

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

Programa de Pós-graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde

RACHEL BHARBARA MACCHERONIO DALMASO

**Efeito da Fotobiomodulação Associada a Fibra de Carbono Ativada no Processo
de Reparo Ósseo: Modelo Experimental**

São Paulo, SP

2017

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

Programa de Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde

**Efeito da Fotobiomodulação Associada a Fibra de Carbono Ativada no Processo
de Reparo Ósseo: Modelo Experimental**

**Tese apresentada a
Universidade Nove de Julho,
para obtenção do título de
doutor em Biofotônica
Aplicada às Ciências da
Saúde.**

Aluno: Rachel Bharbara Maccheronio Dalmaso

Orientador: Rodrigo Labat Marcos

2017

Dedicatória:

Dedico este trabalho a minha mãe, Sandra, que sempre me fez acreditar na realização dos meus sonhos e trabalhou muito para que eu pudesse realizá-los. Pelas simples palavras “você consegue” nos momentos em que mais precisei. Pelo amor, compreensão, apoio que você me mostra todos os dias confirmando que não existe distância no amor. “O amor é a única coisa que transcende o tempo e o espaço.”

Dalmaso, Rachel Bharbara Maccheronio.

Efeito da fotobiomodulação associado à fibra de carbono ativada no processo de reparo ósseo: modelo experimental. / Rachel Bharbara Maccheronio Dalmaso. 2017.

69 f.

Tese (doutorado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2017.

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

1. Reparo ósseo. 2. Fotobiomodulação. 3. Carvão ativado. 4. Propriedades mecânicas.

I. Marcos, Rodrigo Labat. II. Título

CDU 615.831

São Paulo, 15 de dezembro de 2017.

TERMO DE APROVAÇÃO

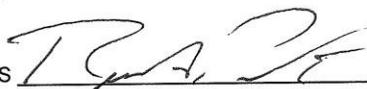
Aluno (a): Rachel Bharbara Maccheronio Dalmaso

Título da Tese: "Efeito da fotobiomodulação associada a fibra de carbono ativada no processo de reparo ósseo: Modelo experimental"

Presidente: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS



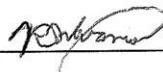
Membro: PROF. DR. RENATO ARAUJO PRATES



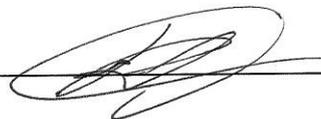
Membro: PROF^a. DR.^a ANNA CAROLINA RATTO TEMPESTINI



Membro: PROF. DR. RICARDO SCARPARO NAVARRO



Membro: PROF. DR. RODRIGO LEAL DE PAIVA CARVALHO



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 minhas necessidades.

A minha família, em especial meu tio Fernando e minha avó Marcília, por me apoiar em minhas escolhas, me ajudando no caminho.

A minha amiga Cintia, que fez parte destes momentos sempre me incentivando. Por ser minha amiga-irmã desde 2009.

A todos meus amigos que fazem parte do meu dia a dia nesta família que chamamos de Uninove – Aline, Carol, Dowglas, Paula, Renan, Tamires, Viviane, Zenildo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos, por ter me conduzido nos caminhos da ciência de forma brilhante e paciente.

Aos meus colegas do grupo de pesquisa Rodney Pallotta Capp, Romildo Torres da Silva, e em especial Patrícia de Almeida Mattos, pela ajuda e companheirismo durante essa aventura. Sem sua ajuda este trabalho não seria possível.

Aos professores que participaram das bancas Profa. Dra. Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana, Prof. Dr. Renato Araujo Prates, Prof. Dr. Lucio Frigo, Prof. Dr. Rodrigo Leal de Paiva Carvalho, e Prof. Dr. Ricardo Scarparo Navarro.

A todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos a mim, fazendo a vida valer cada vez mais a pena.

A todos, muito obrigada.

"Aprender é a única coisa que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende."

- Leonardo da Vinci

Resumo

O reparo ósseo é um processo que compreende aspectos do desenvolvimento e crescimento do esqueleto, envolvendo diversos componentes extracelulares, celulares e fatores de crescimento. A intervenção por agentes externos para acelerar o reparo ósseo torna-se interessante pela possibilidade de reabilitação e retorno destes pacientes às suas atividades normais. A importância da utilização de terapias não medicamentosas, entre estas, a fotobiomodulação, representa um fator altamente relevante para o Sistema de Saúde. O objetivo deste trabalho foi de avaliar o efeito da fotobiomodulação associada ou não a fibra de carbono ativada no processo de reparo ósseo. Foram utilizados 64 ratos Wistar machos distribuídos em 8 grupos: Controle (CTL), Defeito ósseo sem tratamento (NT), tratado com Laser de 830nm, 1J, 100mW (L1J), tratado com Laser 3J (L3J), tratado com Laser 6J (L6J), e tratado com Laser 10J (L10J). Após seleção do melhor parâmetro, foram feitos mais 2 grupos: grupo com defeito ósseo e utilização de fibra ativada (AF), grupo com defeito ósseo e utilização de fibra ativada associado ao Laser de 830nm, 6J, 100mW (AF+L). Modificações histológicas, morfológicas, bioquímicas e biomecânicas foram avaliadas. Resultados: O grupo L6J apresentou melhor aspecto histológico de reparo ósseo, comparado aos demais parâmetros de irradiação. Os resultados mostram um aumento da força de flexão nos grupos L6J e AF+L comparado com o grupo NT, um aumento na deformação no grupo AF em comparação com o grupo NT, uma diminuição da concentração de fosfatase alcalina no grupo L6J comparado com o grupo NT e análise histológicas com presença de um tecido ósseo organizado no grupo L6J com aceleração no reparo ósseo. Este estudo mostra o potencial da combinação da fotobiomodulação com fibra de carvão ativado como ferramenta efetiva no reparo de tecido ósseo.

Palavras-chave: *Reparo Ósseo, Fotobiomodulação, Carvão Ativado, Propriedades Mecânicas.*

Abstract

Bone repair is a process that comprises aspects of skeletal development and growth, involving various extracellular components, cellular and growth factors. The intervention by external agents to accelerate bone repair becomes interesting for the possibility of rehabilitation and return of these patients to their normal activities. The importance of the use of non-medicated therapies, among them, photobiomodulation, represents a highly relevant factor for the health system. The objective of this work was to evaluate the effect of low intensity laser therapy associated or not with activated carbon fiber in the bone repair process. 64 male Wistar rats were distributed in 8 groups: Control (CTL), Untreated bone defect (NT), treated with 830nm, 1J, 100mW (L1J), treated with Laser 3J (L3J), and treated with Laser 6J (L6J), and treated with 10J Laser (L10J). After selecting the best parameter, 2 groups were evaluated: group with bone defect and use of activated carbon fiber (FA), and group with bone defect and use of activated fiber associated with 830nm, 6J, 100mW (AF + L) laser. Histological, morphological, biochemical and biomechanical modifications were evaluated. Results: L6J group presented a better histological aspect of bone repair, compared to the other irradiation parameters. The results showed an increase in the flexion strength in the L6J and AF + L groups compared to the NT group, an increase in the strain in the AF group compared to the NT group, a decrease in the alkaline phosphatase concentration in the L6J group compared to the group NT and histological analysis with the presence of an organized bone tissue in the L6J group with acceleration in the bone repair. This study shows the potential of the combination of photobiomodulation with activated carbon fiber as an effective tool in the repair of bone tissue.

Keywords: Bone Repair, Photobiomodulation, Activated Carbon Fiber Felt, Mechanical Properties.

Sumário

1. Introdução.....	16
1.1 Epidemiologia das Fraturas e/ou Defeitos ósseos	16
1.2 Estrutura e Controle da Formação Óssea	16
1.4 Defeitos e Fraturas Ósseas	21
1.5 Terapias Utilizadas Para O Reparo Ósseo	22
1.6 Biomateriais	24
1.7 Fibra de carbono ativado	25
1.8 LASER	26
1.9 Características da luz LASER	26
1.10 O Laser como terapia anti-inflamatória	27
1.11 Ação da irradiação da Luz Laser sobre tecido ósseo	28
2. Objetivos.....	30
2.1 Objetivos Gerais	30
2.2 Objetivos Específicos.....	30
3. Material e Métodos	31
3.1 Animais.....	31
3.2 Defeito ósseo	31
3.3 Grupos experimentais	32
3.4 Protocolo de tratamento.....	34
3.5 Fibra Ativada	35
3.7 Quantificação de Fosfatase Alcalina no soro sanguíneo circulante pelo método de ELISA.....	37
3.8 Análise Histológica – Microscopia de luz (óptica).....	37
3.9 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	38
3.10 Cultivo Celular.....	38
3.11. Análise Estatística	40
4. Resultados.....	41
4.1 Análises de Viabilidade e Toxicidade Celular	41
4.2 Análise de Adesão Celular	43
4.3 Análise Estrutural	44
4.4 Análise da Fosfatase Alcalina.....	45
4.5 Análises Histológicas – Microscopia Óptica.....	46
4.6 Propriedades Mecânicas	54
5. Discussão	57
6. Conclusão.....	63

7. Referências Bibliográficas.....	64
8. Anexo	70
8.1 Aprovação comite de ética.....	70

Lista de abreviaturas:

λ - comprimento de onda
ANOVA – análise de variância
AsGaAl – Arseneto de Galio e Alumínio
BMP-2- Proteína Morfogenética Óssea 2
BMP-3 – Proteína Morfogenética Óssea 3
BMP-4 – Proteína Morfogenética Óssea 4
BMP-7 – Proteína Morfogenética Óssea 7
BMP-8 - Proteína Morfogenética Óssea 8
cm² – centímetro quadrado
CTL- controle
Dmax – descolamento no momento de ruptura máxima
FA – fibra ativado
FA + L – lesão tratado com associação da fibra ativada e laser 6J
FGF- 2- fator de crescimento de fibroblasto
Fmax – força de ruptura máxima
g – grama
HE – hematoxilina e eosina
IL – 1- Interleucina 1
IL – 6- Interleucina 6
J – joule
J/cm² – joules por centímetro quadrado
kg – quilograma
Ks – rigidez
LASER – Light amplified by stimulated emission of radiation
LLLT – Low level laser therapy
mL – mililitro
mm- milímetro
mW – miliwatt
nm – nanômetro
NPM – rotações por minuto
NT – lesão não tratado
PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas
RANKL - receptor ativador do fator nuclear kapa B
S – Segundos
TGF- α - Fatores de Necrose Tumoral Alfa
TGF- β - Fator de transformação do crescimento beta
 μ L – 10⁻⁶ litros
 μ m - micrometros
VEGF - fator de crescimento endotelial vascular
W – Watts

Lista de Figuras:

Figura 1: Defeito ósseo induzido pela broca cirúrgica. O defeito feito com auxílio de motor Driller® a 1500rpm e broca com 5 mm de comprimento e 1.3 mm de espessura.....	30
Figura 2: Fluxograma de Grupos Experimentais. Grupos Controle (CTL), não tratado (NT), com laser (1J), com laser (3J), com laser (6J), com laser (10J), grupo tratado com fibra ativada (AF), ou com associação entre fibra ativada e laserterapia (AF+L).....	31
Figura 3: Cronograma de protocolo experimental. Dia 0, 12, e 28	33
Figura 4: Dispositivo para ensaio de flexão em 3 pontos EMIC200. Velocidade de carregamento e descarregamento de 6 mm/min e acrescentado 0.3mm durante cada carregamento	34
Figura 5: Gráfico do ensaio de flexão. A) Curva típica de registro durante a aplicação das forças de carregamento e descarregamento. B) Curva simplificada indicando a Força máxima e deslocamento no momento da ruptura.....	35
Figura 6: Posicionamento do osso tibial para ensaio mecânico	35
Figura 7: Viabilidade do Biomaterial da fibra ativada após 48h Grupos Controle (CTL), grupo tratado com fibra ativada (AF), com laser (L) ou com associação entre fibra ativada e laserterapia (AF+L).	40
Figura 8: Toxicidade do Biomaterial de fibra ativada 48h Grupos Controle (CTL), grupo tratado com fibra ativada (AF), com laser (L) ou com associação entre fibra ativada e laserterapia (AF+L).....	41
Figura 9: Fotomicrografias de aderência de cultura celular OSTEO I demonstrando interação entre o biomaterial derivado de carbono ativada e o crescimento celular. (A) fibras de carvão ativada evidenciando (B) fibras de carvão ativada aderidas nas células. A e B [67 e 40µm].....	42
Figura 10: Fotomicrográfias estrutural da fibra de fibra ativada. [10µm].....	43
Figura 11: Concentração de fosfatase alcalina. Grupos Controle (CTL), não tratado (NT), grupo tratado com fibra ativada (AF), com laser (L) ou com associação entre fibra ativada e laserterapia (AF+L).	44
Figura 12: Histologia Representativa da tíbia dos ratos grupo CTL. Aumento 200x.....	45
Figura 13: Histologia Representativa da tíbia dos ratos grupo NT. Aumento 200x.....	46

Figura 14: Histologia Representativa da tíbia dos ratos grupo 1J. Aumento 200x.....	47
Figura 15: Histologia Representativa da tíbia dos ratos grupo 3J. Aumento 200x.....	48
Figura 16: Histologia Representativa da tíbia dos ratos grupo 6J. Aumento 200x.....	49
Figura 17: Histologia Representativa da tíbia dos ratos grupo 10J. Aumento 200x.....	50
Figura 18: Histologia Representativa da tíbia dos ratos grupo AF. Aumento 200x.....	51
Figura 19: Histologia Representativa da tíbia dos ratos grupo AF+ L6J. Aumento 200x.....	52
Figura 20: Gráfico da força máxima de flexão no momento da ruptura óssea. Gráfico da força máxima de flexão no momento da ruptura óssea. Grupos Controle (CTL), não tratado (NT), grupo tratado com fibra ativada (AF), com laser (L) ou com associação entre fibra ativada e laserterapia (AF+L).	53
Figura 21: Gráfico do deslocamento máximo no momento da ruptura óssea. Gráfico da força máxima de flexão no momento da ruptura óssea. Grupos Controle (CTL), não tratado (NT), grupo tratado com fibra ativada (AF), com laser (L) ou com associação entre fibra ativada e laserterapia (AF+L).	54

Lista de Tabelas:

Tabela 1: Tabela de parâmetros da irradiação laser.	32
Tabela 2: Resumo dos resultados comparado com CTL.....	55
Tabela 3: Resumo dos resultados comparado com NT.....	55

1. Introdução

1.1 Epidemiologia das Fraturas e/ou Defeitos ósseos

Mais de 6,2 milhões de fraturas ósseas ocorrem nos Estados Unidos a cada ano, sendo que aproximadamente 10% evoluem para complicações na sua reparação óssea por diversos motivos. Mesmo com a maioria das fraturas evoluindo para um reparo adequado, mais de 30 milhões de dias de trabalho são perdidos ao ano devido à incapacidade do paciente em realizar suas atividades diárias, levando a uma enorme perda de produtividade e renda, constituindo portanto um importante problema de saúde pública ⁽¹⁾.

Na União Europeia, estima-se que um em cada três idosos com idade superior a 80 anos sofrerão uma fratura óssea e que a incidência anual aumente de 125.000 para 1 milhão em 2020. Dados da Organização das Nações Unidas apontam 2 bilhões de idosos para o ano de 2025, sendo que no ano de 2050 em todo o mundo o número de idosos previstos terá ultrapassado o número de jovens. O envelhecimento da população brasileira reflete-se nos mais de 21 milhões de brasileiros com idade acima de 60 anos, representando, em média, 10% da população. Há projeção de que se chegará aos 50 milhões em 2050. O envelhecimento traz consigo o risco maior de fratura óssea e a necessidade do reparo ósseo ⁽²⁾.

No Brasil, estimaram custos na ordem de R\$121,5 milhões para o tratamento de fraturas em estudos feitos no período 2006- 2008. Os estudos epidemiológicos são de importância para entendimento da população, estas informações podem ser utilizadas para planejar o tratamento e aumentar o entendimento de fratura e reparo ósseo ⁽³⁾.

Independentemente do tipo de investimento público ou privado, os gastos em saúde vêm crescendo no mundo. A intervenção por agentes externos para acelerar o reparo ósseo torna-se interessante pela possibilidade de reabilitação e retorno destes pacientes às suas atividades normais. Atingir este objetivo é a meta, no entanto é essencial expandir nossa compreensão sobre as etapas interdependentes do reparo das fraturas e de como elas contribuem para a funcionalidade biomecânica do osso ⁽⁴⁾.

1.2 Estrutura e Controle da Formação Óssea

A estrutura do osso consiste em células e matriz extracelular. As células incluem osteoblastos, osteócitos, células osteoprogenitoras e osteoclastos. A matriz extracelular

é constituída por três constituintes principais; hidroxiapatita, uma matriz e água. A matriz orgânica inclui colágeno, moléculas tipo I e em menor proporção tipo V, péptidos, glicoproteínas, fatores de crescimento solúveis e hormônios ^(5,6).

O esqueleto adulto é composto de 80% de osso cortical e 20% de osso trabecular. A principal unidade funcional do osso cortical é o osteon, que é constituída por lamelas. Os osteons se encontram paralelo ao colágeno em todo o osso, proporcionando suporte esquelético. Correndo com os osteon são os canais de havers, nos quais os vasos sanguíneos, linfáticos e nervos atravessam para fornecer nutrição ao osso⁽⁵⁾.

O reparo ósseo é um processo biológico complexo que envolve aspectos do desenvolvimento e crescimento do esqueleto, incluindo diversos componentes extracelulares, celulares e fatores de crescimento. Embriologicamente, os ossos se desenvolvem de duas formas distintas: por ossificação intramembranosa (diferenciação direta de células mesenquimais em osteoblastos) ou ossificação endocondral (células mesenquimais diferenciadas em condrócitos que formam um modelo de matriz cartilaginosa e são progressivamente substituídas por matriz óssea)⁽⁷⁾.

