

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**  
**BIOFOTÔNICA APLICADA ÀS CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**FOTOBIMODULAÇÃO ASSOCIADA A MATERIAL CARBONOSO  
PARTICULADO IMPREGNADO COM PARTÍCULAS DE NANOPRATA  
NO REPARO ÓSSEO**

**Paulo Henrique Boulitreau Assirati**

**SÃO PAULO -SP**  
**2019**

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**  
**BIOFOTÔNICA APLICADA ÀS CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**PAULO HENRIQUE BOULITREAU ASSIRATI**

**FOTOBIMODULAÇÃO ASSOCIADA A MATERIAL CARBONOSO  
PARTICULADO IMPREGNADO COM PARTÍCULAS DE NANOPRATA  
NO REPARO ÓSSEO**

**Dissertação apresentada a Banca  
Examinadora como requisito para a  
obtenção do título de mestre no  
Programa de Pós-Graduação em  
Biofotônica Aplicada às Ciências da  
Saúde**

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

**SÃO PAULO -SP**  
**2019**

**Assirati, Paulo Henrique Boulitreau.**

***Fotobiomodulação associada a material carbonoso particulado impregnado com partículas de nanoprata no reparo ósseo. / Paulo Henrique Boulitreau Assirati 2019.***

**54 f.**

***Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2019.***

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

***1. Fotobiomodulação. 2. Reparo Ósseo. 3. Carvão ativado. 4. Nanoprata.***

***I. Labat, Rodrigo. II. Título***

***CDU 615.831***

S6o Paulo, 07 de fevereiro de 2019

TERMO DE APROVACAO

Aluno (a): Paulo Henrique Boulitreau Assirati

Titulo da Dissertag6o: "Fotobiomodulaç6o associada a material carbonoso particulado impregnado com paniculas de nanoprata no reparo 6sseo"

Presidente: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS

  
\_\_\_\_\_

Membro: PROF. DR. RENATO ARAUJO PRATES

  
\_\_\_\_\_

Membro: PROF\*. DR^ ANA CLAUDIA MUNIZ RENNO

  
\_\_\_\_\_

**Dedicatória:**

Dedico este trabalho aos meus pais, Elizabeth e Orlando, pelo amor e pela criação que me proporcionaram e proporcionam, pela compreensão nos momentos mais espinhosos da vida, pela responsabilidade que tiveram como educadores e pelo incentivo e carinho que sempre recebi ao longo da vida.

## **Agradecimentos:**

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as necessidades.

A minha família, pelo apoio sempre concedido nas minhas decisões tomadas, pela paciência e carinho nos momentos difíceis.

A minha mulher, Emilia e minha filha Manuela, pelo amor, compreensão e força que me dão todos os dias.

Ao meu orientador, professor Dr Rodrigo Labat Marcos, pela correta condução e sabedoria na forma de transmitir conhecimento.

Aos meus colegas do grupo de pesquisa Rodney Pallotta, Rachel Bharbara Dalmaso, Patrícia Almeida Mattos, Marília Del Bel e Bianca Brito pela ajuda e companheirismo durante essa fase de crescimento.

Aos incentivadores e amigos, Prof. Dr Leandro Lauriti e Profa. Dra Verônica Franco de Carvalho.

Aos professores que participaram da banca avaliadora Profa. Dra. Ana Claudia Muniz Rennó, Prof. Dr. Renato Araujo Prates, Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos.

Agradeço à Universidade Nove de Julho e ao Departamento de Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde pela oportunidade concedida para a realização do Mestrado.

## RESUMO

No Brasil, milhares de cirurgias osteomusculares são realizadas anualmente e este alto número de procedimentos produz um impacto social e econômico para o país. A fotobiomodulação já é considerada uma terapia auxiliar principalmente no pós-operatório, com influência no processo doloroso e no reparo ósseo. O uso de material carbonoso particulado vem sendo sugerido pelo nosso grupo de pesquisa como uma alternativa para substituto ósseo e sua impregnação pela prata vem demonstrado ser eficaz no controle de infecções ósseas. O Objetivo deste trabalho foi de avaliar o efeito da fotobiomodulação sobre o reparo ósseo, após a utilização de biomaterial carbonoso impregnado com nanop prata em tibia de ratos. Material e métodos: Ratos Wistar machos foram anestesiados com associação de cloridrato de quetamina e xilazina (90mg/kg e 10mg/kg) e submetidos ao processo de confecção do defeito ósseo localizado na região monocortical das duas tíbias traseiras. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos: (I) lesão não tratado (NT), (II) lesão tratado com material carbonoso puro (CM), (III) impregnado com nanop prata (CM+NS) e (IV) tratado exclusivamente com fototerapia (PBM). O quinto grupo (V) houve a associação da fototerapia ao material carbonoso impregnado pela prata (CM+NS+PBM). Os animais foram irradiados em dias alternados até o 12º dia com laser 830nm, 6J, 100mW. Trinta dias (30) após a indução da lesão, os animais foram eutanasiados e amostras de tibia e sangue foram coletados e armazenados para análises posteriores. Resultados: Os grupos CM, CM+NS e CM+NS+PBM apresentaram aumento nos níveis de fosfatase alcalina. Ao contrario, o grupo PBM apresentou redução, todos comparados ao grupo NT. Os grupos CM+NS e CM+NS+PBM apresentaram aumento de Fmax quando comparado ao grupo NT. Somente o grupo PBM apresentou aumento no Dmax comparado ao grupo NT. Todos os tratamentos apresentaram redução no tecido de granulação e melhor organização no tecido ósseo comparado ao grupo NT. Conclusão: O uso de material carbonoso impregnado por prata parece auxiliar no reparo ósseo. O tratamento com fotobiomodulação associado ou não com material carbonoso impregnado pela prata auxiliaram no reparo ósseo e na recuperação das propriedades mecânicas deste tecido.

Palavras-chave: Fotobiomodulação, reparo ósseo, carvão ativado, nanop prata

## ABSTRACT

In Brazil, thousands of musculoskeletal surgeries are performed annually and this high number of procedures produces a social and economic impact for the country. Photobiomodulation is already considered an auxiliary therapy mainly in the postoperative period, with influence on the painful process and the bone repair. The use of particulate carbon material has been suggested by our research group as an alternative bone substitute and its impregnation by silver has been shown to be effective in the control of bone infections. The aim of this work was to evaluate the effect of photobiomodulation on the bone repair, after the use of carbon biomaterial impregnated with nanoparticle in tibia of rats. Materials and methods: Male Wistar rats were anesthetized with a combination of ketamine and xylazine (90mg / kg and 10mg / kg) and submitted to the bone defect confection located in the monocortical region of the two hind tibiae. The animals were randomly assigned to 5 groups: (I) untreated lesion (NT), (II) treated with pure carbon material (CM), (III) nanoparticle impregnated (CM + NS) and (IV) treated exclusively with phototherapy (PBM). The fifth group (V) showed the association of phototherapy with silver impregnated carbonaceous material (CM + NS + PBM). The animals were irradiated on alternate days until the 12th day with 830nm, 6J, 100mW laser. Thirty days (30) after lesion induction, the animals were euthanized and tibia and blood samples were collected and stored for further analysis. Results: The CM, CM + NS and CM + NS + PBM groups presented increased levels of alkaline phosphatase. On the other hand, the PBM group presented reduction, all compared to the NT group. The CM + NS and CM + NS + PBM groups showed an increase in Fmax when compared to the NT group. Only the PBM group showed an increase in Dmax compared to the NT group. All treatments presented reduction in granulation tissue and better organization in the bone tissue compared to the NT group. Conclusion: The use of carbon material impregnated by silver seems to aid in bone repair. The treatment with photobiomodulation associated or not with silver impregnated carbon material aided in bone repair and recovery of the mechanical properties of this tissue.

Key words: photobiomodulation, bone repair, carbon material, nanosilver

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	13
OBJETIVOS .....	21
MATERIAL E MÉTODOS .....	22
RESULTADOS .....	30
DISCUSSÃO .....	41
CONCLUSÃO .....	48
REFEÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49
ANEXOS .....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ag<sup>+</sup> – prata

ALP – fosfatase alcalina

ATP – trifosfato de adenosina

C – cortical

Ca<sup>2+</sup> – cálcio

CEUA – comitê de ética no uso de animais

CM – material carbonoso

COL1 – colágeno tipo 1

COX2 – cicloxigenase

DNA – ácido desoxirribonucleico

Dmax – deslocamento máximo

ED – endósteo

Fmax – força máxima

GT – tecido de granulação

HE – hematoxilina eosina

IGF – fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1

IL1beta – interleucina 1 beta

IL6 – interleucina 6

J – joules

Kg – quilograma

LASER – light amplified by stimulated emission of radiation

M – medular

mg – miligramas

mL – mililitros

mm – milímetro

mW – miliwatt

N – newton

nm – nanometro

NS – nanoprata  
NT – não tratado  
OB – osteoblasto  
OC – osteoclasto  
OCC – osteocalcina  
OPG – osteoprotegerina  
PBM - fotobiomodulação  
PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas  
PGE2 – prostaglandina E2  
PPM – parte por milhão  
RANK – receptor ativador do fator nuclear kapa B  
RANKL – ligante do receptor ativador do fator nuclear kapa B  
RPM – rotação por minuto  
RNA – ácido ribonucleico  
SUS – sistema único de saúde  
TA – área de transição  
TGF – fator de transformação de crescimento  
TGFbeta – fator de transformação de crescimento beta  
TNFalfa – fator de necrose tumoral alfa  
UI – unidade internacional  
VC – canal vascular  
 $\lambda$ - comprimento de onda  
°C – graus Celsius  
 $\mu$ L – microlitro

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de remodelação óssea.....	15
Figura 2: Grupos Experimentais .....	23
Figura 3: Caracterização tomográfica do material carbonoso.....	24
Figura 4: Curso temporal do experimento de indução óssea e tratamento com laser de baixa intensidade .....	26
Figura 5: Posicionamento do osso tibial com a lesão óssea voltada para baixo no dispositivo para ensaio biomecânico de flexão em 3 pontos.....	28
Figura 6: Gráfico dos níveis de fosfatase alcalina após 30 dias da indução da lesão óssea.....	30
Figura 7: Fotomicrografia transversal da tibia do grupo NT.....	31
Figura 8: Fotomicrografia transversal da tibia do grupo CM.....	32
Figura 9: Fotomicrografia transversal da tibia do grupo CM+NS.....	33
Figura 10: Fotomicrografia transversal da tibia do grupo PBM.....	34
Figura 11: Fotomicrografia transversal da tibia do grupo CM+NS+PBM.....	35
Figura 12: Prancha com fotomicrografias dos cortes histológicos da tibia dos grupos NT, CM, CM+NS, PBM, CM+NS+PBM e gráfico da fosfatase alcalina dos mesmos grupos .....	36

Figura 13: Gráfico Fmax no momento da ruptura óssea..... 37

Figura 14: Gráfico Dmax no momento da ruptura óssea..... 38

Figura 15: Gráfico sobreposição Fmax e Dmax no momento da ruptura óssea .....39

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Parâmetros Dosimétricos .....	26
Quadro 2: Comparação de resultados dos grupos experimentais .....	40

## **INTRODUÇÃO**

### **1.1 Epidemiologia das fraturas e/ou defeitos ósseos**

De acordo com o banco de dados do Sistema de Internações Hospitalares do Sistema Único de Saúde (SIH/SUS), as fraturas foram responsáveis por quase 280.000 internações ocorridas no ano 2.000 <sup>(1)</sup>. Em 2014, mais de 14 mil cirurgias osteomusculares foram realizadas pelo Sistema Único de Saúde no Brasil, sendo que mais de 2 mil destas, foram realizadas por retardo na consolidação ou perda óssea. No período que compreende os anos de 2012 a 2014, mais de R\$ 370 milhões de reais foram gastos com procedimentos cirúrgicos de ordem ortopédica <sup>(2)</sup>. Mesmo com a maioria das fraturas evoluindo para um reparo adequado, muitos dias de trabalho são perdidos ao ano devido à incapacidade do paciente de realizar suas atividades diárias, levando a uma enorme perda de produtividade e renda <sup>(3)</sup>.

A intervenção de agentes externos para acelerar o reparo ósseo torna-se importante pela possibilidade de antecipação da reabilitação destes pacientes e de seu retorno às atividades cotidianas <sup>(4)</sup>. Para alcançar essa otimização, no entanto, é necessário estudar terapias que auxiliem no reparo ósseo, melhorando sua funcionalidade e reduzindo os riscos de infecções.

### **1.2 Remodelação óssea**

Os ossos são tecidos metabolicamente ativos que sofrem um processo contínuo de renovação e remodelação. Esta atividade é consequência, em sua maior parte, da atividade de dois tipos celulares principais, característicos do tecido ósseo: os osteoblastos e os osteoclastos. O equilíbrio desse sistema ósseo depende de uma remodelação óssea equilibrada, ou seja, de uma dinâmica balanceada entre a atividade dos osteoblastos, células de formação óssea, e os osteoclastos, células de reabsorção óssea.

Os osteoblastos secretam matriz óssea rica em proteínas colágenas (Colágeno Tipo I) e proteínas não colágenas como a Osteocalcina (OCC) que é uma proteína relacionada com a mineralização óssea, promovendo a fixação do cálcio e na formação dos cristais de hidroxapatita. A síntese progressiva de matriz óssea faz com que, após um determinado tempo, o osteoblasto fique aprisionado no interior de sua matriz secretada, transformando-se num osteócito, ao mesmo tempo que ocorre a mineralização da matriz previamente sintetizada, determinando a formação de um osso maduro. Os osteoblastos estão envolvidos no processo de formação óssea, mas também na manutenção deste tecido, assegurando a reparação de danos e lesões, mantendo a integridade óssea.

Os osteoclastos são células fundamentais na manutenção de uma massa e estrutura óssea adequada ao longo da vida e é uma das células mais especializadas do corpo humano, tendo como principal função a reabsorção óssea, que permite um equilíbrio entre a reabsorção e a deposição de tecido ósseo. O equilíbrio da interação osteoblasto-osteoclasto é fundamental para a manutenção da integridade do esqueleto ao longo da vida <sup>(5)</sup>.

Uma mostra do quão dependente estão os fenômenos de formação e reabsorção na dinâmica da reparação óssea são as proteínas efetivamente envolvidas na diferenciação celular que determinam ativação ou inibição das atividades que regulam o metabolismo ósseo. Dentre as proteínas ósseas envolvidas nessa dinâmica podemos destacar a Osteoprotegerina, a RANKL e RANK, conceituados como marcadores de atividades celulares <sup>(6)</sup>.

