

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

Fernando Gredinare Foster

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

São Paulo, SP

2015

FERNANDO GREDINARE FOSTER

EFEITO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA ASSOCIADO
AO USO DE FELTRO 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.

Orientador: Rodrigo Labat Marcos

São Paulo, SP
2015

Foster, Fernando Gredinare.

Efeito do laser de baixa potência associado ao uso de feltro ativado no processo de reparo ósseo em tíbia de ratos./ Fernando Gredinare Foster, 2015.

54 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2015.

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

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

I. Marcos, Rodrigo Labat. II. Título

CDU 615.831

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todas as pessoas que ajudaram de forma direta ou indireta para sua composição.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, meu pai Fábio Foster *in memoriam* que me ensinou valores importantes para minha formação acadêmica e social, me mostrou o caminho instaurando a dúvida e me auxiliando nas soluções de muitos problemas, agradeço a minha mãe Vera Lúcia Gredinare Foster pela formação do caráter e por toda sua paciência carinho e tempo dedicados nesses anos todos, agradeço aos meus irmãos Fábio Gredinare Foster e Eduardo Gredinare Foster pelos exemplos passados todos esses anos, onde mesmo que de forma inconsciente me mostraram o melhor caminho a trilhar, e um agradecimento especial a minha irmãzinha Renata Gredinare Foster por anos de paciência comigo, obrigado Renatinha.

Agradeço a minha esposa Marta Alexandra Andrino Romão Foster por todo amor, paciência e dedicação comigo nessa fase de nossas vidas, agradeço imensamente tudo que ela fez por mim. Muito obrigado.

Agradeço ao meu orientador Rodrigo Marcos Labat por toda paciência e dedicação nesse trabalho, seus ensinamentos foram de suma importância para a conclusão desse trabalho, muito obrigado por toda atenção que teve comigo.

Agradeço ao Romildo Torres pela paciência e ajuda, obrigado pelas horas em que me ajudou.

Lista de Abreviaturas

CTL - Controle

NT - Lesão não tratado

AF - Lesão tratado com feltro ativado

AF+L - Lesão tratado com associação do feltro ativo e laser 6J.

TGF- β – Fator de transformação β

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- α - Fator de necrose tumoral α

BMP-3 - Proteínas morfogenética 3

BMP-4 - Proteínas morfogenéticas 4

BMP-7 - Proteínas morfogenéticas 7

BMP-8 - Proteínas morfogenéticas 8

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

cm² - Centímetro quadrado

J – Joule

J/cm² - Joules por centímetro quadrado

N – Newton

RPM – Rotações Por Minuto

ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

μ L - 10⁻⁶ Litros

F_{max} - Força de ruptura máxima

D_{max} - Descolamento no momento da ruptura máxima

AsGaAl - Arseneto de Gálio e Alumínio

ANOVA - análise de variância

® - Marca Registrada

% - Porcento

H E – Hematoxilina eosina

λ - Comprimento de onda

μ m – Micrometros

RESUMO

Foster, FG. *Efeito do laser de baixa potência associado ao uso de feltro ativado no processo de reparo ósseo em tíbia de ratos /Fernando gredinare foster, 2015.*

Lesões ósseas são difíceis de serem tratadas e dependendo do grau da lesão, a intervenção cirúrgica é um dos tratamentos utilizados. Neste caso, o uso de substitutos ósseos pode ser necessário. A terapia com laser de baixa potência também é indicada como terapia auxiliar, pela sua importante ação analgésica e de reparo. Porém, pouco se sabe a respeito da interação entre biomateriais e laserterapia. O objetivo deste trabalho foi verificar o uso do feltro ativado como substituto ósseo e a interação com a laserterapia de baixa potência no processo de reparo ósseo em tíbias de ratos, analisando aspectos histológicos, bioquímicos e biomecânicos. Material e Métodos: Foram utilizados 35 ratos wistar, entre 150g à 200g, com 3 meses de idade. Depois de anestesiados, os animais foram colocados em mesa cirúrgica, a pele foi dissecada e o defeito ósseo monocortical foi confeccionado na região central da tíbia direita dos animais. Imediatamente após a cirurgia os ratos foram randomizados e organizados nos seguintes grupos: Controle (CTL), Lesão não tratado (NT), Lesão tratado com feltro ativado (AF), Lesão tratado com Laser (L6J) e Lesão tratado com associação do feltro ativado e laser 830nm, 6J – 100mW (AF+L). Após 28 dias os animais foram eutanasiados, o sangue foi coletado e a tíbia removida para análises histológicas e biomecânicas. Resultados: O grupo NT apresentou redução do reparo ósseo traduzido pela baixa organização histológica e redução da resistência mecânica. O grupo AF apresentou aumento da capacidade de deformação enquanto que o grupo L apresentou melhor organização histológica. O grupo AF+L apresentou melhora na resistência mecânica. Concluimos que o laser associado ao uso do feltro de carbono ativado auxiliou o reparo ósseo no modelo de lesão em tíbia de ratos

Palavras-chave: Reparo Ósseo, Laser de Baixa Potência, Feltro Ativado, Propriedades Mecânicas.

ABSTRACT

Foster, FG. Low-power laser effect associated with the use of activated felt in the bone repair process in rat's tibia / **Fernando gredinare foster,** 2015.

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 felt 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 felt (AF), Lesion treated with lasertherapy (L6J) and Lesion treated with association of activated carbon felt and laser 830nm, 6J-100mW (AF+L). 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 group showed no L improve mechanical properties, whereas AF increase the strain in compare to CTL. AF+L group presented better flexion forces, related with improvement of histological aspects, however increased the alkaline phosphatase levels. Conclusion: the use of activated carbon felt seems to improve the bone repair induced in this study. The laser association with activated carbon felt showed improvement of biomechanical properties and still the histological results have a better aspect.

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

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	01
1.1. EPIDEMIOLOGIA DAS FRATURAS E/OU DEFEITOS ÓSSEOS	01
1.2 FORMAÇÃO ÓSSEA.....	01
1.3 FRATURAS ÓSSEAS	02
1.4. TRATAMENTOS PARA LESÕES ÓSSEAS.....	02
1.5 FIBRA DE CARBONO ATIVADA.....	03
1.6 LASER DE BAIXA POTÊNCIA.....	03
1.7 O LASER COMO TERAPIA ANTI-INFLAMATÓRIA	04
1.8 AÇÃO DA IRRADIAÇÃO DA LUZ LASER SOBRE TECIDO ÓSSEO.....	05
2. OBJETIVOS.....	08
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	09
3.1 ANIMAIS.....	09
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	09
3.3 DEFEITO ÓSSEO	10
3.4 PROTOCOLO DE TRATAMENTO	10
3.5 ANÁLISE DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS ÓSSEA.....	11
3.6 QUANTIFICAÇÃO DE FOSFATASE ALCALINA	12
3.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA – MICROSCOPIA DE LUZ (ÓPTICA).....	13
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	13
4. RESULTADOS	14
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
7- ANEXOS.....	34
7.1 – Comitê de Ética Animal.....	35
7.2 – Artigo Submetido à <i>Lasers in Medical Sciences</i>	36

I- INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia das Fraturas e/ou Defeitos ósseos

Todos os anos cerca de 6,2 milhões de fraturas ósseas ocorrem somente nos EUA (SELLA, 2015). Embora o tecido ósseo tenha a capacidade de se curar sozinho (CLAES, 2007) de 5 – 10% dessas fraturas acabam tendo complicações na fase de reparo ósseo o que leva a um problema maior, resultando em altos custos com saúde. (EINHORN, 2015) Com isso a um aumento considerável na demanda clínica em busca de terapias para o bom reparo ósseo. (HOPPE, 2011).