A cicatrização óssea secundária ou indireta ocorre pela formação de calo através da ossificação endocondral e intramembranosa. Ossificação intramembranosa requer recrutamento de células osteoprogenitoras e células mesenquimais do perióstio distante da fratura para formar calo duro sem um modelo de cartilagem. A ossificação endocondral é um processo: formação de hematoma, fase inflamatória, fase de reparo e, finalmente, remodelação. Em contraste com a ossificação intramembranosa, a cura é auxiliada pelo perióstio perto do local da fratura ⁽⁵⁾. É de grande importância a compreensão da estrutura óssea para entender o processo de reparo ósseo.

Este reparo é dividido histologicamente em quatro fases, caracterizadas por eventos celulares e moleculares específicos baseados em décadas de observação com modelos experimentais em animais e humanos. Entretanto, tais delimitações tornam-se mais difíceis na prática ⁽¹⁾.

Os eventos celulares envolvidos no reparo ósseo podem ser observados através da determinação dos níveis de fatores inflamatórios, vasculares, precursores osteocondrais e osteoclastos e moleculares específicos através da presença de

citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento pró-osteogênicos e fatores angiogênicos; responsáveis pelo recrutamento celular e por estimular a diferenciação e crescimento. ^(1,5)

Reparo ósseo em 4 estágios.

A fratura óssea promove comprometimento da integridade tecidual, provocando a interrupção da função vascular normal e distorção da arquitetura óssea, e conseqüentemente, uma reação inflamatória inespecífica. O extravasamento vascular dentro do leito acometido é composto de plaquetas degranuladas, macrófagos e outras células inflamatórias (granulócitos, linfócitos e monócitos) e cada componente são responsáveis por funções como: combate de infecções, secreção de citocinas e fatores de crescimento. Outra característica histológica é a presença de trombo fibrocartilaginoso. ^(1,3)

A resposta celular coordena e envolve a secreção de diversas citocinas e fatores de crescimento, incluindo fator de transformação β (TGF- β), fator de crescimento de derivação plaquetária (PDGF), fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF-2), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF), interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6), proteína óssea morfogenética 2 (BMP-2) e fator de necrose tumoral α (TNF- α). Estes marcadores celulares são responsáveis pelo início da cascata do reparo ósseo (IL-1, IL-6 e TNF- α) e início da formação do calo ósseo (TGF- β , PDGF, BMP-2) ^(1,3).

Devido o reparo ósseo possuir algum nível de instabilidade mecânica, esta reparação é feita através da ossificação endocondral, ou seja, formação óssea precedida de matriz ^(1,8).

As células dominantes da matriz são os condrócitos e fibroblastos, responsáveis pelo suporte mecânico do reparo ósseo e a produção de calo ósseo semirrígido, a princípio avascular que será substituído gradativamente por osso medular vascularizado. Os condrócitos provenientes de células progenitoras mesenquimais se proliferam e sintetizam tecido fibrocartilaginoso / granulomatoso, que depois é substituído por cartilagem. Esta cartilagem cresce e envolve um centro fibrocartilaginoso unindo-se ao centro dos fragmentos fraturados e este estágio é caracterizado morfológicamente pela presença de condrócitos hipertrofiados que mineralizam a matriz antes da apoptose ^(3,8).

Os principais sinalizadores celulares da condrogênese e do início da ossificação endocondral são o TGF- β 2 e 3. Quanto à proliferação celular durante a ossificação intramembranosa, seja na proliferação de fibroblastos ou na proliferação e diferenciação celular, os responsáveis são BMP-5 e 6. Em relação ao crescimento vascular, as angiopoietinas I e II são responsáveis pelos vasos maiores e irrigação acessória dos vasos já existentes e o sinalizador é o fator de crescimento endotelial vascular ^(3,8).

Estágio com maior atividade osteogênica, ou seja, maior nível de atividade de osteoblasto e formação de matriz óssea mineralizada, caracterizando assim a formação óssea primária ou calo ósseo primário, este com formato irregular. A formação deste calo ósseo primário independe em alguns casos do suporte cartilaginoso, acontecendo simplesmente o fenômeno de aposição e reabsorção óssea ^(3,8).

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

Esta fase é caracterizada por ampla rede de vasos sanguíneos formados por diversos fatores de crescimento como VEGF e BMP-5 e 6. Tais estruturas são fundamentais na formação óssea, sendo responsáveis pelo aumento do aporte sanguíneo do local afetado e neoformação óssea pela diferenciação de osteoblasto ^(3,8).

O estágio final do reparo ósseo é caracterizado por um remodelamento visando seu retorno ao formato ósseo original, atuando diretamente no calo ósseo secundário ^(3,8).

Inicialmente há conversão da matriz óssea irregular em osso, processo regulado pela reabsorção seguida de formação óssea; as células osteóides têm papel fundamental na proteólise de elementos osteóides antes deste evento ^(3,8).

A célula principal envolvida no fenômeno de reabsorção da mineralização óssea é o osteoclasto que origina da diferenciação e fusão de células hematopoiéticas. Estes aderem na superfície mineralizada formando um espaço preenchido por ácido e proteinases, provocando sua desmineralização. Os produtos da degradação são

removidos principalmente por macrófagos. Após a reabsorção da matriz, os osteoclastos tornam-se inativos e sofrem apoptose, estimulando a ativação de osteoblastos na superfície erosiva ^(3,8).

1.3 Bioquímica do Reparo Ósseo

A regeneração óssea é uma complexa interação das células, regulada por uma série de moléculas de sinalização celular, como as citocinas e os fatores de crescimento, que induzem ou modulam as células osteoprodutivas⁽¹⁾. Após a fratura, o osso é reparado por um processo que resume muitos dos eventos da formação do osso intramembranar e endocondral. Inicialmente, a formação é acompanhada por uma resposta inflamatória e o recrutamento de muitas das moléculas de sinalização envolvidas na regulação da nova formação óssea (isto é, ILs, TNF- α , TGF- β , FGFs, BMPs, PDGF, VEGF, etc) ⁽²⁾.

As proteínas morfogenéticas dos ossos (BMPs) estão envolvidas na diferenciação dos osteoblastos e na regeneração óssea. Elas afetam a remodelação óssea através da regulação da atividade de reabsorção óssea dos osteoclastos e tem sido relatado como tendo um papel na estimulação mecânica da cicatrização de fraturas e diferenciação de condrócitos. Vários membros da família BMP, por exemplo, BMP-2, BMP-3, BMP-4 e BMP-7, mostraram efeitos positivos para facilitar a cicatrização da fratura e a formação óssea⁽¹⁾.

Interleucinas IL-1 e IL-6 que são secretadas por osteoblastos, coordenam o processo de formação e reabsorção óssea juntos com a osteoprotegerina e TGF- β . IL-1 β participa na proliferação de osteoblastos durante a fase aguda do reparo ósseo e inibe a proliferação e diferenciação de condroblastos. Ela é encontrada em altas concentrações na inflamação inicial e no remodelamento e por isso ela pode auxiliar na formação da cartilagem no reparo da fratura. IL-1 é liberado nos primeiros momentos do processo inflamatório e estimula a expressão de IL-6 pelos osteoblastos e IL-6 está associado a osteoclastogênese. IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, atuando na supressão de citocinas inflamatórias. Ela diminui a expressão de RANKL no reparo ósseo⁽³⁾.

IL-1 e IL-6 estimulam a migração de células osteoprogenitoras para formação de osteoblastos; e com ação dual a IL-6 promove a produção de ligante RANK, com seus níveis aumentados na presença de TNF- α , estimula a formação e ativação de osteoclastos, em compensação, qual há alto níveis de IL-10, o processo é invertido, pois inibe a reabsorção e aumenta a deposição de matriz extracelular ^(4,9).

Marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo são empregados na prática clínica há muitas décadas, dentro deles podemos mencionar fosfatase alcalina e osteocalcina. A formação da fosfatase alcalina é dependente da ação dos osteoblastos. A fosfatase alcalina é uma ectoenzima que está localizada na membrana plasmática dos osteoblastos e está envolvida nos processos de formação e mineralização óssea. A osteocalcina é um peptídeo secretado pelos osteoblastos maduros, condrócitos hipertrofiados e odontoblastos. Esta proteína é caracterizada como marcador da atividade osteoblástica. Estudos indicam que o aparecimento e aumento de produção da proteína são coincidentes com o início do processo de mineralização. A produção de osteocalcina é um marcador do osteoblasto maduro. Outros estudos, sugerem que a osteocalcina tenha importante papel no recrutamento e diferenciação dos osteoclastos ⁽¹⁰⁾.

1.4 Defeitos e Fraturas Ósseas

Segundo estimativas do centro de controle e prevenção de doenças do governo dos EUA, em 2004 houve mais de 320.000 internações hospitalares por fratura de quadril, a maioria em idosos, um aumento de 3% se comparado ao período de 1996 à 2004. Em relação aos defeitos ósseos, estes geralmente estão associados à deformidades congênitas e neste caso os números serão de 120.000 nascimentos com deformidades congênitas ósseas em 2002 ^(8,9).

As fraturas ósseas ocorrem por razões como: traumas diretos por arma de fogo, acidentes, torções ou quedas. Essas fraturas causam diversos danos teciduais ao seu redor como: irritação nas terminações nervosas (dor), sangramentos, espasmos musculares e deformidades em alguns casos ^(8,11).

Existem diversas formas de descrição de fraturas ósseas, destacamos: a *localização*: epifisária, metafisária ou diafisária; *etiologia*: traumática, estresse, espontânea, patológica; *exposição*: exposta ou não: quando existe o rompimento da integridade da osso, podendo haver comunicação do meio interno com o meio externo

havendo estado grave, potencialmente infectada; *desvio*: sem desvio, desviada ou impactada; *traço de fratura*: se a fratura rompe por total a região cortical óssea ela é considerada completa, porém, se houver apenas o rompimento parcial, ela recebe o nome de galho verde. Quando existe uma fratura com presença de diversos pedaços, recebe o nome de cominutiva e quando há mais de um local fraturado recebe o nome de fratura composta ^(3,8,11).

O tratamento das doenças ósseas é bem amplo e depende do diagnóstico e da extensão da lesão. Em casos de fraturas as terapias podem variar, desde tratamentos mais conservadores, como a completa imobilização do osso afetado ou por intervenções cirúrgicas para acesso à fratura e colocação de biomateriais para sua correção ^(3,8,11).

Os defeitos ósseos provenientes de malformações congênitas, traumas não corrigidos, lesões extensas ou de sequelas cirúrgicas, como na remoção de tumores, são corrigidos através de enxertia óssea e colocação de próteses biocompatíveis e utilização de substâncias indutoras de formação óssea (BMPs) descrita recentemente. Também são utilizados tecidos sintéticos, como o modelo adotado no presente estudo ^(3,8,11).

1.5 Terapias Utilizadas Para O Reparo Ósseo

Reparo ósseo pode ser alterado por estímulos externos biomecânicos e internos biológicos. Diversas terapia através de métodos físicos e biológicos são desenvolvidos para melhorar o reparo das fraturas ósseas. Dentro destas podemos mencionar estimulação por ultrassom pulsado de baixa intensidade, o campo magnético elétrico, capacitiva acoplado a estimulação elétrica, distração osteogênica, cirurgia, biomateriais, e fotobiomodulação ⁽¹¹⁾.

Vários estudos indicam que estimulação por ultrassom pulsado de baixa intensidade pode ser aplicado para acelerar o reparo da fratura óssea, influenciando todas as quatro fases de reparo. As tensões mecânicas resultantes de estimulação por ultrassom pulsado de baixa intensidade pode manipular a expressão e funcionamento de várias células envolvidas no processo de consolidação da fratura e pode aumentar o fluxo sanguíneo local da fratura promovendo a consolidação óssea. Estimulação por ultrassom pulsado de baixa intensidade acelera a maturação do calo ósseo após a

osteotomia tibial por hemicalotase. O ultrassom pode estimular a expressão de integrinas e facilita a adesão de osteoblastos no local da fratura ⁽¹¹⁾.

A distração osteogênica é uma forma de engenharia de tecidos in vivo na qual a separação gradual de margens ósseas, cirurgicamente seccionadas promove a formação óssea intramembranosa fisiológico sob tensão. Foi descrito nos anos 1950s por Gavriil Ilizarov. O projeto de Ilizarov consiste de um fixador de anel externo, uma osteotomia correspondente e a aplicação de distração gradual para os dois segmentos ósseos. Isto permite formação de tecido ósseo para substituir o osso em falta no local da fatura por exemplo, a tibia ⁽¹²⁾.

Tecnologia de estimulação eléctrica com o potencial para aumentar a formação de novo osso por regulação da função dos osteoblastos é feita atualmente por estimulação capacitivo acoplado a campo eléctrico - CEF. Em estudos com animais, CEF tem sido utilizada para prevenir a osteoporose em vértebras de rato, e promove reparo da fratura não consolidada. CEF é aprovado pelo FDA dos Estados Unidos, visto como uma forma não invasiva para o reparo de fratura óssea. Estes resultados podem sugerir um potencial para o uso da CEF para promover a formação óssea e diminuir a dor em pacientes com fraturas ósseas ⁽¹³⁾.

Campos eletromagnéticos são utilizados para desempenhar um papel na consolidação óssea respeitando os mesmos princípios de tensão mecânica. Quando a carga mecânica é aplicada ao osso, um gradiente de pressão desenvolve. Gradientes de pressão empurra o fluido intersticial através dos canaliculos de regiões de alta para baixa pressão. Isto expõem membranas dos osteócitos a tensão, bem como para potenciais eléctricos. Campos eletromagnéticos é feito para imitar o efeito do estresse mecânico sobre o osso no local de fratura ⁽¹⁴⁾.

Os tratamentos de fratura óssea não tem mudado muito nos últimos 100 anos. Ainda hoje é utilizado os tratamentos mais conservadores por imobilização com gesso, e tratamentos mais invasivos como cirurgia. O desenvolvimento de novas técnicas cirúrgicas minimamente invasivas representou grande avanço no tratamento das fraturas nos últimos anos. Implantes como haste intramedular, e placa de compressão são utilizados para fazer osteossíntese que leva a consolidação mais rápida da fratura óssea ⁽¹⁵⁾.

Na última década, tem tido um aumento nos biomateriais utilizados para reparo tecidual. Em casos do tecido ósseo, eles são utilizados como uma alternativa aos enxertos ósseos pois eles possuem características positivas como não danificar tecidos saudáveis. Esses materiais como espaçadores de silicone, coágulo de fibrina, alginato misto, scaffolds e carvão ativado, entre outros obrigatoriamente apresenta biocompatibilidade e biodegradáveis com o tecido ósseo. Utilização dos biomateriais poderia levar a uma redução de custos e do trauma cirúrgico ⁽¹⁶⁾.

A utilização de biomateriais e fotobiomodulação tem se mostrado promissor para a regeneração e reparo bem sucedida de tecido ósseo, considerando fatores como a composição do osso e a matriz óssea. Biomateriais à base de carbono têm sido exploradas por pesquisadores, bem como na indústria. Carbono ativado é um biomaterial que tem vantagens em comparação com outros materiais frequentemente utilizados. A fotobiomodulação utilizando diferentes tipos de parâmetros espectroscópicos e de irradiação para finalidades distintas se provou altamente útil por sua ação anti-inflamatória, analgésica e efeitos bioestimulante. Pesquisas recentes mostram que a fotobiomodulação tem efeitos diferentes sobre as células do tecido ósseo. Sendo assim, demonstrando a possibilidade de união dessas duas terapias menos invasivas ⁽¹⁶⁾.

1.6 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. 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 ⁽¹⁷⁾.

Diversas linhas de pesquisa têm sido desenvolvidas e os benefícios atribuídos percorrem desde a melhora no processo de consolidação ⁽¹⁸⁾, o aumento da angiogênese e estímulo da neoformação óssea ⁽¹⁹⁾ até a produção de matriz óssea e melhora da diferenciação celular ⁽¹⁷⁾. 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. Vidros, vitrocerâmicas, polímeros de diversas composições e nacre (madrepérola)⁽¹⁹⁻²¹⁾.

1.7 Fibra de carbono ativado

As fibras de carbono ativado (FCA) podem ser entendidas como fios de fibra ativada, porém possuem características especiais quando comparadas com os carvões em pó ou granular, pois podem ser transformados em tecido, fibra ou qualquer outra forma têxtil. Além disso, a caracterização completa da fibra evidenciou sua estrutura de poros muito bem definida na área de microporos favorecendo uma alta capacidade de adsorção ⁽²²⁾.

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 ^(22,23). 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 utilizadas 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^(22,24).

1.8 LASER

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. Deriva por analogia de outro acrônimo: MASER, ou Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation. O maser será o princípio dos estudos que conduziram os pesquisadores à descoberta do laser ⁽²⁵⁾.

1.9 Características da luz LASER

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

- Monocromaticidade - a energia carregada pelo fóton estimulante e pelo fóton emitido são as mesmas. Portanto, a luz laser é composta de apenas um comprimento de onda, enquanto uma fonte de luz incandescente é formada por vários comprimentos de onda.
- Intensidade - pode ser extremamente grande, ao contrário das fontes de luz convencionais. Sua potência pode atingir ordens de tera watt (10^{12} W). Essas grandes intensidades ocorrem em lasers pulsados, onde a energia acumulada em longo tempo é emitida toda em um intervalo de tempo muito pequeno, da ordem de 10^{-12} s.
- Direção - o feixe resultante é constituído de ondas que se deslocam na mesma direção, ou seja, há um mínimo de dispersão.
- Coerência - a radiação é espacialmente coerente se as ondas sucessivas da radiação estão em fase e tempo coerentes, e se os trens de onda estão todos na mesma direção e com o mesmo comprimento de onda ⁽²⁵⁻²⁷⁾.

