processo de reparo pode necessitar de auxílio. Assim, a utilização do carvão ativado como substituto ósseo quando a aplicação do laser de baixa potência para auxílio do reparo ósseo pode ser uma alternativa para estes problemas. O objetivo deste trabalho foi verificar a utilização do carvão ativado como substituto ósseo e a interação deste com a laserterapia, no processo de reparo ósseo em tíbias de ratos, avaliando alterações histológicas, bioquímicas e biomecânicas. Material e Métodos: Foram utilizados 35 ratos wistar, entre 150g à 200g, com 3 meses de idade. Os animais foram anestesiados com associação de cloridrato de quetamina e (90mg/Kg e 10mg/Kg, IP). Depois de anestesiados, os animais foram colocados em mesa cirúrgica, a pele foi dissecada e foram confeccionados defeitos ósseos monocorticais na região central da tibia direita dos ratos. Imediatamente após a cirurgia os ratos foram randomizados e divididos nos seguintes grupos: Controle (CTL), Lesão não tratado (NT), Lesão tratado com carvão ativado (CA), Lesão tratado com associação do carvão ativo e laser 830nm, 6J – 100mW (CA+L) e lesão tratado com Hidroxiapatita (HA). Após 28 dias os animais foram eutanasiados com hiperdosagem do mesmo anestésico, o sangue foi coletado e a tibia foi retirada para análises histológicas, bioquímicas e biomecânicas. Resultados: O grupo NT apresentou redução nas forças de flexão e alterações histológicas relacionadas a desorganização do tecido. Os grupos HA e CA+L não apresentaram melhora das propriedades mecânicas, porém, o grupo CA+L apresentou melhora dos aspectos histológicos. Somente o grupo CA apresentou melhora das forças de flexão, relacionado com melhora dos aspectos histológicos e redução dos níveis de fosfatase alcalina. Os grupos NT, CA+L e HA apresentaram níveis de fosfatase alcalina elevados. Conclusão: A utilização de carvão ativado parece melhorar o reparo ósseo induzido neste estudo. A associação do laser com o carvão ativado não apresentou melhora das propriedades biomecânicas apesar dos resultados histológicos apresentarem um aspecto melhor.

Palavras-chave: *Reparo ósseo, Laser de baixa potência, Carvão ativado, Propriedades Mecânicas.*

## **ABSTRACT**

The bone defects are caused by several factors and the repair process can be slow, where inflammatory and proliferative phases of remodeling of this tissue are extremely important for the quality of the repair. There are several therapies where the main is the surgery and in this case, the use of bone substitutes can be indicated. However the repair process may require assistance. Thus, the use of activated charcoal as bone substitute when the implementation of low-power laser to aid bone repair can be an alternative to these problems. The aim of this study was to verify the use of activated carbon as bone substitute and the interaction with the laser in the process of bone repair in rat tibias, assessing biochemical, histological and biomechanical changes. Material and methods: male wistar rats, 35 were used between 150 g to 200 g, with 3 months of age. The animals were anesthetized with ketamine hydrochloride and Association (90mg/Kg and 10mg/Kg, IP). Once anesthetized, the animals were put on surgical table, the skin was dissected and were made monocortical bone defects in the central region of the right tibia of mice. Immediately after surgery the rats were randomized and divided into the following groups: control (CTL), untreated Injury (NT), Lesion treated with activated carbon (CA), Lesion treated with association of activated carbon and laser 830nm, 6J-100mW (CA+L) and injury treated with Hydroxyapatite (HA). After 28 days the animals were euthanized with overdose of the same anesthetic, blood was collected and the tibia was taken for biochemical, histological and biomechanical analysis. Results: the NT group reduction in bending forces and histological changes related to disorganization of the tissue. The groups showed no CA+L and HA improves mechanical properties, however, the CA+L group presented histological aspects of improvement. Only the CA group presented better flexion forces, related with improvement of histological aspects and reduced levels of alkaline phosphatase. The NT groups, CA+L and HA presented high alkaline phosphatase levels. Conclusion: the use of activated carbon seems to improve the bone repair induced in this study. The laser association with activated carbon showed no improvement of biomechanical properties in spite of the histological results have a better aspect.

Keywords: bone repair, low-level laser, activated carbon, mechanical properties.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	13
1.1. Epidemiologia das Fraturas e/ou Defeitos ósseos .....	13
1.2 Formação Óssea.....	13
1.3 Reparo ósseo em 04 estágios .....	13
1.4 Defeitos e Fraturas ósseas .....	16
1.5 Tratamentos para as lesões ósseas.....	16
1.5.1 Carvão ativado.....	16
1.5.2 Laser de baixa potência.....	18
1.6 O Laser como terapia anti-inflamatória .....	18
1.7 Ação da irradiação da Luz Laser sobre tecido ósseo.....	19
2. OBJETIVOS.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Animais.....	22
3.2 Grupos experimentais.....	22
3.3 Defeito ósseo .....	23
3.4 Protocolo de tratamento .....	23
3.5 Análise das propriedades mecânicas óssea.....	24
3.6 Quantificação de Fosfatase Alcalina.....	26
3.7 Análise Histológica – Microscopia de luz (óptica).....	26
3.8 Análise Estatística .....	27
4. RESULTADOS .....	28
5. DISCUSSÃO.....	37
6. CONCLUSÃO .....	41
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	42

### **Anexos:**

Submissão do artigo “Effect of low level laser associated with activated carbon in bone repair of rats.” À revista “Lasers in medical sciences” .....	53
---	----

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Epidemiologia das Fraturas e/ou Defeitos ósseos

Mais de 6,2 milhões de fraturas ósseas ocorrem nos Estados Unidos a cada ano, sendo que aproximadamente 10% evoluem para complicações na sua reparação óssea, por diversos motivos. Mesmo com a maioria das fraturas evoluindo para um reparo adequado, mais de 30 milhões de dias de trabalho são perdidos ao ano devido à incapacidade do paciente em realizar suas atividades diárias, levando a uma enorme perda de produtividade e renda (FÁVARO-PIPI et al, 2010).

A intervenção por agentes externos para acelerar o reparo ósseo torna-se interessante pela possibilidade de reabilitação e retorno destes pacientes às suas atividades normais. Atingir este objetivo é a meta, no entanto é essencial expandir nossa compreensão sobre as etapas interdependentes do reparo das fraturas e de como elas contribuem para a funcionalidade biomecânica do osso (HADJIARGYROU M et al, 2002).

### 1.2 Formação Óssea

O reparo ósseo é um processo que recaptula aspectos do desenvolvimento e crescimento do esqueleto, envolvendo diversos componentes extracelulares, celulares e fatores de crescimento. Este reparo é dividido histologicamente em quatro fases, caracterizadas por eventos celulares e moleculares específicos baseados em décadas de observação com modelos experimentais em animais e humanos. Entretanto, tais delimitações tornam-se mais difíceis na prática (FÁVARO-PIPI et al, 2010).

Os eventos celulares envolvidos no reparo ósseo podem ser observados através da determinação dos níveis de determinados fatores inflamatórios, vasculares, precursores osteocondrais e osteoclastos e moleculares através da presença de determinadas citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento pró-osteogênicos e fatores angiogênicos; responsáveis pelo recrutamento celular e por estimular a diferenciação e crescimento (FÁVARO-PIPI, 2010; HADJIARGYROU, 2002)

### 1.3 Reparo ósseo em 04 estágios

#### **1º Estágio: INFLAMAÇÃO**

A fratura óssea promove comprometimento da integridade tecidual, provocando a interrupção da função vascular normal e distorção da arquitetura

óssea, e conseqüentemente, uma reação inflamatória inespecífica. O extravasamento vascular dentro do leito acometido é composto de plaquetas degranuladas, macrófagos e outras células inflamatórias (granulócitos, linfócitos e monócitos) e cada componente são responsáveis por funções como: combate de infecções, secreção de citocinas e fatores de crescimento. Outra característica histológica é a presença de trombo fibrocartilaginoso (FÁVARO-PIPI, 2010; HADJIARGYROU, 2002).

A resposta celular coordena e envolve a secreção de diversas citocinas e fatores de crescimento, incluindo fator de transformação  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento de derivação plaquetária (PDGF), fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF-2), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF), interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6), proteína óssea morfogenética 2 (BMP-2) e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Estes marcadores celulares são responsáveis pelo início da cascata do reparo ósseo (IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ ) e início da formação do calo ósseo (TGF- $\beta$ , PDGF, BMP-2) (FÁVARO-PIPI, 2010; HADJIARGYROU, 2002).

### **2º Estágio: FORMAÇÃO DO CALO FIBROCARILAGINOSO**

Devido o reparo ósseo possuir algum nível de instabilidade mecânica, esta reparação é feita através da ossificação endocondral, ou seja, formação óssea precedida de matriz cartilaginosa (FÁVARO-PIPI, 2010; HADJIARGYROU, 2002).

As células dominantes da matriz são os condrócitos e fibroblastos, responsáveis pelo suporte mecânico do reparo ósseo e a produção de calo ósseo semirrígido, a princípio avascular que será substituído gradativamente por osso medular vascularizado. Os condrócitos provenientes de células progenitoras mesenquimais se proliferam e sintetizam tecido fibrocartilaginoso / granulomatoso, que depois é substituído por cartilagem. Esta cartilagem cresce e envolve um centro fibrocartilaginoso unindo-se ao centro dos fragmentos fraturados e este estágio é caracterizado morfologicamente pela presença de condrócitos hipertrofiados que mineralizam a matriz cartilaginosa antes da apoptose (FÁVARO-PIPI, 2010; HADJIARGYROU, 2002).

Os principais sinalizadores celulares da condrogênese e do início da ossificação endocondral são o TGF- $\beta$ 2 e 3. Quanto à proliferação celular durante a ossificação intramembranosa, seja na proliferação de fibroblastos ou na proliferação e diferenciação celular, os responsáveis são BMP-5 e 6. Em relação ao crescimento vascular, as angiopoietinas I e II são responsáveis pelos vasos maiores e irrigação acessória dos vasos já existentes e o sinalizador é o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (FÁVARO-PIPI, 2010; HADJIARGYROU, 2002).

### **3º Estágio: FORMAÇÃO DO CALO ÓSSEO PRIMÁRIO**

Estágio com maior atividade osteogênica, ou seja, maior nível de atividade de osteoblasto e formação de matriz óssea mineralizada, caracterizando assim a formação óssea primária ou calo ósseo primário, este com formato irregular. A formação deste calo ósseo primário independe em alguns casos do suporte cartilaginoso, acontecendo simplesmente o fenômeno de aposição e reabsorção óssea (FÁVARO-PIPI, 2010; HADJIARGYROU, 2002).

O início de formação da matriz celular óssea depende da combinação dos proteínáceos e matriz extracelular mineralizada, medida pela presença de M-CSF e RANKL (ligante do receptor ativador de ligante NF-κB), sintetizada por osteoblastos maduros, diferenciados à partir de osteoprogenitores na presença de fatores osteogênicos membros do grupo de proteínas morfogenéticas - BMP-3, BMP-4, BMP-7 e BMP-8 (FÁVARO-PIPI, 2010; HADJIARGYROU, 2002).

Esta fase é caracterizada por ampla rede de vasos sanguíneos formados por diversos fatores de crescimento como VEGF e BMP-5 e 6. Tais estruturas são fundamentais na formação óssea, sendo responsáveis pelo aumento do aporte sanguíneo do local afetado e neoformação óssea pela diferenciação de osteoblasto (FÁVARO-PIPI, 2010; HADJIARGYROU, 2002).

### **4º Estágio: REMODELAMENTO ÓSSEO**

O estágio final do reparo ósseo é caracterizado por um remodelamento visando seu retorno ao formato ósseo original, atuando diretamente no calo ósseo secundário.

Inicialmente há conversão da matriz óssea irregular em osso, processo regulado pela reabsorção seguida de formação óssea; as células osteóides têm papel fundamental na proteólise de elementos osteóides antes deste evento (FÁVARO-PIPI, 2010; HADJIARGYROU, 2002).

A célula principal envolvida no fenômeno de reabsorção da mineralização óssea é o osteoclasto que origina da diferenciação e fusão de células hematopoiéticas. Estes aderem na superfície mineralizada formando um espaço preenchido por ácido e proteinases, provocando sua desmineralização. Os produtos da degradação são removidos principalmente por macrófagos. Após a reabsorção da matriz, os osteoclastos tornam-se inativos e sofrem apoptose, estimulando a ativação de osteoblastos na superfície erosiva (FÁVARO-PIPI, 2010; HADJIARGYROU, 2002).

## 1.4 Defeitos e Fraturas ósseas

Segundo estimativas do centro de controle e prevenção de doenças do governo dos EUA, em 2004 houve mais de 320.000 internações hospitalares por fratura de quadril, a maioria em idosos, um aumento de 3% se comparado ao período de 1996 à 2004. Em relação aos defeitos ósseos, estes geralmente estão associados à deformidades congênitas e neste caso os números serão de 120.000 nascimentos com deformidades congênitas ósseas em 2002 (SCHINDELER; AI-AGL 2008).

As fraturas ósseas ocorrem por razões como: traumas diretos por arma de fogo, acidentes, torções ou quedas. Essas fraturas causam diversos danos teciduais ao seu redor como: irritação nas terminações nervosas (dor), sangramentos, espasmos musculares e deformidades em alguns casos (SHINDELER; NIKOLIDAKIS, 2008).

Existem diversas formas de descrição de fraturas ósseas, destacamos:

- Exposta ou não: quando existe o rompimento da integridade do osso, podendo haver comunicação do meio interno com o meio externo.
- Traço de fratura: se a fratura rompe por total a região cortical óssea ela é considerada completa, porém, se houver apenas o rompimento parcial, ela recebe o nome de galho verde. Quando existe uma fratura com presença de diversos pedaços, recebe o nome de cominuta e quando há mais de um local fraturado recebe o nome de fratura composta (HADJIARGYROU, 2002; SCHINDELER; AI-AGL; NIKOLIDAKIS, 2008).

## 1.5 Tratamentos para as lesões ósseas

Os defeitos ósseos provenientes de malformações congênitas, traumas não corrigidos, lesões extensas ou de sequelas cirúrgicas, como na remoção de tumores, são corrigidos através de enxertia óssea e colocação de próteses biocompatíveis e utilização de substâncias indutoras de formação óssea (BMPs) descrita recentemente (REFERENCIA).

O tratamento das doenças ósseas é bem amplo e depende do diagnóstico e da extensão da lesão. Em casos de fraturas as terapias podem variar, desde tratamentos mais conservadores, como a completa imobilização do osso afetado ou por intervenções cirúrgicas para acesso à fratura e colocação de biomateriais para sua correção.

### 1.5.1 Carvão ativado

O carvão ativado é um sólido carbonoso poroso contendo sítios acessíveis para a ocorrência do fenômeno de adsorção ou ainda reações

químicas. O termo ativado se refere a materiais de carbono produzidos por pirólise em temperaturas inferiores à 1000°C, seguido por ativação para criar a estrutura porosa final desejável (MARSH H, 1997).

Basicamente, qualquer material de baixo custo contendo um elevado teor de carbono e ao mesmo tempo uma quantidade moderada de substâncias inorgânicas pode ser usado como matéria-prima para a produção de carvão ativado. Em geral, os processos comerciais utilizam precursores como os derivados da biomassa degradada ou fóssil (turfa, lignito, antracito e hulha), da biomassa fresca (aparas de madeira, cascas de coco, cascas de todos os tipos de nozes, casca e palha de arroz, etc) ou ainda de resíduos da biomassa após o seu processamento (lignina, bagaço de cana, etc). Estas matérias-primas possuem um baixo valor de aquisição ou um elevado teor de carbono, ou ainda combinam essas duas propriedades (MARSH H, 1997) .

As características do material final são fortemente afetadas em função da natureza da matéria-prima utilizada, do agente de ativação e das condições do processo de ativação. Cada variável produz um carvão ativado com características específicas tais como a área de superfície, volume total de poros e distribuição de tamanho dos poros. De acordo com essas diferentes características, o carvão poder ser destinado para utilização como adsorvente na fase líquida ou na fase gasosa (MARSH, 1997).

Uma pequena porcentagem do carvão ativado, em torno de 20%, é destinada a aplicações em fase gasosa. Neste sistema, geralmente, o processo envolvido é apenas físico, por meio do fenômeno de adsorção, como por exemplo, na estocagem de hidrogênio (W. ZHAO, 2011) e na purificação de gases (RUSSAMEE; SITTHIKHANKAEW 2011).

Por outro lado, a maior parte do carvão ativado produzido mundialmente é utilizada em aplicações em fase líquida. Neste processo podem ocorrer tanto o fenômeno da adsorção física quanto reações químicas. Por isso, inúmeras aplicações do carvão em fase líquida podem ser citadas, por exemplo, no tratamento de água (SHAO S, 2014) na indústria de descoloração de açúcar (B. PENDYAL; M AHMEDNA, 1999), na recuperação do ouro (MANSOOREH, N. GÖNEN, 2007), no refino de combustíveis líquidos na adsorção de compostos que provocam câncer como o arsênio (MOHAMMAD ASADULLAH, 2007), entre outras.

Carvões ativados são excelentes e versáteis adsorventes, devido à sua porosidade altamente desenvolvida além de uma elevada área de superfície interna fazendo com que o material seja eficiente em diferentes campos de aplicação (MARSH H, 1997).

Estas características específicas do carvão ativado associado ao fato de ser considerado um material de baixo custo seria um fator importante para a utilização na área médica, por exemplo, como substituto ósseo utilizados em lesões neste tecido.

### 1.5.2 Laser de baixa potência

A palavra Laser origina-se do acrônimo (palavra formada pelas iniciais de outras palavras) de Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, ou Amplificação da luz por emissão estimulada de radiação (LEE SJ, 2000).