Os osteoblastos secretam a Osteoprotegerina, uma citocina receptora homóloga aos membros da superfamília de receptores TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral), que atua como osteoprotetora, isto é, inibindo a diferenciação de pré-osteoclastos em osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea. A osteoprotegerina faz isso se ligando ao RANKL (Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa- $\beta$ ) impedindo sua interação com RANK (Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa- $\beta$ ) que está presente na superfície dos osteoclastos e assim inibe sua maturação e ativação. A expressão da OPG é inibida pela Prostaglandina

E2 (PGE2) e os glicocorticoides, e é ativada pela vitamina D3 (Calcitriol), íons  $\text{Ca}^{2+}$  e o TGF, conforme esquematizado na figura 1.

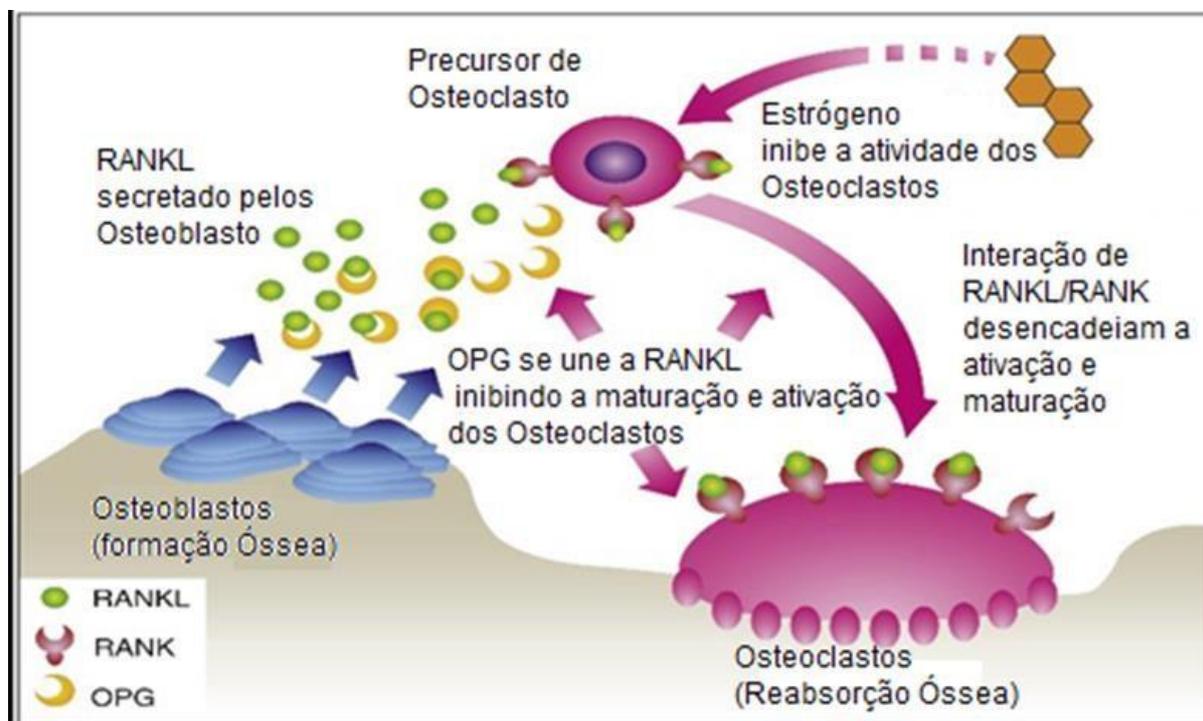


Figura 1: Esquema de remodelação óssea. Adaptado: Sun, S, 2008. 12(2): p. 239-51.

### 1.3 Reparo e tratamento das lesões ósseas

As fraturas ósseas ocorrem por razões como: traumas diretos causados por arma de fogo, acidentes, torções ou quedas. Os defeitos ósseos são provenientes de malformações congênitas, traumas não corrigidos, lesões extensas ou de sequelas cirúrgicas, como na remoção de tumores, e são corrigidos através de enxertia óssea, colocação de próteses biocompatíveis e utilização de substâncias indutoras de formação óssea <sup>(7)</sup>. 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 em quatro fases (inflamação, condrogênese, ossificação e remodelamento), caracterizadas por eventos celulares e moleculares específicos que ocorrem de maneira ordenada.

Durante a fase inflamatória ocorre o aumento de algumas citocinas, entre elas TNF- $\alpha$  e IL-6, além de células inflamatórias e células de origem mesenquimais. No entanto, a presença destas citocinas podem ocorrer em outras fases do reparo, por exemplo, durante o processo de remodelação <sup>(8)</sup>.

A presença das células inflamatórias recruta as osteoprogenitoras para o local afetado e induz a ossificação endocondral formando matriz cartilaginosa, composta por condrócitos e fibroblastos, estes irão proliferar e sintetizar tecido fibrocartilaginoso unindo a lacuna óssea. Após a união há formação do calo ósseo semirrígido, para maior atividade osteogênica através da aposição e reabsorção óssea, porém para a formação da matriz celular óssea é necessária a combinação de proteínas e matriz extracelular mineralizada. Em sequência à intensa formação óssea irregular, o estágio final de reparo caracterizado pelo remodelamento inicia-se por meio de osteoclastos e algumas interleucinas, para o reestabelecimento da forma original do osso <sup>(3)(4)</sup>.

Diversas terapias auxiliares têm sido utilizadas afim de melhorar o reparo ósseo, como é o caso do laser de baixa intensidade, do ultrassom e de biomateriais como hidroxiapatita, polímeros biodegradáveis, cerâmicas, biovidros e mais recentemente o uso de materiais carbonosos. Bossini *et al*, (2011) <sup>(9)</sup> desenvolveram um estudo com ratas osteopênicas para avaliar os efeitos da associação de uma vitrocerâmica com o laser de baixa intensidade. O grupo observou um aumento na quantidade de osso neoformado. Outros estudos apontam que a associação do laser com biomateriais promove indução de osteogênese e mineralização, aumento da deposição de massa óssea e melhora das propriedades mecânicas do tecido ósseo <sup>(10,11)</sup>.

Já é bem conhecido que os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo podem ser divididos em 2 grupos: Os relacionados a formação óssea (ALP, OCC, COL1) e os de reabsorção óssea (ALP) e a relação no equilíbrio destes marcadores podem influenciar na qualidade do osso formado <sup>(12)</sup>.

#### **1.4 Biomateriais**

Os compostos bioativos são definidos como materiais sintéticos, inorgânicos ou uma combinação destes, capazes de produzir resposta biológica específica, ligação

e interação entre o composto e o tecido promovendo efeitos benéficos para o meio sem que haja toxicidade ou resposta imunológica. De acordo com os padrões-ouro da engenharia de tecidos, um substituto ósseo ideal deve oferecer estrutura tridimensional osteoindutiva altamente porosa garantindo circulação de nutrientes e fatores de crescimento. Deve conter também propriedades de superfície que favoreçam migração, proliferação e diferenciação de diferentes tipos celulares de interesse local, bem como ser biocompatível e de biodegradação controlada e conter células ou moléculas biologicamente ativas indutoras de osteogênese e osteocondutividade, ter propriedades mecânicas condizentes com a região de implante e promover vascularização, cada uma dessas características objetivando reparo e/ou regeneração tecidual <sup>(13,14)</sup>.

Diversas linhas de pesquisa têm sido desenvolvidas e os benefícios atribuídos percorrem desde a melhora no processo de consolidação <sup>(15)</sup>, o aumento da angiogênese e estímulo da neoformação óssea <sup>(16)</sup> até a produção de matriz óssea e melhora da diferenciação celular <sup>(17)</sup>. Nos últimos anos, grandes avanços foram obtidos através da Engenharia de Tecidos no desenvolvimento de materiais bioativos em combinações de células, arcabouços e fatores bioativos que garantiram biomateriais de diversas composições para uso em enxertia óssea, como por exemplo vidros, vitrocerâmicas, polímeros de diversas composições e nacre (madrepérola) <sup>(14,17,18)</sup>.

## 1.5 Material Carbonoso

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 superiores à 1000°C, seguido por ativação para criar a estrutura porosa final desejável <sup>(19)</sup>.

Basicamente, qualquer material de baixo custo contendo um elevado teor de carbono e ao mesmo tempo uma quantidade moderada de substâncias inorgânicas pode ser usada 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, um elevado teor de carbono, ou combinam essas duas propriedades <sup>(19)</sup>.

No âmbito de aplicações médicas, o Carvão Ativado apresenta grande parte das condições necessárias ideais para este tipo de aplicação. A principal característica está relacionada com a alta porosidade do material. Uma grande quantidade de poros de diferentes diâmetros e grande superfície interna sugere que este biomaterial apresente boa interação com compostos externos, como por exemplo, na adsorção de poluentes, fármacos e provavelmente servindo como um catalizador físico para a proliferação celular <sup>(14,19)</sup>. Tendo em mente as características do carvão ativado e conhecendo as inúmeras aplicações desse material, surge a hipótese de que o carvão ativado pode ter um papel importante nos processos de estímulo e reparo quando utilizado como substituto ósseo. Ao investigar tais possibilidades, nosso grupo realizou análises relacionadas a toxicidade do material e os dados foram submetidos para publicação. Neste estudo estão inclusos os dados relacionados à atividade de Fosfatase Alcalina. Para avaliação da interação do material com o meio, indução de osteogênese e características de superfície foram avaliados dados de Microscopia Óptica. Além destes dados, foram analisados também força e resistência das amostras associadas ao carvão ativado.

## **1.6 Laser de baixa intensidade no reparo ósseo**

Ao irradiar tecidos vivos com a luz laser de baixa intensidade, esta é absorvida por cromóforos fotoreceptores localizados nas células, promovendo modulações bioquímicas importantes, estimulação de respiração mitocondrial através da produção de oxigênio molecular e síntese de ATP. 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. A coerência uma das propriedades da luz laser onde 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 <sup>(20,21)</sup>, mas ao penetrar no tecido, esta propriedade se perde nos primeiros extratos da osso. Isto ocorre devido

à grande variedade de estruturas celulares que compõe a osso <sup>(22)</sup>. Segundo esses autores, apesar da perda da coerência da radiação do laser de baixa intensidade no interior dos tecidos, esta é absorvida pelas células gerando alterações no seu metabolismo tanto em tecidos superficiais como profundo <sup>(23,24)</sup>.

Os achados indicam ação do Laser em estágios precoces da neoformação óssea, atuando em estímulo e indução do processo de reparo e criando assim, uma série de condições ambientais para melhora do reparo ósseo. Estudos sugerem a modulação de diversos fatores de crescimento, como o IGF, PDGF e TGF- $\beta$ , fatores osteogênicos como RANKL, OPG e ainda diversas citocinas, como IL-1 $\beta$ , COX2 e TNF- $\alpha$ , no período mais inicial da reparação óssea. Observou-se ainda que fatores teciduais como a deposição de colágeno tipo I e II também apresentaram aumento considerável <sup>(25-30)</sup>.

Rennó e cols. (2007) <sup>(31)</sup> observaram que a irradiação de culturas de células com laser de baixa intensidade provocou aumento da proliferação de osteoblastos e acelerou o processo de reparo. Outro estudo recente do mesmo grupo aponta para efeitos regulatórios do ciclo celular, neste caso, o laser atuaria modulando a resposta bioquímica da célula no que diz respeito às atividades mitocondrial e gênica, e ainda de síntese de proteínas regulatórias melhorando, com isso, a proliferação celular e o processo de consolidação da fratura. Estudos anteriores já evidenciavam as diversas capacidades modulatórias do laser e os resultados vão desde a constatação de maior formação de tecido osteóide trabecular, promoção de rápida formação de matriz óssea, maior deposição óssea até o favorecimento da diferenciação de osteoblastos <sup>(32,33)</sup>.

Apesar dos resultados encontrados no uso isolado da laserterapia e de biomateriais no reparo ósseo, há ainda um número reduzido de publicações que investigam os benefícios do uso de biomateriais associados à irradiação laser no reparo ósseo <sup>(34,35)</sup>, sendo um objeto de estudo importante, visto que podem existir modulações no reparo ósseo em ambas as condições de tratamento.

Dadas as características apresentadas pelo Carvão Ativado, torna-se importante investigar o seu papel frente aos processos de reparo ósseo a julgar pela relação custo versus benefício, a facilidade de obtenção e manufatura, e o baixo custo por ser derivado da queima de outros compostos, todas essas questões fazem do carvão ativado e sua associação ao laser de baixa intensidade um bom objeto de estudo no âmbito de compostos auxiliares do reparo ósseo.

## 1.7 Nanoprata

Em função de suas propriedades as nanopartículas metálicas têm tido considerável atenção da comunidade acadêmica e propostas de sua utilização abrangem aplicações em sensores óticos, agentes bactericidas e fungicidas. As propriedades antimicrobianas da prata têm sido reconhecidas ao longo da história <sup>(36)</sup>. Com a descoberta dos antibióticos o uso da prata foi descartado, entretanto, o crescente aumento da resistência das bactérias e o surgimento de novas cepas resistentes aos mais potentes antibióticos constituem fatores que despertaram novamente o interesse da comunidade científica pela prata como agente contra microrganismos.

O efeito antimicrobiano da prata é bastante conhecido, entretanto, o mecanismo de ação é apenas parcialmente compreendido. Segundo Li *et al.* (2008) <sup>(37)</sup> a interação de íons de prata com grupos tiol em proteínas resulta na inativação de enzimas respiratórias e na produção de espécies reativas de oxigênio.

‡ Foi demonstrado que o íon Ag<sup>+</sup> impede a replicação do DNA, afeta a estrutura e permeabilidade da membrana celular e causa danos à respiração celular <sup>(36,37,38)</sup>. As partículas nanométricas de prata exibem excelentes propriedades antimicrobianas devido à morfologia com faces altamente ativas, destacando-se o fato da reatividade ser favorecida por facetas de alta densidade atômica <sup>(39)</sup>.

Alguns estudos utilizam partículas de nanopratas em materiais porosos com o objetivo de controlar sua liberação. Contudo, os trabalhos são preliminares, sendo necessários maiores estudos para entender a ação da prata no controle da infecção bacteriana em lesões ósseas.