1.10 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⁽²⁷⁾.

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⁽²⁷⁾.

O efeito de estimulação da fotobiomodulação com laser de baixa intensidade e a camada tecidual a ser atingida pela luz laser depende do comprimento de onda, da dose e da intensidade da luz utilizada na irradiação. O sucesso da fotobiomodulação com laser de baixa intensidade depende de uma conjunção de fatores que englobam características individuais, como a condição clínica a ser tratada e do tecido alvo, e fatores gerais relacionados a dosimetria da luz⁽²⁷⁾.

A coerência é uma das propriedades da luz laser, como citada acima, 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⁽²⁸⁾. 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^(29,30).

Acredita-se que a ação do laser de baixa intensidade sobre o tecido está relacionada à possibilidade de inibir o aparecimento de fatores quimiotáxicos nos estágios iniciais da inflamação; interferindo nos efeitos dos mediadores químicos induzidos pela inflamação⁽³¹⁾; inibindo a síntese das prostaglandinas e inibindo o esfíncter pré-capilar através de mediadores químicos. Estudos adicionais sobre o efeito anti-inflamatório do fotobiomodulação ainda se fazem bastante necessários⁽³²⁾.

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^(33,34).

Tem sido acumulando experiência em trabalhos experimentais e clínicos com a aplicação da fotobiomodulação em diferentes situações. Fomos capazes de caracterizar o efeito da terapia com laser de baixa potência na reação inflamatória de

edema de pata, pleurisia e dermatite, hiper-reatividade de vias aéreas em ratos e camundongos, e tendinite de calcâneo em humanos ⁽³⁵⁾. No entanto, é muito importante ressaltar que muito pouco se conhece a respeito do mecanismo de ação dos lasers infra-vermelhos. Neste sentido, os estudos experimentais com estes comprimentos de onda assumem grande relevância para o esclarecimento do mecanismo de ação da terapia ⁽³³⁾.

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, especialmente em países subdesenvolvidos. No entanto, o estabelecimento de parâmetros clínicos para a utilização desta técnica se faz ainda extremamente necessário ^(36–38).

1.11 Ação da irradiação da Luz Laser sobre tecido ósseo

Os efeitos da luz laser sobre os tecidos começaram a ser descritas por Mester et al em 1972, observando a acelerada reparação da ferida no osso. Existem estudos realizados sobre diversos modelos experimentais envolvendo outros tecidos, onde podemos ver a ação da fotobiomodulação do laser de baixa intensidade sobre o reparo tecidual ^(39–41).

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 ^(39–45).

Devido à propriedade de reparação tecidual acelerada, serão 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 ^(46,47).

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, apenas será relatado em diversos estudos 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 ^(40,42,43). 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 ^(41,47).

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 diária por um período de quinze dias ^(41,47).

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. ^(41,43-47)

2. Objetivos:

2.1 Objetivos Gerais

- Investigar se o uso da fotobiomodulação por laser de baixa intensidade e sua associação a fibra ativada auxilia o processo de reparo ósseo em modelo experimental de lesão em tíbia de ratos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar as diferenças histológicas utilizando diferentes parâmetros de irradiação (1, 3, 6, e 10 Joules).
- Avaliar o uso do fibra ativada no processo de reparo ósseo.

3. Material e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados 64 ratos Wistar machos pesando entre 150 e 200g (+/- 60 dias de vida), com livre acesso a água e ração, provenientes do Biotério da Universidade Nove de Julho. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada e ciclo claro/escuro de 12 horas. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética para Animais, da Universidade Nove de Julho.

3.2 Defeito ósseo

Os animais foram anestesiados com quetamina (90mg/Kg) e Xilazina (10mg/Kg). Em seguida foi realizada uma incisão com lamina 22 sobre o osso de ambos as tíbias na parte póstero-lateral com a divulsão dos planos subcutâneos e musculares, acesso ao periósteo do osso tibial na região proximal e a confecção de um defeito óssea 4 mm abaixo da articulação do joelho. O defeito foi feito com auxílio de motor Driller® a 1500rpm e broca com 5 mm de comprimento e 1.3 mm de espessura (figura 1). Os defeitos foram feitos até a broca atravessar a região medular da tíbia do animal sem ultrapassá-la, formando uma cavidade onde o fibra de carvão ativado foi colocado.

Após confecção de um defeito ósseo, os animais do grupo AF receberam o fibra de carvão ativado na região do defeito ósseo, o grupo AF+L recebeu carvão ativo no local do defeito ósseo e foram irradiados imediatamente com laser de baixa intensidade. O fibra de carvão ativado foi aplicado da região do defeito ósseo até a cobertura total do defeito induzido pela broca cirúrgica. Após este processo, os animais foram suturados e retornados as caixas.

Foi administrado TRAMAL® associado a Dipirona® via intraperitoneal com dose de 5mg/kg em intervalos de 8 horas por 3 dias após o procedimento cirúrgico. Comitê de Ética: AN0007/201.

Os animais que apresentaram fraturas, processo infeccioso, rejeições aos biomateriais ou quaisquer outras complicações pós-cirúrgicas foram retirados do protocolo experimental e do estudo. Não houve imobilização de membro ou do animal bem como nenhuma restrição de área livre para caminhada na gaiola de alojamento durante o estudo.



Figura 1: Defeito ósseo induzido pela broca cirúrgica. Fonte: Sampaio, A. B. A.

3.3 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em grupos de 8 animais cada e submetidos imediatamente a diversos tratamentos, conforme especificado abaixo:

CTL – Grupo Controle Íntegro: os animais deste grupo foram mantidos sem procedimento cirúrgico. (N=8).

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

NT – Grupo com defeito ósseo, e sem tratamento. Os animais deste grupo foram submetido ao procedimento cirúrgico para realização de um defeito ósseo em ambas as tíbias e não receberam nenhum tipo de intervenção. (N=8)

L1J – Grupo com defeito ósseo, e irradiado com laser (830nm, 1J, 100mW). Os animais deste grupo foram submetido ao procedimento cirúrgico para realização de um defeito ósseo em ambas as tíbias e receberam tratamento com laser 1J. (N=8)

L3J – Grupo com defeito ósseo, e irradiado com Laser (830nm, 3J, 100mW). Os animais deste grupo foram submetido ao procedimento cirúrgico para realização de um defeito ósseo em ambas as tíbias e receberam tratamento com laser 3J. (N=8)

L6J – Grupo com defeito ósseo, e irradiado com Laser (830nm, 6J, 100mW). Os animais deste grupo foram submetido ao procedimento cirúrgico para realização de um defeito ósseo em ambas as tíbias e receberam tratamento com laser 6J. (N=8)

L10J – Grupo com defeito ósseo, e irradiado com Laser (830nm, 10J, 100mW). Os animais deste grupo foram submetido ao procedimento cirúrgico para realização de um defeito ósseo em ambos as tíbias e receberam tratamento com laser 10J. (N=8)

AF – Grupo com defeito ósseo, e utilização de fibra ativada. Os animais deste grupo foram submetido ao procedimento cirúrgico para realização de um defeito ósseo em ambos as tíbias e receberam a fibra de carvão ativado. (N=8)

AF+L – Grupo com defeito ósseo, e utilização de fibra ativada associado ao Laser (830nm, 6J, 100mW). Os animais deste grupo foram submetido ao procedimento cirúrgico para realização de um defeito ósseo em ambos as tíbias e receberam a fibra de carvão ativado e receberam tratamento com laser 6J. (N=8)

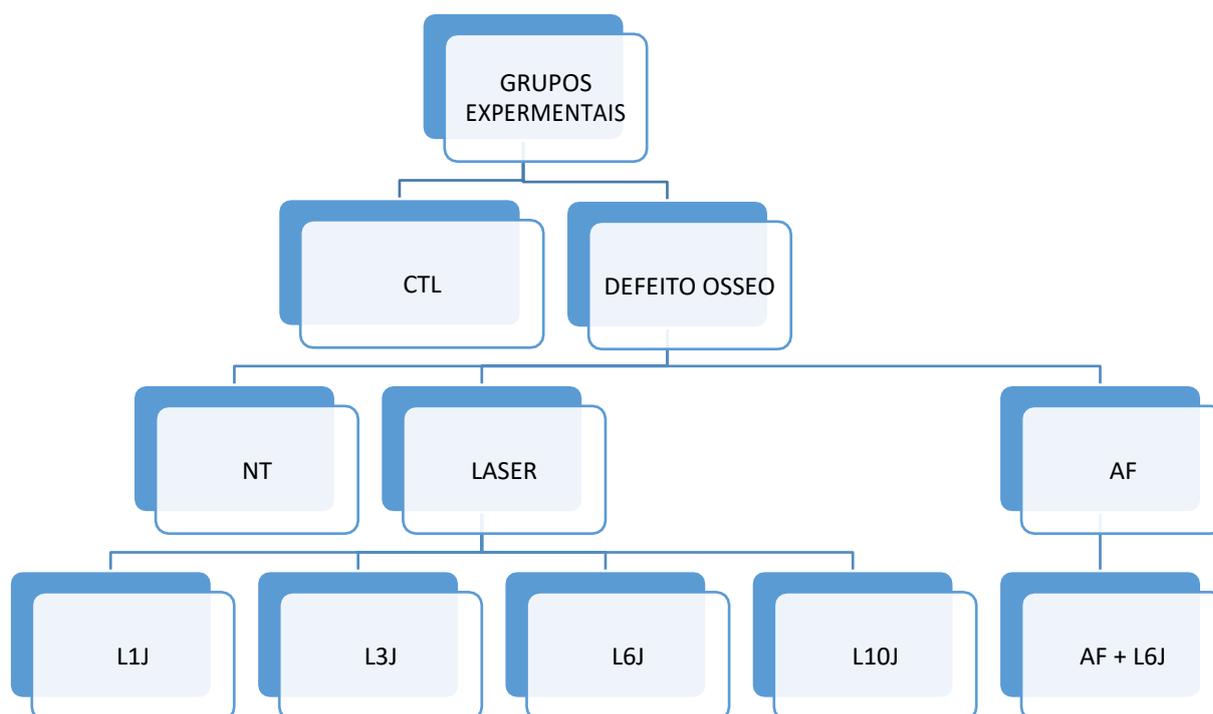


Figura 2: Fluxograma de Grupos Experimentais

3.4 Protocolo de tratamento

Foi utilizado o Laser Diodo de Baixa Intensidade Thera-laser (DMC[®], - Brasil), com os seguintes parâmetros:

O tratamento Laser foi realizado sobre a osso, durante sete (7) dias alternados, começando 24 horas após a cirurgia.

Tabela 1: Parâmetros da irradiação laser.

Grupo	Comp. onda (nm)	Tipo de Diodo	Potência (mW)	Diâmetro do feixe (cm ²)	Densidade potência (W/cm ²)	Energia (J)	Densidade Energia (J/cm ²)	Tempo (s)
L1J	830	AsGaAl	100	0.028	3.5	1	35.71	10
L3J						3	107.14	30
L6J						6	214.28	60
L10J						10	357.14	100

O tratamento com Laser foi aplicado em contato com a pele do animal em ângulo de 90° sobre a região da cirurgia, em ponto único. Foram submetidos a 7 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).

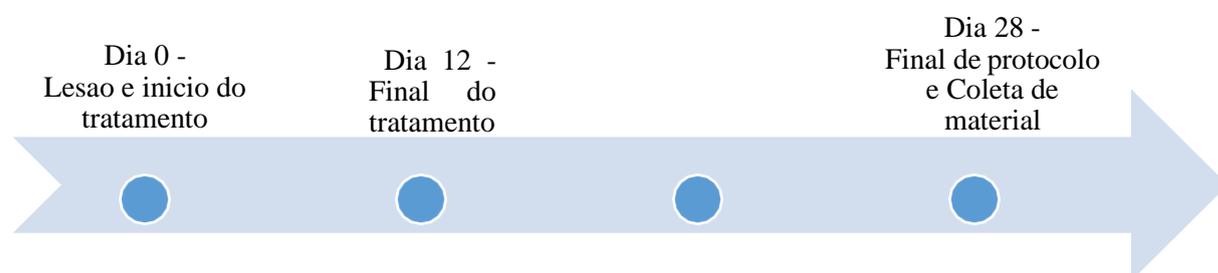


Figura 3: cronograma de protocolo experimental

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

3.5 Fibra Ativada

O fibra ativada passou por processo de esterilização e no momento da utilização, foi umedecido com salina estéril 0,9% e aplicado na região do defeito ósseo até a cobertura total da lesão. O fibra ativada foi recortado mantendo área padrão de 5mm² e aplicação na região do defeito ósseo até a cobertura total do defeito induzido pela broca cirúrgica.

3.6 Análise da propriedades mecânicas óssea

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

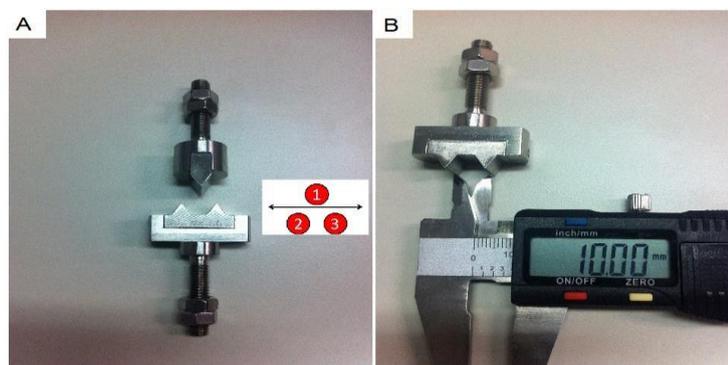


Figura 4: Dispositivo para ensaio de flexão em 3 pontos. Fonte: Autor.

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

Durante a padronização do ensaio de flexão, foi utilizada uma velocidade de carregamento e descarregamento de 6 mm/min e acrescentado 0.3mm durante cada carregamento. O ensaio de flexão foi interrompido automaticamente, após a ruptura óssea e foram analisados os seguintes parâmetros:

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

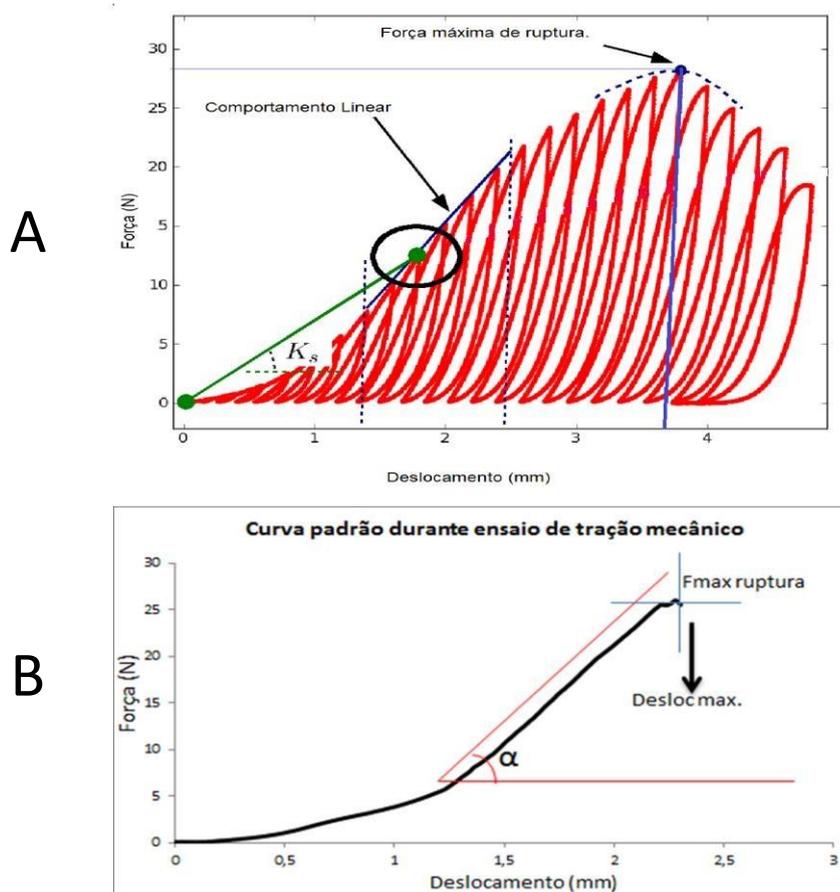


Figura 5: Gráfico do ensaio de flexão. A) Curva típica de registro durante a aplicação das forças de carregamento e descarregamento. B) Curva simplificada indicando a Força máxima e deslocamento no momento da ruptura. Fonte: Sampaio, A. B. A.

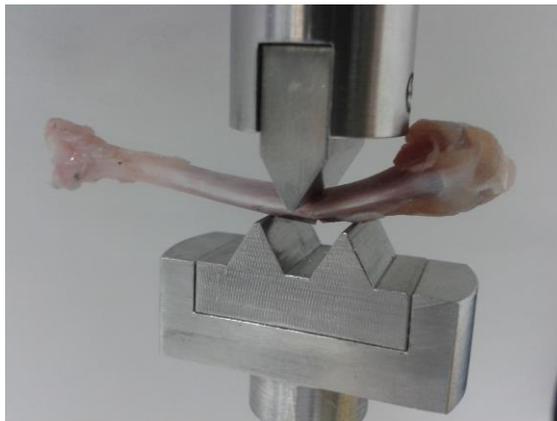


Figura 6: Posicionamento do osso tibial para ensaio mecânico. Fonte: Autor

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

Antes da eutanásia dos animais, foi coletado sangue sem o uso de anticoagulante através da punção cardíaca nos 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 plasma; 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 seguiu as seguintes etapas: Primeiramente, a solução tampão (DEA) é preparada e incubada por alguns minutos a 37°C . Enquanto ocorre a incubação, em placa de 96 poços, coloca-se $2\mu\text{l}$ da amostra em cada poço da placa e a este é adicionado $200\mu\text{l}$ do reagente único, previamente incubado.