Segundo o banco de dados do Sistema de Internações Hospitalares do Sistema Único de Saúde de Saúde (SIH/SUS), as fraturas resultaram em quase 280.000 internações que ocorreram no ano de 2.000 (GAWRYSZEWSKI, 2004). O Sistema Único de Saúde realizou mais de 14 mil cirurgias osteomusculares em 2014, onde mais de 2 mil destas fraturas, foram realizadas por problemas na consolidação ou perda óssea. Entre 2012 - 2014 mais de R\$ 370 milhões foram gastos com procedimentos cirúrgicos. (DATASUS acessado em 05/2015).

A mediação de alguns agentes externos com a finalidade de modular e acelerar o reparo ósseo acabam se tornando atrativos, pois buscam um retorno mais rápido e uma reabilitação mais amena para o paciente. Alcançar essa meta é o objetivo principal, porém ainda se faz necessário um melhor entendimento nas etapas correlacionadas do reparo das fraturas e de como elas contribuem para a funcionalidade biomecânica do osso (HADJIARGYROU, 2011).

1.2 Formação Óssea

O tecido ósseo é uma especialização do tecido conjuntivo, formado por células presentes na matriz extracelular, a diferenciação do tecido ósseo se dá pelo fato dele ter em sua composição uma grande quantidade de mineral e a matriz mineralizada com capacidade para confeccionar um tecido altamente resistente e duro, com as mais diversas funções, entre elas algumas de grande importância como a proteção do encéfalo e a proteção de outros órgãos vitais presentes na caixa torácica. (RUMI, 2003).

O desenvolvimento do processo de reparo ósseo é um processo complexo que leva tempo para se completar e envolve diversos elementos extracelulares, celulares e fatores de crescimento que ocorrem de maneira ordenada, onde o tecido ósseo sofre as mesmas modificações de seu crescimento natural. No momento em que há lesão tecidual e deformação na estrutura óssea a função vascular se altera resultando em extravasamento vascular e a ação de inúmeras células inflamatórias para o local lesionado (FÁVARO-PIPI, 2010; NICOLA, 2003).

1.3 Fraturas Ósseas

As fraturas ósseas podem ocorrer por diversos motivos, traumas diretos por armas de fogo, acidentes torções ou quedas, acarretando em lesão tecidual. A lesão tecidual acaba trazendo alguns problemas como: irritação nas terminações nervosas (dor), sangramentos, espasmos musculares e alteração estrutural em alguns casos. Defeitos ósseos que são resultados de malformações congênitas, traumas não corrigidos, leões extensos ou de sequelas cirúrgicas, como na remoção de tumores, tem sua correção com o uso de enxertos ósseos, próteses biocompatíveis e com o uso de substâncias indutoras de formação óssea (NIKOLADIKIS, 2008; SHINDELER, 2008).

1.4 Tratamentos para lesões ósseas

Existem várias terapias utilizadas no tratamento de lesões ósseas, entre elas, o ultrassom de baixa intensidade, cirurgias, imobilizações, uso de biomateriais. Mesmo o osso da tíbia tendo uma maior frequência de fraturas expostas, existe grande debate para o tratamento ideal (BHABDRAI, 2001).

O uso dos tratamentos e terapias nas fraturas e lesões busca uma maior rapidez no reparo ósseo. No início dos anos 50 o ultrassom de baixa intensidade começou a ser utilizado com a finalidade de redução da dor (GAM, JOHANNSEN, 1995). O enxerto ósseo como tratamento para lesão óssea também é utilizado, e tem ação estimulando e acelerando o processo de reparo ósseo (MIRANDA, 2005)

O bioossilicato é um biomaterial muito utilizado no auxílio de reparo ósseo, com propriedades que aceleram e potencializam a recuperação óssea modulando os processos inflamatórios (OLIVEIRA, 2012).

O Ultrassom, também é utilizado como tratamento para lesões ósseas, segundo (WANG, 2015) o uso de ultrassom mostrou um resultado positivo na regulação da diferenciação condrogênica.

1.5 Fibra de carbono ativado

As fibras de carbono ativado (FCA) podem ser entendidas como fios de feltro ativado, porém possuem características especiais quando comparadas com os carvões em pó ou granular, pois podem ser transformados em tecido, feltro ou qualquer outra forma têxtil. Além disso, a caracterização completa da fibra evidenciou sua estrutura de poros muito bem definida na área de microporos (Marcuzzo, 2014; Marcuzzo, 2013) favorecendo uma alta capacidade de adsorção (Solano & Amorós, 2008; Yoon & Koray, 2000).

Assim como os carvões ativados, as fibras de carbono 'ativado podem ser produzidas por meio do processo de pirólise seguida por oxidação térmica a temperaturas entre 700 e 1000°C (Carrott, 2001; Marcuzzo, 2012). O limitante na produção deste material está em sua matéria-prima, pois apesar da fibra de carbono ser considerada um material estratégico, a matéria-prima bem como a própria fibra, possui venda controlada para países em desenvolvimento como o Brasil.

Em alguns estudos são utilizados FCA produzidas a partir da poliacrilonitrila (PAN) têxteis de origem nacional. Este material de partida não possui qualidade para ser transformado em fibra de carbono aplicável em setores estratégicos, como a aeronáutica, pois a matéria prima precursora é têxtil, não possuindo grau de pureza e rigor de fabricação necessário para sua transformação em fibra estrutural. Por outro lado, a PAN têxtil nacional apontou características interessantes após a sua transformação em fibra de carbono ativada, pois apresentou alta fração de microporos e elevada capacidade adsortiva (Marcuzzo, 2014).

1.6 Laser de Baixa Potência

A palavra LASER é um acrônimo e deriva de Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, ou Amplificação da luz por emissão estimulada de radiação. (LEE SJ, 2000). A emissão da luz de laser ocorre em uma estrutura composta por espelhos. Dentro dessa estrutura os átomos são ativados pela eletricidade (ROSA, 2009).

O LASER é uma luz com algumas características únicas como a igualdade das energias entre os fóton estimulante e o fóton emitido garantindo a composição de apenas um comprimento de onda tornando a luz LASER monocromática, diferente da luz incandescente formada por vários comprimentos de onda fazendo a luz incandescente se perder no tempo e espaço. A luz de LASER também tem a capacidade de variar sua potencia podendo alcançar ordens de tera watt(10¹²W) permitindo uma enorme intensidade. As ondas que formam a luz de LASER são unidirecionais, essa propriedade é garantida pelo movimento das ondas no mesmo sentido. A coerência, outra propriedade das luz de LASER, ocorre quando as ondas se deslocam no espaço e tempo de forma ordenada. (MOURA,2009; BERTOLOTTI, 1983).

No início dos 60, onde se deu início o uso da luz LASER como terapia na medicina, diversos estudos foram realizados com o intuito de elucidar o desempenho dos equipamentos sobre os tecidos biológicos. (MCDAVID, V. G,2001). No Brasil o LASER teve seu início cerca de 20 anos depois se comparado a Europa e Estados unidos, os primeiros trabalhos Brasileiros nestas área são da segunda metade da década de 80. (DE CASTRO ET AL, 2001).

1.7 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 (BASFORD, 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).

1.8 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 β e TNF- α , 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).