## **2. OBJETIVOS:**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar o uso da fotobiomodulação associada ao material carbonoso impregnado com nanop prata no processo de reparo ósseo em modelo experimental de lesão óssea em tibia de ratos.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar a ação do biomaterial carbonoso impregnado ou não com nanop prata no reparo ósseo;
- Avaliar a interação da fotobiomodulação com laser de baixa intensidade associada ao biomaterial carbonoso impregnado por prata no reparo ósseo;
- Verificar se as terapias associadas entre laser de baixa intensidade e biomaterial impregnado ou não com nanop prata interferem nos níveis de fosfatase alcalina, nas propriedades mecânicas e na organização óssea.

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizados 20 animais Wistar, machos com idade de 90 dias e com a média de 350g cada, originários do Biotério da Universidade Nove de Julho, com protocolo experimental aprovado pela CEUA (AN022/2017). Os animais foram alojados em gaiolas apropriadas, mantidas em ambiente com iluminação controlada com ciclos de 12X12 horas (claro e escuro), devidamente higienizadas e com temperatura padrão de 22-23 graus Celsius, ventilação adequada e livre acesso a água e alimento.

#### **3.2 Grupos experimentais**

Os animais foram distribuídos em 5 grupos experimentais contendo 4 animais em cada (figura 2). Todos os animais utilizados no estudo foram submetidos à cirurgia nas duas patas traseiras, obtendo o N amostral de 40 unidades ósseas.

Os grupos experimentais foram identificados como:

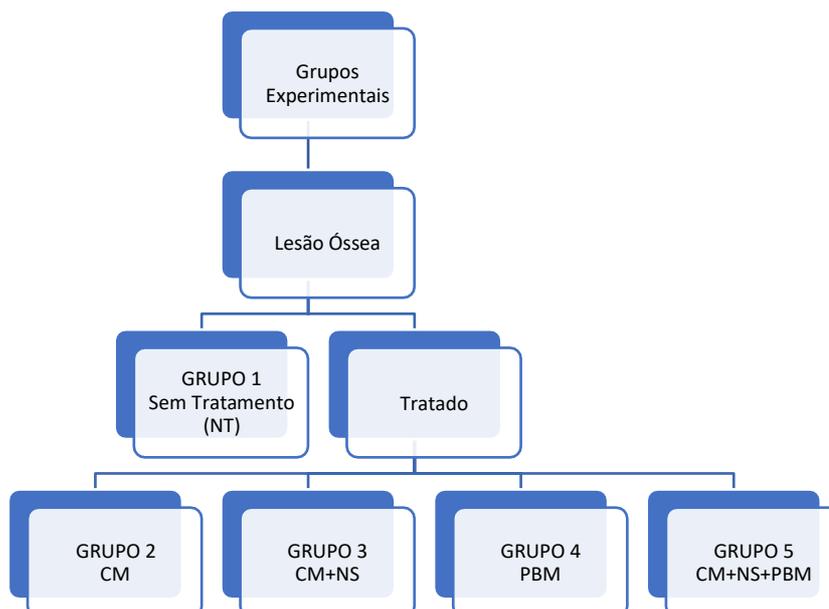
Grupo 1: (NT) – Grupo com defeito ósseo e sem tratamento;

Grupo 2: (CM) – Grupo com defeito ósseo e utilização de biomaterial carbonoso;

Grupo 3: (CM+NS) – Grupo com defeito ósseo e utilização de biomaterial carbonoso + nanop prata (concentração de 600ppm);

Grupo 4: (PBM) - Grupo com defeito ósseo e irradiado com Laser de baixa intensidade (830nm; 6J; 100mW);

Grupo 5: (CM+NS+PBM) – Grupo com defeito ósseo e utilização de biomaterial carbonoso + nanop prata (600ppm) + laser (830nm; 6J; 100mW).



*Figura 2: Grupos Experimentais. Lesão óssea em tíbia de ratos. N=4.*

### 3.3 Defeito Ósseo

Os animais foram anestesiados com Cetamina (90mg/Kg) e Xilazina (10mg/Kg) e fixados em mesa de cortiça. Em seguida foi realizada uma incisão na pele dos animais seguida de divulsão dos planos subcutâneos e musculares para acesso à porção postero-lateral da tíbia à direita. O defeito ósseo foi realizado na região proximal do perióstio da tíbia 10 mm abaixo da articulação do joelho com auxílio de broca trefina com 05 mm de comprimento e 1.3 mm de espessura, acoplada a um motor de implante Driller® em velocidade de 1500 rpm e irrigação constante. Os defeitos foram caracterizados como adequados, quando a broca tivesse atravessado parte da região medular da tíbia do animal sem transpassá-la, formando uma cavidade circular onde os biomateriais foram depositados conforme descrito por GRANITO, 2009 <sup>(35)</sup>. Após a lesão, os animais dos grupos 2, 3 e 5 (CM, CM+NS e CM+NS+PBM) receberam o biomaterial carbonoso na região do defeito ósseo. Os grupos 4 e 5 (PBM e CM+NS+PBM) foram irradiados imediatamente com laser de baixa intensidade (830nm, 6J, 100mW). Após este processo, os animais foram suturados e retornaram ao alojamento em caixas como anteriormente. Para analgesia, foi administrado TRAMAL® associado à Dipirona® via intraperitoneal com dose de 5mg/kg em intervalos de 8 horas por 3 dias após o procedimento cirúrgico.

### 3.4 Preparação do Material carbonoso

O Material foi produzido e cedido gentilmente pelo Professor Dr Guilherme Lenz, do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.

Para a confecção da amostra, o licor negro foi utilizado de forma bruta, sem nenhum tratamento prévio. Afim de se obter tamanho de poro controlado, o PMMA foi peneirado para na faixa de granulometria de  $420\mu\text{m} < \Phi < 500\mu\text{m}$ . Para a confecção dos materiais carbonosos foram adicionados 100g do licor negro bruto, 15g de resorcinol e 45g de PMMA (Polimetilmetacrilato) para a formação dos poros de tamanho micro, e por último foram inseridos 44g de formaldeído como agente reticulante na polimerização do material. Todo este processo foi realizado sobre agitação com o auxílio de uma placa de agitação e uma barra de agitação magnética.

A amostra foi submetida à carbonização em um forno tubular horizontal, com uma taxa de aquecimento de  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até atingir a temperatura de  $900^{\circ}\text{C}$ . O tempo de permanência foi de 2 horas sob atmosfera inerte de argônio. Em seguida as amostras foram deixadas esfriar em atmosfera inerte até atingir temperatura ambiente para evitar a queima do material. Por fim, a amostra foi lavada afim de retirar o excesso de sais de sódio, potássio e enxofre provenientes do processo de deslignificação da madeira. A caracterização tomográfica (figura X) foi realizada nas amostras e o tamanho final dos poros foi entre  $250\mu\text{m} < \Phi < 420\mu\text{m}$ .

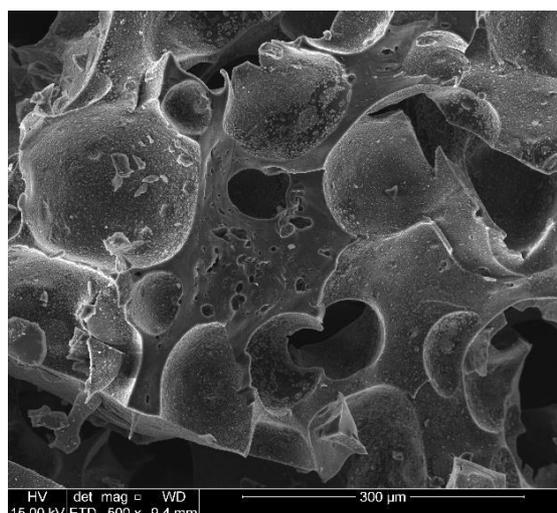


Figura 3: Caracterização tomográfica do material carbonoso.

O material carbonoso particulado foi esterilizado. No momento da cirurgia óssea, foi adicionado solução salina 0,9% até a formação de uma pasta. 1mg do material foi adicionado em cada loja óssea.

### **3.5 Preparação da Nanoprata**

As soluções de nanoprata na proporção de 660ppm foram produzidas e gentilmente cedidas pelo Professor Dr Guilherme Lenz, do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.

As nano partículas de prata foram sintetizadas utilizando uma solução 1,0 mmol/L de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ), adicionado gota a gota a 30 mL de ( $\text{NaBH}_4$ ) boro-hidreto de sódio, solução em 2,0 mmol . Foi adicionado  $\text{AgNO}_3$  lentamente, na frequência de 1 gota por segundo, em agitação magnética e banho de gelo. Após a alteração de coloração, a agitação foi interrompida e a solução contendo nano partículas de Prata foi armazenada sob refrigeração.

Em um tubo falcon de 50ml foi adicionado 10g de material carbonoso estéril e 40ml de solução de nanoprata 660ppm estéril. A mistura foi mantida por 24 horas e em seguida foi armazenada para implantação na cirurgia óssea na tíbia dos animais.

### **3.6 Protocolo de Tratamento**

A irradiação com laser de baixa intensidade foi realizada após o término da cirurgia para indução da lesão óssea e sutura dos tecidos, sendo aplicada em contato com a pele do animal em ângulo de  $90^\circ$  sobre a incisão cirúrgica, no local do defeito ósseo. Para garantir que a irradiação ocorresse no local da lesão, o ponto de irradiação foi definido conforme a medida efetuada para realizar o defeito ósseo, ou seja, 10mm abaixo da articulação do joelho em ponto único.

Os animais foram submetidos a 07 períodos de tratamento alternados, sendo o primeiro tratamento imediatamente após a cirurgia e os demais alternadamente, até o 12º dia de pós-operatório (0-2-4-6-8-10-12), conforme a figura 4.

Após 30 dias de indução da lesão, os animais foram anestesiados com hiperdose de cloridrato de Xilazina (30mg/ml) e Cloridrato de Cetamina (270mg/ml),

o sangue foi coletado via punção cardíaca para análises de Fosfatase Alcalina e após a eutanásia, a tíbia foi removida e conservada para análises morfológicas e biomecânicas.



Figura 4: Curso temporal do experimento de indução óssea e tratamento com laser de baixa intensidade. ( $\Delta$ ) Lesão óssea; ( $\uparrow$ ) Laserterapia; ( $\dagger$ ) Eutanásia.

Os parâmetros de irradiação foram definidos, de acordo com estudos anteriores realizados por Pallotta *et al* (2014) <sup>(40)</sup>, indicados no Quadro 1.

<input type="checkbox"/> Emissor de Luz Laser - Diodo (AsGaAl);
<input type="checkbox"/> comprimento de onda de 830nm;
<input type="checkbox"/> potência de 100mW;
<input type="checkbox"/> energia de 6J por ponto e emissão contínua;
<input type="checkbox"/> ponto único de aplicação;
<input type="checkbox"/> tempo de irradiação de 60 segundos;
<input type="checkbox"/> densidade de potência de 3,5 W/cm <sup>2</sup> ;
<input type="checkbox"/> densidade de energia de 214,28 J/cm <sup>2</sup> ,
<input type="checkbox"/> área de saída do feixe, no bico da caneta de 0,028cm

Quadro 1: Parâmetros Dosimétricos

### 3.7 Análise sanguínea – Dosagem de Fosfatase Alcalina (ALP)

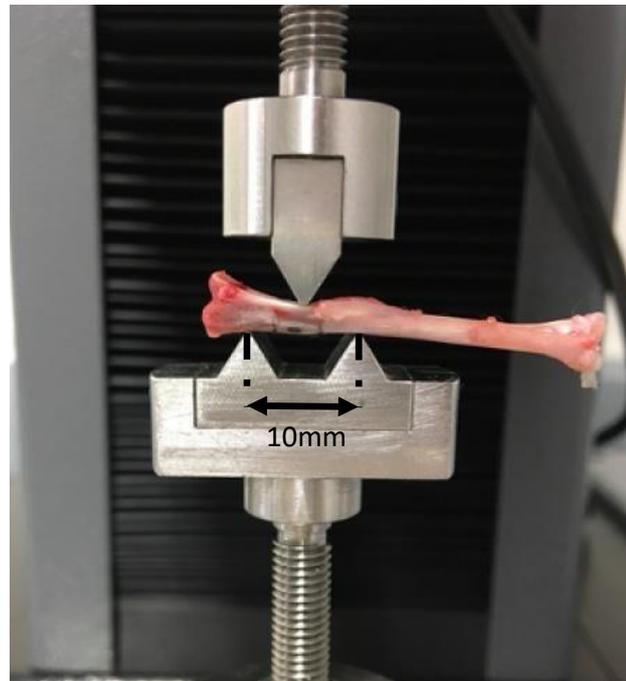
Para a quantificação da Fosfatase Alcalina, após 30 dias da indução da lesão, todas as ratas foram anestesiadas e antes da eutanásia foi coletado sangue sem uso de anticoagulante através da punção cardíaca nos ratos e colhido e acondicionado

em tubo plástico Eppendorff por volta de 3ml. Após 10 minutos da coleta, o tubo com o sangue foi centrifugado a 5000 rpm por 3 minutos para separação do soro e parte vermelha do sangue. O soro foi armazenado em outro tubo a  $-80^{\circ}\text{C}$  até sua utilização para a análise.

A reação para detecção dos níveis de ALP seguiu as seguintes etapas: Inicialmente a solução tampão (DEA) foi preparada e incubada por alguns minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Enquanto ocorreu a incubação, em placa de 96 poços, colocou-se  $2\mu\text{l}$  da amostra em cada poço da placa e foi adicionado  $200\mu\text{l}$  do reagente único, previamente incubado. A absorbância foi feita no comprimento de onda  $405\text{nm}$  a  $37^{\circ}\text{C}$ , no período de 03 minutos e 20 segundos, iniciando a leitura 20 segundos após começo da reação, outras leituras foram feitas em 1, 2 e 3 minutos após a primeira leitura, o cálculo foi feito pela absorbância de Fosfatase alcalina (U/l) a  $405\text{ nm} = \Delta A/\text{min} \times 5.460$ . Os valores foram 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. As análises seguiram as instruções do fabricante.