A absorbância foi 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 $405\text{ nm} = \Delta A/\text{min} \times 5.460$. 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.

3.8 Análise Histológica – Microscopia de luz (óptica)

As amostras do tecido foram fixadas em formol a 10% por um período de 72 horas. Posteriormente as amostras foram 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 transversais 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). A região do defeito ósseo foi observada e fotografada.

3.9 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os biomateriais foram devidamente metalizados por metodologia padrão de deposição sob vácuo. As amostras foram metalizadas com íons de ouro e examinadas em microscópio eletrônico de varredura MEV FEI-INSPEC F50 operado com energia de 10kv (PMT-USP). A superfície do tecido onde foi observado o defeito ósseo as análises ocorreram em diferentes aumentos (500X, 1000X, 10000X e 40000X) e posteriormente, comparada com o tecido sadio. Os experimentos relacionados à Microscopia Eletrônica de Varredura foram realizados em parceria com o Laboratório de Moagem de Alta Energia, Materiais de Carbono e Compósitos para Altas Temperaturas (Escola Politécnica, USP).

3.10 Cultivo Celular

Cultivo Celular

As células OSTEO I (DEBONI, 1995), gentilmente cedidas pela Prof. Dra. Kristiane F. Porta (UNINOVE) foram cultivadas em meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Vitrocell, Campinas, SP, Brasil), contendo 10% de soro fetal bovino (Vitrocell, Campinas, Brasil) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Vitro cell, SP, Brasil). Os osteoblastos foram mantidos em estufa a 37°C, contendo 5% de CO₂ em atmosfera úmida (Thermo Fisher Scientific, EUA). O monitoramento do crescimento

celular foi realizado a cada 24 horas, utilizando microscópio invertido de fase. O subcultivo foi feito quando da subconfluência da monocamada celular, garantindo a manutenção do banco da linhagem celular. Para o repique, o meio de cultivo foi removido, as células lavadas com PBS e incubadas com solução de tripsina 0,25% durante 3 minutos a 37°C. A neutralização da tripsina foi efetuada com meio DMEM e posteriormente, as células foram centrifugadas a 1.200 rpm em 4°C por 5 minutos e resuspendidas em 1 ml de meio DMEM. A viabilidade das células foi avaliada por coloração com corante vital azul de Trypan (0,4%). Foram utilizadas nos ensaios as culturas com viabilidade maior que 95%.

Ensaio de Viabilidade Celular - (Método MTT)

A metodologia MTT se baseia na habilidade da enzima mitocondrial desidrogenase, encontrada somente em células viáveis, em clivar os anéis de tetrazólio do sal MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide), formando cristais azuis escuros de formazan, os quais são impermeáveis às membranas celulares, ficando então retidos no interior das células viáveis. A posterior lise celular, utilizando o isopropanol, faz com que estes sais de formazan sejam liberados. O número de células viáveis é diretamente proporcional ao nível de cristais de azul de formazan. A coloração resultante é mensurada por método de absorvância.

Os osteoblastos (1x10³, 3x10³ e 1x10⁴) foram incubados em placas de cultura de fundo chato de 96 poços (Kasv, EUA) e mantidos em estufa de atmosfera úmida a 37°C e com 5% de concentração de CO₂. Após a adesão das células na placa (24 horas), foram adicionados aos poços específicos de cada grupo, os biomateriais derivados de Carvão Ativado. Os carvões, divididos em CA1, CA2, CA3 e CA4 (de acordo com as características de superfície de cada um) foram esterilizados e acrescentados aos poços em quantidades iguais de XXmg por poço. Após os diferentes períodos de cultivo e tratamento com Laserterapia (24, 48 e 72 horas), foi realizada a retirada do meio de cultura por inversão da placa e lavagem com 100 µl de PBS [1x]. Então foi adicionado 50 µl de MTT (0,5 mg/ml em tampão) (Thiazolyl blue – Sigma, EUA) e realizada uma incubação de 3 h a 37°C. Após a incubação, 100 µl de isopropanol foi adicionado em cada poço e a absorvância foi medida a 620 nm. Os dados de densidade óptica (DO) medidos como absorvância (correspondente à

proliferação celular) foram obtidos em quadruplicata e estão representados como médias \pm e desvio padrão (DV).

Ensaio de Toxicidade Celular – Cristal Violeta

O teste de Cristal Violeta é utilizado para determinar a viabilidade celular, por coloração do núcleo (DNA) celular (Kueng et. al., 1989). Os osteoblastos (1×10^4 e 3×10^3) foram incubados em placas de cultura de fundo chato de 96 poços (Kasv, EUA) e mantidos em estufa de atmosfera úmida a 37°C , com 5% de concentração de CO_2 . Após a adesão das células na placa (24 horas), foram adicionados aos poços específicos de cada grupo, os biomateriais derivados de Carvão Ativado. Os carvões, divididos em CA1, CA2, CA3 e CA4 (de acordo com as características de superfície de cada um) foram esterilizados e acrescentados aos poços em quantidades iguais por poço. Após os diferentes períodos de cultivo e tratamento com laserterapia (24, 48 e 72 horas), os sobrenadantes foram removidos e as placas lavadas com tampão PBS [1X]. Em seguida, foi adicionado aos poços $40\mu\text{l}$ de cristal violeta diluído em 1% de e 5% de. Após o tempo de reação de 15 minutos, o conteúdo da placa foi removido por método de inversão e a placa foi lavada com água MilliQ®. Retirado o excesso de água, $100\mu\text{l}$ de metanol foi adicionado em cada poço e os cristais foram ressuspensos com auxílio de pipeta multicanal. Os dados foram obtidos em quadruplicata e a absorbância, determinada em 540nm.

3.11. Análise Estatística

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

4. Resultados

4.1 Análises de Viabilidade e Toxicidade Celular

Na figura 7, é apresentado o gráfico da viabilidade celular do biomaterial de fibra ativada após 48 horas. Não foi observado alteração estatisticamente significativa na viabilidade celular entre os grupos abaixo.

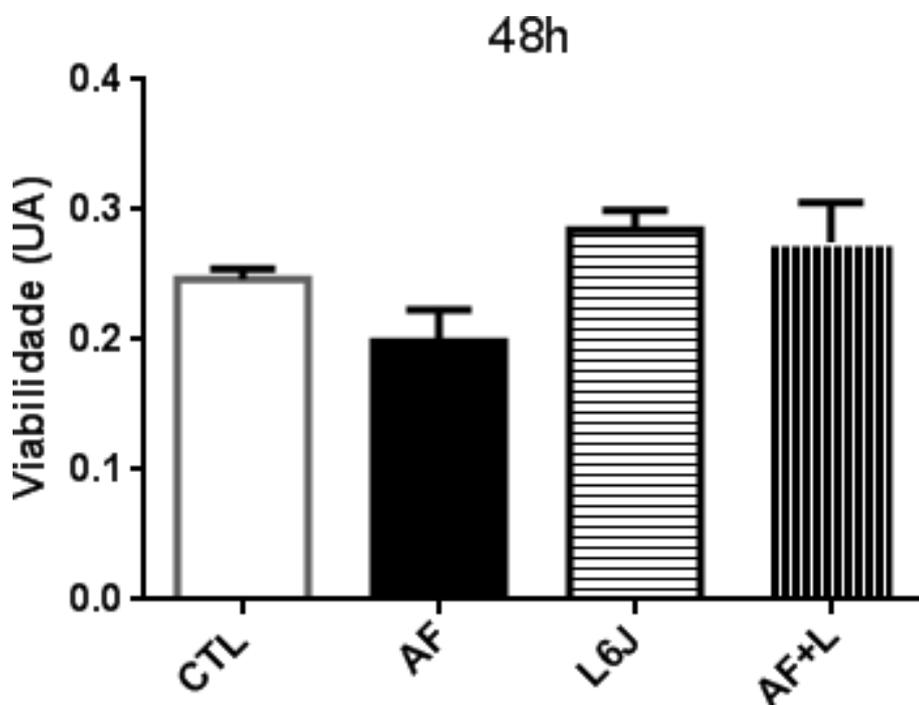


Figura 7: Viabilidade do Biomaterial de fibra ativada após 48 horas. Grupos Controle (CTL), grupo tratado com fibra ativada (AF), com laser (L) ou com associação entre fibra ativada e laserterapia (AF+L).

Na figura 8, é apresentado o gráfico de toxicidade celular do biomaterial de fibra ativada após 48 horas. Não foram observados alterações significativas entre os grupos experimentais.

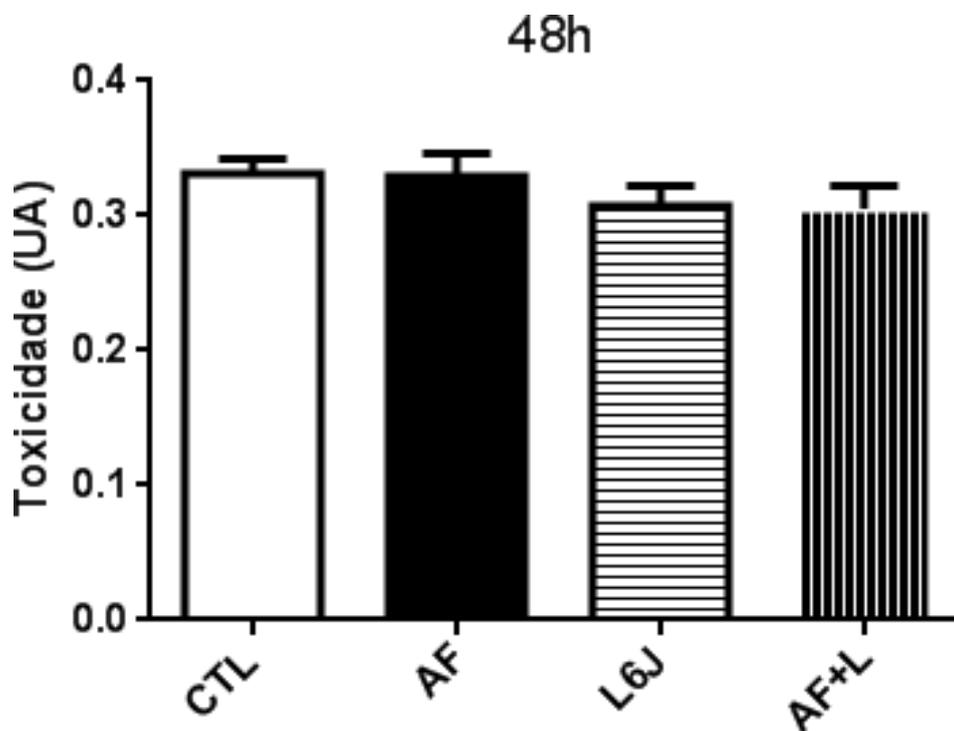


Figura 8: Toxicidade do Biomaterial de fibra ativada após 48 horas. Grupos Controle (CTL), grupo tratado com fibra ativada (AF), com laser (L) ou com associação entre fibra ativada e laserterapia (AF+L).

4.2 Análise de Adesão Celular

Na figura 9, é apresentada as fotomicrografias da fibra de fibra ativada mostrando aderência celular ao biomaterial. Foi observado em (A) a aderência de osteoblastos na fibra de carbono em toda sua porção lateral.

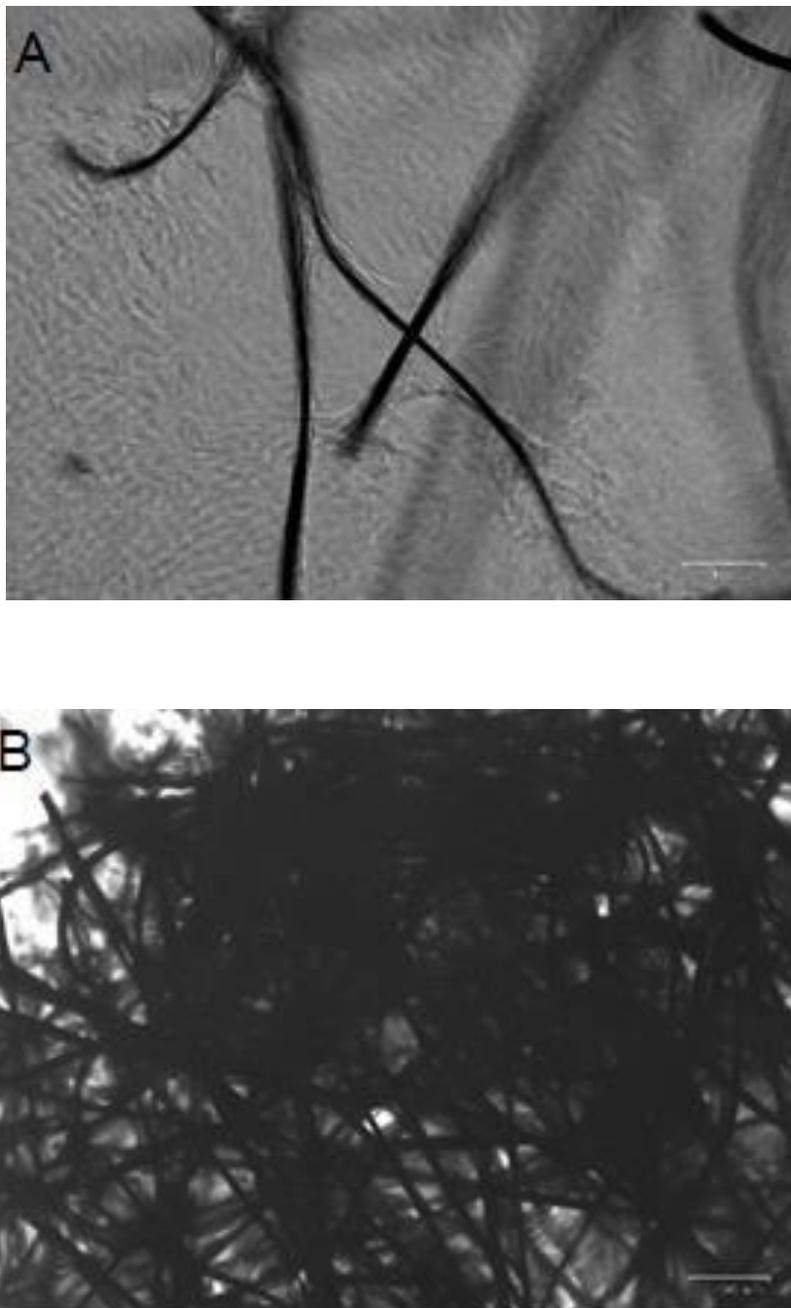


Figura 9: Fotomicrografias de cultura celular OSTEO I demonstrando interação entre o biomaterial derivado de carbono ativada e o crescimento celular. (A) fibras de carvão ativado evidenciando a não formação de halo. (B) fibras de carvão ativado aderidas nas células e tendência de junção. A e B [67 e 40 μ m] respectivamente

4.3 Análise Estrutural

Na figura 10 é apresentada as fotomicrografias eletrônicas da estrutura da fibra de fibra ativado. É possível observar que os fios apresentam áreas similares em seu prolongamento.

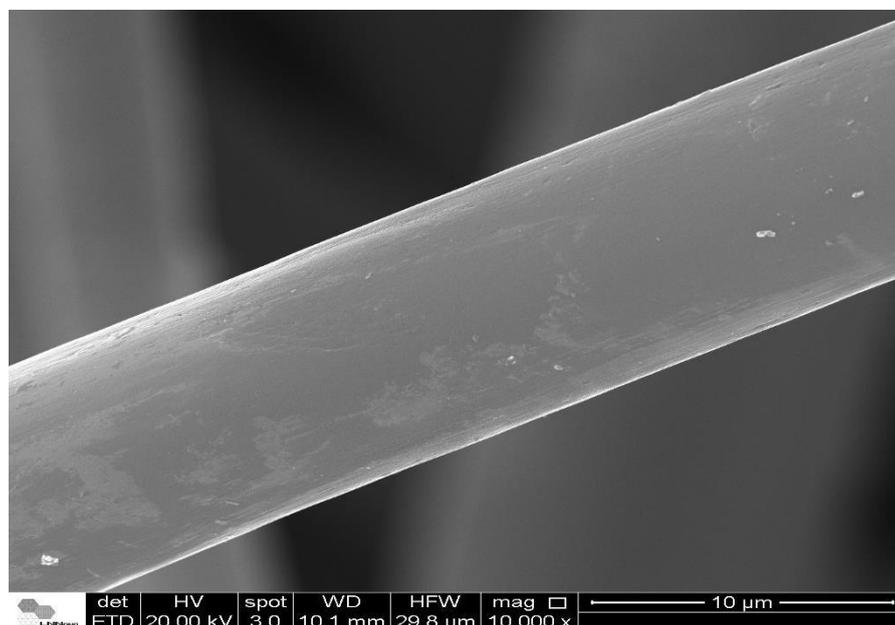
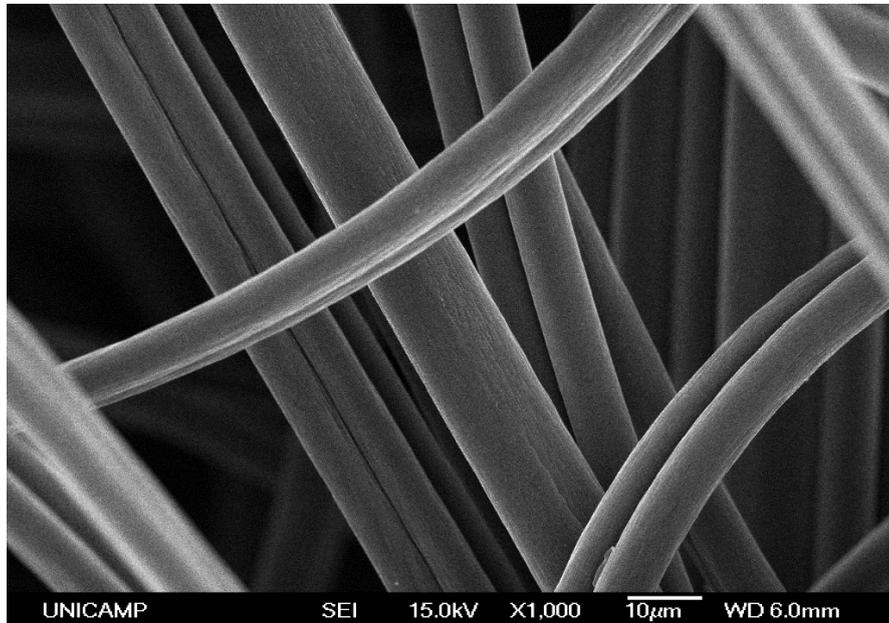


Figura 10: Fotomicrografias de fibra carbono ativado [10μm]

4.4 Análise da Fosfatase Alcalina

Após a indução dos defeitos ósseos e aos diversos tratamentos, os ossos e o sangue foram utilizados para análises bioquímicas, histológicas e de ensaios de flexão.