O decaimento espontâneo de um dos átomos para o estado fundamental começa a provocar a emissão estimulada dos demais átomos e conseqüente produção de luz. Somente a luz que se propaga ao longo do eixo principal do laser é submetida às várias reflexões no interior da cavidade ressonante, fazendo com que haja um feixe de luz. As principais características desse feixe emergente são as seguintes:

- Monocromaticidade - a energia carregada pelo fóton estimulante e pelo fóton emitido são as mesmas. Portanto, a luz laser é composta de apenas um comprimento de onda, enquanto uma fonte de luz incandescente é formada por vários comprimentos de onda.

- Intensidade - pode ser extremamente grande, ao contrário das fontes de luz convencionais. Sua potência pode atingir ordens de tera watt ( $10^{12}$  W). Essas grandes intensidades ocorrem em lasers pulsados, onde a energia acumulada em longo tempo é emitida toda em um intervalo de tempo muito pequeno, da ordem de  $10^{-12}$  s.

- Direção - o feixe resultante é constituído de ondas que se deslocam na mesma direção, ou seja, há um mínimo de dispersão.

- Coerência - a radiação é espacialmente coerente se as ondas sucessivas da radiação estão em fase e tempo coerentes, e se os trens de onda estão todos na mesma direção e com o mesmo comprimento de onda (LEE, 2000; BERTOLOTI, 1983; DE CASTRO ET AL, 2001)

### 1.6 O Laser como terapia anti-inflamatória

Embora o uso de laser nas mais diversas áreas da medicina, odontologia, fisioterapia venha crescendo vertiginosamente nas duas últimas décadas, o conhecimento básico de seu funcionamento ainda é muito deficiente pelos profissionais, principalmente aqueles que não serão especificamente treinados.

No Brasil, a introdução da tecnologia do laser será bastante tardia em comparação com outros países, principalmente Europa e Estados Unidos. Os trabalhos pioneiros nesta área remontam à segunda metade da década de 80.

O efeito de estimulação com Laser de Baixa Potência (LBP) depende do comprimento de onda, da dose e da intensidade da luz utilizada na irradiação (DE CASTRO ET AL, 2001).

A coerência é uma das propriedades da luz laser, como citada acima, mas ao penetrar no tecido, esta propriedade se perde nos primeiros extratos do osso. Isto ocorre devido à grande variedade de estruturas celulares que compõe o osso (KARU, 1986). Segundo esses autores, apesar da perda da coerência da radiação do LBP no interior dos tecidos, esta é absorvida pelas células gerando alterações no seu metabolismo tanto em tecidos superficiais como profundos (SCHAFFER M, 2000; KIYOIZUMI T, 1988)

Acredita-se que a ação do laser de baixa potência sobre o tecido está relacionada à possibilidade de inibir o aparecimento de fatores quimiotáticos nos estágios iniciais da inflamação; interferindo nos efeitos dos mediadores químicos induzidos pela inflamação (HAZEKI O, 1989) inibindo a síntese das prostaglandinas (SVAASAND, 1990) e inibindo o esfíncter pré-capilar através de mediadores químicos. Estudos adicionais sobre o efeito anti-inflamatório do laser de baixa potência ainda se fazem bastante necessários.

O uso de laser na prática clínica para o efeito anti-inflamatório em diferentes patologias baseia-se em um número já razoável de publicações de caráter científico. Nos últimos anos, inúmeros estudos clínicos aleatorizados, placebo-controle serão realizados, fazendo com que a Terapia Laser já seja considerada como alternativa terapêutica para várias doenças (BASFOR, 2000; BJORDAL, 2008)

É importante ressaltar que muito pouco se conhece a respeito do mecanismo de ação dos lasers infravermelhos. Neste sentido, os estudos experimentais com estes comprimentos de onda assumem grande relevância para o esclarecimento do mecanismo de ação da terapia.

Tendo em vista os dados apresentados anteriormente, a importância da utilização de terapias não medicamentosas representa um fator altamente relevante para o Sistema de Saúde. No entanto, o estabelecimento de parâmetros de irradiação para sua utilização se faz ainda necessário (CORREA, 2007; BJORDAL; LEAL, 2008)

### **1.7 Ação da irradiação da Luz Laser sobre tecido ósseo**

Os efeitos da luz laser sobre os tecidos começaram a ser descritas por Mester e cols em 1972, observando a acelerada reparação da ferida no osso. Posteriormente, serão realizados estudos sobre diversos modelos experimentais envolvendo outros tecidos, onde será ratificado tal fato (LOPES, 2006; PINHEIRO, 2004; MATSUMOTO, 2009).

Há diversos casos de traumas ósseos, estes causados por acidentes de origens diversas ou atos cirúrgicos e patologias ósseas, dentre eles os tumores e cistos ósseos. O efeito causado pela fototerapia de aceleração do reparo ósseo pode representar um benefício em potencial, pois: melhora o pós-operatório do paciente, diminui o tempo de recuperação com sessões de reabilitação dos movimentos articulares; gera menores perdas financeiras à economia, onde o indivíduo retorna ao trabalho e às atividades diárias em menor tempo (LOPES, 2006; TORRES, 2008; STEIN, 2008; PINHEIRO, 2008; KAZEM, 2009; RIBEIRO; BLAYA, 2008). Devido à propriedade de reparação tecidual acelerada, foram realizados estudos em diferentes modelos experimentais de laboratório e estudos clínicos, na tentativa de desvendar o mecanismo de ação e as alterações de sinalização celular nas áreas irradiadas pela luz laser (KHADRA, 2004; NISSAN, 2006).

Inúmeros trabalhos comprovam a reparação óssea acelerada com a quantificação por cortes histológicos e observações clínicas, porém o mecanismo de ação da fototerapia sobre a superfície óssea não será bem esclarecido, mas estudos indicam que a fototerapia não age diretamente na osteossíntese, mas sim cria uma série de condições ambientais melhorando o reparo ósseo, acelerando a proliferação e diferenciação celular (TORRES; STEIN; PINHEIRO, 2008).

É importante ressaltar que, para a ocorrência da aceleração da proliferação e diferenciação celular é necessário o aumento de diversas substâncias bioativas, dentre elas os fatores de crescimento e citocinas citados anteriormente (RIBEIRO; BLAYA, 2008)

Segundo estudos, a laserterapia agiria modulando diversos processos metabólicos aumentando assim o potencial regenerativo dos tecidos. Em trabalhos recentes, GERBI e cols, constataram histologicamente um menor período de integração entre o tecido ósseo e os biomateriais, BMPs e enxertos ósseos liofilizados, em animais submetidos à irradiação laser diários, por um período de quinze dias (RIBEIRO, 2008; NISSAN, 2006).

Este e outros trabalhos observaram o mesmo efeito in vivo e in vitro, porém, sugerem modulação de diversos fatores de crescimento, dentre os quais citamos o IGF, PDGF e BMPs e diversas citocinas, como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , no período mais inicial da reparação óssea. Além das alterações celulares mencionadas, observou-se ainda que fatores teciduais como a deposição de colágeno tipo I e II também apresentaram aumento considerável (STEIN; RIBEIRO; PINHEIRO; BLAYA, 2008; KAZEM, 2009; KHADRA, 2004; NISSAN, 2006).

**2. OBJETIVO:**

- Avaliar alterações histológicas e biomecânicas no processo de reparo ósseo em tíbias de ratos após indução de lesão.
- Analisar a ação do carvão ativado e sua associação com terapia laser de baixa potência no reparo ósseo em tíbias de ratos.
- Comparar a utilização do carvão ativado com a hidroxiapatita.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados 35 ratos Wistar machos pesando entre 150 e 200g (+/- 60 dias de vida), com livre acesso a água e ração, provenientes do Biotério da Universidade Nove de Julho. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada e ciclo claro/escuro de 12 horas.

#### 3.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em 5 grupos de 07 animais cada e submetidos aos tratamentos, conforme especificado abaixo:

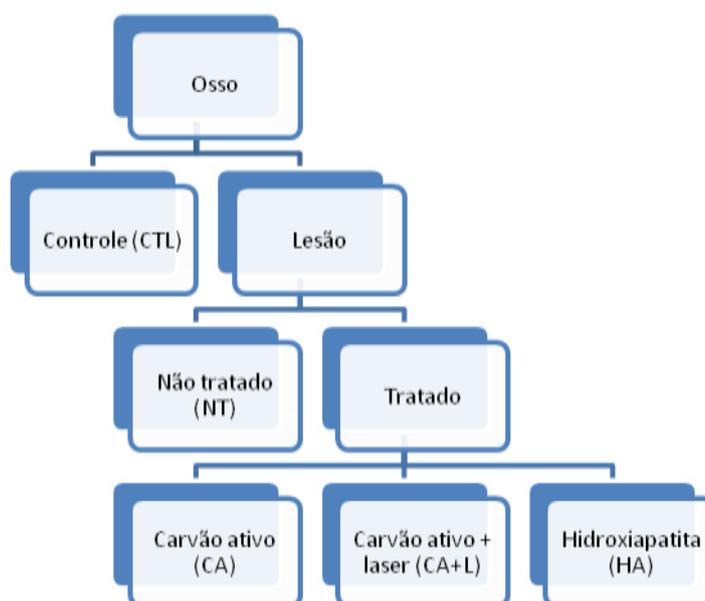


Figura 1. Esquema dos grupos experimentais

CTL – Íntegro: sem procedimento cirúrgico.

Nos demais grupos os animais foram submetidos ao defeito ósseo e tratados conforme descrito abaixo:

NT – Grupo com a loja óssea e sem tratamento.

CA – Grupo com loja óssea e utilização de carvão ativo  
 CA+L – Grupo com loja óssea e utilização de carvão ativo associado ao Laser (830nm, 6J, 100mW, 60 segundos)

HA – Grupo com loja óssea e utilização de hidroxiapatita

### 3.3 Defeito ósseo

Os animais foram anestesiados com quetamina (90mg/Kg) e Xilazina (10mg/Kg) e fixados em mesa de cortiça. Em seguida foi realizada uma incisão sobre o osso na parte postero-lateral da tíbia à direita com a divulsão dos planos subcutâneos e musculares, acesso ao periósteo do osso tibial na região proximal e a confecção de furo 04 mm abaixo da articulação do joelho com auxílio de broca com 05 mm de comprimento e 1.3 mm de espessura (figura 2). Após confecção do furo os animais do grupo CA receberam o carvão ativo na região do furo, o grupo CA+L recebeu carvão ativo no local do furo e foram irradiados imediatamente com laser de baixa potência e o grupo HÁ recebeu hidroxiapatita no local do furo. Após este processo, os animais foram suturados e retornados as caixas.

Tanto o carvão ativado quanto a hidroxiapatita foram diluídas em solução salina estéril 0,9% até a formação de uma massa consistente e aplicado da região da loja óssea até a cobertura total do defeito induzido pela broca cirúrgica.



Figura 2: Defeito ósseo induzido

### 3.4 Protocolo de tratamento

Foi utilizado o Laser de Baixa Potência (LBP) de diodo, com os seguintes parâmetros descritos abaixo:

Grupo	Comprimento de onda (nm)	Tipo de Diodo	Potência (mW)	Diâmetro do feixe (cm <sup>2</sup> )	Densidade de potência (W/cm <sup>2</sup> )	Energia (J)	Densidade de Energia (J/cm <sup>2</sup> )	Tempo por ponto(s)
CA+L	830	AsGaAl	100	0.028	3.5	6	204,28	60

Figura 3: Tabela com os parâmetros de irradiação laser.

O tratamento Laser foi realizado sobre o osso, durante sete (7) dias intercalados após a cirurgia.

Após todo protocolo experimental, os animais foram anestesiados com hiperdose de cloridrato de Xilazina (30mg/ml) e Cloridrato de quetamina (270mg/ml) e após a eutanásia, o osso tibial foi removido e conservado para análises morfológicas e biomecânicas e o sangue coletado para análise da fosfatase alcalina.

### 3.5 Análise das propriedades mecânicas óssea

Após a indução da lesão, os animais foram sacrificados após 28 dias e a osso foi removido para posteriores análises. Parte deste material foi utilizada imediatamente após a retirada, nos ensaios de flexão para a avaliação de suas propriedades mecânicas. A atividade normal do osso é formada por um conjunto de tensões aplicadas no tecido, divididas em forças de carregamento e descarregamento. Desta forma, foi aplicada uma sequência de forças de carregamento e descarregamento a fim de simular as condições de tensões reais do osso.

Primeiramente foram realizadas as medidas de comprimento, largura e altura da tíbia. Estes valores serão utilizados para detalhar as dimensões do material e padronização dos resultados. As tíbias foram colocadas horizontalmente no aparelho de teste mecânico (EMIC200) para ensaio de flexão em 3 pontos (figuras 4 e 6).

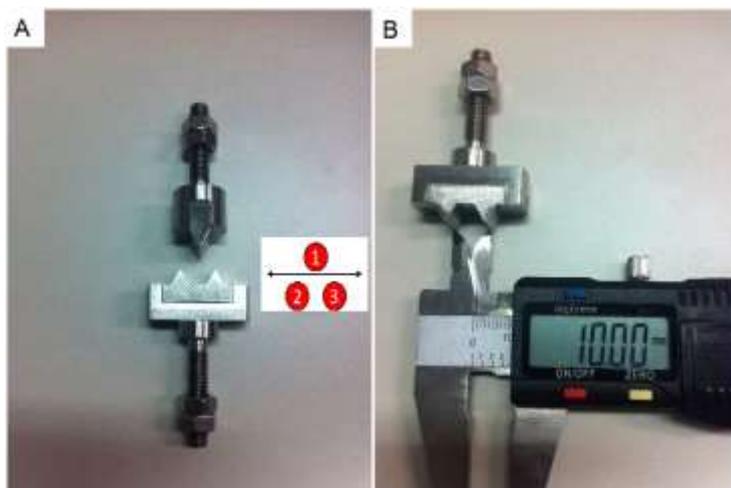


Figura 4: Dispositivo para ensaio de flexão em 3 pontos

Durante a padronização do ensaio de flexão, foi utilizada uma velocidade de carregamento e descarregamento de 6 mm/min e acrescentado 0,3mm

durante cada carregamento. O ensaio de flexão foi interrompido automaticamente, após a ruptura óssea e foram analisados os seguintes parâmetros:

- Força de ruptura máxima ( $F_{\max}$ )
- Descolamento no momento da ruptura máxima ( $D_{\max}$ )
- Rigidez ( $\alpha$ )

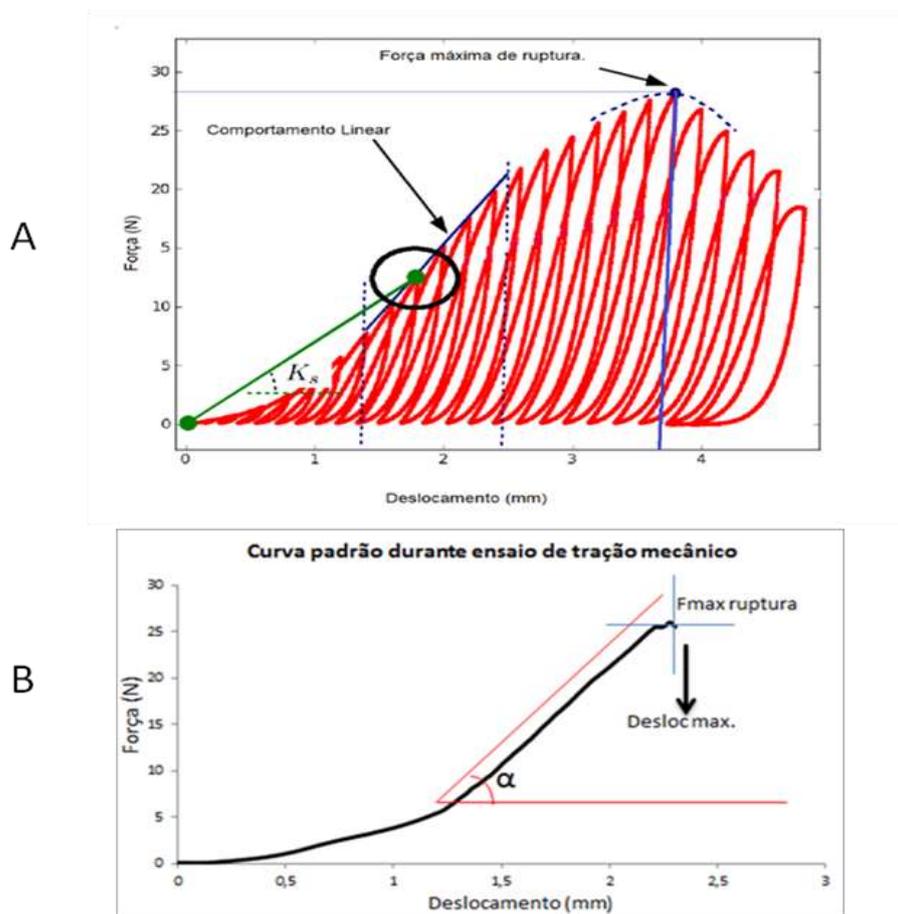


Figura 5: Gráfico do ensaio de flexão. A) Curva típica de registro durante a aplicação das forças de carregamento e descarregamento. B) Curva simplificada indicando a Força máxima e deslocamento no momento da ruptura.

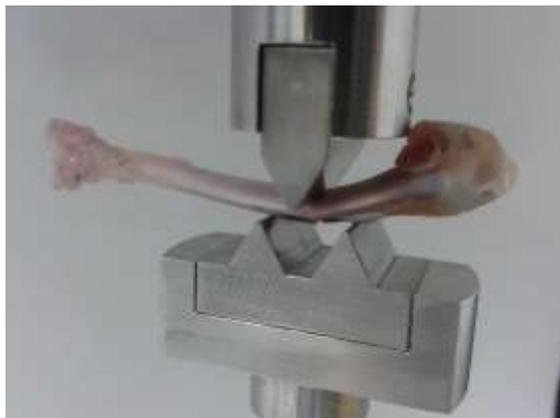


Figura 6: Posicionamento do osso tibial para ensaio mecânico.