### **3.8 Análise da Propriedades Mecânicas**

Logo após a eutanásia, as tíbias direita e esquerda foram removidas e as medidas de largura, comprimento e altura foram aferidas. Foram simulados eventos de carga e descarga pelo dispositivo para ensaio de flexão (aparelho de teste biomecânico (EMIC2000) para ensaio de flexão em 3 pontos). A tíbia foi colocada horizontalmente, apoiada em 2 suportes metálicos (superior e inferior) e a distância foi ajustada para cada amostra, de acordo com o valor de sua espessura. O comprimento do corpo de prova foi padronizado para  $10\text{mm}$  (distância entre os pontos de contato do dispositivo inferior) e o dispositivo superior foi posicionado no centro do corpo de prova, mantendo  $5\text{mm}$  para cada lado e a região da lesão foi posicionada para baixo, conforme figura 4. O ensaio cíclico de flexão foi programado mantendo velocidade de carga e descarga de  $6\text{mm}/\text{min}$ . Foi acrescido  $0,3\text{mm}$  durante cada carregamento, até ocorrer a ruptura óssea. Em seguida foram analisados: - Força de ruptura máxima ( $F_{\text{max}}$ ); - Descolamento (mm) no momento da ruptura Máxima ( $D_{\text{max}}$ ).



*Figura 5: Posicionamento do osso tibial com a lesão óssea voltada para baixo no dispositivo para ensaio biomecânico de flexão em 3 pontos. Fonte: Autor*

### **3.9 Microscopia Óptica de Luz**

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  $\mu$ 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). As seguintes estruturas foram

observadas: Tecido de granulação (GT); região Medular (M) e cortical (C); Osteoblastos (OB); Osteoclastos (OC); presença de material carbonoso (CM), presença de canais vasculares (VC); Endósteo (ED) e regiões de transição para formação de tecido ósseo maduro (TA).

### **3.10 Análise Estatística**

Os dados foram expressos pela média e pelo desvio padrão da média. Os resultados serão submetidos à análise de variância (ANOVA) com pós teste de Bonferroni. Para confecção dos gráficos, foi utilizado o software GraphPad Prisma 5. O nível de significância estatístico será de  $p < 0,05$ .

## 4. Resultados

### 4.1 Níveis de Fosfatase Alcalina

Na figura 6, foi observado aumento nos níveis de fosfatase alcalina dos grupos CM, CM+NS e CM+NS+PBM quando comparados com o grupo NT. O grupo PBM apresentou discreta redução de fosfatase alcalina em relação ao grupo NT, porém sem significância.

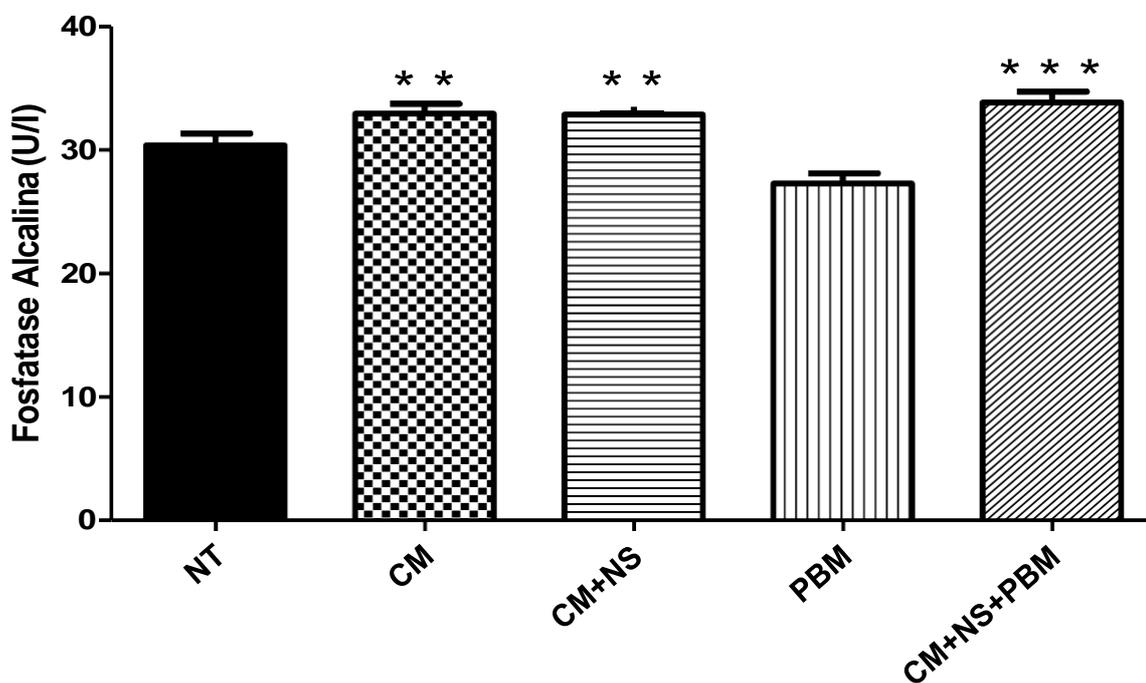
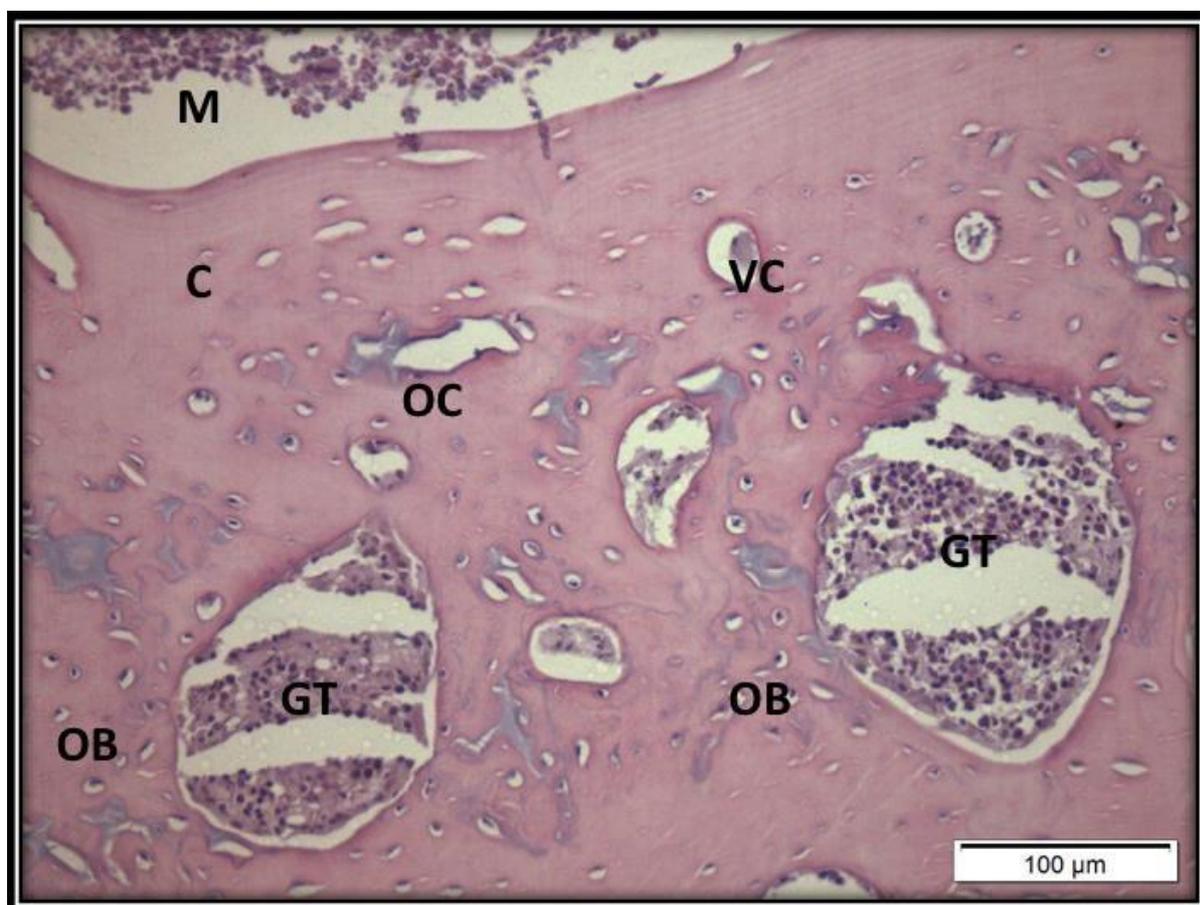


Figura 6: Gráfico dos níveis de fosfatase alcalina após 30 dias da indução da lesão óssea. Grupos: não tratado (NT); tratado com material carbonoso (CM); tratado com material carbonoso com nanoprata (NS); tratado com laserterapia (PBM) e tratamento associado de material carbonoso com nanoprata e laserterapia (CM+NS+PBM). N=4. \*\* $p < 0.01$  VS NT.

## 4.2 Análises Histológicas

Foram realizadas análises histológicas e avaliadas as diferenças na formação óssea nos diferentes grupos. Foram fotografadas as áreas de formação óssea 30 dias após a indução da lesão. A figura 7 representa o grupo não tratado (NT) com região cortical (C) e medular (M) bem definidas. Foi observado presença de tecido de granulação (GT), canais vasculares (VC) em formação e maior presença de osteoblastos (OB) concentrados próximos ao tecido de granulação. Foi observado a presença de osteoclasto (OC) próximo ao canal vascular.



*Figura 7: Fotomicrografia transversal da tíbia do grupo NT. Estruturas ósseas observadas: M= Camada Medular, C= Camada Cortical, GT= Tecido de Granulação, VC= Canal Vascular, OB= Osteoblasto, OC= Osteoclasto. Aumento de 20X; Coloração HE.*

A figura 8 representa o grupo tratado com material carbonoso (CM). Foram observados canais vasculares (VC) em formação e presença de populações de osteoblastos distribuídos de forma homogênea na camada cortical. Foi observado partículas de material carbonoso em áreas mais periféricas, na camada cortical.

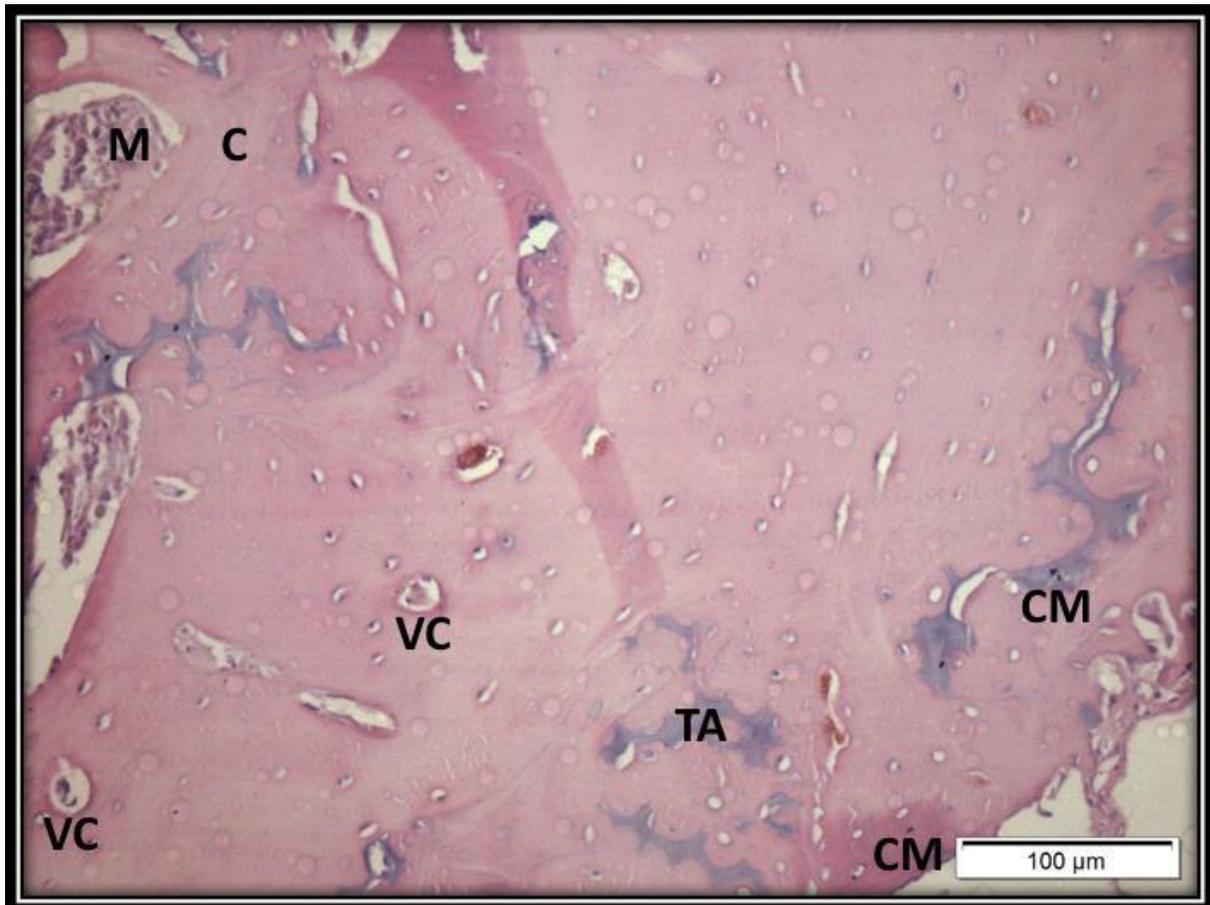
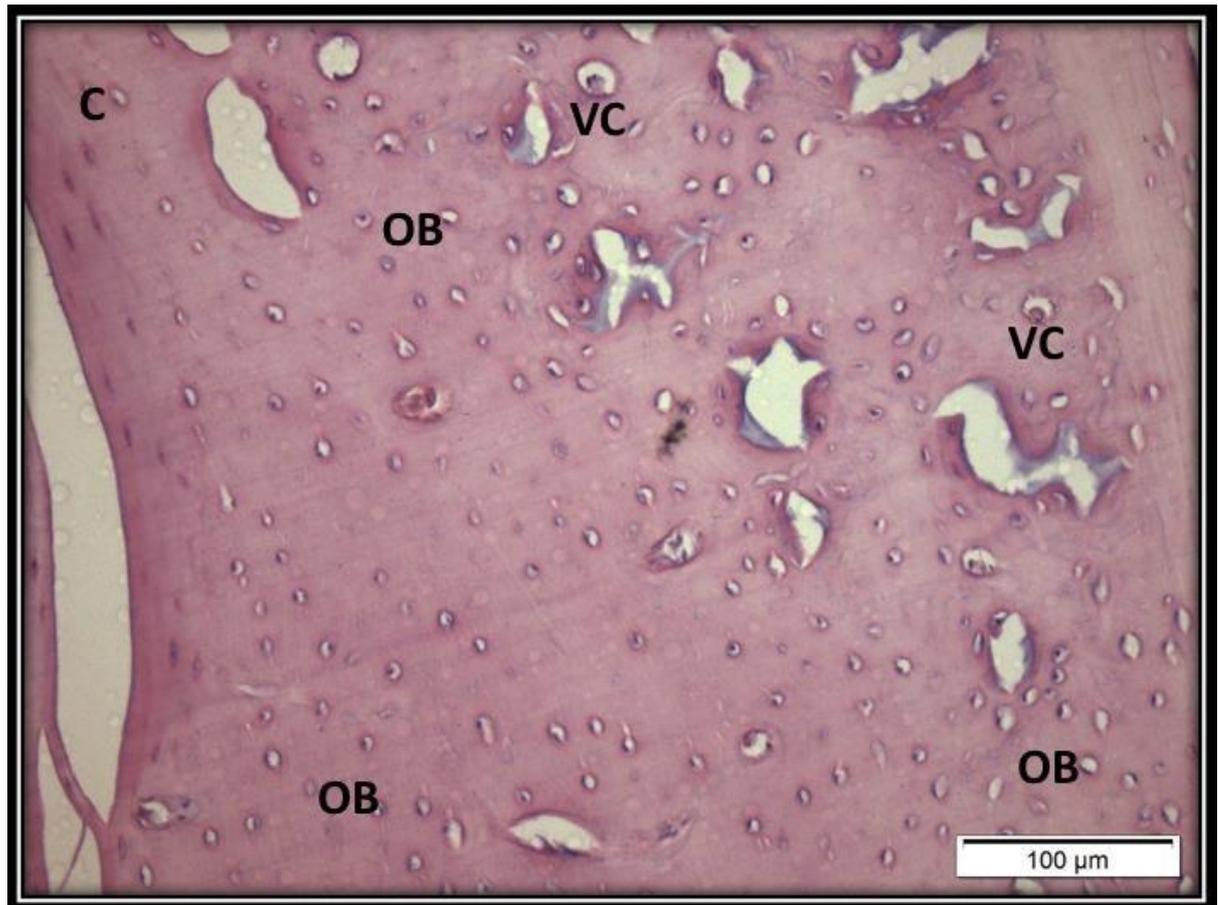