Na figura 11, é apresentado o gráfico da concentração de fosfatase alcalina no sangue dos animais, durante o processo de reparo ósseo. Os grupos NT, AF e AF+L apresentaram aumento da fosfatase alcalina quando comparados ao grupo controle. O grupo lesionado e tratado com laser (L) apresentou uma redução significativa na concentração de fosfatase alcalina, quando comparado ao grupo não tratado.

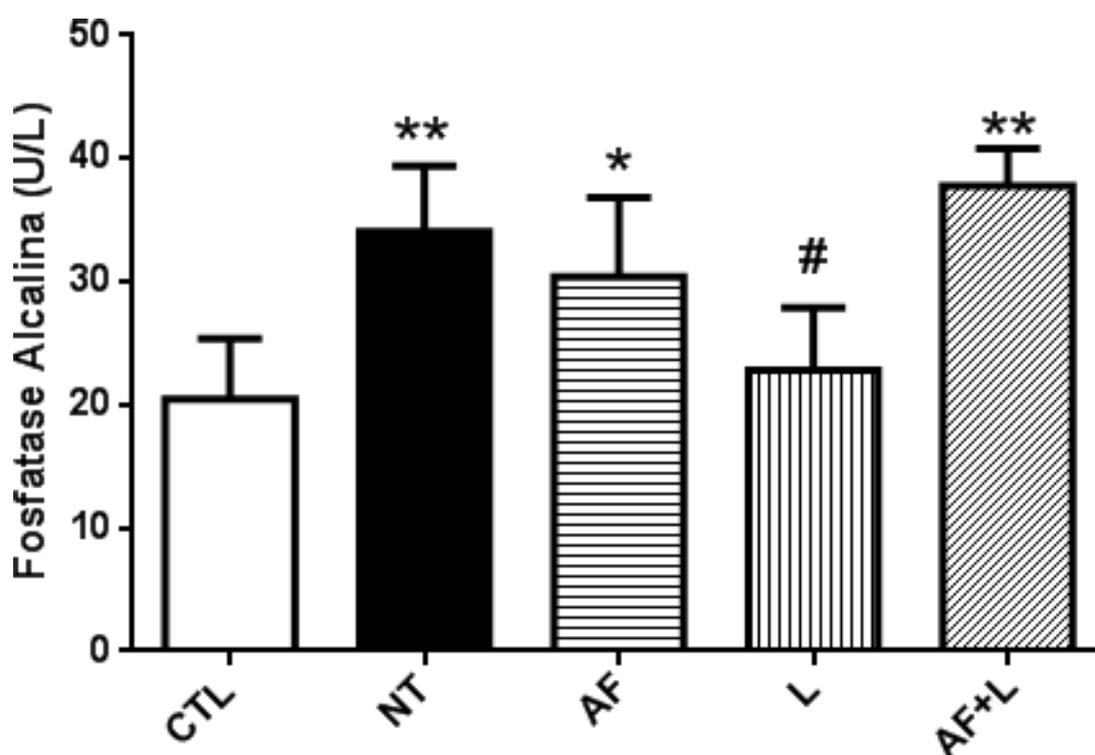


Figura 11: Concentração de fosfatase alcalina. Grupos Controle (CTL), não tratado (NT), grupo tratado com fibra ativado (AF), com laser (L) ou com associação entre fibra ativada e laserterapia (AF+L). ** $p < 0,001$ vs CTL, # $p < 0,05$ vs NT.

4.5 Análises Histológicas – Microscopia Óptica

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

Na figura 12 podemos observar um corte transversal da tíbia do grupo CTL onde a lesão não foi induzida. Na região cortical (C) com a presença tanto de osteócitos (Oc) quanto de canais vasculares (Cv) distribuídos de forma uniforme pelo tecido ósseo.

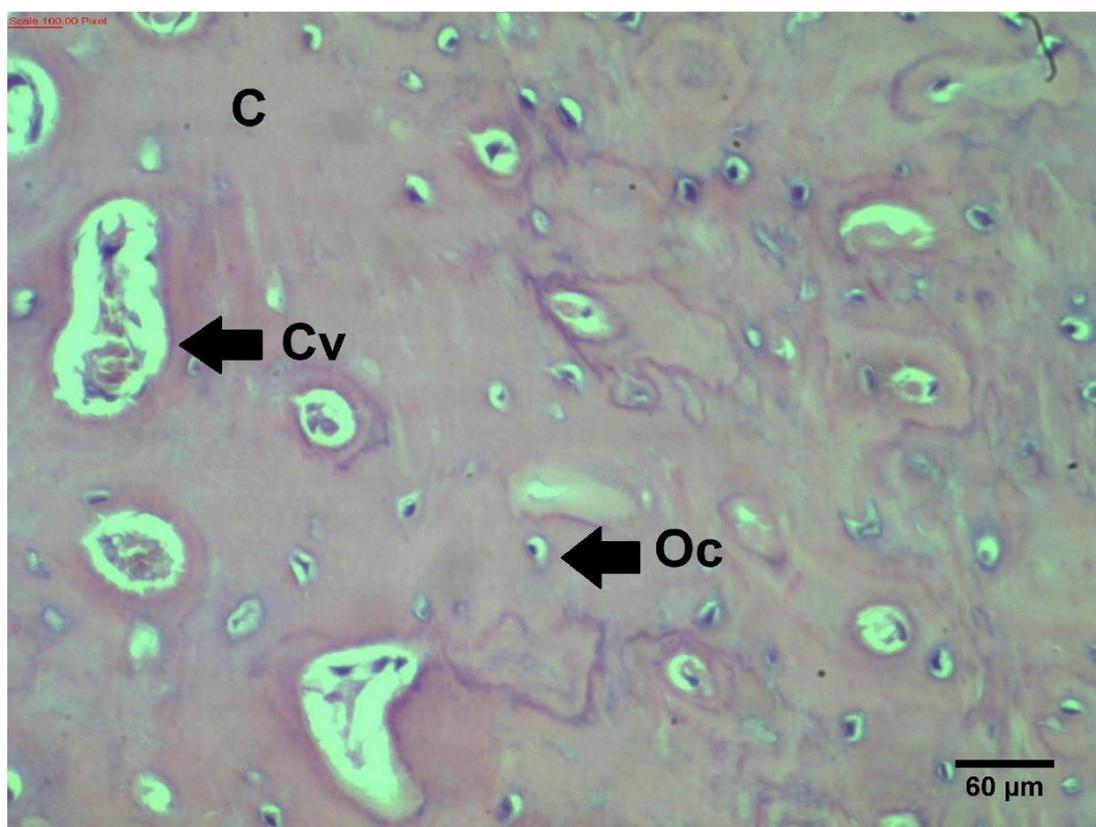


Figura 12: Corte histológico transversal da tíbia direita do grupo CTL. (200X). Região cortical (C). Presença de osteócitos (Oc) e canais vasculares (Cv).

Na figura 13, podemos observar um corte histológico do grupo NT onde a lesão foi induzida e não foi realizado nenhum tratamento. Nesta imagem podemos observar a presença de região ainda com desorganização óssea e tecido de granulação.

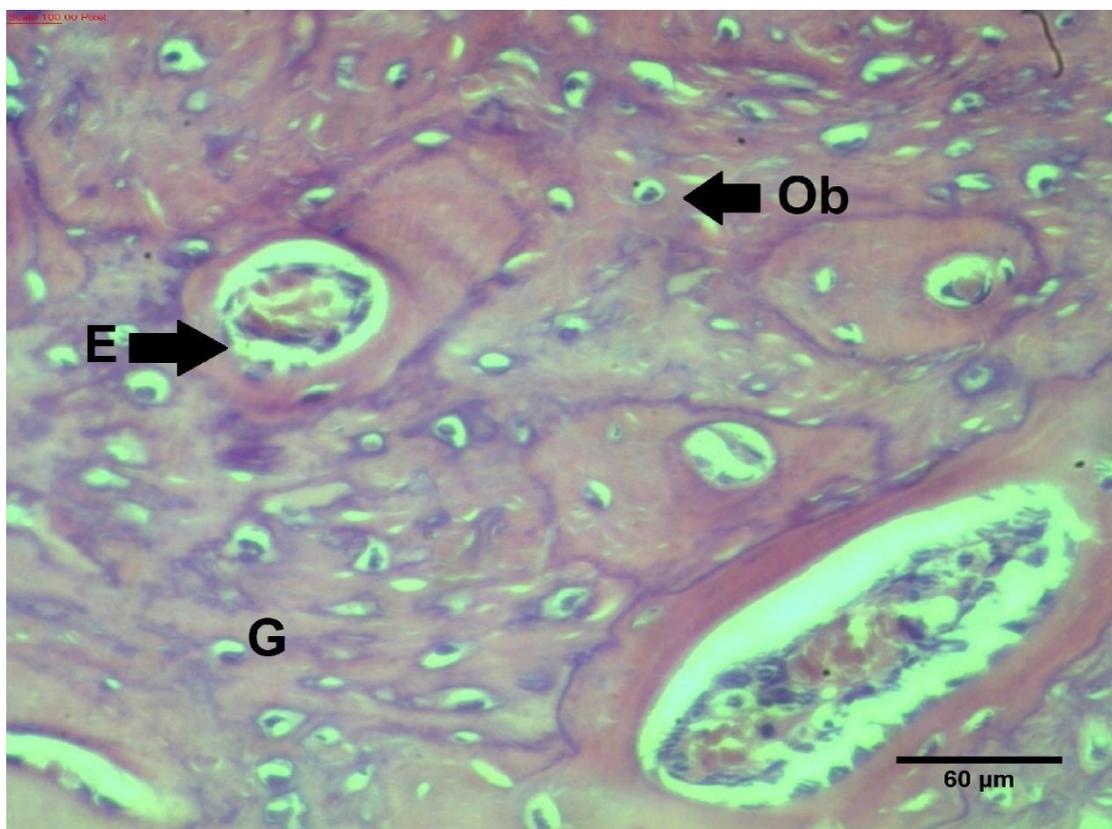


Figura 13: Corte histológico transversal da tíbia direita do grupo NT. (200X). Tecido de granulação (G), osteoblastos (Ob) e endóstio (E).

Na figura 14 observamos a região cortical do grupo irradiado com laser de baixa intensidade 1J. Podemos observar a presença de osteócitos e tecido de granulação distribuídos de maneira regular. É possível observar ainda uma região de remodelamento ósseo.

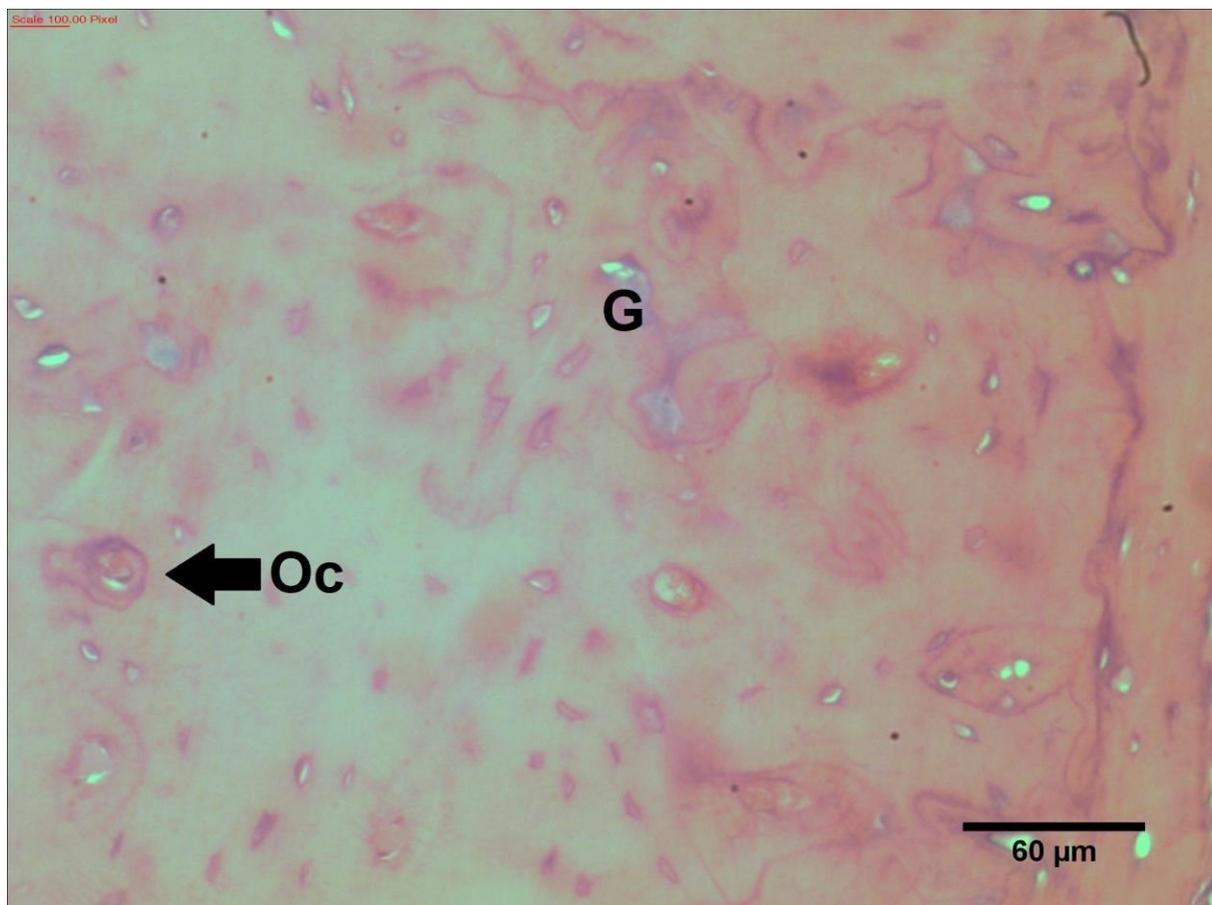


Figura 14: Corte histológico transversal da tíbia direita do grupo L1J. (200X). Tecido de granulação (G), osteócitos (Oc).

Na figura 15 observamos a região cortical do grupo irradiado com laser de baixa intensidade 3J. Podemos observar a presença de osteócitos e tecido de granulação. É possível observar ainda uma região de remodelamento ósseo.

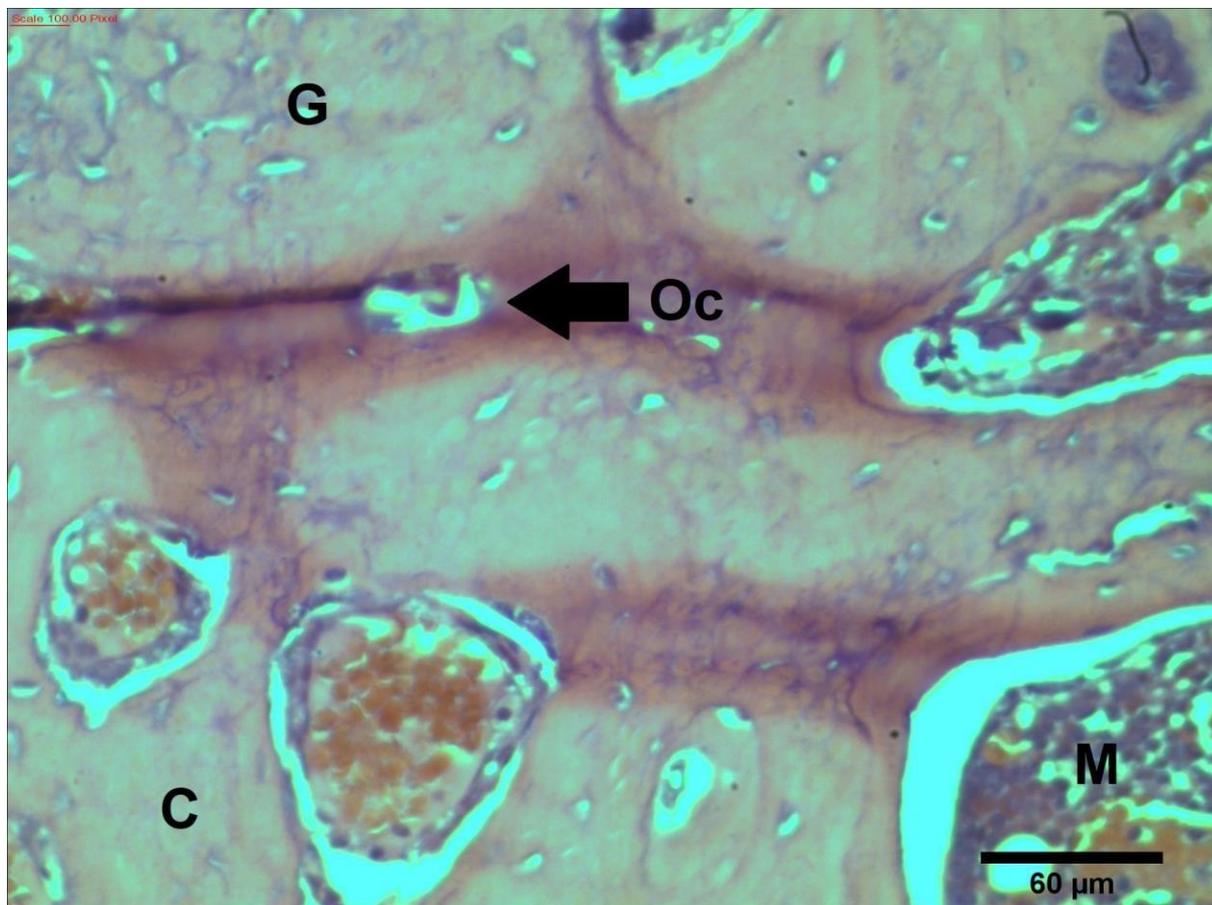


Figura 15: Corte histológico transversal da tíbia direita do grupo L3J. (200X). Região cortical (C), endóstio (E), osteócitos (Oc) e tecido de granulação (G)

Na figura 16 observamos a região cortical do grupo irradiado com laser de baixa intensidade 6J. Podemos observar a presença de osteócitos e canais vasculares distribuídos de maneira uniforme.