### 3.6 Quantificação de Fosfatase Alcalina no soro sanguíneo circulante pelo método de ELISA.

Antes da eutanásia dos animais, foi coletado sangue sem o uso de anticoagulante através da punção cardíaca nos ratos. Após 10 minutos da coleta, o tubo contendo a amostra de sangue foi então centrifugado a 5.000rpm por 03 minutos para a separação do soro e parte vermelha do sangue; o soro foi colocado em novo tubo, e armazenando à temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  até sua utilização.

A reação para detecção dos níveis de fosfatase alcalina segue as seguintes etapas:

Primeiramente, a solução tampão (DEA) é preparada e incubada por alguns minutos. Enquanto ocorre a incubação, em placa de ELISA, coloca-se 2 $\mu\text{l}$  da amostra em cada poço da placa e a este é adicionado 200 $\mu\text{l}$  do reagente único, previamente incubado.

A absorbância é feita no comprimento de onda 405nm a  $37^{\circ}\text{C}$ , no período de 03 minutos e 20 segundos, iniciando a leitura 20 segundos após começo da reação, havendo outras leituras em 1, 2 e 3 minutos após a primeira leitura, o cálculo é feito pela absorbância de Fosfatase alcalina (U/l) a 405 nm =  $\Delta A/\text{min} \times 5.460$ . Os valores são determinados a partir da diferença da média de Absorbância/min ( $\Delta A/\text{min}$ ), subtraindo cada leitura da anterior e fazendo a média dos valores.

### 3.7 Análise Histológica – Microscopia de luz (óptica)

As amostras do tecido foram fixadas em formol a 10% por um período de 72 horas. Posteriormente as amostras foram desidratadas e submetidas a uma série gradativa de banhos de álcool, começando com 50% e progredindo até o álcool absoluto 100% (SYNTH). Em seguida o tecido foi diafanizado com Xilol por 4 horas (SYNTH) para impregnação (embebição) e inclusão em Paraplast® das amostras. Em seguida, foram colocadas em recipientes de alumínio adequados, com Paraplast® fundido por 4 horas. Após a impregnação, as

amostras foram colocadas em um pequeno recipiente coberto com parafina e deixadas para solidificar, formando um bloco contendo o tecido. Para a microtomia foram realizados cortes com 5  $\mu\text{m}$  de espessura em micrótomo LEICA RM 2125 RT. Uma vez precedido o preparo das amostras os cortes foram colocados em lâminas para serem corados, com Hematoxilina-Eosina (H.E.). Após a coloração os cortes foram montados em lâminas permanentes para posteriores análises em microscópio óptico e fotografados através de sistema de microfotografia (Olympus System Microscope Model CX 41 – Olympus PM10SP Automatic Photomicrographic System).

### **3.8 Análise Estatística**

Os dados foram descritos em valores médios com os respectivos desvios padrão. Foram analisados tanto em seus valores absolutos como a sua variação em percentual, à partir dos valores obtidos nas análises biomecânicas e bioquímicas. Para os dados paramétricos, foi utilizado o teste de ANOVA com post-hoc Tukey-Kramer. O nível de significância estatístico foi para  $p < 0,05$ .

#### 4- RESULTADOS

Após a indução das lojas ósseas e aos diversos tratamentos, os ossos e o sangue foram utilizados para análises bioquímicas, histológicas e de ensaios de flexão.

A partir das lâminas histológicas, foram obtidas as imagens a seguir.

Na figura 7 podemos observar um corte transversal da tíbia indicando a região (1), a região medular (2) e a presença tanto de osteocitos (seta preta) quanto de endosteo (seta vermelha).

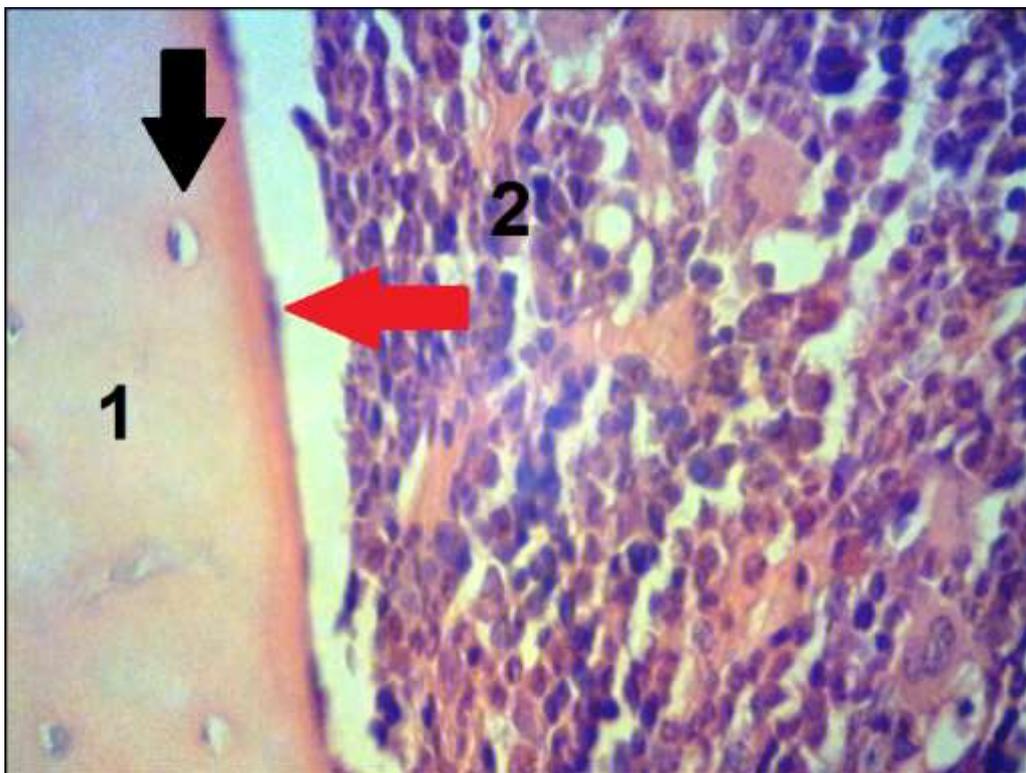


Figura 7: Corte histológico transversal da tíbia direita do grupo CTL. (400X). Região cortical (1) e medular (2). Presença de osteócito (seta preta) e endosteo (seta vermelha).

Na figura 8, podemos observar um corte histológico do grupo onde a lesão foi induzida e não foi realizado nenhum tratamento. Nesta imagem podemos observar a presença ainda de calo ósseo (seta vermelha), mais ao lado outra região ainda com desorganização óssea (seta preta) e a presença de cartilagem óssea que será substituída pelo tecido maduro.

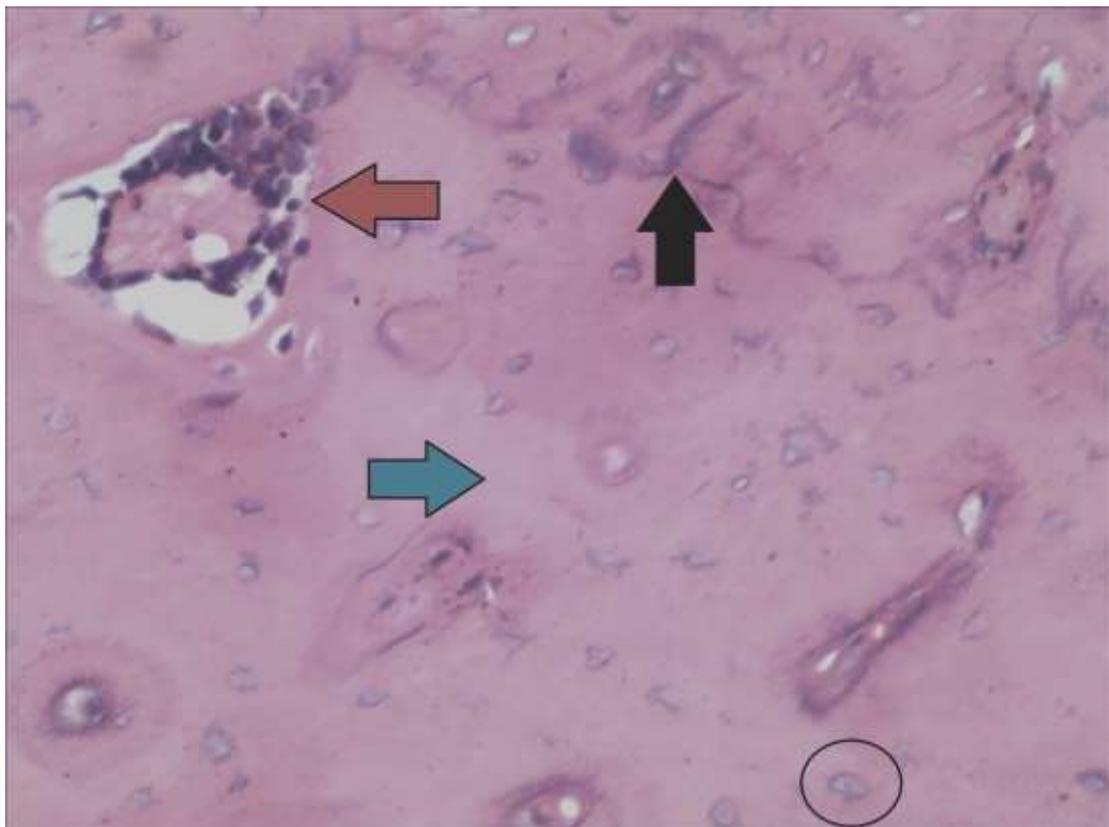


Figura 8: Corte histológico transversal da tíbia direita do grupo NT. (200X). Calo ósseo (seta vermelha), tecido ósseo de transição (seta preta), cartilagem óssea (seta azul) e osteocito (círculo).

Na figura 9 observamos um tecido ósseo mais organizado com a presença de canais de Havers (seta preta), osteocitos (círculo) e alguns fragmentos do carvão utilizado no tratamento (seta vermelha).

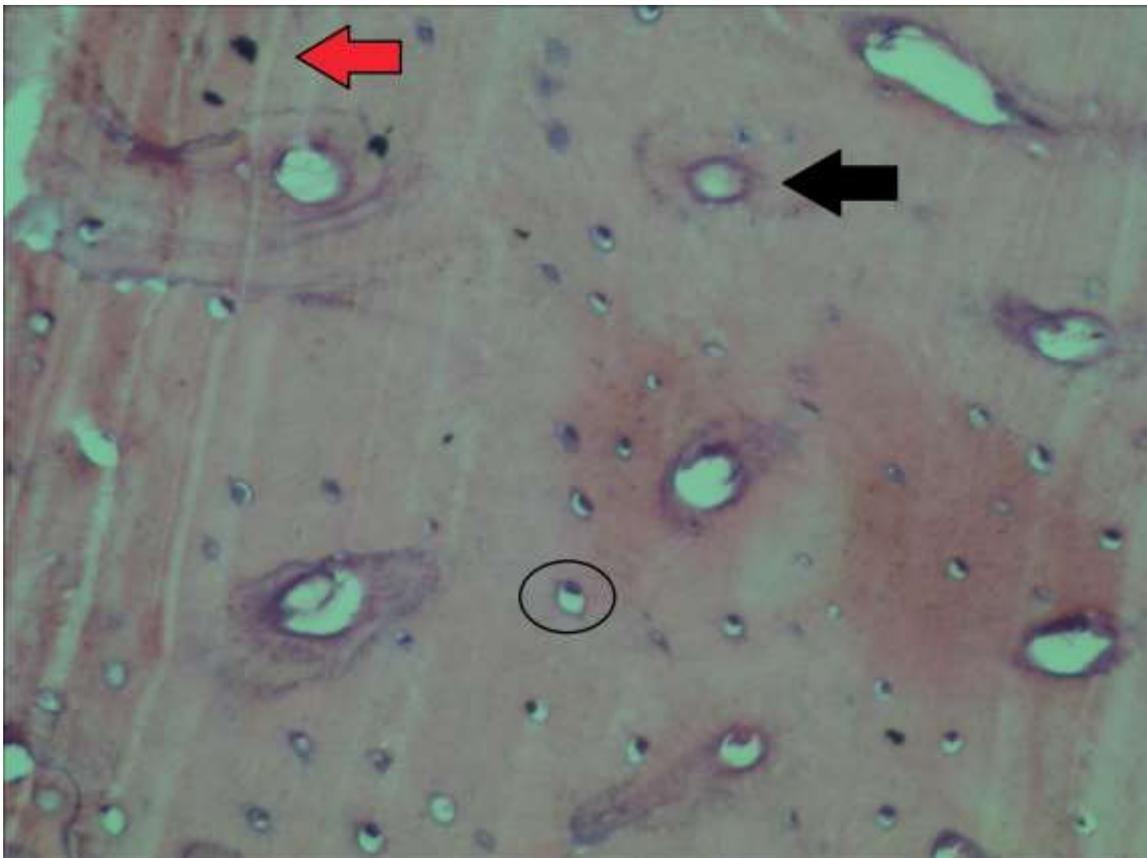


Figura 9: Corte histológico transversal da tíbia direita do grupo CA. (200X). Canal de Havers (seta preta), fragmentos de carvão ativado (seta vermelha) e osteocitos (círculo).

Na figura 10 é possível observar um tecido também organizado, com a presença de vários canais de Havers (seta preta) e formação de tecido ósseo maduro (seta vermelha). Podemos observar também a presença de osteócitos (círculo) distribuídos de forma mais homogênea, como apresentado também na figura 9.

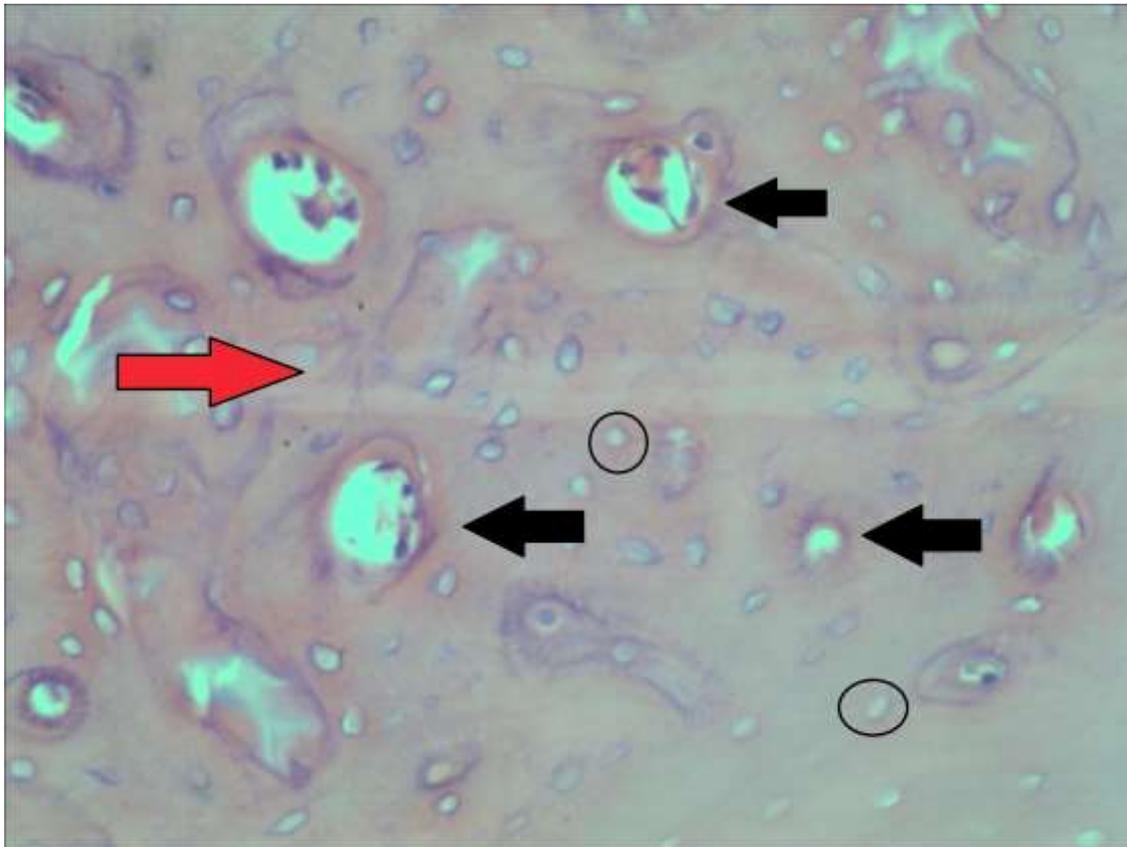


Figura 10: Corte histológico transversal da tíbia direita do grupo CA+L. (200X). Canal de Havers (seta preta), formação de tecido maduro (seta vermelha) e osteócito (círculo).

Na figura 11 podemos observar a presença de osteócitos (círculo) e canais de Havers (seta preta). Podemos observar ainda a substituição da cartilagem óssea pelo tecido maduro (seta vermelha) e a substituição do calo primário para o calo secundário (seta azul).

