



UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA - BIOFOTÔNICA

GIOVANA GLEICE DA SILVA SANTOS

**EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO LOCAL E VASCULAR NA
ORGANIZAÇÃO TECIDUAL E RESISTÊNCIA ÓSSEA – ESTUDO
EXPERIMENTAL**

São Paulo, SP

2025



GIOVANA GLEICE DA SILVA SANTOS

**EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO LOCAL E VASCULAR NA
ORGANIZAÇÃO TECIDUAL E RESISTÊNCIA ÓSSEA – ESTUDO
EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada à Universidade
Nove de Julho, para obtenção do título
de Mestre(a) em Medicina - Biofotônica.

Orientador: Prof. Rodrigo Labat Marcos

São Paulo, SP

2025



Santos, Giovana Gleice da Silva.

Efeito da fotobiomodulação local e vascular na organização tecidual e resistência óssea – estudo experimental. / Giovana Gleice da Silva Santos. 2025.

64 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2025.

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

1. Lesão óssea. 2. Fotobiomodulação vascular. 3. ILIB. 4. Propriedades mecânicas. 5. Colágeno.

I. Marcos, Rodrigo Labat.

II. Título.

CDU 615.831

São Paulo, 14 de novembro de 2025.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): Giovana Gleice da Silva Santos

Título da Dissertação: "Efeito da fotobiomodulação local e vascular na organização tecidual e resistência óssea – estudo experimental".

Presidente: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS 

Membro: PROFª. DRª. STELLA REGINA ZAMUNER 

Membro: PROF. DR. NIVALDO ANTONIO PARIZOTTO 

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, que guiou e fortaleceu em cada etapa desta caminhada.

Aos meus pais e minha irmã pela dedicação e amor incondicional em todos os momentos da minha vida.

Ao meu noivo, pelo amor, paciência e incentivo. Obrigada por sempre estar ao meu lado e me motivar a nunca desistir.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos professores do curso de Medicina Biofotônica, por compartilhar conhecimento e experiências que foram essenciais para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

Em especial ao meu orientador Rodrigo Labat Marcos pela dedicação e orientação que foi fundamental para a construção e finalização deste trabalho.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que pudesse chegar até aqui.

FINANCIAMENTOS

O PRESENTE TRABALHO FOI REALIZADO COM APOIO DA UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO (UNINOVE) - PROGRAMA DE BOLSAS PARA A FORMAÇÃO DO PESQUISADOR.

O PRESENTE TRABALHO FOI REALIZADO COM APOIO DA COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES) – PROCESSO: 88887.907421/2023-00 TAXA

O PRESENTE TRABALHO FOI REALIZADO COM APOIO DA COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES) – PROCESSO: 88887.940984/2024-00 BOLSA

"Nós continuamos seguindo em frente, abrindo novas portas e fazendo coisas novas, porque somos curiosos... e a curiosidade continua nos conduzindo por novos caminhos."

Walt Disney

RESUMO

As lesões ósseas são comuns e afetam grande parte da sociedade. Os tratamentos atuais visam o controle do processo inflamatório e do reparo tecidual com foco na melhora funcional do paciente. A terapia por fotobiomodulação (PBM) tem apresentado resultados satisfatórios por modular o processo inflamatório, acelerar a cicatrização óssea e melhorar a resistência do tecido, porém, são escassos os estudos utilizando a Fotobiomodulação Vascular (VPBM) na promoção do reparo ósseo. Objetivo: Comparar o efeito da terapia por fotobiomodulação local (LPBM) com a fotobiomodulação vascular (VPBM), sobre a resistência mecânica óssea e sua relação com a proporção de colágeno, em modelo experimental de lesão em tíbia de ratos. Metodologia: Foram utilizados ratos Wistar machos, distribuídos em 4 grupos: Sem lesão (CTL) ou com lesão, sem tratamento (NT) ou tratados com Fotobiomodulação local, irradiada sobre o defeito ósseo (LPBM) ou vascular, irradiada sobre os vasos na região da base da cauda (VPBM). Os animais foram anestesiados e foi realizada cirurgia para confecção do defeito ósseo padrão em ambas as tíbias dos ratos. Os grupos foram tratados utilizando os seguintes parâmetros: LPBM (808nm; 6J; 100mW, sobre o defeito ósseo) e VPBM (808nm; 15J; 100mW, sobre a artéria caudal) 3 vezes por semana, até o 30º dia, quando os animais foram eutanasiados e as tíbias removidas e armazenadas para as análises histológicas e de propriedades mecânicas. Resultados: A lesão óssea altera a organização tecidual e a proporção de colágeno, refletindo na resistência mecânica da tíbia. A LPBM normalizou a proporção de colágeno e favoreceu a capacidade de deformação óssea, enquanto que a VPBM melhorou a resistência óssea e a organização tecidual. Conclusão: A PBM aplicada de forma local ou vascular auxilia o processo de reparo ósseo, melhorando a organização tecidual e as propriedades mecânicas ósseas.

Palavras-chave: Lesão óssea, fotobiomodulação vascular, ILIB, propriedades mecânicas, colágeno.

ABSTRACT

Bone injuries are common and affect a large portion of society. Current treatments aim to control the inflammatory process and tissue repair, focusing on improving patient function. Photobiomodulation (PBM) therapy has shown satisfactory results by modulating the inflammatory process, accelerating bone healing, and improving tissue strength. However, studies using Vascular Photobiomodulation (VPBM) to promote bone repair are scarce. Objective: To compare the effects of photobiomodulation therapy, applied locally (LPBM) and vascular (VPBM), on bone organization and mechanical strength in an experimental model of tibial injury in rats. Methodology: Male Wistar rats were divided into four groups: Uninjured (CTL) or injured, untreated (NT), or treated with Local (LPBM) or Vascular (VPBM) Photobiomodulation. The animals were anesthetized, and surgery was performed to create a standard bone defect in both tibiae. The groups were treated using the following parameters: LPBM (808nm; 6J; 100mW) and VPBM (808nm; 15J; 100mW) three times a week, until the 30th day, when the animals were euthanized and the tibiae removed and stored for histological and mechanical properties analyses. Results: Bone injury alters tissue organization and collagen proportion, reflecting on the mechanical strength of the tibia. LPBM normalized the collagen proportion and favored bone deformation capacity, while VPBM improved bone strength and tissue organization. Conclusion: PBM applied locally or vascular aids the bone repair process, improving tissue organization and bone mechanical properties.

Keywords: Bone injury, photobiomodulation, ILIB, mechanical properties, collagen.

DESTAQUES

1. Inovação: O estudo visa a comparação direta entre LPBM e VPBM e os seus efeitos representando um avanço, já que a aplicação vascular ainda é pouco explorada na literatura em reparo ósseo;
2. Abordagem Metodológica: A utilização de protocolos distintos para LPBM e VPBM que permitem compreender diferentes mecanismos de ação no reparo ósseo;
3. Potencial Clínico: Os achados experimentais deste estudo abrem caminho para futuras aplicações clínicas, ampliando possibilidades de intervenção em casos de fraturas e defeitos ósseos;
4. Segurança Terapêutica: A fotobiomodulação se destaca por ser uma técnica não invasiva, com baixo risco de efeitos adversos em comparação a abordagens farmacológicas;
5. Contribuição Clínica: Já que o estudo visa o tratamento de um problema afeta grande parte da população as lesões ósseas.

HIGHLIGHTS

1. Innovation: This study aims to directly compare LPBM and VPBM and their effects, representing an advance, since vascular application is still little explored in the literature on bone repair;
2. Methodological Approach: The use of distinct protocols for LPBM and VPBM allows for an understanding of the different mechanisms of action in bone repair;
3. Clinical Potential: The experimental findings of this study pave the way for future clinical applications, expanding possibilities for intervention in cases of fractures and bone defects;
4. Therapeutic Safety: Photobiomodulation stands out as a non-invasive technique with a low risk of adverse effects compared to pharmacological approaches;
5. Clinical Contribution: Since the study aims to treat a problem that affects a large part of the population – bone injuries.

RESUMO PARA LEIGOS

As fraturas e lesões ósseas são problemas de saúde muito comuns e podem ser bastante prejudiciais a vida das pessoas, podendo causar dor, limitação de movimentos e longos períodos de recuperação. Pensando em encontrar formas de acelerar o processo de recuperação, esta pesquisa investigou o uso de uma técnica chamada fotobiomodulação, que consiste na utilização da luz laser de baixa intensidade para estimular o reparo ósseo. O estudo foi feito com ratos que tiveram pequenas lesões no osso da perna (tíbia). Eles foram distribuídos em grupos: onde um grupo os ratos não receberam tratamento com a luz, outro grupo recebeu o tratamento com a luz aplicada diretamente no local da lesão e outro grupo recebeu a luz aplicada sobre um vaso sanguíneo, para agir de forma mais ampla pelo corpo. Após 30 dias, os resultados mostraram que o laser aplicado diretamente no osso ajudou a deixá-lo mais flexível e a equilibrar a formação do colágeno, proteína essencial para a cicatrização. Já o laser aplicado sobre o vaso sanguíneo deixou o osso mais resistente e melhor organizado. Então podemos concluir que a pesquisa mostra que o uso do laser pode ajudar o corpo a se recuperar de fraturas mais rápido e com melhor qualidade, cada forma de aplicação trazendo benefícios diferentes. Tais descobertas são importantes porque, no futuro, essa técnica pode ser utilizada em pacientes com fraturas ou cirurgias ortopédicas, reduzindo o tempo de recuperação, evitando complicações e melhorando a qualidade de vida.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Imagem representativa das fases do reparo ósseo.....	24
Figura 2.	Delineamento experimental.....	36
Figura 3.	Foto defeito ósseo.....	37
Figura 4.	Foto dispositivo para ensaio de flexão em 3 pontos.....	39
Figura 5.	Foto representativa da posição tibial no dispositivo de flexão.....	40
Figura 6.	Gráfico ensaio de flexão.....	41
Figura 7.	Gráfico Fmax.....	43
Figura 8.	Gráfico Dmax.....	44
Figura 9.	Gráfico da relação entre Fmax e Dmax Dmax.....	45
Figura 10.	Gráfico da proporção de colágeno total.....	46
Figura 11.	Imagens histológicas do tecido ósseo de tíbias de ratos com coloração picrosirius red.....	47
Figura 12.	Imagens histológicas tecido ósseo tibial de ratos.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Parâmetros dosimétricos VPBM e LPBM.....	38
------------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA - análise de variância

AsGaAl – Arsenieto de Gálio e Alumínio

BMP – Proteína Morfogenética Óssea

COX-2 – Ciclooxigenase-2

CTL – Grupo Controle

Dmax – Deformação máxima

ECM – Matriz extracelular

Fmax – Força máxima

H.E. - Hematoxilina-Eosina

IL-1 – Interleucina 1

IL-6 – Interleucina 6

IL-10 – Interleucina 10

ILIB – Intravascular Laser Irradiation of Blood

IM – Via Intramuscular

J – Joules

LASER – Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation

LLLT- Low-Level Laser Therapy

LPBM- Fotobiomodulação Local

M-CSF – Fator Estimulador de Colônia de Macrófagos

MMPS – Metaloproteinases da matriz

NaCl – Cloreto de Sódio

n – Número de animais por amostra

NT – Grupo Não Tratado

NO – Óxido Nítrico

OBs – osteoblastos

OCs - osteoclastos

OPG – osteoprotegerina

OTs - osteócitos

PBM – terapia por fotobiomodulação

PDGF- Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

PGE₂ – Prostaglandina E₂

RANK – Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa-β

RANKL – Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa-β

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

SC – via subcutânea

SOD – Superóxido Dismutase

TGF-β – Fator de Transformação de Crescimento Beta

TNF-α – Fator de Necrose Tumoral alfa

UNINOVE – Universidade Nove de Julho

UI – Unidade Internacional

VEGF- Fatores de Crescimento, como o Endotelial Vascular

VPBM – Fotobiomodulação Vascular

SUMÁRIO

1. CONTEXTUALIZAÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
3. OBJETIVOS.....	33
4. METODOLOGIA	34
5. RESULTADOS	42
6. DISCUSSÃO	50
7. CONCLUSÃO	54
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
9. ANEXOS	64

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

Lesões ósseas representam um desafio clínico, devido à incidência de complicações associadas a este tecido e apesar da sua notável capacidade de reparação, os ossos dependem de um equilíbrio entre as etapas deste processo, que quando alteradas, podem comprometer a integridade morfológica e consequentemente a resistência óssea (1,2,3).

O reparo ósseo inicia-se a partir do processo inflamatório, no qual células de defesa são ativadas para a limpeza dos fragmentos celulares. Em seguida, ocorre uma fase proliferativa, marcada pela presença de tecido de granulação (4,5,6). As lesões ósseas alteram a morfologia tecidual, causando interrupções da função vascular e mudança na arquitetura óssea e durante o processo de formação do novo tecido, proteínas morfogenéticas (BMPs) desempenham um papel chave na diferenciação celular, assim como a angiogênese favorece o retorno da vascularização e da atividade osteogênica, caracterizada pela presença de osteoblastos e matriz óssea mineralizada, com formação do calo ósseo primário (7,8).

O remodelamento ósseo é a etapa final do reparo e visa a restauração da morfologia, atuando na formação do calo ósseo secundário, onde a matriz óssea irregular é gradualmente convertida em tecido ósseo maduro. Nesta fase, os osteoclastos estão ativos, auxiliando na reabsorção óssea e organização da matriz extracelular (7,8).

O colágeno é um componente essencial da matriz extracelular, e sua proporção é determinante para a organização e resistência óssea. Estudos indicam que um aumento na proporção de colágeno tipo III pode estar associado a um reparo mais eficiente nas fases iniciais, enquanto a predominância do colágeno tipo I em estágios posteriores, garantindo maior resistência ao tecido reparado (9,10). As propriedades mecânicas do osso são fundamentais para sua função como estrutura de suporte, conferindo resistência, rigidez e tenacidade. Essas características são diretamente influenciadas pela composição estrutural e pelos processos contínuos de remodelação óssea, que conferem ao tecido equilíbrio entre resistência

mecânica e flexibilidade, permitindo-lhe suportar cargas variadas sem fraturar facilmente (11).