Muitos grupos estudam os efeitos da aceleração do reparo ósseo causado pela fototerapia. Otimizar esse processo, de reparo ósseo, pode representar um grande benefício, pois, melhora a situação pós operatória do paciente; minimizando o tempo da recuperação e das sessões de reabilitação, gerando menores perdas financeiras à economia já que viabiliza ao paciente um retorno mais rápido a suas atividades diárias (LOPES MARTINS, 2006; TORRES, 2008; STEIN, 2008; PINHEIRO, 2008; KAZEM, 2009; BLAYA, 2008).

2- OBJETIVO:

Avaliar alterações histológicas e biomecânicas durante o processo de reparo ósseo em tíbias de ratos após indução de lesão e o uso de feltro ativado associado ou não com laser de baixa potência neste reparo.

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 sendo respeitado o ciclo claro/escuro de 12 horas.

3.2 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em 4 grupos de 07 animais cada e submetidos aos tratamentos, conforme especificado na figura abaixo:

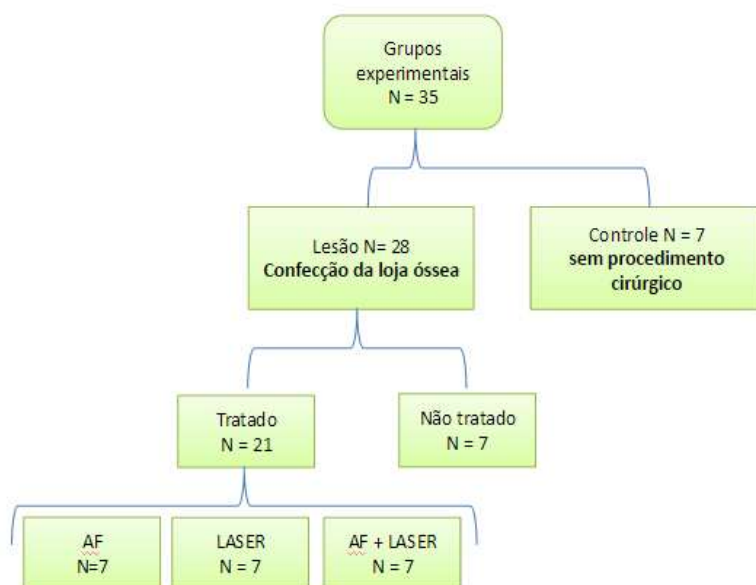


Figura 1: Grupos experimentais

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.

AF – Grupo com loja óssea e utilização de feltro ativado

L – Grupo com loja óssea e utilização Laser (830nm, 6J, 100mW, 60 segundos)

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

3.3 Defeito ósseo

Os animais foram submetidos a um processo cirúrgico para indução da loja óssea, foram anestesiado com Quetamina (90mg/Kg) e Xilazina (10mg/Kg) e fixados em mesa de cortiça. Após anestesiados e fixados foi realizada uma incisão sobre o osso na região pósterio-lateral da tíbia direita, para acessar o osso foi realizada a separação dos planos subcutâneos e musculares, e a realização da loja óssea a 04mm abaixo da articulação do joelho utilizando uma broca com 05mm de comprimento e 1.3 mm de espessura (PALLOTTA, 2014).

Após a realização da loja óssea os animais do grupo AF, receberam o feltro ativado na região interna da loja óssea. Os animais do grupo AF+L receberam o feltro e foram irradiados com LASER de baixa potência imediatamente. Após este processo, os animais foram suturados e retornados às caixas. (Comitê de ética AN0046/2014).

O feltro ativado foi esterilizado em autoclave e recortados mantendo área padrão de 25mm² e aplicação na região da loja óssea até a cobertura total do defeito induzido pela broca cirúrgica.



Figura 2: Defeito ósseo induzido pela broca cirúrgica (Sampaio, ABA; 2014)

3.4 Protocolo de tratamento

Foi utilizado o Laser Diodo de Baixa Intensidade, com os seguintes parâmetros descritos abaixo:

λ (nm)	Diodo	P (mW)	\varnothing (cm ²)	DP (W/cm ²)	E (J)	DE (J/cm ²)	t (s)
830	AsGaAl	100	0.028	3.5	6	204,28	60

Tabela 1: Tabela com os parâmetros da irradiação laser. λ = comprimento de onda, P= Potência, \varnothing = Diâmetro do feixe, DP= Densidade de Potência, E= Energia, DE= Densidade de Energia, t= Tempo.

O LASER foi irradiado sobre o osso, por um período de sete (7) dias intercalados após a indução da loja óssea (cirurgia). Assim que o protocolo experimental acabar, os animais foram eutanasiados com hiperdose de cloridrato de Xilazina (30mg/ml) e Cloridrato de quetamina (270mg/ml). Após o procedimento de eutanásia o osso tíbia foi removido e conservado para análises morfológicas e biomecânicas e o sangue coletado para análise de fosfatase alcalina.

3.5 Análise de propriedades mecânicas do osso

Depois de 28 dias da realização da lesão, os animais forma sacrificados e o osso da tíbia foi removido para análises de propriedades mecânicas. Parte desse material foi utilizado imediatamente após a retirada, em ensaios de flexão para avaliar as 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 foram 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.

Durante a padronização do ensaio de flexão, foi utilizada 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:

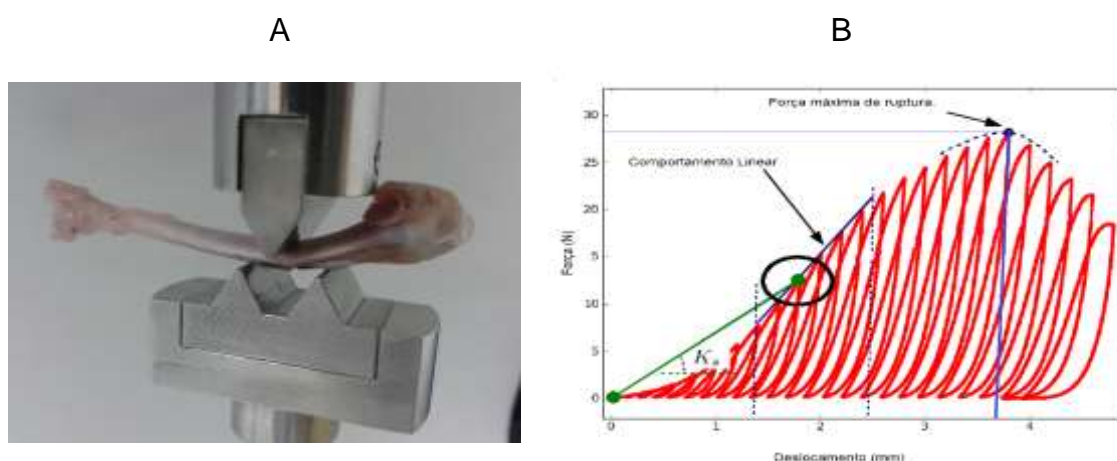


Figura 3: Ensaio de flexão em tíbia de ratos. (A) Dispositivo para ensaio de flexão em 3 pontos. (B) Curva típica de registro durante a aplicação das forças de carregamento e descarregamento. (Adaptado de Sampaio, ABA; 2014).

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

3.6 Quantificação de Fosfatase Alcalina

Antes da eutanásia dos animais, foi coletado sangue sem o uso de anticoagulante através da punção cardíaca nos animais. Após 10 minutos da coleta, o tubo contendo a amostra de sangue foi centrifugado a 5.000 rpm 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°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 2µl da amostra em cada poço da placa e a este é adicionado 200µl do reagente único, previamente incubado.