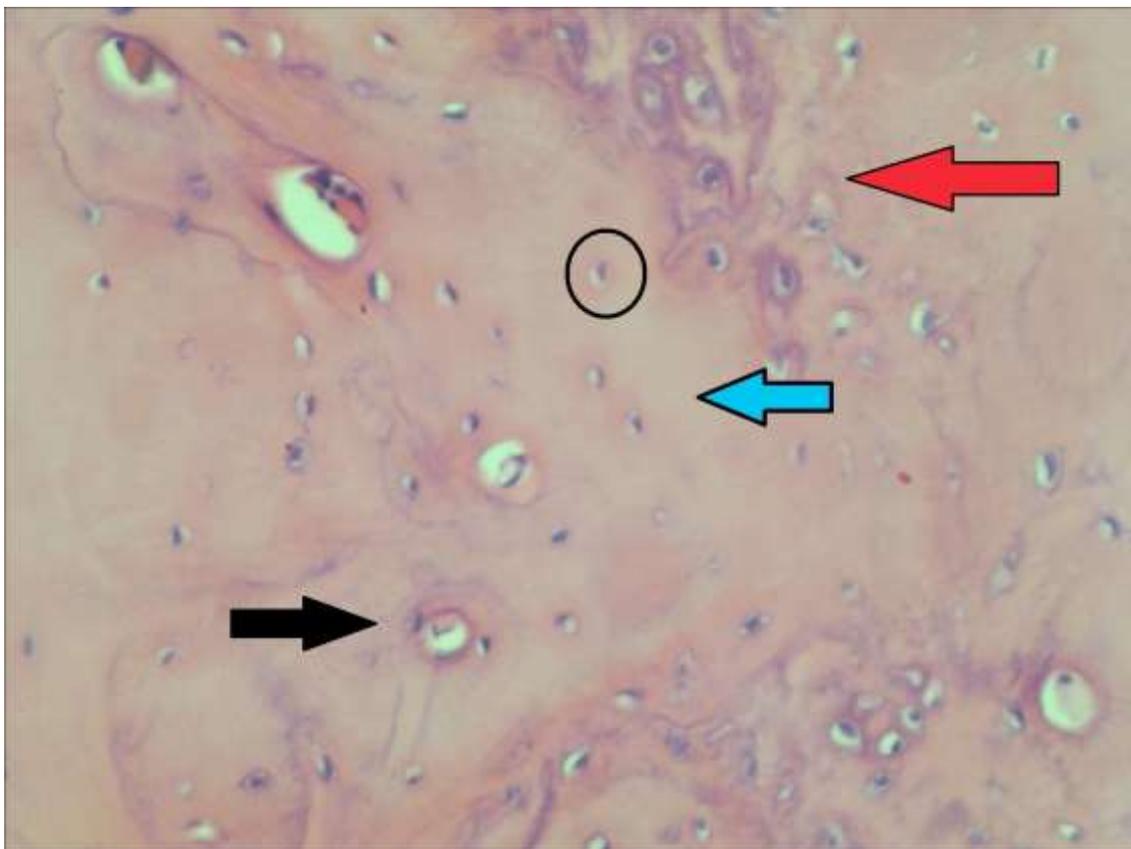


Figura 11: Corte histológico transversal da tíbia direita do grupo HA. (200X). Canal de Havers (seta preta), cartilagem óssea (seta vermelha), calo ósseo (seta azul) e osteócito (círculo).

Na figura 12, é apresentado o gráfico dos níveis de fosfatase alcalina no sangue dos animais, durante o processo de reparo ósseo. Todos os grupos apresentaram aumento da fosfatase alcalina quando comparados ao grupo controle. O grupo lesionado e tratado com carvão ativado apresentou uma redução significativa quando comparado ao grupo não tratado.

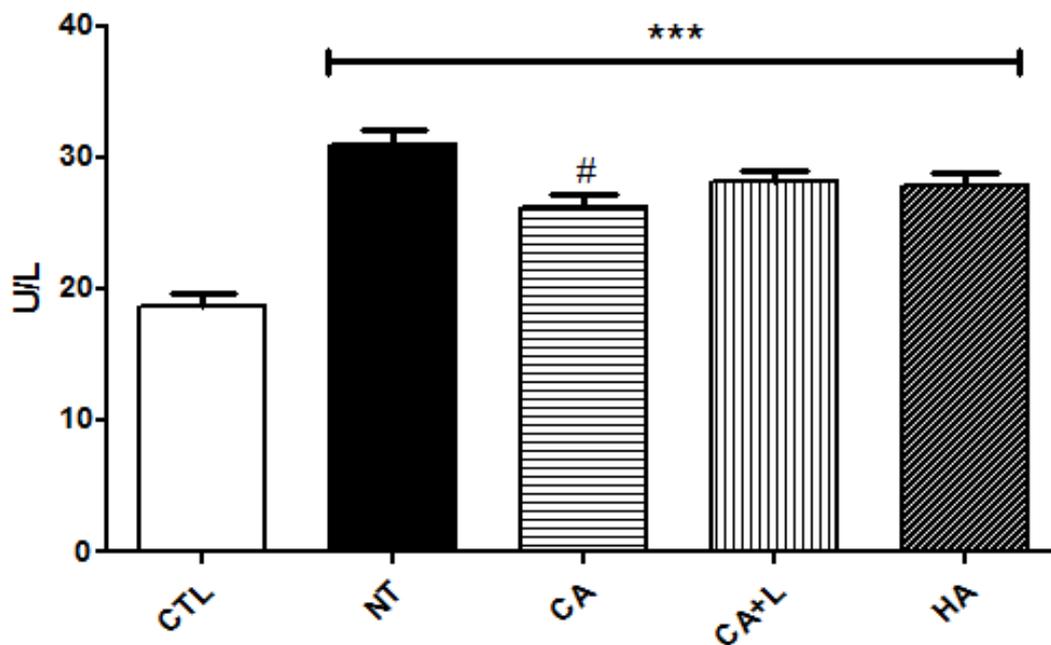


Figura 12: Níveis de fosfatase alcalina. Grupos Controle (CTL), não tratado (NT), grupo tratado com carvão ativado (CA), com hidroxiapatita (HA) ou com associação entre carvão ativado e laserterapia (CA+L). \*\*\*  $p < 0,001$  vs CTL, #  $p < 0,05$  vs NT.

Na figura 13 observamos o gráfico da forma máxima de flexão no momento da ruptura óssea. Podemos observar neste gráfico que todos os grupos apresentaram redução da força máxima de flexão em comparação ao grupo controle. O grupo tratado com carvão ativo apresentou aumento desta força quando comparado ao grupo não tratado. Ao contrário, o grupo tratado com hidroxiapatita apresentou redução desta força, mesmo quando comparado ao grupo não tratado.

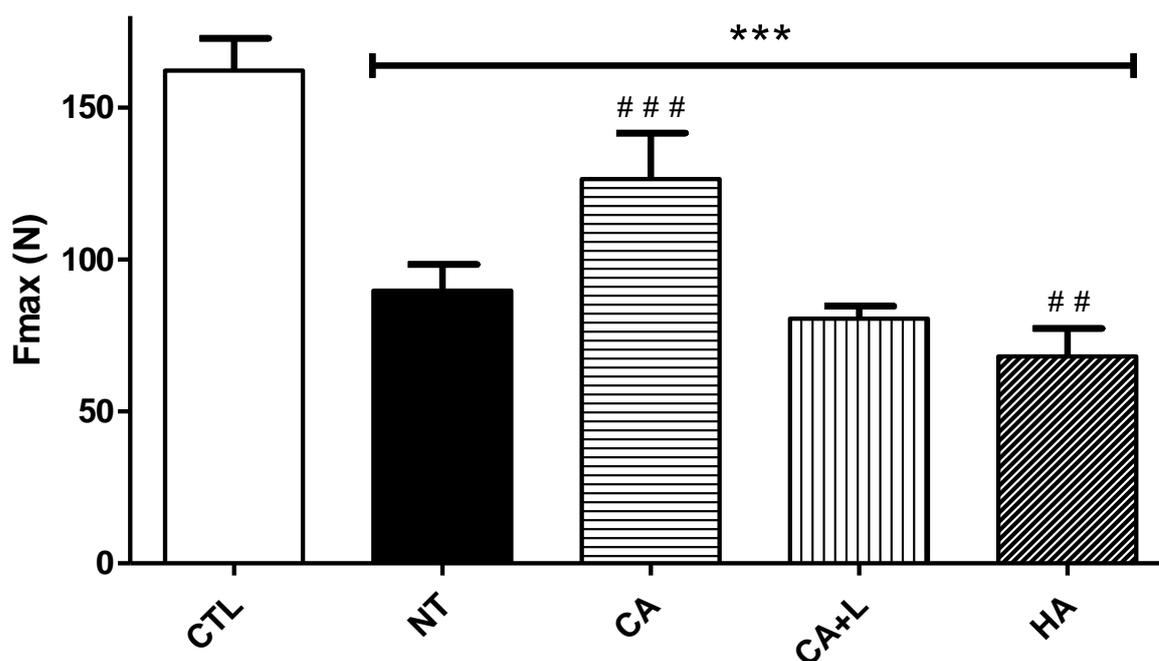


Figura 13: Gráfico da força máxima de flexão no momento da ruptura óssea. Grupos Controle (CTL), não tratado (NT), grupo tratado com carvão ativado (CA), com hidroxiapatita (HA) ou com associação entre carvão ativado e laserterapia (CA+L). \*\*\*  $p < 0,001$  vs CTL, ##  $p < 0,01$  e ###  $p < 0,001$  vs NT.

Na figura 14 observamos o deslocamento máximo atingido no momento da ruptura. Nenhum dos grupos onde a loja óssea foi induzida não apresentou alteração deste deslocamento.

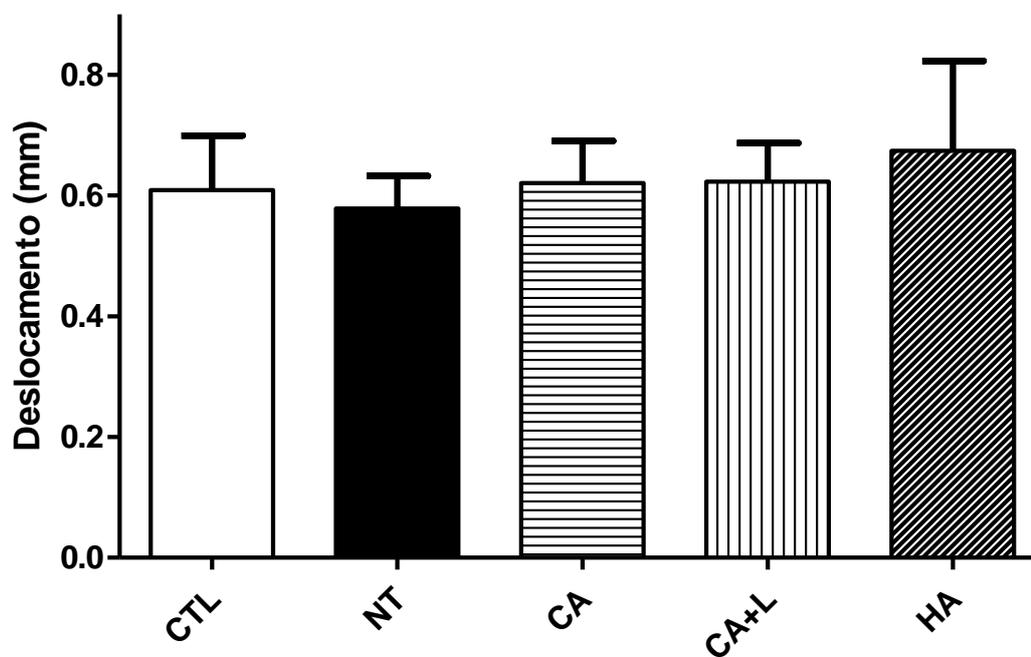


Figura 14: Gráfico do deslocamento máximo no momento da ruptura óssea. Grupos Controle (CTL), não tratado (NT), grupo tratado com carvão ativado (CA), com hidroxiapatita (HA) ou com associação entre carvão ativado e laserterapia (CA+L).

Na figura 15 observamos a relação entre os gráficos apresentados na figura 13 e 14. Neste gráfico podemos observar que o grupo não tratado apresentou um deslocamento para a esquerda, indicando uma menor força de flexão. O grupo tratado com carvão ativado apresentou uma posição mais próxima do tecido saudável (CTL). O grupo HA apresentou um deslocamento para a direita, porém, com redução da força de flexão.

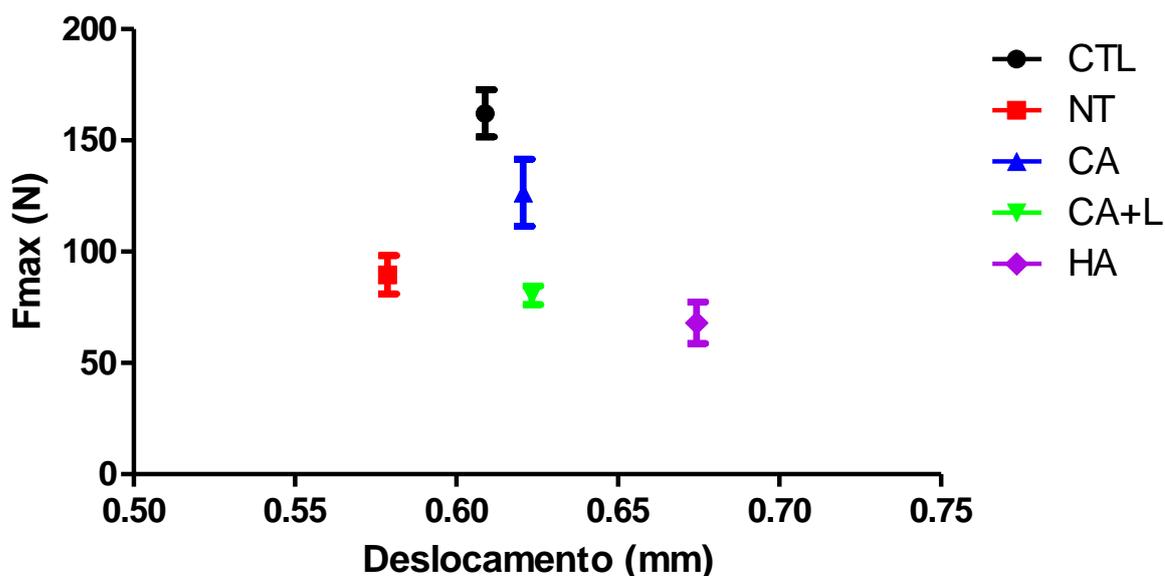


Figura 15: Gráfico da relação entre a força máxima de flexão óssea com o deslocamento máximo no momento da ruptura óssea.. Grupos Controle (CTL), não tratado (NT), grupo tratado com carvão ativado (CA), com hidroxiapatita (HA) ou com associação entre carvão ativado e laserterapia (CA+L).

## 5- DISCUSSÃO

Alterações ósseas como fraturas e/ou reabsorções ósseas geralmente levam a um processo de recuperação longo e doloroso. Existe um grande interesse em buscar tratamentos que auxiliem a reparação óssea e promovam uma recuperação mais rápida do paciente às suas atividades diárias normais.

Na fratura e durante a reconstrução óssea os pacientes geralmente são internados afim de reestabelecer a correta função do osso lesionado e independentemente da parte do corpo afetada, este processo de reconstrução óssea pode durar vários dias de internação chegando a meses ou anos de recuperação da função óssea normal e em alguns casos são necessários mais de um procedimento para o correto reestabelecimento da integridade óssea (RENNO, 2007; CROSS; ZAPATA; WOLFORD; RUSTEMEYER, 2011)

Neste trabalho foi escolhido um modelo de lesão óssea confeccionada a partir de uma broca cirúrgica e neste local de lesão, chamado loja óssea, foi utilizado o carvão ativado como biomaterial para análise de sua capacidade de reparo ósseo. Foi utilizado também o laser de baixa potência como terapia auxiliar na fase inflamatória em associação com a utilização do carvão ativado.

Como comentado anteriormente, o carvão ativado apresenta algumas propriedades interessantes para sua utilização na área médica. Primeiramente, ele é formado por uma grande quantidade de poros de diferentes diâmetros e e uma superfície otimizada fazendo com que este produto apresente interação com compostos externos, por exemplo, na adsorção de poluentes, fármacos, e neste caso, estimulando o reparo ósseo, provavelmente servindo como um catalizador físico para a proliferação celular. Já a hidroxiapatita foi utilizada como biomaterial por ser uma substância conhecida pelos profissionais da área de saúde para a promoção de enxertos ósseos, auxiliando no reparo ósseo.

O reparo ósseo foi analisado 28 dias após a lesão óssea e foram mensurados os níveis de fosfatase alcalina, padrões histológicos e propriedades mecânicas como a força de flexão máxima no momento da ruptura e a capacidade de deformação descrita pelos valores do deslocamento do tecido na máquina de ensaios mecânicos.

Em relação à escolha de nossos métodos, são poucos os trabalhos que relacionam alterações histológicas e bioquímicas com as alterações das propriedades mecânicas ósseas durante o reparo (NASCIMENTO; KAZEM, 2010)

A partir destes indicadores, apresentamos alguns resultados relacionando aspectos histológicos e biomecânicos.

A partir destes resultados foi possível observar uma melhora no reparo ósseo quando utilizamos o carvão ativado. Ao contrário, na associação do carvão ativado com laserterapia ou na utilização da hidroxiapatita, o tecido ósseo apresentou menor resistência às forças de flexão durante o ensaio

biomecânico, apesar de mostrarem tendência na redução de fosfatase alcalina e aspectos histológicos que indicaram reparo ósseo em diferentes níveis.

É conhecido que a laserterapia pode auxiliar o reparo ósseo em animais de pequeno porte (NASCIMENTO, 2010) e esta melhora estaria relacionada, por exemplo, ao aumento dos níveis de calcitonina (KAZEM, 2010)

Porém, quando pensamos em aplicação clínicas da laserterapia deparamos com diferentes parâmetros de irradiação que dificulta sua padronização e indicação clínica. Assim, a preocupação com a dosimetria é fundamental para se definir parâmetros de irradiação seguros e eficazes na utilização do laser de baixa intensidade (MESTER, 2013; TUBY et al, 2013; ALVES et al, 2013).

Neste trabalho escolhemos utilizar o laser de baixa potência 830nm com energia de 6 Joules, potência de 100mW e tempo de irradiação de 60 segundos. Estes parâmetros já foram utilizados em trabalhos anteriores em que a partir do 28º dia após a indução da lesão foi observado um processo de reparo adiantado, com a presença de calo ósseo maduro e formação completa do osso antes lesionado, restando apenas a retomada da arquitetura inicial. (PALLOTTA, 2014)

Outro fator importante do reparo ósseo está na relação dos níveis de fosfatase alcalina com a deposição de hidroxiapatita no osso. A deposição gradual de hidroxiapatita na matriz extracelular é uma etapa normal que interfere na atividade dos osteocitos além de alterar a deposição e reabsorção óssea. Neste sentido, a fosfatase alcalina tem um papel fundamental, pois hidroliza o pirofosfato e fornece fosfato inorgânico (ORIMO, 2010).