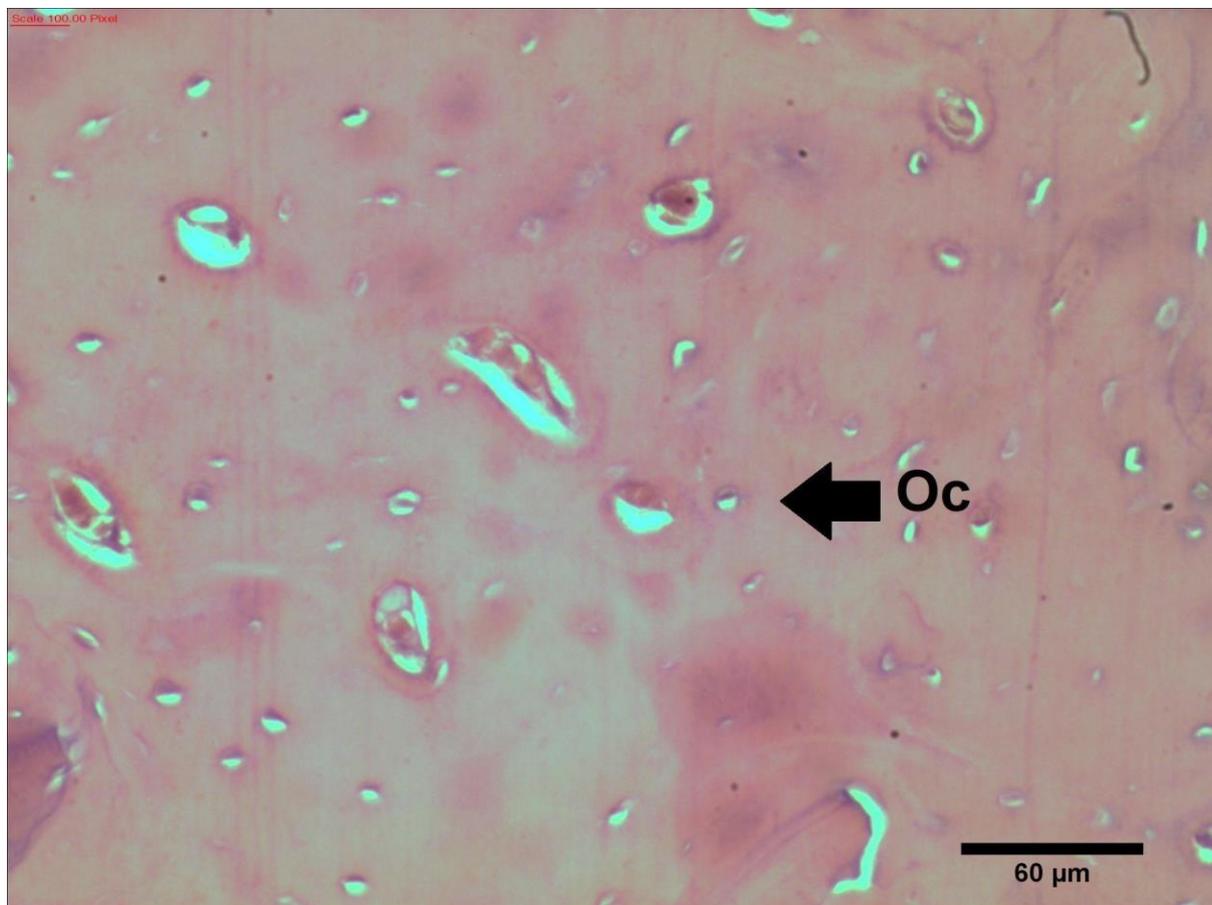


Figura 16: Corte histológico transversal da tíbia direita do grupo L6J. (200X). Região cortical (C), osteócitos (Oc).

Na figura 17 observamos a região cortical do grupo irradiado com laser de baixa intensidade 10J. Podemos observar a presença de osteócitos e canais e tecido de granulação.

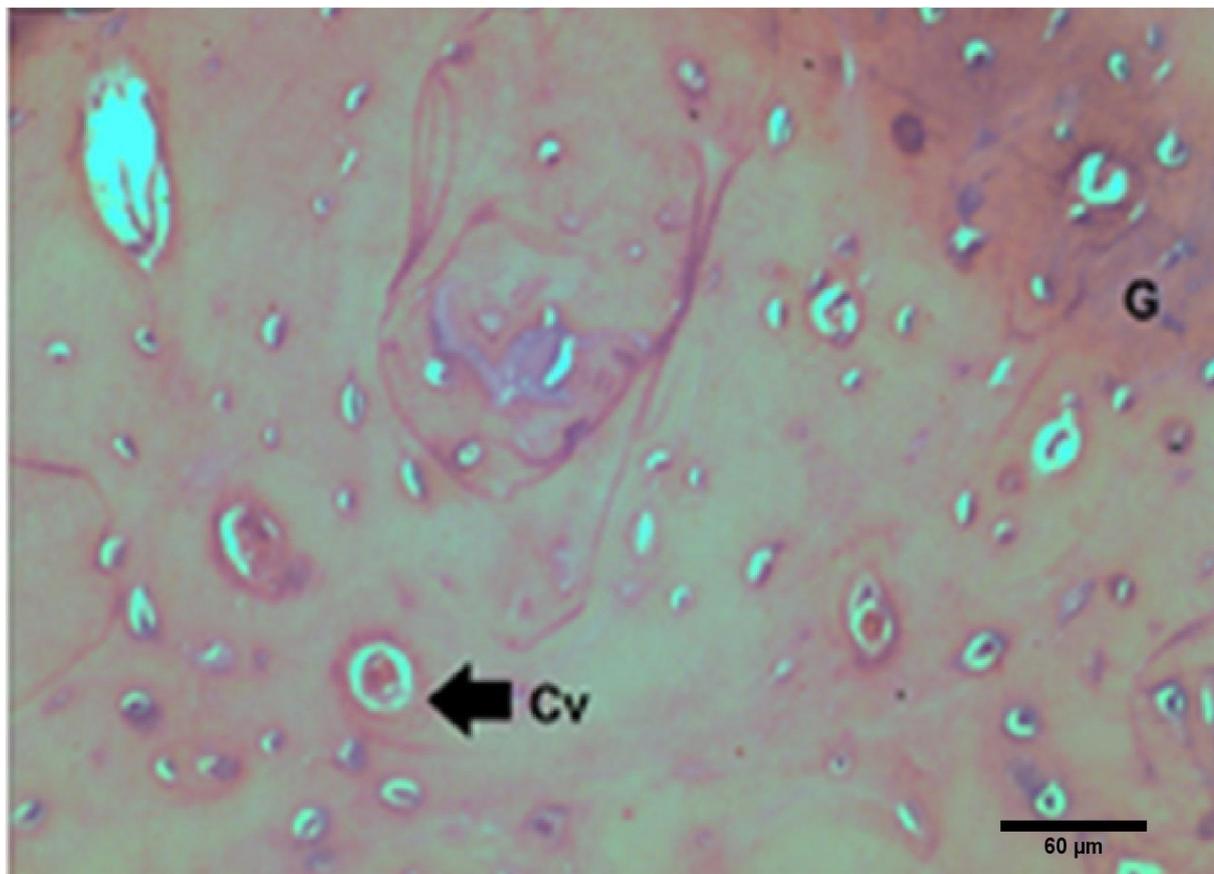


Figura 17: Corte histológico transversal da tíbia direita do grupo L10J. (200X). Tecido de granulação (G), canais vasculares (Cv).

Na figura 18 observamos a região cortical do grupo AF onde foi utilizado a fibra de carvão ativado sem irradiação. Observamos um tecido ósseo organizado com a presença de osteócitos e tecido de granulação.

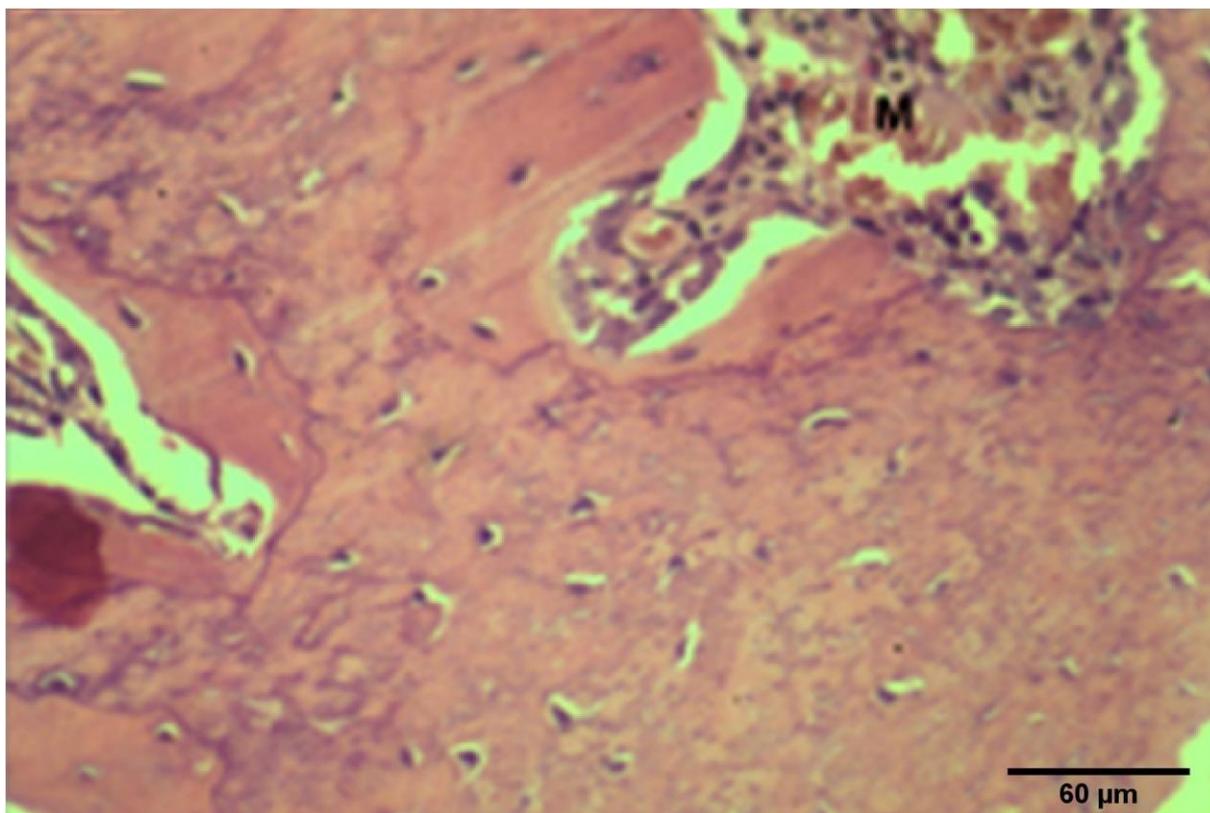


Figura 18: Corte histológico transversal da tíbia direita do grupo AF. (200X). Região medular (M); região cortical (C); Tecido de granulação (G)

Na figura 19 observamos a região cortical do grupo irradiado com laser de baixa intensidade 6J em associação com a fibra de carvão ativado (AF+L). É possível observar um tecido em remodelação, com a presença de canais vasculares. Podemos observar também a presença de osteócitos distribuídos de forma homogênea e tecido de granulação.

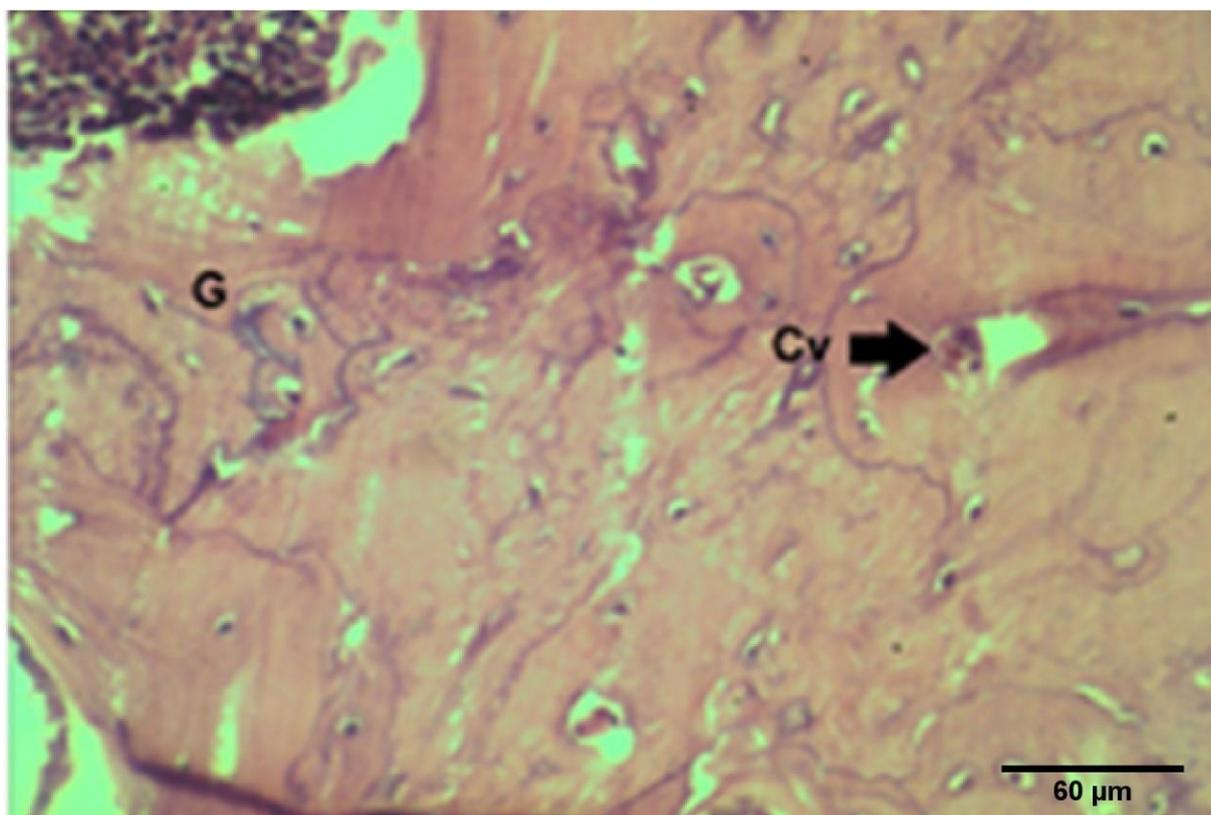


Figura 19: Corte histológico transversal da tíbia direita do grupo AF+L. (200X). Canal vascular (Cv), tecido de granulação (G).

4.6 Propriedades Mecânicas

Abaixo, demonstramos os dados referentes às alterações de força e deformação dos grupos experimentais após 28 dias.

Na figura 20 observamos o gráfico da força máxima de flexão no momento da ruptura óssea (F_{max}). Podemos observar neste gráfico que todos os grupos apresentaram redução da força máxima de flexão em comparação ao grupo controle. Os grupos tratado com laser 6J (L) e com associação de fibra ativado e laser (AF+L) apresentaram aumento desta força quando comparado ao grupo não tratado. Ao contrário, o grupo tratado com fibra ativada (AF) apresentou F_{max} próximo ao grupo não tratado NT.