A absorbância é feita no comprimento de onda 405nm a 37°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 óptica (M.O)

As amostras do tecido foram fixadas em formol a 10% por um período de 72 horas. Posteriormente as amostras foram descalcificadas, 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 µm 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. Foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk para análise da normalidade. 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

Artigo submetido à revista “Lasers in Medical Sciences” (Qualis B1) com o título: “Effect of activated carbon fiber associated with lasertherapy on the bone healing process in rats tibia. Histological and biomechanical aspects”

4.1 Resultados histológicos:

A figura 4 representa uma imagem histológica transversal do grupo controle. Nesta imagem podemos observar a presença canais vasculares e osteócitos distribuídos de forma homogênea na região cortical e ainda uma porção da região medular.

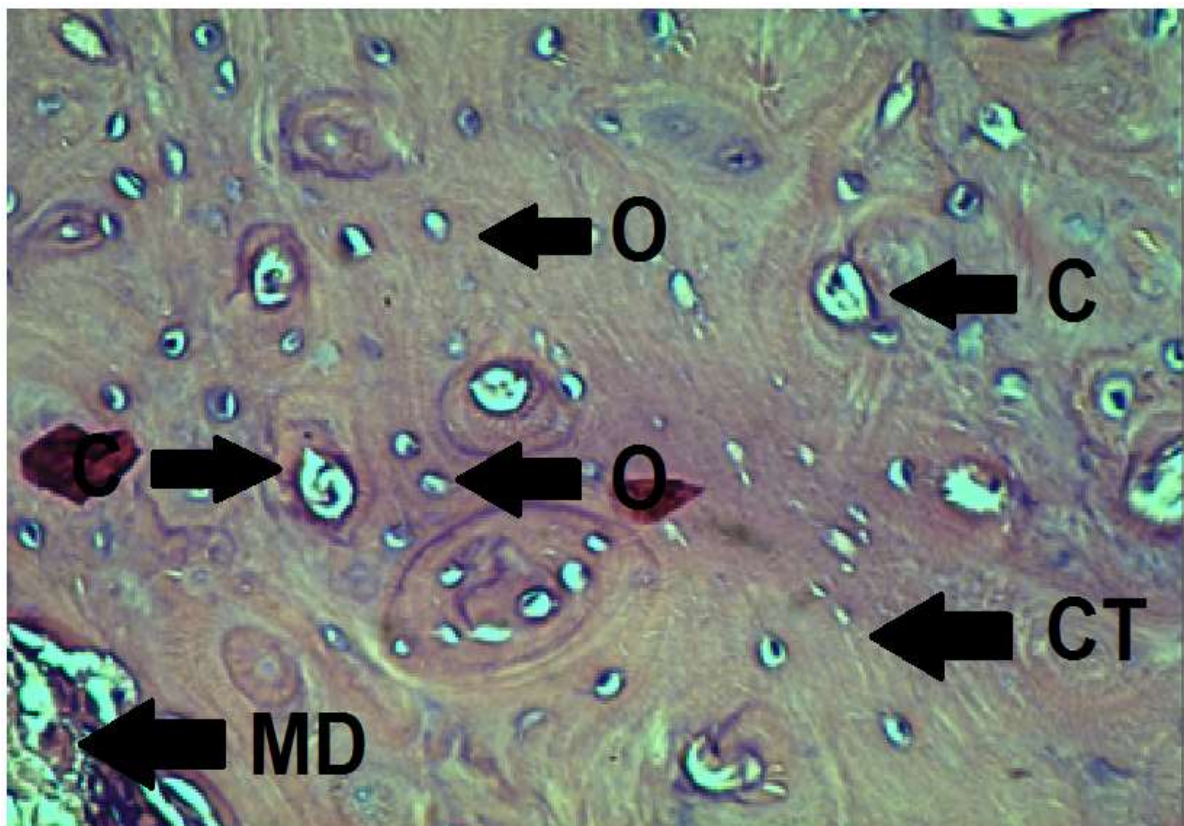


Figura 4: Corte histológico transversal da tíbia direita do grupo CTL. (400X). Região medular (MD) e cortical (CT) com presença de osteócitos (O) e canais vasculares (C).

A figura 5 representa o grupo com o defeito ósseo sem tratamento após 28 dias da lesão. Nesta imagem observamos que uma região cortical formou-se dentro da região medular. Observamos ainda região de formação óssea de transição e poucos osteócitos na região cortical.

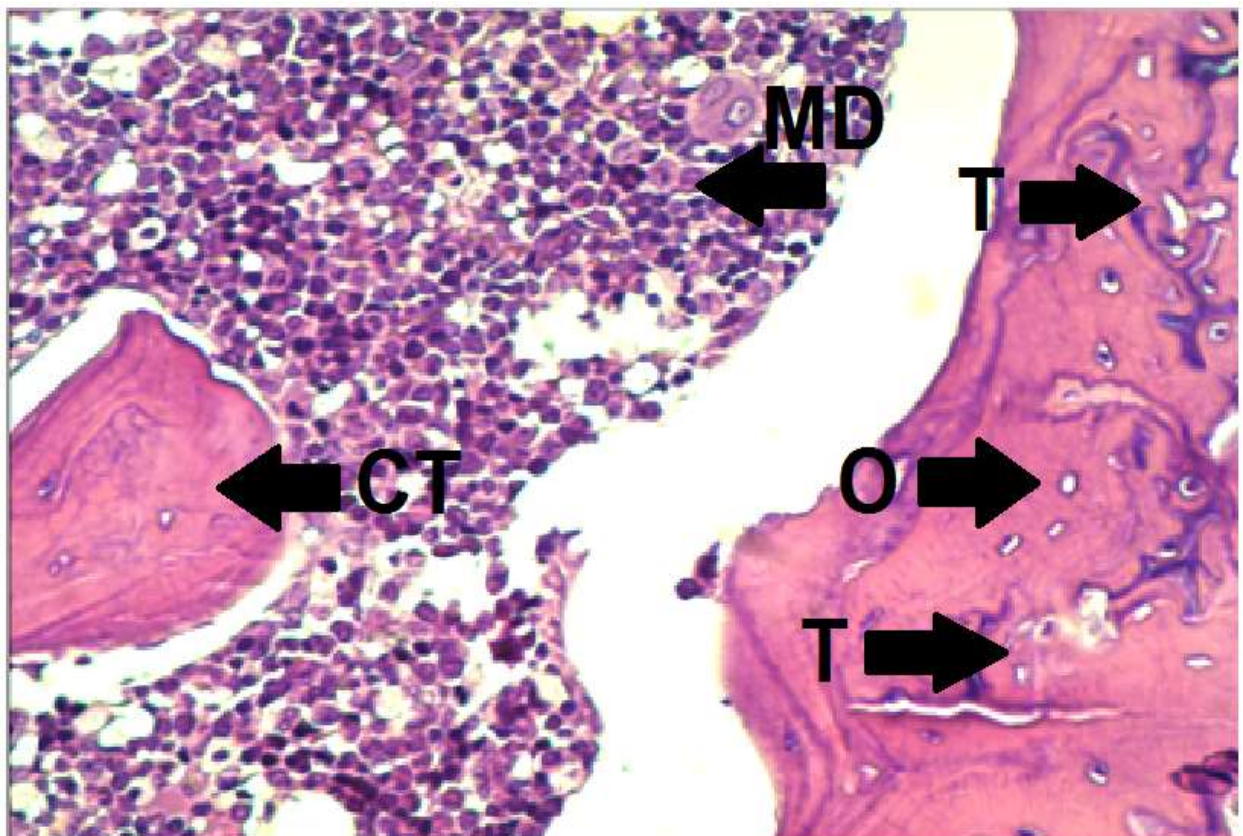


Figura 5: Corte histológico transversal da tíbia direita do grupo NT. (400X). Região medular (MD), cortical (CT), osteócitos (O) e região de transição entre tecido cartilaginoso e ósseo (T).