A avaliação das propriedades mecânicas do osso pode ser realizada por meio de diferentes ensaios, incluindo testes biomecânicos de flexão, compressão e torção. Entre eles, destaca-se o ensaio de flexão em três pontos, no qual a força (N) é aplicada por carregamento repetitivo, gerando deslocamento (mm). Esse método fornece uma curva característica, na qual a fase elástica é representada pela porção linear inicial. O término dessa região marca o início da fase plástica, que se estende até um ponto crítico, correspondente ao limite de resistência óssea (12,13).

A fotobiomodulação (PBM) é considerada uma terapia promissora no reparo ósseo. Estudos experimentais e clínicos têm demonstrado que a PBM pode modular mediadores inflamatórios, estimular a atividade de osteoblastos, aumentar a produção de colágeno e promover a neoformação óssea. No entanto, a maioria das investigações concentra-se na aplicação local da PBM (LPBM), enquanto os efeitos sistêmicos decorrentes da aplicação vascular (VPBM) ainda permanecem pouco explorados. (14,15; 16;17; 18)

A fotobiomodulação vascular (VPBM), inicialmente desenvolvida na forma invasiva do ILIB (Irradiação Intravascular do Sangue por Laser), evoluiu para uma técnica não invasiva e transcutânea, sendo atualmente reconhecida por seus efeitos moduladores sistêmicos. Estudos experimentais sugerem que a VPBM pode modular a sinalização redox na mitocôndria por meio da estimulação de componentes da cadeia respiratória desencadeando efeitos benéficos sobre imunoglobulinas, interferons e interleucinas (19), auxiliando no reparo de diversos tecidos (20, 21,22). Contudo, os efeitos da VPBM sobre o processo de reparo ósseo são desconhecidos e diante deste cenário, o presente estudo propõe investigar e comparar os efeitos da fotobiomodulação aplicada de forma local (LPBM) ou vascular (VPBM) na organização tecidual e resistência mecânica óssea, utilizando modelo experimental de lesão em tíbia de ratos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tecido Ósseo

A estrutura óssea é composta por células e uma matriz extracelular. Entre as células presentes, encontram-se os osteoblastos, osteócitos, células osteoprogenitoras e osteoclastos. A matriz extracelular é formada por três componentes principais: hidroxiapatita, matriz orgânica e água. A matriz orgânica é constituída predominantemente por colágeno tipo I, com uma menor proporção de colágeno tipo V, além de glicoproteínas, fatores de crescimento solúveis e hormônios (23)

O esqueleto adulto é formado por aproximadamente 80% de osso cortical e 20% de osso trabecular. A unidade funcional do osso cortical é o ósteon, composto por lamelas. Os ósteons estão dispostos paralelamente às fibras de colágeno ao longo do osso, oferecendo suporte estrutural ao esqueleto. Acompanhando os ósteons, estão os canais de Havers, por onde passam vasos sanguíneos, linfáticos e nervos, responsáveis por fornecer nutrição ao tecido ósseo. (24)

O reparo ósseo é um processo biológico complexo que abrange o desenvolvimento e o crescimento do esqueleto, envolvendo diversos componentes extracelulares, celulares e fatores de crescimento. Embriologicamente, os ossos podem se desenvolver por duas vias distintas: ossificação intramembranosa, que ocorre pela diferenciação direta de células mesenquimais em osteoblastos, ou ossificação endocondral, na qual células mesenquimais se diferenciam em condrócitos, formando uma matriz cartilaginosa que é gradualmente substituída por matriz óssea. (25).

A cicatrização óssea secundária, ou indireta, ocorre pela formação de calo através dos processos de ossificação endocondral e intramembranosa. A ossificação intramembranosa exige o recrutamento de células osteoprogenitoras e mesenquimais provenientes do periósteo distante da fratura, formando um calo duro sem a presença de um modelo cartilaginoso. Por outro lado, a ossificação endocondral segue uma sequência de eventos: formação de hematoma, fase inflamatória, fase de reparo e, por fim,

remodelação. Diferente da ossificação intramembranosa, esse processo é auxiliado pelo periósteo adjacente à fratura. (26)

Os eventos celulares envolvidos no reparo ósseo podem ser monitorados por meio da análise dos níveis de certos fatores inflamatórios, vasculares, precursores osteocondrais e osteoclastos. Esses processos também são regulados pela presença de citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento pró-osteogênicos e angiogênicos, que desempenham um papel crucial no recrutamento celular, além de estimular a diferenciação e o crescimento celular, necessários para o reparo ósseo. (27)

2.2 Defeitos e Fraturas Ósseas

As fraturas ósseas ocorrem devido a fatores como traumas diretos, como ferimentos por arma de fogo, acidentes, torções ou quedas. Essas fraturas podem resultar em diversos danos aos tecidos circundantes, incluindo irritação nas terminações nervosas, causando dor, sangramentos, espasmos musculares e, em alguns casos, deformidades. (28)

As fraturas ósseas podem ser descritas de diversas maneiras, destacando-se os seguintes aspectos: localização, podendo ser epifisária, metafisária ou diafisária; etiologia, como traumática, por estresse, espontânea ou patológica; exposição, classificando-se como exposta, quando há rompimento da integridade do osso e comunicação com o meio externo, o que pode resultar em infecção, ou não exposta; desvio, que pode ser sem desvio, desviada ou impactada; e traço de fratura. Se a fratura rompe completamente a região cortical do osso, é considerada completa; se o rompimento for apenas parcial, é chamada de fratura em galho verde. Quando a fratura apresenta vários fragmentos ósseos, é classificada como cominutiva, e, se houver mais de um local fraturado, é denominada fratura composta. (7,28).

Defeitos ósseos causados por malformações congênicas, traumas não corrigidos, lesões extensas ou sequelas de cirurgias, como na remoção de tumores, são tratados com enxertos ósseos, próteses biocompatíveis e substâncias indutoras de formação óssea, como as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs). (7,29).

2.3 Reparo ósseo

O reparo ósseo ocorre para promover a recuperação do tecido após uma lesão, resultante de quedas, acidentes, prática de esportes de risco ou cirurgias planejadas, como a remoção de tumores, desenvolvendo-se em 3 estágios. Durante uma fratura, ocorre o rompimento dos vasos sanguíneos, resultando em uma hemorragia intensa e na formação de um coágulo na região lesionada. Inicialmente, desencadeia-se o processo inflamatório, no qual citocinas pró-inflamatórias como Interleucina 1 (IL-1), Interleucina 6 (IL-6) e Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) são expressas pelos linfócitos T (5). Outros mediadores, como Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa- β (RANK), Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa- β (RANKL) e Osteoprotegerina (OPG) ativando uma cascata de eventos de sinalização intracelular promovendo a diferenciação e fusão dos pré-osteoclastos mononucleares formando Osteoclastos maduros. Portanto, o principal sistema modulador das funções do tecido ósseo é o sistema RANK/RANKL/OPG (16). Nesta fase, a osteogênese é favorecida pelos Fatores de Crescimento, como o Endotelial Vascular (VEGF), Derivado de Plaquetas (PDGF) e de Fator de Transformação de Crescimento Beta (TGF- β) (5,6).

A fase proliferativa condrogênica ocorre entre 7 e 10 dias após a fratura, marcada pela formação de tecido de granulação e pela proliferação de células mesenquimais que se diferenciam em condrócitos, formando um calo fibrocartilaginoso semirrígido. Esse calo estabiliza a fratura, fornecendo suporte mecânico para o processo de reparo (5). Posteriormente, na fase osteogênica, há uma intensa ativação dos osteoblastos, e o calo fibrocartilaginoso é substituído por um calo ósseo imaturo, caracterizado por uma matriz mineralizada irregular e mais rígida mecanicamente (5,6).

Durante o remodelamento, ocorrem múltiplos ciclos de deposição e reabsorção óssea, resultando na formação de um tecido organizado, com ósteons alinhados longitudinalmente ao eixo do osso e lamelas dispostas em camadas concêntricas ao redor dos canais de Havers. Esse processo de remodelamento e adaptação é dependente das forças mecânicas funcionais a que o osso é submetido (30) (Figura 1). A compreensão detalhada da osteoclastogênese tem se tornado essencial, especialmente com o avanço no

desenvolvimento de substitutos ósseos, como biomateriais, e no entendimento dos fatores locais e sistêmicos, como aspectos moleculares, fatores hormonais e condições clínicas que afetam o metabolismo ósseo e comprometem a densidade mineral óssea, levando a fraturas por fragilidade.

As lesões ósseas comprometem a integridade tecidual, causando interrupção da função vascular normal e distorção da arquitetura óssea, resultando em uma reação inflamatória inespecífica. O extravasamento vascular na área lesionada contém plaquetas degranuladas, macrófagos e outras células inflamatórias (granulócitos, linfócitos e monócitos), cada uma desempenhando funções importantes, como o combate a infecções, secreção de citocinas e fatores de crescimento. Outra característica histológica é a presença de um trombo fibrocartilagenoso (3,7). Devido à instabilidade mecânica do reparo ósseo, a recuperação se dá por ossificação endocondral, ou seja, a formação óssea ocorre após a deposição de uma matriz cartilaginosa (3,8).

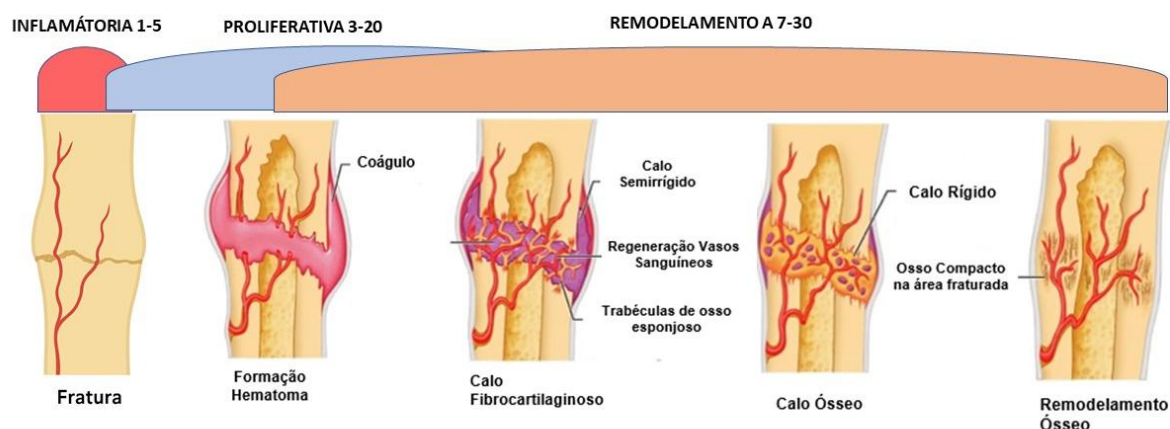


Figura 1 – Reparo ósseo após uma fratura ilustrando as fases inflamatórias; proliferativa e de remodelamento. Fonte: <https://www.orthobullets.com/basic-science/9009/fracture-healing#popup/image/10160> Adaptado

As células predominantes na matriz são os condrócitos e fibroblastos, que fornecem suporte mecânico para o reparo e contribuem para a formação

do calo ósseo semirrígido, que inicialmente é avascular e gradualmente é substituído por osso medular vascularizado. Os condrócitos, provenientes de células progenitoras mesenquimais, proliferam-se e sintetizam tecido fibrocartilaginoso/granulomatoso, que posteriormente é substituído por cartilagem. Esta cartilagem cresce e envolve um centro fibrocartilaginoso, unindo-se aos fragmentos fraturados; essa fase é marcada pela presença de condrócitos hipertrofiados que mineralizam a matriz antes de sofrerem apoptose (3,8).

Os principais sinalizadores celulares que regulam a condrogênese e o início da ossificação endocondral são o TGF- β 2 e o TGF- β 3. Na ossificação intramembranosa, que envolve a proliferação de fibroblastos e a diferenciação celular, os BMP-5 e BMP-6 desempenham funções chave. O crescimento vascular, por sua vez, é mediado pelas angiopoietinas I e II, que são responsáveis pela formação de vasos maiores e pela irrigação acessória dos já existentes, com o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) atuando como o principal sinalizador (3,8).

O estágio com maior atividade osteogênica caracteriza-se pela intensa ação dos osteoblastos e pela formação de uma matriz óssea mineralizada, resultando no desenvolvimento do calo ósseo primário, que apresenta uma estrutura irregular. Em alguns casos, essa formação ocorre independentemente do suporte cartilaginoso, com o osso sendo formado simplesmente através do fenômeno de aposição e reabsorção óssea (3,8).

A formação inicial da matriz óssea depende da combinação de proteínas da matriz extracelular mineralizada e é regulada pela presença do Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos e RANKL, sintetizados por osteoblastos maduros diferenciados a partir de osteoprogenitores sob a influência de fatores osteogênicos, como Proteína Morfogenética Óssea (BMP-3, BMP-4, BMP-7 e BMP-8). Esta fase é marcada por uma extensa rede de vasos sanguíneos, formados sob a ação de diversos fatores de crescimento, incluindo VEGF e BMP-5 e BMP-6. Esses vasos são essenciais para o aumento do suprimento sanguíneo e para a neoformação óssea pela diferenciação dos osteoblastos (3,8).

O estágio final do reparo ósseo é o remodelamento, que visa restaurar a morfologia original do osso, atuando diretamente sobre o calo ósseo secundário. Neste processo, a matriz óssea irregular é gradualmente convertida em tecido ósseo, através de ciclos de reabsorção seguidos de formação; as células osteóides desempenham um papel crucial na proteólise dos elementos osteóides que antecedem esse processo (3,8).

A principal célula envolvida na reabsorção da matriz mineralizada é o osteoclasto, que se origina da diferenciação e fusão de células hematopoiéticas. Os osteoclastos aderem à superfície mineralizada, criando uma lacuna onde ocorre a liberação de ácido e proteinases que promovem a desmineralização óssea. Os produtos dessa degradação são eliminados principalmente pelos macrófagos. Após a reabsorção, os osteoclastos tornam-se inativos e sofrem apoptose, o que estimula a ativação de osteoblastos na superfície para iniciar a formação de novo tecido ósseo (3,8).