Figura 8: Fotomicrografia transversal da tíbia do grupo CM. Estruturas ósseas observadas: M= Camada medular, C= Camada Cortical, TA= Área de Transição, CM= material carbonoso, VC= Canal Vascular, OB= Osteoblasto. Aumento de 20X; Coloração HE.

A figura 9 representa a região cortical do grupo tratado com material carbonoso impregnado com nanop prata (CM+NS). Foram observados osteoblastos distribuídos de forma homogênea na camada cortical e presença de formação de canais vasculares (VC). Não foram observadas regiões com tecido de granulação.



*Figura 9: Fotomicrografia transversal da tíbia do grupo CM+NS. Estruturas ósseas observadas: C= Camada Cortical, VC= Canal Vascular, OB= Osteoblasto. Aumento de 20X; Coloração HE.*

A figura 10 representa o grupo tratado com fotobiomodulação (PBM) com região cortical (C) e medular (M) bem definidas. Foi observado osteoblastos (OB) distribuídos na maioria do tecido ósseo, na camada cortical (C) formado após 30 dias da indução da lesão. Foram observadas áreas de transição (TA) no tecido ósseo formado, além de canais vasculares (VC) e endóstio (ED) entre a camada medular e cortical.

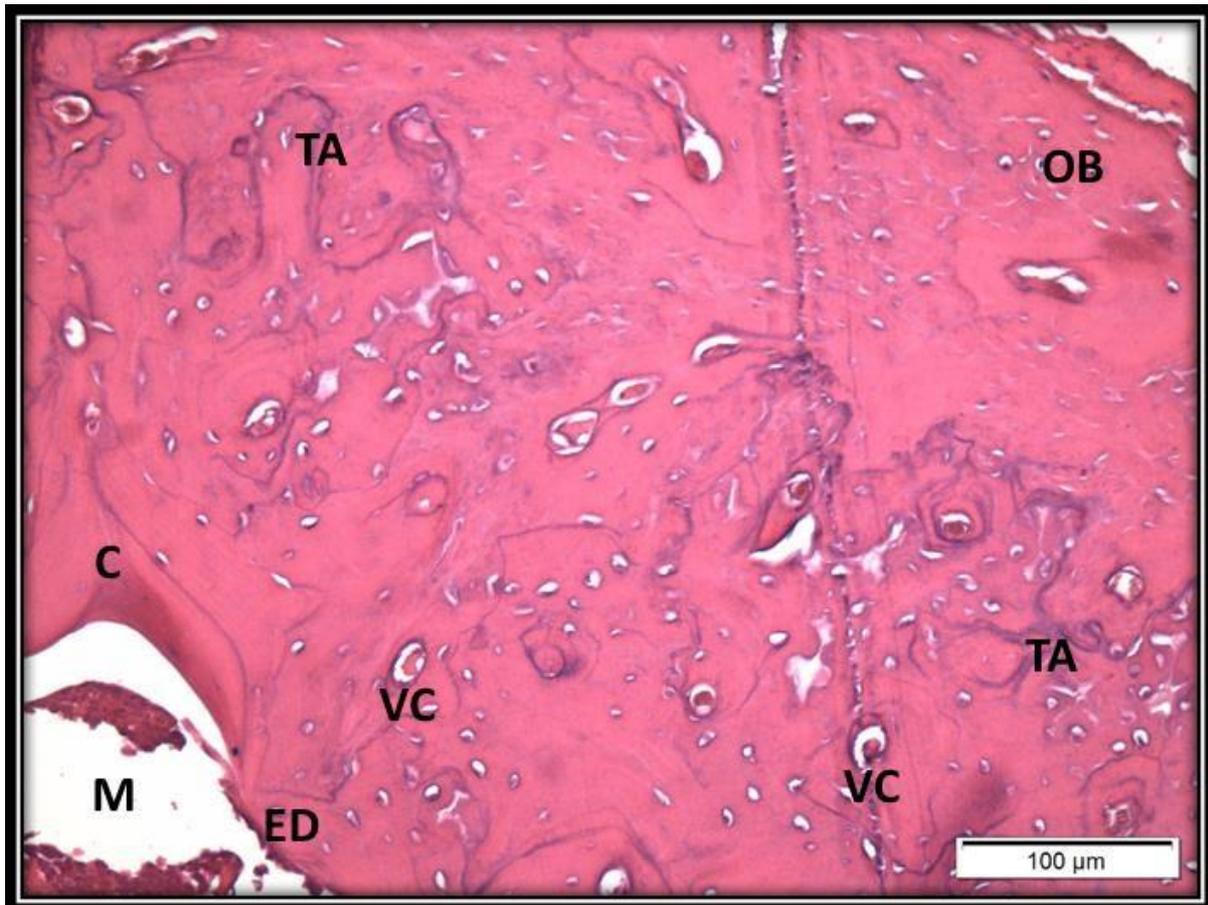
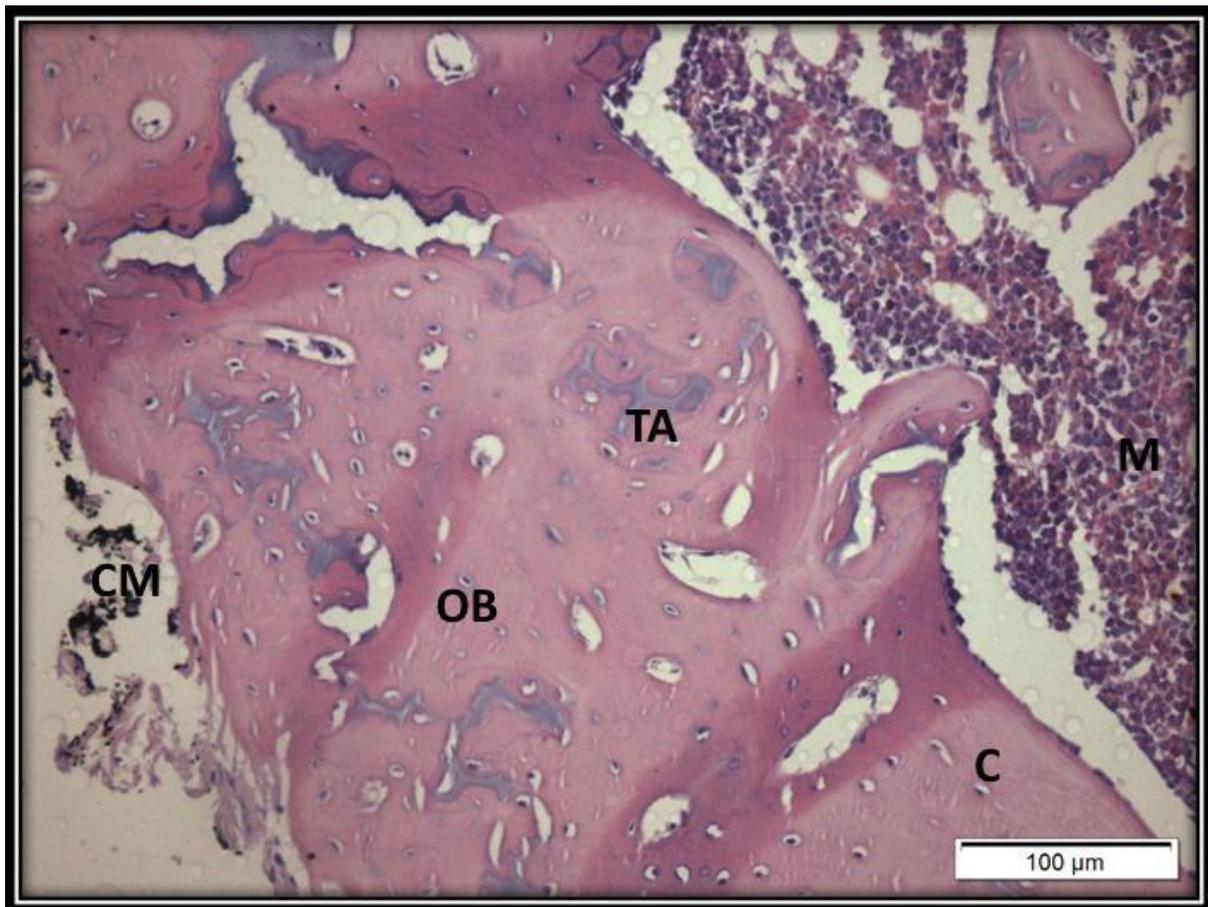


Figura 10: Fotomicrografia transversal da tíbia do grupo PBM. Estruturas ósseas observadas: M= Camada Medular, C= Camada Cortical, TA= Área de Transição, VC= Canal Vascular, ED= Endóstio, OB= Osteoblasto. Aumento de 20X; Coloração HE.

A figura 11 representa o grupo tratado com fotobiomodulação associada ao material carbonoso impregnado com nanop prata (CM+NS+PBM) com regiões cortical (C) e medular (M) bem definidas. Foi observado uma boa distribuição dos osteoblastos (OB) além de áreas de transição (TA) na camada cortical. Foi observado partículas do material carbonoso (CM) nas áreas mais periféricas da camada cortical.



*Figura 11: Fotomicrografia transversal da tíbia do grupo CM+NS+PBM. Estruturas ósseas observadas: M= Camara Medular, C= Camada Cortical, TA= Área de Transição, OB= Osteoblasto, CM= Material Carbonoso. Aumento de 20X; Coloração HE.*

Na figura 12 são apresentadas imagens histológicas representativas de cada grupo experimental (NT, CM, CM+NS, PBM, CM+NS+PBM) bem como o gráfico da fosfatase alcalina. Foi observado maior área de tecido de granulação no grupo NT em relação aos demais grupos. Quanto aos osteoblastos, foi observado uma distribuição mais homogênea das células nos grupos CM, CM+NS e CM+NS+PBM em relação aos demais grupos. O material carbonoso utilizado como material de preenchimento

das lesões óssea foi observado somente nos grupos CM e CM+NS+PBM. O grupo CM+NS apresentou menor área de transição entre tecido osseo primário e tecido osseo maduro. Canais vasculares em formação foram observados em todos os grupos. Os grupos CM, CM+NS e CM+NS+PBM apresentaram aumento dos níveis de fosfatase alcalina, quando comparados ao grupo NT.