Na figura 6 podemos observar a imagem histológica da região do defeito ósseo onde foi utilizado o feltro ativado. É possível observar a região medular conservada e a região cortical com presença de canais vasculares e osteócitos distribuídos de forma regular. Observamos ainda a presença de regiões de transição durante a formação do tecido ósseo.

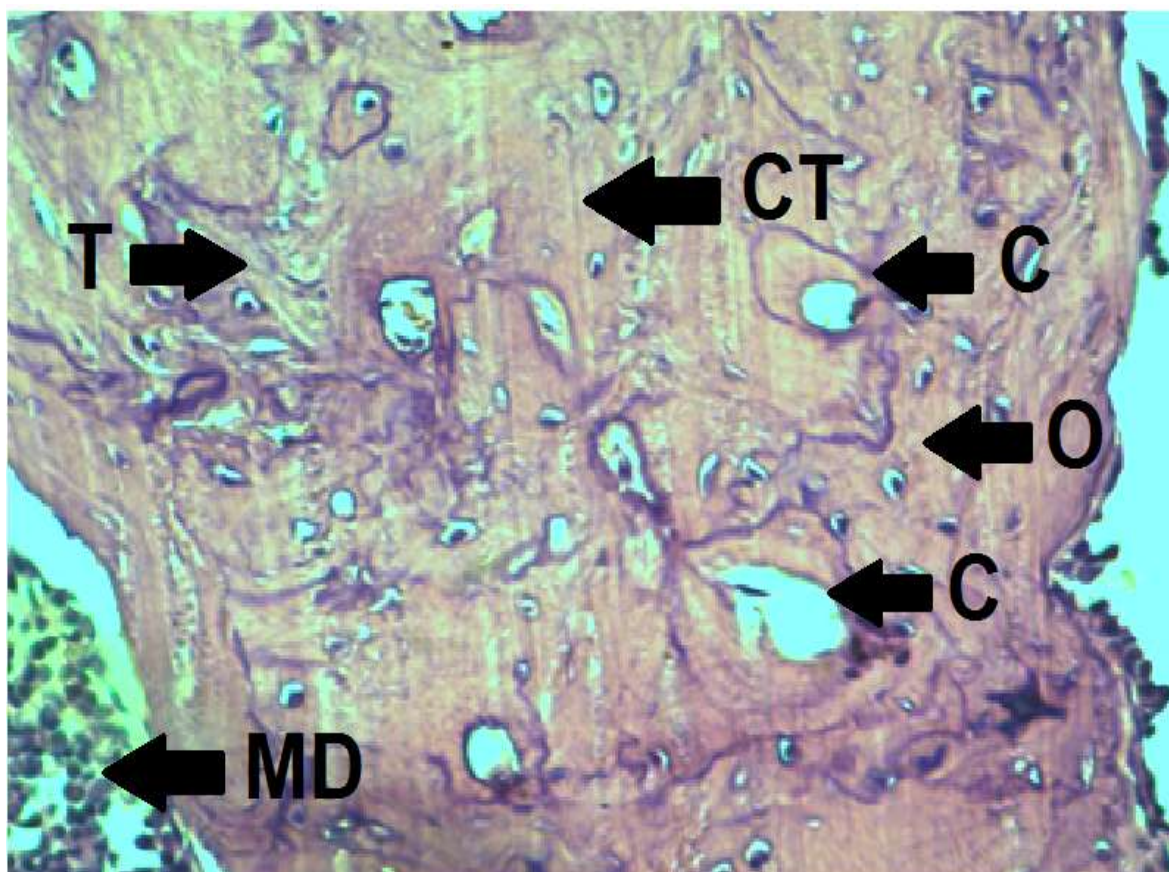


Figura 6: Corte histológico transversal da tíbia direita do grupo AF. (400X). Região medular (MD), cortical (CT) com presença de canais vasculares (C), osteócitos (O) e região de transição entre tecido cartilaginoso e ósseo (T).

Na figura 7 observamos a região cortical do grupo irradiado com laser de baixa potência. Podemos observar a presença de osteócitos e canais vasculares distribuídos de maneira regular. É possível observar ainda uma região de remodelamento ósseo.

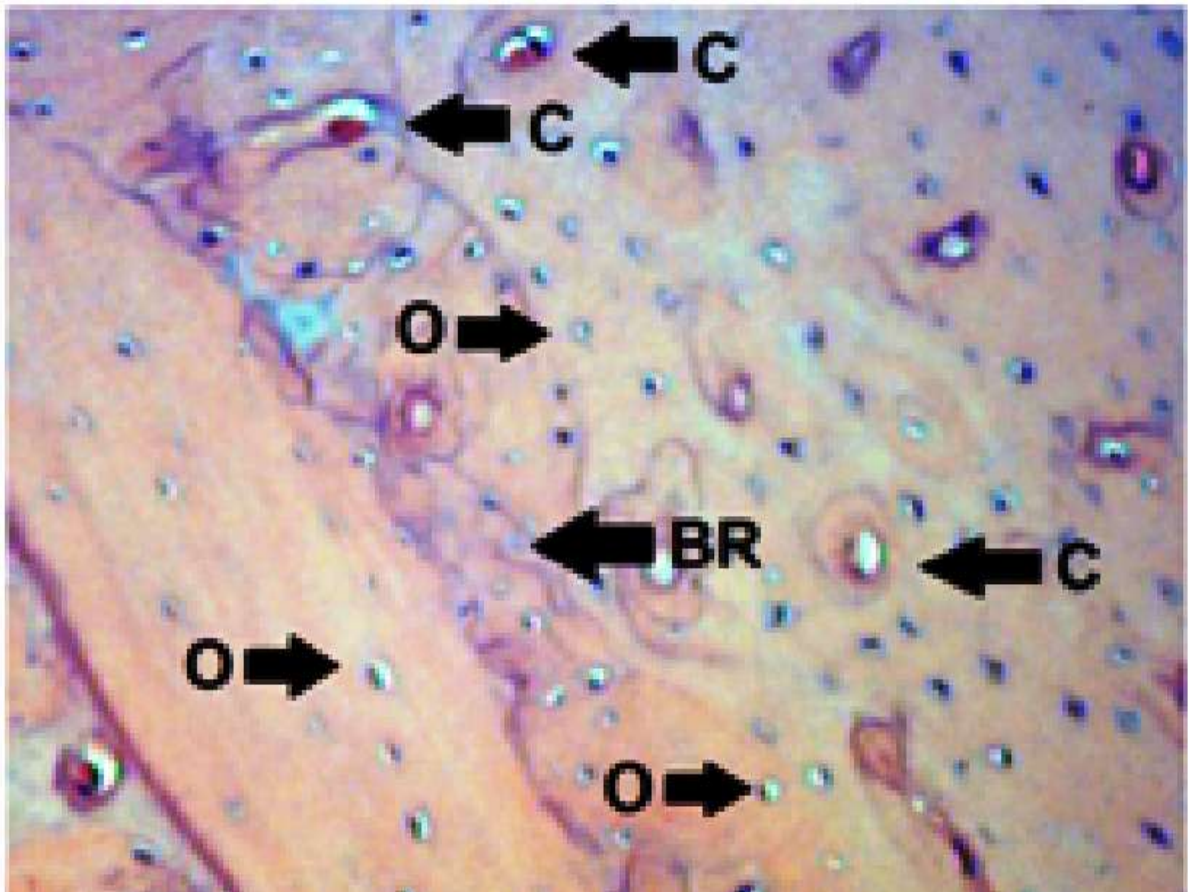


Figura 7: Corte histológico transversal da tíbia direita do grupo L. (400X). Região cortical (CT), canais vasculares (C), osteócitos (O) e remodelamento ósseo (BR).