2.4 Colágeno no Tecido Ósseo

O colágeno é um componente essencial da matriz extracelular (ECM) a qual desempenha um papel essencial na regeneração óssea. Os tipos de colágeno I e III são os mais predominantes nesse processo, cada um com funções específicas que contribuem para a cicatrização e remodelação do tecido ósseo. O colágeno tipo I é o principal constituinte estrutural do osso, conferindo resistência mecânica e suporte para a formação óssea, enquanto o colágeno tipo III está envolvido nos estágios iniciais da cicatrização, fornecendo uma matriz mais flexível que auxilia na regeneração tecidual (9).

O colágeno tipo I constitui aproximadamente 90% da matriz orgânica do osso, sendo responsável pela resistência à tração e rigidez do tecido. Sua presença é essencial para a deposição mineral e a formação de uma matriz óssea organizada, permitindo o crescimento e a diferenciação celular adequada (10).

Durante a fase inicial da cicatrização óssea, o colágeno tipo III desempenha um papel fundamental na formação de uma rede estrutural

provisória que permite a proliferação celular e o recrutamento de fatores de crescimento (31). Ele é mais abundante em tecidos imaturos e em estágios iniciais de regeneração, sendo gradualmente substituído pelo colágeno tipo I à medida que o osso amadurece. Esse processo é regulado por metaloproteinases da matriz (MMPs), que degradam seletivamente o colágeno tipo III para permitir a remodelação da ECM e a deposição do colágeno tipo I (31).

O equilíbrio entre os colágenos tipo I e III é um fator determinante na qualidade da cicatrização óssea. Estudos mostram que um aumento na proporção de colágeno tipo III pode estar associado a uma regeneração mais eficiente em fases iniciais, enquanto a predominância do colágeno tipo I em estágios posteriores garante a resistência e durabilidade do tecido reparado (10).

2.5 Propriedade Mecânica do Osso

As propriedades mecânicas do osso são fundamentais para sua função como estrutura de suporte, garantindo resistência, rigidez e tenacidade. Essas características são diretamente influenciadas pela composição estrutural e pelos processos contínuos de remodelação óssea.

O osso é um material composto, formado por uma matriz de colágeno tipo I mineralizada por cristais de hidroxiapatita. Essa combinação confere ao tecido ósseo um equilíbrio entre resistência mecânica e flexibilidade, permitindo que ele suporte cargas variadas sem fraturar facilmente. O osso pode ser classificado em cortical e trabecular. O osso cortical, mais denso e compacto, forma a camada externa dos ossos longos, enquanto o osso trabecular, de estrutura esponjosa, está localizado nas extremidades dos ossos e é crucial para a absorção de impactos e distribuição da carga (11).

As propriedades mecânicas do osso são avaliadas por meio de diversos testes, incluindo ensaios de flexão, compressão e torção. Além disso, técnicas avançadas como nanoindentação e tomografia computadorizada quantitativa são utilizadas para medir propriedades em níveis micro e nanoestruturais (32).

Estudos recentes indicam que a combinação de métodos não invasivos e técnicas avançadas de imagem pode melhorar a caracterização mecânica do osso e auxiliar na detecção precoce de doenças ósseas (32).

O ensaio mecânico de flexão de três pontos, onde a Força(N) é aplicada através de carregamento repetitivo e o Deslocamento (mm), onde fornecem uma curva mostrando a fase elástica que é determinada pela porção linear (tangente) desta inclinação inicial. O fim da região linear marca o início da fase plástica até um ponto crítico o qual representa o limite de resistência do osso. (12,13)

Condições patológicas como o mieloma múltiplo afetam significativamente as propriedades mecânicas do osso, reduzindo o módulo elástico e a dureza. Em um estudo com modelos murinos de doença óssea do mieloma múltiplo, observou-se uma redução na espessura das partículas minerais do osso trabecular, além de um decréscimo da elasticidade do osso cortical (33).

2.6 Tratamentos utilizados para o Reparo Ósseo

O reparo ósseo pode ser influenciado por estímulos externos biomecânicos e internos biológicos. Diversas terapias utilizando métodos físicos e biológicos são desenvolvidas para aprimorar o reparo de fraturas ósseas. Entre eles, destacam-se a estimulação por ultrassom pulsado de baixa intensidade, campos magnéticos elétricos, estimulação elétrica, distração osteogênica, intervenções cirúrgicas, uso de biomateriais e fotobiomodulação. (34).

Diversos estudos indicam que a estimulação por ultrassom pulsado de baixa intensidade pode ser aplicada para acelerar o reparo da fratura óssea, influenciando todas as quatro fases do processo de reparo. As tensões mecânicas resultantes dessa estimulação podem modificar a expressão e o funcionamento de várias células envolvidas na consolidação da fratura, além de aumentar o fluxo sanguíneo local, promovendo a consolidação óssea. A estimulação por ultrassom pulsado de baixa intensidade acelera a maturação

do calo ósseo após osteotomias tibiais por hemicalotase, e também pode estimular a expressão de integrinas, facilitando a adesão de osteoblastos no local da fratura (35).

A distração osteogênica é uma técnica de engenharia tecidual in vivo, na qual a separação gradual das margens ósseas seccionadas cirurgicamente promove a formação óssea intramembranosa sob tensão fisiológica. Descrita pela primeira vez nos anos 1950 por Gavriil Ilizarov, essa técnica envolve um fixador de anel externo, uma osteotomia correspondente e a aplicação de distração gradual entre os segmentos ósseos, permitindo a formação de novo tecido ósseo para substituir o osso ausente no local da fratura. (36).

A tecnologia de estimulação elétrica que visa aumentar a formação de novo osso por meio da regulação da função dos osteoblastos é atualmente realizada por meio da estimulação capacitiva acoplada a campo elétrico (CEF). Estudos em modelos animais demonstram que a CEF pode prevenir a osteoporose em vértebras de ratos e promover o reparo de fraturas não consolidadas. A CEF é aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos como uma forma não invasiva de tratamento para fraturas ósseas. Esses resultados sugerem o potencial do uso da CEF para promover a formação óssea e reduzir a dor em pacientes com fraturas (37).

Campos eletromagnéticos também são utilizados para auxiliar na consolidação óssea, respeitando os princípios de tensão mecânica aplicados ao tecido. Quando uma carga mecânica é aplicada ao osso, um gradiente de pressão se desenvolve, empurrando o fluido intersticial através dos canaliculos, das áreas de alta para baixa pressão. Isso expõe as membranas dos osteócitos a tensões mecânicas e a potenciais elétricos. Campos eletromagnéticos são projetados para imitar os efeitos do estresse mecânico no osso no local da fratura (38).

Os tratamentos de fraturas ósseas pouco mudaram nos últimos 100 anos, com o uso contínuo de métodos conservadores, como a imobilização com gesso, e tratamentos invasivos, como cirurgias. No entanto, o desenvolvimento de novas técnicas cirúrgicas minimamente invasivas representou um grande avanço no tratamento das fraturas nos últimos anos.

Implantes, como hastes intramedulares e placas de compressão, são utilizados para realizar osteossíntese, promovendo uma consolidação mais rápida da fratura óssea (39).

A terapia com lasers de diferentes tipos e energias, como o laser de baixa potência (LLLT), demonstra ser altamente eficaz, exibindo efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e bioestimulantes. Estudos recentes indicam que a irradiação com laser tem diferentes impactos nas células do tecido ósseo, contribuindo para o processo de reparo (40)

2.7 Terapia por fotobiomodulação do reparo ósseo

Os efeitos da PBM são baseadas na interação dos fótons incidentes com as células do tecido irradiado, através da absorção dos fótons por moléculas fotorreceptoras (cromóforos) e da transdução dessa energia em reações químicas no interior celular, onde o aumento de ATP mitocondrial funciona como sinalizador para a proliferação celular (41). Alguns fatores podem influenciar nos efeitos de bioestimular e/ou bioinibir, entre eles o tipo de tecido alvo, condição fisiológica ou patológica e dosimétricos utilizados: Comprimento de onda (nm); Tempo de exposição (s); Potência (mW); Irradiância (W/cm^2); Energia (J); Exposição Radiante ou Fluência (J/cm^2) (42,43).

Autores observaram que o Laser Infravermelho por penetrar em maior profundidade no tecido favorecendo reparos no tecido ósseo (3). Os parâmetros dosimétricos têm sido estudados e o laser de Diodo semicondutor - Arsenieto de Gálio Alumínio (AsGaAl), no espectro de luz infravermelha (780-830nm) tem mostrado resultados significantes no reparo ósseo (42,43)

Os efeitos da luz laser sobre os tecidos começaram a ser descritos por (44), com a observação da aceleração da reparação de feridas. Posteriormente, diversos estudos experimentais em diferentes modelos envolvendo outros tecidos ratificaram esses efeitos benéficos da fototerapia (45). Há uma variedade de casos de traumas ósseos, incluindo os decorrentes de acidentes, intervenções cirúrgicas e patologias ósseas como tumores e

cistos. O efeito da fototerapia em acelerar o reparo ósseo pode representar um benefício significativo, pois melhora o pós-operatório do paciente, reduz o tempo de recuperação, e diminui perdas financeiras ao possibilitar um retorno mais rápido do indivíduo ao trabalho e às suas atividades diárias (41,46).

Devido à sua capacidade de acelerar a reparação tecidual, diversos estudos experimentais de laboratório e ensaios clínicos foram realizados para desvendar o mecanismo de ação e as alterações de sinalização celular nas áreas irradiadas pela luz laser. Esses estudos têm demonstrado a reparação óssea acelerada com evidências obtidas por meio de cortes histológicos e observações clínicas. No entanto, o mecanismo de ação da fototerapia sobre a superfície óssea ainda não está completamente elucidado; sabe-se que a fototerapia não atua diretamente na osteossíntese, mas cria um ambiente favorável ao reparo ósseo, acelerando a proliferação e diferenciação celular. Para que ocorra essa aceleração, é essencial o aumento de substâncias bioativas, como os fatores de crescimento e citocinas previamente mencionados (45).

Estudos indicam que a laserterapia modula processos metabólicos que aumentam o potencial regenerativo dos tecidos. Trabalhos recentes, como os de Gerbi e colaboradores, observaram histologicamente um menor tempo de integração entre o tecido ósseo e biomateriais, como BMPs e enxertos ósseos liofilizados, em animais submetidos à irradiação laser diária por quinze dias (47, 45). Esses efeitos foram observados tanto in vivo quanto in vitro e indicam uma modulação de diversos fatores de crescimento, como IGF, PDGF, BMPs, e citocinas como IL-1 β e TNF- α , especialmente nas fases iniciais da reparação óssea. Além das alterações celulares, verificou-se um aumento significativo na deposição de colágeno tipo I e II, o que contribui para o processo de reparação tecidual (45,47).

A Laserterapia, assim, destaca-se como uma abordagem terapêutica promissora para acelerar a recuperação de fraturas. O impacto positivo na proliferação celular e na diferenciação, associado ao aumento de fatores de crescimento e citocinas, favorece a criação de um ambiente propício para o

reparo ósseo acelerado, beneficiando a recuperação clínica dos pacientes e reduzindo o tempo de tratamento necessário.

2.8 Terapia por Fotobiomodulação Vascular no Reparo Tecidual

O ILIB foi inicialmente desenvolvido por cientistas soviéticos na década de 1970, com objetivo principal no tratamento de doenças cardiovasculares. Este método consistia na inserção de uma fibra óptica acoplada a um cateter intravenoso para irradiar diretamente o sangue com laser de hélio-neônio (He-Ne), com comprimento de onda de 632,8 nm (48). Apesar ILIB apresentar efeitos promissores, como o aumento da oxigenação tecidual e modulação imunológica, o caráter invasivo do ILIB limitava sua aplicação clínica de forma ampla. Então foi modificada para uma abordagem não invasiva, utilizando irradiação transcutânea na artéria radial e passou a ser denominada como: Vascular Photobiomodulation (VPBM) (19).

A VPBM é realizada aplicando-se luz laser de baixa intensidade (geralmente entre 632 a 660 nm) sobre a pele que recobre a artéria radial ou carótida, sem a necessidade de punção venosa (49). O protocolo clínico pode variar, mas sessões típicas duram de 15 a 30 minutos, com frequência de uma ou duas vezes por dia em ciclos terapêuticos de 5 a 10 dias consecutivos (48).

A luz penetra a pele e atinge os vasos sanguíneos superficiais, sendo absorvida por cromóforos presentes nos leucócitos, plaquetas e hemácias. A ativação mitocondrial resultante leva à produção de ATP, óxido nítrico (NO), e espécies reativas de oxigênio (ROS), modulando processos inflamatórios e imunes (50).

Estudos demonstram resultados positivos do uso da VPBM em experimentação animal, o estudo de Mesquita-Ferrari, R. A. et al com protocolo de irradiação aplicada na região da veia/artéria caudal com laser de arseneto de gálio e alumínio (AsGaAl), com parâmetros de 780 nm, densidade de energia de 80 J/cm², potência de 40 mW e tempo de exposição de 80 segundos, totalizando uma dose energética de 3,2 J em um único ponto se

mostrou positiva no modelo experimental de recuperação da atividade motora em ratos após lesão medular.

A VPBM afeta de maneira ampla o organismo, promovendo efeitos biológicos que ultrapassam o local da aplicação modulando o sistema imunológico com a estimulação a produção de imunoglobulinas, interferons e interleucinas, especialmente IL-6, IL-10 e TNF- α (51). Melhora a microcirculação que aumenta a deformabilidade eritrocitária, diminui a viscosidade do plasma e promove vasodilatação mediada por NO (19). Reduz o estresse oxidativo, estimulando as enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), promovendo equilíbrio redox (19). Estimulação mitocondrial e síntese de ATP melhorando a atividade respiratória celular e favorecendo a homeostase energética (50), e os efeitos analgésicos e neuromoduladores com a melhora na dor crônica e estados neurovegetativos (51).