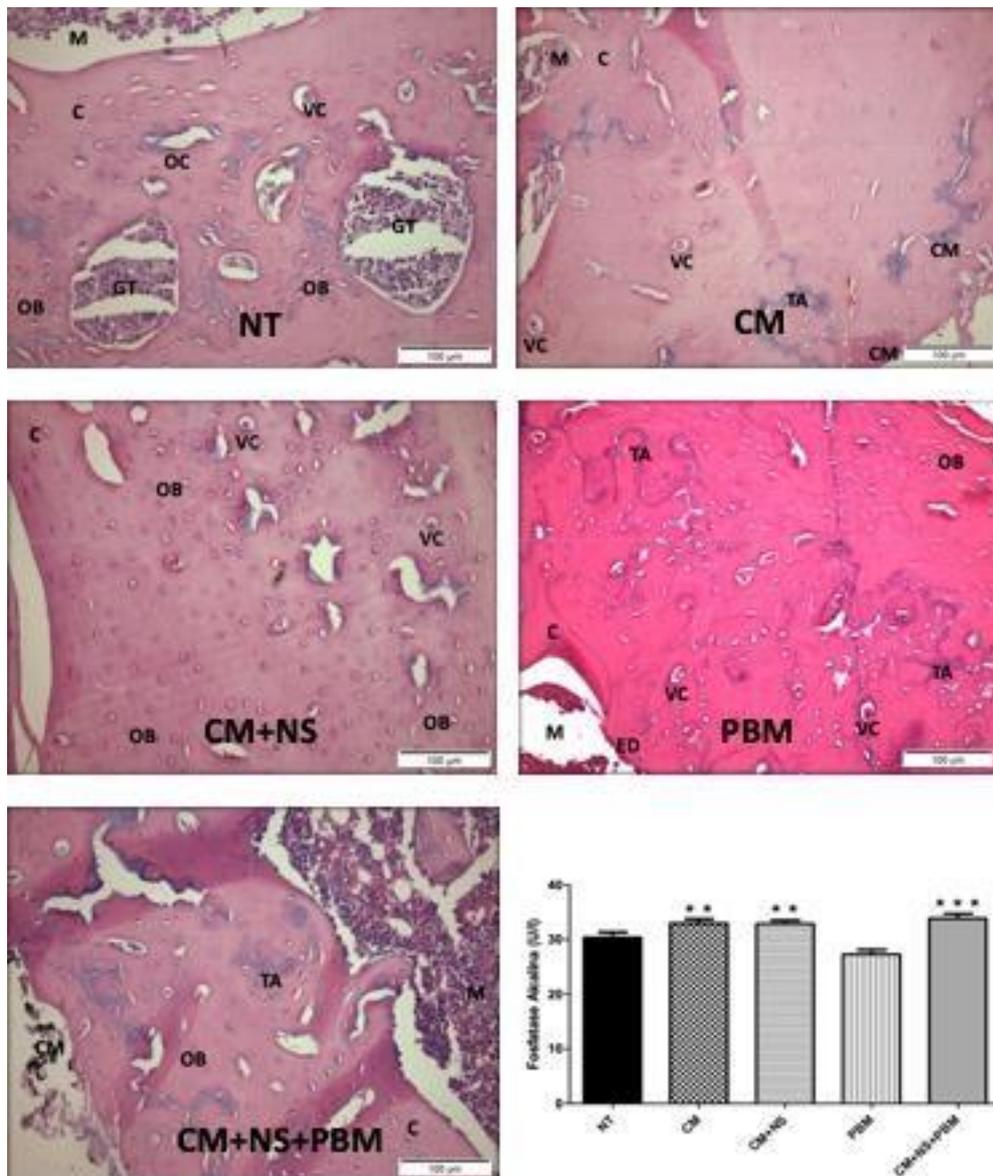


Figura 12: Prancha com fotomicrografias dos cortes histológicos da tíbia dos grupos NT, CM, CM+NS, PBM, CM+NS+PBM e gráfico da fosfatase alcalina dos mesmos grupos.

### 4.3 Análises Biomecânicas

Foram realizados os ensaios biomecânicos de flexão para cálculo da força máxima e deformação máxima no momento de ruptura óssea para avaliação das propriedades mecânicas  $F_{max}$  e  $D_{max}$ .

A figura 13 representa o gráfico da força máxima do ensaio de flexão no momento da ruptura óssea. Podemos observar neste gráfico que todos os grupos tratados obtiveram um aumento dessa força quando comparados ao grupo não tratado (NT), porém, os grupos tratados com material carbonoso impregnado com nanop prata (CM+NS) e com o uso associado da fotobiomodulação com o material carbonoso impregnado com nanop prata (CM+NS+PBM) tiveram um aumento significativo quando comparados ao grupo não tratado (NT).

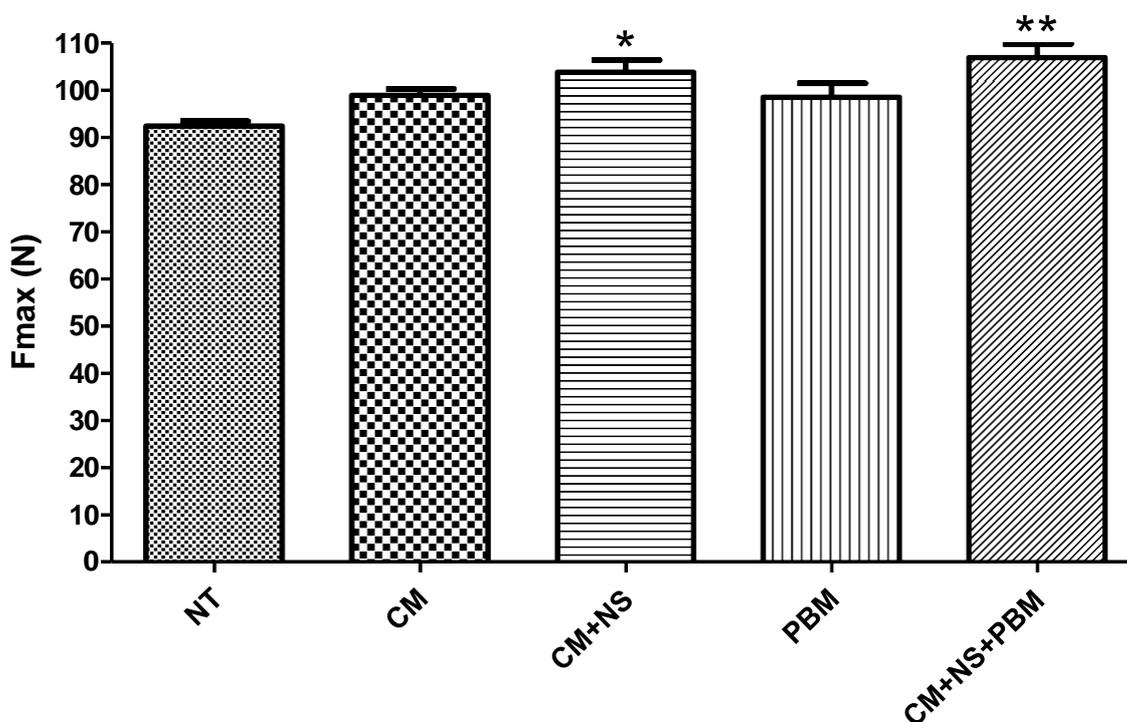


Figura 13: Gráfico  $F_{max}$  no momento da ruptura óssea.

Grupos: não tratado (NT); tratado com material carbonoso (CM); tratado com material carbonoso com nanop prata (NS); tratado com laserterapia (PBM) e tratamento associado de material carbonoso com nanop prata e laserterapia (CM+NS+PBM).  $N=5$ .

A figura 14 representa o gráfico da deformação máxima atingida no momento da ruptura, relacionada a capacidade do deslocamento do material. Podemos observar que somente o grupo tratado com fotobiomodulação (PBM) obteve um aumento significativo dessa deformação quando comparado ao grupo não tratado (NT). Os demais grupos não tiveram alterações significativas quando comparados ao grupo não tratado (NT).

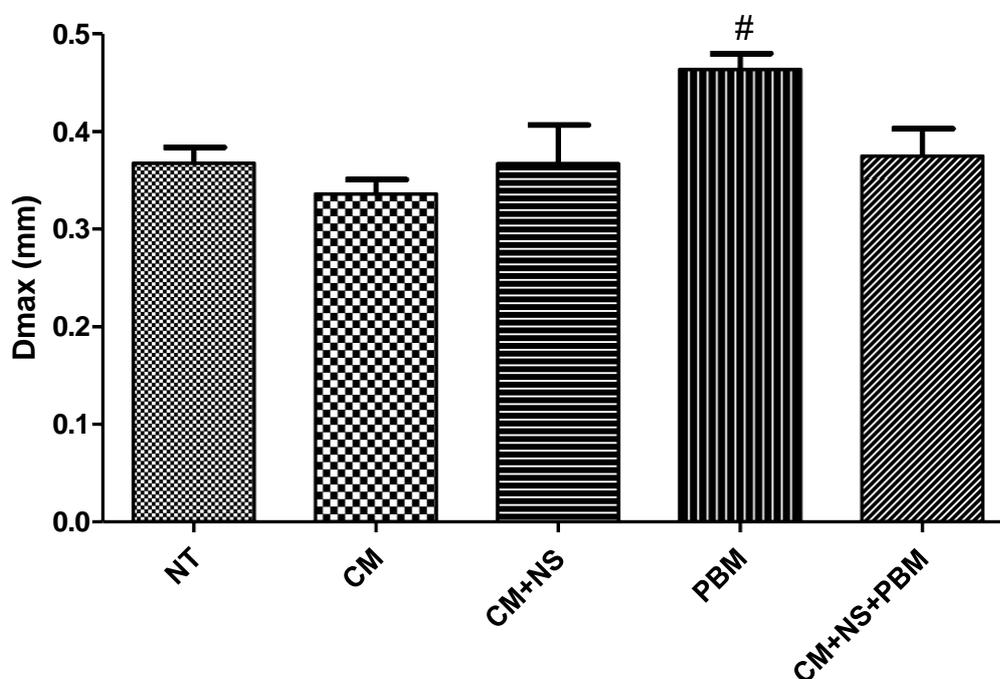


Figura 14: Gráfico Dmax no momento da ruptura óssea.

Grupos: não tratado (NT); tratado com material carbonoso (CM); tratado com material carbonoso com nanoprata (NS); tratado com laserterapia (PBM) e tratamento associado de material carbonoso com nanoprata e laserterapia (CM+NS+PBM). N=4.

A figura 15 representa o gráfico da relação entre Fmax e Dmax, e podemos observar que o grupo tratado com material carbonoso (CM) apresentou um deslocamento para esquerda, isto é, um aumento do ângulo da relação entre a Fmax e Dmax. O grupo fotobiomodulação (PBM) apresentou um deslocamento para a direita, isto é, uma diminuição do ângulo da relação entre Fmax e Dmax. Os grupos tratados com o material carbonoso impregnado com nanoprata (CM+NS) e material carbonoso

impregnado com nanop prata associado a fotobiomodulação (CM+NS+PBM) apresentaram um ângulo muito próximo da relação entre Fmax e Dmax.

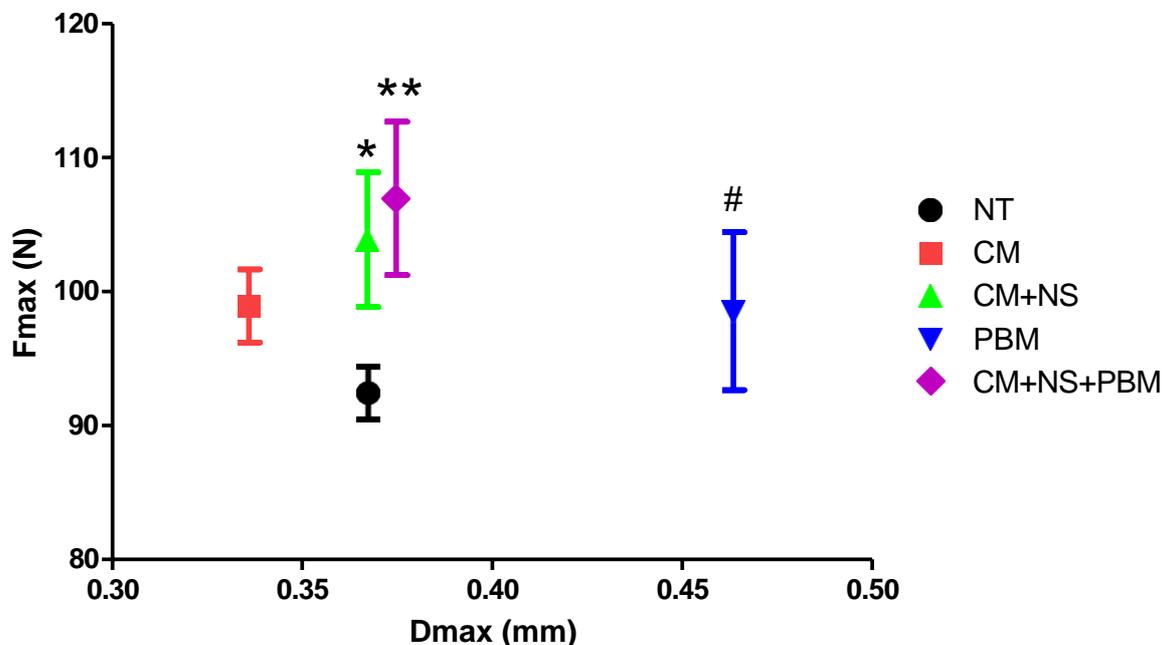


Figura 15: Gráfico sobreposição Fmax e Dmax no momento da ruptura óssea. Grupos: não tratado (NT); tratado com material carbonoso (CM); tratado com material carbonoso com nanop prata (NS); tratado com laserterapia (FBM) e tratamento associado de material carbonoso com nanop prata e laserterapia (CM+NS+PBM).

\* $p < 0,05$  vs NT-Fmax e \*\* $p < 0,01$  vs NT-Fmax; # $p < 0,05$  vs NT-Dmax. N=4.

O quadro 2 representa a comparação dos resultados através de símbolos que representam melhora ou piora das características após a realização do experimento. Todos os grupos apresentaram melhoras das características para as análises da fosfatase alcalina, Fmax e morfológicas, com destaque para o grupo CM+NS+PBM.

QUADRO COMPARATIVO DE RESULTADOS vs NT				
Análises	CM	CM+NS	PBM	CM+NS+PBM
ALP	↑	↑	=	↑↑
Fmax	=	↑	=	↑↑
Dmax	↓	=	↑	=
Histológica	↑	↑↑	↑	↑↑

Quadro 2: Comparação de resultados dos grupos experimentais CM, CM+NS, PBM, CM+NS+PBM comparados ao grupo NT. Símbolos: (=) para resultados similares e (↑) ou (↓) para aumento ou redução proporcional ao número de símbolos utilizados.

## 5. Discussão

Neste trabalho, foi observado que o uso associado da fotobiomodulação com o material carbonoso impregnado com nanop prata não prejudicou o reparo ósseo. Neste caso houve manutenção das propriedades biomecânicas e adequado nível de fosfatase alcalina, levando a um tecido ósseo organizado constatado na avaliação das lâminas histológicas. Os resultados obtidos nesse trabalho podem ser atribuídos a utilização do material carbonoso impregnado por nanopartículas de prata irradiado pela luz laser no momento do reparo das lesões ósseas nas tíbias dos ratos. Os resultados bioquímicos, histológicos e biomecânicos claramente demonstram um benefício do reparo ósseo no grupo tratado com o biomaterial proposto pelo nosso grupo de pesquisa quando este foi associado a fotobiomodulação, já que estatisticamente os resultados obtidos para esse grupo foram qualitativamente superiores ao grupo que não recebeu tratamento.