A figura 8 apresenta a histologia do grupo AF+L. Na imagem observamos a região medular e grande parte da região cortical com presença de osteócitos, canais vasculares e região de transição de formação do tecido ósseo.

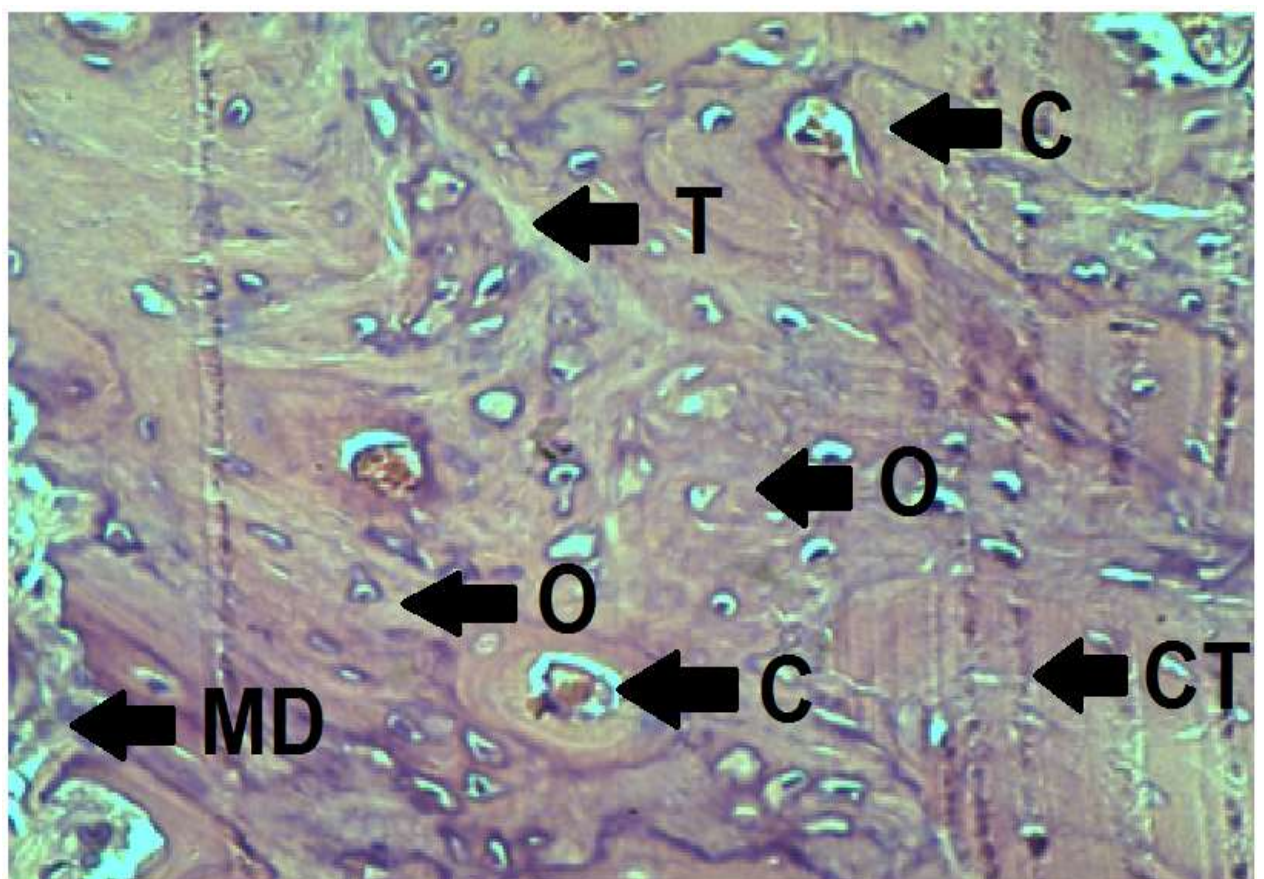


Figura 8: Corte histológico transversal da tíbia direita do grupo AF+L. (400X). Medula óssea (MD), região cortical (CT), osteócitos (O), canais vasculares (C) e região de transição de formação do tecido ósseo (T).

4.2 Resultados Bioquímicos – Níveis de fosfatase alcalina:

Na figura 9, 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 feltro ativado apresentou uma redução significativa quando comparado ao grupo não tratado.

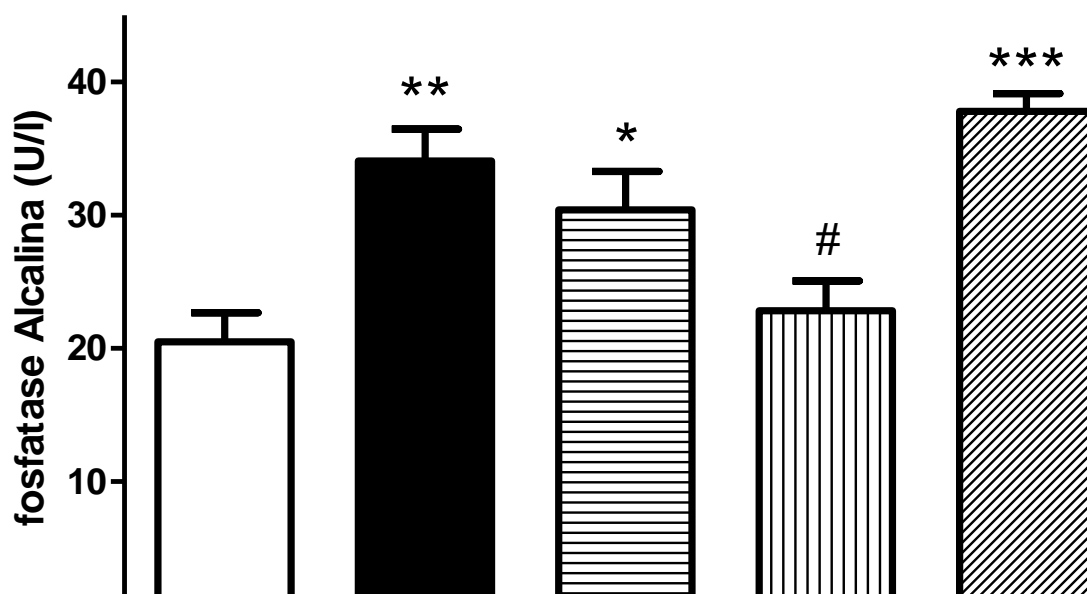


Figura 9: Níveis de fosfatase alcalina. Grupos Controle (CTL), não tratado (NT), grupo tratado com feltro ativado (AF), com hidroxiapatita (HA) ou com associação entre feltro ativado e laserterapia (AF+L). *** $p < 0,001$ vs CTL, # $p < 0,05$ vs NT.