São escassos os estudos que investigam os efeitos da fotobiomodulação vascular (VPBM) no processo de reparo ósseo. Além disso, não foram encontrados trabalhos comparativos entre a fotobiomodulação local (LPBM) e a vascular (VPBM) em relação a parâmetros biomecânicos, à resistência tecidual e à proporção de colágeno. O estudo da VPBM é relevante, pois permite a aplicação em regiões com grandes vasos, reduzindo o número de pontos de aplicação. Isso não apenas favorece o reparo ósseo, mas também pode aumentar a adesão do paciente ao tratamento.

3. OBJETIVOS

3.1- Objetivo Geral

Avaliar o efeito da terapia por fotobiomodulação (808nm; 6J; 100mW), aplicada de forma local (LPBM) ou vascular (VPBM) na organização tecidual, na proporção de colágeno total e na resistência mecânica óssea, em modelo experimental de lesão em tibia de ratos.

3.2- Objetivos Específicos

Avaliar o efeito da terapia por fotobiomodulação em 2 formas de irradiação (LPBM ou VPBM) sobre:

- A resistência óssea, a partir de ensaio mecânico cíclico de flexão, avaliando a Força máxima e a Deformação máxima óssea;
- A organização tecidual em tibia de ratos, a partir da análise histológica, utilizando coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) ou pela coloração com Picrosirius, avaliando a proporção de colágeno, no tecido neoformado.

4. METODOLOGIA

4.1- Animais e Aspectos Éticos

Todos os procedimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia Translacional ou no Biotério da Universidade Nove de Julho – UNINOVE. Todos os procedimentos para a utilização dos animais de laboratório seguiram o guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório, além do Check-List para desenvolvimento da metodologia.

Foram utilizadas neste estudo 20 ratos da linhagem *Rattus norvegicus* (Wistar) MACHOS Wistar com idade de 3 a 5 meses (adultos), entre 180 - 250g num total de 20 animais, randomizados e distribuídos em 4 grupos experimentais. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da UNINOVE sob o número CEUA No 3946130819.

4.2- Grupos Experimentais:

Os 20 animais foram randomizados manualmente por um operador, de forma totalmente aleatória e sem qualquer tipo de pré-seleção, sendo distribuídos em 4 grupos (n=10), a saber:

CTL: Grupo Controle Íntegro: sem procedimento cirúrgico;

NT: Grupo com defeito ósseo e sem tratamento;

LPBM: Grupo com defeito ósseo e irradiado com Laser no local da lesão óssea (808nm, 6J, 100mW);

VPBM: Grupo com defeito ósseo e irradiado com Laser na região da artéria caudal (808nm, 15J, 100mW).

4.3- Método de Anestesia dos animais

Os animais foram pesados e anestesiados com associação de cloridrato de quetamina (90mg/Kg) e Xilazina (10mg/Kg). Os animais foram avaliados, com relação a ação da anestesia e em seguida foi realizada a lesão óssea em ambas as tíbias dos ratos.

4.4- Protocolo Experimental:

Os animais dos grupos NT, LPBM e VPBM foram anestesiados e a indução da lesão óssea foi realizada em ambas as tíbias. Imediatamente após a cirurgia os animais foram tratados de acordo com cada grupo experimental. Os tratamentos foram realizados 3 vezes por semana, no período da tarde, durante 30 dias. No final deste período, os animais foram eutanasiados com hiperdose de anestésico associação de cloridrato de quetamina (270mg/Kg) e Xilazina (30mg/Kg), e as tíbias foram dissecadas e armazenadas em freezer - 80°C ou em formol de acordo com cada análise propostas abaixo. Todo o protocolo pode ser observado na figura 2.

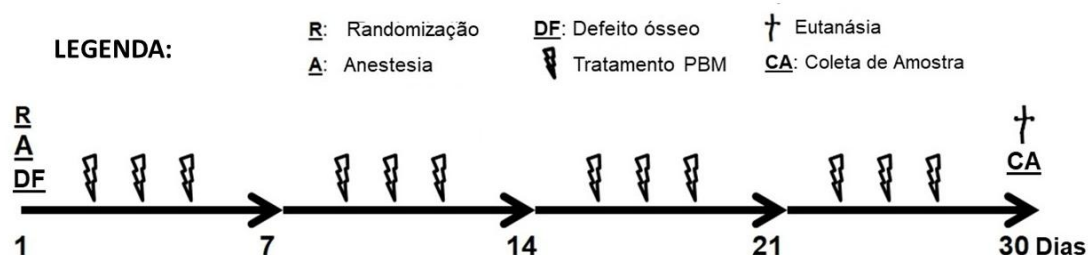


Figura 2- Delineamento experimental

4.5- Técnica de indução da lesão óssea

Para a cirurgia, os animais foram anestesiados, em seguida foi realizada a tricotomia e assepsia das áreas cirúrgicas. Em ambas as tíbias foram feitas uma incisão na parte pósteromedial, afastamento do músculo e exposição do osso. Na face medial do osso, a 10mm da extremidade superior da epífise proximal, foi realizado um defeito ósseo com uma profundidade de 0,5mm ou até atingir a medula óssea, utilizando um motor de implante cirúrgico – VK Driller® Equipamentos Elétricos Ltda (1500 rpm), com uma broca cirúrgica cilíndrica helicoidal de implante Ø1.3mm (KG Sorensen, SP-Brasil), penetrando perpendicularmente ao osso sempre com irrigação com soro fisiológico estéril (NaCl 0,9%) para evitar aquecimento(7). A cirurgia foi realizada nas mesmas condições para todos os animais e pelo mesmo operador (Fig. 3).

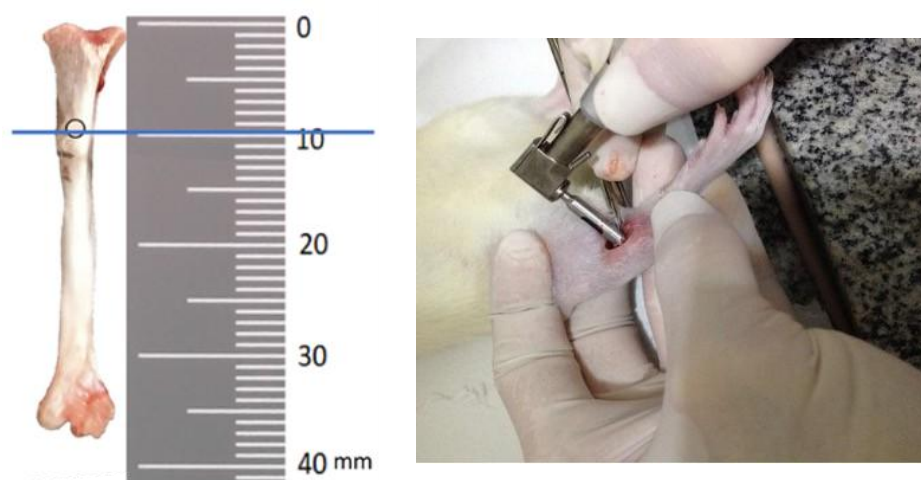


Figura 3- Defeito ósseo monocortical em tíbias, realizado com uma broca cirúrgica helicoidal de implante com 1.3mm de diâmetro (*Fonte: Autor*).

Manteve-se uma distância entre a cabeça da tíbia e o ponto de perfuração por volta de 9mm. Em seguida foi suturado o músculo e a pele com fio de nylon monofilamentar 4-0 (Shalon®) (7).

Os animais voltaram para suas gaiolas específicas e ficaram aos cuidados do Biotério da Uninove. Após cirurgia, receberam a dose única de Pentanbiotic® Veterinário Reforçado 2.400.000UI (Zoetis) - Dose: 0,02ml – 200g, dose única via IM. Esperou-se todos os ratos acordarem para administrar os seguintes analgésicos: Cronidor® 2% - Cloridrato de Tramadol a 2% de uso Veterinário (Agener União) - (5mg/kg). Diluição (1:10): 0,5ml de tramadol para 5ml de soro estéril. Dose de 0,2ml /200g da solução por via subcutânea de 8/8hs por 3 dias e Novalgina® - Dipirona Sódica 500mg/ml: 1 gota (0,05ml)/por quilo. Dose de 0,01 ml para 200g, em diluição 1:10 (Dipirona/soro estéril), respectivamente e foi administrado 0,1ml/200g da solução por via subcutânea, de 8/8hs por 3 dias. E retornaram para suas gaiolas de origem e mantidas sob os cuidados do Biotério da UNINOVE.

4.6- Tratamento por Fotobiomodulação

Para o grupo PBM, logo depois de realizada a lesão óssea foi feito uma aplicação utilizando laser de baixa intensidade (808nm; 6J; 100mW) em contato com a pele do animal (LPBM), direcionado perpendicularmente a região da sutura, onde está localizada a lesão óssea ou aplicado na região da artéria caudal (VPBM: 808nm; 15J; 100mW). Os animais foram colocados em suas respectivas gaiolas com livre acesso a água e ração e acondicionados no Biotério da UNINOVE. O tratamento foi repetido 3 vezes por semana, num total de 12 aplicações. O equipamento Laser utilizado foi: Photon Lase III DMC. Emissor de Luz Laser – Diodo (AsGaAl). O aparelho foi aferido antes e após a utilização pelo Laboratório de Biofotônica da UNINOVE.

Os parâmetros dosimétricos utilizados estão detalhados na tabelasabaixo:

Tabela 1- Parâmetros dosimétricos vascular e local utilizado no experimento.
Equipamento: Photon Lase III DMC

Parâmetros Dosimétricos – Equipamento Photon Lase III DMC

	VPBM	LPBM
Emissor de Luz Laser - Diodo	AsGaAl	AsGaAl
Comprimento de Onda	808 nm	808 nm
Área de Saída do Feixe	0,028cm ²	0,028cm ²
Potência	100 Mw	100 mW
Modo de Emissão	Contínua	Contínua
Energia Radiante por Ponto	15 J	6 J
Exposição Radiante	535,71 J/cm ²	214,28 J/cm ²
Ponto Único de Aplicação	Contato, Ponto único	Contato, Ponto único
Tempo de Radiação	150 s	60 s
Número de Aplicações (3x semana)	12	12

4.7- Eutanásia e coleta de amostras

Depois da coleta de sangue os animais foram anestesiados com hiperdosagem de Cetamina (270mg/ml) e Cloridrato de Xilazina (30mg/ml) para a eutanásia. Foram removidas as tíbias direitas e esquerdas de todos os grupos.

As tíbias direitas e esquerdas foram removidas e lavadas com soro fisiológico estéril e colocadas individualmente em Eppendorff e armazenadas em recipiente com nitrogênio líquido -80°C , e depois guardadas em freezer -80°C para posteriormente serem utilizadas na análise de propriedades mecânicas ou em formol (10%) para análises histológicas.

4.8- Análises

4.8.1- Análise das propriedades mecânicas ósseas

Após a indução da lesão, os animais foram sacrificados após 30 dias e o osso foi removido para posteriores análises. Parte deste material foi utilizada, 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.

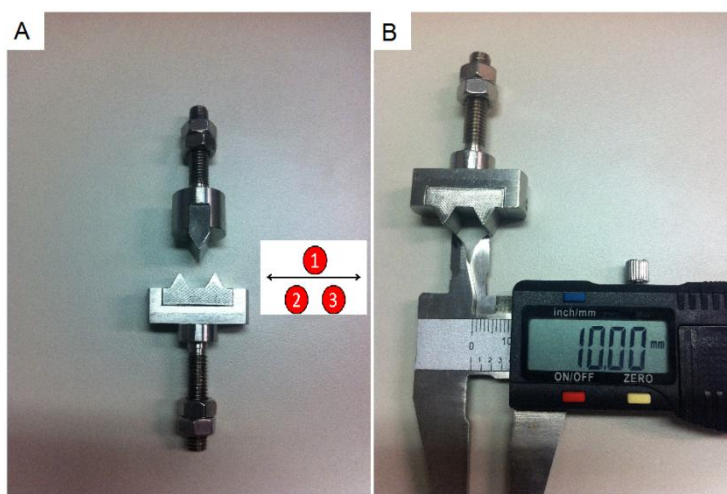


Figura 4: Dispositivo para ensaio de flexão em 3 pontos. Teste mecânico (EMIC200). *Fonte: autor.*

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

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})

Onde F_{max} corresponde à força máxima suportada pela tíbia no momento imediatamente anterior à ruptura, indicando a resistência mecânica do tecido ósseo.

D_{max} corresponde ao deslocamento máximo observado no ponto de ruptura, refletindo a capacidade de deformação e a tenacidade do tecido. Em conjunto, esses dois parâmetros permitem caracterizar propriedades como rigidez, elasticidade, resistência e qualidade estrutural da matriz extracelular.