No grupo não tratado (NT) houve a redução das propriedades mecânicas, a histologia apresentou desorganização tecidual devido a presença de grande quantidade de tecido de granulação e a fosfatase alcalina alta mostrando que ainda esta havendo formação óssea. Esse cenário já foi observado em outros trabalhos como o de Bossini, *et al* <sup>(34)</sup>, onde as propriedades mecânicas do grupo que se submeteu a lesão óssea e não foi tratado com nenhum material de preenchimento nem com a fotobiomodulação foram piores quando comparadas ao grupo submetido a lesão óssea tratado com um material de preenchimento em associação a fotobiomodulação com 120 J/cm quadrado. No grupo (NT) os piores resultados para as propriedades mecânicas associado a desorganização tecidual apresentada na análise histológica, bem como a distribuição irregular e a pouca quantidade de osteoblastos denotam um atraso no reparo ósseo. O alto nível da fosfatase alcalina apresentado por esse grupo que não recebeu tratamento pode nos sugerir que a fase de formação óssea ainda seja a de remodelamento ósseo ou ainda de início da formação óssea. O baixo nível de fosfatase alcalino para o grupo não tratado (NT) em relação aos demais grupos pode estar associado a uma menor quantidade de osteoblastos presente nesse grupo. A fosfatase alcalina é uma enzima considerada um marcador bioquímico responsável pela iniciação da mineralização da matriz extra

cellular durante o reparo ósseo. Segundo Hideo Orimo <sup>(41)</sup>, podemos definir marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo como substâncias que retratam a formação bem como a reabsorção ósseas. Como a formação é dependente da ação dos osteoblastos, os marcadores de formação, na realidade, medem produtos decorrentes da ação destas células. A fosfatase alcalina é expressa na membrana celular dos osteoblastos, e a pouca quantidade de osteoblastos observada na lâmina do grupo não tratado (NT) nos remete a uma fase ainda não completa do reparo ósseo.

Com o intuito de desenvolver um biomaterial que possa ser apropriado para o favorecimento do reparo ósseo, com um baixo custo, e ainda por cima sustentável, este estudo se propôs avaliar e sugerir a utilização de um material carbonoso nas lojas cirúrgicas realizadas sobre as tíbias de ratos Wistar machos. O grupo tratado com material carbonoso (CM) obteve uma melhora das características histológicas em relação ao grupo não tratado por apresentar uma melhor distribuição, assim como uma maior quantidade de osteoblastos. A fosfatase alcalina deste grupo tratado com o material carbonoso apresentou um nível significativamente mais alto em relação ao grupo não tratado. Esses resultados sugerem que o grupo CM está numa fase mais adiantada do reparo ósseo em relação ao grupo NT. Comparativamente com o grupo não tratado, o grupo tratado com o material carbonoso (CM) apresentou mais organização das células e menos tecido de granulação, denotando um estágio mais avançado do reparo ósseo, bem como fragmentos do material carbonoso na lâmina histológica, corroborando com o trabalho de Pallotta (2014) <sup>(40)</sup>. Quanto as suas propriedades mecânica, o grupo (CM) sofreu um leve aumento da força máxima e uma leve diminuição da deformação máxima no momento da ruptura, quando comparados ao grupo (NT), ambos sem significância, o que quer dizer que não prejudicaram ou favoreceram as propriedades mecânicas para esse grupo especificamente.

O grupo tratado com material carbonoso impregnado com nanop prata (CM+NS) foi o que obteve melhores características histológicas por apresentar a melhor distribuição de osteoblastos observados no microscópio óptico, ausência de tecido de granulação e poucas área de transição, e esses achados, conjuntamente com o alto nível da fosfatase alcalina, bem como um aumento da força máxima no momento da

ruptura, demonstram uma melhora das propriedades mecânicas, e sugerem um reparo ósseo bem adiantado em relação ao grupo que não recebeu tratamento (NT). As excelentes características histológicas encontradas especificamente para o grupo tratado com o material carbonoso impregnado por nanop prata podem ser atribuídas a uma possível desinfecção gerada pelas propriedades antimicrobianas da nanop prata. Um material que supra a necessidade de utilização de antibiótico sistêmico para o pós operatório de uma cirurgia óssea, seja ela do tipo que for, representaria uma otimização e um avanço em relação à pratica realizada nos dias atuais, onde o uso indiscriminado de antibióticos pelos profissionais da saúde é recorrente e provoca o fenômeno da resistência bacteriana aos antibióticos, que já é um dos problemas de saúde pública mais graves atualmente, estando associada ao uso inadequado de antibióticos, apresentando consequências clínicas e econômicas preocupantes relacionados com o aumento da morbidade e mortalidade <sup>(42-44)</sup> devido aos atrasos na administração de tratamentos eficazes contra as infecções causadas por bactérias resistentes.

O desenvolvimento de resistência bacteriana aos antibióticos é um fenômeno natural resultante da pressão seletiva exercida pelo uso de antibióticos, mas que tem sofrido uma expansão muito acelerada devido à utilização inadequada destes fármacos, existindo uma correlação muito clara entre um maior consumo de antibióticos e níveis mais elevados de resistência microbiana, Segundo Loureiro at al) <sup>(45)</sup>.

Nenhum antibiótico foi utilizado como forma de prevenção de infecção para nenhum dos grupos experimentais para este experimento realizado pelo nosso grupo de pesquisa, portanto, este trabalho pretende, assim, alertar para a importância do problema da resistência microbiana na saúde pública atualmente, da mesma forma que também propõe o desenvolvimento de um novo biomaterial impregnado por nanop prata, exercendo dessa forma uma propriedade antibacteriana que poderia substituir o uso dos antibióticos.

Em diversos trabalhos já foi demonstrado que a nanop prata possui um amplo espectro de atividade antibacteriana, bem como seu uso no desenvolvimento de biomateriais resistentes a infecção <sup>(46-49)</sup>. As nanopartículas de prata tem se mostrado efetiva contra as bactérias gram positivas e negativas, fungos, filamentosos, leveduras e vírus, também possuem grande área interfacial, permitindo maior eficiência para penetração em fissuras celulares. Em relação à toxicidade para as

células animais, a prata é o material que apresenta a menor toxicidade<sup>(50,51)</sup>. A nanop prata exerce um papel antimicrobiano sinérgico a diversos antibioticos<sup>(52)</sup>. Materiais impregnados por nanop prata apresentam boa compatibilidade celular e sanguínea<sup>(53)</sup> e alguns desses biomateriais tem sido estudados na forma de ensaios clínicos em pacientes ortopédicos<sup>(46,47)</sup>.

Apesar de alguns estudos e aplicações clínicas das nanopartículas de prata já estarem presentes no nosso cotidiano, existe ainda uma preocupação a respeito do uso da prata sob o aspecto de segurança e toxicidade que limita sua implantação mais recorrente em implantes e enxertos na área da Ortopedia, e as informações acerca das concentrações adequadas encontradas na literatura permanecem contraditórias<sup>(46,47,53,54)</sup>.

O mecanismo de ação antimicrobiana proposto para as nanopartículas de prata refere-se à interação com grupos que contêm os elementos enxofre e fósforo, que são encontrados tanto nas membranas celulares como no citoplasma das bactérias. Sua interação ocorre com a membrana celular dos microrganismos, causando danos ao processo de respiração celular, e, no interior das células, interagem com o DNA, impedindo a divisão celular, Segundo Morones et al. 2005<sup>(39)</sup>.

Nesse contexto, este trabalho objetivou avaliar a atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata associada ao material carbonoso, e constatou-se que houve um benefício no reparo ósseo dos ratos que se submeteram a lesão tibial. Todos os animais submetidos a lesão óssea e que receberam o tratamento com a nanop prata impregnada ao material carbonoso não desenvolveram nenhum tipo de infecção ou complicação pós operatória, o que nos leva a crer que o efeito antibacteriano das nanopartículas de prata fizeram bem seu papel antimicrobiano.

Outro pilar terapêutico principal analisado no trabalho proposto pelo nosso grupo de pesquisa foi a aplicação da luz laser sobre a lesão óssea com a finalidade de se obter algum benefício no reparo ósseo nas tíbias dos ratos. O grupo tratado com fotobiomodulação (PBM) obteve uma redução do nível de fosfatase alcalina e da força máxima no momento da ruptura em relação ao grupo não tratado (NT), mas sem significância. Em contraponto, sofreu um aumento significativo da deformação máxima no momento da ruptura. Na deformação por ruptura o corpo rompe-se em duas ou mais partes. A ruptura acontece quando um corpo recebe uma tensão inicialmente maior daquela que produz a deformação plastica; essa tensão tende a

diminuir após o início do processo. Esse dado pode ser interessante se levarmos em consideração a necessidade funcional do osso que clinicamente pode ser reabilitado através de um tratamento onde somente a fotobiomodulação fosse aplicada. Nosso trabalho, avaliou os níveis da fosfatase alcalina 30 dias após a indução da lesão óssea, e é muito semelhante ao trabalho de Rodrigues *et al*<sup>(55)</sup>, onde foram realizadas análises bioquímicas para avaliar os níveis de fosfatase alcalina nos sangues coletados dos animais submetidos a extração dentária e avaliação do reparo ósseo em diferentes grupos, num período de 28 dias após a indução da lesão óssea e foi observado uma importante redução nos níveis de fosfatase alcalina do grupo irradiado com laser de baixa intensidade, sem uso de biomaterial quando comparado aos grupos que receberam o material carbonoso, e esse mesmo grupo PBM apresentou discreta redução em relação ao grupo NT, porém sem significância. A ação da irradiação da luz laser sobre o tecido ósseo foi inicialmente descrita por Mester *et al*<sup>(56)</sup>, em 1972, onde observou-se a acelerada reparação da ferida no osso. O autor ressaltou que a dosimetria é fundamental para que os parâmetros de irradiação sejam seguros e eficazes na utilização do laser de baixa intensidade. 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<sup>(31,40)</sup>. Neste trabalho, os resultados obtidos para o grupo experimental que recebeu tratamento com a laserterapia foram semelhantes a outros já publicados na literatura<sup>(40,57)</sup>, que também utilizaram os parâmetros de irradiação de energia de 6 J, potência de 100mW e com tempo de irradiação de 60 segundos sobre a lesão óssea, e a partir do 28º após a indução da lesão, foi observado um processo de reparo mais avançado do grupo que se submeteu a fototerapia, com presença de calo ósseo maduro e formação mais adiantada do osso previamente lesionado em relação ao grupo não irradiado, logo, podemos concluir que a irradiação provocou um efeito bioestimulante positivo no estágio inicial da cicatrização óssea em relação aos grupos não irradiados. No nosso trabalho, os resultados mais interessantes encontrados no experimento foram do grupo tratado com o uso associado da fotobiomodulação com o material carbonoso impregnado com nanop prata (CM+NP+PBM), que após as análises realizadas, apresentou uma fase mais adiantada no reparo ósseo. Os resultados histológicos nos forneceram informações importantes da progressão do reparo ósseo nos diferentes tratamentos, e no grupo (CM+NP+PBM), a boa

distribuição dos osteoblastos observada no corte histológico aliada a maior produção de fosfatase alcalina por esses osteoblastos denota um adiantamento o tempo de reparo ósseo. Ozawa et al. e Stein et al.<sup>(58,27)</sup> também evidenciaram que o laser com comprimento de onda de 830nm foi eficiente para estimular a proliferação celular de osteoblastos resultando em um aspecto ósseo mais organizado. Outro dado que corrobora para a adjetificação de bons resultados foram os aqueles obtidos na força máxima no momento de ruptura óssea para esse grupo CM+NS+PBM, onde a maior Fmax foi obtida e aumentou significativamente em quando comparada ao grupo NT, no ensaio de flexão. Alguns autores sugerem que a terapia laser é capaz de promover um aumento da força mecânica após uma fratura. Rennó et al encontraram que o laser é capaz de acelerar a ação de osteoblastos em áreas de fraturas<sup>(31)</sup>. Nosso trabalho propôs um ensaio de flexão sobre a área da lesão óssea utilizando o ensaio ciclico de flexão em três pontos com uma carga suficiente até que provocasse a ruptura da tibia do animal. O ensaio de flexão foi utilizado para determinar as propriedades mecânicas de resistência à flexão e módulo de deformação sob flexão, e consiste na aplicação de uma carga crescente e ciclica em um determinado ponto de uma barra, no nosso trabalho especificamente, a tibia do animal. Essas propriedades foram importantes para avaliar o desempenho do material avaliado quando submetido a uma carga de flexão, simulando uma situação real da vida cotidiana. As melhoras encontradas nas propriedades mecânicas nos grupos experimentais do nosso estudo podem ser atribuídas não só pelo biomaterial utilizado, mas também pela associação da fotobiomodulação utilizada no trabalho, assim como demonstrado em diversos trabalhos realizados anteriormente e que obtiveram um benefício com a fototerapia no reparo ósseo<sup>(3,9,32,34)</sup>. De fato, os resultados obtidos no nosso trabalho corroboram com a tese que a fotobiomodulação é capaz de aumentar a atividade osteoblástica, estimular a síntese de RNA e DNA e a síntese de proteínas, promover a diferenciação precoce de células osteoprogenitoras em osteoblastos maduros<sup>(58)</sup>, estimular o aumento dos níveis da fosfatase alcalina<sup>(41)</sup>. Essas características oferecidas pelo tratamento da fotobiomodulação parecem contribuir para uma aceleração no processo do reparo ósseo .

Nosso trabalho demonstrou que o grupo que associa a fotobiomodulação ao material carbonoso impregnado com nanoprata (CM+NS+PBM) obteve os melhores resultados de maneira geral, frente às análises realizadas, demonstrando que o

material carbonoso impregnado com nanoprata irradiado pelo laser não prejudica o reparo ósseo mas consegue promover um benefício adicional ao reparo.

## 6. Conclusão

Com base nos resultados obtidos e nos artigos científicos pesquisados, podemos concluir que o tratamento realizado com a fotobiomodulação utilizando comprimento de onda de 830nm, potência de 100mW e energia de 6J associado ao material carbonoso impregnado por nanop prata promoveu benefícios adicionais ao reparo ósseo no modelo de lesão de tibia de ratos, em todas as análises realizadas neste trabalho: bioquímica, morfológica e biomecânica.

O material carbonoso impregnado por prata irradiado pelo laser de baixa intensidade foi capaz de acelerar a formação óssea pelo aumento da concentração da fosfatase alcalina, presença de um tecido ósseo organizado morfológicamente e melhoria das propriedades mecânicas do tecido neoformado.