Após o processo lesivo, os níveis de fosfatase alcalina aumentam gradativamente até atingir seu pico no final da 2ª semana. A partir daí, a formação óssea é reduzida sendo substituída em parte pela remodelação óssea e os níveis de fosfatase alcalina retornam aos níveis fisiológicos, necessários apenas para a manutenção óssea.

Assim, a terapia com laser de baixa potência pode estimular a produção de fosfatase alcalina pelos osteoblastos nas fases iniciais do processo lesivo, alterando o tempo de reparo ósseo (DA SILVA, 2011; SARACINO, 2009).

No âmbito celular, a laserterapia pode atuar no reparo ósseo inibindo o recrutamento de células osteoprogenitoras e aumentando a ativação de osteoclastos, diminuindo a deposição de matriz extracelular e estimulando o remodelamento ósseo.

Os resultados histológicos nos forneceram informações importantes da progressão do reparo ósseo nos diferentes tratamentos. No grupo CTL, como esperado, os osteocitos estão distribuídos de maneira homogênea em todo o tecido ósseo maduro e existe uma divisão adequada entre a camada cortical e medular, com a presença de endosteio nesta delimitação. No grupo NT foi observado ainda áreas com reabsorção ossea, bem como regiões de transição de osso primário para secundário. Este resultado em conjunto com os níveis

aumentados de fosfatase alcalina mostra que a região da lesão está ainda em fase de formação óssea. A redução da força de flexão no grupo NT apenas confirma a presença de um tecido ainda frágil que caminha de forma mais lenta para o reparo ósseo.

Os resultados histológicos do grupo CA mostra um processo adiantado do reparo. É possível observar a presença de canais de Havers e osteocitos distribuídos sobre um tecido ósseo organizado e homogêneo. A redução dos níveis de fosfatase alcalina sugere que existe uma menor deposição de osso local, e dependendo da fase que o reparo está, sua redução pode modular a fase de remodelação óssea seja por retardar ou acelerar o reparo ósseo (DA SILVA, 2011; SARACINO, 2009). Neste caso, A redução dos níveis de fosfatase alcalina no grupo CA sugere uma melhora no processo de reparo, o que afirmado pela melhora na força máxima de flexão. Todo este cenário sugere que o carvão ativado apresenta características que favorecem sua utilização como substituto ósseo.

Estes aspectos histológicos favoráveis para o reparo ósseo também são encontrados no grupo CA+L onde é possível observar a disposição homogênea tanto de osteocitos quanto de canais de Havers. Porém, os níveis de fosfatase alcalina não foram reduzidos significativamente em comparação ao grupo NT, estando longe dos níveis normais encontrados no grupo CTL. A força de flexão também mostrou alterada, com valores próximos ao grupo NT, porém com uma capacidade de deformação maior, observada pelo aumento do deslocamento em relação ao grupo NT.

A laserterapia é conhecida pela sua ação moduladora, alterando a resposta celular e reduzindo o processo inflamatório. O laser pode ainda aumentar a reabsorção óssea, retardando o processo de reparo tecidual, fator que pode promover a readequação da formação óssea do original (SIMUNOVIFA, 2010; PALLOTTA, 2011).

O tratamento com Hidroxiapatita (HA) também apresentou uma velocidade de reparo mais lenta, com a presença de regiões ainda de transição entre cartilagem óssea e do tecido ósseo maduro e a redução da força máxima de flexão para valores ainda menores que o grupo NT. Na fase inicial da lesão (fase inflamatória) é observado intenso infiltrado inflamatório com respectiva necrose celular. Este cenário é revertido 2 semanas após um processo lesivo, quando ocorre intensa formação e deposição de hidroxiapatita. Os resultados encontrados no grupo HA sugerem que talvez a presença de quantidades maiores de hidroxiapatita reduza a atividade da fosfatase alcalina em algum momento, prejudicando a processo de reparo ósseo adequado no tempo estudado.

Nossos resultados demonstraram que os tratamentos utilizados dos diferentes grupos (CA, CA+L e HA) alteram o curso morfofuncional do reparo ósseo, acelerando o processo de reparo no grupo CA ou reduzindo este processo no grupo HA. No entanto, seria importante avaliar o comportamento histológico, bioquímico e biomecânico do laser isoladamente.

Além disso, mesmo sabendo que o carvão ativado já é utilizado como estratégia terapêutica na desintoxicação por hiperdosagem de vários fármacos controlados, a utilização do carvão ativado como biomaterial merece estudos mais aprofundados que verifiquem a interação deste produto com o organismo.

Outra limitação deste trabalho seria a necessidade de incluir um grupo de tratamento exclusivo com laser de baixa potência, a fim de avaliar sua interferência isolada frente ao reparo ósseo.

## **6- CONCLUSÃO**

A partir dos resultados e dos embasamentos teóricos aqui apresentados, podemos concluir que o modelo de lesão óssea utilizado neste trabalho reduziu algumas propriedades mecânicas pela redução da força de flexão, pelo aumento dos níveis de fosfatase alcalina e pelo cenário apresentado nas análises histológicas com presença de um tecido ósseo desorganizado e com atraso no reparo ósseo.

O tratamento com carvão ativado mostrou uma melhora no processo de reparo ósseo.

O grupo onde houve a associação entre a utilização de carvão ativado e irradiação laser, apresentou melhoras histológicas, porém com redução da força de flexão. O tratamento com hidroxiapatita apresentou uma qualidade do reparo menor que os outros tratamentos.

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMEDNA M, MARSHALL WE. Surface properties of granular activated carbons from agricultural by-products and their effects on raw sugar decolorization, *Bioresource Technology*, Volume 71, Issue 2, January 2000,103-112,

AI-AQL ZS, ALAGL AS, GRAVES DT, GERSTENFELD LC, EINHORN TA. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J Dent Res*. 2008 Feb;87(2):107-18.

ALBERTINI R, AIMBIRE F S, CORREA F I, RIBEIRO W, COGO J C, ANTUNES E, TEIXEIRA S A, DE NUCCI G, CASTRO-FARIA-NETO H C, ZÂNGARO R A, LOPES-MARTINS R A. Effects of different protocol doses of low power gallium-aluminum-arsenate (Ga-Al-As) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced rat paw oedema. *J Photochem Photobiol B*. 2004 May 27;74(2-3):101-7.

AIMBIRE F, ALBERTINE R, DE MAGALHÃES R G, LOPES-MARTINS R A, CASTRO-FARIA-NETO H C, ZÂNGARO R A, CHAVANTES M C, PACHECO MT. Effect of LLLT Ga-Al-As (685 nm) on LPS-induced inflammation of the airway and lung in the rat. *Lasers Med Sci*. 2005;20(1):11-20.

AIMBIRE F, ALBERTINI R, PACHECO M T, CASTRO-FARIA-NETO H C, LEONARDO P S, IVERSEN V V, LOPES-MARTINS R A, BJORDAL J M. Low-level laser therapy induces dose-dependent reduction of TNFalpha levels in acute inflammation. *Photomed Laser Surg*. 2006 Feb;24(1):33-7.

AIMBIRE F, LOPES-MARTINS R A, ALBERTINI R, PACHECO M T, CASTRO-FARIA-NETO H C, MARTINS P S, BJORDAL J M. Effect of low-level laser therapy on hemorrhagic lesions induced by immune complex in rat lungs. *Photomed Laser Surg*. 2007 Apr;25(2):112-7.

AIMBIRE F, LIGEIRO DE OLIVEIRA AP, ALBERTINI R, CORRÊA<sup>TM</sup> A JC, LADEIRA DE CAMPOS CB, LYON JP, SILVA JA JR, COSTA MS. Low level laser therapy (LLLT) decreases pulmonary microvascular leakage, neutrophil influx and IL-1beta levels in airway and lung from rat subjected to LPS-induced inflammation. *Inflammation*. 2008 Jun;31(3):189-97.

ALVES AC, VIEIRA R, LEAL-JUNIOR E, DOS SANTOS S, LIGEIRO AP, ALBERTINI R, JUNIOR J, DE CARVALHO P. Effect of low-level laser therapy on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(5):R116.

ASADULLAH M, JAHAN I, AHMED MB, ADAWIYAH P, MALEK NH, RAHMAN MS. Preparation of microporous activated carbon and its modification for arsenic removal from water, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, Volume 20, Issue 3, 25 May 2014, Pages 887-896,

BASFORD J R, SHEFFIELD C G, CIESLAK K R. Laser therapy: a randomized, controlled trial of the effects of low intensity Nd:YAG laser irradiation on lateral epicondylitis. *Arch Phys Med Rehabil*. 2000 Nov;81(11):1504-10.

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

BOYCE BF, LI P, YAO Z, ZHANG Q, BADELL IR, SCHWARZ EM, O'KEEFE RJ, XING L. TNF-alpha and pathologic bone resorption. *Keio J Med*. 2005 Sep;54(3):127-31. Review.

BJORDAL J M, JOHNSON M I, IVERSEN V V, AIMBIRE F, LOPES-MARTINS R A. Photoradiation in acute pain: a systematic review of possible mechanisms of action and clinical effects in randomized placebo-controlled trials. *Photomed Laser Surg*. 2006 Apr;24(2):158-68.

BJORDAL J M, JOHNSON M I, LOPES-MARTINS R A, BOGEN B, CHOW R, Ljunggren A E. Short-term efficacy of physical interventions in osteoarthritic knee pain. A systematic review and meta-analysis of randomised placebo-controlled trials. *BMC Musculoskelet Disord*. 2007 Jun 22;8:51. Review.

BJORDAL J M, KLOVNING A, LOPES-MARTINS R A, ROLAND P D, JOENSEN J, SLØRDAL L. Overviews and systematic reviews on low back pain. *Ann Intern Med*. 2008 May 20;148(10):789-90; author reply 791-2.

BJORDAL J M, LOPES-MARTINS R A, IVERSEN V V. A randomised, placebo controlled trial of low level laser therapy for activated Achilles tendinitis with microdialysis measurement of peritendinous prostaglandin E2 concentrations. *Br J Sports Med*. 2006 Jan;40(1):76-80; discussion 76-80.

BJORDAL J M, LOPES-MARTINS R A, JOENSEN J, COUPPE C, LJUNGGREN A E, STERGIOLAS A, JOHNSON M I. A systematic review with procedural assessments and meta-analysis of low level laser therapy in lateral elbow tendinopathy (tennis elbow). *BMC Musculoskelet Disord*. 2008 May 29;9:75.

BERTOLOTI R L. Alternative casting alloys for today's crown and bridge restorations. Part II: metal-ceramic restorations. *CDA J.* 1983 Sep;11(9):63-9.

BHATNAGAR A, HOGLAND W, MARQUES M, SILLANPÄÄ M. An overview of the modification methods of activated carbon for its water treatment applications, *Chemical Engineering Journal*, Volume 219, 1 March 2013, Pages 499-511.

BLAYA DS, GUIMARÃES MB, POZZA DH, WEBER JB, DE OLIVEIRA MG. Histologic study of the effect of laser therapy on bone repair. *J Contemp Dent Pract.* 2008 Sep 1;9(6):41-8.

BLIDDAL H, HELLESEN C, DITLEVSEN P, ASSELBERGHS J, LYAGER L. Soft-laser therapy of rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 1987;16(4):225-8.

BROSSEAU L, WELCH V, WELLS G, TUGWELL P, DE BIE R, GAM A, HARMAN K, SHEA B, MORIN M. Low level laser therapy for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: a metaanalysis. *J Rheumatol.* 2000 Aug;27(8):1961-9.

CAMPANA V, MOYA M, GAVOTTO A, JURI H, PALMA J A. Effects of diclofenac sodium and He:Ne laser irradiation on plasmatic fibrinogen levels in inflammatory processes. *J Clin Laser Med Surg.* 1998 Dec;16(6):317-20.

CORREA F, LOPES MARTINS R A, CORREA J C, IVERSEN V V, JOENSON J, BJORDAL J M. Low-level laser therapy (GaAs lambda = 904 nm) reduces inflammatory cell migration in mice with lipopolysaccharide-induced peritonitis. *Photomed Laser Surg.* 2007 Aug;25(4):245-9.

COHEN SL, MOORE AM, WARD WE. Interleukin-10 knockout mouse: a model for studying bone metabolism during intestinal inflammation. *Inflamm Bowel Dis.* 2004 Sep;10(5):557-63.

CROSS MB, OSBAHR DC, NAM D, REINHARDT KR, BOSTROM MP, DINES JS. An analysis of the hip and knee reconstruction section of the orthopaedic in-training examination. *Orthopedics.* 2011 Sep 9;34(9):e550-5.

DOHAN DM, CHOUKROUN J, DISS A, DOHAN SL, DOHAN AJ, MOUHYI J, GOGLY B. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006 Mar;101(3):e51-5.

DE OLIVEIRA TS, SERRA AJ, MANCHINI MT, BASSANEZE V, KRIEGER JE, DE TARSO CAMILLO DE CARVALHO P, ANTUNES DE, BOCALINI DS, FERREIRA TUCCI PJ, SILVA JA JR. Effects of low level laser therapy on

attachment, proliferation, and gene expression of VEGF and VEGF receptor 2 of adipocyte-derived mesenchymal stem cells cultivated under nutritional deficiency. *Lasers Med Sci.* 2014 Sep 6

DE CASTRO E SILVA JÚNIOR O, ZUCOLOTO S, MENEGAZZO L A, GRANATO R G, ARCASSA L G, BAGNATO V S. Laser enhancement in hepatic regeneration for partially hepatectomized rats. *Lasers Surg Med.* 2001;29(1):73-7.

DOHAN EHRENFEST DM, RASMUSSEN L, ALBREKTSSON T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* 2009 Mar;27(3):158-67.

DA SILVA AP, PETRI AD, CRIPPA GE, STUANI AS, STUANI AS, ROSA AL, STUANI MB. Effect of low-level laser therapy after rapid maxillary expansion on proliferation and differentiation of osteoblastic cells. *Lasers Med Sci.* 2011 Aug 13.

FÁVARO-PIPI E, BOSSINI P, DE OLIVEIRA P, RIBEIRO JU, TIM C, PARIZOTTO NA, ALVES JM, RIBEIRO DA, SELISTRE DE ARAÚJO HS, RENNO AC. Low-intensity pulsed ultrasound produced an increase of osteogenic genes expression during the process of bone healing in rats. *Ultrasound Med Biol.* 2010 Dec;36(12):2057-64. Epub 2010 Oct 15.

FERRARESI C, PARIZOTTO NA, PIRES DE SOUSA MV, KAIPPERT B, HUANG YY, KOISO T, BAGNATO VS, HAMBLIN MR. Light-emitting diode therapy in exercise-trained mice increases muscle performance, cytochrome c oxidase activity, ATP and cell proliferation. *J Biophotonics.* 2014 Nov 6;9999

FERRAZ FH, SCHELLINI SA, SCHELLINI RC, PELLIZON CH, HIRAI FE, PADOVANI CR. BMP implant associated with platelet-rich plasma in orbit fracture repair. *Curr Eye Res.* 2008 Mar;33(3):293-301.

GÖNEN N, KÖRPE E, YILDIRIM ME, SELENGIL U. Leaching and CIL processes in gold recovery from refractory ore with thiourea solutions, *Minerals Engineering*, Volume 20, Issue 6, May 2007, Pages 559-565.

GUO X, WANG XF. Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. *Cell Res.* 2009 Jan;19(1):71-88.

HADJIARGYROU M, LOMBARDO F, ZHAO S, AHRENS W, JOO J, AHN H, JURMAN M, WHITE DW, RUBIN CT. Transcriptional profiling of bone

regeneration. Insight into the molecular complexity of wound repair. *J Biol Chem.* 2002 Aug 16;277(33):30177-82. Epub 2002 Jun 7.

HAZEKI O, TAMURA M. Near infrared quadruple wavelength spectrophotometry of the rat head. *Adv Exp Med Biol.* 1989;248:63-9.

HAK DJ, SCHULZ KS, KHOIE B, HAZELWOOD SJ. The effect of Cox-2 specific inhibition on direct fracture healing in the rabbit tibia. *J Orthop Sci.* 2011 Jan;16(1):93-8. Epub 2011 Jan 25. PubMed PMID: 21264481.

HU Z, PEEL SA, HO SK, SÁNDOR GK, CLOKIE CM. Platelet-rich plasma induces mRNA expression of VEGF and PDGF in rat bone marrow stromal cell differentiation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009 Jan;107(1):43-8. Epub 2008 Aug 28.

HONMURA A, ISHII A, YANASE M, OBATA J, HARUKI E. Analgesic effect of Ga-Al-As diode laser irradiation on hyperalgesia in carrageenin-induced inflammation. *Lasers Surg Med.* 1993;13(4):463-9.

KARU T I. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser irradiation *Dokl Akad Nauk SSSR.* 1986;291(5):1245-9.

KAZEM SHAKOURI S, SOLEIMANPOUR J, SALEKZAMANI Y, OSKUIE MR. Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process. *Lasers Med Sci.* 2009 Apr 28.

KAZEM SHAKOURI S, SOLEIMANPOUR J, SALEKZAMANI Y, OSKUIE MR. Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process. *Lasers Med Sci.* 2010 Jan;25(1):73-7. Epub 2009 Apr 28.

KIYOIZUMI T. Low level diode laser treatment for hematomas under grafted kin and its photobiological mechanisms. *Keio J Med.* 1988 Dec;37(4):415-28.

KHADRA M, RØNOLD HJ, LYGSTADAAS SP, ELLINGSEN JE, HAANAES HR. Low-level laser therapy stimulates bone-implant interaction: an experimental study in rabbits. *Clin Oral Implants Res.* 2004 Jun;15(3):325-32.

LUI J, CORBET EF, JIN L. Combined photodynamic and low-level laser therapies as an adjunct to nonsurgical treatment of chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* 2011 Feb;46(1):89-96. doi: 10.1111/j.