4.3 Resultados biomecânicos

Na figura 10 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 feltro 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.

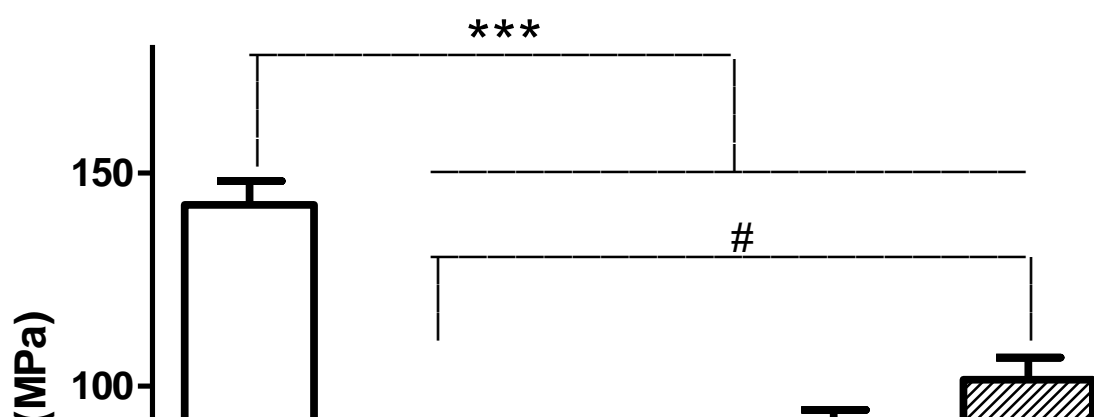


Figura 10: Gráfico da força máxima de flexão no momento da ruptura óssea. Grupos Controle (CTL), não tratado (NT), grupo tratado com feltro ativado (AF), com hidroxiapatita (HA) ou com associação entre feltro ativado e laserterapia (AF+L). *** $p < 0,001$ vs CTL, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ vs NT.

Na figura 11 observamos o deslocamento máximo atingido no momento da ruptura. Nenhum dos grupos onde a loja óssea foi induzida não apresentou alteração deste deslocamento.

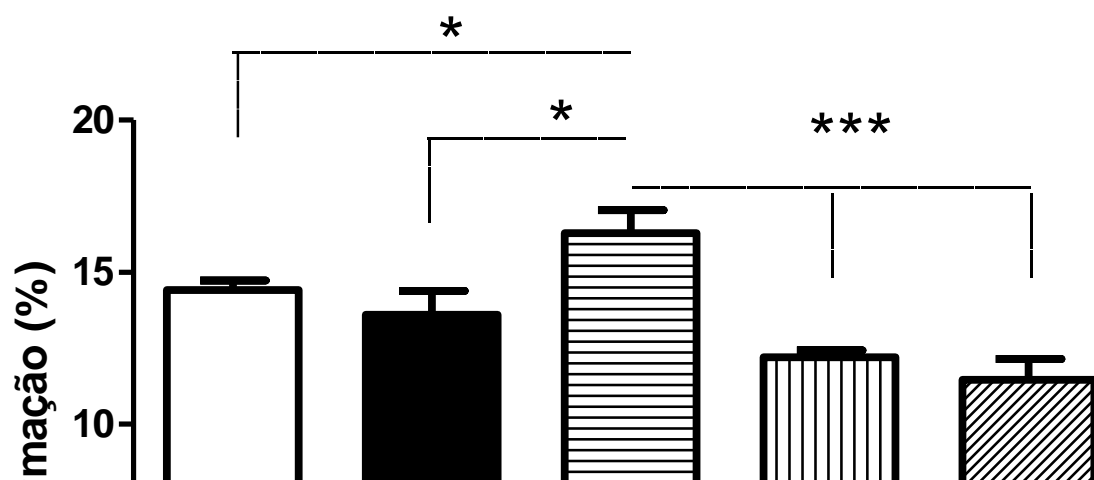


Figura 11: Gráfico do deslocamento máximo no momento da ruptura óssea. Grupos Controle (CTL), não tratado (NT), grupo tratado com feltro ativado (AF), com hidroxiapatita (HA) ou com associação entre feltro ativado e laserterapia (AF+L).

Na figura 12 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 feltro ativado apresentou uma posição mais próxima do tecido saudável (CTL). O grupo HA apresentou um deslocamento para a direita, porem, com redução da força de flexão.

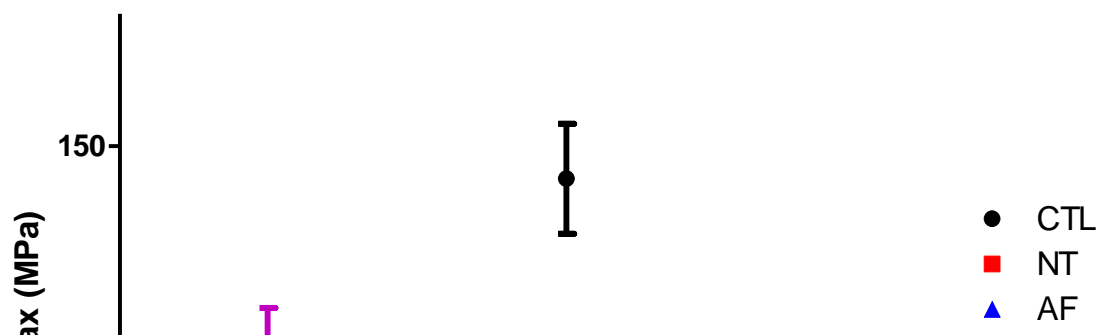


Figura 12: Gráfico da relação entre a força máxima de flexão óssea com o deslocamento máximo no momento da ruptura óssea. Grupos Controle (CTL), não tratado (NT), grupo tratado com feltro ativado (AF), com hidroxiapatita (HA) ou com associação entre feltro ativado e laserterapia (AF+L).

Grupos	Fosfatase Alcalina	F.Máx.	Deformação	Rigidez
NT	+++	- - -	-	- -
AF	++	- -	++	- -

L	=	- -	- -	=
L+AF	+++	-	- -	=

Tabela 2: Tabela com todos resultados para melhor visualização.

5- CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de biomateriais em cirurgias ósseas é bastante conhecido, porém pode haver alterações no reparo, principalmente devido às características do material que muitas vezes é diferente do tecido original.

Desta forma, a pesquisa de novos materiais que apresentem propriedades biológicas ainda é uma realidade.

O uso de terapias auxiliares à cirurgia óssea também é comum, geralmente para redução da dor e auxílio do reparo ósseo. Neste caso, a laserterapia é utilizada pelo seus efeitos analgésicos e anti-inflamatórios conhecidos. No entanto é fundamental conhecer a interação entre a associação do laser com o uso deste biomaterial.

A partir de nossos resultados, podemos concluir que o modelo utilizado de lesão óssea em tibia de ratos altera de maneira importante o reparo ósseo, pela redução da resistência a força de flexão do tecido ósseo, reforçada pela presença de tecido de transição observados nos resultados histológicos.

A fibra de carbono ativado auxiliou o reparo ósseo, porém aumentou a capacidade de deformação, o que sugere um aumento na flexibilidades deste tecido.

O laser de baixa potência, no parâmetro de irradiação apresentado auxilia o reparo ósseo, melhora a organização do tecido, porém auxilia na melhora da resistência ou na capacidade de deformação.

O uso da fibra de carbono ativada, associada ao uso de laser de baixa potência (830nm, 6J, 100mW) auxiliou no reparo ósseo, melhorando as propriedades mecânicas e a organização do tecido ósseo.