## 7. Referências Bibliográficas

1. Gawryszewski, V.P.; Koizumi, M.S.; Mello-Jorge, M.H.P.; Morbidity and mortality from external causes in Brazil, 2000. *Cad. Saúde Públ.*, v.20, n.4, p.995-1003, 2004.
2. DATASUS. Sistema de Internações Hospitalares (SIHSUS). Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde, Disponível em: <> <http://datasus.saude.gov.br/>.
3. Fávaro-Pipi, E.; Bossini, P.; De Oliveira, P.; Ribeiro, J.U.; TIM, C.; Parizotto, N.; Alvez, J.M.; Ribeiro, D.A.; Selistre De Araújo, H.S.; Renno, A.C. Low-intensity pulsed ultrasound produced an increase of osteogenic genes expression during the process of bone healing in rats. *Ultrasound Med. Biol.*, v.36, n.12, p.2057-2064, 2010.
4. Hadjiargyrou, M.; Lombardo, F.; Zhao, S.; Ahrens, W.; Joo, J.; Ahn, H.; Jurman, M.; White, D.W.; Rubin, C.T. Transcriptional profiling of bone regeneration. Insight into the molecular complexity of wound repair. *J. Biol. Chem.*, v.277, n.33, p.30177-30182, 2002.
5. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury*. 2005 Dec;36(12):1392-404. Epub 2005 Aug 15.
6. Sun, S., Bone disease drug discovery: examining the interactions between osteoblast and osteoclast. *Expert Opin Ther Targets*, 2008. 12(2): p. 239-51.
7. Schindeler, A.; McDonald, M.M.; Bokko, P.; Little, D.G. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, v.19, n.5, p.459-466, 2008.
8. Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Developmental aspects of fracture healing and the use of pharmacological agents to alter healing. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2003 Dec;3(4):297-303; discussion 320-1.
9. Bossini, P.S.; Renno, A.C.M.; Ribeiro, D.A.; Fangel, R.; Peitz, O.; Zanotto, E.D.; Parizotto, N.A. Biosilicate® and low-level laser therapy improve bone repair in osteoporotic rats. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, v.5, p.229-337, 2011.
10. Abo-ElSaad, N.S.; Soory, M.; Gadalla, L.M.A.; Ragab, L.I.; Dunne, S.; Zalata, K.R.; Louca, C. Effect of soft laser and bioactive glass on bone regeneration in the treatment of infra-bony defects (a clinical study). *Lasers Med. Sci.*, v.24, p.387-395, 2009.
11. Oonishi, H.; Hench, L.L.; Wilson, J.; Sugihara, F.; Tsuji, E.; Matsuura, M.; Kin, S.; Yamamoto, T.; Mizokawa, S. Quantitative comparison of bone growth behavior in granules of Bioglass, A-W glass-ceramic, and hydroxyapatite. *J. Biomed. Mater. Res.*, v.51, n.1, p.37-46, 2000.
12. Vieira, J.G.H. Considerações Sobre os Marcadores Bioquímicos do Metabolismo Ósseo e sua Utilidade Prática. *Arq Bras Endocrinol Metab* vol.43 no.6, 1999

13. Moura, J.; Teixeira, L.N.; Ravagnani, C.; Peitl-Filho, O.; Zanotto, E.D.; Beloti, M.M.; Panzeri, H.; Rosa, A.L.; Oliveira, P.T. In vitro osteogenesis on a highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate®). *J. Biomed. Mater. Res. A.*, v.82, p.545-557, 2007.
14. Henkel, J.; Woodruff, M.A.; Epari, D.R.; Steck, R.; Glatt, V.; Dickinson, I.C.; Choong, P.F.M.; Schuetz, M.A.; Hutmacher, D.W. Bone regeneration based on tissue engineering conceptions – a 21<sup>st</sup> century perspective. *Bone Research.*, v.3, p.216-248, 2013.
15. Miranda, E.S.; Cardoso, F.T.S.; Medeiros-Filho, J.F.; Barreto, A.D.R.; Teixeira, R.M.M.; Wanderley, A.L.; Fernandes, K.E. Organic and Inorganic Bone Graft use in Rabbits' radius surgical fractures repair: an experimental and comparative stud. *Acta Ortop. Bras.*, v.13, n.5, p.245-248, 2005.
16. Oliveira, P.; Fernandes, K.R.; Sperandois, E.F.; Pastor, F.A.; Nonakas, K.O.; Parizotto, N.A.; Renno, A.C.M. Comparative study of the effects of low-level laser and low-intensity ultrasound associated with biosilicate® on the process of bone repair in the rat tibia. *Rev. Bras. Ortop.*, v.47, n.1, p.102-107, 2012.
17. Flausse, A.; Henrionnet, C.; Dossot, M.; Dumas, D.; Hupont, S.; Pinzano, A.; Mainard, D.; Galois, L.; Magdalou, J.; Lopez, E.; Gillet, P.; Rousseau, M. Osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in hydrogel containing nacre powder. *J. Biom. Mat. Res.*, v.101A, n.11, p.3211-3218, 2013.
18. Reswan, K.; Chen, Q.Z.; Blaker, J.J.; Boccaccini, A.R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.*, n. 27, p. 3413–3431, 2006.
19. Marsh, H.; Heintz, E.A.; Rodriguez-Reinoso, F. Introduction to carbon Technologies. Alicante:Universidad, 1997.
20. Lee SJ. Cytokine delivery and tissue engineering. *Yonsei Med J.* 41(6):704–19, 2000.
21. De Castro e Silva Júnior O.; Zucoloto S, Menegazzo L.A.; Granato R.G.; Marcassa L.G.; Bagnato V.S. Laser enhancement in hepatic regeneration for partially hepatectomized rats. *Lasers Surg Med.* 2001;29(1):73–7.
22. Karu T.I. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser irradiation. *Dokl Akad Nauk SSSR.* 1986;291(5):1245–9.
23. Schaffer M.; Bonel H.; Sroka R.; Schaffer P.M.; Busch M.; Reiser M. et al. 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.* janeiro de 2000;54(1):55–60.
24. Kiyozumi T. Low level diode laser treatment for hematomas under grafted skin and its photobiological mechanisms. *Keio J Med.* dezembro de 1988;37(4):415–28.

25. Khadra, M.; Ronold, H.J.; Lyngstadaas, S.P.; Ellingsen, J.E.; Haanaes, H.R. Low-level laser therapy stimulates bone-implant interaction: an experimental study in rabbits. *Clin. Oral Impl. Res.*, v.15, n.3, p.325-332, 2004.
26. Nissan, J.; Assif, D.; Gross, M.D.; Yaffe, A.; Binderman, I. Effect of low intensity laser irradiation on surgically created bony defects in rats. *J. Oral Rehabil.*, v.33, n.8, p.619-624, 2006.
27. 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.*, v.120, n.3-4, p.112-117, 2008.
28. Ribeiro, D.A.; Matsumoto, M.A. Low-level laser therapy improves bone repair in rats treated with anti-inflammatory drugs. *J. Oral Rehabil.*, v.35, n.12, p.925, 2008.
29. Blaya, D.S.; Guimarães, M.B.; Pozza, D.H.; Weber, J.B.; De Oliveira, M.G. Histologic study of the effect of laser therapy on bone repair. *J. Contemp. Dent. Pract.*, v.9, n.6, p.41-48, 2008.
30. Kazem, S.S.; Soleimanpour, J.; Salekzamani, Y.; Oskuie, M.R. Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process. *Lasers Med. Sci.*, 2009.
31. Renno, A.C.M.; McDonnell, P.A.; Parizotto, N.A.; Laakso, E-L. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro. *Photomed. Laser Surg.*, v.25, n.4, p.275-280, 2007.
32. TimIM, C.R.; ZambroniAMBONI-PintoINTO, K.N.; RossiOSSI, B.R.O.; Fernandes, K.; Matsumoto, M.A.; Parizotto, N.A.; Rennó, A.C.M.; Low-level laser therapy enhances the expression of osteogenic factors during bone repair in rats. *Lasers Med Sci.*, v.29, p.147-156, 2014.
33. Ebrahimi, T.; Moslemi, N.; Rokn, A.R.; Heidari, M.; Nokhbatolfoghahaie, H.; Fekrazad, R. The influence of low-level laser therapy on bone healing. *J. Dent.*; v.9, n.4, p.238-248, 2012.
34. Bossini, P.S.; Renno, A.C.M.; Ribeiro, D.A.; Fangel, R.; Peitl, O.; Zanotto, E.D.; Parizotto, N.A. Biosilicate® and low-level laser therapy improve bone repair in osteoporotic rats. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, v.5, p.229-337, 2011.
35. Granito, R.N., Ribeiro, D.A., Renno, A.C.M., Ravagnani, C., Bossini, P.S., Peitl-Filho, O., Zanotto, E.D., Parizotto, N.A., Oishi, J. Effects of biosilicate and bioglass 45S5 on tibial bone consolidation on rats: a biomechanical and a histological study. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, v.20, p.2521-2526, 2009.
36. Berni, E. A., Ribeiro, C., Zucolotto, V. Síntese de nanopartículas de prata para aplicação na sanitização de embalagens. São Carlos, Comunicado Técnico, n. 99, Embrapa, 2008.

- 37.** LI, Qilin et al. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. *Water Research*, v. 42, p. 4591-4602, 2008.
- 38.** Koga, H. e Kitaoka, T. On-paper Synthesis of Silver Nanoparticles for Antibacterial Applications. In: PEREZ, David Pozo (Org.). *Silver Nanoparticles*. Vukovar: In- tech, 2010. Cap. 14.
- 39.** Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramirez, J. T., Yacaman, M. J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, Institute of Physics Publishing, v. 16, p. 2346– 2353, 2005.
- 40.** Pallotta, R. C. Avaliação do efeito da radiação laser de baixa potência e do plasma rico em fibrina na reparação óssea em ratos. Tese de Doutorado, catálogo USP, Instituto de Ciências Biomédicas, Farmacologia, 2014.
- 41.** Orimo, H. The Mechanism of Mineralization and the Role of Alkaline Phosphatase in Health and Disease. *J Nippon Med Sch* 2010; 77 (1)
- 42.** World Health Organization. Containing antimicrobial resistance. Geneva, Switzerland: WHO; 2005. (WHO Policy Perspectives on Medicines; 10).
- 43.** Livermore D. M. Minimising antibiotic resistance. *Lancet Infect Dis*. 2005;5:450–9.
- 44.** Kollef M. H, Sherman G, Ward S, Fraser VJ. Inadequate antimicrobial treatment of infections: A risk factor for hospital mortality among critically ill patients. *Chest*. 1999;115:462–74.
- 45.** Loureiro, R.J.; Roque F., Rodrigues A.T.; Herdeiro M.T.; Ramalheira E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. *rev port saúde pública* 2016;34(1):77–84
- 46.** Shirwaiker R.A.; Samberg M.E.; Cohen P.H.; Wusk R.A.; Monteiro-Riviere N.A. Nanomaterials and synergistic low intensity direct current (LIDC) stimulation technology for orthopaedic implantable medical devices. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2013; 5: 191–204. doi: 10.1002/wnan.1201 PMID: 23335493
- 47.** Tautzenberger A, Kovtun A, Ignatius A. Nanoparticles and their potential for application in bone. *Int J Nanomedicine*. 2012; 7: 4545–4557. doi: 10.2147/IJN.S34127 PMID: 22923992
- 48.** Rai M.K.; Deshmukh S.D.; Ingle A.P.; Gade A.K. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *J Appl Microbiol*. 2012; 112: 841–852. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012. 05253.x PMID: 22324439

- 49.**Pal S, Tak Y.K.; Song J.M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 2007; 73: 1712-1720. doi:1712-1720. doi: 10.1128/AEM.02218-06 PMID: 17261510
- 50.**Rai M.K.; Deshmukh S.D.; Ingle A.P.; Gade A.K. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *J Appl Microbiol*. 2012; 112: 841-852. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05253.x PMID: 22324439
- 51.**Berini Neto, E. A.; Ribeiro, C.; Zucullotto, V. Síntese de nanopartículas de prata para aplicação na sanitização de embalagens. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2008. (Comunicado técnico, 99).
- 52.**Fayaz A.M.; Balaji K, Girilal M, Yadav R, Kalaichelvan P.T.; Venketesan R. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine*. 2010; 6: 103-109. doi: 10.1016/j.nano.2009.04.006 PMID: 19447203
- 53.**Zhang R, Lee P, Lui V.C.; Chen Y, Liu X, Lok C.N, et al. Silver nanoparticles promote osteogenesis of mesenchymal stem cells and improve bone fracture healing in osteogenesis mechanism mouse model. *Nanomedicine*. 2015; S1549-9634(15)00159-8.
- 54.**Albers C.E.; Hofstetter W, Siebenrock K.A.; Landmann R, Klenke F.M. In vitro cytotoxicity of silver nanoparticles on osteoblasts and osteoclasts at antibacterial concentrations. *Nanotoxicology*. 2013; 7: 30-36. doi: 10.3109/17435390.2011.626538 PMID: 22013878
- 55.**Rodrigues C. R., Fabris A. L. S., Hassumi J. S., Gonçalves A., Sonoda C. K., Okamoto R. Kinetics of gene expression of alkaline phosphatase during healing of alveolar bone in rats. *British journal of oral and maxillofacial surgery*
- 56.**Mester A. Laser Biostimulation. *Photomed Laser Surg*. 2013 Jun;31(6): 237-9.
- 57.**Batista J.D.; Sargenti-Neto S, Dechichi P, Rocha F.S.; Pagnoncelli R.M. Low-level laser therapy on bone repair: is there any effect outside the irradiated field? *Lasers Med Sci*. julho de 2015;30(5):1569-74.
- 58.**Ozawa Y, Shimizu N, Kariya G, Abiko Y. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. 1998 Apr;22(4):347-54.

## 8. Anexos

Certificado de aprovação no comitê de ética no uso de animais (CEUA)

**UNINOVE**  
Universidade Nove de Julho

**CERTIFICADO**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

Certificado que o EMENDA DO PROJETO intitulado "Efeito da fotobiomodulação associada ao uso do biomaterial carvão ativado impregnado com partículas de nanoprata no reparo ósseo", protocolo nº AN0022/2017, sob a responsabilidade do Prof. Rodrigo Labat Marcos que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Nove de Julho em reunião de 07/03/2018.

Vigência do Projeto: 15/03/2018 a 15/02/2021

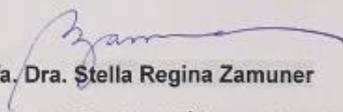
Espécie/linhagem: Ratos Wistar

Nº de animais: 36

Peso/Idade: 150 g e 2-3 meses

Sexo: machos

Origem: UNINOVE

  
**Prof. Dra. Stella Regina Zamuner**  
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animais  
Universidade Nove de Julho