LANGE J, SAPOZHNIKOVA A, LU C, HU D, LI X, MICLAU T 3RD, MARCUCIO RS. Action of IL-1beta during fracture healing. *J Orthop Res.* 2010 Jun;28(6):778-84.

LOPES-MARTINS R A, ALBERTINI R, MARTINS P S, BJORDAL J M, FARIA NETO H C. Spontaneous effects of low-level laser therapy (650 nm) in acute inflammatory mouse pleurisy induced by carrageenan. *Photomed Laser Surg.* 2005 Aug;23(4):377-81.

LOPES-MARTINS R A, ALBERTINI R, MARTINS P S, BJORDAL J M, FARIA NETO H C. Spontaneous effects of low-level laser therapy (650 nm) in acute inflammatory mouse pleurisy induced by carrageenan. *Photomed Laser Surg.* 2005 Aug;23(4):377-81.

LOPES-MARTINS R A, ALBERTINI R, LOPES-MARTINS P S, DE CARVALHO F A, NETO H C, IVERSEN V V, BJORDAL J M. Steroid receptor antagonist mifepristone inhibits the anti-inflammatory effects of photoradiation. *Photomed Laser Surg.* 2006 Apr;24(2):197-201.

LOUIS PJ. Bone grafting the mandible. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2011 May;23(2):209-27.

LEAL JUNIOR E C, LOPES-MARTINS R A, VANIN A A, BARONI B M, GROSSELLI D, DE MARCHI T, IVERSEN V V, BJORDAL J M. Effect of 830 nm low-level laser therapy in exercise-induced skeletal muscle fatigue in humans. *Lasers Med Sci.* 2008 Jul 23.

LEE SJ. Cytokine delivery and tissue engineering. *Yonsei Med J.* 2000 Dec;41(6):704-19.

MARSH H, HEINTZ E A, RODRÍGUEZ-REINOSO F. *Introduction to carbon Technologies.* Alicante:Universidad, 1997.

MATSUMOTO MA, FERINO RV, MONTELEONE GF, RIBEIRO DA. Low-level laser therapy modulates cyclo-oxygenase-2 expression during bone repair in rats. *Lasers Med Sci.* 2009 Mar;24(2):195-201. Epub 2008 Feb 29.

MESTER A. Laser biostimulation. *Photomed Laser Surg.* 2013 Jun;31(6):237-9.

MOUNTZIARIS PM, MIKOS AG. Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008 Jun;14(2):179-86. Review.

MOHAMED SG, SUGIYAMA E, SHINODA K, TAKI H, HOUNOKI H, ABDEL-AZIZ HO, MARUYAMA M, KOBAYASHI M, OGAWA H, MIYAHARA T. Interleukin-10 inhibits RANKL-mediated expression of NFATc1 in part via suppression of c-Fos and c-Jun in RAW264.7 cells and mouse bone marrow cells. *Bone.* 2007 Oct;41(4):592-602.

MOOREN RE, HENDRIKS EJ, VAN DEN BEUCKEN JJ, MERKX MA, MEIJER GJ, JANSEN JA, STOELINGA PJ. The effect of platelet-rich plasma in vitro on primary cells: rat osteoblast-like cells and human endothelial cells. *Tissue Eng Part A*. 2010 Oct;16(10):3159-72.

MIZUTANI K, MUSYA Y, WAKAE K, KOBAYASHI T, TOBE M, TAIRA K, HARADA T. A clinical study on serum prostaglandin E2 with low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg*. 2004 Dec;22(6):537-9.

MESQUITA-FERRARI RA, MARTINS MD, SILVA JA JR, DA SILVA TD, PIOVESAN RF, PAVESI VC, BUSSADORI SK, FERNANDES KP. Effects of low-level laser therapy on expression of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  in skeletal muscle during the repair process. *Lasers Med Sci*. 2011 May;26(3):335-40.

NASCIMENTO SB, CARDOSO CA, RIBEIRO TP, ALMEIDA JD, ALBERTINI R, MUNIN E, ARISAWA EA. Effect of low-level laser therapy and calcitonin on bone repair in castrated rats: a densitometric study. *Photomed Laser Surg*. 2010 Feb;28(1):45-9.

NIKOLIDAKIS D, JANSEN JA. The biology of platelet-rich plasma and its application in oral surgery: literature review. *Tissue Eng Part B Rev*. 2008

NISSAN J, ASSIF D, GROSS MD, YAFFE A, BINDERMAN I. Effect of low intensity laser irradiation on surgically created bony defects in rats. *J Oral Rehabil*. 2006 Aug;33(8):619-924.

OLMEDO ML, LANDRY PS, SADASIVAN KK, ALBRIGHT JA, MEEK WD, ROUTH R, MARINO AA. Regulation of osteoblast levels during bone healing. *J Orthop Trauma*. 1999 Jun-Jul;13(5):356-62.

ORIMO H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nihon Med Sch*. 2010 Feb;77(1):4-12. Review.

PALLOTTA RC, BJORDAL JM, FRIGO L, LEAL JUNIOR EC, TEIXEIRA S, MARCOS RL, RAMOS L, DE MOURA MESSIAS F, LOPES-MARTINS RA. Infrared (810-nm) low-level laser therapy on rat experimental knee inflammation. *Lasers Med Sci*. 2011 Apr 12.

PALLOTTA, RC. Evaluation of the effect of low level laser and plasma rich fibrin in bone repair in rats. Thesis USP – 2014. [www.teses.usp.br](http://www.teses.usp.br)

PENDYAL, M.M. JOHNS, W.E. MARSHALL, M. AHMEDNA, R.M. RAO. Removal of sugar colorants by granular activated carbons made from binders

and agricultural by-products, *Bioresource Technology*, Volume 69, Issue 1, July 1999, 45-51, B.

PEREIRA AC, FERNANDES RG, CARVALHO YR, BALDUCCI I, FAIG-LEITE H. Bone healing in drill hole defects in spontaneously hypertensive male and female rats' femurs. A histological and histometric study. *Arq Bras Cardiol*. 2007 Jan;88(1):104-9.

PLACHOKOVA AS, VAN DEN DOLDER J, STOELINGA PJ, JANSEN JA. Early effect of platelet-rich plasma on bone healing in combination with an osteoconductive material in rat cranial defects. *Clin Oral Implants Res*. 2007 Apr;18(2):244-51.

PINHEIRO AL, LIMEIRA JÚNIOR FDE A, GERBI ME, RAMALHO LM, MARZOLA C, PONZI EA. Effect of low level laser therapy on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone. *Braz Dent J*. 2003;14(3):177-81. Epub 2004 Mar 29. PubMed

PINHEIRO AL, MARTINEZ GERBI ME, CARNEIRO PONZI EA, PEDREIRA RAMALHO LM, MARQUES AM, CARVALHO CM, SANTOS RDE C, OLIVEIRA PC, NÓIA M. Infrared laser light further improves bone healing when associated with bone morphogenetic proteins and guided bone regeneration: an in vivo study in a rodent model. *Photomed Laser Surg*. 2008 Apr;26(2):167-74.

PIRES D, XAVIER M, ARAÚJO T, SILVA JA JR, AIMBIRE F, ALBERTINI R. Low-level laser therapy (LLLT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of anti- and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat. *Lasers Med Sci*. 2011 Jan;26(1):85-94. PMID: 20737183.

RIBEIRO DA, MATSUMOTO MA. Low-level laser therapy improves bone repair in rats treated with anti-inflammatory drugs. *J Oral Rehabil*. 2008 Dec;35(12):925

RUSTEMEYER J, GREGERSEN J. Quality of Life in orthognathic surgery patients: Post-surgical improvements in aesthetics and self-confidence. *J Craniomaxillofac Surg*. 2011 Aug 22.

RENNO AC, MCDONNELL PA, PARIZOTTO NA, LAAKSO EL. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro. *Photomed Laser Surg*. 2007 Aug;25(4):275-80.

SANTOS JJ, AMIRANOFF F, BATON SD, GREMILLET L, KOENIG M, MARTINOLLI E, RABEC LE GLOAHEC M, ROUSSEAUX C, BATANI D, BERNARDINELLO A, GREISON G, HALL T. Fast electron transport in

ultraintense laser pulse interaction with solid targets by rear-side self-radiation diagnostics. *Phys Rev Lett*. 2002 Jul 8;89(2).

SALGADO CL, SANCHEZ EM, ZAVAGLIA CA, ALMEIDA AB, GRANJA PL. Injectable Biodegradable Polycaprolactone-Sebacic Acid Gels for Bone Tissue Engineering. *Tissue Eng Part A*. 2011 Sep 15.

SHAIEGAN M, POURFATOLLAH AA, NAMIRI M, BABAEE G. Generation of IL-8 and TNF-alpha in platelet concentrates during storage. *Arch Iran Med*. 2006 Jan;9(1):61-4.

SHAO S, LIANG H, CHANG H, YU H, LI G. Characterization of membrane foulants in a pilot-scale powdered activated carbon-membrane bioreactor for drinking water treatment, *Process Biochemistry*, Volume 49, Issue 10, October 2014, Pages 1741-1746.

SOLEIMANI M, KAGHAZCHI T. Gold recovery from loaded activated carbon using different solvents *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, Volume 39, Issue 1, January 2008, Pages 9-11.

SAFAVI SM, KAZEMI B, ESMAEILI M, FALLAH A, MODARRESI A, MIR M. Effects of low-level He-Ne laser irradiation on the gene expression of IL-1beta, TNF alpha, IFN-gamma, TGF-beta, bFGF, and PDGF in rat's gingiva. *Lasers Med Sci*. 2008 Jul;23(3):331-5.

SARACINO S, MOZZATI M, MARTINASSO G, POL R, CANUTO RA, MUZIO G. Superpulsed laser irradiation increases osteoblast activity via modulation of bone morphogenetic factors. *Lasers Surg Med*. 2009 Apr;41(4):298-304.

SCHINDELER A, MCDONALD MM, BOKKO P, LITTLE DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol*. 2008 Oct;19(5):459-66. Epub 2008 Jul 25.

SERHAN CN, SAVILL J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol*. 2005 Dec;6(12):1191-7.

SITTHIKHANKAEW R, PREDAPITAKKUN S, KIATTIKOMOL RW, PUMHIRAN S, ASSABUMRUNGRAT S, LAOSIRIPOJANA N. Comparative Study of Hydrogen Sulfide Adsorption by using Alkaline Impregnated Activated Carbons for Hot Fuel Gas Purification, *Energy Procedia*, Volume 9, 2011, Pages 15-24,

SPERANDIO FF, SIMÕES A, CORRÊA L, ARANHA AC, GIUDICE FS, HAMBLIN MR, SOUSA SC. Low-level laser irradiation promotes

the proliferation and maturation of keratinocytes during epithelial wound repair. *J Biophotonics*. 2014 Nov 20;9999(9999).

STERGIOULAS A. Low-power laser treatment in patients with frozen shoulder: preliminary results. *Photomed Laser Surg*. 2008 Apr;26(2):99-105.

SVAASAND LO. Biostimulation with low-intensity laser s--physics or metaphysics? *Nord Med*. 1990;105(3):72-5. Inst for fysikalsk elektronikk, Norges Tekniske Høgskole, Universiteti Trondheim.

SUNITHA RAJA V, MUNIRATHNAM NAIDU E. Platelet-rich fibrin: evolution of a second-generation platelet concentrate. *Indian J Dent Res*. 2008 Jan-Mar;19(1):42-6.

SCHAFFER M, BONEL H, SROKA R, SCHAFFER P M, BUSCH M, REISER M, DÜHMKE E. Effects of 780 nm diode laser irradiation on blood microcirculation: preliminary findings on time-dependent T1-weighted contrast-enhanced magnetic resonance imaging (MRI). *J Photochem Photobiol B*. 2000 Jan;54(1):55-60.

STEIN E, KOEHN J, SUTTER W, WENDTLANDT G, WANSCHITZ F, THURNHER D, BAGHESTANIAN M, TURHANI D. Initial effects of low-level laser therapy on growth and differentiation of human osteoblast-like cells. *Wien Klin Wochenschr*. 2008;120(3-4):112-7.

SIMONPIERI A, DEL CORSO M, VERVELLE A, JIMBO R, INCHINGOLO F, SAMMARTINO G, DOHAN EHRENFEST DM. Current Knowledge and Perspectives for the Use of Platelet-Rich Plasma (PRP) and Platelet-Rich Fibrin (PRF) in Oral and Maxillofacial Surgery. Part 2: Bone Graft, Implant and Reconstructive Surgery. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011 Jul 8.

SIMUNOVIĆ-SOSKIĆ M, PEZELJ-RIBARIĆ S, BRUMINI G, GLAZAR I, GRZIJĆ R, MILETIĆ I. Salivary levels of TNF-alpha and IL-6 in patients with denture stomatitis before and after laser phototherapy. *Photomed Laser Surg*. 2010 Apr;28(2):189-93.

TORRES CS, DOS SANTOS JN, MONTEIRO JS, AMORIM PG, PINHEIRO AL. Does the use of laser photobiomodulation, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration improve the outcome of autologous bone grafts? An in vivo study in a rodent model. *Photomed Laser Surg*. 2008 Aug;26(4):371-7.

TUBY H, HERTZBERG E, MALTZ L, ORON U. Long-term safety of low-level laser therapy at different power densities and single or multiple applications to the bone marrow in mice. *Photomed Laser Surg*. 2013 Jun;31(6):269-73.

WALLACE A, COONEY TE, ENGLUND R, LUBAHN JD. Effects of interleukin-6 ablation on fracture healing in mice. *J Orthop Res*. 2011 Sep;29(9):1437-42. doi: 10.1002/jor.21367. Epub 2011 Mar 28.

WOLFORD LM, DHAMEJA A. PLANNING FOR COMBINED TMJ Arthroplasty and Orthognathic Surgery. *Atlas Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2011 Sep;19(2):243-70.

ZHAO W, FIERRO V, ZLOTEA C, AYLON E, IZQUIERDO MT, LATROCHE M, CELZARD A. Optimization of hydrogen storage capacity onto activated carbons, *International Journal of Hydrogen Energy* 36 (2011) 11746-11751

ZAPATA U, HALVACHS EK, DECHOW PC, ELSALANTY ME, OPPERMAN LA. Architecture and Microstructure of Cortical Bone in Reconstructed Canine Mandibles After Bone Transport Distraction Osteogenesis. *Calcif Tissue Int*. 2011 Sep 17.

ZIMMERMANN CE, GIERLOFF M, HEDDERICH J, AßIL Y, WILTFANG J, TERHEYDEN H. Biocompatibility of bone graft substitutes: effects on survival and proliferation of porcine multilineage stem cells in vitro. *Folia Morphol (Warsz)*. 2011 Aug;70(3):154-60.

ZHANG Y, TANGL S, HUBER CD, LIN Y, QIU L, RAUSCH-FAN X. Effects of Choukroun's platelet-rich fibrin on bone regeneration in combination with deproteinized bovine bone mineral in maxillary sinus augmentation: A histological and histomorphometric study. *J Craniomaxillofac Surg*. 2011 Jun 9.

ZHANG S, MAO T, CHEN F. Influence of platelet-rich plasma on ectopic bone formation of bone marrow stromal cells in porous coral. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2011 Sep;40(9):961-5. Epub 2011 May 18.

## Lasers in Medical Science

### Effect of low level laser associated with activated carbon in bone repair of rats --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Effect of low level laser associated with activated carbon in bone repair of rats
Article Type:	Original Article
Keywords:	bone repair, low level laser, activated carbon, mechanical properties.
Corresponding Author:	Rodrigo Labat Marcos, PhD Universidade Nove de Julho São Paulo, SP BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade Nove de Julho
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Alexandre Botelho Abreu Sampaio
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Alexandre Botelho Abreu Sampaio Rodrigo Lopes-Martins Rodney Pallotta Alain Celzard Vanessa Fierro Ernesto Cesar Leal-Junior Gisele Amaral-Labat Guilherme Lens Rodrigo Labat Marcos, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	<p>The bone defects are caused by several factors and the repair process can be slow, where inflammatory and proliferative phases of remodeling of this tissue are extremely important for the quality of the repair. There are several therapies where the main is the surgery and in this case, the use of bone substitutes can be indicated. However the repair process may require assistance. Thus, the use of activated charcoal as bone substitute when the implementation of low-power laser to aid bone repair can be an alternative to these problems. The aim of this study was to verify the use of activated carbon as bone substitute and the interaction with the laser in the process of bone repair in rat tibias, assessing biochemical, histological and biomechanical changes.</p> <p>Material and methods: male wistar rats, 36 were used between 150 g to 200 g, with 3 months of age. The animals were anesthetized with ketamine hydrochloride and Association (90mg/Kg and 10mg/Kg, IP). Once anesthetized, the animals were put on surgical table, the skin was dissected and were made monocortical bone defects in the central region of the right tibia of mice. Immediately after surgery the rats were randomized and divided into the following groups: control (CTL), untreated injury (NT), Lesion treated with activated carbon (CA), Lesion treated with association of activated carbon and laser 830nm, 6J-100mW (CA+L) and injury treated with Hydroxapatite (HA). After 28 days the animals were euthanized with overdose of the same anesthetic, blood was collected and the tibia was taken for biochemical, histological and biomechanical analysis. Committee of ethics: AN00462014-UNINOVE. Results: the NT group reduction in bending forces and histological changes related to disorganization of the tissue. The groups showed no CA+L and HA improves mechanical properties,</p>

however, the CA+L group presented histological aspects of improvement. Only the CA group presented better flexion forces, related with improvement of histological aspects and reduced levels of alkaline phosphatase. The NT groups, CA+L and HA presented high alkaline phosphatase levels. Conclusion: the use of activated carbon seems to improve the bone repair induced in this study. The laser association with activated carbon showed no improvement of biomechanical properties in spite of the histological results have a better aspect.

## Abstract

The bone defects are caused by several factors and the repair process can be slow, where inflammatory and proliferative phases of remodeling of this tissue are extremely important for the quality of the repair. There are several therapies where the main is the surgery and in this case, the use of bone substitutes can be indicated. However the repair process may require assistance. Thus, the use of activated charcoal as bone substitute when the implementation of low-power laser to aid bone repair can be an alternative to these problems. The aim of this study was to verify the use of activated carbon as bone substitute and the interaction with the laser in the process of bone repair in rat tibias, assessing biochemical, histological and biomechanical changes. Material and methods: male wistar rats, 35 were used between 150 g to 200 g, with 3 months of age. The animals were anesthetized with ketamine hydrochloride and Association (80mg/Kg and 10mg/Kg, IP). Once anesthetized, the animals were put on surgical table, the skin was dissected and were made monocortical bone defects in the central region of the right tibia of mice. Immediately after surgery the rats were randomized and divided into the following groups: control (CTL), untreated Injury (NT), Lesion treated with activated carbon (CA), Lesion treated with association of activated carbon and laser 830nm, 6J-100mW (CA+L) and injury treated with Hydroxyapatite (HA). After 28 days the animals were euthanized with overdose of the same anesthetic, blood was collected and the tibia was taken for biochemical, histological and biomechanical analysis. Committee of ethics: AN00482014-UNINOVE. Results: the NT group reduction in bending forces and histological changes related to disorganization of the tissue. The groups showed no CA+L and HA improves mechanical properties, however, the CA+L group presented histological aspects of improvement. Only the CA group presented better flexion forces, related with improvement of histological aspects and reduced levels of alkaline phosphatase. The NT groups, CA+L and HA presented high alkaline phosphatase levels. Conclusion: the use of activated carbon seems to improve the bone repair induced in this study. The laser association with activated carbon showed no improvement of biomechanical properties in spite of the histological results have a better aspect.

**Keywords:** bone repair, low level laser, activated carbon, mechanical properties.

## 1- Introduction

Bone repair is a process that remember aspects of the development and growth of the skeleton, involving several extracellular, cellular components and growth factors. The cellular events involved in bone repair can be observed through the determination of the levels of certain inflammatory factors, vascular, osteochondral precursors and osteoclasts and molecular through the presence of certain Pro-

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Inflammatory Cytokines, growth factors pró-osteogénicos and angiogenic factors; responsible for recruitment and to stimulate cellular differentiation and growth (FAVARO-PIPI, 2010; HADJIARGYROU, 2002)

The bone fractures can cause various tissue damage around as; irritation in the nerve endings (pain), bleeding, muscle spasms and deformities in some cases (SHINDELER; NIKOLIDAKIS, 2008).

The treatment is very broad and depends on the diagnosis and the extent of the damage, but in cases of bone loss, bioreplacements are used. However, it is important to control the inflammatory process to direct for a better repair.

Activated carbon is a solid porous containing coal mining sites accessible for the occurrence of the phenomenon of adsorption or chemical reactions (MARSH H, 1997).

Activated carbon are excellent and versatile adsorbents, due to its porosity highly developed beyond a high internal surface area causing the material to be effective in different application fields (MARSH H, 1997).

These specific characteristics of activated carbon associated with the fact that it is considered a low-cost material would be an important factor for use in the medical field, for example, as bone substitute used in lesions in this tissue.

The use of laser in clinical practice for the anti-inflammatory effect in different pathologies is based on a reasonable number of publications of scientific character, causing the Laser Therapy is considered as an alternative therapy for various diseases (BASFOR, 2000; BJORDAL, 2008).

The effect caused by phototherapy in the acceleration of bone healing can represent a potential benefit, because: the patient's postoperative improvement decreases recovery time with rehabilitation sessions of joint movements; generates smaller financial losses to the economy, where the individual returns to work and daily activities in less time (LEE, 2006; TORRES, 2008; STEIN, 2008; PATEL, 2008; KAZEM, 2008; RIBEIRO; BLAYA, 2008).

## 2- Objective

The aim of this study was to evaluate the histological and biochemical, biomechanical changes in the process of bone repair in rat tibia after induction of injury and the action of activated carbon usage associated with laser therapy on bone repair in rat tibia.

## 3- MATERIAL AND METHODS

1 We used 35 male Wistar rats weighing between 150 and 200 g from University Nove  
2 de Julho. Comitê de ética AN00462014.

3  
4 The animals were divided into 5 groups of animals each 07: (CTL) without surgical  
5 procedure. (NT) Group with the bone store and without treatment. (CA) Group with  
6 bone store and use of active carbon. (CA+L) Group with bone store and use active  
7 carbon associated to 830nm Laser, 8J, 100mW (Figure 1). (HA) Group with bone  
8 store and use of hydroxyapatite.  
9

10  
11 <<FIGURA 1>>  
12

13  
14 The animals were anesthetized with Ketamine (90mg/Kg) and Xylazine (10mg/Kg)  
15 and then an incision was performed on the bone at the post-tibial side to the right  
16 with divulsion of subcutaneous and muscle plans, access to the periosteum of the  
17 tibial bone in proximal region and making hole 04 mm below the knee joint with the  
18 aid of drill with 05 mm in length and 1.3 mm thick. After making the hole Group (CA)  
19 received the active coal in the hole, the Group (CA+L) received in-place active  
20 carbon and hole were irradiated immediately with low-power laser and the Group  
21 received hydroxyapatite (HA) at the location of the hole. After this process, the  
22 animals were sutured and returned the boxes. All the animals were euthanized after  
23 28 days. The blood and the bone were collected for analysis.  
24  
25  
26  
27

28  
29 Both the activated carbon as hydroxyapatite were diluted in sterile saline solution 0.9  
30 until the formation of a grease and applied in the region of bone store until full  
31 coverage of defect induced by surgical drill. LLLT was held after the bone injury and  
32 maintained for 7 days with occasional irradiation, at the site of injury.  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Analysis of bone mechanical properties

After the induction of the lesion, the animals were sacrificed after 28 days and the bone was removed for further analysis. Part of this material was used immediately after the withdrawal, bending tests for the evaluation of their mechanical properties. The normal activity of the bone consists of a set of applied voltages in the tissue, divided into forces of loading and unloading. In this way, it was applied a sequence of loading and unloading forces in order to simulate real tension conditions of the bone.

First were the measures of length, width and height of the tibia. These values will be used to detail the material dimensions and standardization of results. The tibias were placed horizontally on the appliance of mechanical testing (EMIC200) for bending test on 3 points. Was used a speed of loading and unloading of min.binding size 8 and added 0, 3 mm for each shipment. The bending test was interrupted automatically after bone breakage and the following parameters were analyzed: maximum breaking force (Fmax), offset in the time of maximum break (Dmax), stiffness ( $\alpha$ ).

## Quantification of alkaline phosphatase in blood serum stock by ELISA method.

Before the euthanasia of animals, blood was collected without the use of blood thinners through cardiac puncture in mice. After 10 minutes of collecting, the tube containing the blood sample was then centrifuged at 5,000 rpm for 03 minutes for serum separation and red part of the blood; the serum was placed in a new tube, and storing at a temperature of -80° C until their use.

The reaction for detection of alkaline phosphatase levels follows the following steps: the buffer (DEA) is prepared and incubated for a few minutes. While incubation occurs in ELISA plate, put 2  $\mu$ l of the sample in each well of the plate and to this is added 200  $\mu$ l of reagent only previously incubated.

The absorbance is done at a wavelength 405nm to 37° C, in the period from 03 minutes and 20 seconds, starting reading 20 seconds after beginning of the reaction, with other readings in 1, 2 and 3 minutes after the first reading, the calculation is made by absorbance of alkaline phosphatase (UI) to 405 nm  $\Delta$  Amin x 5,460. The values are determined from the difference of the average Absorbânciamin ( $\Delta$  Amin), subtracting each previous reading and the values averaged.

## Histological Analysis

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Were performed standard procedures and preparation of the material, including the decalcification of bone to allow the histological cut. After all the preparation, cuts were made with 5  $\mu\text{m}$  of thickness in LEICA microtome RM 2125 RT. The samples in the slides were stained with hematoxylin-Eosin (H E) for analysis of cellular structures.

### Statistical Analysis

The data were described in mean values with the respective standard deviations. Were analyzed in both their absolute values as their variation in percentage, from the values obtained in the biomechanical and biochemical analyses. For the parametric data, ANOVA test was used with (post-hoc Tukey-Kramer). The statistical significance level  $p < 0.05$ .

## 4- RESULTS

As commented previously, after the induction of bone stores and the various treatments, the bones and the blood were used for biochemical analyses, and histological tests of flexion. From the histological slides were obtained the following images.

### FIGURE 2

In Figure 2A we can observe a cross-section of tibia indicating the region (1), the Medullary region (2) and the presence of osteocytes (black arrow) and endosteal (red arrow).

In Figure 2B, we can observe a histological cut of the group where the injury was induced and no treatment was not performed. In this image we can still observe the presence of callus (red arrow), next another region with bone disorganization (black arrow) and the presence of bone cartilage will be replaced by mature tissue.

In Figure 2 we see a more organized bone tissue with the presence of canals of Havers (black arrow), osteocytess (circle) and a few fragments of activated carbon used in treatment (red arrow).

1 In Figure 2D is possible to observe the tissue also organized, with the  
2 presence of several canals of Havers (black arrow) and mature bone tissue formation  
3 (red arrow). We can also observe the presence of osteocytes (circle) distributed more  
4 homogeneously, as shown in Figure 9.

5  
6 In Figure 2E shows the presence of osteocytes (circle) and Havers canals  
7 (black arrow). We can still observe the replacement of cartilage by bone tissue ripe  
8 (red arrow) and the replacement of the calluses primary to secondary callus (blue  
9 arrow).

10  
11 In Figure 2F, is presented the graph levels of alkaline phosphatase in the  
12 blood of animals, during the process of bone repair. All groups showed increased  
13 alkaline phosphatase when compared to the control group. The Group injured and  
14 treated with activated carbon presented a significant reduction when compared to the  
15 untreated group.

16  
17 In Figure 3A observe the maximum bending shape chart at the time of bone  
18 rupture. We can see in this graph that all groups showed a reduction of the maximum  
19 bending strength compared to the control group. The group treated with active  
20 carbon increased this strength when compared to the untreated group. On the  
21 contrary, the group treated with hydroxyapatite reduction of this power, even when  
22 compared to the untreated group.

23  
24 In Figure 3B observe the maximum displacement reached at the time of  
25 rupture. None of the groups where the bone store was induced showed no change of  
26 this offset.

27  
28 In Figure 3 we noted the relationship between the graphics presented in  
29 Figure 13 and 14. In this graph we can see that the untreated group showed a shift to  
30 the left, indicating a lower bending force. The group treated with activated carbon  
31 presented a position closer to the healthy tissue (CTL). The HA has an offset to the  
32 right, however, with reduction of bending force.

## 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 **5- DISCUSSION**

46  
47 Bone alterations as eou bone resorption fractures often lead to a long and  
48 painful recovery process. There is a great interest in getting treatments that help the  
49 bone repair and promote a faster recovery for the patient to their normal daily  
50 activities.

51  
52 On fracture and during the bone reconstruction patients are usually  
53 hospitalized in order to re-establish the correct function of the injured bone and  
54 regardless of the affected body part, this process of bone reconstruction may last for  
55 several days of hospitalization to months or years of recovery of normal bone  
56 function and in some cases more than one procedure are necessary for the correct  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 establishment of bone integrity (NAGAPPAN, 2007; CROSS; ZAPATA; WOLFORD;  
2 RUSTEMEYER, 2011).

3  
4 In this work, we picked a bone lesion model made from a surgical drill and in  
5 this place of injury, called bone store, activated carbon was used as biomaterial for  
6 bone repair capacity. It was also used as a low level laser therapy help in the  
7 inflammatory phase in association with the use of activated carbon.  
8  
9

10 As commented previously, the activated carbon presents some interesting  
11 properties for its use in the medical field. First, it is formed by a large number of pores  
12 of different diameters and an optimized surface causing this product present  
13 interaction with external compounds, for example, on pollutant adsorption,  
14 pharmaceuticals, and in this case, stimulating bone repair, probably serving as a  
15 catalyst for physical cellular proliferation. Already the hydroxyapatite was used as  
16 biomaterial for being a substance known by health professionals for the promotion of  
17 bone grafts, aiding in bone repair.  
18  
19

20 Bone healing was analyzed 28 days after injury were measured and bone  
21 alkaline phosphatase levels, histologic pattern and mechanical properties as the  
22 maximum flexion force at the time of rupture and the deformation capacity described  
23 by tissue displacement values in mechanical testing machine.  
24  
25

26 Regarding the choice of our methods, there are few jobs that relate  
27 biochemical and histological changes with changes of mechanical properties during  
28 bone repair (birth; KAZEM, 2010).  
29  
30

31 From these results it was possible to observe an improvement in bone repair  
32 when using activated carbon. On the contrary, in the Association of activated carbon  
33 with laser therapy or the use of hydroxyapatite, the bone tissue showed lower  
34 resistance to bending forces during biomechanical test, despite showing trend in  
35 reduction of alkaline phosphatase and histological aspects that indicate bone repair  
36 at different levels.  
37  
38

39 It is known that Illt can aid bone repair in small animals (BIRTH, 2010) and this  
40 improvement would be related, for example, to increased levels of calcitonin  
41 (KAZEM, 2010).  
42  
43

44 However, when we think about clinical application of Illt are faced with different  
45 irradiation parameters that hinders their standardization and clinical indication. Thus,  
46 the concern with the dosimetry is fundamental to define parameters of irradiation safe  
47 and effective in the use of low-intensity laser (MESTER, 2013; TUBY et al, 2013;  
48 ALVES et al., 2013).  
49  
50

51 In this work we use the low-power laser 830nm with 6 Energy Joules, power of  
52 100mW and irradiation time of 60 seconds. These parameters have already been  
53 used in previous works in that from the 28th day after the induction of injury was  
54 observed a repair process in advance, with the presence of callus mature and  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 complete formation of the bone before injured, leaving only the resumption of the  
2 initial architecture. (PALLOTTA, 2014).

3  
4 Another important factor of bone repair is in the relationship between alkaline  
5 phosphatase levels with the deposition of hydroxyapatite in the bone. The gradual  
6 deposition of hydroxyapatite on extracellular matrix is a normal step that interferes  
7 with the activity of osteocitos and change the deposition and bone resorption. In this  
8 sense, the alkaline phosphatase has a fundamental role, because hydrolyses the  
9 pyrophosphate and provides inorganic phosphate (ORIMO, 2010).

10  
11  
12 After the harmful process, alkaline phosphatase levels increase gradually until  
13 it reaches its peak at the end of the 2nd week. From there, bone formation is reduced  
14 being replaced in part by bone remodeling and alkaline phosphatase levels return to  
15 physiological levels, required only for bone maintenance.

16  
17  
18  
19  
20  
21 Thus, the low-power laser therapy can stimulate the production of alkaline  
22 phosphatase by osteoblasts in the early stages of harmful process, changing the time  
23 of bone repair (DA SILVA, 2011; SARACINO, 2009).

24  
25  
26 Under phone, Illt can act on bone repair by inhibiting recruitment of  
27 osteoprogenitor cells and increasing the activation of osteoclasts, decreasing the  
28 deposition of extracellular matrix and stimulating the bone remodeling.

29  
30  
31 The histological results provided us with important information on the  
32 progression of bone repair in different treatments. In CTL group, as expected, the  
33 osteocytes are distributed in homogeneous way throughout the mature bone tissue  
34 and there is a division between the cortical and Medullary layer, with the presence of  
35 endosteos in this demarcation. In the NT group was observed even with osseous  
36 resorption areas, as well as transition regions of primary to secondary bone. This  
37 result, in conjunction with the increased levels of alkaline fostatase shows that the  
38 injury is still in the process of bone formation. The reduction in the strength of  
39 bending in the NT group only confirms the presence of a still fragile fabric that walks  
40 more slowly for bone repair.

41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49 The histological findings of the CA group shows an early repair process. It is  
50 possible to observe the presence of Havers canals and osteocytess distributed over  
51 a bone tissue organized and homogeneous. To reduce the levels of alkaline  
52 phosphatase suggests that there is a smaller local bone deposition, and depending  
53 on the stage that the repair is, its reduction can modulate the phase of bone  
54 remodeling is by slow or accelerate the bone repair (DA SILVA, 2011; SARACINO,  
55 2009). In this case, the reduction of the levels of alkaline phosphatase in the CA  
56 Group suggests an improvement in the repair process, which affirmed by  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 improvement in flexural maximum strength. This whole scenario suggests that the  
2 activated carbon presents characteristics that favor their use as bone substitute.

3  
4 These histological aspects favorable for bone repair are also found in the  
5 CA+L group where you can see the layout of both osteocytes and homogeneous  
6 Havers canals. However, the alkaline phosphatase levels were not reduced  
7 significantly compared to NT group, being away from the normal levels found in  
8 the CTL. Bending strength also showed altered, with values near the NT group, but  
9 with a larger deformation capacity, observed by increasing the offset in relation to the  
10 NT group.  
11  
12

13  
14 LLLT is known for its modulating action, changing the cellular response and  
15 reducing the inflammatory process. The laser can still increase bone resorption,  
16 slowing the process of tissue repair, who factor can promote the readjustment of the  
17 original bone formation (SIMUNOVIFA, 2010; PALLOTTA, 2011).  
18  
19

20  
21 Treatment with Hydroxyapatite (HA) also presented a speed slower repair,  
22 with the presence of transition still regions between bone and cartilage of the mature  
23 bone tissue and reducing the maximum strength for flexion values still smaller than  
24 the NT group. in the initial phase of the lesion (inflammatory phase) is observed  
25 intense inflammatory infiltrate with its cellular necrosis. This scenario is reversed 2  
26 weeks after a harmful process, when intense formation and deposition of  
27 hydroxyapatite. The results found in the HA suggests that perhaps the presence of  
28 larger amounts of hydroxyapatite reduce alkaline phosphatase activity at some point,  
29 damaging the appropriate bone in repair process time studied.  
30  
31  
32  
33

34  
35 Our results showed that the treatments used for different groups (CA, CA+L  
36 and HA) alter the morpho-functional bone repair course, accelerating the repair  
37 process in the CA group or reducing this process in HA. However, it would be  
38 important to evaluate the histological, biochemical and biomechanical behavior of  
39 laser alone.  
40

41  
42 Another limitation of this work would be the need to include a group of exclusive  
43 treatment with low level laser, in order to assess its interference outside the isolated  
44 bone repair.  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52

## 53 54 **6-CONCLUSION** 55

56  
57  
58 From the results and the theoretical ramming presented here, we can conclude that  
59 the bone lesion model used in this paper has reduced some mechanical properties  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 by bending force reduction, by increasing levels of alkaline phosphatase and the  
2 scenario presented in the histological analysis with presence of a disorganized bone  
3 tissue and bone repair delay.

4  
5 Treatment with activated carbon showed an improvement in bone repair process.

6  
7 The group where there was an association between the use of activated carbon and  
8 laser irradiation, rebounded, however with histological reduction in bending strength.  
9 Treatment with hydroxyapatite presented a repair quality less than the other  
10 treatments.  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44

#### 45 7- REFERENCES

46  
47  
48  
49 AHMEDNA M, MARSHALL WE. Surface properties of granular activated carbons  
50 from agricultural by-products and their effects on raw sugar decolorization,  
51 Bioresource Technology, Volume 71, Issue 2, January 2000,103-112,  
52

53  
54  
55  
56 AI-AQL ZS, ALAGL AS, GRAVES DT, GERSTENFELD LC, EINHORN TA. Molecular  
57 mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction  
58 osteogenesis. J Dent Res. 2008 Feb;87(2):107-18.  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2 BASFORD J R, SHEFFIELD C G, CIESLAK K R. Laser therapy: a randomized,  
3 controlled trial of the effects of low intensity Nd:YAG laser irradiation on lateral  
4 epicondylitis. Arch Phys Med Rehabil. 2000 Nov;81(11):1504-10.  
5  
6  
7

8  
9  
10 BASHARDOUST TAJALI S, MACDERMID JC, HOUGHTON P, GREWAL R. Effects  
11 of low power laser irradiation on bone healing in animals: a meta-analysis. J Orthop  
12 Surg Res. 2010 Jan 4.  
13  
14

15  
16  
17 BOYCE BF, LI P, YAO Z, ZHANG Q, BADELL IR, SCHWARZ EM, O'KEEFE RJ,  
18 XING L. TNF-alpha and pathologic bone resorption. Keio J Med. 2005  
19 Sep;54(3):127-  
20

21  
22 31. Review.  
23  
24

25  
26  
27 BJORDAL J M, JOHNSON M I, IVERSEN V V, AIMBIRE F, LOPES-MARTINS R A.  
28 Photoradiation in acute pain: a systematic review of possible mechanisms of action  
29 and clinical effects in randomized placebo-controlled trials. Photomed Laser Surg.  
30 2006 Apr;24(2):158-68.  
31  
32

33  
34  
35 BJORDAL J M, JOHNSON M I, LOPES-MARTINS R A, BOGEN B, CHOW R,  
36 Ljunggren A E. Short-term efficacy of physical interventions in osteoarthritic knee  
37 pain. A systematic review and meta-analysis of randomised placebo-controlled trials.  
38 BMC Musculoskelet Disord. 2007 Jun 22;8:51. Review.  
39  
40

41  
42  
43  
44 BJORDAL J M, KLOVNING A, LOPES-MARTINS R A, ROLAND P D, JOENSEN J,  
45 SLØRDAL L. Overviews and systematic reviews on low back pain. Ann Intern Med.  
46 2008 May 20;148(10):789-90; author reply 791-2.  
47  
48

49  
50  
51 BJORDAL J M, LOPES-MARTINS R A, IVERSEN V V. A randomised, placebo  
52 controlled trial of low level laser therapy for activated Achilles tendinitis with  
53 microdialysis measurement of peritendinous prostaglandin E2 concentrations. Br J  
54 Sports Med. 2006 Jan;40(1):76-80; discussion 76-80.  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 FERRAZ FH, SCHELLINI SA, SCHELLINI RC, PELLIZON CH, HIRAI FE,  
2 PADOVANI CR. BMP implant associated with platelet-rich plasma in orbit fracture  
3 repair. *Curr Eye Res.* 2008 Mar;33(3):293-301.  
4

5 GÖNEN N, KÖRPE E, YILDIRIM ME, SELENGİL U. Leaching and CIL processes in  
6 gold recovery from refractory ore with thiourea solutions, *Minerals Engineering,*  
7 *Volume 20, Issue 6, May 2007, Pages 559-565.*  
8  
9

10  
11  
12 GUO X, WANG XF. Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other  
13 pathways. *Cell Res.* 2009 Jan;19(1):71-88.  
14

15  
16 HADJIARGYROU M, LOMBARDO F, ZHAO S, AHRENS W, JOO J, AHN H,  
17 JURMAN M, WHITE DW, RUBIN CT. Transcriptional profiling of bone regeneration.  
18 Insight into the molecular complexity of wound repair. *J Biol Chem.* 2002 Aug  
19 16;277(33):30177-82. Epub 2002 Jun 7.  
20  
21

22  
23 HAZEKI O, TAMURA M. Near infrared quadruple wavelength spectrophotometry of  
24 the rat head. *Adv Exp Med Biol.* 1989;248:63-9.  
25  
26

27  
28  
29 HAK DJ, SCHULZ KS, KHOIE B, HAZELWOOD SJ. The effect of Cox-2 specific  
30 inhibition on direct fracture healing in the rabbit tibia. *J Orthop Sci.* 2011  
31

32  
33 Jan;16(1):93-8. Epub 2011 Jan 25. PubMed PMID: 21264481.  
34  
35

36  
37 HU Z, PEEL SA, HO SK, SÁNDOR GK, CLOKIE CM. Platelet-rich plasma induces  
38 mRNA expression of VEGF and PDGF in rat bone marrow stromal cell differentiation.  
39 *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009 Jan;107(1):43-8. Epub  
40 2008 Aug 28.  
41  
42

43  
44 HONMURA A, ISHII A, YANASE M, OBATA J, HARUKI E. Analgesic effect of Ga-Al-  
45 As diode laser irradiation on hyperalgesia in carrageenin-induced inflammation.  
46 *Lasers Surg Med.* 1993;13(4):463-9.  
47  
48

49  
50 KARU T I. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser  
51 irradiation *Dokl Akad Nauk SSSR.* 1986;291(5):1245-9.  
52  
53

54  
55 KAZEM SHAKOURI S, SOLEIMANPOUR J, SALEKZAMANI Y, OSKUIE MR. Effect  
56 of low-level laser therapy on the fracture healing process. *Lasers Med Sci.* 2009 Apr  
57 28.  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

therapy on expression of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  in skeletal muscle during the repair process. *Lasers Med Sci.* 2011 May;26(3):335-40.

NASCIMENTO SB, CARDOSO CA, RIBEIRO TP, ALMEIDA JD, ALBERTINI R, MUNIN E, ARISAWA EA. Effect of low-level laser therapy and calcitonin on bone repair in castrated rats: a densitometric study. *Photomed Laser Surg.* 2010 Feb;28(1):45-9.

NIKOLIDAKIS D, JANSEN JA. The biology of platelet-rich plasma and its application in oral surgery: literature review. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008

NISSAN J, ASSIF D, GROSS MD, YAFFE A, BINDERMAN I. Effect of low intensity laser irradiation on surgically created bony defects in rats. *J Oral Rehabil.* 2006 Aug;33(8):619-624.

OLMEDO ML, LANDRY PS, SADASIVAN KK, ALBRIGHT JA, MEEK WD, ROUTH R, MARINO AA. Regulation of osteoblast levels during bone healing. *J Orthop Trauma.* 1999 Jun-Jul;13(5):356-62.

ORIMO H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nihon Med Sch.* 2010 Feb;77(1):4-12. Review.

PALLOTTA RC, BJORDAL JM, FRIGO L, LEAL JUNIOR EC, TEIXEIRA S, MARCOS RL, RAMOS L, DE MOURA MESSIAS F, LOPES-MARTINS RA. Infrared (810-nm) low-level laser therapy on rat experimental knee inflammation. *Lasers Med Sci.* 2011 Apr 12.

PALLOTTA, RC. Evaluation of the effect of low level laser and plasma rich fibrin in bone repair in rats. Thesis USP – 2014. [www.teses.usp.br](http://www.teses.usp.br)

PENDYAL, M.M. JOHNS, W.E. MARSHALL, M. AHMEDNA, R.M. RAO. Removal of sugar colorants by granular activated carbons made from binders and agricultural by-products, *Bioresource Technology*, Volume 69, Issue 1, July 1999, 45-51, B.

PEREIRA AC, FERNANDES RG, CARVALHO YR, BALDUCCI I, FAIG-LEITE H. Bone healing in drill hole defects in spontaneously hypertensive male and female rats' femurs. A histological and histometric study. *Arq Bras Cardiol.* 2007 Jan;88(1):104-9.

1 PLACHOKOVA AS, VAN DEN DOLDER J, STOELINGA PJ, JANSEN JA. Early  
2 effect of platelet-rich plasma on bone healing in combination with an osteoconductive  
3 material in rat cranial defects. *Clin Oral Implants Res.* 2007 Apr;18(2):244-51.

4 PINHEIRO AL, LIMEIRA JÚNIOR FDE A, GERBI ME, RAMALHO LM, MARZOLA C,  
5 PONZI EA. Effect of low level laser therapy on the repair of bone defects grafted with  
6 inorganic bovine bone. *Braz Dent J.* 2003;14(3):177-81. Epub 2004 Mar 29. PubMed  
7  
8  
9

10 PINHEIRO AL, MARTINEZ GERBI ME, CARNEIRO PONZI EA, PEDREIRA  
11 RAMALHO LM, MARQUES AM, CARVALHO CM, SANTOS RDE C, OLIVEIRA PC,  
12 Nôia M. Infrared laser light further improves bone healing when associated with bone  
13 morphogenetic proteins and guided bone regeneration: an in vivo study in a rodent  
14 model. *Photomed Laser Surg.* 2008 Apr;26(2):167-74.  
15  
16  
17  
18

19 PIRES D, XAVIER M, ARAÚJO T, SILVA JA JR, AIMBIRE F, ALBERTINI R. Low-  
20 level laser therapy (LLL; 780 nm) acts differently on mRNA expression of anti- and  
21 pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced  
22 tendinitis in rat. *Lasers Med Sci.* 2011 Jan;26(1):85-94. PMID: 20737183.  
23  
24  
25  
26

27 RIBEIRO DA, MATSUMOTO MA. Low-level laser therapy improves bone repair in  
28 rats treated with anti-inflammatory drugs. *J Oral Rehabil.* 2008 Dec;35(12):925  
29  
30

31 RUSTEMEYER J, GREGERSEN J. Quality of Life in orthognathic surgery patients:  
32 Post-surgical improvements in aesthetics and self-confidence. *J Craniomaxillofac*  
33 *Surg.* 2011 Aug 22.  
34  
35  
36

37 RENNO AC, MCDONNELL PA, PARIZOTTO NA, LAAKSO EL. The effects of laser  
38 irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in  
39 vitro. *Photomed Laser Surg.* 2007 Aug;25(4):275-80.  
40  
41  
42

43 SANTOS JJ, AMIRANOFF F, BATON SD, GREMILLET L, KOENIG M, MARTINOLLI  
44 E, RABEC LE GLOAHEC M, ROUSSEAU C, BATANI D, BERNARDINELLO A,  
45 GREISON G, HALL T. Fast electron transport in ultraintense laser pulse interaction  
46 with solid targets by rear-side self-radiation diagnostics. *Phys Rev Lett.* 2002 Jul  
47 8;89(2).  
48  
49  
50

51 SALGADO CL, SANCHEZ EM, ZAVAGLIA CA, ALMEIDA AB, GRANJA PL.  
52 Injectable Biodegradable Polycaprolactone-Sebacic Acid Gels for Bone Tissue  
53 Engineering. *Tissue Eng Part A.* 2011 Sep 15.  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 STERGIOULAS A. Low-power laser treatment in patients with frozen shoulder:  
2 preliminary results. *Photomed Laser Surg.* 2008 Apr;26(2):99-105.  
3

4  
5  
6 SVAASAND LO. Biostimulation with low-intensity laser s--physics or metaphysics?  
7 *Nord Med.* 1990;105(3):72-5. Inst for fysikalsk elektronikk, Norges Tekniske  
8 Høgskole, Universiteti Trondheim.  
9

10  
11  
12 SUNITHA RAJA V, MUNIRATHNAM NAIDU E. Platelet-rich fibrin: evolution of a  
13 second-generation platelet concentrate. *Indian J Dent Res.* 2008 Jan-Mar;19(1):42-6.  
14

15  
16 SCHAFFER M, BONEL H, SROKA R, SCHAFFER P M, BUSCH M, REISER M,  
17 DÜHMKE E. Effects of 780 nm diode laser irradiation on blood microcirculation:  
18 preliminary findings on time-dependent T1-weighted contrast-enhanced magnetic  
19 resonance imaging (MRI). *J Photochem Photobiol B.* 2000 Jan;54(1):55-60.  
20  
21

22  
23  
24 STEIN E, KOEHN J, SUTTER W, WENDTLANDT G, WANSCHITZ F, THURNHER  
25 D, BAGHESTANIAN M, TURHANI D. Initial effects of low-level laser therapy on  
26 growth and differentiation of human osteoblast-like cells. *Wien Klin Wochenschr.*  
27 2008;120(3-4):112-7.  
28  
29

30  
31 SIMONPIERI A, DEL CORSO M, VERVELLE A, JIMBO R, INCHINGOLO F,  
32 SAMMARTINO G, DOHAN EHRENFEST DM. Current Knowledge and Perspectives  
33 for the Use of Platelet-Rich Plasma (PRP) and Platelet-Rich Fibrin (PRF) in Oral and  
34 Maxillofacial Surgery. Part 2: Bone Graft, Implant and Reconstructive Surgery. *Curr*  
35 *Pharm Biotechnol.* 2011 Jul 8.  
36  
37

38  
39  
40 SIMUNOVIFÁ-SOSKIFÁ M, PEZELJ-RIBARIFÁ S, BRUMINI G, GLAZAR I, GRZIFÁ  
41 R, MILETIFÁ I. Salivary levels of TNF-alpha and IL-6 in patients with denture  
42 stomatitis before and after laser phototherapy. *Photomed Laser Surg.* 2010  
43 Apr;28(2):189-93.  
44  
45  
46

47  
48  
49 TORRES CS, DOS SANTOS JN, MONTEIRO JS, AMORIM PG, PINHEIRO AL.  
50 Does the use of laser photobiomodulation, bone morphogenetic proteins, and guided  
51 bone regeneration improve the outcome of autologous bone grafts? An in vivo study  
52 in a rodent model. *Photomed Laser Surg.* 2008 Aug;26(4):371-7.  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 TUBY H, HERTZBERG E, MALTZ L, ORON U. Long-term safety of low-level laser  
2 therapy at different power densities and single or multiple applications to the bone  
3 marrow in mice. *Photomed Laser Surg*. 2013 Jun;31(6):269-73.

4  
5  
6 WALLACE A, COONEY TE, ENGLUND R, LUBAHN JD. Effects of interleukin-6  
7 ablation on fracture healing in mice. *J Orthop Res*. 2011 Sep;29(9):1437-42. doi:  
8 10.1002/jor.21367. Epub 2011 Mar 28.

9  
10  
11  
12  
13 WOLFORD LM, DHAMEJA A. PLANNING FOR COMBINED TMJ Arthroplasty and  
14 Orthognathic Surgery. *Atlas Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2011 Sep;19(2):243-  
15 70.

16  
17  
18  
19 ZHAO W, FIERRO V, ZLOTEA C, AYLON E, IZQUIERDO MT, LATROCHE M,  
20 CELZARD A. Optimization of hydrogen storage capacity onto activated carbons.  
21 *International Journal of Hydrogen Energy* 36 (2011) 11746-11751

22  
23  
24  
25 ZAPATA U, HALVACHS EK, DECHOW PC, ELSALANTY ME, OPPERMAN LA.  
26 Architecture and Microstructure of Cortical Bone in Reconstructed Canine Mandibles  
27 After Bone Transport Distraction Osteogenesis. *Calcif Tissue Int*. 2011 Sep 17.

28  
29  
30  
31 ZIMMERMANN CE, GIERLOFF M, HEDDERICH J, AUBIL Y, WILTFANG J,  
32 TERHEYDEN H. Biocompatibility of bone graft substitutes: effects on survival and  
33 proliferation of porcine multilineage stem cells in vitro. *Folia Morphol (Warsz)*. 2011  
34 Aug;70(3):154-60.

35  
36  
37  
38  
39  
40 ZHANG Y, TANGL S, HUBER CD, LIN Y, QIU L, RAUSCH-FAN X. Effects of  
41 Choukroun's platelet-rich fibrin on bone regeneration in combination with  
42 deproteinized bovine bone mineral in maxillary sinus augmentation: A histological  
43 and histomorphometric study. *J Craniomaxillofac Surg*. 2011 Jun 9.

44  
45  
46  
47  
48  
49 ZHANG S, MAO T, CHEN F. Influence of platelet-rich plasma on ectopic bone  
50 formation of bone marrow stromal cells in porous coral. *Int J Oral Maxillofac Surg*.  
51 2011 Sep;40(9):961-5. Epub 2011 May 18.

Title Page

Effect of low level laser associated with activated carbon in bone repair of rats

Sampaio ABA; Lopes-Martins RAB; Pallotta RC; Celzard A; Fierro V; Leal-Junior EC;  
Labat-Amaral G; Lens G; Marcos RL

University of Nove de Julho

ICB – University of São Paulo

Poli – University of São Paulo

Université de Lorraine