No entanto, mais trabalhos são necessários, afim de entender quais as características do material são importantes para o reparo. O uso de outros modelos de lesão em diferentes ossos com características mais corticais ou mais medulares também pode ser interessante pelo fato da fibra de carvão ativada promover aumento da deformação.

Enfim, a utilização de outros parâmetros de irradiação, por exemplo, a redução da potência aplicada, seria interessante afim de buscar uma dosagem mais efetiva para esta associação, mantendo seus efeitos analgésicos e anti-inflamatórios.

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.

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, 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, 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, STERGIOULAS 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.

BERTOLOTTI 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.

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.

KIYOIZUMI T. Low level diode laser treatment for hematomas under grafted skin 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, 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.

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- α and TGF- β 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

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

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, LAOSIROPOJANA 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).

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.

SIMUNOVIFÁ-SOSKIFÁ M, PEZELJ-RIBARIFÁ S, BRUMINI G, GLAZAR I, GRZIFÁ R, MILETIFÁ 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.

7- ANEXOS

Protocolo de Pesquisa referente ao Projeto nº AN0046.2014

Título do Projeto: Efeito do laser de baixa potência associado ao uso de biomateriais derivados de carvão ativado no processo de reparo ósseo em tíbia de ratos

Orientador: Rodrigo Labat Marcos

Objetivos: - Avaliar alterações histológicas e biomecânicas no processo de reparo ósseo em tíbias de ratos após indução de lesão.

- Avaliar o efeito do laser de baixa potência no reparo ósseo em tíbias de ratos.

- Avaliar a ação de biomateriais e sua associação com terapia laser de baixa potência no reparo ósseo em tíbias de ratos

Objetivos bem definidos.

Método: Os animais serão anestesiados com ketamina (90mg/Kg) e Xilazina (10mg/Kg) e fixados em mesa de cortiça. Em seguida será realizada uma incisão sobre o osso na parte postero-lateral da tíbia à direita com a divisão dos planos subcutâneos e musculares, acesso ao periosteo 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. Após confecção de furo os animais serão ou não tratados, dependendo do grupo que pertenciam, para assim realizar a sutura por planos.

Será utilizado o Laser Diodo de Baixa Intensidade Thera-laser (DMC[®], - Brasil), com os seguintes parâmetros: comprimento de onda de 810nm, potência de 100mW, ondas contínuas, energia de 6 Joules. O tratamento Laser será realizado sobre o osso, durante sete (7) dias intercalados, começando 24 horas após a cirurgia. Após todo protocolo experimental, os animais serão anestesiados com hipodose de cloridrato de Xilazina (30mg/ml) e Cloridrato de Ketamina (270mg/ml) e após a eutanásia, o osso tibial será removido e conservado para análises morfológicas e biomecânicas e o sangue será coletado para análise da fosfatase alcalina.

Após a indução da lesão, os animais serão sacrificados após 28 dias e o osso será removido para posteriores análises. Parte deste material será utilizado 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, será aplicado uma sequência de forças de carregamento e descarregamento a fim de simular as condições de tensões reais do osso.

Primeiramente serão 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 serão fixadas no aparelhos de teste mecânico (tensiómetro). Vários testes de carregamento e descarregamento de forças serão realizados até o momento da ruptura do tecido. A força de rigidez em 3 diferentes pontos será analisada.

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

Antes da eutanásia dos animais, será 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 será então centrifugado a 5.000rpm por 03 minutos para a separação do soro e parte vermelha do sangue; o soro será colocado em novo tubo, e armazenando à temperatura de -80°C até sua utilização. A reação para detecção dos níveis de fosfatase alcalina ocorre da seguinte maneira: Primeiramente, a solução tampão (DEA) é preparada e incubada por alguns minutos. Enquanto ocorre a incubação, em placa de ELISA, coloca-se 2µl da amostra em cada poço da placa e a este é adicionado 200µl do reagente único, previamente incubado. A absorbância é feita no comprimento de onda 405nm a 37°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 = $\Delta A/\text{min} \times 5.460$. Determinar a diferença da média de Absorbância/min ($\Delta A/\text{min}$), subtraindo cada leitura da anterior e fazendo a média dos valores. Utilizar esta média para os cálculos.

As amostras do tecido serão fixadas em formol a 10% por um período de 72 horas. Posteriormente as amostras serão 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 será diafanizado com Xilol por 4 horas (SYNTH) para impregnação (embebição) e inclusão em Paraplast® das amostras. Em seguida, estas serão colocadas em recipientes de alumínio adequados, com Paraplast® fundido por 4 horas. Após a impregnação, as amostras serão colocadas em um pequeno recipiente coberto com parafina e deixadas para endurecer, formando um bloco contendo o tecido. Para a microtomia serão realizados cortes com 5 µm de espessura em micrótomo LEICA, RM 2125 RT. Uma vez precedido o preparo das amostras os cortes serão colocados em lâminas para serem corados, com Hematoxilina-Eosina (H.E.). Após a coloração os cortes serão montados em lâminas permanentes para posterior análise em microscópio óptico e fotografadas através de sistema de microfotografia (Olympus System Microscope Model CX 41 – Olympus PM10SP Automatic Photomicrographic System).

Os dados serão expressos pela média e pelo desvio padrão da média. Os resultados serão submetidos à análise de variância (ANOVA) e os valores de p indicados abaixo dos gráficos apresentados neste trabalho.

Metodologia condizente com os objetivos delineados.

Animais (procedência, raça, linhagem, número de animais, peso, sexo): Serão utilizados 48 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 serão mantidos em ambiente com temperatura controlada e ciclo claro/escuro de 12 horas.

Condições de alojamento e nutrição: Os animais serão obtidos do biotério de criação da Universidade Nove de Julho e mantidos em condições controladas de umidade (50%-60%), luminosidade (claro) e temperatura (22°C - 25°C) no biotério de experimentação da Universidade Nove de Julho.

Medidas para evitar estresse e/ou dor nos animais: Uso de Tramal, 5 mg/kg, intraperitoneal, por 2 dias após a indução da contusão, a cada 4 horas.

Procedimento Anestésico e/ou Analgésico (incluir dose e vias de administração): Uso de Tramal, 5 mg/kg, intraperitoneal, por 2 dias após a indução da contusão, a cada 4 horas.

Eutanásia: Overdose de Anestesia, Xilasina/Ketamina, 30mg/ml e 270mg/ml, i.p. respectivamente.

Pertinência e valor científico do estudo proposto: A importância da utilização de terapias não medicamentosas associadas com técnicas tradicionais com o uso de biomateriais representa um fator altamente relevante para o Sistema de Saúde, especialmente em nosso país. No entanto poucos estudos abordam aspectos funcionais e biomecânicos do laser de baixa potência no processo de reparo ósseo.

Data de início: 10/12/2014

Data de término: 10/12/2015

Apresentado a este Comitê para análise ética, foi considerado:

(X) Aprovado, sendo que este projeto deverá permanecer arquivado por 05 (cinco) anos nesta Secretaria.

() Com pendência (relacionar), devendo o Pesquisador encaminhar as modificações sugeridas, e iniciar a coleta de dados somente após a aprovação do projeto por este Comitê.

() Não-Aprovado

São Paulo, 3 de dezembro de 2014

26 de janeiro de 2015

[Assinatura]

[Assinatura]
Prof. Dra. Karin Marie van der Heijden Cardenes
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho