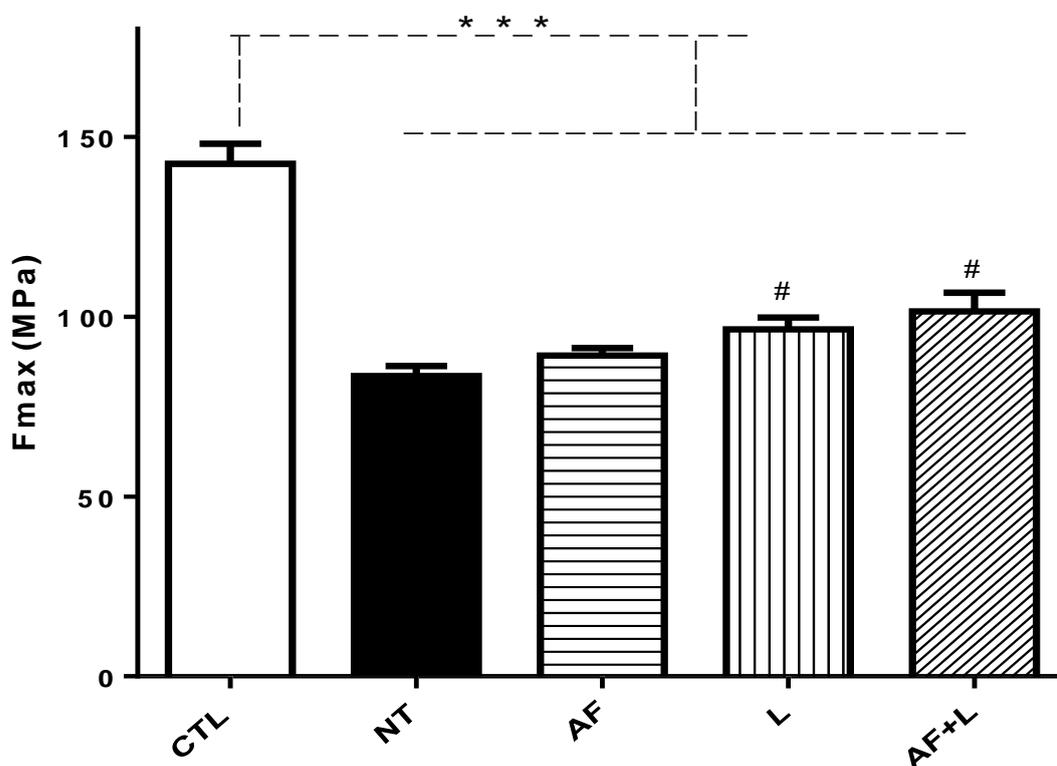


Figura 20: Gráfico da força máxima de flexão no momento da ruptura óssea. Grupos Controle (CTL), não tratado (NT), grupo tratado com fibra ativado (AF), com laser (L) ou com associação entre fibra ativada e laserterapia (AF+L). *** $p < 0,001$ vs CTL, # $p < 0,01$

Na figura 21 observamos o deformação máximo atingido no momento da ruptura, relacionado a capacidade de deslocamento do material. Podemos observar neste gráfico que todos os grupos apresentaram alteração desta deformação em comparação ao grupo controle. O grupo fibra ativada (AF) apresentou um aumento de deslocamento máximo em relação ao grupo controle. Os demais grupos (NT, L e AF+L) apresentaram uma diminuição do deslocamento quando comparados ao grupo CTL. Os grupos L e AF+L apresentaram valores similares ao grupo NT.

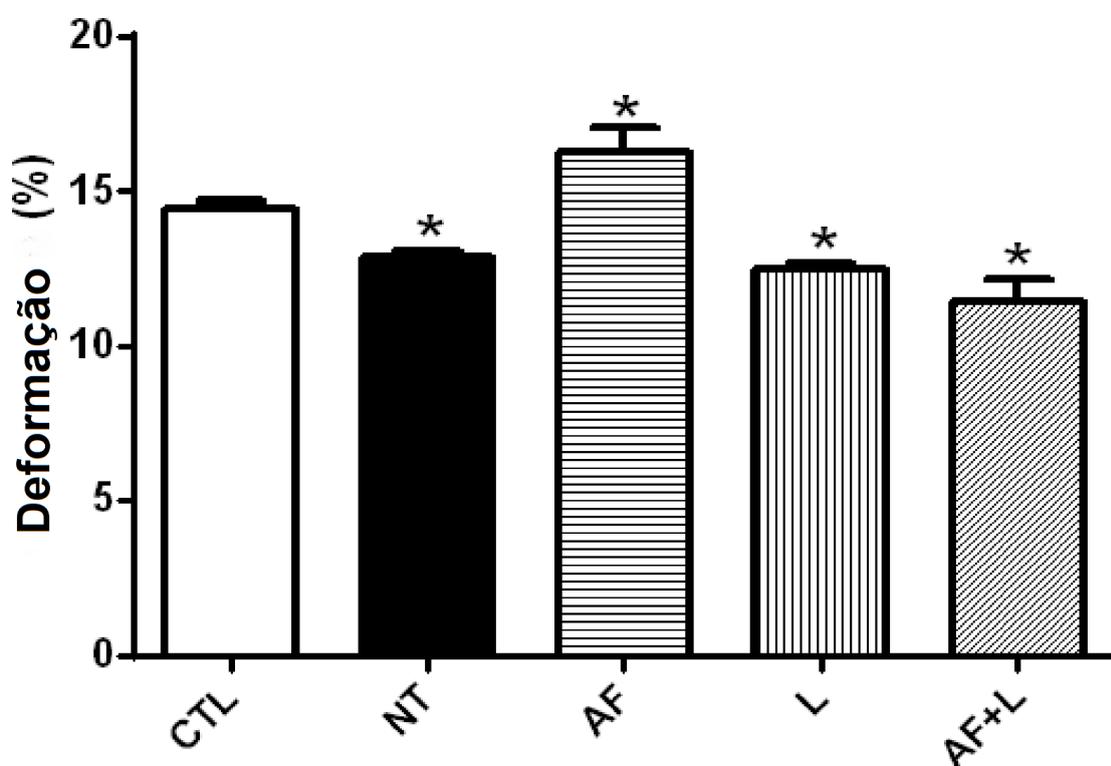


Figura 21: Gráfico de deformação máxima no momento da ruptura óssea. Grupos Controle (CTL), não tratado (NT), grupo tratado com fibra ativada (FA), com laser (L) ou com associação entre fibra ativada e laserterapia (AF+L). *** $p < 0,001$

Tabela 2: Resumo dos Resultados morfológicos, biomecânicos e bioquímicos dos grupos (L), (AF) e (AF + L) em relação ao CTL:

GRUPO	HISTOLOGIA	FMAX	DEFORMAÇÃO (Relação CTL)	FA
LASER (L6J)	↓	↓	↓	=
AF	↓	↓	↑	↑
AF + L	↓	↓	↓	↑

Tabela 3: Resumo dos Resultados morfológicos, biomecânicos e bioquímicos dos grupos (L), (AF) e (AF + L) em relação ao NT:

GRUPO	HISTOLOGIA	FMAX	DEFORMAÇÃO	FA
LASER (L6J)	↑	↑	↑	↓
AF	↑	=	=	↓
AF + L	↑	↑	↓	↑

5. Discussão

A incidência mundial de distúrbios e condições ósseas aumentou abruptamente, especialmente em populações onde o envelhecimento é aliado ao aumento da obesidade e a ausência atividade física ⁽⁴⁾. Alterações ósseas como fraturas e/ou reabsorções ósseas geralmente levam a um processo de recuperação longo e doloroso. As fraturas são comuns, caras e muitas vezes se tornam um peso crônico para os indivíduos e a sociedade. Existe um grande interesse em buscar tratamentos que auxiliem a reparação óssea e promovam uma recuperação mais rápida do paciente às suas atividades diárias normais ⁽⁴⁸⁾.

Além de impor custos médicos diretos à sociedade, as fraturas ósseas também resultam em custos indiretos, principalmente relacionados à redução da produtividade por incapacidade e morte prematura⁽⁴⁹⁾. Na fratura e durante a reconstrução óssea os pacientes geralmente são internados afim de reestabelecer a correta função do osso lesionado e independentemente da parte do corpo afetada, este processo de reconstrução óssea pode durar vários dias de internação chegando a meses ou anos de recuperação da função óssea normal e em alguns casos são necessários mais de um procedimento para o correto reestabelecimento da integridade óssea ^(48,50-53).

A cura da fratura óssea é um processo de reparo em vários estágios que envolve etapas complexas e bem orquestradas que são iniciadas em resposta à lesão e com o objetivo de recuperar as funções mecânicas do osso. Em geral, o tecido ósseo possui capacidade de cura por si só. Em condições críticas, como em defeitos ósseos maiores e fraturas com vascularização inadequada ou interrompida, pode ocorrer um atraso no processo de cicatrização ou mesmo uma falta de união. Portanto, abordagens clínicas como a terapia com laser de baixa intensidade foram desenvolvidas para estimular o processo de cicatrização óssea ⁽⁵⁴⁾.

Neste trabalho foi escolhido um modelo de lesão óssea confeccionada a partir de uma broca cirúrgica e neste local de lesão, chamado defeito ósseo, foi utilizado o carvão ativado em forma de fibra como biomaterial para análise de sua capacidade de reparo ósseo. A fotobiomodulação foi utilizado como terapia auxiliar na fase inflamatória em associação com a utilização do fibra de carvão ativado.

O fibra ativada apresenta algumas propriedades interessantes para sua utilização na área da saúde. O fibra ativada pode ser preparado através de uma variedade de composições, estruturas e propriedades que dependem da matéria-prima, método de processamento e formação. Nos últimos anos, pesquisas adicionais sobre

fibra ativada receberam muita atenção de pesquisadores de todo o mundo devido às suas altas capacidades de adsorção ⁽⁵⁵⁾. Ele é formado por uma superfície otimizada fazendo com que este produto apresente interação com compostos externos, por exemplo, na adsorção de poluentes, fármacos, e neste caso, estimulando o reparo ósseo, provavelmente servindo como um catalizador físico para a proliferação celular ⁽⁵⁶⁾.

O reparo ósseo foi analisado 28 dias após a lesão óssea e foram mensurados os concentração de fosfatase alcalina, padrões histológicos e propriedades mecânicas como a força de flexão máxima no momento da ruptura e a capacidade de deformação escrita pelos valores do deslocamento do tecido na máquina de ensaios mecânicos ^(44,57). São poucos os trabalhos que relacionam alterações histológicas e bioquímicas com as alterações das propriedades mecânicas ósseas durante o reparo ^(21,58,59).

Após ter feito avaliação com as energias de 1, 3, 6, e 10 Joules foi escolhido utilizar o laser de baixa intensidade 830nm com energia de 6 Joules, potência de 100mW e tempo de irradiação de 60 segundos, onde a análise histológica mostrou uma melhor formação óssea quando comparado com as demais energias. Estes parâmetros de energia e potência corroboram com os achados de Pallotta et al, em que a partir do 28º dia após a indução da lesão foi observado um processo de reparo adiantado, com a presença de calo ósseo maduro e formação completa do osso antes lesionado, restando apenas a retomada da arquitetura inicial ⁽³⁾.

Após o processo lesivo, os níveis de fosfatase alcalina aumentam gradativamente até atingir seu pico no final da 2ª semana. A partir daí, a formação óssea é reduzida sendo substituída em parte pela remodelação óssea e os concentração de fosfatase alcalina retornam as concentrações fisiológicos, necessários apenas para a manutenção óssea ⁽³⁾. Rennó et al mostra que o laser 830nm foi eficaz para estimular a proliferação celular e a atividade da fosfatase alcalina nas células osteoblásticas utilizando energia próximo a 6J ^(48,60).

Assim, a fotobiomodulação com laser de baixa intensidade pode estimular a produção de fosfatase alcalina pelos osteoblastos nas fases iniciais do processo lesivo, alterando o tempo de reparo ósseo ⁽⁶¹⁾. 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 ^(3,48).

Em um estudo de Batista et al., usaram irradiação a laser de 830nm, 6J, e apresentou um efeito bioestimulante positivo no estágio inicial da cicatrização óssea. Além disso, em um estudo in vivo comparando os efeitos dos 830nm laser, na energia de 1,7 e 3,4 J, mostrou que quanto maior a energia for mais eficiente para produzir ossos recém formados ⁽⁶²⁾.

Os resultados histológicos nos forneceram informações importantes da progressão do reparo ósseo nos diferentes tratamentos. No grupo CTL, como esperado, os osteócitos estão distribuídos de maneira homogênea em todo o tecido ósseo maduro e existe uma divisão adequada entre a camada cortical e medular, com a presença de endóstio nesta delimitação. No grupo NT foi observado ainda áreas com reabsorção óssea, bem como tecido de granulação. Este resultado em conjunto com os de fosfatase alcalina mostra que a região da lesão está ainda em fase de formação óssea. A redução da força de flexão no grupo NT confirma a presença de um tecido ainda frágil que caminha de forma mais lenta para o reparo ósseo ^(35,63).

Os resultados histológicos do grupo laser (L6J) mostram um processo adiantado do reparo. É possível observar a presença de osteócitos distribuídos sobre um tecido ósseo organizado e homogêneo. A redução dos níveis de fosfatase alcalina em relação ao grupo NT sugere que existe uma menor deposição de osso local, sua redução pode modular a fase de remodelação óssea podendo acelerar o reparo ósseo. Houve uma melhora na força máxima de flexão quando comparado com o grupo NT, essas características sugerem que o laser 6J apresenta características que favorecem sua utilização como terapia para reparo ósseo.

Estes resultados estão de acordo com os resultados encontrados por Werneck et al ⁽⁶⁴⁾ que encontram uma resposta dose-dependente das células a irradiação laser. Ozawa et al. e Stein et al ^(43,65) 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.

Estes aspectos histológicos favoráveis para o reparo ósseo também são encontrados no grupo AF onde é possível observar organização do tecido. As concentrações de fosfatase alcalina foram diminuídas em comparação ao grupo NT que sugere que ainda podemos observar osso que está em formação. A força de flexão no grupo AF também mostrou pouco alterada em relação ao NT e observamos uma capacidade de deformação maior em comparação ao CTL. Isso mostra um tecido mais elástico e com mais facilidade de deformar. O aumento da capacidade de deformação

do grupo AF pode estar relacionada com a morfologia do fibra ativada onde a distribuição de suas fibras lembram a formação de colágeno em alguns tecidos biológicos.

A laserterapia é conhecida pela sua ação moduladora, alterando a resposta celular e reduzindo o processo inflamatório. O laser pode ainda aumentar a reabsorção óssea, alterando o processo de reparo tecidual, fator que pode promover a readequação da formação óssea do original ⁽³⁾. Os resultados mostram que os tratamentos utilizados dos diferentes grupos (AF, AF+L e L) alteram o curso morfofuncional do reparo ósseo, acelerando o processo de reparo no grupo L6J.

Não existem na literatura, dados conclusivos a respeito da melhor dosimetria a ser utilizada na estimulação do tecido ósseo. No presente estudo, foi obtida uma resposta dose-dependente mostrando eficácia com 6J. Estes resultados corroboram com uma série de trabalhos que verificaram que o laser aplicado em energia próximo a 6J, promove uma melhor resposta do tecido ^(48,59,62,66).

Alguns trabalhos na literatura evidenciam que a resposta das células a irradiação laser é que respondem de formas diferentes a diferentes comprimentos de onda ^(43,64,65). Comprimentos de onda mais longos, dentro da faixa do infravermelho próximo, 700nm até 1200nm, são mais adequados para o tratamento de estruturas mais profundas⁽⁶²⁾. Para entendermos os fatores envolvidos neste processo, necessitamos outras investigações.

No grupo AF+L podemos observar uma histologia mais desorganizada do que os outros grupos estudados. Deslocamento máximo no momento da ruptura óssea mostra pouco diminuído em relação ao grupo NT. Isso pode sugerir que a associação da fotobiomodulação ao fibra ativada causa a aceleração do processo de reparo. Houve um aumento na concentração de fosfatase alcalina do grupo AF+L o que sugere que talvez este tecido esteja ainda em formação óssea, devido a presença do fibra ativada.

A força mecânica é um dos parâmetros mais importantes relacionados ao risco de fratura. Neste estudo este parâmetro foi avaliado através do teste de flexão de três pontos. Este teste tem sido utilizado em trabalhos que investigam os efeitos da fotobiomodulação na força óssea e na consolidação de fraturas⁽⁶⁷⁾. Evans em 1973 descreve que as propriedades mecânicas mais bem estudadas do osso são suas características de resistência, sua força máxima ou deformação sob carga, rigidez ou módulo de elasticidade, sua dureza e sua capacidade de absorção de energia. Os métodos utilizados para a determinação dessas propriedades são os mesmos que

empregados em estudos similares das propriedades mecânicas de materiais de engenharia e estruturais ⁽⁶⁸⁾.

Observamos no gráfico da forma máxima de flexão no momento da ruptura óssea que todos os grupos apresentaram redução da força máxima de flexão em comparação ao grupo controle. Os grupos tratados com laser (L), e fibra ativada com laser (AF+L) apresentaram aumento desta força quando comparado ao grupo não tratado. No deslocamento máximo atingido no momento da ruptura o grupo AF apresentou um aumento em relação ao grupo CTL. Grupos L e AF+L tiveram uma diminuição em relação ao CTL. Nas concentrações 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 laser (L) apresenta uma redução significativa quando comparado ao grupo NT.

Muitos 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⁽⁴⁸⁾. Trelles et al verificaram uma grande presença de osteoblastos na área fraturada, após irradiação com laser. Esta maior concentração de osteoblastos poderia estar relacionada com uma deposição de matriz óssea, o que contribuiria para o aumento a força mecânica do tecido ósseo no grupo irradiado com laser de baixa intensidade ⁽⁶⁹⁾.

O biomaterial em forma de fibra ativada demonstrou um aumento na viabilidade celular de osteoblastos com a associação do material de fibra ativada indicando que a terapia foi eficiente em estimular o metabolismo celular. Não foi observado toxicidade celular, nos resultados celulares, com valores próximos ao grupo controle (CTL). Na imagem microscópica podemos observar aderência das células osteoblastos ao biomaterial. Essas características sugerem a biocompatibilidade do matéria ⁽⁴⁸⁾. Em relação a culturas de células, os efeitos estimulantes do laser também têm sido evidenciados. Luger et al, Tamura et al e Ozawa et al ^(31,65,70) demonstraram um efeito positivo do laser na proliferação celular.

Portanto, os dados do estudo atual demonstraram que 6J foi capaz de estimular o metabolismo ósseo e acelerar o processo de cicatrização óssea no modelo experimental de reparo ósseo. Estes resultados corroboram os de Rennó et al. e Batista et al, que observaram que a terapia com laser de baixa intensidade no comprimento de onda infravermelho foi capaz de melhorar o reparo ósseo em tíbias de ratos osteoporóticos. Em conjunto, os resultados do presente trabalho traz evidências

que o tecido ósseo responde corretamente ao laser e ao uso de biomateriais de carbono ativado, o que representaria uma terapia segura e eficaz para tratar fraturas ósseas ^(6,62,64,69).

A Fotobiomodulação vem surgindo como um recurso capaz de modular o reparo ósseo e acelerar o processo de consolidação de fraturas. Melhor parametrização das variáveis é necessário. As limitações estão relacionadas a dosimetria e há muita controvérsia sobre seu mecanismo de ação nos diferentes tecidos. A fibra de carvão ativado também demonstra eficácia no reparo do tecido ósseo.

Algumas limitações do trabalho devem ser apontadas. Apenas um período após a lesão óssea foi investigado. Seria muito interessante investigar a resposta tecidual precoce e tardia ao uso de laser e biomateriais em diferentes períodos pós lesão. Além disso, mais análises quantitativas deve ser incluída em pesquisas futuras, como análise bioquímica, para melhor compreender os vários mecanismos que fazem parte do processo de reparo ósseo.

6. Conclusão

A partir dos resultados e dos embasamentos teóricos aqui apresentados, podemos concluir que o modelo de lesão óssea utilizado neste trabalho alterou as propriedades mecânicas. Podemos observar uma melhora das propriedades mecânicas relacionadas com o aumento da força de flexão nos grupos tratados com laser de baixa intensidade na energia de 6J e em sua associação com a fibra de carbono ativada. Sugerimos ainda que tanto o biomaterial quando o laser de baixa intensidade acelerou a formação óssea pela redução da concentração de fosfatase alcalina e pela presença de um tecido ósseo organizado, principalmente do grupo irradiado.

Este tipo de material envolve um baixo custo, é de fácil aquisição e biocompatível. Os dados deste trabalho abrem horizontes para outras pesquisas a respeito dos efeitos do laser e o uso de fibra de carvão ativado. Estudos futuros devem ser realizados no intuito de investigar os efeitos de diferentes comprimentos de onda, doses e formas de aplicação do laser bem como, os diversos formas e usos de fibra de carvão ativado e a interação dos dois.

7. Referências Bibliográficas

1. Fávaro-Pípi E, Feitosa SM, Ribeiro DA, Bossini P, Oliveira P, Parizotto NA, et al. Comparative study of the effects of low-intensity pulsed ultrasound and low-level laser therapy on bone defects in tibias of rats. *Lasers Med Sci.* 1º de setembro de 2010;25(5):727–32.
2. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Crit Rev Biomed Eng.* 2012;40(5):363–408.
3. Pallotta RC. Avaliação do efeito da radiação laser de baixa potência e do plasma rico em fibrina na reparação óssea em ratos. [Internet] [text]. Universidade de São Paulo; 2014 [citado 4 de dezembro de 2017]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42136/tde-25112014-143302/>
4. Fletcher RH, Fletcher S. Epidemiología clínica:: Elementos essenciais. In: Estudos sobre riscos. [Internet]. 2008 [citado 4 de dezembro de 2017]. Disponível em: <http://pesquisa.bvsalud.org/infofrontera/resource/es/bib-232723>
5. Brannigan K, Griffin M. An Update into the Application of Nanotechnology in Bone Healing. *Open Orthop J.* 2016;10:808–23.
6. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis P. Current concepts of molecular aspects of bone healing. - PubMed - NCBI [Internet]. 2005 [citado 5 de dezembro de 2017]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16102764>
7. Paiva KBS, Granjeiro JM. Bone tissue remodeling and development: focus on matrix metalloproteinase functions. *Arch Biochem Biophys.* 1º de novembro de 2014;561:74–87.
8. Hadjiargyrou M, Lombardo F, Zhao S, Ahrens W, Joo J, Ahn H, et al. Transcriptional profiling of bone regeneration. Insight into the molecular complexity of wound repair. *J Biol Chem.* 16 de agosto de 2002;277(33):30177–82.
9. Bortolon PC, Andrade CLT de, Andrade CAF de. O perfil das internações do SUS para fratura osteoporótica de fêmur em idosos no Brasil: uma descrição do triênio 2006-2008. *Cad Saúde Pública.* abril de 2011;27(4):733–42.
10. Vieira JGH. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. *Arq Bras Endocrinol Amp Metabol.* dezembro de 1999;43(6):415–22.
11. Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol.* outubro de 2008;19(5):459–66.
12. 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.* fevereiro de 2008;87(2):107–18.

13. Liu Y, Wei X, Kuang Y, Zheng Y, Gu X, Zhan H, et al. Ultrasound treatment for accelerating fracture healing of the distal radius. A control study. *Acta Cir Bras.* novembro de 2014;29(11):765–70.
14. Fürmetz J, Soo C, Behrendt W, Thaller PH, Siekmann H, Böhme J, et al. Bone Transport for Limb Reconstruction Following Severe Tibial Fractures. *Orthop Rev [Internet]*. 31 de março de 2016 [citado 6 de outubro de 2017];8(1). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4821232/>
15. Rossini M, Viapiana O, Gatti D, de Terlizzi F, Adami S. Capacitively Coupled Electric Field for Pain Relief in Patients with Vertebral Fractures and Chronic Pain. *Clin Orthop.* março de 2010;468(3):735–40.
16. Victoria G, Petrisor B, Drew B, Dick D. Bone stimulation for fracture healing: What's all the fuss? *Indian J Orthop.* 2009;43(2):117–20.
17. Guarniero R, Batista MA, Leivas TP, Rodrigues CJ, Arenas GCF, Belitardo DR. Avaliação do efeito do ibandronato na consolidação de fratura: estudo experimental em coelhos. *Clinics.* outubro de 2011;66(10):1787–92.
18. Moura J, Teixeira LN, Ravagnani C, Peitl O, Zanotto ED, Beloti MM, et al. In vitro osteogenesis on a highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate). *J Biomed Mater Res A.* 1º de setembro de 2007;82(3):545–57.
19. Henkel J, Woodruff MA, Epari DR, Steck R, Glatt V, Dickinson IC, et al. Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions — A 21st Century Perspective. *Bone Res.* 25 de setembro de 2013;1(3):216–48.
20. Miranda ES, Cardoso FTS, Filho M, De JF, Barreto MDR, Teixeira RM de M, et al. Organic and inorganic bone graft use in rabbits' radius surgical fractures repair: an experimental and comparative study. *Acta Ortopédica Bras.* 2005;13(5):245–8.
21. Oliveira FS, Pinfildi CE, Parizoto NA, Liebano RE, Bossini PS, Garcia ÉB, et al. Effect of low level laser therapy (830 nm) with different therapy regimes on the process of tissue repair in partial lesion calcaneous tendon. *Lasers Surg Med.* 1º de abril de 2009;41(4):271–6.
22. 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. *J Ind Eng Chem.* 25 de maio de 2014;20(3):887–96.
23. Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* junho de 2006;27(18):3413–31.
24. Bhatnagar A, Hogland W, Marques M, Sillanpää M. An overview of the modification methods of activated carbon for its water treatment applications. *Chem Eng J.* 1º de março de 2013;219(Supplement C):499–511.
25. Lee SJ. Cytokine delivery and tissue engineering. *Yonsei Med J.* dezembro de 2000;41(6):704–19.

26. Bertolotti RL. Alternative casting alloys for today's crown and bridge restorations. Part II: metal-ceramic restorations. *CDA J.* setembro de 1983;11(9):63–9.
27. de Castro e Silva Júnior O, Zucoloto S, Menegazzo LA, Granato RG, Marcassa LG, Bagnato VS. Laser enhancement in hepatic regeneration for partially hepatectomized rats. *Lasers Surg Med.* 2001;29(1):73–7.
28. Karu TI. [Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser irradiation]. *Dokl Akad Nauk SSSR.* 1986;291(5):1245–9.
29. Schaffer M, Bonel H, Sroka R, Schaffer PM, 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.
30. 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.
31. Hazeki O, Tamura M. Near infrared quadruple wavelength spectrophotometry of the rat head. *Adv Exp Med Biol.* 1989;248:63–9.
32. Svaasand LO. [Biostimulation with low-intensity lasers--physics or metaphysics?]. *Nord Med.* 1990;105(3):72–5.
33. Basford JR, Sheffield CG, Cieslak KR. Laser therapy: a randomized, controlled trial of the effects of low intensity Nd:YAG laser irradiation on lateral epicondylitis. *Arch Phys Med Rehabil.* novembro de 2000;81(11):1504–10.
34. Bjordal JM, Lopes-Martins RA, Joensen J, Couppe C, Ljunggren AE, Stergioulas A, et al. A systematic review with procedural assessments and meta-analysis of low level laser therapy in lateral elbow tendinopathy (tennis elbow). *BMC Musculoskelet Disord.* 29 de maio de 2008;9:75.
35. Silva RT da. Efeito do laser de baixa potência (660nm) na tendinite induzida por colagenase em tendão calcâneo de ratos. Effect of the low level laser therapy (660nm) in the induced tendinitis by collagenase in aquilles tendon of rats [Internet]. 12 de dezembro de 2013 [citado 4 de dezembro de 2017]; Disponível em: <http://bibliotecatede.uninove.br/handle/tede/1134>
36. Correa F, Lopes Martins RAB, Correa JC, Iversen VV, Joenson J, Bjordal JM. Low-level laser therapy (GaAs lambda = 904 nm) reduces inflammatory cell migration in mice with lipopolysaccharide-induced peritonitis. *Photomed Laser Surg.* agosto de 2007;25(4):245–9.
37. Bjordal JM, Klovning A, Lopes-Martins RAB, Roland P-DH, Joensen J, Slørdal L. Overviews and systematic reviews on low back pain. *Ann Intern Med.* 20 de maio de 2008;148(10):789-790; author reply 791-792.
38. Leal Junior ECP, Lopes-Martins RAB, Vanin AA, Baroni BM, Grosselli D, De Marchi T, et al. Effect of 830 nm low-level laser therapy in exercise-induced skeletal muscle fatigue in humans. *Lasers Med Sci.* maio de 2009;24(3):425–31.

39. Lopes-Martins RAB, Albertini R, Lopes-Martins PSL, de Carvalho FAS, Neto HCCF, Iversen VV, et al. Steroid receptor antagonist mifepristone inhibits the anti-inflammatory effects of photoradiation. *Photomed Laser Surg.* abril de 2006;24(2):197–201.
40. Pinheiro ALB, Júnior L, Assis F de, Gerbi MEM, Ramalho LMP, Marzola C, et al. 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.
41. Ribeiro DA, Matsumoto MA. Low-level laser therapy improves bone repair in rats treated with anti-inflammatory drugs. *J Oral Rehabil.* dezembro de 2008;35(12):925–33.
42. Torres CS, dos Santos JN, Monteiro JSC, Amorim PGM, Pinheiro ALB. 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.* agosto de 2008;26(4):371–7.
43. Stein E, Koehn J, Sutter W, Wendtlandt G, Wanschitz F, Thurnher D, et al. 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.
44. Kazem Shakouri S, Soleimanpour J, Salekzamani Y, Oskuie MR. Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process. *Lasers Med Sci.* janeiro de 2010;25(1):73–7.
45. Blaya DS, Guimarães MB, Pozza DH, Weber JBB, de Oliveira MG. Histologic study of the effect of laser therapy on bone repair. *J Contemp Dent Pract.* 1º de setembro de 2008;9(6):41–8.
46. Khadra M, Rønold HJ, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE, Haanaes HR. Low-level laser therapy stimulates bone-implant interaction: an experimental study in rabbits. *Clin Oral Implants Res.* junho de 2004;15(3):325–32.
47. 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.* agosto de 2006;33(8):619–924.
48. Renno ACM, McDonnell PA, Parizotto NA, Laakso E-L. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro. *Photomed Laser Surg.* agosto de 2007;25(4):275–80.
49. Brosseau L, Welch V, Wells G, Tugwell P, de Bie R, Gam A, et al. Low level laser therapy for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: a metaanalysis. *J Rheumatol.* agosto de 2000;27(8):1961–9.
50. Cross MB, Osbahr DC, Nam D, Reinhardt KR, Bostrom MPG, Dines JS. An analysis of the hip and knee reconstruction section of the orthopaedic in-training examination. *Orthopedics.* 9 de setembro de 2011;34(9):e550-555.
51. Wolford LM, Dhameja A. Planning for combined TMJ arthroplasty and orthognathic surgery. *Atlas Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* setembro de 2011;19(2):243–70.

52. Rustemeyer J, Gregersen J. Quality of Life in orthognathic surgery patients: post-surgical improvements in aesthetics and self-confidence. *J Cranio-Maxillo-fac Surg Off Publ Eur Assoc Cranio-Maxillo-fac Surg.* julho de 2012;40(5):400–4.
53. Zapata U, HALVACHS E, DECHOW L. Architecture and microstructure of cortical bone in reconstructed canine mandibles after bone transport distraction osteogenesis. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 5 de dezembro de 2017]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21927873>
54. Tim CR, Bossini PS, Kido HW, Malavazi I, von Zeska Kress MR, Carazzolle MF, et al. Effects of low level laser therapy on inflammatory and angiogenic gene expression during the process of bone healing: A microarray analysis. *J Photochem Photobiol B.* 1º de janeiro de 2016;154(Supplement C):8–15.
55. Lee SJ. EBSCOhost | 97747396 | ACTIVATED CARBON FIBER - THE HYBRID OF CARBON FIBER AND ACTIVATED CARBON. [Internet]. 2014 [citado 5 de dezembro de 2017]. 56. Agarwal R, García AJ. Biomaterial strategies for engineering implants for enhanced osseointegration and bone repair. *Adv Drug Deliv Rev.* 1º de novembro de 2015;94:53–62.
57. Nascimento SB, Cardoso CA, Ribeiro TP, Almeida JD, Albertini R, Munin E, et al. Effect of low-level laser therapy and calcitonin on bone repair in castrated rats: a densitometric study. *Photomed Laser Surg.* fevereiro de 2010;28(1):45–9.
58. Renno ACM, Fávoro-Pípi E, Fernandes K, Tim C, Ribeiro DA. Ultrasound therapy modulates osteocalcin expression during bone repair in rats. *Ultrasonics.* janeiro de 2012;52(1):111–6.
59. Bossini PS, Rennó ACM, Ribeiro DA, Fangel R, Ribeiro AC, Lahoz M de A, et al. Low level laser therapy (830nm) improves bone repair in osteoporotic rats: Similar outcomes at two different dosages. *Exp Gerontol.* 1º de fevereiro de 2012;47(2):136–42.
60. Fernandes KR, Ribeiro DA, Rodrigues NC, Tim C, Santos AA, Parizotto NA, et al. Effects of low-level laser therapy on the expression of osteogenic genes related in the initial stages of bone defects in rats. *J Biomed Opt.* março de 2013;18(3):038002.
61. Magri AMP, Fernandes KR, Assis L, Mendes NA, da Silva Santos ALY, de Oliveira Dantas E, et al. Photobiomodulation and bone healing in diabetic rats: evaluation of bone response using a tibial defect experimental model. *Lasers Med Sci.* setembro de 2015;30(7):1949–57.
62. Batista JD, Sargenti-Neto S, Dechichi P, Rocha FS, Pagnoncelli RM. 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.
63. 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.* abril de 2009;41(4):298–304.
64. Werneck CE, Pinheiro ALB, Pacheco MTT, Soares CP, De Castro JLF. Laser Light Is Capable of Inducing Proliferation of Carcinoma Cells in Culture: A

- Spectroscopic in Vitro Study. *Photomed Laser Surg.* 1º de junho de 2005;23(3):300–3.
65. Ozawa Y, Shimizo N. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 5 de dezembro de 2017]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9556134>
 66. Fangel R, Bossini PS, Renno AC, Granito RN, Wang CC, Nonaka KO, et al. EBSCOhost | 100212997 | Biomechanical properties: effects of low-level laser therapy and Biosilicate on tibial bone defects in osteopenic rats. [Internet]. [citado 6 de outubro de 2017].
 67. Pritchard J. Mechanical Properties of Bone. *J Anat.* dezembro de 1973;116(Pt 3):457.
 68. Evans FG. Factors affecting the mechanical properties of bone. [Internet]. 1973 [citado 8 de dezembro de 2017]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1807062/>
 69. Trelles MA, Mayayo E. Bone fracture consolidates faster with low-power laser. *Lasers Surg Med.* 1987;7(1):36–45.
 70. Luger EJ, Rochkind S, Wollman Y, Kogan G, Dekel S. Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. *Lasers Surg Med.* 1998;22(2):97–102.

8. Anexo

8.1 Aprovação comite de ética



Protocolo de Pesquisa referente ao Projeto nº AN0045/2014

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 subcutâneo e musculares, acesso ao periosteio 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.

Os animais serão divididos em grupos de 05 animais cada e submetidos imediatamente a diversos tratamentos, conforme especificado abaixo:

Grupo I – Íntegro: sem procedimento cirúrgico.

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

Grupo II – Grupo com a loja óssea e sem tratamento.

Grupo III – Grupo com loja óssea e utilização de hidroxiapatita

Grupo IV – Grupo com loja óssea e utilização de carvão ativo

Grupo V – Grupo com loja óssea e utilização de carvão ativo associado ao Laser (830nm, 6J, 100mW)

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 (tensiômetro). 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 (UI) 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 (conservação) e inclusão em Paraplast® das amostras. Em seguida, estas serão colocadas em recipientes de tamanho 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 micrôtomos 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 estudam 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:

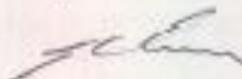
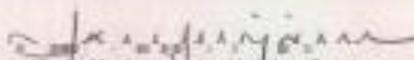
Aprovado, sendo que este projeto deverá permanecer arquivado por 05 (cinco) anos nesta Secretaria.

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

25 de janeiro de 2015

Prof. Dra. Karin Marie van der Heijden Cardenes
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Iluminação de Animais
Universidade Nove de Julho