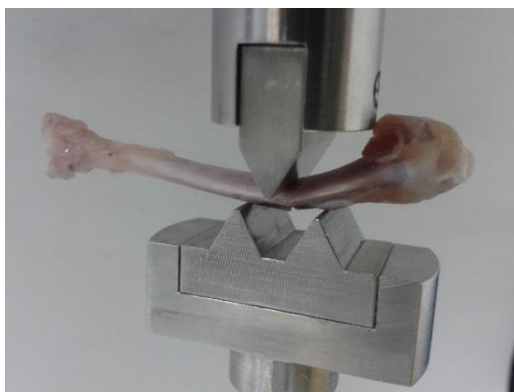
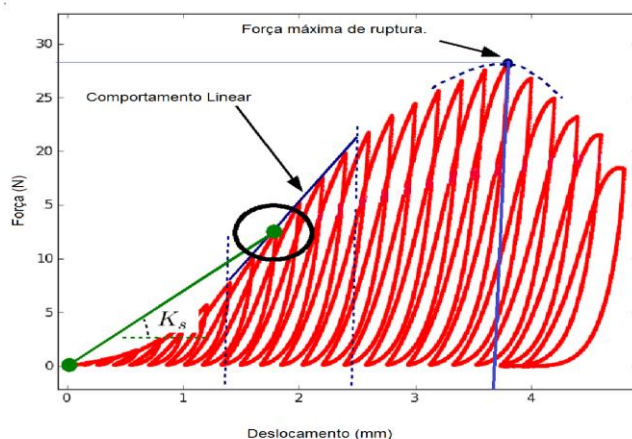


Figura 5: Posicionamento do osso tibial para ensaio mecânico. *Fonte: autor.*

A



B

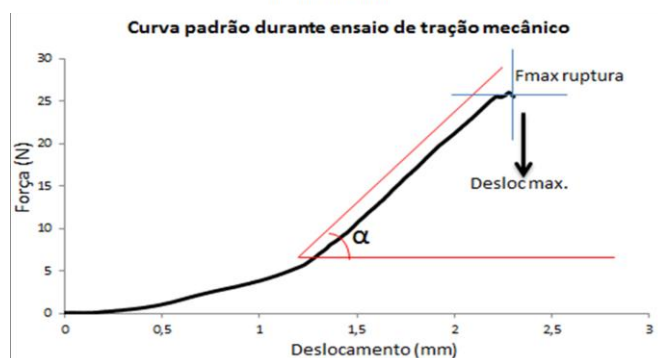


Figura 6: Gráfico do ensaio de flexão. A) Curva típica de registro durante a aplicação das forças de carregamento e descarregamento. B) Curva simplificada indicando a Força máxima e deslocamento no momento da ruptura. *Fonte: autor.*

4.8.2- Análise Histológica – Microscopia de luz (óptica)

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

Após a impregnação, as amostras foram colocadas em um pequeno recipiente coberto com parafina e deixadas para solidificar, formando um bloco

contendo o tecido. Para a microtomia foram realizados cortes com 5 µm de espessura em micrótomo LEICA RM 2125 RT. Uma vez precedido o preparo das amostras os cortes foram colocados em lâminas para serem corados, com Hematoxilina-Eosina (H.E.) ou com Picrosirius . 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).

Para a coloração com HE, foi avaliada a organização ósseo, na região do tecido formado. E com *Picrosirius*, foi utilizado para avaliar a organização e composição do colágeno no tecido formado.

4.8.3- Análise estatística

Os dados foram expressos pela média e seu respectivo desvio padrão. Todos os valores foram submetidos a análise de variância One-way ANOVA os dados são paramétricos e Post test por Tukey's Multiple Comparison. Foi utilizado o programa GraphPad Prisma 5 para confecção dos gráficos e análises estatísticas. Foi considerado o valor estatístico de significância de $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

Nesta etapa, serão apresentados os resultados funcionais, a partir das propriedades mecânicas da tíbia (Fmax e Dmax) e histológicos, referente a organização tecidual e proporção de colágeno.

5.1- Avaliação da Força Máxima de Ruptura – Fmax

No gráfico abaixo se observa a Força máxima resistida pela tíbia até sua ruptura, no ensaio cíclico de flexão. Os grupos NT e LPBM mantiveram Fmax semelhante ao grupo CTL. Somente o grupo VPBM apresentou aumento em Fmax ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo NT.

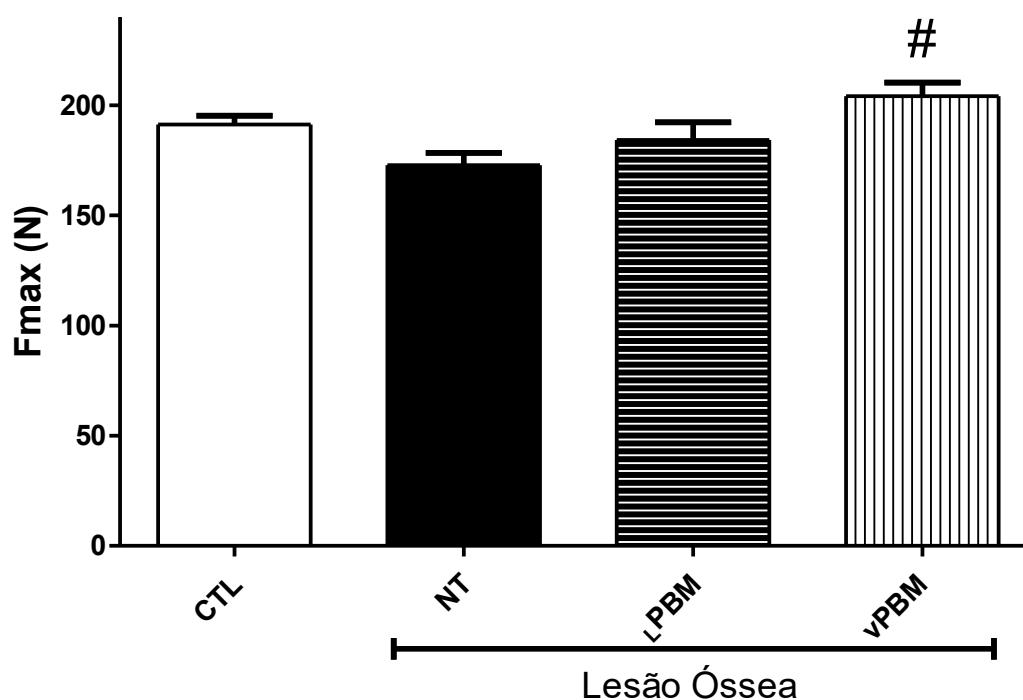


Figura 7: Gráfico da Força máxima durante ensaio de flexão cíclica no momento da ruptura óssea (Fmax) Grupos experimentais: Saudável (CTL) e lesão óssea sem tratamento (NT) ou tratados com Fotobiomodulação Local (LPBM) ou Fotobiomodulação vascular com ação sistêmica (VPBM). # $p < 0,05$ Vs NT.

5.2- Avaliação da Deformação Óssea - Dmax

A deformação máxima (Dmax) representa o quanto o osso é capaz de se deslocar antes de atingir a ruptura, sendo diretamente relacionada à tenacidade tecidual do osso e à capacidade de absorção de energia. Durante o ensaio de flexão em três pontos, a tíbia é submetida a tensões de carga e descarga, além de um componente de cisalhamento, especialmente concentrado próximo ao ponto de aplicação de carga. O cisalhamento é fundamental para a interpretação dos resultados, pois está diretamente relacionado à integridade da matriz colágena e da organização tecidual. Ossos com menor qualidade estrutural, ou com organização colagênica alterada, tendem a perder capacidade de resistir ao cisalhamento, reduzindo Dmax. Assim, a análise de Dmax reflete não apenas a deformabilidade, mas também a coerência estrutural entre as lamelas, importante no contexto da remodelação óssea durante o reparo.

No gráfico abaixo se observa a capacidade de deformação óssea em tíbias de ratos, após diferentes tratamentos. Os grupos NT ($p < 0,001$), LPBM ($p < 0,05$) e VPBM ($p < 0,01$) apresentaram redução em Dmax quando comparado ao grupo sem a lesão (CTL). O grupo LPBM apresentou aumento em Dmax quando comparado ao grupo NT ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças entre os grupos VPBM, NT e LPBM.

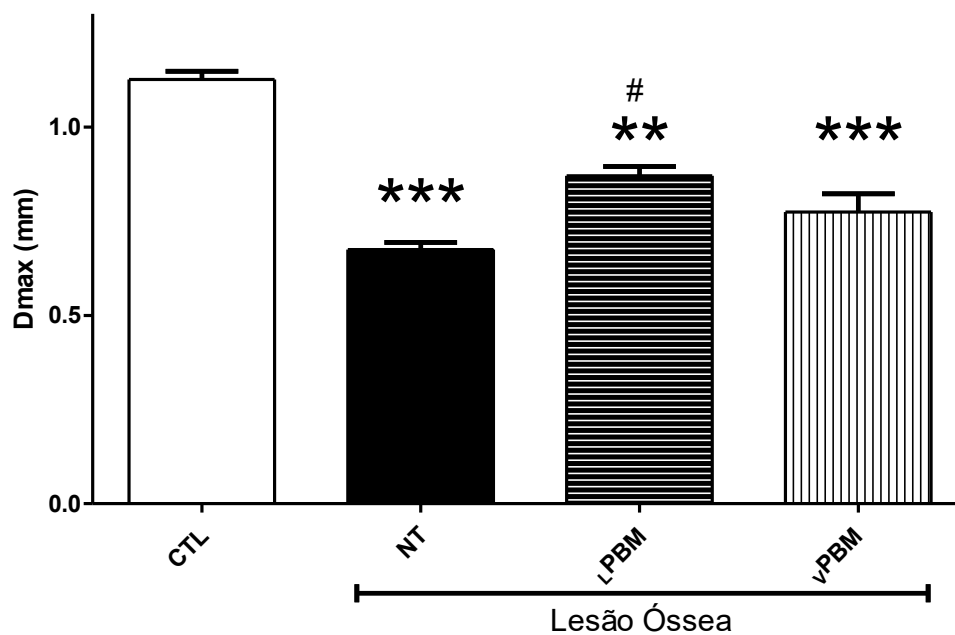


Figura 8: Gráfico da Deformação máxima durante ensaio de flexão cíclica no momento da ruptura óssea (Dmax) Grupos experimentais: Saudável (CTL) e lesão óssea sem tratamento (NT) ou tratados com Fotobiomodulação Local (LPBM) ou Fotobiomodulação vascular com ação sistêmica (VPBM). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ Vs CTL. # $p < 0.05$ Vs NT.

5.3- Relação entre Fmax e Dmax

No gráfico abaixo se observa a relação entre a força máxima suportada (Fmax) e a deformação óssea (Dmax). Os pontos coloridos representam cada grupo experimental, enquanto o ponto preto representa o grupo controle (CTL). Assim, quanto mais distante cada ponto colorido está do ponto preto, maior é a diferença desse grupo em relação ao controle, tanto na força máxima (Fmax) quanto na deformação máxima (Dmax). As linhas horizontais indicam a variação dos valores de Dmax dentro de cada grupo. Já as linhas verticais representam a variação dos valores de Fmax, indicando se os resultados daquele grupo foram mais uniformes ou mais dispersos. Dessa forma, o gráfico permite visualizar não só o quanto cada grupo se afasta do comportamento do controle, mas também o quanto os valores internos de cada grupo variam. Sendo assim foi observado que todos os grupos com lesão óssea NT, LPBM e VPBM apresentaram redução em Fmax e Dmax quando comparados ao grupo CTL. O grupo LPBM apresentou manutenção das propriedades mecânicas com melhora em Dmax ($p < 0,05$), quando comparado com o grupo NT. O grupo VPBM apresentou aumento em Fmax ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo NT.

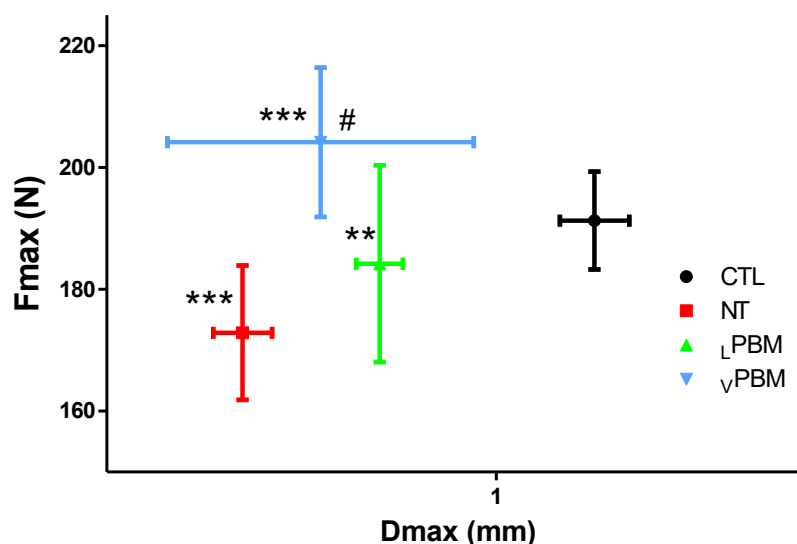


Figura 9: Gráfico da relação entre Fmax e Dmax. Grupos experimentais: Saudável (CTL) e lesão óssea sem tratamento (NT) ou tratados com Fotobiomodulação Local (LPBM) ou Fotobiomodulação vascular com ação sistêmica (VPBM) ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ Vs CTL; # $p < 0,05$ Vs NT.

5.4- Proporção de Colágeno Total

O gráfico abaixo se observa a porcentagem de colágeno total nos diferentes grupos experimentais com lesão óssea. Os grupos NT ($p<0,001$) e VPBM ($p<0,05$) apresentaram aumento na proporção de colágeno marcado pela coloração *Picrosirius*. O grupo LPBM ($p<0,05$) apresentou proporção de colágeno menor que o grupo NT, sendo semelhante ao grupo CTL.

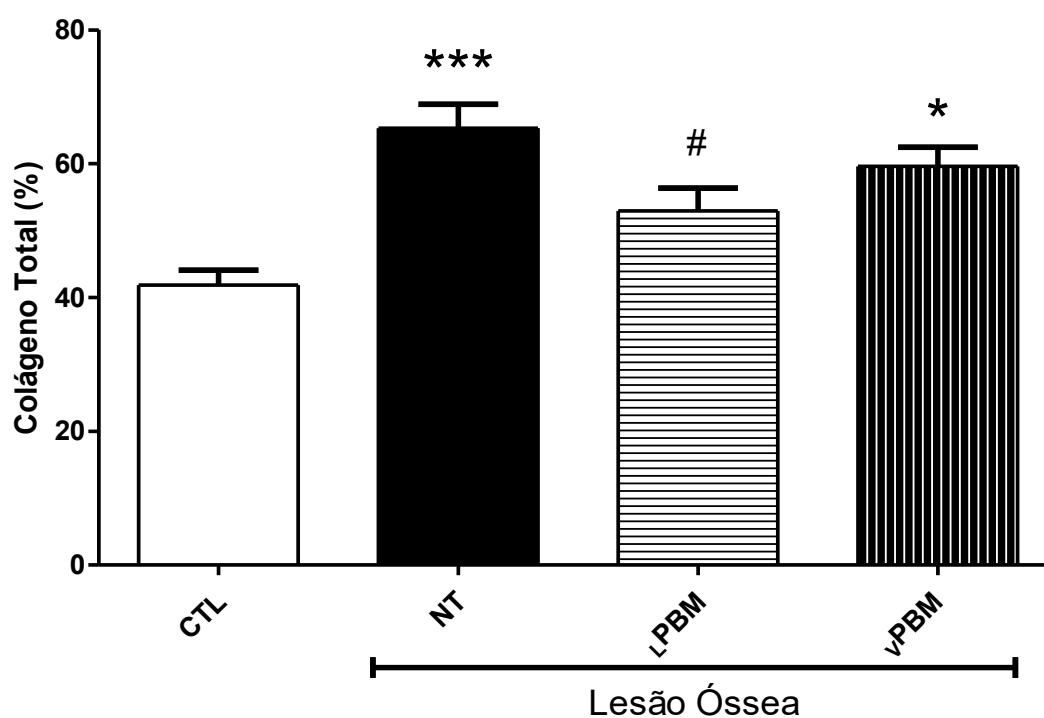


Figura 10: Gráfico da proporção de colágeno total. Grupos experimentais: Saudável (CTL) e lesão óssea sem tratamento (NT) ou tratados com Fotobiomodulação Local (LPBM) ou Fotobiomodulação vascular com ação sistêmica (VPBM) * $p<0,05$ e *** $p<0,001$ Vs CTL; # $p<0,05$ Vs NT.

5.5- Imagens Histológicas Representativas – Proporção de Colágeno por *Picrosirius*:

As imagens histológicas representativas mostram a marcação de colágeno a partir da coloração por *Picrosirius*. Na região do defeito ósseo, observam-se na camada cortical óssea (C) regiões com coloração rosa mais escuras (Colágeno) e mais claras (Regiões de calcificação maior).

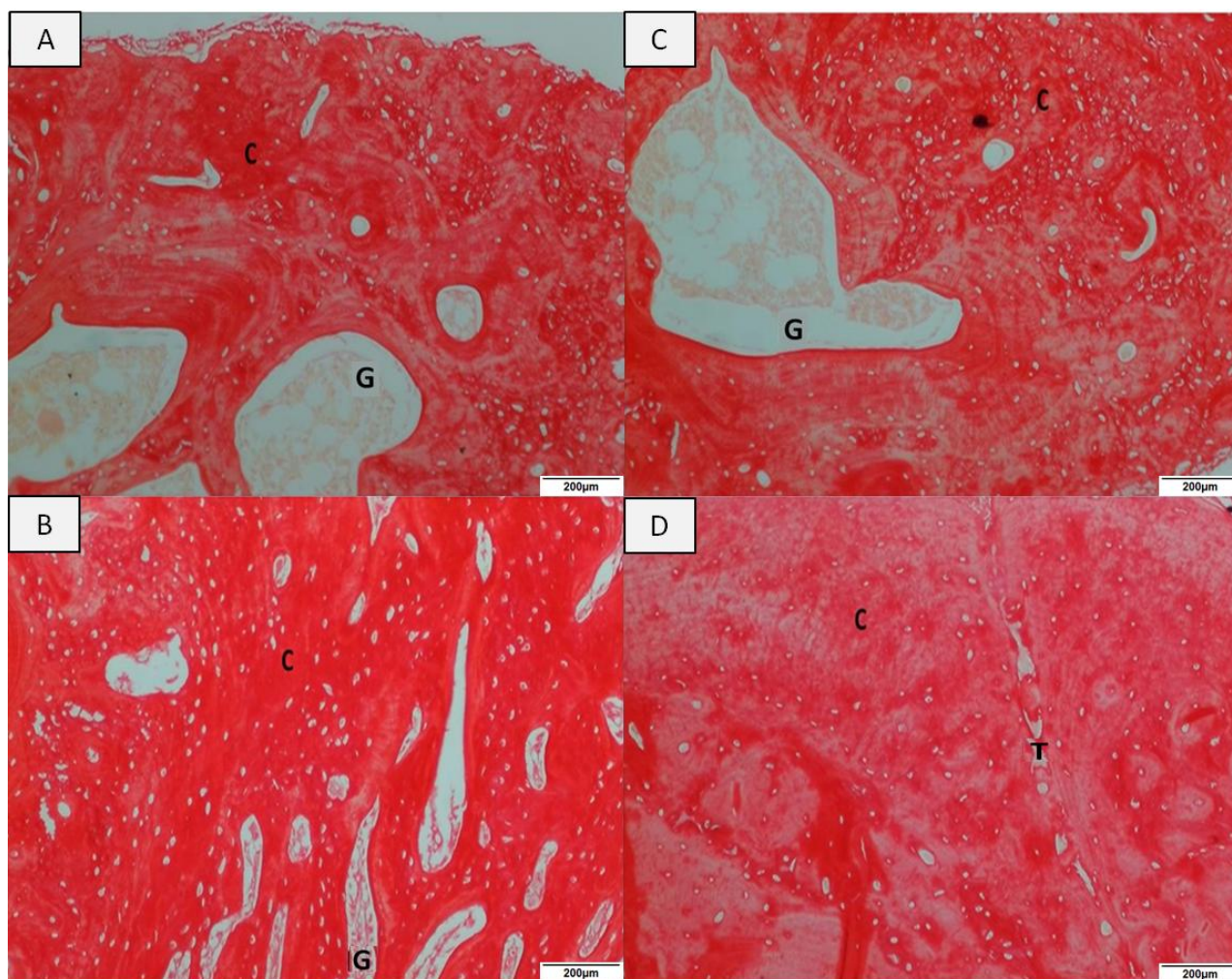


Figura 11: Imagens histológicas do tecido ósseo de tíbias de ratos com coloração *picrosirius red*. Grupos Experimentais: (A) CTL: Grupos Experimentais: (A) CTL: sem defeito ósseo; (B) NT: Defeito ósseo sem tratamento, ou tratado com Fotobiomodulação Local (C) ou Vascular (D). Legenda: C - Camada Cortical; G - Tecido de Granulação. T - Região de transição entre osso imaturo para maduro. Aumento de 100X.

5.6- Imagens Histológica Representativas – Organização Tecidual:

A figura abaixo mostra imagens histológicas representativas do tecido ósseo em 4 diferentes grupos. Em (A), o grupo CTL apresenta tecido ósseo bem organizado, com distribuição homogênea de osteoblastos na camada cortical óssea e presença de canais vasculares bem definidos. Em (B), o grupo NT apresenta tecido ósseo imaturo, com presença de tecido de transição (T) na região onde foi realizado o defeito ósseo (NB). Em (C) e (D), observa-se camada cortical bem organizada, sem tecido de transição.

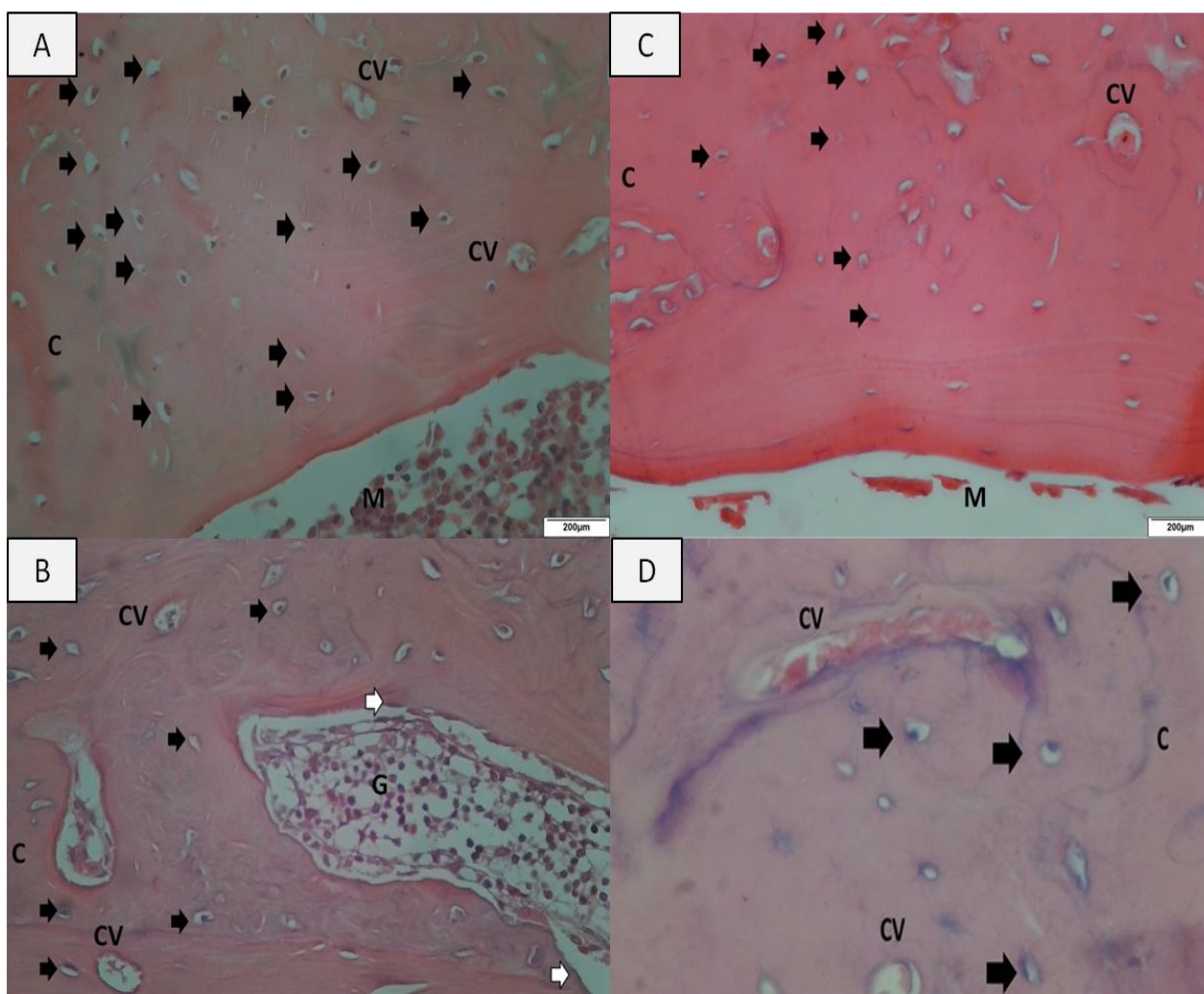


Figura 12: Imagens histológicas do tecido ósseo de tíbias de ratos. Grupos Experimentais: Grupos Experimentais: (A) CTL: sem defeito ósseo; (B) NT: Defeito ósseo sem tratamento, ou tratado com Fotobiomodulação Local (C) ou Vascular (D). Legenda: C - Camada Cortical; G - Tecido de Granulação. T - Região de transição entre osso imaturo para maduro. Aumento de 100X. Seta preta – Osteócitos; Seta branca – Osteoclastos. Aumento de 100X.

As análises histológicas mostraram diferenças claras entre os grupos. O grupo NT apresentou tecido imaturo, com presença de áreas de granulação e regiões de transição entre o osso neoformado e lamelar.

O grupo LPBM apresentou tecido cortical organizado, com osteoblastos distribuídos de forma uniforme e com ausência de tecido de granulação, semelhante ao grupo controle.

O grupo VPBM também apresentou boa organização cortical, porém com maior deposição de colágeno que o controle, sugerindo que o remodelamento ainda estava ativo.

6. DISCUSSÃO

As lesões ósseas provocam modificações estruturais que podem comprometer suas propriedades mecânicas, o processo reparo ósseo é um processo dinâmico e dependente da sequência coordenada entre inflamação, formação do calo e remodelamento. Alterações nessas etapas impactam diretamente a qualidade estrutural e funcional do tecido reparado (52; 53). No presente estudo, avaliamos como diferentes formas de fotobiomodulação (local e vascular) modulam esse processo, especialmente no que diz respeito à organização tecidual, proporção de colágeno e propriedades mecânicas da tíbia.

A utilização de terapias auxiliares, como a Fotobiomodulação (PBM), constitui uma vantagem terapêutica, pois modula o processo inflamatório, contribuindo tanto para o controle da dor quanto para o reparo tecidual (54; 55; 56). A maioria dos estudos com fotobiomodulação associada ao reparo ósseo utiliza o modo de irradiação de forma tópica, com a luz sendo aplicada no local da lesão, apresentando resultados importantes relacionados a proliferação de células ósseas e melhora na organização tecidual (57; 58; 59; 18, 60; 15). Atualmente, o uso da fotobiomodulação aplicada sobre grandes vasos sanguíneos (vPBM) e seus efeitos sistêmicos tem sido utilizado em trabalhos experimentais e clínicos, com importantes efeitos no processo de reparo tecidual (51; 20, 21). Contudo os mecanismos de ação para este efeito vascular ainda não foram esclarecidos, bem como, são escassas as pesquisas envolvendo o uso da VPBM no processo de reparo ósseo.

Após 30 dias da lesão, observamos que a interrupção da integridade cortical (grupo NT) comprometeu tanto a organização do tecido quanto suas propriedades mecânicas, evidenciando que o reparo ainda estava incompleto. Os tratamentos com PBM, por sua vez, influenciaram o processo de remodelamento de maneiras distintas, sugerindo mecanismos complementares entre LPBM e VPBM.

Neste estudo, comparamos os efeitos da fotobiomodulação aplicada no local da lesão (LPBM) ou aplicada sobre a artéria caudal (VPBM), avaliando o

processo de reparo ósseo a partir das análises histológicas e biomecânicas. Foram avaliados aspectos morfológicos, relacionados à organização tecidual e à proporção de colágeno, bem como a resistência óssea por meio de testes cíclicos de flexão. Após 30 dias da indução da lesão, todos os grupos com lesão óssea, sem tratamento (NT), tratado com fotobiomodulação local (LPBM) ou vascular (VPBM) apresentaram redução da capacidade de deformação (D_{max}), em comparação ao grupo controle sem lesão (CTL). Os grupos NT e VPBM também apresentaram maior proporção de colágeno total. O grupo NT também apresentou tecido ósseo desorganizado, caracterizado pela presença de tecido de granulação além de regiões de transição entre tecido imaturo e maduro na camada cortical da tíbia.

O modelo experimental de lesão óssea utilizada nesta pesquisa foi adaptado de trabalhos anteriores, caracterizados pelo defeito não crítico padronizado, que permite o crescimento direcionado tanto da região medular quanto da cortical óssea (18; 61; 62). Alterações na organização tecidual observadas neste modelo também foram descritas em outros estudos, incluindo a presença de tecido de granulação no local da lesão (61), além de tecido ósseo de transição, com mudanças no número de osteoblastos e na atividade de osteoclastos, evidenciando que o processo de reparo ósseo ainda estaria ativo (63).

Esse modelo experimental também favoreceu a padronização do tratamento com LPBM, bem como o acompanhamento e localização da lesão para subsequente análise histológica e funcional (64; 18; 61). Neste estudo, o grupo tratado com LPBM manteve ambas a proporção de colágeno e a força máxima de ruptura (F_{max}) semelhante ao grupo sem lesão (CTL) e aumentou D_{max} quando comparado ao grupo NT. Nas análises histológicas, não foram observados tecidos de granulação e o tecido ósseo neoformado apresentou osteoblastos distribuídos de maneira homogênea, sendo observada ainda a presença de canais vasculares.

Ao analisar o grupo VPBM, observamos osteócitos distribuídos de forma homogênea na camada cortical, além de canais vasculares. Como nos demais grupos com lesão óssea, o grupo VPBM também apresentou redução na

capacidade de deformação (Dmax), contudo, foi observado aumento na força máxima de ruptura (Fmax), acompanhado do aumento na proporção de colágeno quando comparado ao grupo CTL. Em resumo, as tíbias dos animais irradiados com VPBM foram as únicas a apresentar aumento de Fmax, comparado ao grupo NT. Ambas a força máxima de ruptura como a capacidade de deformação óssea são propriedades mecânicas importantes e estão diretamente relacionadas com a resistência tecidual, podendo sofrer alterações durante o processo de reparo, sendo geralmente relacionadas com as características da matriz extracelular, com a proporção de colágeno ou com os níveis de determinadas MMPs com importante papel na degradação do colágeno e na remodelação tecidual (65; 66).

O aumento da força máxima de ruptura associada à diminuição da capacidade de deformação, observada nos resultados biomecânicos do grupo vPBM, podem estar relacionada com alteração na rigidez tecidual. Algumas análises, como a proporção de diferentes tipos de colágeno e níveis de enzimas MMPs poderiam fornecer mais evidências destas alterações biomecânicas (66; 67). É importante também ressaltar que os testes biomecânicos cíclicos utilizados neste estudo se mostraram vantajosos em relação aos ensaios monotônicos utilizados em estudos anteriores, permitindo identificar diferenças funcionais entre ossos saudáveis e com lesão induzida, bem como os benefícios funcionais advindos da PBM (68; 64,59).

Com relação às dosimetrias utilizadas neste estudo, parâmetros similares de comprimento de onda e de energia já foram descritos em pesquisas anteriores, demonstrando serem eficazes na promoção do reparo ósseo, favorecendo a proliferação de osteoblastos e a organização da matriz extracelular (15). Estudos experimentais utilizando a PBM infravermelha aplicada no local da lesão óssea (LPBM) observaram a modulação de enzimas como fosfatase ácida e alcalina e moléculas como RANK-L e osteoprotegerina, auxiliando na atividade osteoclástica, na remodelação óssea e na síntese de colágeno (16;17). A LPBM infravermelha também favorece a formação de canais vasculares, acelerando a neoformação óssea (18; 15).

Com relação ao grupo VPBM, os parâmetros de irradiação escolhidos neste trabalho foram adaptados de estudos experimentais ou clínicos com VPBM no processo de reparo em diversos modelos experimentais, como em lesões medulares (20) no tratamento de doenças pulmonares (19) em doenças metabólicas (21) ou no reparo de lesões musculares (20,22). Contudo, ainda são escassos os trabalhos que utilizam a VPBM como tratamento único ou comparado com a LPBM no processo de reparo ósseo. Existe também certa confusão na nomenclatura utilizada para os estudos com VPBM. Alguns trabalhos ainda mantêm o termo ILIB não invasivo, enquanto outros chamam de irradiação transcutânea, ou ainda fotobiomodulação sistêmica (69).

Do ponto de vista clínico, a PBM também tem se mostrado eficaz como recurso analgésico em lesões e dores ortopédicas (16). Embora seus mecanismos no controle inflamatório e da dor ainda não estejam completamente elucidados, há evidências de que a LPBM atue na modulação da COX-2 e da prostaglandina E2, favorecendo a resolução da inflamação (70; 55). Seus efeitos analgésicos parecem envolver tanto o controle periférico da inflamação quanto mecanismos centrais de modulação da dor (66; 54; 56).

Os achados apresentados neste estudo são promissores, sugerindo um efeito sistêmica da VPBM, o que favoreceria sua utilização em diversas doenças crônicas multifocais, facilitando o trabalho do profissional de saúde além de melhorar a adesão do paciente ao tratamento. Contudo, ainda é necessário avaliar diferentes parâmetros de irradiação para o uso da VPBM, considerando que os comprimentos de onda mais utilizados no reparo tecidual situam-se entre o vermelho e o infravermelho (71; 72; 15), e que tempos maiores de irradiação parecem necessários para atingir volume sanguíneo suficiente e promover efeitos sistêmicos mensuráveis. Em síntese, tanto a LPBM como a VPBM favoreceram a organização do tecido ósseo (73). No entanto, a VPBM parece aumentar a resistência óssea quando comparada à LPBM, sugerindo diferenças na proporção de colágeno como um dos fatores para esta mudança nas propriedades mecânicas da tíbia, neste modelo experimental de lesão óssea.

7. CONCLUSÃO

Concluimos que o modelo de defeito ósseo em tíbia de ratos mantém alterada a morfologia e a proporção de colágeno após 30 dias da indução da lesão, refletindo na redução da resistência mecânica da tíbia. Ambas as terapias por Fotobiomodulação, aplicada no local da lesão (LPBM) ou aplicada superficialmente nos vasos da cauda dos animais (VPBM) melhoraram a organização tecidual, porém, somente a VPBM influenciou no aumento da força máxima de ruptura, refletindo na resistência óssea. Não foi observada diferença na organização tecidual ou na capacidade de deformação entre as tíbias tratadas com Fotobiomodulação Local ou Vascular. Os tratamentos realizados com Fotobiomodulação Local (808 nm; 6J; 100 mW) ou Vascular (808 nm; 15J; 100 mW) promoveram uma melhor organização tecidual, refletindo nas propriedades mecânicas ósseas, no modelo experimental de lesão em tíbia. Perspectivas para trabalhos futuros: Estudos que entendam melhor o mecanismo de ação da VPBM, utilizar os mesmos parâmetros em ambas técnicas LPBM e VPBM e acrescentar um grupo associando as técnicas VPBM e LPBM.

8. REFERÊNCIAS

1. HOFSTETTER, W.; EGLI, R. Bone repair and fracture healing. In: Reference module in biomedical sciences. 3. ed. Amsterdam: Elsevier, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.00223-3>.
2. SATHYENDRA, Vikram; DAROWISH, Michael. Basic science of bone healing. *Hand Clinics*, v. 29, n. 4, p. 473–481, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.hcl.2013.08.002>.
3. FÁVARO-PÍPI, Elaine et al. Low-intensity pulsed ultrasound produced an increase of osteogenic genes expression during the process of bone healing in rats. *Ultrasound in Medicine & Biology*, New York, v. 36, n. 12, p. 2057–2064, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2010.07.012>.
4. ABDEL-MAGEED, A. M.; ABDELLATIF, M. M.; ALI, Y. H.; INTISAR, I. K.; SHAHHAT, I. M. A. M.; ABU-TAHON, M. A.; ... ALI, Z. A. Inflammatory immune response and its key roles in the process of bone fractures healing. *Edelweiss Applied Science and Technology*, v. 8, n. 5, p. 2536–2541, dez. 2024. DOI: <https://doi.org/10.55214/25768484.v8i6.3738>
5. LIN, Z.; RIOS, H. F.; VOLK, S. L.; SUGAI, J. V.; JIN, Q.; GIANNOBILE, W. V. Gene expression dynamics during bone healing and osseointegration. *Journal of Periodontology*, v. 82, n. 7, p. 1007–1017, 2011.
6. MARSELL, R.; EINHORN, T. A. The biology of fracture healing. *Injury*, v. 42, p. 551–555, 2011. DOI: [10.1016/j.injury.2011.03.031](https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.03.031)
7. PALLOTTA, R. C. Avaliação do efeito da radiação laser de baixa potência e do plasma rico em fibrina na reparação óssea em ratos. 2014. 150 f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42136/tde-25112014-143302/>
8. HADJIARGYROU, M. et al. Transcriptional profiling of bone regeneration. Insight into the molecular complexity of wound repair. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 33, p. 30177–30182, 16 Aug. 2002.
9. MURATA, M. Collagen biology for bone regenerative surgery. *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, v. 38, n. 6, p. 321, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.5125/jkaoms.2012.38.6.321>.

10. OLIVEIRA, M. R. et al. Tissue Engineering. Journal of Craniofacial Surgery, v. 24, n. 4, p. e394–e396, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/scs.0b013e3182802324>.
11. ANTIPOV, A. P.; GORDINA, E. M.; MARKOV, M. A.; BOZHKOVA, S. A. Influence of different methods of bone processing on bone mechanical properties. *Genij Ortopedii*, v. 28, n. 6, p. 783–787, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.18019/1028-4427-2022-28-6-783-787>.
12. BRANDT-WUNDERLICH, C. et al. Investigating the bending properties of cardiovascular catheters and stents via three-point bending test setup. *Current Directions in Biomedical Engineering*, v. 10, n. 4, p. 111–114, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/cdbme-2024-2027>.
13. BANIYA, A. Three-point bending test data and procedures, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.21729359>.
14. MAGRI, A. M. P. et al. Photobiomodulation guided healing in a sub-critical bone defect in calvarias of rats. *Laser Therapy*, Tokyo, v. 28, n. 3, p. 171–179, 2019. DOI: 10.5978/islsm.19-OR-10.
15. Rossi JO, Araujo EMC, Camargo MEC, Ferreira Junior RS, Barraviera B, Miglino MA, Nogueira DMB, Reis CHB, Gil GE, Vinholo TR, Soares TP, Buchaim RL, Buchaim DV. Effectiveness of the Association of Fibrin Scaffolds, Nanohydroxyapatite, and Photobiomodulation with Simultaneous Low-Level Red and Infrared Lasers in Bone Repair. *Materials (Basel)*. 2024 Sep 3;17(17):4351. doi: 10.3390/ma17174351. PMID: 39274741; PMCID: PMC11395849.
16. RODRIGUES, E. Efeitos da fotobiomodulação na reabilitação de pacientes com patologias traumato-ortopédicas: revisão integrativa. *Revista Ciência Plural*. 2024; 10(1): e31518.
17. DE OLIVEIRA, Lana Sarita de Souza et al. Low-level laser therapy (780 nm) combined with collagen sponge scaffold promotes repair of rat cranial critical-size defects and increases TGF- β , FGF-2, OPG/RANK and osteocalcin expression. *International Journal of Experimental Pathology*, v. 98, n. 2, p. 75–85, abr. 2017. DOI: 10.1111/iep.12226
18. Bossini PS, 2011 BOSSINI, P. S.; RENNÓ, A. C. M.; RIBEIRO, D. A.; FANGEL, R.; PEITL, O.; ZANOTTO, E. D.; PARIZOTTO, N. A. Biosilicate® and low-level laser therapy improve bone repair in osteoporotic rats. *Journal*

- of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, v. 5, n. 3, p. 229–237, mar. 2011. DOI: 10.1002/term.309
19. SCHAPOCHNIK, Adriana et al. Intravascular laser irradiation of blood (ILIB) used to treat lung diseases: a short critical review. *Lasers in Medical Science*, [s.l.], v. 38, p. 93, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10103-023-03750-0>
 20. TOBELEM, D. D. C. et al. Systemic vascular photobiomodulation accelerates the recovery of motor activity in rats following spinal cord injury. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 55, n. 6, p. 577–589, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/lsm.23665>.
 21. de Freitas NR, Guerrini LB, Haddad DS, de Carvalho RM, Yaedú RYF, de Almeida ALPF. Effect of Vascular Photobiomodulation in the Postoperative Period of Alveolar Bone Grafting. *Dent J (Basel)*. 2025 Apr 26;13(5):190. doi: 10.3390/dj13050190. PMID: 40422610; PMCID: PMC12110624.
 22. Fu JC, Wang NK, Cheng YY, Chang ST. The Adjuvant Therapy of Intravenous Laser Irradiation of Blood (ILIB) on Pain and Sleep Disturbance of Musculoskeletal Disorders. *J Pers Med*. 2022 Aug 19;12(8):1333. doi: 10.3390/jpm12081333. PMID: 36013282; PMCID: PMC9410510.
 23. KAUR, Jasvir; REINHARDT, Dieter P. Extracellular matrix molecules. In: SHARMA, Monzur M. (ed.). *Stem cell biology and tissue engineering in dental sciences*. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2015. cap. 3, p. 25–43. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397157-9.00003-5>.
 24. CHANG, B.; JARDINE, J. F.; LIU, X. Osteon: Structure, Turnover, and Regeneration. *Tissue Engineering Part B – Reviews*, [s.l.], 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/TEN.TEB.2020.0322>.
 25. TROMPET, D.; MELIS, S.; CHAGIN, A. S.; MAES, C. Skeletal stem and progenitor cells in bone development and repair *Journal of Bone and Mineral Research*, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jbmr/ziae069>.
 26. GHIMIRE, S.; MIRAMINI, S.; EDWARDS, G. A.; ROTNE, R.; XU, J.; EBELING, P. R.; ZHANG, L. The investigation of bone fracture healing under intramembranous and endochondral ossification. *Bone Reports*, v. 14, p. 100740, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.BONR.2020.100740>.

27. WILGER, K. Basic Biology of Fracture Healing. *SpringerBriefs em Bioengenharia*, p. 7–13, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-030-94082-9_2.
28. CHEW, F. S.; MALDIJAN, C.; MULCAHY, H. Broken Bones. [Sd.], . Disponível em: <https://doi.org/10.1017/cbo9781316182123>.
29. WANG, J. et al. Biomaterials for bone defect repair: Types, mechanisms and effects. *International Journal of Artificial Organs*, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/03913988231218884>.
30. YOUNG, B.; LOWE, J. S.; STEVENS, A.; HEATH, J. W. *Wheater Histologia Funcional*. Brazil: Elsevier Health Sciences, 2011.
31. SINGH, D.; RAI, V.; AGRAWAL, D. K. Regulation of Collagen I and Collagen III in tissue injury and regeneration. *Cardiology and Cardiovascular Medicine*, v. 7, n. 1, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.26502/fccm.92920302>.
32. VÉLEZ-CRUZ, Alex J.; FARIÑAS-CORONADO, Wilfredo. Review-Bone Characterization: Mechanical Properties Based on Non- Destructive Techniques. *Athenea Journal*, San Juan, v. 3, n. 10, p. 16–29, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.47460/athenea.v3i10.45>.
33. RUMMLER, M. et al. Bone mechanical properties were altered in a mouse model of multiple myeloma bone disease. *Biomaterials Advances*, v. 166, p. 214047, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2024.214047>.
34. SCHINDELER, A.; McDONALD, M. M.; BOKKO, P.; LITTLE, D. G. Bone remodeling during fracture repair: the cellular picture. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 19, n. 5, p. 459–466, oct. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2008.07.004>.
35. PALANISAMY, P.; ALAM, M.; LI, S.; CHOW, S. K. H.; ZHENG, Y. P. Low-Intensity Pulsed Ultrasound Stimulation for Bone Fractures Healing: a review. *Journal of Ultrasound in Medicine*, v. 41, n. 3, p. 547–563, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jum.15738>.
36. SHUMAN, M. A. Distraction osteogenesis of the maxillofacial skeleton: biomechanics and clinical implications. *Dentistry 3000*, v. 1, n. 11, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.4172/SCIENTIFICREPORTS.509>.
37. PIAZZOLLA, A. et al. Capacitive coupling electric fields in the treatment of vertebral compression fractures. *Journal of Biological Regulators and*

- Homeostatic Agents*, v. 29, n. 3, p. 637–646, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26403401/>
38. YE, H. Mechanic stress generated by a time-varying electromagnetic field on bone surface. *Medical & Biological Engineering & Computing*, v. 56, n. 10, p. 1793–1805, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S11517-018-1814-3>.
 39. FIOROTT, M. A. et al. Advances in orthopedic surgery. *Здоров'я Суспільства*, v. 4, n. 6, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.51249/hs.v4i06.2295>.
 40. 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. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v. 468, n. 3, p. 735–740, mar. 2010.
 41. PINHEIRO, A. L. B. et al. Effects of LED or laser phototherapy on bone defects grafted with MTA and irradiated with laser or LED light: a comparative Raman spectroscopic study. *Proceedings of SPIE*, v. 8211, p. 821108, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1117/12.906003>.
 42. RADOMINSKI, S. C. et al. Brazilian guidelines for the diagnosis and treatment of postmenopausal osteoporosis. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 57, p. s452–s466, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rbre.2017.07.001>.
 43. FERNANDES, K. P. S.; FERRARI, R. A. M.; FRANÇA, C. M. (Org.). *Biofotônica: conceitos e aplicações*. 1. ed. São Paulo: UNINOVE, 2017. cap. 2, p. 42–49. (e-book).
 44. Mester, E., Szende, B., Spiry, T., & Scher, A. (1972). Stimulation of wound healing by laser rays. *Acta chirurgica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 13(3), 315–324.
 45. BUCHAIM, D. V.; COLA, P. C.; BUCHAIM, R. L. Effects of Photobiomodulation Using Low-Level Laser Therapy on Alveolar Bone Repair. *Photonics*, v. 10, n. 7, p. 734, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/photonics10070734>.
 46. LU, P.; CHEN, L. The role of photobiomodulation in accelerating bone repair. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2024.03.002>.

47. CARVALHO, A. F. et al. Effects of Laser Photobiomodulation on the Regeneration of Bone Defects Grafted with Bio-Oss® Xenograft: a Systematic Review of Animal Models. *Revista de Ciências da Saúde*, v. 25, n. 4, p. 213–220, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.17921/2447-8938.2023v25n4p213-220>.
48. MENEGUZZO, D. T.; FERREIRA, L. S.; NAKASHIMA, C. F.; CARVALHO, E. M. de. Intravascular laser irradiation of blood. In: HAMBLIN, M. R.; SOUSA, M. V. P.; AGRAWAL, T. (eds.). *Handbook of Low-Level Laser Therapy*. Singapore: Pan Stanford Publishing, 2017. Cap. 46. ISBN 978-981-4669-60-3.
49. PACHECO, J. A. et al. Applied Transdérmic Photobiomodulator Therapy About the Primary Carotide Artery in Patients Under Hormonal Blockers and Dynude Disorders and Pathogenic Flora of Orofaringeo and Systemic Repercussions. *American Journal of Biomedical Science and Research*, 2019.
50. TOMÉ, R. F. F. et al. ILIB (intravascular laser irradiation of blood) as an adjuvant therapy in the treatment of patients with chronic systemic diseases- an integrative literature review. *Lasers in Medical Science*, 2020. DOI: 10.1007/s10103-020-03100-4
51. SILVA, V. G. et al. The systemic action of the Intravascular Laser Irradiation of Blood (Ilib) therapy to strengthen the immune system and the inflammatory process: an integrative review. *Research, Society and Development*, 2023.
52. SILVA, Samantha Ketelyn et al. *Suitability of Chitosan Scaffolds with Carbon Nanotubes for Bone Defects Treated with Photobiomodulation*. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 12, p. 6503, 10 jun. 2022. DOI: 10.3390/ijms23126503
53. OVSIANIKOV, Aleksandr; KHADEM-HOSSEINI, Ali; MIRONOV, Vladimir. The synergy of scaffold-based and scaffold-free tissue engineering strategies. *Trends in Biotechnology*, v. 36, n. 4, p. 348–357, abr. 2018. DOI: 10.1016/j.tibtech.2018.01.005
54. E Silva YME, de Viveiros Tavares Alves P, Dalmaso RBM, de Oliveira APL, Duran CCG, Júnior JAS, Zamuner SR, de Souza Setubal Destro MF,

- Cecatto RB, Martins RÁBL, Liebano RE, Marcos RL. Photobiomodulation presents an anti-inflammatory effect, reflecting on the expression of receptors related to the pain process in a collagenase-induced tendinitis experimental model. *J Photochem Photobiol B*. 2025 Aug;269:113205. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2025.113205. Epub 2025 Jun 26. PMID: 40592080.
55. Lopes-Martins RAB, Leonardo PS, Bjordal JM, Marcos RL. Photobiomodulation: Inhibition or Resolution of the Inflammatory Process? *Photobiomodul Photomed Laser Surg*. 2020 Aug;38(8):453-454. doi: 10.1089/photob.2020.4825. Epub 2020 Jun 29. PMID: 32609051.
56. Marcos RL, Evaristo MM, de Almeida-Mattos P, Capeloa CN, Aguilera Cantero JMM, Prates RA, Silva Junior JA, Serra AJ, Longo L, Parizotto NA, Lopes Martins RÁB. Photobiomodulation Controls the Expression of Lipoxin Receptors, Promoting the Resolution of the Inflammatory Process in an Experimental Tendinitis Model. *J Orthop Res*. 2025 May;43(5):1035-1044. doi: 10.1002/jor.26063. Epub 2025 Mar 5. PMID: 40045730
57. GÜRLER, G.; GURSOY, B. Investigation of effects of low level laser therapy in distraction osteogenesis. *Journal of Stomatology & Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 119, n. 6, p. 469–476, dez. 2018. DOI: 10.1016/j.jormas.2018.05.006
58. GONÇALVES, J. B. de O. et al. Effects of low-level laser therapy on autogenous bone graft stabilized with a new heterologous fibrin sealant. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 162, p. 663-668, set. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.07.023>.
59. TIM, Carla Roberta et al. *Low-level laser therapy enhances the expression of osteogenic factors during bone repair in rats*. *Lasers in Medical Science*, v. 29, n. 1, p. 147–156, jan. 2014. DOI: 10.1007/s10103-013-1302-9
60. PINHEIRO, A.L.B.; SOARES, L.G.P.; DA SILVA, A.C.P.; SANTOS, N.R.S.; DA SILVA, A.P.L.T.; NEVES, B.L.R.C.; et al. The use of photobiomodulation therapy or LED and mineral trioxide aggregate improves the repair of complete tibial fractures treated with wire osteosynthesis in rodents. *Lasers Med Sci*, v. 36, n. 4, p. 735-42, 2020.
61. TIM, C.R.; BOSSINI, P.S.; KIDO, H.W.; MALAVAZI, I.; KRESS, M.R.V.; CARAZZOLLE, M.F.; et al. Low-level laser therapy induces an upregulation

- of collagen gene expression during the inicial process of bone healing: a microarray analysis. *J Biomed Opt*, v.21, n.8, p.1-9, 2016b.
62. ATASOY, K. T.; KORKMAZ, Y. T.; ODACI, E.; HANCI, H. The efficacy of low-level 940 nm laser therapy with different energy intensities on bone healing. *Brazilian Oral Research*, [s.l.], v. 31, e7, 2017. DOI: 10.1590/1807-3107BOR-2017.vol31.0007. PMID: 28076498.
 63. BOSKEY, A. L.; IMBERT, L. Bone quality changes associated with aging and disease: a review. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1410, n. 1, p. 93–106, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/NYAS.13572>.
 64. FANGEL, R. et al. Low-level laser therapy, at 60 J/cm² associated with a Biosilicate® increase in bone deposition and indentation biomechanical properties of callus in osteopenic rats. *Journal of Biomedical Optics*, v. 16, n. 7, p. 078001, jul. 2011. DOI: 10.1117/1.3598847
 65. Marcos RL, Leal-Junior EC, Arnold G, Magnenet V, Rahouadj R, Wang X, Demeurie F, Magdalou J, de Carvalho MH, Lopes-Martins RÁ. Low-level laser therapy in collagenase-induced Achilles tendinitis in rats: analyses of biochemical and biomechanical aspects. *J Orthop Res*. 2012 Dec;30(12):1945-51. doi: 10.1002/jor.22156. Epub 2012 Jun 5. PMID: 22674405.
 66. Fernandes, G., Labat Marcos, R., Almeida dos Santos, S. et al. Photobiomodulation control the expression of MMP, TNF- α and NK-1 receptors, improving allodynia and cartilage resistance in rheumatoid arthritis model. *Lasers Med Sci* 40, 306 (2025). <https://doi.org/10.1007/s10103-025-04557-x>
 67. PUBLIO, Matheus Lopes et al. Activated carbon as a bone substitute: enhancing mechanical and morphological properties in a rat tibia defect model. *Journal of Advances in Medicine and Medical Research*, v. 37, n. 1, p. 23-40, 2025. DOI: <https://doi.org/10.9734/jammr/2025/v37i15693>
 68. MARCOS, Rodrigo Labat; ARNOLD, Gilles; MAGNET, Vincent; RAHOUADJ, Rachid; MAGDALOU, Jacques; LOPES-MARTINS, Rodrigo Álvaro Brandão. Biomechanical and biochemical protective effect of low-level laser therapy for Achilles tendinitis. *Journal of the Mechanical Behavior*

- of Biomedical Materials, v. 29, p. 272–285, jan. 2014. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2013.08.028
69. Benevento EM, Lisboa FSS, Kaneko LO, Bertolucci V, Silva ÁAR, de Oliveira DC, Sardim AC, Dos Reis IGM, Porcari AM, Messias LHD. Transcutaneous intravascular laser irradiation of blood affects plasma metabolites of women. *Sci Rep.* 2024 Dec 1;14(1):29839. doi: 10.1038/s41598-024-80169-9. PMID: 39617830; PMCID: PMC11609300.
70. MARCOS, R. L. et al. Infrared (810 nm) low-level laser therapy in rat Achilles tendinitis: a consistent alternative to drugs. *Photochemistry and Photobiology*, v. 87, n. 6, p. 1447-1452, nov./dez. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2011.00999.x>.
71. EROGLU, B. et al. Photobiomodulation has rejuvenating effects on aged bone marrow mesenchymal stem cells. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 13067, 22 jun. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92584-3>.
72. SALEHPOUR, Farzad et al. Penetration Profiles of Visible and Near-Infrared Lasers and Light-Emitting Diode Light Through the Head Tissues in Animal and Human Species: A Review of Literature. *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery*, v. 37, n. 10, p. 581–595, out. 2019. DOI: 10.1089/photob.2019.4676
73. SELLA, V. R. G. et al. Effect of low-level laser therapy on bone repair: a randomized controlled experimental study. *Lasers in Medical Science*, v. 30, n. 3, p. 1061–1068, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10103-015-1710-0>

9. ANEXOS

Anexo A – Certificado Comissão de Ética no Uso de Animais



Universidade Nove de Julho
Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Biomateriais de Carbono e Compósitos (carbono-óxido de grafeno-nanopartículas de prata-grafeno) em reparo ósseo", protocolada sob o CEUA nº 8675271021 (ID 000275), sob a responsabilidade de **Rodrigo Labat Marcos** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (CEUA/UNINOVE) na reunião de 08/12/2021.

We certify that the proposal "Carbon and Composite Biomaterials (carbon-graphene oxide-silver-graphene nanoparticles) in bone repair", utilizing 60 Heterogenics rats (60 males), protocol number CEUA 8675271021 (ID 000275), under the responsibility of **Rodrigo Labat Marcos** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Nove de Julho University (CEUA/UNINOVE) in the meeting of 12/08/2021.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 12/2021 a 12/2023 Área: Biofotônica Aplicada Às Ciências da Saúde

Origem: Biotério - Unidade Vergueiro

Espécie: Ratos heterogênicos

sexo: Machos

idade: 3 a 6 meses

Quantidade: 60

Linhagem: Wistar

Peso: 250 a 350 g

São Paulo, 20 de setembro de 2024


Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho


Profa. Dra. Stella Regina Zamuner
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho