



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

***LASER* DE BAIXA INTENSIDADE E *SCAFFOLD* DE
**BIOSILICATO[®]: EFEITOS ISOLADOS E DA
ASSOCIAÇÃO DAS DUAS MODALIDADES
TERAPÊUTICAS NO REPARO ÓSSEO****

KARINA NOGUEIRA ZAMBONE PINTO ROSSI

SÃO CARLOS – SP

2011

KARINA NOGUEIRA ZAMBONE PINTO ROSSI

***LASER DE BAIXA INTENSIDADE E SCAFFOLD DE
BIOSILICATO[®]: EFEITOS ISOLADOS E DA
ASSOCIAÇÃO DAS DUAS MODALIDADES
TERAPÊUTICAS NO REPARO ÓSSEO***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientadores: Prof^a.Dr. Ana Cláudia Muniz Rennó
Prof. Dr. Oscar Peitl Filho

SÃO CARLOS – SP

2011

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

R831Lb

Rossi, Karina Nogueira Zambone Pinto.

Laser de baixa intensidade e *scaffold* de Biosilicato® :
efeitos isolados e da associação das duas modalidades
terapêuticas no reparo ósseo / Karina Nogueira Zambone
Pinto Rossi. -- São Carlos : UFSCar, 2011.

142 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2011.

1. Biotecnologia. 2. Laser de baixa intensidade. 3. Tecido
ósseo. 4. Ossos - fratura. 5. Histologia. 6. Biomecânica. I.
Título.

CDD: 660.6 (20^a)

Karina Nogueira Zambone Pinto Rossi

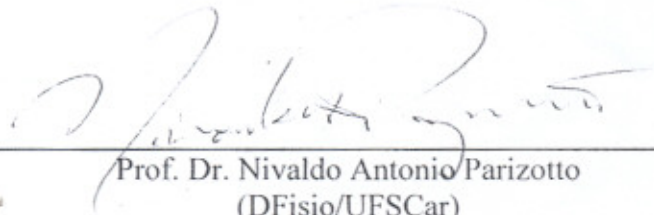
Tese de Doutorado submetida à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia, da
Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia

Aprovado em: 02/12/2011.

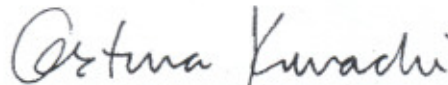
BANCA EXAMINADORA



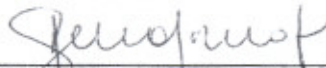
Prof. Dr. Oscar Peitl Filho (Orientador)
(UFSCar)



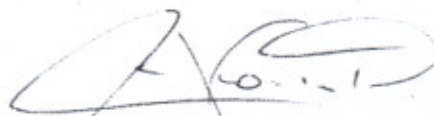
Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto
(DFisio/UFSCar)



Profª. Drª. Cristina Kurachi
(USP/IFSC)



Profª. Drª. Mariza Akemi Matsumoto
(Universidade do Sagrado Coração-Bauru)



Prof. Dr. Carlos Alberto Fortulan
(USP)

DEDICATÓRIA

A minha mãe, Marines, meu aconchego;

Ao meu pai, Wanderlei, minha segurança;

Ao meu irmão, Fernando, meu carinho;

Ao meu marido, Bruno, meu melhor amor.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Profª Drª Ana Cláudia Muniz Rennó, que antes de ser minha orientadora, é uma grande amiga. Minha maior incentivadora a seguir a área acadêmico-científica, desde a época em que éramos “apenas” amigas e, que, quis o destino, veio a se tornar minha orientadora de Doutorado. Obrigada pela amizade e confiança de sempre e muito obrigada pelos ensinamentos ao longo desses anos de convivência também profissional.

Serei sempre grata!

Ao Prof. Dr. Oscar Peitl Filho, que mesmo antes de formalizada sua orientação neste trabalho, sempre contribuiu com engajamento, desde o delineamento experimental até as fases finais deste trabalho. Muito obrigada por compartilhar com generosidade todo o seu conhecimento e auxiliar no meu crescimento profissional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me guiado, me dado força e serenidade para seguir adiante ao longo dessa jornada. Agradeço as dificuldades, pois com elas aprendi e agradeço sua luz no meu caminho, que orientou os meus passos.

A toda a minha família, que mesmo com a distância, sempre me nutriu de amor e carinho.

A todos os docentes que compuseram a banca examinadora desta tese e da sua qualificação, que, com suas contribuições científicas, permitiram meu crescimento profissional e acadêmico.

À chefia e membros do Conselho Departamental do Departamento de Morfologia e Patologia - CCBS/UFSCar, pelo afastamento parcial concedido e principalmente, pelo apoio durante este período.

A todos os colegas, docentes, técnicos e funcionários do Departamento de Morfologia e Patologia da UFSCar, pelo apoio e confiança, por acreditarem no meu trabalho, e por cada gesto e palavra de incentivo ao longo do desenvolvimento desta tese, muito obrigada!

Aos colegas do Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV) do Departamento de Engenharia de Materiais da UFSCar por disponibilizar o material utilizado neste estudo.

Ao doutorando Murilo Crovace do LaMav/DEMa pela manufatura dos *scaffolds* utilizados e por todas as prestações ao longo desse período de convivência.

A amiga, Carla Tim, pelo companheirismo durante o desenvolvimento deste trabalho e, principalmente, pela amizade cultivada.

As amigas Poliane e Elaine pelo auxílio durante o período experimental deste trabalho.

A amiga Kelly, pela ajuda durante o período experimental deste trabalho.

Ao aluno de graduação do curso de Fisioterapia da UFSCar, Vitor Oliani, pelo auxílio durante o período experimental deste trabalho.

Ao meu grande amor, amigo e companheiro, Bruno, além de todo o amor e suporte emocional durante esta etapa, agradeço pelo auxílio durante o desenvolvimento experimental e finalização deste trabalho.

A todos os amigos componentes do grupo “Rennó *et al.*” pela amizade e bons momentos compartilhados.

A grande amiga Renata, pelo enorme incentivo para que eu me envolvesse nesta área de pesquisa, pelo apoio ao longo do trabalho e todas as sugestões dadas.

A Prof^a Dr^a Keico Okino Nonaka por disponibilizar o equipamento para a realização do ensaio biomecânico dos estudos desta tese.

A Prof^a Dr^a Patrícia Driusso, pela ajuda durante a realização da análise estatística, além de sua amizade.

Ao Prof. Dr. Nivaldo Parizotto por disponibilizar o equipamento de irradiação *laser* utilizado neste trabalho, além de todo o auxílio prestado.

Ao Prof. Dr. Daniel Araki, pela ajuda durante as análises deste trabalho.

Aos amigos Luciana Sanada e Rodrigo Okubo, pela ajuda na finalização desta tese.

Aos funcionários do Biotério Central da UFSCar, Roberto e Rivair, pela atenção e ajuda.

À Cláudia, secretária do PPG-Biotec/UFSCar, pela presteza e auxílio em todos os momentos necessários.

A minha família de escolha, meu querido “clã” de amigos, muito obrigada a cada um de vocês, simplesmente por fazerem parte da minha vida, a tornarem muito mais feliz e completa.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo fomento concedido ao projeto que inclui esta tese.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

“O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem.”

(João Guimarães Rosa)

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da terapia *laser* de baixa intensidade (LLLT) (830nm, 120J/cm², 100mW) e do implante de *scaffolds* de Biosilicato[®], associados ou não, nos aspectos histológicos, propriedades biomecânicas do calo ósseo e na imun expressão de proteínas, fatores de crescimento e de transcrição relacionados a diferentes etapas do reparo ósseo, ao 15°, 30° e 45° dia após a cirurgia de defeitos ósseos induzidos em tíbias de ratos. Cento e vinte ratos machos da linhagem *Wistar* (3 meses de idade ± 280 gramas) foram submetidos a defeitos tibiais bilaterais e distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais com 30 animais cada. No primeiro estudo investigaram-se os efeitos do implante de *scaffolds* de Biosilicato[®] em defeitos ósseos de ratos, a partir de dois grupos experimentais: grupo defeito ósseo controle (GC) e grupo defeito ósseo tratado com *scaffold* de Biosilicato[®] (GB). O implante do *scaffold* foi realizado em seguida à cirurgia de defeito ósseo. A análise histológica revelou que os animais do GB apresentavam osso neoformado mais organizado ao 30° e 45° dia após a cirurgia. A imunistoquímica demonstrou que o *scaffold* de Biosilicato[®] promoveu maior expressão de COX-2 nos dias 15 e 30 de após a cirurgia, imun expressão positiva de RUNX-2 em todos os períodos, maior expressão de RANKL no 15° dia e imun expressão positiva de BMP-9 no 45° dia. Porém, o *scaffold* de Biosilicato[®] não aumentou as propriedades mecânicas do calo ósseo. Assim, o implante de *scaffold* de Biosilicato[®] foi eficaz em estimular o reparo de defeitos tibiais, porém, não foi capaz de melhorar suas propriedades mecânicas. No segundo estudo, foram avaliadas as mudanças temporais-espaciais no processo de reparo ósseo em defeitos tratados com LLLT, a partir de dois grupos experimentais: GC e grupo defeito ósseo tratado com *laser* (GL). O tratamento com *laser* iniciou-se imediatamente após a cirurgia dos defeitos ósseos e realizaram-se 8, 15 ou 23 sessões, com um intervalo de 48h entre elas. As análises histológica e morfométrica revelaram que o GL apresentou melhor organização tecidual aos 15° e 30° dias após a cirurgia, e maior área de osso neoformado no 15° dia. A imunistoquímica mostrou que a LLLT promoveu maior expressão de COX-2 no 15° dia, imun expressão positiva de RUNX-2 em todos os períodos avaliados, maior imun expressão de BMP-9 no 30° dia e maior imunorreatividade do RANKL no 15° dia. Porém, a LLLT não aumentou as propriedades biomecânicas do calo ósseo. Assim, a LLLT melhorou o processo de consolidação óssea, mas não foi capaz de melhorar suas propriedades biomecânicas. O terceiro estudo investigou os efeitos da associação da LLLT com implantes de *scaffolds* de Biosilicato[®] na consolidação óssea, a partir de três grupos experimentais: GC, GB e grupo *scaffold* de Biosilicato[®] irradiado com *laser* (GBL). O implante do *scaffold* foi realizado em seguida à cirurgia de defeito ósseo. O tratamento com *laser* iniciou-se imediatamente após a cirurgia e foram realizadas 8, 15 ou 23 sessões, com um intervalo de 48h entre elas. Ao 15° dia pós-lesão a análise histológica revelou tecido de granulação e osso neoformado justapostos à superfície dos *scaffolds* no GB e GBL. Trinta dias após a lesão, o GB e GBL apresentavam osso neoformado mais organizado em comparação ao GC. Ao 45° dia, foi possível observar tecido de granulação nos defeitos do GBL. No GB, o pico de imun expressão da COX-2 ocorreu no 15° dia e no GBL, no 30° dia. Os GB e GBL apresentaram imun expressão positiva da BMP-9 até o 45° dia após a cirurgia, enquanto que para o RANKL, a imun expressão foi maior no GBL no 30° dia. No entanto, 30 e 45 dias após a lesão, os animais dos GB e GBL apresentaram valores estatisticamente menores de carga máxima em comparação ao GC. Assim, a associação do *scaffold* de Biosilicato[®] com o *laser* exerce atividade osteogênica durante o reparo ósseo, no entanto, o *scaffold* de Biosilicato[®] associado ou não a irradiação *laser* não é eficaz em melhorar as propriedades mecânicas do calo ósseo. Finalmente, podemos concluir que a LLLT e o implante de *scaffolds* de Biosilicato[®], associados ou não, foram eficazes em estimular a consolidação óssea, melhorando o desenvolvimento de osso neoformado e ativando a imun expressão de proteínas, fatores de crescimento e de transcrição relacionados a diferentes etapas do reparo ósseo em defeitos tibiais em ratos. No entanto, estas modalidades terapêuticas, associadas ou não, não foram capazes de melhorar as propriedades mecânicas do calo ósseo em ensaio de flexão na posição de tração.

Palavras-chave: reparo ósseo, Biosilicato[®], *scaffold* de biomaterial, terapia *laser* de baixa intensidade, estudo *in vivo*.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effects of low intensity laser therapy (LLLT) (830nm, 120J/cm², 100mW) and implantation of Biosilicate[®] scaffolds, associated or not, in histological aspects, biomechanical properties of the bone callus and immunoexpression of proteins, growth and transcription factors related to different stages of bone repair, at 15, 30 and 45 days after surgery of bone defects induced in the tibia of rats. For this, three studies were performed in which a total of one hundred and twenty male Wistar rats (3 months ± 280 g) were submitted to bilateral tibial defects and randomly distributed in four experimental groups with 30 animals each. In the first study the effects of the implantation of Biosilicate[®] scaffolds in bone defects of rats were investigated in two groups: bone defect group (GC) and bone defect treated with Biosilicate[®] scaffold group (GB). The implantation of the scaffold was performed subsequent to surgery of bone defect. Histological analysis revealed that animals of GB showed newly formed bone better organized at 30 and 45 days after surgery. The immunohistochemical analysis demonstrated that the Biosilicate[®] scaffold promoted a higher expression of COX-2 on days 15 and 30 after surgery, immunostaining positive of RUNX-2 in all periods, increased expression of RANKL on day 15 and positive immunoexpression of BMP-9 on the 45th day. However, the Biosilicate[®] scaffold did not increase the mechanical properties of bone callus. Thus, the implantation of Biosilicate[®] scaffold was effective in stimulating the repair of tibial defects, however, was not able to improve their mechanical properties. In the second study, the spatial-temporal changes in the process of bone healing in defects treated with LLLT were evaluated in two groups: GC and bone defect treated with laser group (GL). The laser treatment started immediately following the surgery of bone defects and have been 8, 15 or 23 sessions with an interval of 48 hours between them. The histological and morphometric analysis revealed that the GL showed better tissue organization at 15 and 30 days after surgery, and biggest area of newly formed bone at day 15. The immunohistochemistry showed that the LLLT promoted higher expression of COX-2 at day 15, immunostaining of RUNX-2 positive in all periods, higher immunoexpression of BMP-9 on day 30 and higher immunoreactivity of RANKL at day 15. However, the LLLT did not increase the biomechanical properties of bone callus. Thus, the LLLT improved the process of bone healing, but was unable to improve its biomechanical properties. In the third study the effects of the association of LLLT with implants of Biosilicate[®] scaffolds in bone healing were investigated in three experimental groups: GC, GB and Biosilicate[®] scaffold irradiated with laser group (GBL). The implantation of the scaffold was performed following the surgery of bone defect. The laser treatment started immediately after surgery and were performed 8, 15 or 23 sessions with an interval of 48 hours between them. At 15 days after surgery, the histological analysis revealed granulation tissue and newly formed bone juxtaposed to the surface of scaffolds in GB and GBL. Thirty days after injury, the GB and GBL had better organized newly formed bone compared to the CG. At day 45 was possible to observe granulation tissue in the defects of the GBL. In the GB, the peak of immunoexpression of COX-2 occurred on the 15th day and in the GBL, on the 30th day. The GB and GBL showed positive immunoexpression of BMP-9 up to 45th day after surgery, while RANKL immunoexpression was higher in the GBL at day 30. However, 30 and 45 days after injury, the animals of GB and GBL showed statistically lower values of maximum load compared to the CG. Thus, the association of the scaffold Biosilicate[®] with laser irradiation has osteogenic activity during the bone repair, however, the scaffold Biosilicate[®] associated or not with the laser irradiation is not effective to improve mechanical properties of the bone callus. Finally, we concluded that LLLT ($\lambda = 830 \text{ nm}$, 120J/cm²) and implantation of Biosilicate[®] scaffolds, associated or not, were effective to stimulate the bone consolidation by improving the development of newly formed bone and activating immunoexpression of proteins, growth and transcription factors related to different stages of bone healing in tibial defects in rats. However, these therapeutic modalities associated or not, were unable to improve mechanical properties of the bone callus.

Key words: bone repair, Biosilicate[®], biomaterial scaffold, low level laser therapy, *in vivo* study.

LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS

ABNT	= Associação Brasileira de Normas Técnicas
Al ₂ O ₃	= Alumina
ALP	= Fosfatase Alcalina
ANOVA	= Teste de Análise da Variância
As-Ga-Al	= Arseneto de Gálio Alumínio
ATP	= Adenosina Trifosfato
BMP-2	= Proteína Morfogenética Óssea-2
BMP-4	= Proteína Morfogenética Óssea-4
BMP-9	= Proteína Morfogenética Óssea-9
BMPs	= Proteínas Morfogenéticas Ósseas
b-TCP	= B-Tricálcio Fosfato
C1	= Campo 1
C2	= Campo 2
C3	= Campo 3
CaO	= Óxido de Cálcio
cm	= Centímetro
cm/min	= Centímetro por Minuto
cm ²	= Centímetro Quadrado
COX-2	= Ciclo Oxigenase-2
D _{ap}	= Densidade Aparente
DEMa	= Departamento de Engenharia de Materiais
DFisio	= Departamento de Fisioterapia
DNA	= Ácido Desoxirribonucleico
DP	= Desvio-Padrão
EDTA	= Ácido Etilenodiaminotetracético
g	= Grama
GB	= Grupo <i>scaffold</i> de Biosilicato [®]
GBL	= Grupo <i>scaffold</i> de Biosilicato [®] irradiado com <i>laser</i>
GC	= Grupo Controle
GL	= Grupo Laser
h	= Hora
HCA	= Hidroxicarbonatoapatita
HE	= Hematoxilina e Eosina
He-Ne	= Hélio Neônio
IFSC	= Instituto de Física de São Carlos
IGF-I	= Fator de Crescimento do Tipo Insulina 1

IgG	= Imunoglobulina G
J	= Joule
J/cm ²	= Joule por Centímetro Quadrado
Kg	= Quilograma
KN	= Quilo Newton
LaMaV	= Laboratório de Materiais Vítreos
<i>laser</i>	= Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação
LCE	= Laboratório de Caracterização Estrutural
LIPUS	= Ultrassom Pulsado de Baixa Intensidade
LLLT	= Terapia <i>Laser</i> de Baixa Intensidade
M	= Mol
mg	= Miligrama
mg/kg	= Miligrama por Quilograma de Massa Corporal
MHz	= Mega Hertz
mm	= Milímetro
mRNA	= Ácido Ribonucléico Mensageiro
mW	= MiliWatts
mW/cm ²	= MiliWatts por Centímetro Quadrado
N	= Newton
Na ₂ O	= Óxido de Sódio
nm	= Nanômetro
°C	= Graus Celsius
OPG	= Osteoprotegerina
P ₂ O ₅	= Pentóxido Difósforo
P _{ap}	= Porosidade Aparente
PBS	= Solução de Tampão Fosfato
pH	= Potencial Hidrogeniônico
PVB	= Polvinil Butiral
RANK	= <i>Receptor Activator of Nuclear Factor K-B</i>
RANKL	= <i>Receptor Activator of Nuclear Factor K-B Ligand</i>
RNA	= Ácido Ribonucléico
rpm	= Rotação por Minuto
RUNX-2	= <i>Runt Related Transcription Factor-2</i>
s	= Segundo
SiO ₂	= Sílica
SiO ₂ -Na ₂ O-CaO-P ₂ O ₅	= Composto do Biosilicato®
TGF	= <i>Transforming Growth Factor</i>
TM	= Tricrômico de Masson

TNF	= Fator de Necrose Tumoral
T_p	= Porosidade Total
TRAP	= <i>Tartrate-Resistant Acid Phosphatase</i>
UFSCar	= Universidade Federal de São Carlos
UNIFESP	= Universidade Federal de São Paulo
USP	= Universidade de São Paulo
vol.	= Volume
W	= Watts
W/cm ²	= Watts por Centímetro Quadrado
ZAS	= Zircônia-Alumina-Sílica
ZrO ₂	= Zircônia
α -TCP	= Alfa-Fosfato Tricálcico
λ	= Comprimento de Onda
μm	= Micrômetro
μm^2	= Micrômetro Quadrado
%	= Porcentagem
<	= Menor
>	= Maior
\leq	= Menor ou Igual
®	= Marca Registrada
°C/min	= Graus Celsius por minuto

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Procedimento cirúrgico experimental. A: Tricotomia da região a ser operada. B: Incisão da pele no terço médio tibial. C: Defeito ósseo realizado com broca tipo trefina de 3mm de diâmetro. D: Defeito ósseo. E: Implante de *scaffold* de Biosilicato[®] no defeito ósseo. F: Sutura da área operada.35
- Figura 2.** Aparelho portátil emissor de radiação *laser* Thera lase[®] (DMC São Carlos,SP, Brasil), versão 24, classe 3B, As-Ga-Al diodo.40
- Figura 3.** Morfometria da área de osso neoformado: A: Desenho ilustrativo da padronização dos campos selecionados na análise morfométrica. B: Fotomicrografia representativa do campo 3 (C3) de um defeito ósseo do grupo controle 15 dias. A cor azul indica a área de tecido ósseo neoformado. Coloração: TM. (Aumento: 100X).43
- Figura 4.** Análise Biomecânica: A: Máquina de ensaio universal Instron, modelo 4444. B: Posicionamento da tíbia durante o teste de flexão, com defeito ósseo posicionado para baixo, na linha de ação da carga a ser aplicada.46
- Figura 5.** Imagens obtidas via lupa dos *scaffolds* de Biosilicato[®].57
- Figura 6.** Imagens obtidas via microscopia eletrônica de varredura dos *scaffolds* embutidos em resina epóxi. (A: Barra = 1mm; B: Barra = 200µm; C: Barra = 200µm; D: Barra = 100µm; E: Barra = 50 µm; F: Barra = 5µm).....59
- Figura 7.** Osso intacto (#), osso neoformado (*), partículas de biomaterial (seta). A: grupo controle 15 dias, B: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] 15 dias, C: grupo controle 30 dias, D: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] 30 dias, E: grupo controle 45 dias, F: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] 45 dias. (Coloração: HE. Barra = 200µm).62
- Figura 8.** Imunoexpressão de COX-2 (seta), partículas de biomaterial (*), tecido medular (M). A: grupo controle 15 dias, B: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] 15 dias, C: grupo controle 30 dias, D: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] 30 dias, E: grupo controle 45 dias, F: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] 45 dias. (Aumento: 500X).....64
- Figura 9.** Imunoexpressão de RUNX-2 (seta), partículas de biomaterial (*), tecido medular (M). A: grupo controle 15 dias, B: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] 15 dias, C: grupo controle 30 dias,

D: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] 30 dias, E: grupo controle 45 dias, F: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] 45 dias. (Aumento: 500X).....65

Figura 10. Imunoexpressão de RANKL (seta), partículas de biomaterial (*), tecido medular (M). A: grupo controle 15 dias, B: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] 15 dias, C: grupo controle 30 dias, D: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] 30 dias, E: grupo controle 45 dias, F: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] 45 dias. (Aumento: 500X).....66

Figura 11. Imunoexpressão de BMP-9 (seta), partículas de biomaterial (*), tecido medular (M). A: grupo controle 15 dias, B: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] 15 dias, C: grupo controle 30 dias, D: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] 30 dias, E: grupo controle 45 dias, F: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] 45 dias. (Aumento: 500X).....67

Figura 12. Médias e DP da carga máxima. * Controle *versus scaffold* de Biosilicato[®] aos 30 dias pós-cirurgia; ** controle *versus scaffold* de Biosilicato[®] aos 45 dias pós-cirurgia; grupo controle: a 15 dias *versus* 30 e 45 dias; b 30 dias *versus* 45 dias.....68

Figura 13. Médias e DP de resiliência.69

Figura 14. Osso intacto (#), osso neoformado (*). A: grupo controle 15 dias, B: grupo *laser* 15 dias, C: grupo controle 30 dias, D: grupo *laser* 30 dias, E: grupo controle 45 dias, F: grupo *laser* 45 dias. (Coloração: HE. Barra = 200µm).....85

Figura 15. Médias e DP da área de osso neoformado (µm²). * Grupo *laser versus* grupo controle, 15 dias pós-cirurgia. Grupo controle: a 15 dias *versus* 30 e 45 dias; ** 30 dias *versus* 45 dias. Grupos *laser*: b 15 dias *versus* 30 e 45 dias; # 30 dias *versus* 45 dias.86

Figura 16. Imunoexpressão de COX-2 (seta), tecido medular (M). A: grupo controle 15 dias, B: grupo *laser* 15 dias, C: grupo controle 30 dias, D: grupo *laser* 30 dias, E: grupo controle 45 dias, F: grupo *laser* 45 dias. (Aumento: 500X).88

Figura 17. Imunoexpressão de RUNX-2 (seta), tecido medular (M). A: grupo controle 15 dias, B: grupo *laser* 15 dias, C: grupo controle 30 dias, D: grupo *laser* 30 dias, E: grupo controle 45 dias, F: grupo *laser* 45 dias. (Aumento: 500X).89

Figura 18. Imunoexpressão de BMP-9 (seta), tecido medular (M). A: grupo controle 15 dias, B: grupo *laser* 15 dias, C: grupo controle 30 dias, D: grupo *laser* 30 dias, E: grupo controle 45 dias, F: grupo *laser* 45 dias. (Aumento: 500X).91

Figura 19. Imunoexpressão de RANKL (seta), tecido medular (M). A: grupo controle 15 dias, B: grupo <i>laser</i> 15 dias, C: grupo controle 30 dias, D: grupo <i>laser</i> 30 dias, E: grupo controle 45 dias, F: grupo <i>laser</i> 45 dias. (Aumento: 500X).	92
Figura 20. Osso intacto (#), osso neoformado (*), partículas de biomaterial (seta). A: grupo controle 15 dias, B: grupo <i>scaffold</i> de Biosilicato [®] 15 dias, C: grupo <i>scaffold</i> de Biosilicato [®] + <i>laser</i> 15 dias, D: grupo controle 30 dias, E: grupo <i>scaffold</i> de Biosilicato [®] 30 dias, F: grupo <i>scaffold</i> de Biosilicato [®] + <i>laser</i> 30 dias, G: grupo controle 45 dias, H: grupo <i>scaffold</i> de Biosilicato [®] 45 dias, I: grupo <i>scaffold</i> de Biosilicato [®] + <i>laser</i> 45 dias (Coloração: HE. Barra = 200µm).	111
Figura 21. Imunoexpressão de COX-2 (seta), partículas de biomaterial (*), tecido medular (M). A: grupo controle 15 dias, B: grupo <i>scaffold</i> de Biosilicato [®] 15 dias, C: grupo <i>scaffold</i> de Biosilicato [®] + <i>laser</i> 15 dias, D: grupo controle 30 dias, E: grupo <i>scaffold</i> de Biosilicato [®] 30 dias, F: grupo <i>scaffold</i> de Biosilicato [®] + <i>laser</i> 30 dias, G: grupo controle 45 dias, H: grupo <i>scaffold</i> de Biosilicato [®] 45 dias, I: grupo <i>scaffold</i> de Biosilicato [®] + <i>laser</i> 45 dias (Aumento: 500X).	113
Figura 22. Imunoexpressão de RANKL (seta), partículas de biomaterial (*), tecido medular (M). A: grupo controle 15 dias, B: grupo <i>scaffold</i> de Biosilicato [®] 15 dias, C: grupo <i>scaffold</i> de Biosilicato [®] + <i>laser</i> 15 dias, D: grupo controle 30 dias, E: grupo <i>scaffold</i> de Biosilicato [®] 30 dias, F: grupo <i>scaffold</i> de Biosilicato [®] + <i>laser</i> 30 dias, G: grupo controle 45 dias, H: grupo <i>scaffold</i> de Biosilicato [®] 45 dias, I: grupo <i>scaffold</i> de Biosilicato [®] + <i>laser</i> 45 dias (Aumento: 500X).	115
Figura 23. Imunoexpressão de BMP-9 (seta), partículas de biomaterial (*), tecido medular (M). A: grupo controle 15 dias, B: grupo <i>scaffold</i> de Biosilicato [®] 15 dias, C: grupo <i>scaffold</i> de Biosilicato [®] + <i>laser</i> 15 dias, D: grupo controle 30 dias, E: grupo <i>scaffold</i> de Biosilicato [®] 30 dias, F: grupo <i>scaffold</i> de Biosilicato [®] + <i>laser</i> 30 dias, G: grupo controle 45 dias, H: grupo <i>scaffold</i> de Biosilicato [®] 45 dias, I: grupo <i>scaffold</i> de Biosilicato [®] + <i>laser</i> 45 dias (Aumento: 500X).	117
Figura 24. Médias e DP de Carga Máxima (KN). a grupo <i>scaffold</i> de Biosilicato [®] versus grupo controle 30 dias; * grupo <i>scaffold</i> de Biosilicato [®] + <i>laser</i> versus grupo controle 30 dias; **	

grupo <i>scaffold</i> de Biosilicato® <i>versus</i> grupo controle 45 dias; # grupo <i>scaffold</i> de Biosilicato® + <i>laser versus</i> grupo controle 45 dias.....	118
Figura 25. Médias e DP de Resiliência (J).....	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Densidade aparente (D_{ap}), porosidade aparente (P_{ap}), porosidade total (T_p) e macroporosidade dos <i>scaffolds</i>	60
Tabela 2. Propriedades Biomecânicas dos grupos controle e laser.....	92

APRESENTAÇÃO DA TESE

Esta tese de doutorado foi elaborada na forma de três estudos e redigida em três partes, escritas de acordo com as normas metodológicas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

A primeira parte consiste em Contextualização, Objetivo e Materiais e Métodos, com detalhamento da metodologia utilizada.

Na segunda parte são apresentados três estudos fundamentados na primeira parte exposta acima. O primeiro trabalho avaliou o implante do *scaffold* de Biosilicato[®] em tíbias de ratos saudáveis e suas interações com o tecido ósseo e intitula-se “Respostas *in vivo* após implante de *scaffolds* derivados de uma vitrocerâmica altamente bioativa (Biosilicato[®])”. O segundo estudo teve como objetivo esclarecer alguns mecanismos de ação do *laser* no reparo ósseo, a partir do potencial de consolidação tecidual já conhecido deste recurso terapêutico no osso e é intitulado “Terapia *laser* de baixa intensidade induz a expressão de diferentes fatores osteogênicos durante o reparo ósseo em ratos”. O terceiro trabalho teve como objetivo testar a hipótese de incrementar o potencial osteogênico do *scaffold* de Biosilicato[®] com a associação da terapia *laser* de baixa intensidade e recebeu o título “*Scaffolds* de Biosilicato[®] e terapia *laser* de baixa intensidade: um estudo histológico, imunohistoquímico e biomecânico de defeitos tíbiais em ratos”.

A terceira parte consiste em Conclusão, Considerações Finais e Perspectivas Futuras, Referências Bibliográficas e Anexos.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

APRESENTAÇÃO DA TESE

PARTE I.....	23
1. CONTEXTUALIZAÇÃO.....	24
2. OBJETIVO	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1. Animais de Experimentação.....	33
3.2. Procedimento Cirúrgico	33
3.3. Delineamento Experimental	35
3.4. Caracterização dos <i>Scaffolds</i> de Biosilicato®	36
3.5. Síntese dos <i>Scaffolds</i> de Biosilicato®	37
3.6. Tratamento	38
3.6.1. Implantação dos <i>Scaffolds</i> de Biosilicato®	38
3.6.2. Aplicação do Laser Terapêutico de Baixa Intensidade	38
3.7. Eutanásia dos Animais.....	40
3.8. Coleta e Preparação das Amostras.....	40
3.9. Análises.....	41
3.9.1. Análise Histológica Qualitativa	41
3.9.2. Análise Morfométrica	42
3.9.3. Análise Imunohistoquímica.....	43
3.9.4. Análise Biomecânica.....	45
3.9.5. Análise Estatística dos Dados	46

PARTE II	47
4. ESTUDO 1.....	48
4.1. RESUMO.....	48
4.2. INTRODUÇÃO.....	48
4.3. MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.3.1. Delineamento Experimental	51
4.3.2. <i>Scaffold</i> de Biosilicato®	51
4.3.3. Preparação dos <i>scaffolds</i> de Biosilicato®	51
4.3.4. Procedimento Cirúrgico	53
4.3.5. Análise Histológica	54
4.3.6. Análise Imunohistoquímica	54
4.3.7. Análise Biomecânica.....	55
4.3.8. Análise Estatística.....	56
4.4. RESULTADOS	56
4.4.1. Achados Gerais.....	56
4.4.2. Caracterização dos <i>scaffolds</i>	57
4.4.3. Análise Histológica.....	61
4.4.4. Análise Imunohistoquímica.....	63
4.4.5. Análise Biomecânica.....	67
4.5. DISCUSSÃO.....	69
4.6. CONCLUSÃO	74
5. ESTUDO 2.....	75
5.1. RESUMO.....	75
5.2. INTRODUÇÃO.....	75
5.3. MATERIAIS E MÉTODOS	78
5.3.1. Animais Experimentais	79
5.3.2. Procedimento Cirúrgico	79
5.3.3. Tratamento.....	80
5.3.4. Análise Histológica	80

5.3.5.	Análise Morfométrica	81
5.3.6.	Análise Biomecânica.....	81
5.3.7.	Análise Imunohistoquímica.....	82
5.3.8.	Análise Estatística.....	83
5.4.	RESULTADOS	83
5.4.1.	Achados Gerais.....	84
5.4.2.	Análise Histológica.....	84
5.4.3.	Análise Morfométrica	86
5.4.4.	Análise Imunohistoquímica.....	86
5.4.5.	Análise Biomecânica.....	92
5.5.	DISCUSSÃO.....	93
5.6.	CONCLUSÃO	99
6.	ESTUDO 3.....	100
6.1.	RESUMO.....	100
6.2.	INTRODUÇÃO.....	101
6.3.	MATERIAIS E MÉTODOS	103
6.3.1.	<i>Scaffold</i> de Biosilicato®	104
6.3.2.	Preparação dos <i>scaffolds</i> de Biosilicato®	104
6.3.3.	Terapia <i>Laser</i> de Baixa Intensidade.....	105
6.3.4.	Análise Histológica.....	106
6.3.5.	Análise Imunohistoquímica.....	106
6.3.6.	Análise Biomecânica.....	108
6.3.7.	Análise Estatística.....	108
6.4.	RESULTADOS	109
6.4.1.	Achados Gerais.....	109
6.4.2.	Análise Histológica.....	109
6.4.3.	Análise Imunohistoquímica.....	112
6.4.4.	Análise Biomecânica.....	118
6.5.	DISCUSSÃO.....	119

6.6. CONCLUSÃO	125
PARTE III	126
7. CONCLUSÃO	127
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	128
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129
ANEXO A	140
ANEXO B	141
ANEXO C	142

PARTE I

- 1. CONTEXTUALIZAÇÃO**
- 2. OBJETIVO**
- 3. MATERIAIS E MÉTODOS**

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

Fraturas são definidas como uma interrupção na continuidade do osso, podendo ser provocadas por traumatismos ou por natureza patológica (RUBIN *et al.*, 2006; BRASILEIRO FILHO, 2006). Relacionam-se a altos índices de morbidade e mortalidade e ocorrem com maior incidência nos homens jovens e mulheres de meia-idade e idosas, devido, respectivamente, ao estilo de vida dos jovens e ao desenvolvimento da osteoporose em mulheres (POLINDER *et al.*, 2005; COURT-BROWN; CAESAR, 2006).

Estima-se que ocorram nos Estados Unidos, cerca de 7,9 milhões de fraturas ao ano, e que em torno de 5 a 10% destas evoluam para problemas na reparação óssea, como a não consolidação e a pseudoartrose (CLAES; WILLIE, 2007). Além disso, cerca de 100 mil cirurgias precisam ser realizadas para a colocação de implantes ósseos, devido a problemas no processo de reparo ósseo (POLINDER *et al.*, 2005).

O reparo ósseo é um intrincado processo reparativo, que envolve a interação de diversos eventos biológicos, com a ação de um grande número de células, a síntese ativa de genes e a expressão de várias proteínas e fatores de transcrição e crescimento, garantindo a restauração da integridade do tecido (SENA *et al.*, 2005; CLAES; WILLIE, 2007; KAYAL *et al.*, 2009). Entre as diversas proteínas e fatores de transcrição e crescimento envolvidos nas várias etapas que compõem o reparo ósseo, podem ser destacados algumas que colaboram em diferentes fases da consolidação da fratura, como a enzima ciclo oxigenase-2 (COX-2) (ZHANG *et al.*, 2002), o fator de transcrição RUNX-2 (*runt related transcription factor-2*) e a proteína morfogenética-9 (BMP-9), que estão relacionados com a diferenciação e ativação dos osteoblastos (KANG *et al.*, 2004; RATH *et al.*, 2008), e o RANKL (*receptor activator of nuclear*

factor κ - β ligand), essencial no processo de diferenciação e ativação das células osteoclásticas (KEARNS; KHOSLA; KOSTENUIK, 2008; ANANDARAJAH, 2009).

Apesar de o reparo ósseo envolver um grande número de ações celulares e moleculares para resultar em um processo normal de regeneração, podem surgir alterações no transcorrer desse processo que, por conseguinte, resultam no atraso da consolidação ou na não união óssea (SENA *et al.*, 2005).

Perante o exposto, vários recursos vêm sendo desenvolvidos na tentativa de aperfeiçoar a qualidade e o tempo do reparo de fraturas ósseas, com o intuito de diminuir a possibilidade do desenvolvimento de eventuais complicações oriundas do processo anormal de reparação tecidual (HADJIARGYROU *et al.*, 1998). Dentre estes, alguns exemplos se destacam pelos resultados positivos como auxiliares da consolidação óssea, como é o caso dos enxertos ósseos autógenos e alógenos (GHÉHENNEC; LAYROLLE; DACULSI, 2004; GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005; CARSON; BOSTROM, 2007) uso do ultrassom pulsado de baixa intensidade (LIPUS) (MALIZOS *et al.*, 2006; RUTTEN *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2011), de campos eletromagnéticos (PICKERING; SCAMMELL, 2002) e das aplicações exógenas de fatores de crescimento (YAOITA *et al.*, 2000).

Além destes, destacam-se atualmente as propriedades osteogênicas da terapia *laser* de baixa intensidade (LLLT) (PRETEL; LIZARELLI; RAMALHO, 2007; RENNO *et al.*, 2007; BLAYA *et al.*, 2008; ABOELSAAD *et al.*, 2009; FÁVARO-PIPI *et al.*, 2010) e dos materiais bioativos (HENCH; POLAK, 2002; GRANITO *et al.*, 2009; BOSSINI *et al.*, 2011).

O uso da LLLT para fins terapêuticos é pesquisado desde cerca de 40 anos atrás, com estudos nos mais variados tecidos (KITCHEN; BAZIN, 2003). Entre os principais efeitos teciduais da LLLT estão seus efeitos modulador da resposta inflamatória,

cicatrizantes e analgésicos (KARU, 1998; VLADIMIROV; OSIPOV; KLEBANOV, 2004).

Devido aos diversos efeitos biomodulatórios apresentados pela LLLT em diferentes tecidos, pesquisadores de todo o mundo têm realizado estudos das propriedades fotoquímicas e fotobiológicas da LLLT no reparo ósseo, que comprovam os efeitos positivos tanto em pesquisas *in vitro*, na diferenciação e proliferação de células ósseas, quanto *in vivo*, na diminuição do tempo e na qualidade da consolidação de fraturas em animais (DA SILVA; CAMILLI, 2006; RENNO *et al.*, 2007; MATSUMOTO *et al.*, 2009; FÁVARO-PIPI *et al.*, 2011).

Em culturas de células osteoblásticas, a LLLT apresentou resultados positivos na proliferação e diferenciação celular através do aumento da expressão dos genes RUNX-2 e BMP-2 (As-Ga-Al, 808nm, 800mW, 4J/cm²) (BOUVET-GERBETTAZ *et al.*, 2009), aumento significativo da expressão do gene osteoglicina (As-Ga-Al, 830nm, 500mW, 7.64J/cm²) (HAMAJIMA *et al.*, 2003) e aumento significativo da atividade da proteína fosfatase alcalina (ALP) e da expressão do mRNA da osteopontina (670nm, 400mW, 1J/cm²) (STEIN *et al.*, 2008). Além disso, em recente estudo do nosso grupo de pesquisa, Rennó *et al.* (2007), avaliaram os efeitos da terapia *laser* em culturas de osteoblastos e demonstraram que o *laser* com comprimento de onda de 830nm (30mW, 10J/cm²) aumentou significativamente a proliferação dos osteoblastos e a atividade da ALP destas células.

Resultados positivos também têm sido descritos em estudos investigando os efeitos da LLLT no reparo ósseo em modelos animais. Tais resultados incluem aumento da angiogênese local, maior formação de tecido de granulação e maior formação óssea (As-Ga-Al, 830nm, 75mW, 23J/cm²) (KHADRA *et al.*, 2004). Além disso, Liu *et al.* (2007) (830nm, 200mW, 40J/cm²) observaram que o *laser* acelera o processo de reparo

da fratura e aumenta o volume do calo e densidade mineral óssea, especialmente em estágios iniciais de absorção do hematoma e remodelamento ósseo. Achados corroborados por Shakouri *et al.* (2009) que também observaram influência positiva do *laser* (As-Ga-Al, 780nm, 4J/cm²) no desenvolvimento do calo ósseo em estágios iniciais do processo de consolidação. Por fim, Blaya *et al.* (2008) compararam os efeitos do *laser* infravermelho (As-Ga-Al, 830nm, 50 mW, 10J/cm²) e do *laser* vermelho (685nm, 35mW, 10J/cm²) na reparação óssea e seus resultados indicaram que os dois *lasers* empregados foram eficazes na aceleração do reparo ósseo.

Estudos desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa também têm destacado os efeitos positivos da LLLT na reparação de fraturas ósseas em modelos animais. Marino (2003) comparou duas fluências (5J/cm² e 50J/cm²) do *laser* de baixa intensidade (As-Ga-Al, 830nm, 60mW) e concluiu que a LLLT favoreceu o processo de reparação óssea durante os estágios iniciais e que, particularmente a maior fluência promoveu aumento da força mecânica do calo ósseo. Da mesma maneira, Oliveira (2009) comparou as fluências 60J/cm² e 120J/cm² do *laser* de baixa intensidade (As-Ga-Al, 830nm, 100mW) e concluiu que o *laser* foi eficaz no processo de reparo ósseo nas duas fluências analisadas. Fávaro-Pipi *et al.* (2010) compararam a ação da LLLT (As-Ga-Al, 830nm, 30mW, 50J/cm²) e do LIPUS (1,5MHz, 30mW/cm²) e demonstraram que os animais tratados com LLLT apresentaram aumento da expressão do mRNA da ALP e maior área de tecido ósseo neoformado em comparação aos tratados com LIPUS.

Apesar dos resultados positivos da LLLT na aceleração da consolidação óssea, as modificações moleculares e metabólicas resultantes do estímulo do metabolismo ósseo pela irradiação *laser* ainda não foram completamente elucidadas.

Outra tecnologia alvo de pesquisas devido as suas propriedades osteogênicas são os materiais bioativos. Define-se material bioativo aquele capaz de produzir uma

resposta biológica específica e uma ligação interfacial entre o material e o tecido, sem ser tóxico ou promover respostas imunológicas (HENCH, 1991; HENCH, 1998; HENCH; POLAK, 2002). Os vidros bioativos constituem os materiais bioativos mais eficazes já pesquisados, ou seja, aqueles que formam ligações mais pronunciadas com os tecidos vivos (CAO; HENCH, 1996).

A ligação ao osso foi demonstrada pela primeira vez por Hench e colaboradores em 1971, para uma faixa de composição de vidros bioativos que continham SiO_2 , Na_2O , CaO e P_2O_5 em proporções específicas, contendo menos do que 60mol% de SiO_2 , grande quantidade de Na_2O e CaO e alta razão $\text{CaO}/\text{P}_2\text{O}_5$ (HENCH, 1991). Estas características tornam a superfície do vidro altamente reativa quando exposta aos fluidos corporais, resultando na formação de uma camada de hidroxicarbonatoapatita (HCA) na sua superfície, que equivale química e estruturalmente à fase mineral dos ossos e que liga quimicamente o implante ao tecido. (HENCH, 1991; HENCH, 1998; ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2006). No entanto, as características microestruturais inerentes aos materiais vítreos que favorecem sua bioatividade também determinam suas baixas propriedades mecânicas, o que tem limitado suas aplicações clínicas (JAMES, 1995; HENCH, 1996; VALLET-REGI, 2001).

Atentos a isto, os pesquisadores Hench, da *University of Florida*, Zanotto e Peitl, do Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), desenvolveram uma série de tratamentos térmicos especiais para obter uma nova vitrocerâmica completamente cristalizada a partir do sistema quaternário SiO_2 - Na_2O - CaO - P_2O_5 , conservando, porém, o elevado nível de bioatividade dos vidros bioativos e ao mesmo tempo apresentando melhores propriedades mecânicas decorrentes da cristalização (PEITL, 2005). Esta vitrocerâmica foi denominada Biosilicato[®] (patente WO 2004/074199) (ZANOTTO *et al.*, 2004).

Além das melhores propriedades mecânicas resultantes da cristalização, a composição química do Biosilicato[®] também promove a dissolução de seus componentes e formação da camada de HCA na superfície do biomaterial quando em contato com fluidos corporais ou tecidos biológicos. Dentro deste contexto, surgiu a hipótese de que o Biosilicato[®] possuiria um potencial remineralizador, sendo capaz de estimular a diferenciação e proliferação de osteoblastos, bem como acelerar o processo de consolidação de fraturas (RAVAGNANI, 2003).

Tal potencial foi comprovado em um estudo *in vitro* por Moura *et al.* (2007) no qual o Biosilicato[®] foi mais eficaz do que o *Bioglass* 45S5[®], considerado atualmente o material com maior índice de bioatividade (HENCH, 2003), na proliferação de células osteoblásticas, assim como na síntese de proteínas relacionadas à deposição de matriz óssea e maturação celular.

Estes achados estimularam nosso grupo de pesquisa a investigar os até então desconhecidos efeitos osteogênicos *in vivo* desta vitrocerâmica. Um estudo pioneiro do nosso grupo comparou os efeitos do implante de Biosilicato[®] particulado (granulometrias de 180-210 μ m e de 300-355 μ m) e de partículas de *Bioglass* 45S5[®] na consolidação de defeitos ósseos em tíbias de ratos saudáveis e seus resultados evidenciaram que os defeitos ósseos preenchidos com partículas de Biosilicato[®] (180-210 μ m) apresentavam propriedades mecânicas iguais a de ossos não fraturados. Além disso, os defeitos preenchidos com o Biosilicato[®] particulado (180-210 μ m) apresentaram melhor neoformação tecidual, com maior volume ósseo, número de osteoblastos e de osteoclastos em comparação aos defeitos preenchidos com partículas de *Bioglass* 45S5[®] (GRANITO *et al.*, 2009; GRANITO *et al.*, 2011).

Com os resultados positivos alcançados nestas investigações e visando o uso clínico do Biosilicato[®] em lesões ósseas de grande extensão, os pesquisadores do

LaMaV/UFSCar desenvolveram matrizes porosas tridimensionais (*scaffolds*) de Biosilicato[®], com a finalidade de servir como suporte para a regeneração guiada do tecido ósseo (CROVACE, 2010).

De acordo com Jones e Hench (2003), os *scaffolds* cerâmicos devem ter poros interconectados com um tamanho suficiente para que eles possam hospedar vasos sanguíneos e componentes celulares e extracelulares dos ossos, e com isso, permitir o crescimento do tecido.

Uma vez que o diâmetro médio dos canais de osso cortical varia entre 190 a 230 μm (preenchidos por parênquima), e são interconectados por canalículos (onde ocorre a intervascularização), e o osso esponjoso apresenta uma rede interconectada por poros de 500 a 600 μm de diâmetro, a cerâmica usada como suporte do tecido ósseo deve conter espaços morfológicamente compatíveis com as interconexões naturais do osso, ou seja, poros interconectados com um tamanho mínimo de 100 μm , para que eles possam hospedar vasos sanguíneos e componentes celulares e extracelulares dos ossos (HENCH, 1991; JONES; HENCH, 2003). Além disso, o *scaffold* deve se integrar ao osso hospedeiro sem a formação de tecido cicatricial, criando uma interface estável, e deve ser reabsorvido na mesma velocidade que o osso é regenerado, de forma que o osso acabe por regressar ao seu estado e função original (COSTA *et al.*, 2007).

Recentemente, os *scaffolds* de biomateriais, têm sido com frequência pesquisados em estratégias regenerativas ósseas, pois estes servem como um guia para o crescimento do tecido ósseo e permitem o suprimento sanguíneo e de nutrientes para as células que estão dentro dos *scaffolds* (DAVIES *et al.*, 2008). Quando isto não acontece, temos a formação de tecido ósseo nas bordas do material e desenvolvimento de tecido necrótico no centro, provavelmente devido a limitações na penetração celular e ao inadequado suprimento sanguíneo (ROSE *et al.*, 2004). Sendo assim, é possível

hipotetizar que a associação da irradiação laser e do *scaffold* de Biosilicato[®] pode ter um efeito positivo na aceleração do processo de reparação óssea.

Conforme o exposto acima, a terapia *laser* de baixa intensidade e o Biosilicato[®] apresentam alto potencial osteogênico. No entanto, a influência do implante de *scaffolds* de Biosilicato[®] na reparação óssea ainda não foi pesquisada em estudos *in vivo*. Além disso, não estão claros quais são os mecanismos de ação moleculares que ocorrem durante a irradiação do *laser* no tecido ósseo lesado. Finalmente, não sabemos quais os efeitos biológicos acontecem durante a associação dos dois tratamentos supracitados na consolidação da fratura óssea.

2. OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da LLLT ($\lambda = 830\text{nm}$, fluência de $120\text{J}/\text{cm}^2$) e do implante de *scaffolds* de Biosilicato[®], associados ou não, nos aspectos histológicos, propriedades biomecânicas do calo ósseo e na imunoexpressão de proteínas, fatores de crescimento e de transcrição relacionados a diferentes etapas do reparo ósseo ao 15°, 30° e 45° dia após a cirurgia de defeitos ósseos induzidos em tíbias de ratos saudáveis.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) (Parecer 002/2009) (ANEXO A).

3.1. Animais de Experimentação

Neste trabalho foram utilizados 120 ratos (*Rattus norvegicus: var. albinus*, *Rodentia, Mammalia*) machos, da linhagem *Wistar*, com três meses de idade e peso corporal médio de 280 gramas no início do experimento, provenientes do Biotério Central da UFSCar.

Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Morfologia e Patologia da UFSCar durante todo o período experimental, onde permaneceram alocados individualmente em gaiolas de polipropileno padrão, alimentados com ração comercial (Primor rações) e água a vontade e mantidos em condições ambientais controladas (ciclo claro/escuro 12/12 horas, temperatura controlada a $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e ambiente higienizado).

3.2. Procedimento Cirúrgico

Todos os animais foram submetidos à cirurgia para a realização de defeitos ósseos nas tíbias. As cirurgias foram realizadas nas tíbias direitas e esquerdas e de acordo com os princípios éticos de instrumentação animal, sob condições padrão de assepsia e anestesia geral.

A técnica cirúrgica utilizada baseou-se nos trabalhos de Barushka *et al.* (1995), Marino (2003), Oliveira *et al.* (2010) e Granito *et al.* (2009), que realizaram defeitos ósseos cilíndricos unilaterais de dimensões e localizações padronizadas na cortical da tíbia de ratos.

Para a realização das lesões ósseas, foi utilizada uma broca odontológica tipo trefina, da marca WMA[®], com 2cm de comprimento, 3mm de diâmetro externo, acionada por um micromotor da marca BELTEC[®], com rotação de 13.500rpm e irrigação contínua com soro fisiológico de forma a evitar queimaduras do tecido ósseo.

Todo o procedimento foi realizado sob anestesia de acordo com a massa corporal, com injeção intraperitoneal de uma combinação de cloridrato de ketamina (Agener[®]) (80mg/Kg) e cloridrato de xilazina 2% (Syntec[®]) (10mg/kg). Após a anestesia, realizou-se tricotomia digital e assepsia da área a ser operada (Figura 1A) e foram realizados os defeitos ósseos localizados a 10mm abaixo da articulação do joelho por meio de uma incisão no terço proximal da tíbia (Figura 1B).

A região do defeito foi padronizada em todos os animais com a utilização de um paquímetro digital. A lesão foi induzida com a trefina mantida na posição horizontal e perpendicular em relação ao eixo longitudinal do osso, de modo a penetrar na cortical medial e danificar o canal medular abaixo desta, porém sem atingir a face contralateral, resultando em um orifício cilíndrico de 3mm de diâmetro (Figuras 1C e 1D).

Em seguida, o tecido muscular e a pele foram suturados com fio de náilon monofilamentar 4.0 (Shalon[®]) à distância de 0,5cm entre os pontos e realizada a antisepsia local (Figura 1F). Os animais foram mantidos em caixas individuais com livre acesso à água e ração até o momento da eutanásia (GRANITO *et al.*, 2009, BOSSINI, 2010).

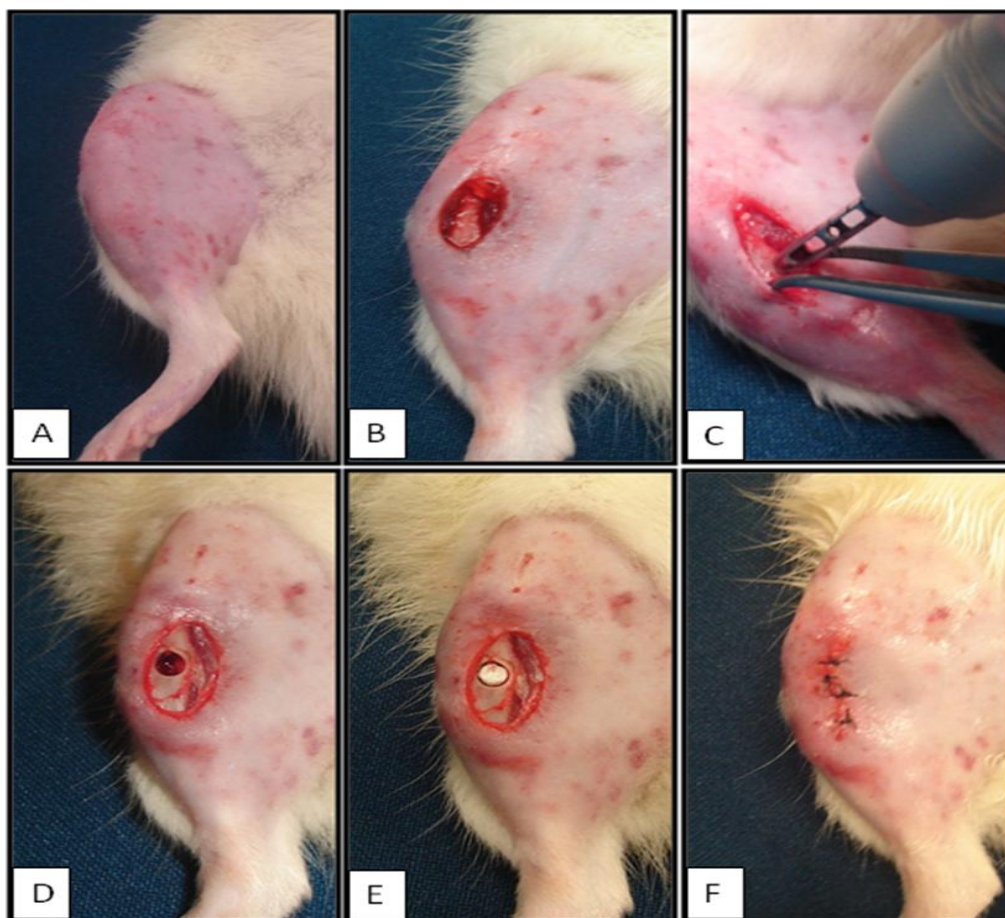


Figura 1. Procedimento cirúrgico experimental. A: Tricotomia da região a ser operada. B: Incisão da pele no terço médio tibial. C: Defeito ósseo realizado com broca tipo trefina de 3mm de diâmetro. D: Defeito ósseo. E: Implante de *scaffold* de Biosilicato[®] no defeito ósseo. F: Sutura da área operada.

3.3. Delineamento Experimental

Foram utilizados 120 ratos, pesados e distribuídos aleatoriamente, nos seguintes grupos (com 30 animais cada):

- **Grupo Controle (GC):** animais submetidos à realização do defeito ósseo, mas não receberam nenhum tipo de tratamento.

- **Grupo Biosilicato[®] (GB):** animais submetidos à realização do defeito ósseo e à implantação do *scaffold* de Biosilicato[®].
- **Grupo Laser (GL):** animais submetidos à realização do defeito ósseo e tratados com *laser* ($\lambda = 830\text{nm}$), na fluência de $120\text{J}/\text{cm}^2$ por 34 segundos, fornecendo 3,4J de energia.
- **Grupo Biosilicato[®] e Laser (GBL):** animais submetidos à realização do defeito ósseo e ao implante do *scaffold* de Biosilicato[®]. Além disso, os animais foram tratados com *laser* ($\lambda = 830\text{nm}$), na fluência de $120\text{J}/\text{cm}^2$ por 34 segundos, fornecendo 3,4J de energia.

Cada grupo foi dividido em três subgrupos, compostos por 10 ratos cada, resultando em três períodos experimentais, com animais eutanasiados ao 15°, 30° e 45° dia após a cirurgia óssea, a saber:

- **GC15, CB15, GL15 e GBL15:** animais dos grupos Controle, Biosilicato[®], *Laser* e grupo Biosilicato[®] e *Laser* eutanasiados ao 15° dia após a cirurgia.
- **GC30, GB30, GL30 e GBL30:** animais dos grupos Controle, Biosilicato[®], *Laser* e grupo Biosilicato[®] e *Laser* eutanasiados ao 30° dia pós-cirúrgico.
- **GC45, CB45, GL45 e GBL45:** para animais dos grupos Controle, Biosilicato[®], *Laser* e grupo Biosilicato[®] e *Laser* eutanasiados ao 45° dia pós-cirúrgico.

3.4. Caracterização dos *Scaffolds* de Biosilicato[®]

Foram utilizados *scaffolds* de Biosilicato[®] com 3mm de diâmetro, 1,5mm de espessura, cerca de 44% de porosidade total e macroporos interconectados com

diâmetro médio de 230 μ m. Estas características são adequadas para a osteogênese no interior do implante, uma vez que permitem a passagem de células e suprimento sanguíneo através do mesmo (KARAGEORGIU; KAPLAN, 2005; VITALE-BROVARONE *et al.*, 2007).

O Biosilicato[®] foi desenvolvido por pesquisadores do Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV) da UFSCar, com a finalidade de produzir uma vitrocerâmica que conservasse o elevado nível de bioatividade evidente nos vidros bioativos, porém com melhores propriedades mecânicas que estes. Consiste em material composto por um sistema quaternário P₂O₅-Na₂O-CaO-SiO₂, completamente cristalizado por tratamento térmico específico (PEITL, 1995). Os detalhes da composição e do tratamento térmico para manufatura do Biosilicato[®] estão descritos nas patentes WO 2004/074199 (ZANOTTO *et al.*, 2004).

3.5. Síntese dos *Scaffolds* de Biosilicato[®]

Os *scaffolds* foram produzidos e fornecidos pelo LaMaV/UFSCar e pela empresa Vitrovita – Instituto de Inovação em Vitrocerâmicos (São Carlos, SP, Brasil). Primeiramente aqueceu-se álcool isopropílico à temperatura de 50°C, mantido sob agitação magnética e adicionado polvinil butiral (PVB). Em seguida, o Biosilicato[®] em pó foi adicionado ao gel e, esta mistura homogeneizada com um bastão de vidro, obtendo-se uma espécie de cimento. Após, adicionou-se fibras de polietileno, novamente homogeneizado e depositado em um cadinho de ZAS (zircônia-alumina-sílica) onde foi seco à temperatura ambiente por 72 horas.

Foram obtidos blocos de aproximadamente 50 x 80 x 16mm. A queima dos blocos foi realizada em forno elétrico, em dois estágios: o primeiro para remoção dos aditivos de processamento e o segundo para a sinterização dos *scaffolds* propriamente dita. Então, os blocos porosos obtidos foram cortados em placas de 16 x 50mm, com 1,5mm de espessura e utilizou-se uma broca odontológica tipo trefina, da marca WMA[®], com 2cm de comprimento, 3mm de diâmetro externo, acionada por um micromotor da marca BELTEC[®] para o corte dos *scaffolds*.

3.6. Tratamento

3.6.1. Implantação dos *Scaffolds* de Biosilicato[®]

Os *scaffolds* foram implantados justapostos ao defeito ósseo imediatamente após a realização do mesmo, preenchendo completamente o defeito ósseo (Figura 1E).

3.6.2. Aplicação do Laser Terapêutico de Baixa Intensidade

O dispositivo emissor da radiação *laser* utilizado foi um modelo portátil Thera lase[®] (DMC São Carlos, SP, Brasil), versão 24, classe 3B, diodo com meio ativo de arseneto de gálio e alumínio (As-Ga-Al diodo) (Figura 2). Este aparelho foi fornecido pelo Laboratório de Eletrotermofototerapia, do Departamento de Fisioterapia (DFisio), da UFSCar, sob responsabilidade do Prof. Dr. Nivaldo A. Parizotto.

Os parâmetros empregados foram: comprimento de onda de 830nm, emissão contínua, potência de saída de 100mW, densidade de potência de $3,57\text{W}/\text{cm}^2$, área do feixe de $0,028\text{cm}^2$ e divergência de 1.5° , na fluência de $120\text{J}/\text{cm}^2$, fornecendo 3,4J de energia e com tempo de aplicação por ponto de 34 segundos. A escolha da dosimetria empregada baseou-se em resultados positivos de estudos prévios do nosso grupo de pesquisa (RENNO *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2010; BOSSINI *et al.*, 2011).

O equipamento foi previamente calibrado e novamente aferido após o período de tratamento experimental no Laboratório de Biofotônica do Grupo de Óptica do Instituto de Física de São Carlos (IFSC), Universidade de São Paulo (USP), com o objetivo de se obter alta confiabilidade na intensidade efetiva da emissão *laser*.

Os protocolos de tratamento se iniciaram imediatamente após sutura de músculo e pele no procedimento cirúrgico e foram realizados a cada 48 horas em todos os grupos tratados com *laser* de baixa intensidade.

O *laser* foi aplicado em um único ponto sobre a região do defeito ósseo, com padronização prévia a cada aplicação do local de irradiação pelo uso de um paquímetro digital (10mm abaixo da linha articular do joelho). As irradiações ocorreram sempre no mesmo horário, com uso da técnica pontual em contato, na qual a caneta do equipamento foi posicionada perpendicularmente à face anterior da tíbia, em contato com a pele suprajacente ao osso lesado.

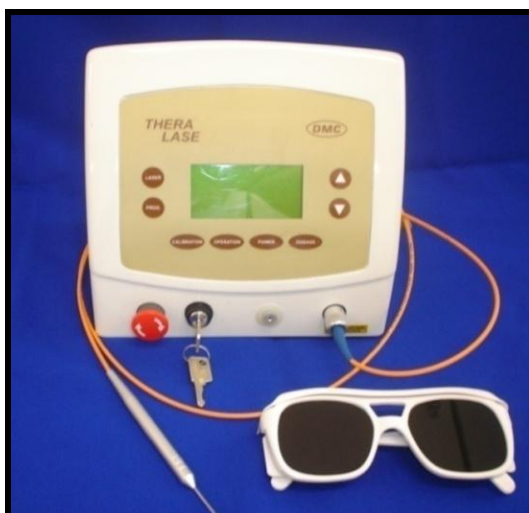


Figura 2. Aparelho portátil emissor de radiação *laser* Thera lase[®] (DMC São Carlos,SP, Brasil), versão 24, classe 3B, As-Ga-Al diodo.

3.7. Eutanásia dos Animais

Os animais foram eutanasiados por meio de dose letal de anestésico (ketamina/xilasina) injetado via intraperitoneal ao 15º, 30º e 45º dia após a realização do defeito ósseo, de acordo com cada subgrupo experimental. Nos diferentes grupos tratados com laser, a eutanásia foi realizada 24 horas após a última sessão de tratamento.

3.8. Coleta e Preparação das Amostras

Após a eutanásia, foi realizada a ressecção cirúrgica completa das tíbias de cada animal, sendo que as tíbias esquerdas foram utilizadas na análise biomecânica enquanto que as direitas foram designadas para as análises histológica, morfométrica e imunoistoquímica. As análises foram realizadas contendo dez amostras de cada grupo.

As tíbias esquerdas foram armazenadas em solução salina e, em seguida, submetidas ao ensaio biomecânico.

As tíbias direitas foram fixadas em formalina tamponada a 10% (Merck, Darmstadt, Germany) por 24 horas, lavadas em água corrente por 24 horas e descalcificadas em solução de ácido etilendiaminotetracético 4% (EDTA) (Merck, Darmstadt, Germany).

Após, as amostras foram reduzidas para processamento e incluídas em blocos de parafina. Posteriormente, os blocos de parafina foram cortados longitudinalmente em relação à tíbia onde foi realizado o defeito ósseo, por meio de um micrótomo rotativo numérico (Ancap, modelo 297) do Laboratório de Eletrotermofototerapia (DFisio/UFSCar), obtendo-se cortes semi-seriados com espessura padronizada de 5 μ m.

3.9. Análises

3.9.1. Análise Histológica Qualitativa

Para a análise histológica qualitativa, foram confeccionadas lâminas com os cortes longitudinais semi-seriados de 5 μ m de espessura, as quais foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE, Merck). Utilizando-se um microscópio de luz (Olympus, Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan), foram observadas as seguintes características no local da lesão: infiltrado inflamatório, tecido de granulação, tecido ósseo neoformado, organização tecidual óssea, biomaterial e necrose tecidual. Quando estes achados estavam presentes, foram classificados em leve, moderado e intenso, sendo considerado leve quando a característica estava presente em área menor do que 35% do campo

analisado, moderado quando o achado estava presente em área entre 35% a 65% do campo avaliado e intenso, quando o aspecto histológico estava presente em área maior do que 65% do campo avaliado (ANEXO B).

3.9.2. Análise Morfométrica

Para a análise morfométrica, foram confeccionadas lâminas com os cortes longitudinais semi-seriados de 5 μ m de espessura, as quais foram coradas com Tricrômico de Masson (TM).

Por meio de um microscópio de luz (Nikon E 20000) e do programa de imagem Motic Images Plus, versão 2.0, foram obtidas fotomicrografias para a análise das imagens.

Para isso, foram selecionados três campos da região cortical do defeito ósseo de cada animal, intitulados de C1 e C2, respectivamente, os dois campos adjacentes à margem esquerda do defeito ósseo e C3, o campo localizado na margem direita do defeito ósseo (Figura 3).

Cada campo foi fotografado com a objetiva de 10X e a área de tecido ósseo neoformado presente nessas regiões foi contornada e, em seguida, mensurada. Depois de registradas, as áreas dos três campos de cada lâmina foram somadas, revelando a área total de osso neoformado, com o valor expresso em micrômetros quadrados (μm^2) e os resultados apresentados como a média da área total do tecido ósseo neoformado de cada grupo experimental (MIRANDA *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2010; FÁVARO-PÍPI *et al.*, 2010; BOSSINI *et al.*, 2011).

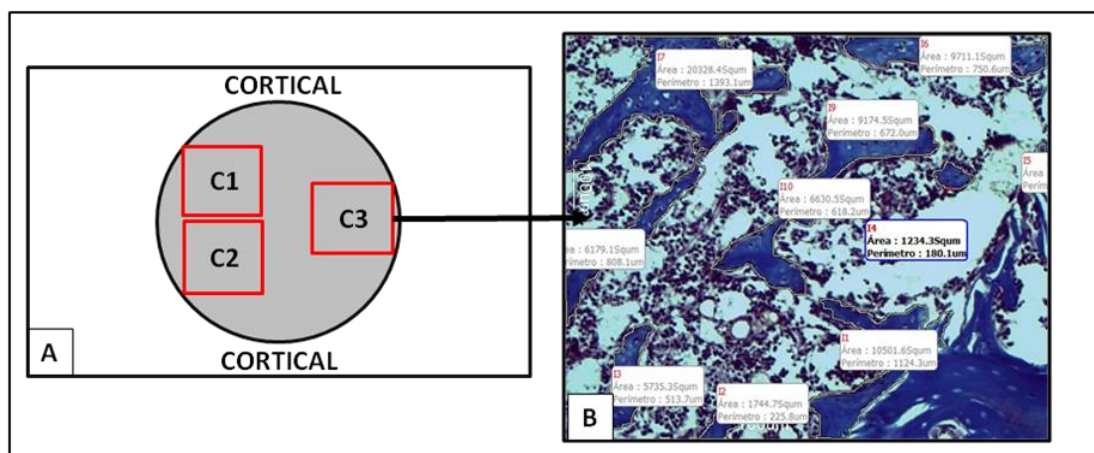


Figura 3. Morfometria da área de osso neoformado: A: Desenho ilustrativo da padronização dos campos selecionados na análise morfométrica. B: Fotomicrografia representativa do campo 3 (C3) de defeito ósseo do grupo controle 15 dias. A cor azul escuro indica a área de tecido ósseo neoformado. Coloração: TM. (Aumento: 100X).

3.9.3. Análise Imunoistoquímica

A avaliação imunoistoquímica foi realizada no Laboratório Multidisciplinar do Departamento de Biociências da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), com contribuição do Prof. Dr. Daniel Araki Ribeiro.

Inicialmente, foram confeccionadas lâminas histológicas com cortes longitudinais semi-seriados de 5µm de espessura. A parafina foi removida com xilol e os cortes foram reidratados em etanol e, em seguida, imersos em solução de tampão citrato a 0,01M (pH 6,0) em microondas (850W) por três ciclos de cinco minutos cada para recuperação antigênica. O material foi pré-incubado com peróxido de hidrogênio a 0,3% em solução de tampão fosfato (PBS) por cinco minutos para inativação da peroxidase endógena e, na sequência, bloqueado em soro fetal bovino a 5%, diluído em solução de PBS por dez minutos.

As amostras foram incubadas com anti-COX-2 anticorpo primário policlonal (Santa Cruz Biotechnology, USA) na concentração de 1:200, anti-RUNX-2 anticorpo primário policlonal (Santa Cruz Biotechnology, USA) na concentração de 1:200, anti-RANKL anticorpo primário policlonal (Santa Cruz Biotechnology, USA) na concentração de 1:200 e anti-BMP-9 anticorpo primário policlonal (Santa Cruz Biotechnology, USA) na concentração de 1:200. A incubação foi realizada em refrigerador (4°C) por um período de 12 horas, seguida de dois banhos em solução de PBS, com duração de cinco minutos cada.

A seguir, os cortes foram incubados com biotina conjugada ao anticorpo secundário anti-IgG (imunoglobulina G) de coelho (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) na concentração de 1:200 em PBS por uma hora. Na sequência, os cortes foram lavados duas vezes com PBS, seguido por aplicação de complexo pré-formado de avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories) por 45 minutos. Os complexos foram visualizados por meio da aplicação de solução de 3,3 diaminobenzidina a 0,05% e contra corados com Hematoxilina de Harris. Como controle dos anticorpos, alguns cortes histológicos foram submetidos ao anticorpo de coelho IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) na concentração de 1:200, omitindo-se os anticorpos primários, estes cortes serviram como controle negativo das reações. Além disso, foram realizados controles positivos internos em cada bateria da reação realizada.

Posteriormente, as lâminas foram analisadas por meio de um microscópio de luz (Olympus, Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan). Foram avaliados três campos de cada corte e observada a presença e localização da imunomarcagem dos fatores analisados. Quando presente, foi determinada se a imunomarcagem era localizada nas células ou na matriz extracelular.

Além disso, foi mensurada a imunexpressão por percentual da área do campo avaliado: leve para imunomarcção positiva, porém em área menor do que de 35% do campo analisado, moderada para imunomarcção positiva em área entre 35% a 65% do campo avaliado e intensa, para área com imunexpressão positiva do fator analisado maior do que 65% do campo avaliado (ANEXO C).

3.9.4. Análise Biomecânica

Para a análise biomecânica utilizou-se o teste de flexão de três pontos, realizado em temperatura ambiente em uma máquina de ensaio universal (Instron, modelo 4444) do Laboratório de Neuroendocrinologia, Departamento de Ciências Fisiológicas, UFSCar, sob responsabilidade da Prof^a Dr^a Keico Okino Nonaka.

Para a realização do ensaio, as extremidades da tíbia foram apoiadas em suportes metálicos, expondo 1,8cm do comprimento da tíbia ao teste, de modo que o defeito se localizasse em posição central relativa aos apoios. Foi utilizada uma célula de carga com capacidade máxima de 1KN e pré-carga de 5N em velocidade constante de 0,5cm/min. As tíbias foram posicionadas com a face do defeito ósseo voltada para baixo, de modo a submetê-los à tração, e a força foi aplicada perpendicularmente ao eixo longitudinal do osso por uma haste cilíndrica de 2,0mm de diâmetro, até o momento da fratura, de modo a submeter a região do defeito ósseo à tração (Figura 4). A força aplicada e o deslocamento do edentador foram monitorados e registrados por meio de um *software* do equipamento (Instron Series IX).

A partir da curva carga/deformação foram obtidos os valores da carga máxima (KN) e resiliência (J).

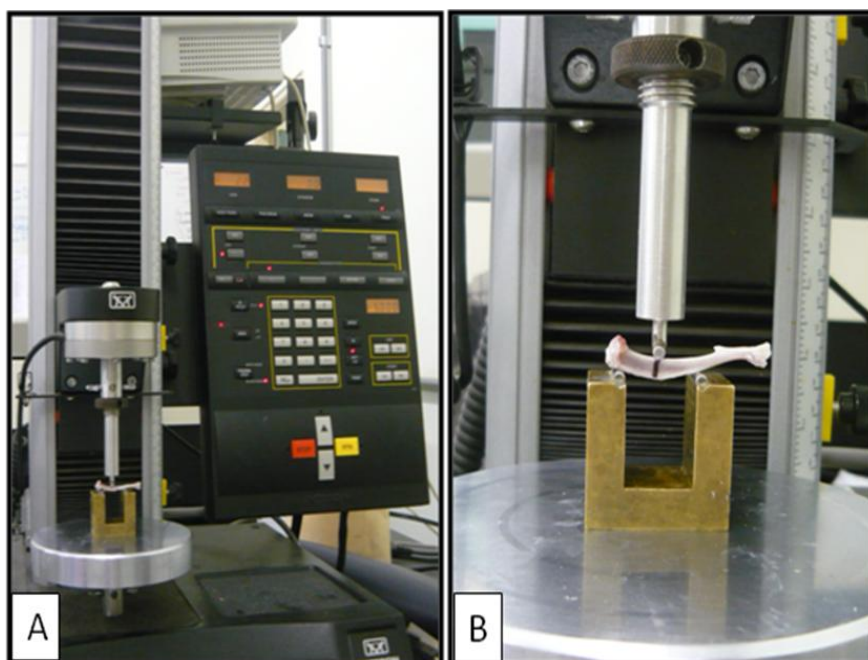


Figura 4. Análise Biomecânica: A: Máquina de ensaio universal Instron, modelo 4444. B: Posicionamento da tíbia durante o teste de flexão, com defeito ósseo posicionado para baixo, na linha de ação da carga a ser aplicada.

3.9.5. Análise Estatística dos Dados

Os dados foram analisados estatisticamente por meio de técnicas descritivas, na forma de médias e desvios-padrão.

O teste de normalidade Shapiro–Wilk’s W test foi utilizado para todas as variáveis. Todas as variáveis apresentaram distribuição normal da amostra. As comparações entre os grupos foram feitas utilizando testes de análise de variância (ANOVA one-way), seguida do teste *post-hoc* de Duncan. As análises foram realizadas no *software* STATISTICA versão 7.0 (StatSoft Inc.). Para as conclusões das análises estatísticas, o nível de significância utilizado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

PARTE II

4. ESTUDO 1

“Respostas *in vivo* após implante de *scaffolds* derivados de uma vitrocerâmica altamente bioativa (Biosilicato[®])”

5. ESTUDO 2

“Terapia *laser* de baixa intensidade potencializa a expressão de diferentes fatores osteogênicos durante o reparo ósseo em ratos”

6. ESTUDO 3

“*Scaffolds* de Biosilicato[®] e terapia *laser* de baixa intensidade: um estudo histológico, imunohistoquímico e biomecânico de defeitos tibiais em ratos”

4. ESTUDO 1

“Respostas *in vivo* após implante de *scaffolds* derivados de uma vitrocerâmica altamente bioativa (Biosilicato®)”

4.1. RESUMO

Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos do implante de *scaffolds* de Biosilicato® em defeitos ósseos de ratos. Apesar de um estudo prévio *in vivo* ter demonstrado respostas positivas do Biosilicato® particulado nas propriedades morfológicas e biomecânicas do calo ósseo, os efeitos do seu *scaffold* tridimensional ainda não foram estudados. Sessenta ratos machos *Wistar* com defeitos tibiais foram utilizados em dois grupos experimentais, grupo *scaffold* de Biosilicato® e grupo controle. Os animais foram sacrificados nos dias 15, 30 e 45 após a lesão, visando comparar os efeitos temporais-espaciais na consolidação óssea. Para isso, foram realizadas análises histológica, imunoistoquímica e biomecânica. Os resultados histológicos revelaram que os animais do grupo *scaffold* de Biosilicato® apresentavam osso neoformado mais organizado ao 30° e 45° dia após a cirurgia. A imunohistoquímica demonstrou que o *scaffold* de Biosilicato® promoveu maior expressão de COX-2 nos 15° e 30° dias de pós-operatório, imunoexpressão positiva de RUNX-2 em todos os períodos avaliados, maior expressão de RANKL no 15° dia pós-lesão e imunoexpressão positiva de BMP-9 no 45° dia. Entretanto, o *scaffold* de Biosilicato® não aumentou as propriedades biomecânicas do defeito ósseo. Assim, nossos resultados revelaram que o implante de *scaffold* de Biosilicato® foi eficaz em melhorar os aspectos histológicos do tecido ósseo em consolidação, assim como promoveu o aumento da expressão de fatores relacionados ao processo de reparo tecidual e atividade celular, porém, não foi capaz de melhorar suas propriedades mecânicas.

Palavras-chave: Biosilicato®, *scaffold* de biomaterial, reparo ósseo, análise imunohistoquímica, estudo *in vivo*.

4.2. INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos é um campo em expansão e relativamente moderno de pesquisas na área da saúde que trabalham para desenvolver tecnologias e modelos adequados para promover a regeneração de tecidos humanos. Isto inclui a restauração

do tecido e da função dos órgãos através da criação de substitutos biológicos para os tecidos retirados, além de implantes artificiais e próteses. Para isso, muitas abordagens diferentes podem ser aplicadas, tais como a deposição de células em *scaffolds* acelulares implantados, associação de *scaffolds* com tecidos previamente cultivados *in vitro*, ou a implantação de *scaffolds* acelulares que servem como suporte para uma regeneração tecidual guiada *in situ* (YANG *et al.*, 2002; CORTESINI, 2005).

Um *scaffold* ideal para promover a fixação e proliferação celular deve possuir química de superfície e topografia adequadas, arquitetura com poros interconectados, além de propriedades mecânicas similares as da região de implantação (YANG *et al.*, 2001).

Uma grande variedade de *scaffolds* biodegradáveis de diferentes materiais tem sido investigada como substitutos ósseos, incluindo *scaffolds* de vidros bioativos e de biocerâmicas (KIM; KNOWLES; KIM, 2005; CHEN *et al.*, 2006). Estes biomateriais são conhecidos por suas propriedades osteogênicas e sua capacidade de se integrar com o osso vivo, formando uma camada de hidroxicarbonatoapatita biologicamente ativa e semelhante à presente no tecido vivo em sua superfície (HENCH; POLAK, 2002; HENCH, 2003). Um dos biomateriais mais frequentemente estudados na engenharia de tecidos é o *Bioglass*[®] 45S5. Este é um vidro à base de sílica (45% SiO₂, 24,5% Na₂O, CaO 24,5%, 6% P₂O₅), conhecido por ter a composição mais bioativa entre vários vidros que têm a capacidade de se ligar aos ossos (HENCH, 2003). Apesar dos seus efeitos estimulantes bem conhecidos sobre a osteogênese, o uso do *Bioglass*[®] 45S5 monolítico tem sido limitado em aplicações de engenharia óssea, principalmente devido as suas relativamente pobres propriedades mecânicas (VALLET-REGI, 2001; DIEUDONNE *et al.*, 2002).

Considerando este importante assunto, nosso grupo de pesquisa desenvolveu uma série de tratamentos térmicos para obter uma nova vitrocerâmica bioativa completamente cristalizada a partir do sistema quaternário $P_2O_5-Na_2O-CaO-SiO_2$ (Biosilicato[®], número de patente WO 2004/074199). Experimentos *in vitro* com cultura de células osteogênicas demonstraram que o Biosilicato[®] promove maior formação de uma matriz similar à óssea em relação ao seu vidro precursor e também ao *Bioglass*[®] 45S5 (MOURA *et al.*, 2007). Recentemente, Granito *et al.* (2011) descobriram que o Biosilicato[®] particulado foi capaz de aumentar as propriedades biomecânicas do calo ósseo de defeitos tibiais em ratos em comparação com o *Bioglass*[®] 45S5 (padrão ouro). Além disso, o Biosilicato[®] promoveu maior volume ósseo e maior número de osteoblastos na área do calo ósseo em comparação com o grupo tratado com *Bioglass*[®] 45S5. Os autores concluíram que o Biosilicato[®] completamente cristalizado pode melhorar a reparação tecidual, aumentando a neoformação óssea, bem como melhorando as propriedades mecânicas do osso.

Esses importantes achados estimularam nosso grupo de pesquisa a desenvolver um *scaffold* tridimensional derivado do Biosilicato[®], a fim de favorecer a migração de células e vascularização, fornecendo um ambiente adequado para a regeneração óssea.

Porém, antes de este *scaffold* ser usado com confiança como uma modalidade terapêutica para o tratamento de fraturas, é necessário investigar as respostas do tecido ósseo após seu implante em estudos *in vivo*, para determinar sua segurança e eficácia. Neste contexto, este estudo teve como objetivo investigar os efeitos do implante do *scaffold* derivado de Biosilicato[®] em defeitos ósseos na tíbia de ratos.

4.3. MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1. Delineamento Experimental

Sessenta ratos machos da linhagem *Wistar* (12 semanas de idade, peso médio de 280 g) foram divididos em dois grupos (n = 30 cada grupo). Os animais foram mantidos sob temperatura controlada (24 ± 2 ° C), períodos de claro-escuro de 12 horas, e acesso irrestrito à água e ração comercial. A manipulação dos animais e os procedimentos cirúrgicos foram realizados estritamente de acordo com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFSCar (Parecer 002/2009). Conforme descrito abaixo, defeitos ósseos de tamanho não-crítico foram realizados em ambas as tíbias. Os animais foram eutanasiados 15, 30 e 45 dias após a cirurgia.

4.3.2. *Scaffold* de Biosilicato[®]

Foram utilizados *scaffolds* cilíndricos com 3.0mm de diâmetro e 1.5mm de espessura para a implantação nos defeitos ósseos tibiais.

4.3.3. Preparação dos *scaffolds* de Biosilicato[®]

Os *scaffolds* foram preparados no LaMaV/DEMa da UFSCar, pelo aluno de doutorado Murilo C. Crovace.

Uma vitrocerâmica bioativa totalmente cristalina do sistema quaternário $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2-\text{P}_2\text{O}_5$ (Biosilicato[®], patente WO2004/074199) foi utilizada neste estudo. Este material foi descrito recentemente (RENNO; MCDONNEL; LAAKSO, 2010). Os *scaffolds* foram preparados através de um método inédito, que consistiu na adição de um agente porogênico (no caso, fibras de polietileno) a um cimento à base de Biosilicato[®] em pó.

Inicialmente, álcool isopropílico (99,5% P.A. – Qhemis) foi aquecido até a temperatura de 50°C e 15% vol. de polivinil butiral (PVB, Butvar – B98) foi adicionado; a mistura foi mantida sob agitação vigorosa até a formação de um gel homogêneo. Biosilicato[®] em pó (com tamanho médio das partículas de aproximadamente 5µm) foi adicionado ao gel em uma proporção de 40% vol. e homogeneizado com um bastão de vidro. Posteriormente, 15% vol. de fibras de polietileno (Flinco) com 3,2mm de comprimento e 0,27 mm de espessura foi adicionado à mistura, sendo novamente homogeneizada. O cimento contendo as fibras foi depositado em um cadinho de AZS ($\text{Al}_2\text{O}_3-\text{ZrO}_2-\text{SiO}_2$) e seco à temperatura ambiente por 72h. Desta forma, foram obtidos blocos de aproximadamente 16 x 50 x 80mm.

O procedimento de queima foi realizado em forno elétrico, sendo composto por quatro estágios: (1) aquecimento a uma taxa de 1°C/min da temperatura ambiente até 380°C, com um patamar de 4h nesta temperatura para a remoção do PVB; (2) aquecimento a 1°C/min até 460°C, com um patamar de 4h nesta temperatura para a remoção completa das fibras de polietileno; (3) aquecimento a 5°C/min até 1000°C e patamar de 4h nesta temperatura para a sinterização do Biosilicato[®]; (4) resfriamento a uma taxa de 3°C/min até a temperatura ambiente, para evitar o trincamento dos blocos de Biosilicato[®].

Os blocos porosos foram cortados em pequenas placas de 16 x 50mm, com 1,5mm de espessura. Uma broca odontológica do tipo trefina (WMA[®]) acionada por um micromotor (BELTEC[®]) foi utilizada para cortar os *scaffolds* de 3.0mm de diâmetro e 1.5mm de espessura.

4.3.4. Procedimento Cirúrgico

Defeitos ósseos bilaterais de tamanho não-crítico foram realizados cirurgicamente no terço superior da tíbia (a 10mm distais à articulação do joelho). A cirurgia foi realizada sob condições estéreis e com anestesia geral induzida pela injeção intraperitoneal de xilazina (Syntec[®], 10mg/kg) e ketamina (Agener[®], 80mg/kg). O compartimento medial da tíbia foi exposto através de uma incisão longitudinal na pele previamente tricotomizada e higienizada com antisséptico. Um defeito ósseo padrão de 3.0mm de diâmetro foi criado usando uma broca motorizada (BELTEC[®], Araraquara, São Paulo, Brasil) (13.500rpm), sob irrigação abundante com solução salina. Imediatamente depois, um *scaffold* de Biosilicato[®] previamente esterilizado foi implantado no defeito ósseo, com exceção dos animais do grupo controle. Após o implante, o retalho cutâneo foi reposicionado e suturado com fio cirúrgico de náilon monofilamentar 4.0 (Shalon[®]) e a antissepsia da pele foi realizada com iodopovidona. O estado de saúde dos ratos foi monitorado diariamente.

No 15º, 30º e 45º dia após a cirurgia, os ratos foram sacrificados com uma dose letal de anestésico, injetado via intraperitoneal. As tíbias foram dissecadas e removidas para análise.

4.3.5. Análise Histológica

As tíbias direitas foram removidas e fixadas em formalina tamponada a 10% (Merck[®], Darmstadt, Alemanha) por 48 horas. Em seguida, foram descalcificadas em EDTA a 4% (Merck[®]) e incluídas em blocos de parafina. Foram obtidos cortes seriados de 5µm de espessura, corados com HE (Merck[®]).

Para a avaliação histológica, foi utilizado um microscópio de luz (Olympus, Optical Co. Ltd, Tóquio, Japão) e a presença de processo inflamatório, tecido de granulação, tecido ósseo neoformado, tecido necrótico e biomaterial foram investigados na região do defeito ósseo de cada animal.

4.3.6. Análise Imunoistoquímica

Para a realização da avaliação imunoistoquímica, foram confeccionadas lâminas histológicas com cortes seriados de 5µm de espessura. A parafina foi removida com xilol e os cortes foram reidratados em etanol e, em seguida, imersos em solução de tampão citrato a 0,01M (pH 6,0) em microondas (850W) por três ciclos de cinco minutos cada para recuperação antigênica. O material foi pré-incubado com peróxido de hidrogênio a 0,3% em solução de tampão fosfato (PBS) por cinco minutos para inativação da peroxidase endógena e, na sequência, bloqueado em soro fetal bovino a 5%, diluído em solução de PBS por dez minutos.

As amostras foram incubadas com anti-COX-2 anticorpo primário policlonal (Santa Cruz Biotechnology, USA) na concentração de 1:200, anti-RUNX-2 anticorpo primário (Santa Cruz Biotechnology, USA) na concentração de 1:200, anti-RANKL

anticorpo primário policlonal (Santa Cruz Biotechnology, USA) na concentração de 1:200 e anti-BMP-9 anticorpo primário policlonal (Santa Cruz Biotechnology, USA) na concentração de 1:200. A incubação foi realizada em refrigerador (a 4°C) por um período de 12 horas, seguida de dois banhos em solução de PBS, com duração de cinco minutos cada. Em seguida, os cortes foram incubados com biotina conjugada ao anticorpo secundário anti-IgG de coelho (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) na concentração de 1:200 em PBS por uma hora. Na sequência, os cortes foram lavados duas vezes com PBS, seguido por aplicação de complexo pré-formado de avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories) por 45 minutos. Os complexos foram visualizados por meio da aplicação de solução de 3,3 diaminobenzidina a 0,05% e contra corados com Hematoxilina de Harris.

Para confirmação dos resultados, alguns cortes foram submetidos ao mesmo tratamento omitindo-se somente os anticorpos primários. Estes cortes serviram como controle negativo das reações. Além disso, foram realizados controles positivos internos em cada bateria da reação realizada.

4.3.7. Análise Biomecânica

As propriedades biomecânicas da tíbia esquerda foram determinadas por um teste de flexão de três pontos realizado em uma máquina de ensaio universal Instron® (EUA, modelo 4444, célula de carga de 1KN).

As tíbias foram colocadas em um dispositivo de metal que fornece duplo apoio com 1,8cm de distância entre suas extremidades. A célula de carga foi posicionada

perpendicularmente ao local exato do defeito ósseo. Uma pré-carga de 5N foi aplicada para evitar o deslizamento da amostra.

Finalmente, a amostra foi submetida a uma força de flexão, com taxa de deformação constante de 0,5cm/min até o momento da fratura. A partir da curva de carga-deformação, foram obtidos os valores de carga máxima (KN) e resiliência (J).

4.3.8. Análise Estatística

Os dados da análise biomecânica foram analisados estatisticamente por meio de técnicas descritivas, na forma de médias e desvio-padrão (DP). A normalidade da distribuição das variáveis foi verificada através do teste de Shapiro-Wilk's. Todas as variáveis apresentaram distribuição normal da amostra. As comparações entre os grupos foram feitas utilizando testes de análise de variância (ANOVA), complementada pelo teste *post-hoc* de Duncan. As análises foram realizadas no *software* STATISTICA versão 7.0 (StatSoft Inc.). Para as conclusões das análises estatísticas foi utilizado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

4.4. RESULTADOS

4.4.1. Achados Gerais

Não foram observadas complicações pós-operatórias nem mudanças de comportamento nos animais durante o período experimental. Os ratos voltaram

rapidamente a sua dieta normal e não apresentaram perda de peso durante o experimento. Nenhum animal morreu durante o experimento e nenhuma infecção no sítio cirúrgico foi observada.

4.4.2. Caracterização dos *scaffolds*

A densidade aparente (D_{ap}) e a porosidade aparente (P_{ap}) dos *scaffolds* foram determinadas através do teste de imersão em álcool etílico, que utiliza o princípio de Arquimedes. Para observação da microestrutura, os *scaffolds* foram embutidos sob vácuo e analisados por microscopia eletrônica de varredura (TMP Philips XL-30) no Laboratório de Caracterização Estrutural da UFSCar (LCE/DEMa). Para isso, utilizou-se resina epóxi (EpoThin® – BUEHLER) de baixa viscosidade e pequena retração após cura. A porosidade total (T_p) e a macroporosidade foram obtidas através da análise destas imagens, com o auxílio do software Image-J (versão 1.45). Estas caracterizações foram realizadas pelo aluno de doutorado Murilo C. Crovace do LaMaV/DEMa da UFSCar.

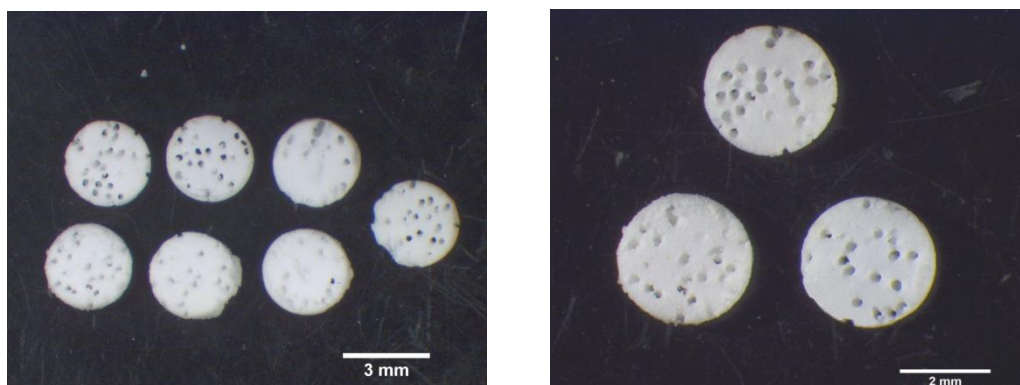


Figura 5. Imagens obtidas via lupa dos *scaffolds* de Biosilicato®.

As imagens obtidas por lupa (Leica MZ75) (Figura 5) mostram que os *scaffolds* apresentam macroporos formados devido à eliminação das fibras de polietileno durante o procedimento de queima dos blocos de Biosilicato[®]. Os macroporos estão preferencialmente orientados na direção perpendicular à face dos *scaffolds*. A orientação destes poros ocorre devido à orientação natural das fibras após sua mistura no cimento à base de Biosilicato[®]. Como já descrito no item anterior, os *scaffolds* apresentavam 3,0mm de diâmetro e 1,5mm de espessura.

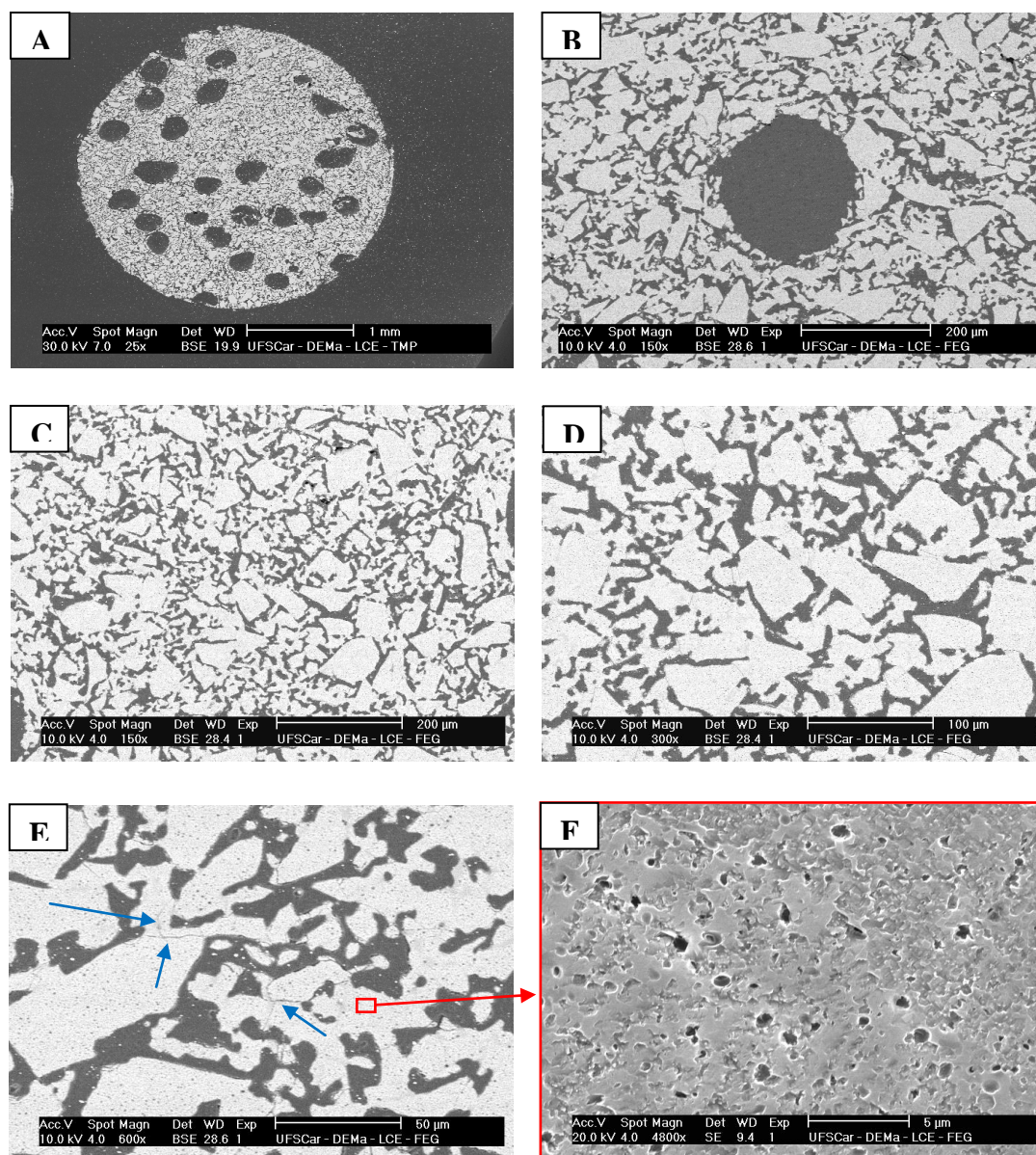


Figura 6. Imagens obtidas via microscopia eletrônica de varredura dos *scaffolds* embutidos em resina epóxi. Setas azuis: microtrincas nos grãos de Biosilicato[®].

Na figura 6, são apresentadas as fotomicrografias dos *scaffolds* embutidos em resina epóxi. As regiões de coloração clara compõem o *scaffold* de Biosilicato[®]; as regiões de coloração mais escura representam a resina epóxi. Os macroporos são ovalados e apresentam um diâmetro médio de 230 μ m (Figura 6B). O formato ovalado é

decorrente da deformação local do bloco de Biosilicato[®] durante a queima das fibras de polietileno.

Pode ser observado com detalhes que o *scaffold*, além de apresentar macroporos, é também constituído por uma rede de microcanais interconectados (Figuras 6C e 6D). A presença destes microcanais interconectados permitiu a penetração completa da resina epóxi no interior dos *scaffolds*. Os grãos de Biosilicato[®] que constituem a estrutura do *scaffold* apresentam microporos inferiores a 1µm (Figura 6F) de diâmetro. Não houve penetração de resina nos microporos uma vez que estes são fechados. Adicionalmente, é possível observar a presença de microtrincas nos grãos de Biosilicato[®] (Figura 6E). Apesar disso, os *scaffolds* apresentaram resistência mecânica suficiente para o manuseio e inserção nos defeitos ósseos.

Os *scaffolds* apresentaram uma porosidade total média de aproximadamente 44%. A macroporosidade, correspondente ao volume vazio deixado pelas fibras de polietileno, por volta de 15%. A porosidade restante corresponde à soma dos microcanais interconectados e dos microporos fechados. Os resultados da caracterização da porosidade dos *scaffolds* obtidos são apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Densidade aparente (D_{ap}), porosidade aparente (P_{ap}), porosidade total (T_P) e macroporosidade dos *scaffolds*.

Densidade aparente (D_{ap})	$1,59 \pm 0,07 \text{ g/cm}^3$
Porosidade aparente (P_{ap})	$38 \pm 1 \%$
Porosidade total (T_P)	$44 \pm 3 \%$
Macroporosidade (% de poros > 200µm)	$15 \pm 5 \%$

4.4.3. Análise Histológica

A figura 7 evidencia os resultados histológicos dos grupos controle e *scaffold* de Biosilicato[®], durante os diferentes períodos experimentais.

Quinze dias após a cirurgia, os defeitos do grupo controle estavam preenchidos por infiltrado inflamatório e pequena quantidade de tecido de granulação. Eventualmente foi observada neoformação óssea, sem trabéculas interligadas. Estes achados histológicos correspondem a uma fase intermediária do reparo tecidual (Figura 7A). No grupo *scaffold* de Biosilicato[®], o defeito ósseo estava predominantemente preenchido com o biomaterial (Figura 7B). Além disso, foi observada a presença de tecido de granulação em áreas circunjacentes à parede do defeito e leve quantidade de infiltrado inflamatório.

Trinta dias após a cirurgia, as bordas da lesão ainda eram observadas nos animais do grupo controle, com presença de quantidade moderada de osso neoformado circundado por tecido de granulação (Figura 7C). No grupo *scaffold* de Biosilicato[®], as partículas do biomaterial ainda estavam presentes, mas em menor quantidade em comparação ao primeiro período experimental. Não foi encontrado qualquer sinal de tecidos fibrótico ou necrótico e pôde-se observar a osteointegração entre *scaffold* e osso. As partículas de biomaterial estavam envoltas por tecido de granulação e osso recém-formado com trabéculas interconectadas, especialmente nas bordas da lesão (Figura 7D).

As figuras 7E e 7F mostram os achados histológicos dos grupos controle e *scaffold* de Biosilicato[®] ao 45º dia após a cirurgia. Não foi observado nenhum sinal de inflamação ou presença de tecido de granulação nas amostras dos dois grupos. No grupo controle, observamos grande quantidade de osso remodelado com trabéculas

interligadas, correspondendo a uma etapa final da reparação óssea. No grupo *scaffold* de Biosilicato[®], também estava presente grande quantidade de osso neoformado com trabéculas interligadas. No entanto, algumas partículas do biomaterial ainda foram observadas no interior do defeito ósseo.

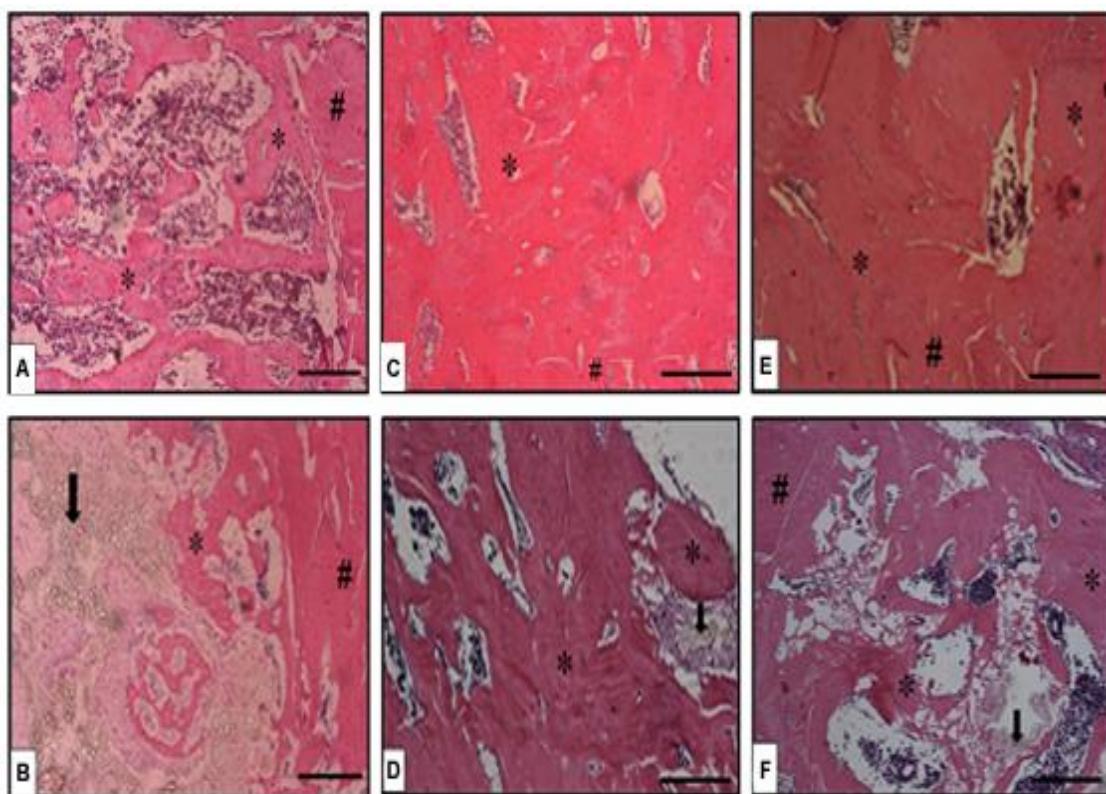


Figura 7. Osso intacto (#), osso neoformado (*), partículas de biomaterial (seta). A: grupo controle 15 dias, B: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] 15 dias, C: grupo controle 30 dias, D: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] 30 dias, E: grupo controle 45 dias, F: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] 45 dias. (Coloração: HE. Barra = 200 μ m).

4.4.4. Análise Imunoistoquímica

4.4.4.1. Expressão de COX-2

Quinze dias após a cirurgia, a expressão da COX-2 foi detectada predominantemente no citoplasma celular. Os animais do grupo controle apresentaram uma leve expressão deste imunomarcador, principalmente no tecido medular (Figura 8A). No mesmo período, os animais do grupo *scaffold* de Biosilicato[®] demonstraram moderada a intensa imunoexpressão, especialmente nos fibroblastos (Figura 8B). Trinta dias após a cirurgia, observamos leve imunoexpressão de COX-2 no grupo controle (Figura 8C). Por outro lado, o grupo *scaffold* de Biosilicato[®] apresentou leve a moderada imunoexpressão deste fator (Figura 8D). No último período avaliado, não foi observada quaisquer imunoexpressão de COX-2 em ambos os grupos experimentais (controle e *scaffold* de Biosilicato[®]) (Figuras 8E e 8F).

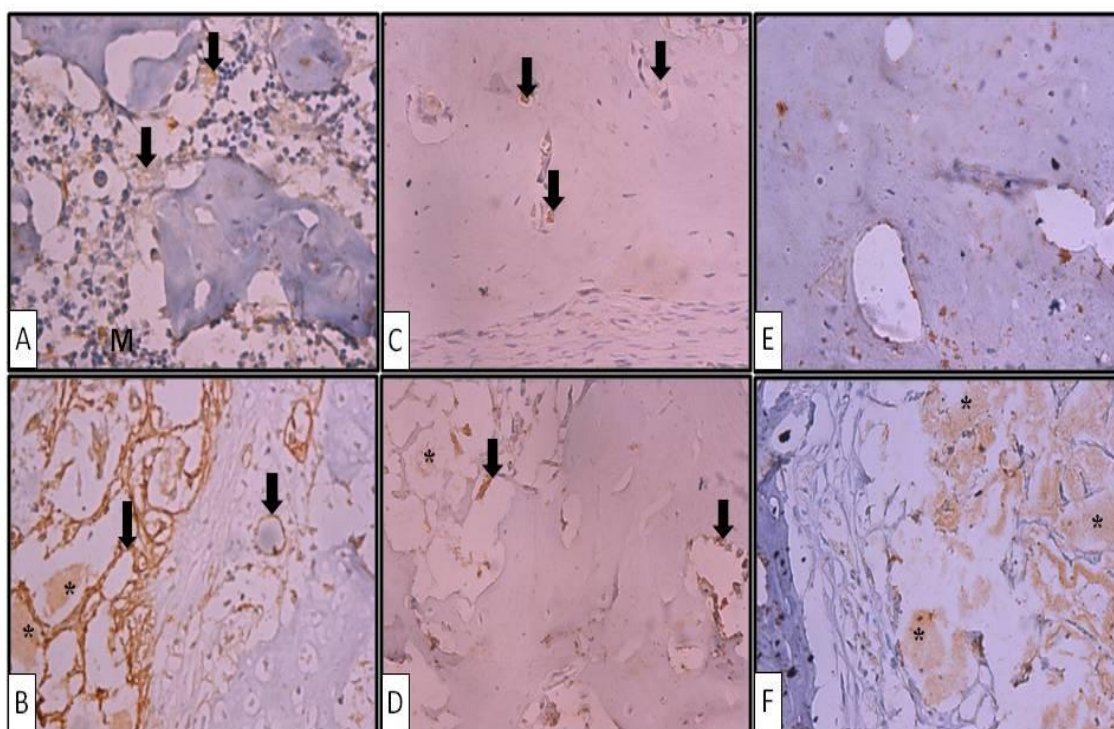


Figura 8. Imunoexpressão de COX-2 (seta), partículas de biomaterial (*), tecido medular (M). A: grupo controle 15 dias, B: grupo *scaffold* de Biosilicato® 15 dias, C: grupo controle 30 dias, D: grupo *scaffold* de Biosilicato® 30 dias, E: grupo controle 45 dias, F: grupo *scaffold* de Biosilicato® 45 dias. (Aumento: 500X).

4.4.4.2. Expressão de RUNX-2

No primeiro período analisado, observou-se imunoexpressão de leve a moderada de RUNX-2, principalmente no tecido medular do grupo controle (Figura 9A). Na análise do grupo *scaffold* de Biosilicato®, foi evidenciada moderada imunoexpressão de RUNX-2 (Figura 9B). Trinta dias após a cirurgia, uma leve imunomarcção de RUNX-2 foi observada tanto no grupo controle quanto no grupo *scaffold* de Biosilicato® (Figuras 9C e 9D). No período de 45 dias após a lesão, não foi encontrada

imunoposição de RUNX-2 no grupo controle (Figura 9E). No entanto, uma leve imunomarcção estava presente no grupo *scaffold* de Biosilicato[®] (Figura 9F).

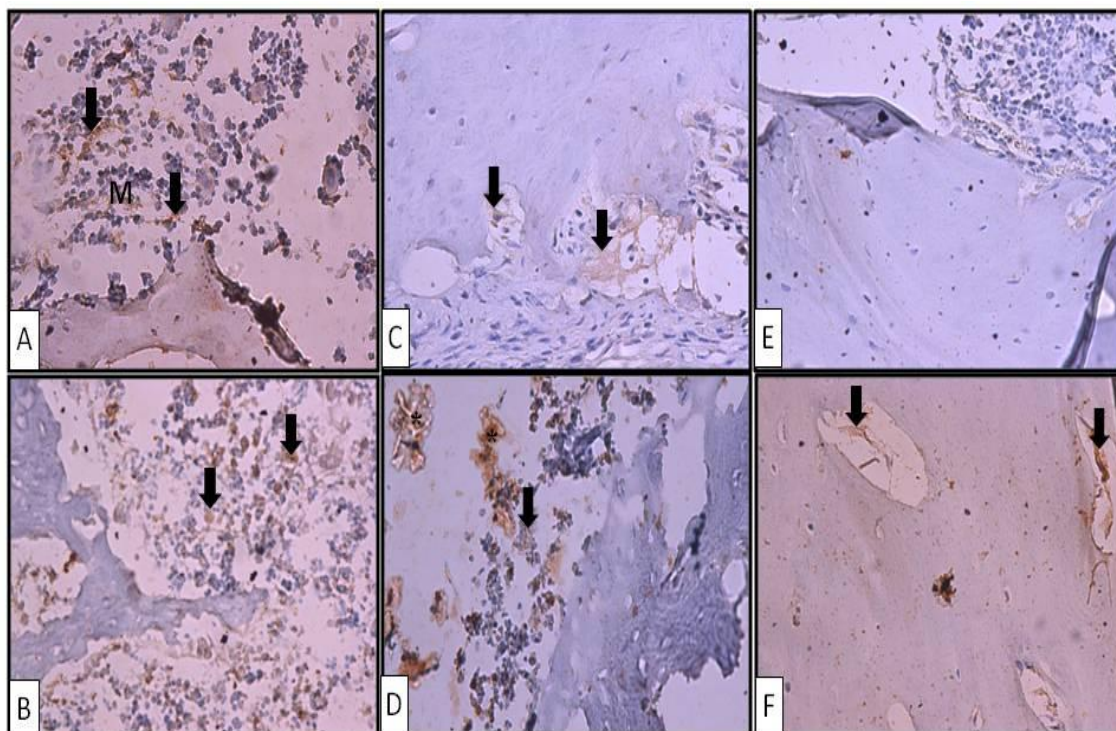


Figura 9. Imunoposição de RUNX-2 (seta), partículas de biomaterial (*), tecido medular (M). A: grupo controle 15 dias, B: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] 15 dias, C: grupo controle 30 dias, D: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] 30 dias, E: grupo controle 45 dias, F: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] 45 dias. (Aumento: 500X).

4.4.4.3. Expressão de RANKL

A figura 10 apresenta a análise imunistoquímica do RANKL. No primeiro período avaliado observou-se imunoposição no grupo controle, enquanto que a expressão observada no grupo *scaffold* de Biosilicato[®] foi moderada (Figuras 10A e 10B). Trinta dias após a cirurgia, foi encontrada leve imunoposição de RANKL em

ambos os grupos (Figuras 10C e 10D). Quarenta e cinco dias após a cirurgia, tanto o grupo controle quanto o *scaffold* de Biosilicato[®] demonstraram leve imunoposição do RANKL (Figuras 10E e 10F).

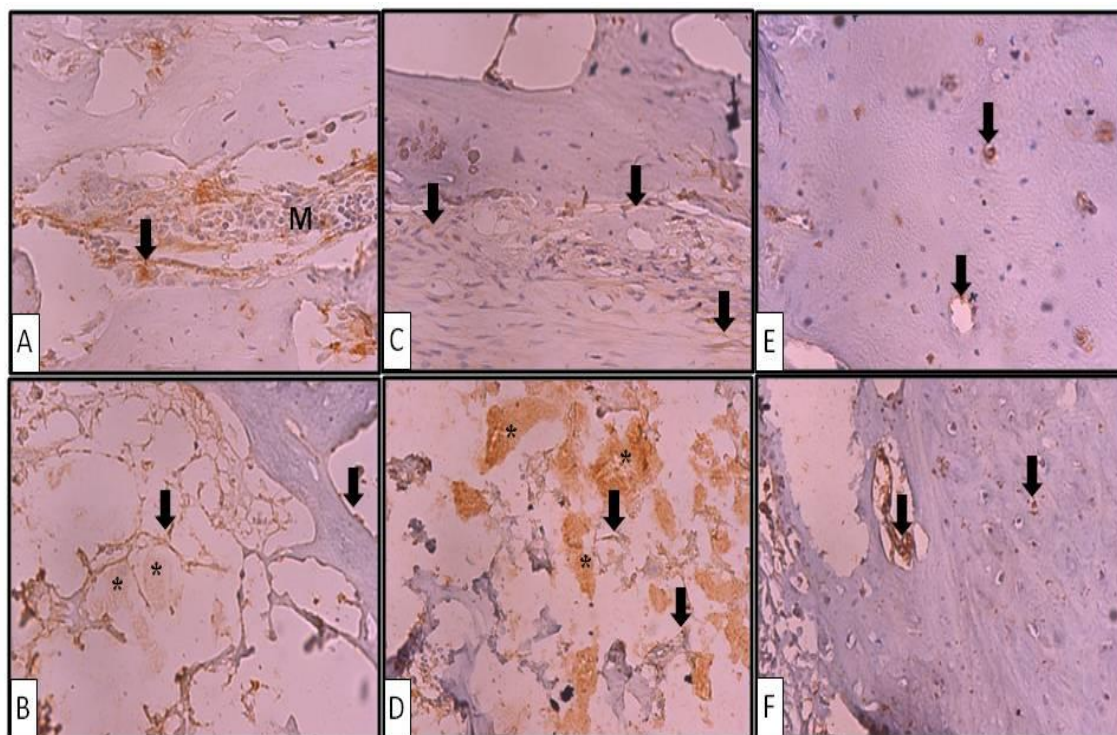


Figura 10. Imunoexpressão de RANKL (seta), partículas de biomaterial (*), tecido medular (M). A: grupo controle 15 dias, B: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] 15 dias, C: grupo controle 30 dias, D: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] 30 dias, E: grupo controle 45 dias, F: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] 45 dias. (Aumento: 500X).

4.4.4.4. Expressão de BMP-9

Quinze dias após a cirurgia, leve imunoposição da BMP-9 pode ser detectada em ambos os grupos (Figuras 11A e 11B). O mesmo ocorreu ao 30º dia de pós-operatório, no qual a imunoposição da BMP-9 foi leve nos animais dos grupos

controle e *scaffold* de Biosilicato[®] (Figuras 11C e 11D). Ao 45º dia após a lesão, não houve expressividade deste imunomarcador no grupo controle (Figura 11E). No entanto, no mesmo período, leve imunoexpressão do BMP-9 pode ser notada no grupo *scaffold* de Biosilicato[®] (Figura 11F).

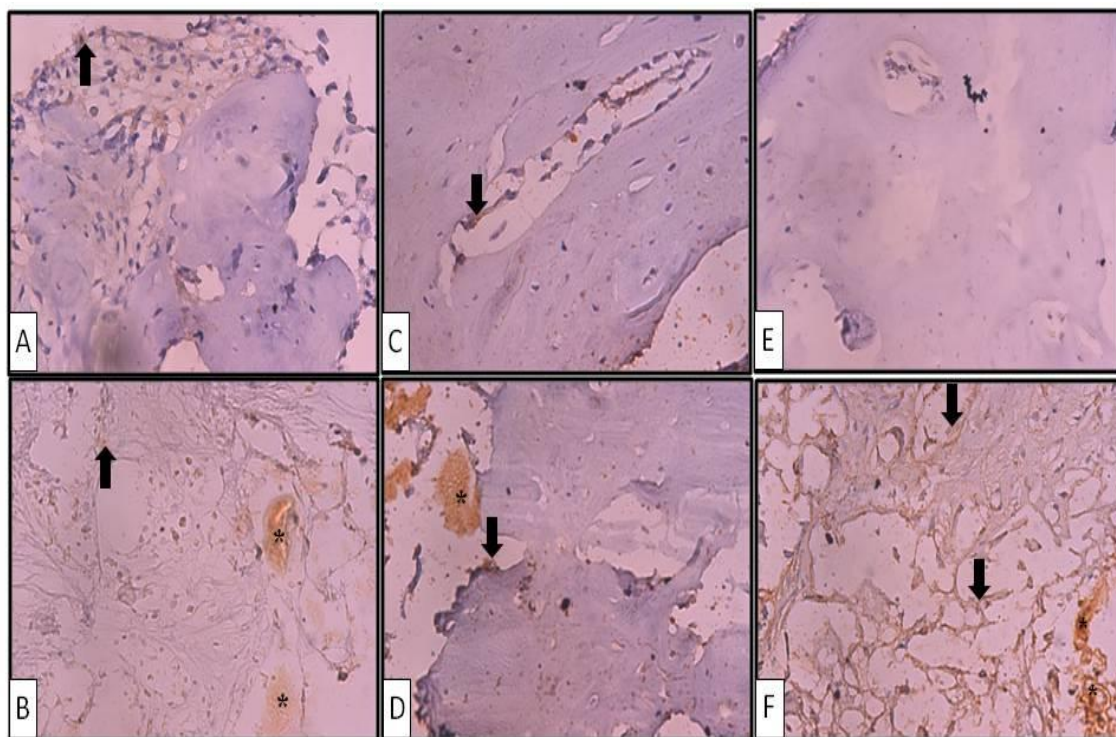


Figura 11. Imunoexpressão de BMP-9 (seta), partículas de biomaterial (*), tecido medular (M). A: grupo controle 15 dias, B: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] 15 dias, C: grupo controle 30 dias, D: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] 30 dias, E: grupo controle 45 dias, F: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] 45 dias. (Aumento: 500X).

4.4.5. Análise Biomecânica

Quinze dias após a cirurgia, não foi observada diferença estatisticamente significativa para a variável carga máxima entre os grupos controle e *scaffold* de

Biosilicato[®]. Porém, ao 30º e 45º dias após a lesão, os animais que receberam implantes de *scaffold* de Biosilicato[®] obtiveram valores estatisticamente menores de carga máxima quando comparados aos animais do grupo controle (Figura 12). Entretanto, para a variável resiliência, não foi encontrada diferença estatística entre os grupos, em qualquer período avaliado (Figura 13).

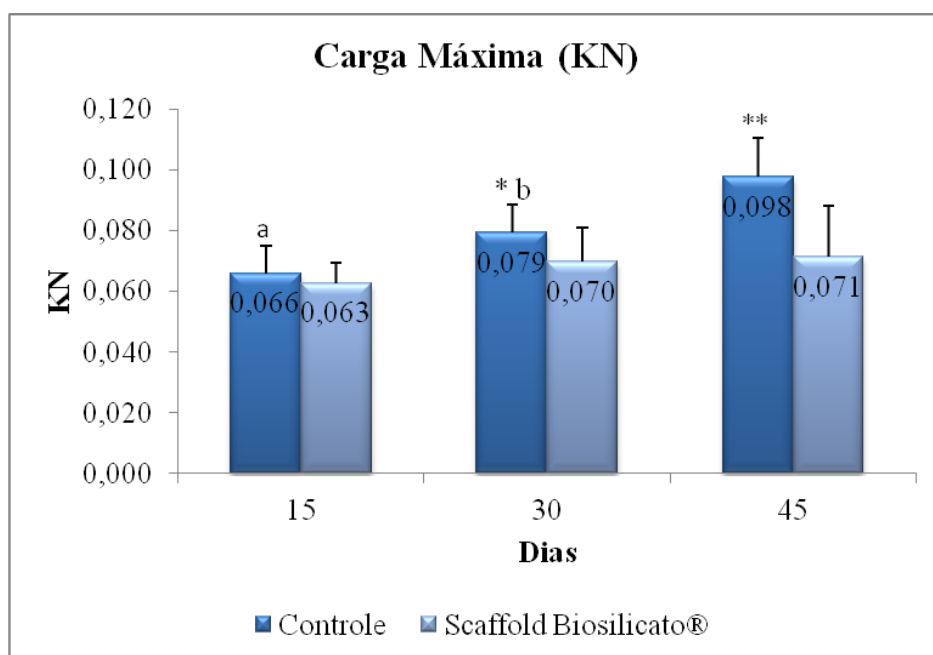


Figura 12. Médias e DP da carga máxima. * Controle *versus scaffold* de Biosilicato[®] aos 30 dias pós-cirurgia; ** controle *versus scaffold* de Biosilicato[®] aos 45 dias pós-cirurgia; grupo controle: a 15 dias *versus* 30 e 45 dias; b 30 dias *versus* 45 dias.

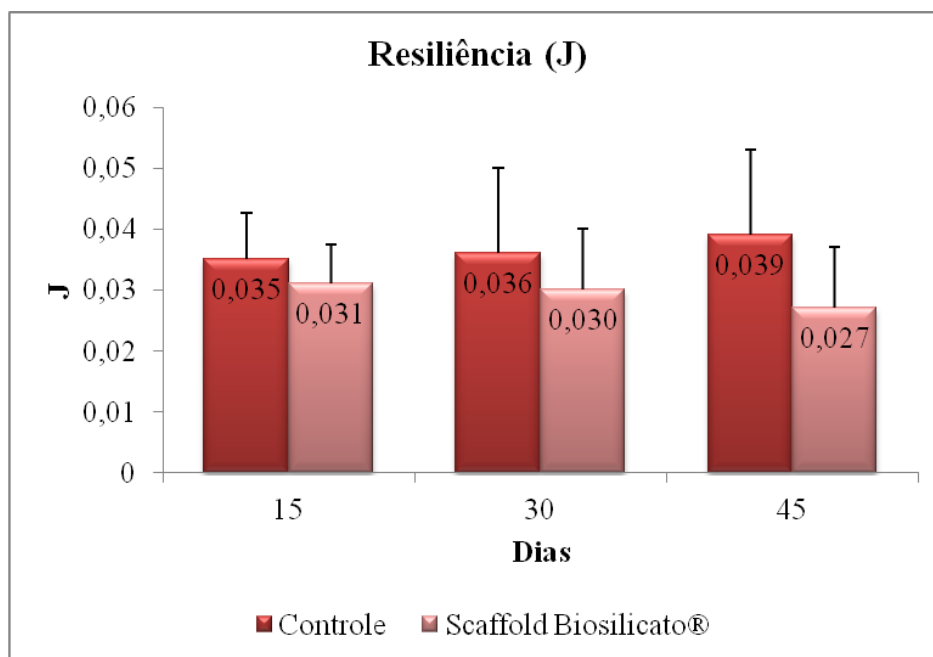


Figura 13. Médias e DP de resiliência.

4.5. DISCUSSÃO

A suplementação biológica de estratégias tradicionalmente utilizadas deve ser implementada no tratamento de fraturas ósseas, especialmente naquelas com atraso no processo de consolidação (HOLLINGER *et al.*, 2008). Recentemente, inúmeros tratamentos são propostos para fraturas persistentes, como, por exemplo, o implante de biovidros osteogênicos, cerâmicas e laserterapia (GAUTHIER *et al.*, 2005). Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar se *scaffolds* feitos de um novo biomaterial osteogênico (Biosilicato®) são capazes de melhorar o reparo ósseo de defeitos tibiais em ratos.

A análise histológica revelou que o grupo *scaffold* de Biosilicato® apresentou neoformação óssea justaposta a superfície do biomaterial em todos os períodos avaliados (15, 30 e 45 dias após a cirurgia). Aos 30° e 45° dias após a cirurgia,

observamos um osso neoformado mais organizado em torno das partículas de biomaterial em relação ao grupo controle, reiterando o efeito osteogênico do Biosilicato[®] e sugerindo sua eficácia na consolidação óssea quando apresentado na forma de *scaffold*. Estes achados estão de acordo com o conceito de vidros ou vitrocerâmicas bioativos, o qual se baseia na rápida deposição de uma camada de hidroxicarbonatoapatita (HCA) na superfície do material como resultado de trocas iônicas de cálcio e sílica, após um vidro bioativo entrar em contato com tecidos vivos (HENCH, 2003). Reações inorgânicas, previamente descritas por Hench (2003), levam ao rápido crescimento da camada de HCA na superfície do material bioativo e, conseqüentemente, a uma rápida proliferação de osso adjacente a este, um processo denominado osteoprodução.

Nossos achados *in vivo* estão de acordo com os resultados obtidos em estudos prévios *in vitro* e *in vivo* (MOURA *et al.*, 2007; BOSSINI *et al.*, 2011; GRANITO *et al.*, 2011). Moura *et al.* (2007) concluíram que peças cilíndricas densas de Biosilicato[®] promoviam a osteogênese de células osteoblásticas e produziam áreas significativamente maiores de matriz calcificada na sua superfície em comparação ao seu vidro precursor e o *Bioglass*[®] 45S5. Em um estudo *in vivo*, foi demonstrado que o Biosilicato[®] particulado foi eficiente para induzir a neoformação óssea e aumentar as propriedades biomecânicas do calo de fratura 20 dias após a cirurgia de defeito ósseo cilíndrico em tíbias de ratos (GRANITO *et al.*, 2011).

Além disso, a análise imunohistoquímica evidenciou expressão da COX-2 nos grupos *scaffold* de Biosilicato[®] no 15º e 30º dia após a cirurgia. A ciclo oxigenase é uma enzima essencial na conversão do ácido araquidônico em prostanóides. Particularmente a expressão da isoforma ciclo oxigenase-2 é relevante para muitos processos patológicos, incluindo a inflamação e reparação tecidual (MATSUMOTO *et al.*, 2009).

A elevada expressão de COX-2 aumenta o potencial osteoblástico de células-tronco mesenquimais e estimula sua diferenciação em osteoblastos, como resposta a sinais osteogênicos. Além disso, a COX-2 é necessária para a osteoclastogênese e osteólise (ZHANG *et al.*, 2001). Somando-se a reabsorção, durante a lesão óssea, a COX-2 também exerce o seu efeito através da regulação dos fatores de transcrição RUNX-2 e osterix (ZHANG *et al.*, 2002). O RUNX-2 é fundamental para a diferenciação dos osteoblastos e osteogênese, além de modular a diferenciação de condrócitos e osteoblastos e a expressão de muitos genes de proteínas de matriz extracelular durante a diferenciação dos condrócitos e osteoblastos (KOMORI, 2009).

Assim, podemos sugerir que a neoformação óssea observada nos animais tratados com *scaffold* de Biosilicato[®] pode ser resultado das expressões constantes de COX-2 e RUNX-2 induzidas pelo biomaterial durante o processo de consolidação tecidual, suportando a hipótese de que este material apresenta uma capacidade osteogênica.

Da mesma forma, o RANKL é um ligante do *receptor activator of nuclear factor κ - β* (RANK) e da osteoprotegerina (OPG) e atua como um fator chave para a diferenciação e ativação dos osteoclastos (KEARNS; KHOSLA; KOSTENUIK, 2008; ANANDARAJAH, 2009).

Nossa análise imunoistoquímica revelou imunomarcagem positiva do RANKL nas células em torno das partículas de Biosilicato[®] em todos os períodos avaliados, sugerindo que houve uma maturação e remodelação óssea, com osteoclastos aderindo continuamente à superfície do Biosilicato[®], na tentativa de degradar e fagocitar o material. Achados similares foram descritos por Kondo *et al.* (2005) que mostraram a imunomarcagem constante de *tartrate-resistant acid phosphatase* (TRAP) nos dias 4, 7,

14, 28 e 56 em torno de partículas de b-tricálcio fosfato (b-TCP), após implantação no côndilo femoral de ratos, indicando uma ação contínua dos osteoclastos.

Sobre o papel das BMPs na cicatrização óssea, evidências sugerem que estas proteínas podem estimular a diferenciação de células mesenquimais na linhagem osteogênica/condrogênica, assim como aumentar a expressão de fosfatase alcalina e osteocalcina (PROFF; RÖMER, 2009). Além disso, as BMPs também atuam na remodelação óssea através da regulação da atividade de reabsorção óssea pelos osteoclastos (KOCHANOWSKA *et al.*, 2007). Finalmente, um estudo recente demonstrou que a BMP-9 é uma das BMPs com maior potencial osteoindutivo (KANG *et al.*, 2004).

No presente estudo, a análise imunohistoquímica mostrou que a BMP-9 pode ser observada na mesma intensidade para ambos os grupos ao 15° e 30° dia pós-cirurgia. No entanto, ao 45° dia, a imunoexpressão da BMP-9 estava presente somente no grupo *scaffold* de Biosilicato[®]. A partir desses resultados, é possível hipotetizarmos que as partículas do Biosilicato[®], que ainda estavam presentes no local do defeito aos 45 dias após a lesão, tiveram um potencial osteogênico e estimularam a expressão da BMP-9 até este período.

Os efeitos dos implantes de biocerâmicas na expressão da BMP-9 não foram descritos na literatura até o momento. No entanto, Okabe *et al.* (2010) encontraram imunomarcção significativamente maior de BMP-2 em defeitos no osso nasal de coelhos preenchidos por α -fosfato tricálcico (α -TCP) comparados aos controles, nos períodos de 4 e 12 semanas após o implante, sugerindo um potencial osteogênico deste material.

Neste estudo não foi encontrado aumento nas propriedades biomecânicas do calo ósseo de animais tratados com *scaffold* de Biosilicato[®]. Sabe-se que a força do osso

depende da quantidade de massa óssea, bem como da qualidade e organização dos seus elementos microestruturais (OLIVERA *et al.*, 2008).

Portanto, é possível que a limitação na capacidade de suporte de carga evidente no grupo tratado com o *scaffold* de Biosilicato[®] ao 30º e 45º dias após a cirurgia esteja relacionada com uma menor quantidade e distribuição espacial do osso neoformado no defeito deste grupo, uma vez que os *scaffolds* implantados apresentavam percentual médio de macroporosidade de 15% e de porosidade total de 44% (Tabela 1).

Assim, as áreas restritas de neoformação óssea apenas nas porosidades do *scaffold* pode ter limitado a quantidade total de osso neoformado no defeito ósseo deste grupo experimental. Por sua vez, esta menor quantidade de tecido ósseo no interior do defeito pode ter comprometido os valores obtidos de propriedades mecânicas pelo grupo *scaffold* de Biosilicato[®]. Porém, a razão desses resultados não está, até o presente momento, devidamente esclarecida.

Além disso, é possível que tais limitações quanto às propriedades biomecânicas também estejam relacionadas com a apresentação da vitrocerâmica em forma de *scaffold*, o que permitiria a propagação de trincas ao longo do material, diferente do Biosilicato[®] particulado já testado em outros estudos do nosso grupo de pesquisa (GRANITO *et al.*, 2009; GRANITO *et al.*, 2011; BOSSINI *et al.*, 2011). Na aplicação do biomaterial particulado, é admissível que as partículas do Biosilicato[®] tenham sido envolvidas pelo osso neoformado, preenchendo tanto a cortical, onde se localiza o defeito ósseo, quanto a cavidade medular abaixo deste, o que pode ter permitido a formação de osso no interior da cavidade medular, resultando em uma região do defeito com maior massa óssea e, portanto, maior resistência mecânica.

Finalmente, no caso do *scaffold* do Biosilicato[®] utilizado neste estudo, apesar dos microcanais interconectados terem sido preenchidos com tecido de granulação e

osso neoformado, os microporos fechados e as microtrincas existentes nos grãos de Biosilicato[®] (Figuras 6E e 6F) podem ter atuado como concentradores de tensão, causando a propagação de trincas através do material e, conseqüentemente, a precocidade da ruptura da tíbia durante o ensaio mecânico.

A metodologia utilizada neste estudo está de acordo com os estudos prévios descritos na literatura (YAIOTA *et al.*, 2000; LIRANI-GALVÃO; JORGETTI; DA SILVA, 2006). O modelo de defeitos ósseos tem sido utilizado por muitos autores (LIRANI-GALVÃO; JORGETTI; DA SILVA, 2006; GRANITO *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010; FÁVARO-PIPI *et al.*, 2011). O uso de *scaffolds* de biomateriais para preenchimento de defeitos ósseos também parece ser um modelo adequado, já que os biomateriais na forma de *scaffolds* vêm sendo testados em estratégias de regeneração óssea, uma vez que podem servir como um guia para o crescimento do tecido ósseo, além de permitirem o fornecimento de sangue e nutrientes para as células que estão no seu interior (DAVIES *et al.*, 2008).

4.6. CONCLUSÃO

Baseado nos resultados deste estudo, podemos concluir que o implante de *scaffold* de Biosilicato[®] foi eficaz em melhorar os aspectos histológicos do tecido ósseo em consolidação, assim como promoveu o aumento da expressão de fatores relacionados ao processo de reparo tecidual e atividade celular, porém, não foi capaz de melhorar suas propriedades mecânicas no período experimental avaliado.

5. ESTUDO 2

“Terapia *laser* de baixa intensidade potencializa a expressão de diferentes fatores osteogênicos durante o reparo ósseo em ratos”

5.1. RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar as mudanças temporais-espaciais na histologia, morfometria, propriedades biomecânicas e imunexpressão de fatores osteogênicos em defeitos ósseos tratados com terapia *laser* de baixa intensidade (LLLT). Apesar dos efeitos positivos da LLLT na regeneração de tecidos, não estão completamente elucidadas por quais vias moleculares a irradiação *laser* atua no metabolismo do tecido ósseo em consolidação. Sessenta ratos machos *Wistar* com defeitos tíbiais bilaterais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais: grupo *laser* e grupo controle. O tratamento com irradiação *laser* (830nm, 120J/cm², 100mW) teve início imediatamente após a cirurgia dos defeitos ósseos e foram realizadas 8, 15 ou 23 sessões, com um intervalo de 48h entre elas. Os animais foram sacrificados nos dias 15, 30 e 45 pós-lesão. As análises histológica e morfométrica revelaram que os animais tratados apresentaram melhor organização tecidual aos 15° e 30° dias de pós-operatório, e maior área de osso neoformado no 15° dia. A imunohistoquímica mostrou que a irradiação *laser* produziu maior expressão de COX-2 no 15° dia pós-operatório, imunexpressão positiva de RUNX-2 durante todos os períodos avaliados, maior imunexpressão de BMP-9 no 30° dia após a cirurgia e maior imunorreatividade do RANKL no 15° dia. No entanto, a irradiação *laser* não promoveu aumento estatisticamente significativo nas propriedades biomecânicas do calo ósseo em comparação aos animais não tratados. Nossos resultados sugerem que a LLLT melhorou o processo de consolidação óssea, acelerando o desenvolvimento do osso neoformado e ativando fatores osteogênicos nos defeitos ósseos tíbiais de ratos, mas não foi capaz de melhorar suas propriedades biomecânicas.

Palavras-chave: reparo ósseo, defeito ósseo, terapia *laser* de baixa intensidade, análise imunohistoquímica, estudo *in vivo*

5.2. INTRODUÇÃO

Diversas abordagens clínicas inovadoras vêm sendo desenvolvidas para o reparo das lesões ósseas, entre as quais está a terapia *laser* de baixa intensidade (LLLT)

(OLIVEIRA *et al.*, 2011). A LLLT é uma modalidade comumente usada para tratar diferentes alterações do sistema musculoesquelético e também parece ter um potencial osteogênico (RENNÓ *et al.*, 2007; HOU *et al.*, 2008; FAVARO-PIPI *et al.*, 2011). Efeitos bioestimulatórios da LLLT nas células ósseas foram relatados em tanto em estudos *in vivo* (FÁVARO-PIPI *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2011) quanto *in vitro* (RENNÓ *et al.*, 2007; FUJIMOTO *et al.*, 2010).

Em recentes estudos *in vitro*, Fujimoto *et al.* (2010) e Kiyosaki *et al.* (2010) observaram que a LLLT estimulou a formação de nódulos ósseos via aceleração da proliferação e diferenciação celular, acompanhados por um aumento da produção de Fator de Crescimento do Tipo Insulina 1 (IGF-I) e BMPs, da atividade de fosfatase alcalina (ALP) e da expressão de osteocalcina e RUNX-2 em osteoblastos.

Além disso, a LLLT é capaz de otimizar o processo de reparo de fraturas em coelhos e ratos, aumentando o volume do calo e a densidade mineral óssea (LIU *et al.*, 2007; RIBEIRO; MATSUMOTO, 2008). Fávaro-Pipi *et al.* (2010) mostraram que o *laser* 830nm promoveu efeitos positivos na consolidação tecidual, com intensa neoformação óssea envolta por tecido conjuntivo altamente vascularizado e grande quantidade de osso neoformado. Similarmente, Ribeiro e Matsumoto (2008) identificaram um aumento da expressão de ciclo oxigenase-2 (COX-2) em células ósseas decorrente da irradiação *laser*, o que resultou em melhor reparo ósseo de defeitos tibiais de ratos. Além disso, parece que a LLLT é capaz de aumentar a expressão dos genes de BMP-4, ALP e RUNX-2 durante o processo de cicatrização óssea em defeitos tibiais em ratos (FÁVARO-PIPI *et al.*, 2011).

No entanto, o mecanismo pelo qual a LLLT age nas células e cicatrização óssea não é totalmente compreendido e, para muitos, o uso da LLLT como modalidade de tratamento ainda é controverso (COOMBE *et al.*, 2001). Deste modo, há uma

necessidade clínica evidente de compreender as vias moleculares e celulares que conduzem a formação óssea após a irradiação *laser* (KHOSLA; WESTENDORF; OURSLER, 2008).

Sabe-se que a consolidação óssea é um processo complexo com interação temporal e espacial de osteoclastos e osteoblastos, regulado por uma série de moléculas de sinalização celular, citocinas, proteínas e fatores de crescimento que modulam a osteoprodução visando criar uma massa biológica e mecanicamente competente (BRICK *et al.*, 2009).

Perante a ocorrência de uma lesão óssea, uma sequência de eventos é desencadeada no processo de reparo tecidual, sendo que uma das primeiras etapas é instalação de uma resposta inflamatória (LI; BURR; TURNER, 2002; SIMON; MANIGRASSO; O'CONNOR, 2002). A ciclo oxigenase é uma enzima essencial para o processo inflamatório, promovendo a conversão de ácido araquidônico em prostaglandinas (KARGMAN *et al.*, 1996). No reparo ósseo, a expressão da isoforma COX-2 aumenta durante as duas primeiras semanas após a fratura e tem um papel essencial na maturação dos osteoblastos (DUCY *et al.*, 1997; ZHANG *et al.*, 2002). Além disso, a COX-2 também regula alguns fatores de transcrição, como o *runt-related transcription factor-2* (RUNX-2). O RUNX-2 é um fator de transcrição multifuncional que controla o desenvolvimento esquelético, atuando na diferenciação de condrócitos e osteoblastos e na expressão de vários genes de proteínas da matriz extracelular durante esta diferenciação (KOMORI, 2009).

Do mesmo modo, as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) estão envolvidas na diferenciação dos osteoblastos e regeneração óssea. As BMPs são membros da superfamília de moléculas sinalizadoras *transforming growth factor* (TGF) e atuam na regulação do desenvolvimento embrionário (RAWOOL *et al.*, 2003; TSUMAKI *et al.*,

2004). Além disso, evidências sugerem que as BMPs apresentam propriedades quimiotáticas para estimular a diferenciação de células mesenquimais na linhagem osteogênica/condrogênica e aumentar a expressão de fosfatase alcalina e osteocalcina (MAYR *et al.*, 2001). Ainda, as BMPs contribuem com a remodelação óssea regulando a atividade de reabsorção tecidual dos osteoclastos (STEIN *et al.*, 2008).

Os osteoclastos são células multinucleadas responsáveis pela reabsorção óssea. A descoberta do *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand* (RANKL), um membro da superfamília de fatores de necrose tumoral (TNF) (ANDERSON *et al.*, 1997; WONG *et al.*, 1997) expresso na superfície de células estromais e dos osteoblastos, que estimula a diferenciação dos osteoclastos, ajudou a elucidar os mecanismos de diferenciação e função osteoclástica (YASUDA *et al.*, 1998; SUDA *et al.*, 1999).

Apesar dos efeitos positivos da LLLT na regeneração de tecidos, não estão completamente elucidadas por quais vias moleculares a irradiação *laser* atua no metabolismo do tecido ósseo em consolidação. Portanto, é importante esclarecer os mecanismos pelos quais a laserterapia age na estimulação do metabolismo ósseo.

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da terapia *laser* sobre o reparo ósseo, caracterizando o padrão temporal-espacial da histologia, morfometria e propriedades biomecânicas do calo ósseo, assim como a imunoexpressão dos fatores osteogênicos COX-2, RUNX-2, RANKL e BMP-9 durante a consolidação de defeitos ósseos em tíbias de ratos.

5.3. MATERIAIS E MÉTODOS

5.3.1. Animais Experimentais

Ratos machos da linhagem *Wistar* (12 semanas de idade, peso médio de 280g, n = 60) foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos, grupo controle (CG) e grupo *laser* (GL) (cada grupo, n = 30). Os animais foram mantidos sob temperatura controlada ($24 \pm 2^\circ\text{C}$), períodos de claro-escuro de 12 horas, e acesso irrestrito à água e ração comercial. A manipulação dos animais e os procedimentos cirúrgicos foram realizados estritamente de acordo com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) (Parecer 002/2009). Conforme descrito abaixo, foram realizados defeitos ósseos em ambas as tíbias. Os animais foram eutanasiados 15, 30 e 45 dias após a cirurgia.

5.3.2. Procedimento Cirúrgico

Defeitos ósseos bilaterais de tamanho não-crítico foram realizados cirurgicamente no terço superior da tíbia (10mm distais à articulação do joelho). A cirurgia foi realizada sob condições estéreis e com anestesia geral induzida pela injeção intraperitoneal de xilazina (Syntec[®], 10 mg/kg) e ketamina (Agener[®], 80 mg/kg). O compartimento medial da tíbia foi exposto através de uma incisão longitudinal na pele previamente tricotomizada. Um defeito ósseo padrão de 3.0mm de diâmetro foi criado usando uma broca motorizada (BELTEC[®], Araraquara, São Paulo, Brasil) (13.500 rpm), sob irrigação abundante com solução salina. O retalho cutâneo foi reposicionado e

suturado com fio cirúrgico de náilon monofilamentar 4.0 (Shalon[®]) e a pele foi desinfetada com iodopovidona. O estado de saúde dos ratos foi monitorado diariamente.

5.3.3. Tratamento

Os tratamentos tiveram início imediatamente após a cirurgia dos defeitos ósseos e foram realizadas 8, 15 ou 23 sessões de irradiação *laser*, com um intervalo de 48h entre elas. Neste estudo foi utilizado um *laser* de diodo com meio ativo composto por arseneto de gálio e alumínio (As-Ga-Al) (Tera laser[®], DMC, São Carlos, SP, Brasil) 830nm, diâmetro do feixe de 0,028 cm², 100mW, 3,57 W/cm², 120J/cm², 3,4 J, com um tempo de irradiação de 34s. O *laser* foi aplicado utilizando a técnica pontual em contato em um único ponto sobre a região do defeito ósseo. No 15º, 30º e 45º dia após a cirurgia, os ratos foram sacrificados com uma dose letal de anestésico, injetado via intraperitoneal. Ambas as tíbias foram dissecadas e removidas para análise.

5.3.4. Análise Histológica

As tíbias direitas foram removidas e fixadas em formalina tamponada a 10% (Merck[®], Darmstadt, Alemanha) por 48 horas, descalcificadas em EDTA a 4% (Merck[®]) e incluídas em blocos de parafina. Foram obtidos cortes seriados de 5µm de espessura cortados longitudinalmente em relação à tíbia onde foi realizado o defeito ósseo e corados com HE (Merck[®]).

Para a avaliação histológica, utilizou-se um microscópio de luz (Olympus, Optical Co. Ltd, Tóquio, Japão) sob um aumento de 40X. A presença de processo

inflamatório, tecido de granulação, tecido ósseo neoformado e tecido necrótico foram investigados na região do defeito ósseo de cada animal.

5.3.5. Análise Morfométrica

A morfometria da área de osso neoformado da região do defeito ósseo de cada animal foi mensurada utilizando um sistema de análise de imagem Motican 5.0 (Meiji camera, USA). As lâminas foram coradas com Tricrômico de Masson (TM) e três campos pré-determinados da região do defeito de cada lâmina foram selecionados para análise: campos 1 (C1) e 2 (C2), próximos à borda esquerda do defeito ósseo, e campo 3 (C3), localizado na adjacência da margem direita do defeito ósseo. A área de osso neoformado presente nessas regiões foi mensurada e o campo fotografado com aumento de 10X. Após o registro, os valores de áreas foram somados e obteve-se o valor da área total de osso neoformado no interior do defeito (MATSUMOTO *et al.*, 2009).

5.3.6. Análise Biomecânica

As propriedades biomecânicas da tíbia esquerda foram determinadas por um teste de flexão de três pontos realizado em uma máquina de ensaio universal Instron® (EUA, modelo 4444, célula de carga de 1KN). As tíbias foram colocadas em um dispositivo de metal de 3,8cm de comprimento, que fornecia duplo apoio com 1,8cm de distância entre suas extremidades. A célula de carga foi posicionada perpendicularmente ao local exato do defeito ósseo. Uma pré-carga de 5N foi aplicada para evitar o deslizamento da amostra. Finalmente, a amostra foi submetida a uma força de flexão,

com taxa de deformação constante de 0,5cm/min até o momento da fratura. A partir da curva de carga-deformação, foram obtidos os valores de carga máxima (KN) e resiliência (J).

5.3.7. Análise Imunoistoquímica

Para a realização da avaliação imunohistoquímica, foram confeccionadas lâminas histológicas com cortes seriados de 5 μ m de espessura. A parafina foi removida com xilol e os cortes foram reidratados em etanol e, em seguida, imersos em solução de tampão citrato a 0,01M (pH 6,0) em microondas (850W) por três ciclos de cinco minutos cada para recuperação antigênica. O material foi pré-incubado com peróxido de hidrogênio a 0,3% em solução de tampão fosfato (PBS) por cinco minutos para inativação da peroxidase endógena e, na sequência, bloqueado em soro fetal bovino a 5%, diluído em solução de PBS por dez minutos.

As amostras foram incubadas com anti-COX-2 anticorpo primário policlonal (Santa Cruz Biotechnology, USA) na concentração de 1:200, anti-RUNX-2 anticorpo primário (Santa Cruz Biotechnology, USA) na concentração de 1:200, anti-RANKL anticorpo primário policlonal (Santa Cruz Biotechnology, USA) na concentração de 1:200 e anti-BMP-9 anticorpo primário policlonal (Santa Cruz Biotechnology, USA) na concentração de 1:200. A incubação foi realizada em refrigerador (a 4°C) por um período de 12 horas, seguida de dois banhos em solução de PBS, com duração de cinco minutos cada. Em seguida, os cortes foram incubados com biotina conjugada ao anticorpo secundário anti-IgG (imunoglobulina G) de coelho (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) na concentração de 1:200 em PBS por uma hora. Na sequência,

os cortes foram lavados duas vezes com PBS, seguido por aplicação de complexo pré-formado de avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories) por 45 minutos. Os complexos foram visualizados por meio da aplicação de solução de 3,3 diaminobenzidina a 0,05% e contra corados com Hematoxilina de Harris.

Para confirmação dos resultados, alguns cortes foram submetidos ao mesmo tratamento omitindo-se somente os anticorpos primários. Estes cortes serviram como controle negativo das reações. Além disso, foram realizados controles positivos internos em cada bateria da reação realizada.

5.3.8. Análise Estatística

Os dados foram analisados estatisticamente por meio de técnicas descritivas, na forma de médias e desvio-padrão. A normalidade da distribuição das variáveis foi verificada através do teste de Shapiro-Wilk's. Todas as variáveis apresentaram distribuição normal da amostra. As comparações entre os grupos foram feitas utilizando testes de análise de variância (ANOVA), complementada pelo teste *post-hoc* de Duncan. As análises foram realizadas no *software* STATISTICA versão 7.0 (StatSoft Inc.). Para as conclusões das análises estatísticas foi utilizado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

5.4. RESULTADOS

5.4.1. Achados Gerais

Não foram observadas complicações pós-operatórias nem mudanças de comportamento nos animais durante o período experimental. Os ratos voltaram rapidamente a sua dieta normal e não apresentaram perda de peso durante o experimento. Nenhum animal morreu durante o experimento e nenhuma infecção no sítio cirúrgico foi observada.

5.4.2. Análise Histológica

A figura 14 evidencia os resultados histológicos dos grupos controle e *laser*, durante os três períodos experimentais avaliados.

Quinze dias após a cirurgia, os defeitos do grupo controle estavam preenchidos por infiltrado inflamatório e pequena quantidade de tecido de granulação. Eventualmente foi observada neoformação óssea, sem trabéculas interligadas. Estes achados histológicos correspondem a uma fase intermediária do reparo tecidual (Figura 14A). No mesmo período, os animais irradiados com *laser* apresentavam neoformação óssea, com trabéculas interligadas e sem infiltrado inflamatório na região do defeito. Este grupo apresentou quantidade moderada de osso neoformado e melhor organização tecidual em relação ao grupo controle, correspondendo a um estágio mais avançado de reparação óssea (Figura 14B).

No 30º dia após a cirurgia, as bordas da lesão ainda eram observadas nos animais do grupo controle, com presença de quantidade moderada de osso neoformado circundado por tecido de granulação (Figura 14C). Por outro lado, a irradiação *laser*

promoveu moderada quantidade de neoformação óssea, com interconectividade das trabéculas e ausência de tecido de granulação, o que representa um estágio mais avançado de consolidação óssea em comparação ao grupo controle (Figura 14D).

No 45º dia, não foi observado nenhum sinal de inflamação ou presença de tecido de granulação nas amostras dos grupos controle e *laser*. No grupo controle, observamos grande quantidade de osso neoformado com trabéculas interligadas. Nos animais tratados com LLLT, encontramos características semelhantes as dos animais do grupo controle, o que corresponde a uma etapa final do reparo ósseo (Figuras 14E e 14F).

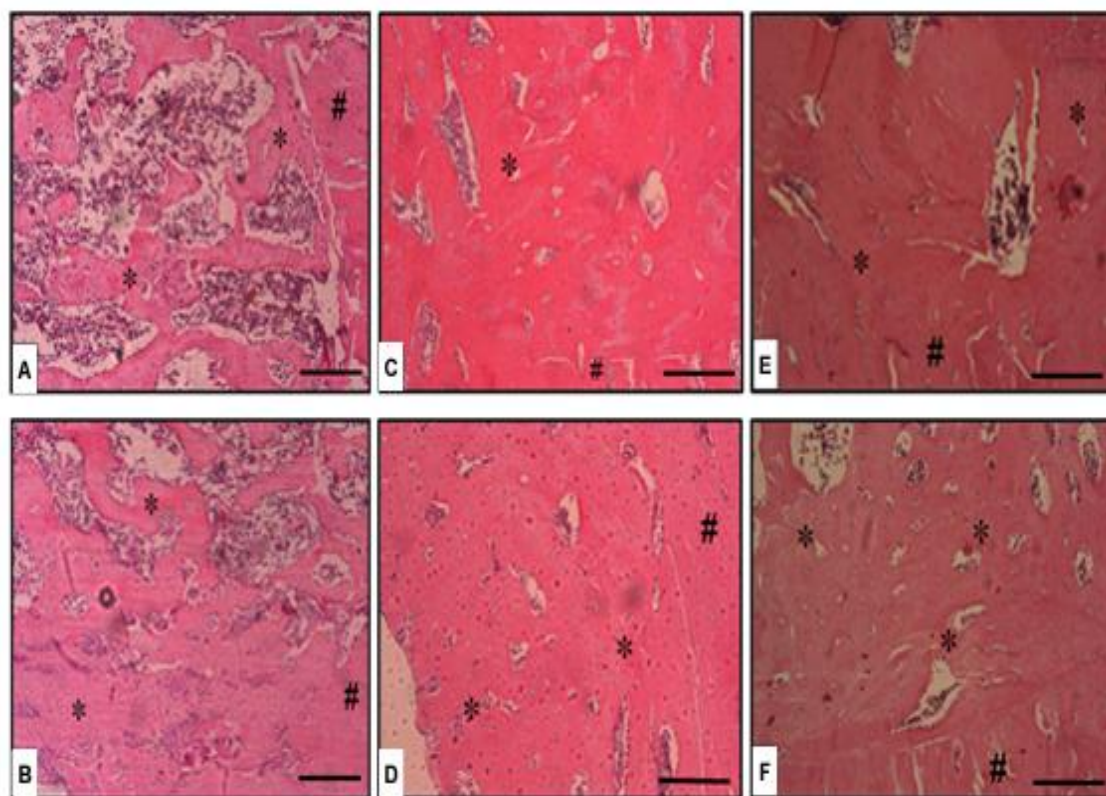


Figura 14. Osso intacto (#), osso neoformado (*). A: grupo controle 15 dias, B: grupo *laser* 15 dias, C: grupo controle 30 dias, D: grupo *laser* 30 dias, E: grupo controle 45 dias, F: grupo *laser* 45 dias. (Coloração: HE. Barra = 200µm).

5.4.3. Análise Morfométrica

A figura 15 ilustra a área de tecido ósseo neoformado dos dois grupos experimentais nos três períodos avaliados. Os animais expostos à LLLT apresentaram área de matriz óssea estatisticamente maior em relação ao controle no 15º dia após a lesão ($p < 0,05$). No entanto, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle e os grupos tratados com *laser* no 30º e 45º dia após a cirurgia ($p > 0,05$).

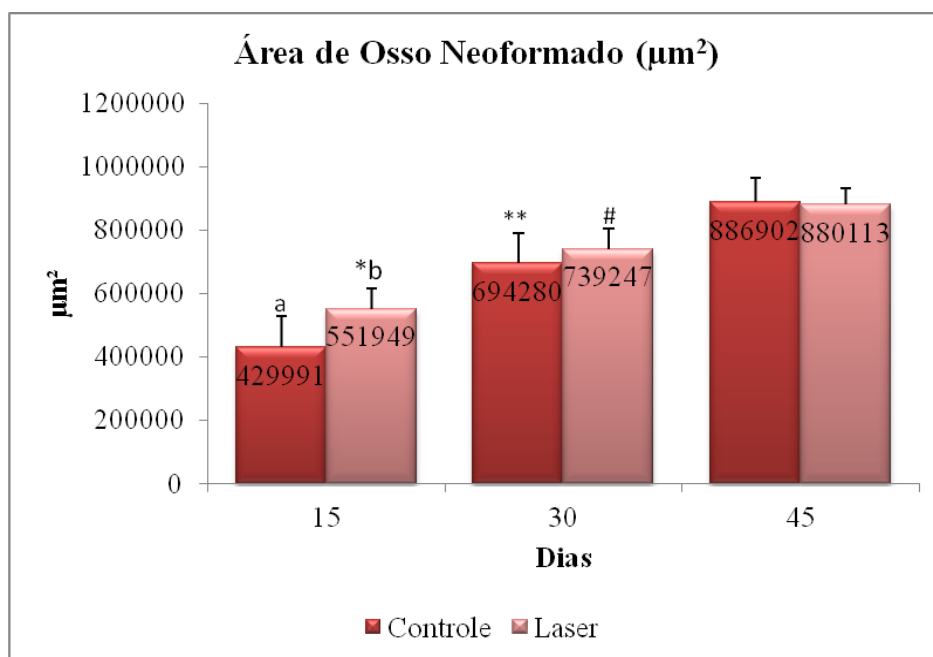


Figura 15. Médias e DP da área de osso neoformado (μm^2). * Grupo *laser* versus grupo controle, 15 dias pós-cirurgia. Grupo controle: a 15 dias versus 30 e 45 dias; ** 30 dias versus 45 dias. Grupos *laser*: b 15 dias versus 30 e 45 dias; # 30 dias versus 45 dias.

5.4.4. Análise Imunoistoquímica

5.4.4.1. Expressão de COX-2

Quinze dias após a cirurgia, a expressão da COX-2 foi detectada predominantemente no citoplasma celular. Os animais do grupo controle apresentaram uma leve expressão deste fator, principalmente no tecido medular (Figura 16A). No mesmo período, os animais do grupo *laser* demonstraram moderada imunoexpressão da COX-2 (Figura 16B). Trinta dias após a cirurgia, leve imunoexpressão de COX-2 pode ser observada tanto no grupo controle quanto no *laser* (Figuras 16C e 16D). No período de 45 dias após a cirurgia, não foi observada imunoexpressão de COX-2 em nenhum dos grupos experimentais (Figuras 16E e 16F).

Vale ressaltar que houve uma diminuição temporal da imunoexpressão da COX-2 nos dois grupos, porém destacamos a maior expressão no grupo *laser* 15 dias após a cirurgia, em comparação ao controle, e ausência de imunomarcagem 45 dias após a lesão óssea, o que provavelmente indica uma biomodulação precoce da LLLT na cicatrização óssea.

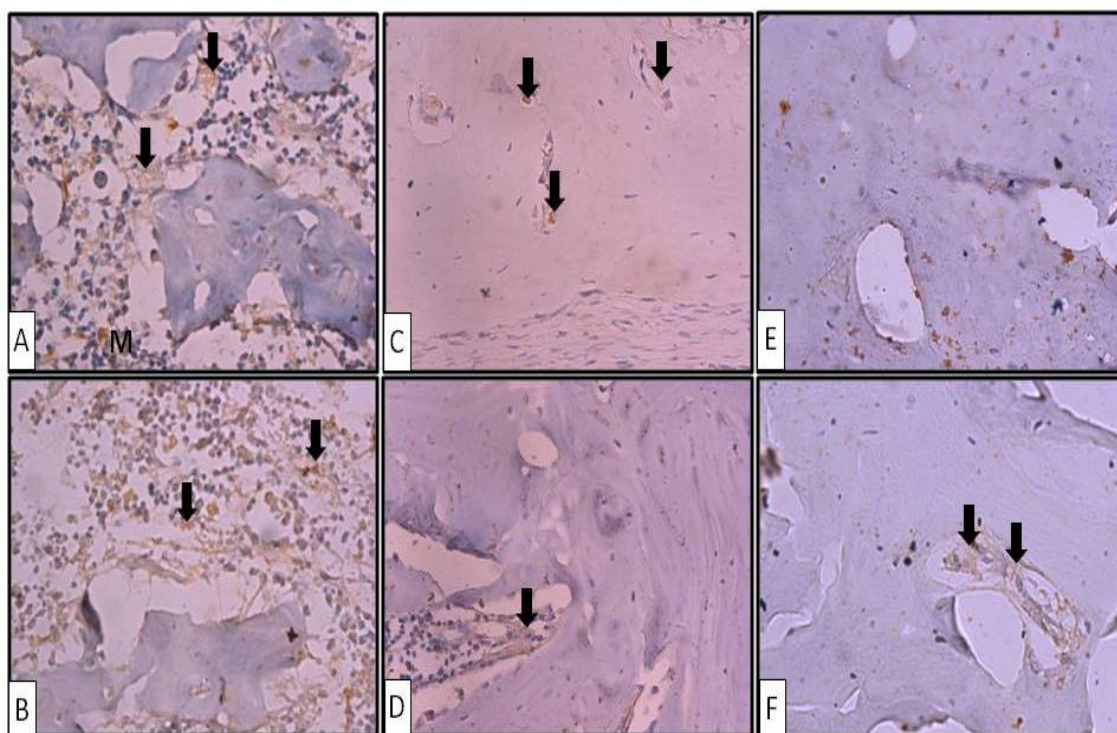


Figura 16. Imunoexpressão de COX-2 (seta), tecido medular (M). A: grupo controle 15 dias, B: grupo *laser* 15 dias, C: grupo controle 30 dias, D: grupo *laser* 30 dias, E: grupo controle 45 dias, F: grupo *laser* 45 dias. (Aumento: 500X).

5.4.4.2. Expressão de RUNX-2

No primeiro período analisado, observou-se moderada imunoexpressão de RUNX-2, principalmente no tecido medular do grupo controle (Figura 17A). Padrão semelhante ocorreu no grupo irradiado com *laser*, ou seja, células do tecido medular foram moderadamente marcadas para o RUNX-2 (Figura 17B). Trinta dias após a cirurgia, leve imunoexpressão de RUNX-2 foi observada em ambos os grupos (Figuras 17C e 17D). Em contraste, no período de 45 dias após a lesão, não foi encontrada

imunoeexpressão de RUNX-2 no grupo controle (Figura 17E), no entanto, uma leve imunomarcção de RUNX-2 foi observada no grupo *laser* (Figura 17F).

Analisando as mudanças temporais na expressão de RUNX-2, o grupo controle apresentou uma diminuição progressiva da expressão deste imunomarcador, atingindo o pico no 15º dia e com expressão ausente no 45º dia após a cirurgia. O grupo *laser* também atingiu o pico da imunoeexpressão do RUNX-2 no 15º dia de pós-operatório, no entanto, sua expressão se manteve presente até o último período avaliado.

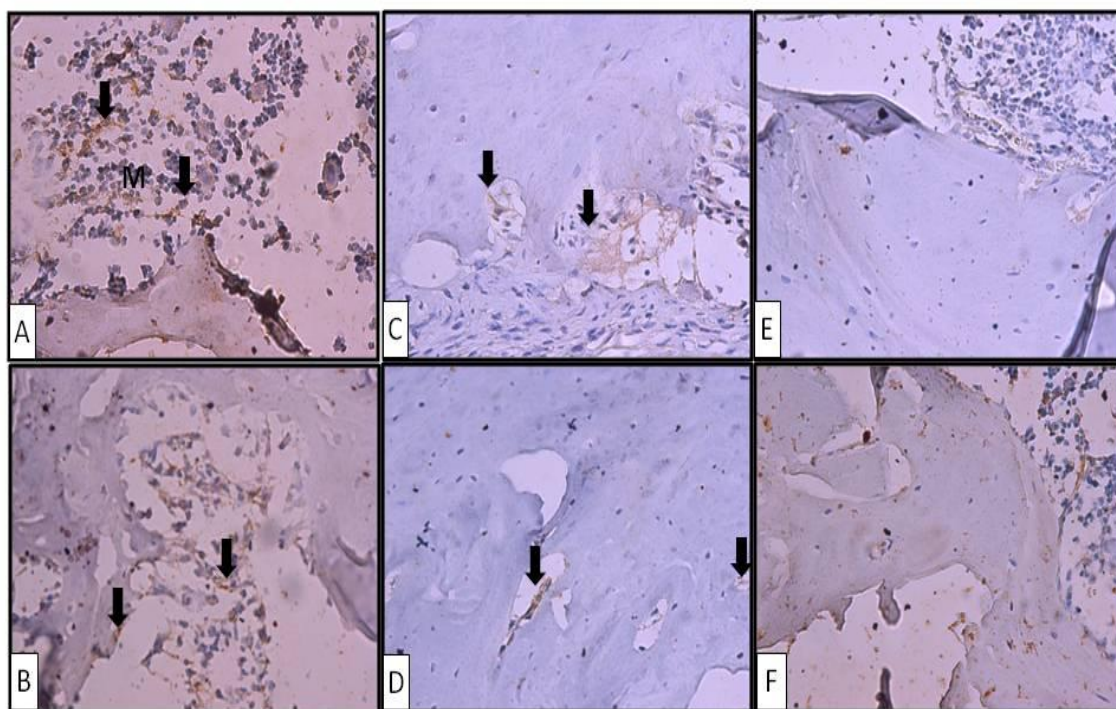


Figura 17. Imunoeexpressão de RUNX-2 (seta), tecido medular (M). A: grupo controle 15 dias, B: grupo *laser* 15 dias, C: grupo controle 30 dias, D: grupo *laser* 30 dias, E: grupo controle 45 dias, F: grupo *laser* 45 dias. (Aumento: 500X).

5.4.4.3. Expressão de BMP-9

A figura 18 ilustra a análise imunoistoquímica da BMP-9. Quinze dias após a cirurgia, observamos imunopressão leve da BMP-9 em ambos os grupos (Figuras 18A e 18B). Ao 30º dia após a lesão, a imunopressão da BMP-9 foi maior no grupo *laser* (moderada) do que no grupo controle (leve) (Figuras 18C e 18D). No entanto, não identificamos expressividade deste imunomarcador tanto no grupo controle quanto no *laser* ao 45º dia de pós-operatório (Figuras 18E e 18F).

É importante salientar que houve maior imunopressão da BMP-9 no grupo *laser*, em comparação ao controle, ao 30º dia após a cirurgia, porém sem diferenças entre os grupos nos outros dois períodos estudados.

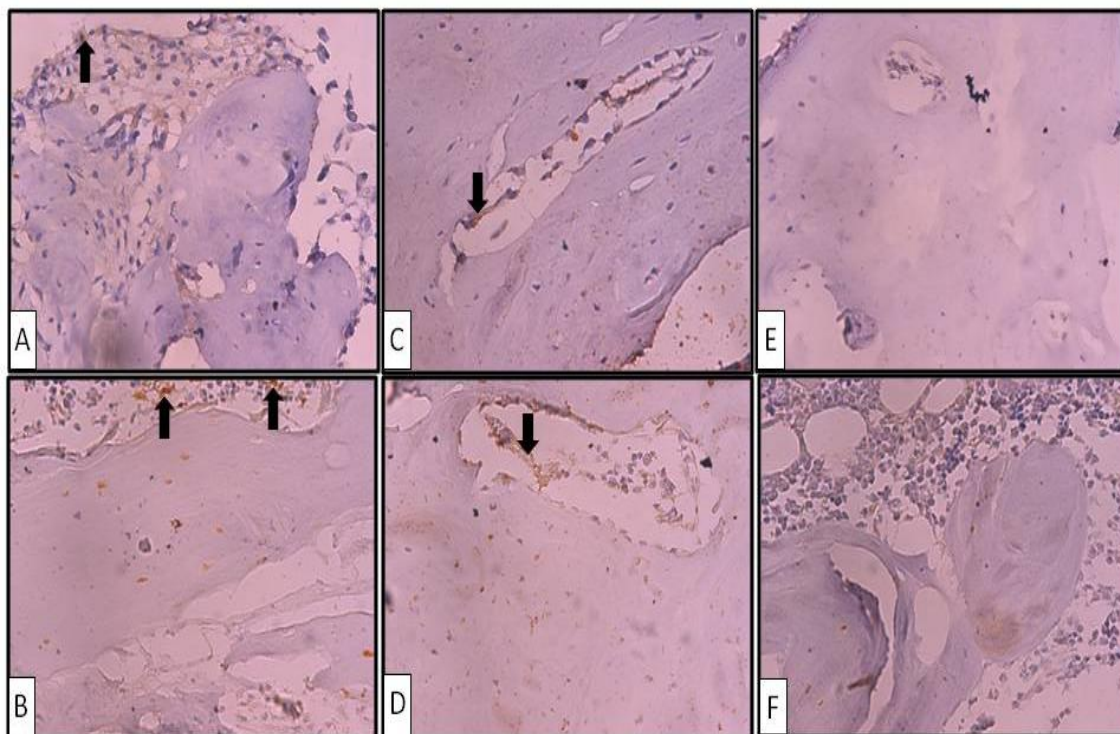


Figura 18. Imunoexpressão de BMP-9 (seta), tecido medular (M). A: grupo controle 15 dias, B: grupo *laser* 15 dias, C: grupo controle 30 dias, D: grupo *laser* 30 dias, E: grupo controle 45 dias, F: grupo *laser* 45 dias. (Aumento: 500X).

5.4.4.4. Expressão de RANKL

Quinze dias após a cirurgia, observou-se leve imunoexpressão de RANKL no grupo controle, porém menor do que a expressão leve a moderada notada no grupo *laser* (Figuras 19A e 19B). Trinta dias após a lesão óssea, uma leve imunoexpressão de RANKL estava presente em ambos os grupos (Figuras 19C e 19D). Curiosamente, no último período avaliado, uma maior imunoexpressão de RANKL (leve) foi observada no grupo controle quando comparado com o grupo *laser* (ausente a leve) (Figuras 19E e 19F).

Quanto às mudanças temporais na expressão do RANKL, vale ressaltar que, no 15º dia após a cirurgia, o grupo *laser* mostrou maior imunorreatividade em relação ao grupo controle. Trinta dias após lesão, os dois grupos tiveram imunoexpressão semelhante de RANKL. No entanto, ao 45º dia de pós-operatório, os animais do grupo controle apresentaram maior imunorreatividade para o RANKL do que os tratados com *laser*.

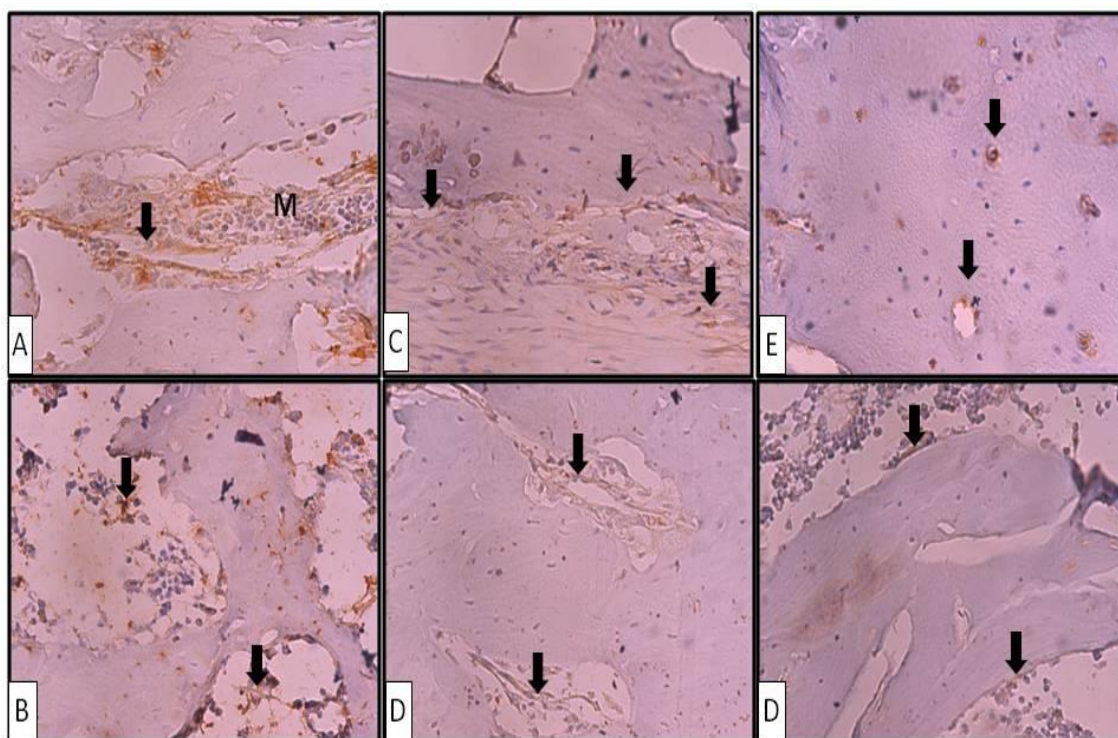


Figura 19. Imunoexpressão de RANKL (seta), tecido medular (M). A: grupo controle 15 dias, B: grupo *laser* 15 dias, C: grupo controle 30 dias, D: grupo *laser* 30 dias, E: grupo controle 45 dias, F: grupo *laser* 45 dias. (Aumento: 500X).

5.4.5. Análise Biomecânica

A tabela 2 ilustra as médias e desvios-padrão do teste biomecânico. Não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa para as variáveis carga máxima e resiliência entre os grupos, em qualquer período avaliado.

Tabela 2. Propriedades Biomecânicas dos grupos controle e laser.

Grupo	Carga Máxima (KN)	Resiliência (J)
-------	----------------------	--------------------

Controle		
15	0,066 ± 0,009 ^a	0,035 ± 0,007
30	0,079 ± 0,009	0,036 ± 0,014
45	0,098 ± 0,013	0,039 ± 0,014
Laser		
15	0,063 ± 0,006	0,030 ± 0,007
30	0,073 ± 0,008	0,032 ± 0,009
45	0,088 ± 0,013	0,034 ± 0,013

^aDados expressos em médias ± DP

5.5. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou os efeitos da LLLT na histologia, morfometria, propriedades biomecânicas e imunexpressão de fatores osteogênicos (COX-2, RUNX-2, RANKL e BMP-9) durante o processo de reparo ósseo em tíbias de ratos. Até o presente momento, tal abordagem não foi descrita na literatura.

A terapia *laser* tem se destacado como um eficiente tratamento não invasivo para estimular a osteogênese e acelerar a consolidação óssea (NISSAN *et al.*, 2006; PRETEL; LIZARELLI; RAMALHO, 2007). Uma recente revisão da literatura mostrou que a terapia *laser* apresenta um efeito estimulante sobre o tecido ósseo em estudos *in vitro* e *in vivo* (PINHEIRO; GERBI, 2006). Estes achados sugerem que o uso do *laser*, especialmente com comprimentos de ondas infravermelhos, pode aumentar a proliferação dos osteoblastos, deposição de colágeno e formação óssea (PINHEIRO; GERBI, 2006).

Na análise histológica do presente estudo, não observamos a presença de infiltrado inflamatório nos animais tratados com *laser*, que apresentaram melhor organização tecidual aos 15° e 30° dias de pós-operatório e maior área de osso neoformado no 15° dia em comparação com os animais não tratados, o que é compatível com um estágio mais avançado de reparo tecidual.

Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Matsumoto *et al.* (2009) que também demonstraram maior quantidade de osso neoformado e a presença de tecido ósseo maduro no grupo irradiado com *laser* (As-Ga-Al, 735nm, 16J/cm²) quando comparado ao grupo controle ao 14° dia após a cirurgia. Da mesma forma, nossos achados concordam com o estudo de Fávaro-Pipi *et al.* (2010), no qual foi relatado que a terapia *laser* (As-Ga-Al, 830nm, 50J/cm²) produziu intensa neoformação óssea, cercada por tecido conjuntivo altamente vascularizado, com deposição de osso primário e maior área de osso neoformado 13 e 25 dias após a cirurgia, indicando que o uso da LLLT seria adequado para melhorar os resultados clínicos de cirurgias ósseas.

Ainda, o presente estudo avaliou o efeito do *laser* 830nm (As-Ga-Al) na imunexpressão de proteínas e fatores de crescimento responsáveis pela modulação do metabolismo ósseo e das atividades das células ósseas durante o processo de consolidação.

Neste contexto, várias evidências sugerem que o processo inflamatório desempenha um importante papel no reparo dos tecidos conjuntivos, estimulando a produção de prostaglandinas, que, por sua vez, atuam sobre a proliferação e diferenciação dos osteoblastos e regulam a diferenciação e a função dos osteoclastos (LI; BURR; TURNER, 2002; SIMON; MANIGRASSO; O'CONNOR, 2002). Sabe-se que a COX-2 é relevante para muitos processos, incluindo inflamação e reparo tecidual (MATSUMOTO *et al.*, 2009).

Especificamente no processo de consolidação óssea, a expressão elevada de COX-2 aumenta o potencial osteoblástico de células-tronco mesenquimais, colaborando com a sua diferenciação em osteoblastos (ZHANG *et al.*, 2001). Além disso, durante o reparo da lesão óssea, a COX-2 também atua através da regulação dos fatores de transcrição osterix e RUNX-2 (ZHANG *et al.*, 2002).

A análise imunohistoquímica do presente trabalho revelou que a LLLT promoveu uma maior expressão de COX-2 quando comparado ao grupo controle no 15º dia pós-lesão, seguida por uma diminuição temporal de sua expressão. De forma geral, podemos sugerir que a maior expressão de COX-2 no grupo *laser* pode ter sido útil para a reparação óssea melhor organizada e também ter contribuído para a presença de maior área de osso neoformado nos animais tratados.

Igualmente, Matsumoto *et al.* (2009) observaram que a terapia *laser* (As-Ga-Al, 735nm, 16J/cm²) produziu uma maior imunoexpressão de COX-2 em células ósseas, especialmente no 14º dia após a cirurgia, resultando na melhor qualidade do reparo ósseo de defeitos tibiais em ratos.

Como descrito acima, a COX-2 atua na osteoblastogênese, por meio da regulação do fator de transcrição RUNX-2 (ZHANG *et al.*, 2002). O RUNX-2 é essencial no processo de desenvolvimento do esqueleto e está associado com a proliferação e a diferenciação dos osteoblastos, desempenhando um papel fundamental na formação óssea (KOMORI, 2003; ZIROS; BASDRA; PAPA VASSILIOU, 2008; WOHL; TOWLER; SILVA, 2009).

Nossos resultados indicaram que a expressão do RUNX-2 atingiu o pico no 15º dia após a cirurgia em ambos os grupos. No grupo controle observamos uma diminuição temporal na expressão deste fator e ausência de marcação ao 45º dia pós-operatório.

Curiosamente, os animais tratados com *laser* apresentaram imunexpressão do RUNX-2 nos três períodos experimentais avaliados.

Sobre os efeitos da LLLT na expressão de marcadores osteoblásticos específicos, muito poucos dados têm sido relatados. Em um estudo *in vitro*, Bouvet-Gerbettaz *et al.* (2009) comprovaram que a terapia *laser* (As-Ga-Al, 808nm, 4J/cm²) pode aumentar a expressão de RUNX-2 em células da medula óssea. Além disso, sabe-se que o RUNX-2 ativa genes específicos para osteoblastos e aumenta a expressão de outros marcadores osteoblásticos, como a osteocalcina, osteopontina, fosfatase alcalina e colágeno tipo I (Vaes *et al.*, 2006).

Como um todo, parece que a expressão constante de RUNX-2 pode estar relacionada com o osso neoformado mais organizado observado nos animais tratados com *laser*, sustentando a hipótese de que a terapia *laser* apresenta um potencial osteogênico.

As BMPs são proteínas fundamentais para os processos de diferenciação osteoblástica e regeneração óssea (PROFF; RÖMER, 2009). Além disso, recentemente foi demonstrado que a BMP-9 é uma das proteínas morfogenéticas com maior potencial osteoindutivo (KANG *et al.*, 2004).

Em relação à imunomarcção da BMP-9 no presente estudo, destaca-se a maior imunexpressão nos animais tratados com *laser* ao 30º dia após a cirurgia, enquanto houve leve imunexpressão da BMP-9 para ambos os grupos no 15º dia e nenhuma expressividade para este imunomarcador em ambos os grupos 45 dias após a cirurgia. Estes achados *in vivo* estão de acordo com estudos anteriores que demonstraram que a LLLT (As-Ga-Al, 830nm, 1.91J/cm²) foi capaz de estimular a mineralização *in vitro* por meio do aumento da expressão dos genes e das proteínas BMPs -2, -4, -6, -7 e do fator

de transcrição RUNX-2, em células MC3T3-E1 de linhagem osteoblástica de camundongos (FUJIMOTO *et al.*, 2010).

Assim, é provável que a maior expressão da BMP-9 nos grupos tratados com *laser* do presente estudo tenha contribuído para a aceleração do reparo ósseo demonstrado na análise histológica, assim como para a maior quantidade de tecido ósseo neoformado evidente nos animais tratados com *laser*.

Além disso, um adequado reparo ósseo inclui a remodelação tecidual, um processo fisiológico que envolve a reabsorção óssea por osteoclastos e a síntese da matriz pelos osteoblastos (RODAN, 1996; LEMAIRE *et al.*, 2004). A esse respeito, a ação dos osteoclastos e de fatores que estimulam a sua diferenciação e função são de suma importância para a manutenção da homeostase óssea. Recentemente, o RANKL foi definido como um fator essencial na diferenciação e ativação osteoclástica (ANDERSON *et al.*, 1997).

Neste estudo, identificamos maior imunorreatividade ao RANKL no grupo *laser* ao 15º dia após a cirurgia, imunocoloração semelhante nos dois grupos ao 30º dia, e maior imunorreatividade ao RANKL no grupo controle no 45º dia pós-lesão. Estes resultados parecem estar de acordo com um estudo anterior *in vitro* o qual apontou que a irradiação *laser* (As-Ga-Al, 810nm, 27.99J/cm²) estimulou a expressão precoce de RANK nas células precursoras de osteoclastos quando comparado ao grupo controle (AIHARA; YAMAGUCHI; KASAI, 2006).

No presente estudo, encontramos um aumento precoce na expressão de RANKL associado a maior imunoeexpressão de outros fatores osteogênicos relacionados a diferentes estágios do reparo ósseo, assim como uma melhor organização tecidual desde o primeiro período avaliado nos animais do grupo *laser*. Sendo assim, é possível que a LLLT tenha a capacidade de acelerar o processo de reparo por meio da estimulação

precoce da remodelação óssea, via diferenciação e ativação dos osteoblastos e osteoclastos.

Apesar dos efeitos estimulantes da LLLT nos achados histológicos, morfométricos e imunohistoquímicos, na análise biomecânica não encontramos qualquer diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Nossos resultados concordam com os descritos por Oliveira *et al.* (2011), que também não encontraram diferença estatisticamente significativa entre os valores de carga máxima e resiliência do calo ósseo de ratos tratados com *laser* 830nm e dos animais do grupo controle, 15 dias após a cirurgia de defeito ósseo tibial. Apesar disso, os autores observaram área de osso neoformado significativamente maior no grupo LLLT do que no grupo controle. Da mesma maneira, Shakouri *et al.* (2010) mostraram que o *laser* 780nm (As-Ga-Al, 4J/cm²) acelera o desenvolvimento do calo ósseo na fase inicial do processo de consolidação (2 e 5 semanas pós-operatória), porém com melhora duvidosa nas propriedades biomecânicas do osso em consolidação, conforme apresentado pelos próprios autores.

Por outro lado, Luger *et al.* (1998) (He-Ne, 632.8nm, 35mW) e Lirani-Galvão *et al.* (2006) (As-Ga-Al, 780nm, 112.5J/cm²) notaram um aumento nas propriedades biomecânicas do calo tibial em ratos após irradiação *laser*. No entanto, é importante ressaltar que estes autores utilizaram diferentes modelos experimentais, parâmetros dosimétricos e comprimentos de onda do *laser* em comparação com os empregados no presente estudo.

Os parâmetros do *laser* utilizados nesse trabalho foram escolhidos baseados em estudos prévios do nosso grupo que demonstraram uma estimulação do metabolismo ósseo após a aplicação da irradiação *laser* (RENNO *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*,

2011). Apesar disso, ainda há na literatura uma contradição entre os diversos autores a respeito dos melhores parâmetros a serem utilizados no tratamento de fraturas ósseas.

Alguns estudos sugerem que doses entre $1\text{J}/\text{cm}^2$ e $5\text{J}/\text{cm}^2$ apresentam efeitos estimulatórios tanto em tecidos moles quanto em ossos (SHIMIZU *et al.*, 2007). Outros autores afirmam que uma dose total de $16\text{J}/\text{cm}^2$ por sessão é mais eficaz para promover efeitos positivos no metabolismo ósseo (PINHEIRO; GERBI, 2006). Por outro lado, alguns relatos sugerem doses mais elevadas (OLIVEIRA *et al.*, 2010; FÁVARO-PIPI *et al.*, 2011). Devido à tamanha controvérsia, ainda não é possível determinar um protocolo ideal de tratamento *laser* com o objetivo de acelerar a consolidação óssea.

Todavia, os resultados deste estudo destacaram os efeitos estimulantes da laserterapia sobre a cicatrização óssea. Mais do que isso, tais achados nos permitiram obter dados relevantes sobre a potencial eficácia desta terapia como um tratamento clínico de não-uniões ósseas e/ou pseudoartroses.

5.6. CONCLUSÃO

Em síntese, podemos concluir que a terapia *laser* (As-Ga-Al, 830nm, $120\text{J}/\text{cm}^2$) melhorou o processo de consolidação óssea, acelerando o desenvolvimento e a organização do osso neoformado e ativando os fatores osteogênicos COX-2, RUNX-2, RANKL e BMP-9 em defeitos ósseos em tíbias de ratos. Contudo, a irradiação *laser* não foi capaz de aumentar as propriedades mecânicas do osso tratado.

6. ESTUDO 3

“*Scaffolds* de Biosilicato[®] e terapia *laser* de baixa intensidade: um estudo histológico, imunohistoquímico e biomecânico de defeitos tibiais em ratos”

6.1. RESUMO

Este estudo teve o objetivo de investigar os efeitos da associação da LLLT com implantes de *scaffolds* de Biosilicato[®] na consolidação óssea por meio de investigações histológica, biomecânica e imunohistoquímica. Apesar dos resultados positivos já descritos do Biosilicato[®] particulado e da LLLT sobre a proliferação de células ósseas, os efeitos da associação de *scaffolds* de Biosilicato[®] e da irradiação *laser* na consolidação óssea ainda não foram estudados. Noventa ratos machos Wistar com defeitos tibiais bilaterais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais: grupo defeito ósseo controle (GC), grupo *scaffold* de Biosilicato[®] (GB) e grupo *scaffold* de Biosilicato[®] irradiado com *laser* (GBL). O implante do *scaffold* de Biosilicato[®] foi realizado em seguida à cirurgia de defeito ósseo. O tratamento com irradiação *laser* (830nm, 120J/cm², 100mW) teve início imediatamente após a cirurgia dos defeitos ósseos e foram realizadas 8, 15 ou 23 sessões, com um intervalo de 48h entre elas. Os animais foram sacrificados nos dias 15, 30 e 45 após a lesão. Os resultados histológicos ao 15º dia revelaram tecido de granulação e osso neoformado em justaposição à superfície dos *scaffolds* de Biosilicato[®] nos animais dos grupos GB e GBL. Trinta e 45 dias após a lesão, os animais do GB apresentaram osso neoformado mais organizado em comparação aos animais do GC. Nos animais do GBL, foi observado um padrão histológico semelhante ao do GB no 30º dia após a cirurgia. No entanto, ao 45º dia, foi possível observar a presença de tecido de granulação nos defeitos do GBL. A análise imunohistoquímica do GB apresentou o pico de imunexpressão da COX-2 no 15º dia pós-operatório, já os animais do GBL atingiram o pico de imunexpressão da COX-2 no 30º dia. Os animais dos grupos GB e GBL apresentaram imunexpressão positiva da BMP-9 até o 45º dia após a cirurgia, enquanto que para o RANKL, observamos imunomarcagem positiva em torno de partículas de Biosilicato[®], irradiados ou não com *laser*, em todos os períodos avaliados, sendo que nos animais do GBL, a imunexpressão do RANKL foi maior do que nos outros grupos no 30º dia de pós-operatório. No entanto, no período de 30 e 45 dias pós-lesão, os animais dos GB e GBL apresentaram valores estatisticamente menores de carga máxima, quando comparados aos animais do GC. Nossos resultados sugerem que a associação do *scaffold* de Biosilicato[®] com o *laser* 120J/cm² exerce atividade osteogênica durante o reparo ósseo, com destaque para a ativação dos fatores osteogênicos avaliados. No entanto, o *scaffold* de Biosilicato[®] associado ou não a irradiação *laser* 120J/cm² não é eficaz em melhorar as propriedades mecânicas do calo ósseo.

Palavras-chave: reparo ósseo, Biosilicato[®], *scaffold* de biomaterial, terapia *laser* de baixa intensidade, estudo *in vivo*

6.2. INTRODUÇÃO

A consolidação de fraturas constitui um complexo processo fisiológico no qual o osso cicatriza a fim de transferir solicitações mecânicas (EINHORN, 1998). Neste processo, o tecido original é reparado e suas propriedades preexistentes, em geral, são restauradas. No entanto, situações clínicas que envolvem grande perda óssea, a presença de doenças prévias ou ressecção de tumores podem resultar no atraso do reparo da fratura ou mesmo em pseudartrose (GAUTHIER; SOMMER, 2003). Dentro deste contexto, há uma necessidade premente de compreender com detalhamento a biologia da cicatrização da fratura para desenvolver estratégias que garantam a reparação normal do esqueleto (GAUTHIER *et al.*, 2005). Devido a sua capacidade de se ligar ao osso por meio da formação de uma camada de apatita biologicamente ativa na sua superfície, um tratamento promissor consiste na utilização de vidros bioativos como substitutos dos tradicionais enxertos ósseos (HOLLINGER *et al.*, 2008).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa desenvolveu uma nova vitrocerâmica bioativa completamente cristalizada a partir do sistema quaternário $P_2O_5-Na_2O-CaO-SiO_2$ (Biosilicato[®], pedido de patente WO 2004/074199). O Biosilicato[®] tem apresentado um efeito estimulatório sobre o metabolismo das células ósseas. Comparando o crescimento de células osteogênicas em cilindros de Biosilicato[®] e Bioglass[®] 45S5 por um período de até 17 dias, Moura *et al.* (2007) concluíram que o Biosilicato[®] promoveu áreas significativamente maiores de matriz calcificada. Os resultados indicam que a cristalização completa de vidros bioativos da série de composições do sistema $P_2O_5-Na_2O-CaO-SiO_2$ pode promover o aumento da formação de matriz óssea *in vitro* em cultura de células osteogênicas.

Da mesma forma, muitas evidências demonstram que a terapia *laser* de baixa intensidade (LLLT) também exerce um efeito positivo sobre o metabolismo ósseo e na consolidação das fraturas (LUGER *et al.*, 1998; OZAWA; SHIMIZU; KARIYA, 1998; RENNO *et al.*, 2007). Quando o *laser* é aplicado no tecido, a luz é absorvida por fotorreceptores, os cromóforos, localizados nas células. Uma vez absorvida, a luz é capaz de modular reações bioquímicas celulares e estimular a respiração mitocondrial, com a produção de oxigênio molecular e síntese de ATP (YAOITA *et al.*, 2000). Tais efeitos são conhecidos por aumentarem a síntese de DNA, RNA e do ciclo celular das proteínas reguladoras, promovendo assim a proliferação celular (RENNO *et al.*, 2007).

Estudos *in vitro* com células osteoblásticas mostraram que a LLLT é capaz de aumentar a atividade mitocondrial (OLIVERA *et al.*, 2008), síntese de DNA e RNA, formação de nódulos ósseos (STEIN *et al.*, 2005), expressão gênica de osteocalcina e osteopontina e atividade de ALP (YAOITA *et al.*, 2000). Além disso, a LLLT mostrou ser capaz de acelerar o processo de reparação de fraturas em coelhos e ratos, aumentando o volume do calo e a densidade mineral óssea (LIU *et al.*, 2007; MATSUMOTO *et al.*, 2009).

Apesar dos resultados positivos já descritos do Biosilicato[®] e da LLLT sobre a proliferação de células ósseas, os efeitos da associação de *scaffolds* de Biosilicato[®] e da irradiação *laser* na consolidação óssea ainda não foram estudados. Antes que as duas terapias possam ser usadas com confiança como modalidade terapêutica no tratamento de fraturas, é necessário investigar os efeitos dose-resposta e as características destes tratamentos em estudos *in vivo* para determinar sua segurança e eficácia. Nossa hipótese é que a associação das duas terapias pode promover a aceleração do metabolismo ósseo no local do defeito ósseo em ratos. Neste contexto, este estudo teve o objetivo de investigar os efeitos da associação da LLLT com implantes de *scaffolds* de Biosilicato[®]

na consolidação óssea por meio de investigações histológica, biomecânica e imunohistoquímica.

6.3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido de acordo com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFSCar (Parecer 002/2009). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas sob temperatura controlada ($24 \pm 2^\circ \text{C}$) e períodos de claro-escuro de 12 horas, com acesso irrestrito à água e ração comercial.

Um total de noventa ratos machos da linhagem *Wistar* (12 semanas de idade, peso médio de 280g) foram distribuídos aleatoriamente em três grupos de 30 animais cada: grupo defeito ósseo controle (GC), grupo *scaffold* de Biosilicato[®] (GB) e grupo *scaffold* de Biosilicato[®] irradiado com *laser* (GBL). Cada grupo foi subdividido em três subgrupos e os animais foram eutanasiados 15, 30 e 45 dias após a cirurgia.

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de xilazina (Syntec[®], 10mg/kg) e ketamina (Agener[®], 80mg/kg) e a região medial da tíbia foi tricotomizada e desinfetada com iodopovidina. O compartimento medial da tíbia foi exposto através de uma incisão longitudinal na pele e um defeito ósseo padrão de 3.0mm de diâmetro foi criado no terço superior de ambas a tíbias (10mm distais à articulação do joelho) usando uma broca motorizada (BELTEC[®], Araraquara, São Paulo, Brasil) (13.500rpm), sob irrigação abundante com solução salina. A profundidade do defeito limitou-se até a ruptura de uma única cortical óssea. Nos animais dos grupos GB e GBL, as cavidades foram preenchidas com scaffolds de Biosilicato[®] de 3mm de diâmetro previamente

esterilizados. O retalho cutâneo foi reposicionado e suturado com fio cirúrgico de náilon monofilamentar 4.0 (Shalon[®]), a pele foi desinfetada com iodopovidona e o estado de saúde dos ratos foi monitorado diariamente.

6.3.1. Scaffold de Biosilicato[®]

Foram utilizados *scaffolds* cilíndricos com 3.0mm de diâmetro e 1.5mm de espessura para a implantação nos defeitos ósseos tibiais.

6.3.2. Preparação dos *scaffolds* de Biosilicato[®]

Os *scaffolds* foram preparados no LAMAV da UFSCar, pelo aluno de doutorado Murilo C. Crovace.

Uma vitrocerâmica bioativa totalmente cristalina do sistema quaternário Na₂O-CaO-SiO₂-P₂O₅ (Biosilicato[®], patente WO2004/074199) foi utilizada neste estudo. Este material foi descrito recentemente (RENNO; MCDONNEL; LAAKSO, 2010). Os *scaffolds* foram preparados através de um método inédito, que consistiu na adição de um agente porogênico (no caso, fibras de polietileno) a um cimento à base de Biosilicato[®] em pó.

Inicialmente, álcool isopropílico (99,5% P.A. – Qhemis) foi aquecido até a temperatura de 50°C e 15% vol. de polivinil butiral (PVB, Butvar – B98) foi adicionado; a mistura foi mantida sob agitação vigorosa até a formação de um gel homogêneo. Biosilicato[®] em pó (com tamanho médio das partículas de aproximadamente 5µm) foi adicionado ao gel em uma proporção de 40% vol. e

homogeneizado com um bastão de vidro. Posteriormente, 15% vol. de fibras de polietileno (Flinco) com 3,2 mm de comprimento e 0,27 mm de espessura foi adicionado à mistura, sendo novamente homogeneizada. O cimento contendo as fibras foi depositado em um cadinho de AZS ($\text{Al}_2\text{O}_3\text{-ZrO}_2\text{-SiO}_2$) e seco à temperatura ambiente por 72h. Desta forma, foram obtidos blocos de aproximadamente 16 x 50 x 80mm.

O procedimento de queima foi realizado em forno elétrico, sendo composto por quatro estágios: (1) aquecimento a uma taxa de $1^\circ\text{C}/\text{min}$ da temperatura ambiente até 380°C , com um patamar de 4h nesta temperatura para a remoção do PVB; (2) aquecimento a $1^\circ\text{C}/\text{min}$ até 460°C , com um patamar de 4h nesta temperatura para a remoção completa das fibras de polietileno; (3) aquecimento a $5^\circ\text{C}/\text{min}$ até 1000°C e patamar de 4h nesta temperatura para a sinterização do Biosilicato[®]; (4) resfriamento a uma taxa de $3^\circ\text{C}/\text{min}$ até a temperatura ambiente, para evitar o trincamento dos blocos de Biosilicato[®].

Os blocos porosos foram cortados em pequenas placas de 16 x 50mm, com 1,5mm de espessura. Uma broca odontológica do tipo trefina (WMA[®]) acionada por um micro-motor (BELTEC[®]) foi utilizada para cortar os *scaffolds* de 3,0mm de diâmetro e 1,5mm de espessura.

6.3.3. Terapia *Laser* de Baixa Intensidade

Neste estudo foi utilizado um *laser* de diodo com meio ativo composto por arseneto de gálio e alumínio (As-Ga-Al) (Tera lase[®], DMC, São Carlos, SP, Brasil) 830nm, diâmetro do feixe de $0,028\text{ cm}^2$, 100mW, $3,57\text{ W}/\text{cm}^2$, $120\text{J}/\text{cm}^2$, 3,4 J, com um

tempo de irradiação de 34s. A irradiação *laser* foi iniciada imediatamente após a cirurgia dos defeitos ósseos e foram realizadas 8, 15 ou 23 sessões de tratamento, com um intervalo de 48h entre elas. O *laser* foi aplicado utilizando a técnica pontual em contato em um único ponto sobre a região do defeito ósseo. Nos dias 15, 30 e 45 após a cirurgia, os ratos foram sacrificados com uma dose letal de anestésico, injetado via intraperitoneal. Ambas as tíbias foram dissecadas e removidas para análise.

6.3.4. Análise Histológica

As tíbias direitas foram removidas e fixadas em formalina tamponada a 10% (Merck[®], Darmstadt, Alemanha) por 48 horas, descalcificadas em EDTA a 4% (Merck[®]) e incluídas em blocos de parafina. Foram obtidos cortes seriados de 5 μ m de espessura, corados com hematoxilina e eosina (coloração HE, Merck[®]).

Para a avaliação histológica, utilizou-se um microscópio de luz (Olympus, Optical Co. Ltd, Tóquio, Japão) sob um aumento de 40X. A presença de processo inflamatório, tecido de granulação, tecido ósseo neoformado, tecido necrótico e biomaterial foram investigados na região do defeito ósseo de cada animal.

6.3.5. Análise Imunoistoquímica

Para a realização da avaliação imunoistoquímica, foram confeccionadas lâminas histológicas com cortes seriados de 5 μ m de espessura. A parafina foi removida com xilol e os cortes foram reidratados em etanol e, em seguida, imersos em solução de tampão citrato a 0,01M (pH 6,0) em microondas (850W) por três ciclos de cinco

minutos cada para recuperação antigênica. O material foi pré-incubado com peróxido de hidrogênio a 0,3% em solução de tampão fosfato (PBS) por cinco minutos para inativação da peroxidase endógena e, na sequência, bloqueado em soro fetal bovino a 5%, diluído em solução de PBS por dez minutos.

As amostras foram incubadas com anti-COX-2 anticorpo primário policlonal (Santa Cruz Biotechnology, USA) na concentração de 1:200, anti-RANKL anticorpo primário policlonal (Santa Cruz Biotechnology, USA) na concentração de 1:200 e anti-BMP-9 anticorpo primário policlonal (Santa Cruz Biotechnology, USA) na concentração de 1:200. A incubação foi realizada em refrigerador (4°C) por um período de 12 horas, seguida de dois banhos em solução de PBS, com duração de cinco minutos cada. Em seguida, os cortes foram incubados com biotina conjugada ao anticorpo secundário anti-IgG (imunoglobulina G) de coelho (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) na concentração de 1:200 em PBS por uma hora. Na sequência, os cortes foram lavados duas vezes com PBS, seguido por aplicação de complexo pré-formado de avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories) por 45 minutos. Os complexos foram visualizados por meio da aplicação de solução de 3,3 diaminobenzidina a 0,05% e contra corados com Hematoxilina de Harris.

Para confirmação dos resultados, alguns cortes foram submetidos ao mesmo tratamento omitindo-se somente os anticorpos primários. Estes cortes serviram como controle negativo das reações. Além disso, foram realizados controles positivos internos em cada bateria da reação realizada.

6.3.6. Análise Biomecânica

As propriedades biomecânicas da tíbia esquerda foram determinadas por um teste de flexão de três pontos realizado em uma máquina de ensaio universal Instron[®] (EUA, modelo 4444, célula de carga de 1KN). As tíbias foram colocadas em um dispositivo de metal que fornecia duplo apoio com 1,8cm de distância entre suas extremidades. A célula de carga foi posicionada perpendicularmente ao local exato do defeito ósseo. Uma pré-carga de 5N foi aplicada para evitar o deslizamento da amostra. Finalmente, a amostra foi submetida a uma força de flexão, com taxa de deformação constante de 0,5cm/min até o momento da fratura. A partir da curva de carga-deformação, foram obtidos os valores de carga máxima (KN) e resiliência (J).

6.3.7. Análise Estatística

Os dados foram analisados estatisticamente por meio de técnicas descritivas, na forma de médias e desvio-padrão. A normalidade da distribuição das variáveis foi verificada através do teste de Shapiro-Wilk's. Todas as variáveis apresentaram distribuição normal da amostra. As comparações entre os grupos foram feitas utilizando testes de análise de variância (ANOVA), complementada pelo teste *post-hoc* de Duncan. As análises foram realizadas no *software* STATISTICA versão 7.0 (StatSoft Inc.). Para as conclusões das análises estatísticas foi utilizado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

6.4. RESULTADOS

6.4.1. Achados Gerais

Não foram observadas complicações pós-operatórias nem mudanças de comportamento nos animais durante o período experimental. Os ratos voltaram rapidamente a sua dieta normal e não apresentaram perda de peso durante o experimento. Nenhum animal morreu durante o experimento e nenhuma infecção no sítio cirúrgico foi observada.

6.4.2. Análise Histológica

Em relação ao grupo controle, as margens do defeito ósseo ainda foram observadas 15 dias após a cirurgia. Neste grupo, os defeitos apresentavam infiltrado inflamatório, leve quantidade de tecido de granulação e tecido ósseo sem trabéculas interconectadas, correspondendo a uma fase inicial do reparo (Figura 20A). Nos espécimes tratados com *scaffolds* de Biosilicato[®], o defeito ósseo estava predominantemente preenchido com o biomaterial (Figura 20B). Também se observou tecido de granulação principalmente nas áreas circunjacentes à borda do defeito e de leve a moderada quantidade de infiltrado inflamatório na região lesada. Nos animais do grupo *scaffold* de Biosilicato[®] irradiado com *laser*, notou-se uma leve quantidade de infiltrado inflamatório e intensa presença de tecido de granulação, quantidade moderada de osso neoformado, com trabéculas levemente interconectadas e quantidade moderada de biomaterial (Figura 20C).

Aos 30 dias após a cirurgia, as bordas da lesão estavam ainda evidentes nos animais controle com a presença de quantidade moderada de osso neoformado e trabéculas ósseas cercadas por tecido de granulação (Figura 20D). No mesmo período, no grupo *scaffold* de Biosilicato[®] as partículas do biomaterial ainda podiam ser vistas, porém, em menor quantidade em comparação ao primeiro período experimental. Não havia qualquer sinal de tecido fibrótico ou necrótico e a osteointegração entre o *scaffold* e osso foi observada. As partículas de biomaterial estavam circundadas por tecido de granulação e osso neoformado com trabéculas interconectadas, especialmente na borda da lesão (Figura 20E). Quanto ao GBL, observamos padrão histológico semelhante ao GB, com leve quantidade de tecido de granulação, moderada quantidade de tecido ósseo neoformado, presença de trabéculas interconectadas principalmente na área periférica da lesão e abundantes partículas de biomaterial no defeito (Figura 20F).

No 45º dia pós-lesão, identificamos presença intensa de osso neoformado com trabéculas interligadas no grupo de controle, o que corresponde a uma etapa final do reparo ósseo (Figura 20G). No GB, foi observada maior quantidade de osso neoformado e trabéculas interconectadas em relação ao período anterior, mas algumas partículas do biomaterial ainda podiam ser vistas na região do defeito (Figura 20H). Finalmente, no GBL, osso neoformado estava em justaposição à superfície do biomaterial, bem como tecido de granulação estava presente na região lesada (Figura 20I).

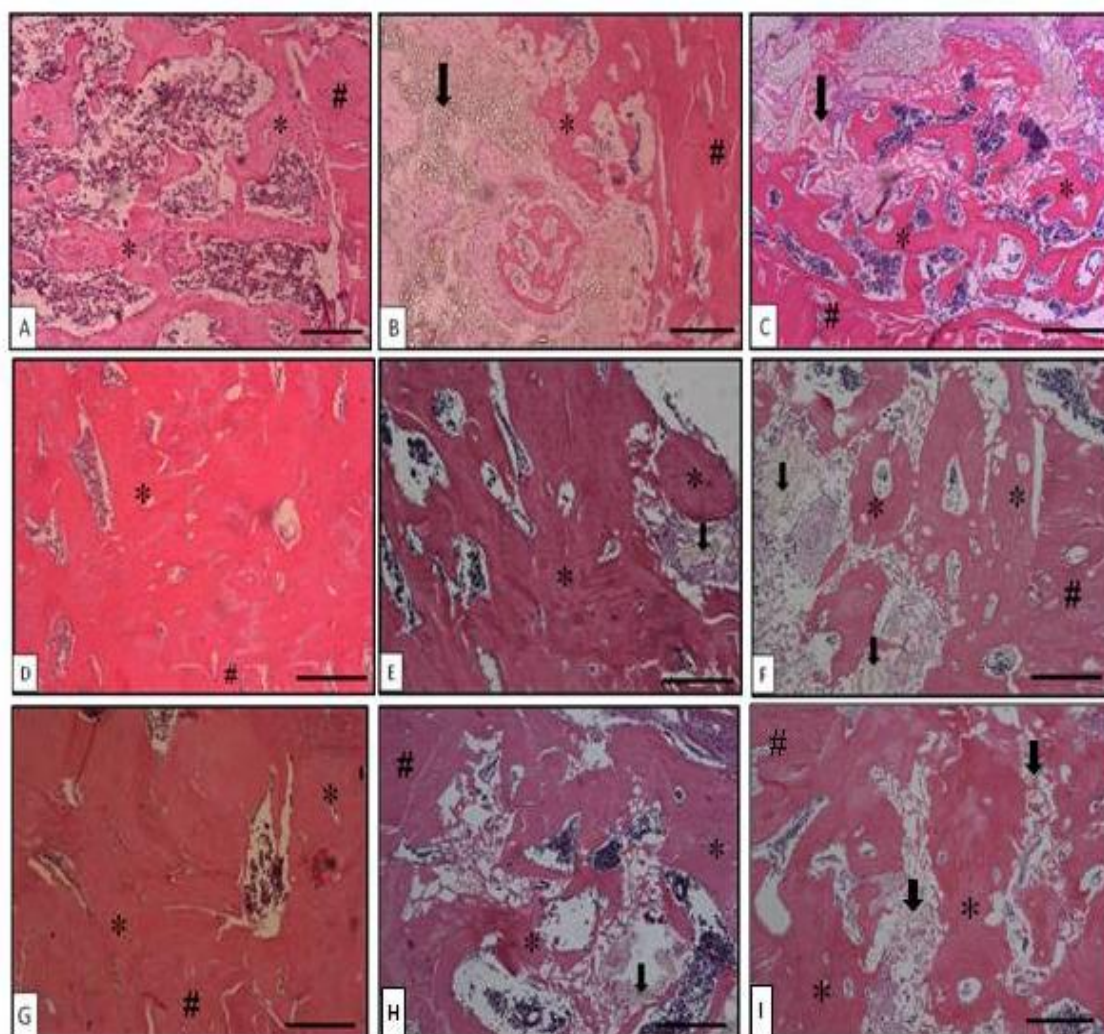


Figura 20. Osso intacto (#), osso neoformado (*), partículas de biomaterial (seta). A: grupo controle 15 dias, B: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] 15 dias, C: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] + *laser* 15 dias, D: grupo controle 30 dias, E: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] 30 dias, F: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] + *laser* 30 dias, G: grupo controle 45 dias, H: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] 45 dias, I: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] + *laser* 45 dias (Coloração: HE. Barra = 200µm).

6.4.3. Análise Imunoistoquímica

6.4.3.1. Expressão de COX-2

A figura 21 ilustra a análise imunoistoquímica da COX-2. Quinze dias após a cirurgia, sua expressão foi detectada predominantemente no citoplasma das células ósseas. Os animais do grupo controle apresentaram leve expressão deste imunomarcador, principalmente no tecido medular (Figura 21A). Os animais do grupo *scaffold* de Biosilicato[®] demonstraram intensa imunoexpressão de COX-2, especialmente nos fibroblastos e tecido circunjacente ao biomaterial (Figura 21B). No grupo tratado com *scaffold* de Biosilicato[®] irradiado com *laser*, observou-se um padrão moderado de expressão, sobretudo ao redor das partículas de biomaterial (Figura 21C).

No 30º dia após a cirurgia, leve imunoexpressão de COX-2 pode ser observada no grupo controle (Figura 21D). O grupo *scaffold* de Biosilicato[®] apresentou leve imunoexpressão deste fator, porém maior em comparação ao grupo controle (Figura 21E). No entanto, o grupo *scaffold* de Biosilicato[®] irradiado com *laser* evidenciou moderada imunoexpressão de COX-2, maior do que os outros dois grupos experimentais (Figura 21F). No último período avaliado no estudo, não foi observada imunoexpressão de COX-2 em nenhum grupo experimental (Figuras 21G, 21H e 21I).

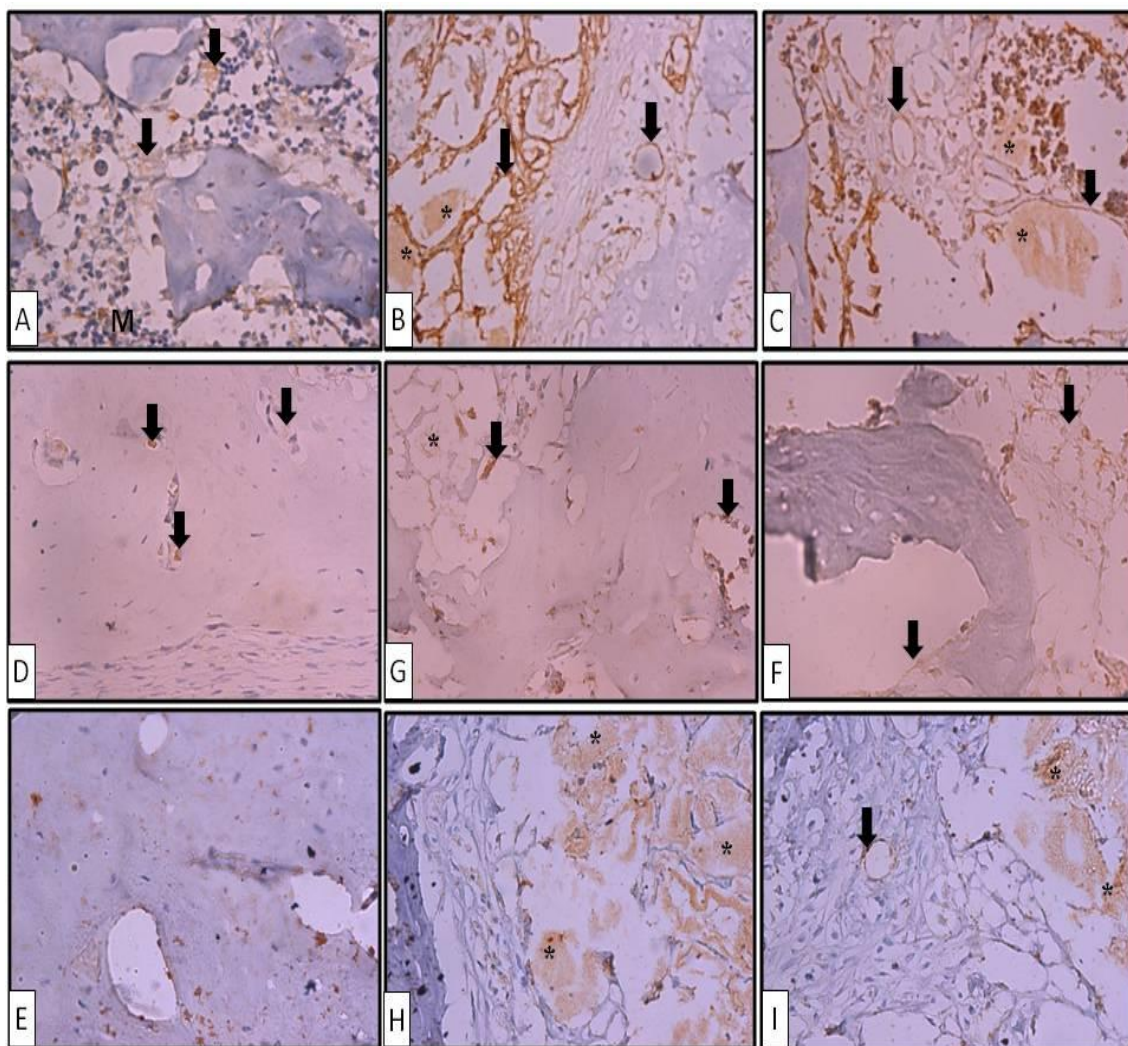


Figura 21. Imunoexpressão de COX-2 (seta), partículas de biomaterial (*), tecido medular (M). A: grupo controle 15 dias, B: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] 15 dias, C: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] + *laser* 15 dias, D: grupo controle 30 dias, E: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] 30 dias, F: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] + *laser* 30 dias, G: grupo controle 45 dias, H: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] 45 dias, I: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] + *laser* 45 dias (Aumento: 500X).

6.4.3.2. Expressão de RANKL

No grupo controle, observou-se leve imunoposição de RANKL (principalmente no tecido medular), mas menor do que a expressão moderada observada nos grupos *scaffold* de Biosilicato[®] e *scaffold* de Biosilicato[®] irradiado com *laser* no primeiro período avaliado (Figuras 22A, 22B e 22C). Trinta dias após a cirurgia, leve imunoposição foi observada nos grupos controle e *scaffold* de Biosilicato[®], que foi menor do que a leve a moderada imunomarcção no grupo *scaffold* de Biosilicato[®] irradiado com *laser* (Figuras 22D, 22E e 22F). No dia 45, todos os grupos apresentaram leve imunoposição de RANKL (Figuras 22G, 22H e 22I).

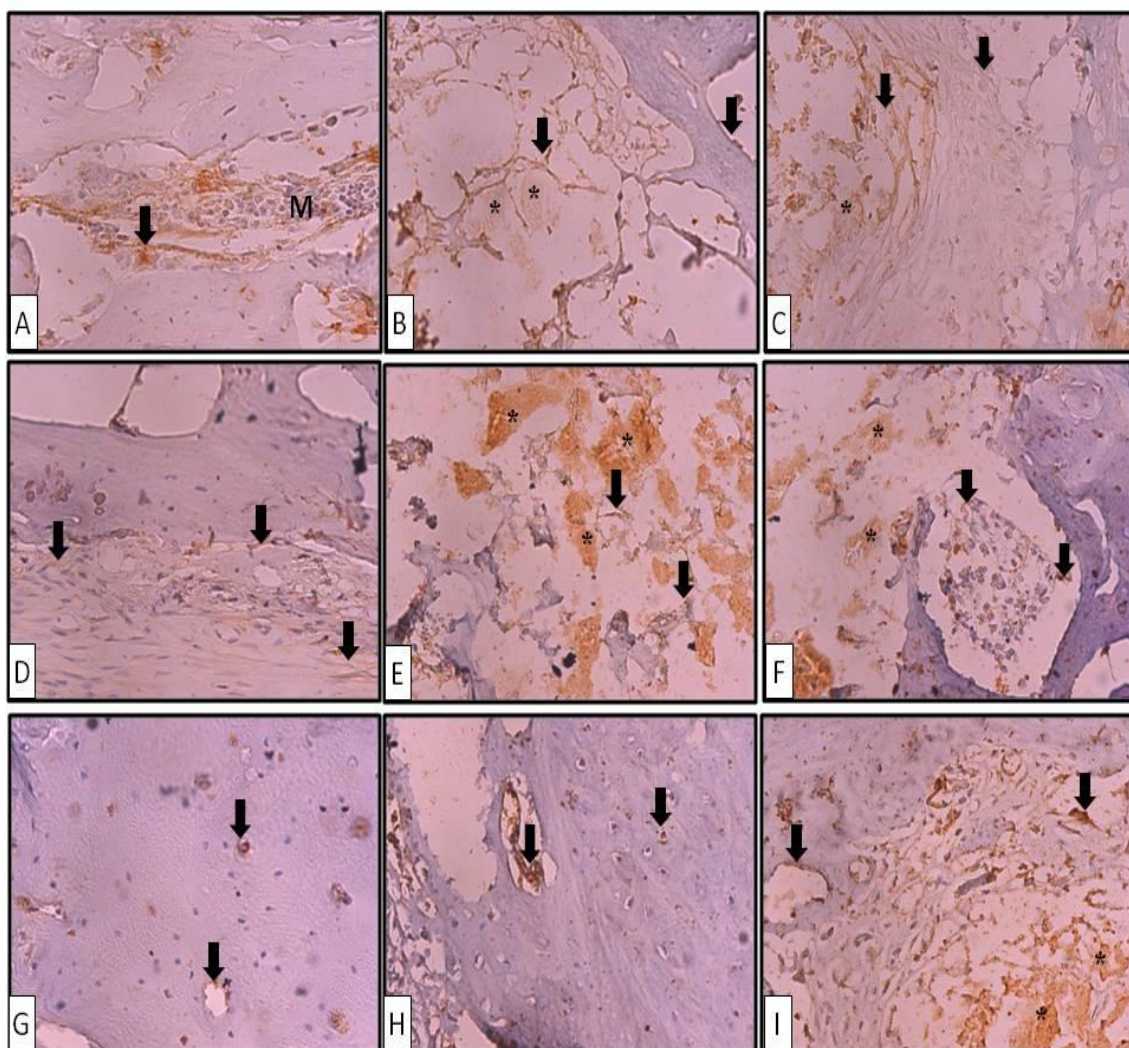


Figura 22. Imunoexpressão de RANKL (seta), partículas de biomaterial (*), tecido medular (M). A: grupo controle 15 dias, B: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] 15 dias, C: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] + *laser* 15 dias, D: grupo controle 30 dias, E: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] 30 dias, F: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] + *laser* 30 dias, G: grupo controle 45 dias, H: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] 45 dias, I: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] + *laser* 45 dias (Aumento: 500X).

6.4.3.3. Expressão de BMP-9

Quinze dias após a cirurgia, uma leve imunexpressão da BMP-9 pode ser observada em todos os grupos (Figuras 23A, 23B E 23C). Nos animais dos grupos controle e *scaffold* de Biosilicato[®] uma leve imunomarcção da BMP-9 foi observada 30 dias pós-cirurgia (Figuras 23D e 23E). Neste mesmo período, uma maior imunexpressão foi observada no grupo *scaffold* de Biosilicato[®] irradiado com *laser* (leve a moderada) (Figura 23F). Além disso, não houve expressividade deste imunomarcador no grupo controle no dia 45 após a cirurgia (Figura 23G). No entanto, nos grupos *scaffold* de Biosilicato[®] e grupo *scaffold* de Biosilicato[®] irradiado com *laser* foi observado imunexpressão positiva de BMP-9 no mesmo período experimental, sendo leve imunomarcção no GB e de leve a moderada no GBL (Figuras 23H e 23I).

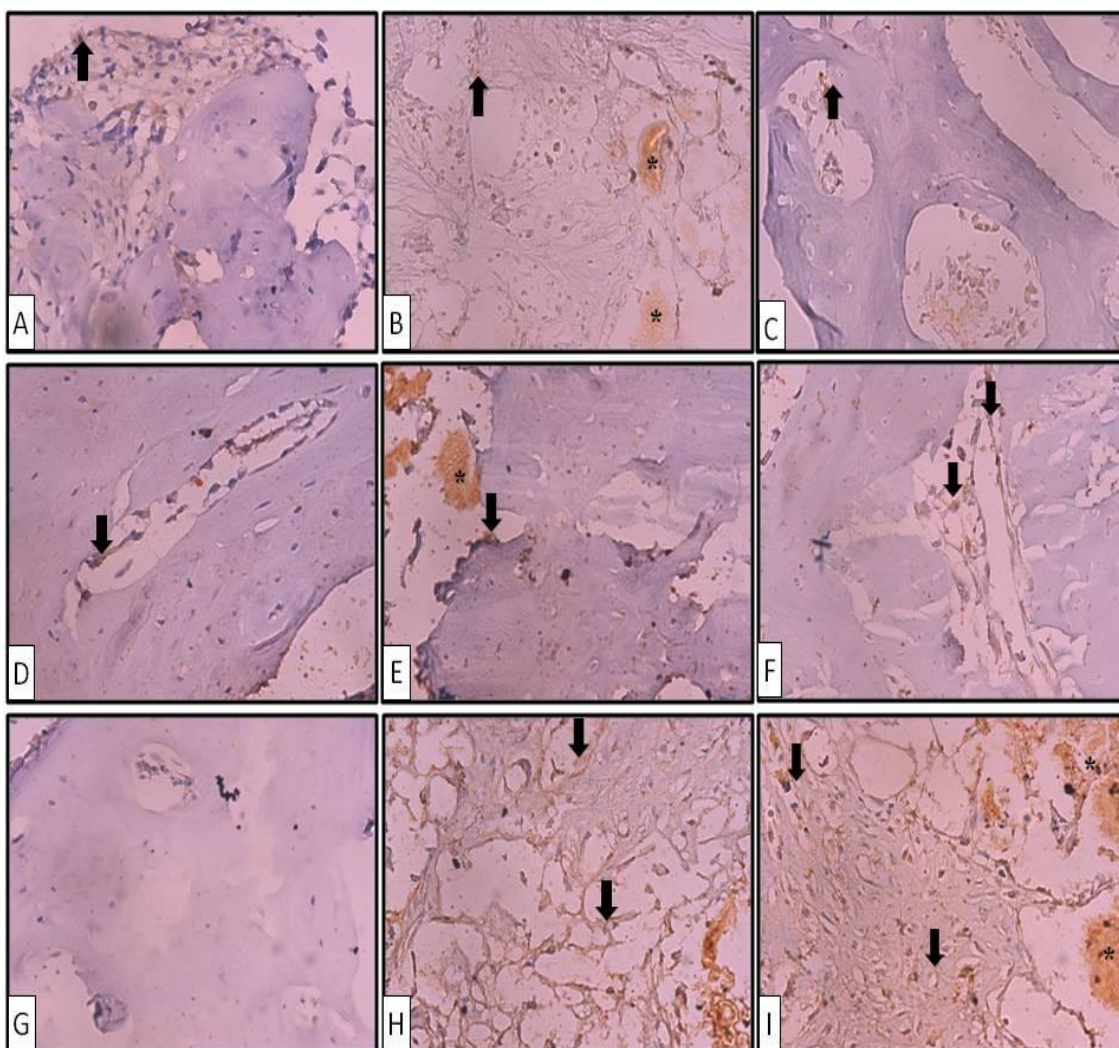


Figura 23. Imunoexpressão de BMP-9 (seta), partículas de biomaterial (*), tecido medular (M). A: grupo controle 15 dias, B: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] 15 dias, C: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] + *laser* 15 dias, D: grupo controle 30 dias, E: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] 30 dias, F: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] + *laser* 30 dias, G: grupo controle 45 dias, H: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] 45 dias, I: grupo *scaffold* de Biosilicato[®] + *laser* 45 dias (Aumento: 500X).

6.4.4. Análise Biomecânica

Quinze dias após a cirurgia, não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa para a variável carga máxima entre os grupos. No entanto, no período de 30 e 45 dias pós-lesão, os animais que foram tratados com *scaffold* de Biosilicato[®] e *scaffold* de Biosilicato[®] irradiado com *laser* apresentaram valores estatisticamente menores de carga máxima, quando comparados aos animais do grupo controle (Figura 24). Porém, para a variável resiliência, não foi encontrada diferença estatística entre os grupos, em nenhum período avaliado (Figura 25).

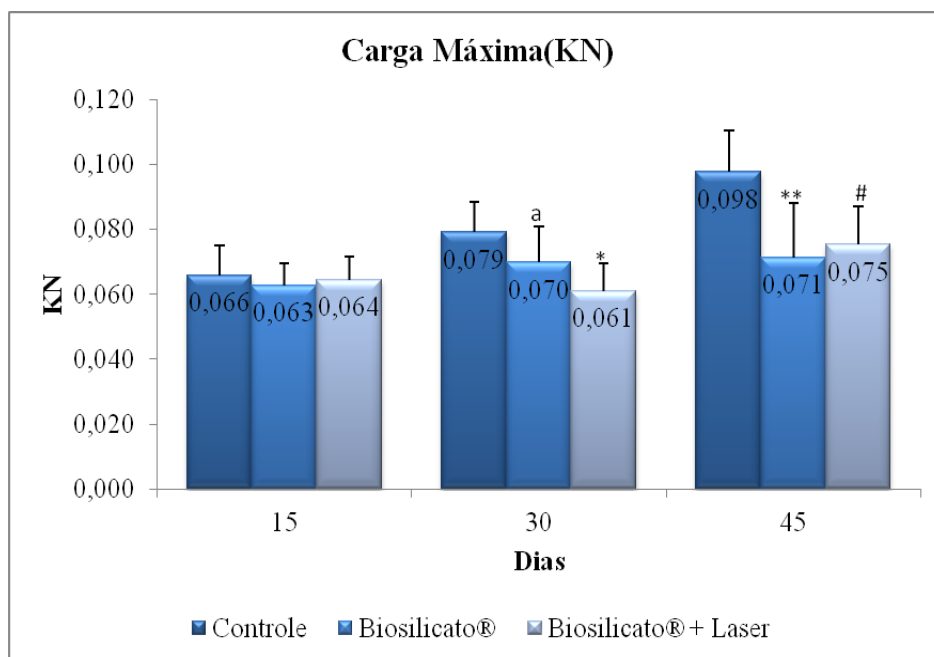


Figura 24. Médias e DP de Carga Máxima (KN). ^a grupo *scaffold* de Biosilicato[®] versus grupo controle 30 dias; ^{*} grupo *scaffold* de Biosilicato[®] + *laser* versus grupo controle 30 dias; ^{**} grupo *scaffold* de Biosilicato[®] versus grupo controle 45 dias; [#] grupo *scaffold* de Biosilicato[®] + *laser* versus grupo controle 45 dias.

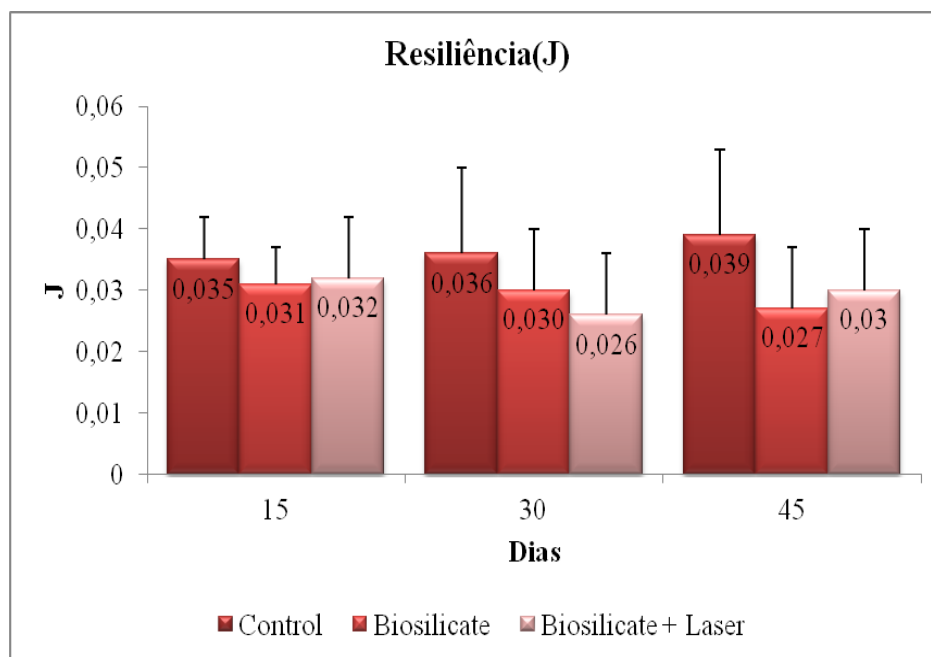


Figura 25. Médias e DP de Resiliência (J).

6.5. DISCUSSÃO

Muitas pesquisas têm demonstrado que a irradiação *laser* pode acelerar a formação óssea e a consolidação da fratura, aumentando sua vascularização, a atividade osteoblástica e a organização das fibras de colágeno (KARU; PYATIBRAT; KALENDU, 1995; USUBA; AKAI; SHIRASAKI, 1998; LIRANI-GALVÃO; JORGETTI; DA SILVA, 2006). Da mesma forma, diversos estudos *in vitro* e *in vivo* têm apontado o grande potencial osteogênico do Biosilicato[®] (MOURA *et al.*, 2007; GRANITO, 2009; SIQUEIRA; ZANOTTO, 2011). Com base nessas evidências, levantamos a hipótese de que os efeitos estimulantes de *scaffolds* de Biosilicato[®] sobre a consolidação óssea poderiam ser aprimorados com a irradiação *laser*.

No primeiro período experimental analisado, encontramos tecido de granulação e osso neoformado em justaposição à superfície do biomaterial nas amostras tratadas

com *scaffolds* de Biosilicato[®] e nas tratadas com *scaffolds* de Biosilicato[®] irradiados com *laser*. Ainda, aos 30° e 45° dias após a lesão, os defeitos preenchidos com *scaffolds* de Biosilicato[®] apresentaram osso neoformado mais organizado em comparação aos animais do grupo controle. Finalmente, foi possível constatar a formação óssea no interior dos poros dos *scaffolds*, o que pode sugerir seu potencial osteogênico.

Tal achado suporta o princípio dos vidros e vitrocerâmicas bioativas, no qual uma rápida formação de uma camada de hidroxicarbonatoapatita (HCA) ocorre na superfície do material como resultado da troca entre íons de cálcio e sílica do vidro bioativo em contato com tecidos vivos (HENCH, 2003).

Nos animais tratados com a associação do *scaffold* de Biosilicato[®] e *laser* 120J/cm², foi observado um padrão histológico semelhante ao do grupo *scaffold* de Biosilicato[®] no 30° dia após a cirurgia. No entanto, ao 45° dia, foi possível observar a presença de tecido de granulação nos defeitos tratados com *scaffold* de Biosilicato[®] e *laser*.

Similarmente, um estudo prévio do nosso grupo de pesquisa sobre consolidação de defeitos ósseos em ratos saudáveis mostrou que o Biosilicato[®] particulado (180-212µm) foi capaz de induzir a neoformação óssea após 14 dias de implante. No entanto, os autores sugeriram que a terapia *laser* (60J/cm² ou 120J/cm²) não melhorou a formação do osso exposto ao Biosilicato[®] (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Não está claro por que esses resultados ocorreram, no entanto, como o Biosilicato[®] é composto por uma vitrocerâmica, é possível que tenha sofrido alguma influência da intensidade focal e saída de energia da luz *laser* durante o tratamento. Tal efeito pode ter inibido posteriormente a migração celular e seu crescimento na superfície do material.

Por outro lado, resultados histológicos positivos da associação do implante de biomaterial (osso bovino inorgânico) e LLLT (As-Ga-Al, 830nm, quatro pontos de irradiação, 4J/cm² por ponto, 16J/cm² por sessão) no reparo de defeitos ósseos em ratos também foram descritos na literatura (PINHEIRO *et al.*, 2003). No entanto, é difícil a comparação dos resultados, porque os estudos anteriores utilizaram diferentes períodos experimentais, tipo de biomaterial implantado e/ou parâmetros dosimétricos do *laser* em relação aos empregados no presente estudo.

Na análise biomecânica, os animais tratados com *scaffold* de Biosilicato[®] e *scaffold* de Biosilicato[®] associado ao *laser* 120J/cm² apresentaram valores estatísticos menores de carga máxima quando comparados aos animais do grupo controle 30 e 45 dias após a cirurgia.

Estes resultados parecem estar de acordo com um estudo prévio no qual a associação do Biosilicato[®] particulado (180-212µm) e *laser* (As-Ga-Al, 830nm, 60J/cm² ou 120J/cm²) foi utilizada para o tratamento de defeitos ósseos em ratos saudáveis e resultou em uma diminuição das propriedades mecânicas do calo ósseo (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Por outro lado, Guzzardella *et al.* (2003) e Bossini *et al.* (2011) observaram um aumento nas propriedades biomecânicas de defeitos ósseos preenchidos com biomaterial após a irradiação do *laser*. No entanto, cumpre destacar que estes estudos utilizaram diferentes modelos experimentais, tipo de biomaterial e/ou parâmetros dosimétricos e comprimento de onda do *laser* em comparação com aqueles utilizados no presente trabalho.

As propriedades mecânicas do osso sofrem influência da massa óssea, assim como da qualidade e disposição dos seus elementos microestruturais (OLIVERA *et al.*, 2008). Considerando que foi observado tecido de granulação nos animais tratados com *scaffold* de Biosilicato[®] e *laser* até o último período avaliado neste estudo, é possível

que os menores valores de propriedades mecânicas deste grupo reflitam a diferença na qualidade e quantidade e distribuição espacial do osso neoformado no defeito ósseo tratado com a associação de *scaffold* de Biosilicato[®] e *laser* 120J/cm².

A fim de compreender os mecanismos moleculares da associação dos biomateriais e da LLLT no reparo ósseo, analisamos o efeito do implante de *scaffolds* de Biosilicato[®] associado ou não ao *laser* 120J/cm² na imunexpressão de COX-2, BMP-9 e RANKL durante o processo de consolidação.

O processo inflamatório desempenha um papel importante no reparo do tecido conjuntivo, estimulando a produção de prostaglandinas, que atuam na proliferação e diferenciação de osteoblastos, além de regularem a diferenciação e função dos osteoclastos (LI; BURR; TURNER, 2002; SIMON; MANIGRASSO; O'CONNOR, 2002). Particularmente, a expressão da enzima ciclooxigenase-2 é de suma importância na reparação tecidual (MATSUMOTO *et al.*, 2009), regulando fatores de transcrição, como o RUNX-2 e osterix, que têm papel na diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos (ZHANG *et al.*, 2002).

Neste estudo, a análise imunohistoquímica do grupo *scaffold* de Biosilicato[®] apresentou o pico de imunexpressão da COX-2 no 15º dia pós-operatório, que pode estar relacionado com o tecido ósseo neoformado mais organizado observado nos animais deste grupo. Por outro lado, os animais tratados com a associação do *scaffold* de Biosilicato[®] e *laser* 120J/cm² atingiu o pico de imunexpressão da COX-2 no 30º dia após a cirurgia.

Quanto aos efeitos da associação do Biosilicato[®] e *laser* 120J/cm² sobre a expressão de COX-2, muito poucos dados foram relatados. Bossini *et al.* (2011) observaram um aumento estatisticamente significativo na área de osso neoformado e aumento da expressão de COX-2 após 15 dias da realização de defeitos ósseos tibiais

em ratas osteopênicas tratadas com a associação de Biosilicato[®] particulado (180-212 μ m) e *laser* 120J/cm² (As-Ga-Al, 830nm). No entanto, é possível que as diferenças dos resultados estejam relacionadas com os diferentes modelos de animais experimentais e apresentação do biomaterial utilizados nos estudos.

As BMPs são outros fatores essenciais relacionados ao reparo ósseo. Estas proteínas apresentam propriedades estimulantes para a diferenciação de células mesenquimais nas linhagens osteogênica/condrogênica e para o aumento da expressão de fosfatase alcalina e osteocalcina (PROFF; RÖMER, 2009). Especificamente as BMPs 2, 6 e 9 desempenham um importante papel na diferenciação de células-tronco mesenquimais em osteoblastos (CHENG *et al.*, 2003).

Nossos resultados revelam que o implante de *scaffold* de Biosilicato[®] e também sua associação com o *laser* produziram uma expressão marcante da BMP-9 no 45º dia após a cirurgia, enquanto não houve expressividade para este imunomarcador no grupo controle no mesmo período. A partir desses resultados, podemos supor que o *scaffold* de Biosilicato[®], associado ou não à irradiação *laser*, exibiu um potencial osteogênico, uma vez que estimulou a expressão de BMP-9 até 45 dias após a cirurgia.

Os efeitos do implante de biocerâmicas associado ou não à LLLT na expressão da BMP-9 não foram abordados até o momento. No entanto, Takeuchi *et al.* (2009), descobriram que defeitos ósseos femorais preenchidos por β -fosfato tricálcico ou carbonato apatita sintetizada foram reparados por osso formado por osteoblastos diferenciados em torno das partículas de biomaterial, e a análise imunohistoquímica revelou que os osteoblastos expressaram BMPs 2, 4 e 7 no 5º dia, 1 e 2 semanas após a lesão. Baseados nestes resultados, os autores concluíram que, quando cerâmicas de fosfato de cálcio são usadas como materiais de substituição óssea, as BMPs são essenciais para sua osteocondutividade.

Sobre o RANKL, este é um fator chave para a diferenciação e ativação dos osteoclastos (KEARNS; KHOSLA; KOSTENUIK, 2008; ANANDARAJAH, 2009). Tem sido demonstrada que a expressão celular de RANKL no calo ósseo está fortemente vinculada à consolidação da fratura e está envolvida na regulação da reabsorção endocondral e na remodelação óssea (KON *et al.*, 2001).

Nossa análise imunohistoquímica evidenciou uma imunomarcagem positiva do RANKL em torno de partículas de Biosilicato[®], irradiados ou não com *laser*, em todos os períodos avaliados. Particularmente nos animais tratados com *scaffold* de Biosilicato[®] e *laser*, a imunoexpressão do RANKL foi maior do que nos outros grupos no 30º dia de pós-operatório, o que pode sugerir uma maior ativação de macrófagos/osteoclastos na superfície do material deste grupo e um *turnover* ósseo acelerado que, por sua vez, poderia colaborar para um reparo tecidual mais rápido nos animais tratados em relação ao controle.

A metodologia utilizada neste estudo está de acordo com estudos anteriores descritos na literatura (YAIOTA *et al.*, 2000; LIRANI-GALVÃO; JORGETTI; DA SILVA, 2006). O modelo de defeitos ósseos tem sido usado por muitos autores (LIRANI-GALVÃO; JORGETTI; DA SILVA, 2006; GRANITO *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010; FÁVARO-PIPI *et al.*, 2011) e seu preenchimento com *scaffolds* de biomaterial foi um modelo eficiente. Os biomateriais na forma de *scaffolds* são utilizados em estratégias de regeneração óssea, uma vez que podem servir como guia para o crescimento do tecido e permitem o fornecimento de sangue e nutrientes para as células que estão no seu interior (DAVIES *et al.*, 2008).

No entanto, é possível encontrar na literatura uma grande variedade de tipo de biomateriais, fluências e comprimentos de onda da irradiação *laser* usados na tentativa de melhorar e acelerar o reparo ósseo. Alguns autores sugerem que a associação de

biomateriais e irradiação *laser* promovem efeitos estimulantes sobre a consolidação óssea (GUZZARDELA *et al.*, 2003; ROCHKIND *et al.*, 2004; BOSSINI *et al.*, 2011). Outros afirmam que a terapia *laser* em associação com um biomaterial não é capaz de modular o processo de cicatrização óssea (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Devido a esta controvérsia, ainda não é possível determinar com segurança um protocolo ideal de LLLT na osseointegração de biomateriais.

6.6. CONCLUSÃO

Em síntese, podemos concluir que a associação do *scaffold* de Biosilicato[®] com o *laser* 120J/cm² exerce atividade osteogênica durante o reparo ósseo, com destaque para a ativação dos fatores osteogênicos avaliados. No entanto, o *scaffold* de Biosilicato[®] associado ou não a irradiação *laser* 120J/cm² não é eficaz em melhorar as propriedades mecânicas do calo ósseo nos períodos experimentais avaliados.

PARTE III**7. CONCLUSÃO****8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS****9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS****ANEXOS**

7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que a LLLT ($\lambda = 830\text{nm}$, fluência de $120\text{J}/\text{cm}^2$) e o implante de *scaffolds* de Biosilicato[®], associados ou não, foram eficazes em estimular a consolidação óssea, melhorando o desenvolvimento de osso neoformado e ativando a imunexpressão de proteínas, fatores de crescimento e de transcrição relacionados a diferentes etapas do reparo ósseo em defeitos tibiais em ratos saudáveis. No entanto, estas modalidades terapêuticas, associadas ou não, não foram capazes de melhorar as propriedades mecânicas do calo ósseo nos períodos experimentais avaliados em ensaio de flexão na posição de tração.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho avaliou os efeitos da terapia *laser* de baixa intensidade e do implante de *scaffolds* de Biosilicato[®], utilizados independentemente ou associados, no tratamento de defeitos ósseos 15, 30 e 45 dias após a cirurgia de defeitos induzidos em tíbias de ratos, porém algumas questões ainda necessitam ser analisadas para permitir uma correta e segura aplicação dos tratamentos propostos.

A partir disso, podemos enumerar eventuais limitações do atual estudo e perspectivas de futuros trabalhos:

1. Realizar defeitos ósseos de tamanho crítico para avaliar a eficácia de tratamento tanto da LLLT quanto do *scaffold* de Biosilicato[®];
2. Testar ambas as terapias em ossos de diferentes áreas corpóreas, com organizações morfológicas distintas (osso cortical e osso esponjoso) e com diferentes demandas biomecânicas;
3. Analisar genes e outras proteínas envolvidas no reparo ósseo para melhor compreender o processo de consolidação óssea, assim como a ação da LLLT e do *scaffold* de Biosilicato[®] no tecido ósseo em reparação.
4. Comparar o implante de *scaffolds* de Biosilicato[®] com implante de *scaffolds* de material bioinerte;
5. Testar *scaffolds* de Biosilicato[®] que apresentem maior porosidade e interconexão entre os poros produzidos sob diferentes vias e com diferentes agentes porogênicos,
6. Testar os *scaffolds* de Biosilicato[®], associados ou não, a outros biomateriais e agentes osteogênicos, como, por exemplo, materiais poliméricos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOELSAAD, N.S.; SOORY, M.; GADALLA, L.M.; RAGAB, L.I.; DUNNE, S.; ZALATA, K.R.; LOUCA, C. Effect of soft laser and bioactive glass on bone regeneration in the treatment of bone defects (an experimental study). **Lasers Med Sci**, v. 24, p. 527-533, 2009.

AIHARA, N.; YAMAGUCHI, M.; KASAI, K. Low-energy irradiation stimulates formation of osteoclast-like cells via RANK expression in vitro. **Lasers Med Sci**, v. 21, p. 24-33, 2006.

ANANDARAJAH, A.P.; Role of RANKL in bone diseases. **Trends Endocrinol Metab**, v. 20, p. 88-94, 2009.

ANDERSON, D.M.; MARASKOVSKY, E.; BILLINGSLEY, W.L.; DOUGALL, W.C.; TOMETSKO, M.E.; ROUX, E.R.; TEEPE, M.C.; DUBOSE, R.F.; COSMAN, D.; GALIBERT, L. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. **Nature**, v. 390, p. 175-179, 1997.

BARUSHKA, O.; YAAKOBI, T.; ORON, U. Effect of low-energy laser (He-Ne) irradiation on the process of bone repair in the rat tibia. **Bone**, v. 16, p. 47-55, 1995.

BLAYA, D.S.; GUIMARÃES, M.B.; POZZA, D.H.; WEBER, J.B.; OLIVEIRA, M;G. Histologic study of the effect of laser therapy on bone repair. **J Contemp Dent Pract**, v. 9, p. 41-48, 2008.

BOSSINI, P.S. **Efeitos do laser de baixa intensidade e do Biosilicato® no reparo ósseo de ratas osteopênicas**. 2010. 118p. Tese (Doutorado em Fisioterapia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos/SP.

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. **J Tissue Eng Regen Med**, v. 5, p. 229-237. 2011.

BOUVET-GERBETTAZ, S.; MERIGO, E.; ROCCA, J.P.; CARLE, G.P.; ROCHET, N. Effects of low level laser therapy on proliferation and differentiation of murine bone marrow cells into osteoblasts and osteoclasts. **Lasers Surg Med**, v. 41, p. 291-297, 2009.

BRASILERO FILHO, G. **Bogliolo Patologia**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

BRICK, K.E.; CHEN, X.; LOHR, J.; SCHMIDT, A.H.; KIDDER, L.S.; LEW, W.D. RbBMP-2 modulation of gene expression in infected segmental bone defects. **Clin Orthop Relat Res**, v. 467, p. 3096-3103, 2009.

CAO, W.; HENCH, L.L. Bioactive Materials. **Ceramics International**, v. 22, p. 493-507, 1996.

CARSON, J. S.; BOSTROM, M. P.G. Synthetic bone scaffolds and fracture repair. **Injury**, v. 38, p. S33-S37, 2007.

CHEN, Q.Z.; REZWAN, K.; ARMITAGE, D.; NAZHAT, S.N.; BOCCACCINI, A.R. The surface functionalization of 45S5 Bioglass® based glass-ceramic scaffolds and its impact on bioactivity. **J Mater Sci: Mater Med**, v. 17, p. 979-987, 2006.

CHENG, H.; JIANG, W.; PHILLIPS, F.M.; HAYDON, R.C.; PENG, Y.; ZHOU, L.; LUU, H.H.; AN, N.; BREYER, B.; VANICHAKARN, P.; SZATKOWSKI, J.P.; PARK, J.Y.; HE, T.C. Osteogenic Activity of the Fourteen Types of Human Bone Morphogenetic Proteins (BMPs). **J Bone Joint Surg Am**, v. 85, p. 1544-1552, 2003.

CLAES, L; WILLIE , B. The enhancement of bone regeneration by ultrasound. **Prog Biophys Mol Biol**, v. 93, p. 384-398, 2007.

COOMBE, A.R.; HO, C.; PHILIPS, J.R.; CHAPPLE, C. The effects of low-level laser irradiation on osteoblastic cells. **Clin Orthod Res**, v. 4, p. 3-14, 2001.

CORTESINI, R. Stem cells, tissue engineering and organogenesis in transplantation. **Transpl Immunol**, v. 15, p. 81, 2005.

COSTA, V.C.; COSTA, H.C.; VASCONCELOS, W.L.; PEREIRA, M.M.; ORÉFICE, R.L; MANSUR, H.S. Preparation of hybrid biomaterials for bone tissue engineering. **Mater Res**, v. 10, p. 21-26, 2007.

COURT-BROWN, C.M.; CAESAR, B. Epidemiology of adult fractures: A review. **Injury**, v. 37, p. 691-697, 2006.

CROVACE, M.C. **Obtenção de estruturas porosas altamente bioativas via sinterização do Biosilicato®**. 2010, 117 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) –Universidade Federal de São Carlos, São Carlos/SP.

DA SILVA, R.V.; CAMILLI, J.A. Repair of Bone Defects Treated with Autogenous Bone Graft and Low-Power Laser. **J CranioFac Surg**, v. 17, p. 297-301, 2006.

DAVIES, N.; DOBNER, S.; BEZUIDENHOUT, D.; SCHMIDT, C.; BECK, M.; ZISCH, A.H.; ZILLA, P. The dosage dependence of VEGF stimulation on scaffold neovascularisation. **Biomaterials**, v. 29, p. 3531-3538, 2008.

DIEUDONNE, S.C. ; VAN DEN DOLDER,J. ; DE RUIJTER, J.E. ; PALDAN, H. ; PELTOLA, T. ; VAN'T HOF, M.A. ; HAPPONEN, R.P. ; JANSEN, J.A. Osteoblast differentiation of bone marrow stromal cells cultured on silica gel and sol-gel-derived titania. **Biomaterials**, v. 23, p. 3041-3051, 2002.

DUCY, P.; ZHANG, R.; GEOFFROY, V.; RIDDAL, A.L.; KARSENTRY, G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. **Cell**, v. 89, p. 747-754, 1997.

EINHORN, T.A. The cell and molecular biology of fracture healing. **Clin Orthop Relat Res**, v. S355, p. S7–S21, 1998.

FÁVARO-PÍPI, E.; FEITOSA, S.M.; RIBEIRO, D.A.; BOSSINI, P.; OLIVEIRA, P.; PARIZOTTO, N.A.; RENNO, A.C. Comparative study of the effects of low-intensity pulsed ultrasound and low-level laser therapy on bone defects in tibias of rats. **Lasers Med Sci**, v. 25, p. 727-732, 2010.

FÁVARO-PIPI, E.; RIBEIRO, D.A.; RIBEIRO, J.U.; BOSSINI, P.; OLIVEIRA, P.; PARIZOTTO, N.A.; TIM, C.; ARAÚJO, H.S.S.; RENNO, A.C.M. Low-level laser therapy induces differential expression of osteogenic genes during bone repair in rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 9, p. 311-317, 2011.

FUJIMOTO, K.; KIYOSAKI, T.; MITSUI, N.; MAYAHARA, K.; OMASA, S.; SUZUKI, N.; SHIMIZU, N. Low-intensity laser irradiation stimulates mineralization via increased BMPs in MC3T3-E1 cells. **Lasers Surg Med**, v. 42, p. 519-526, 2010.

GAUTHIER, O.; MÜLLER, R.; VON STECHOW, D.; LAMY, B.; WEISS, P.; BOULER, J.M.; AGUADO, E.; DACULSI, G. In vivo bone regeneration with injectable calcium phosphate biomaterial: A three-dimensional micro-computed tomographic, biomechanical and SEM study. **Biomaterials**, v. 28, p. 5444-5453, 2005.

GAUTIER, E.; SOMMER, C. Guidelines for the clinical application of the LCP. **Injury**, v. 34, p. 63–76, 2003.

GHÉHENNEC, L.; LAYROLLE, P.; DACULSI, G. A review of bioceramics and fibrin sealant. **European Cells and Materials**, v. 8, p. 1-11, 2004.

GIANNOUDIS, P.V.; DINOPOULOS, H.; TSIRIDIS, E. Bone substitutes: An update. **Injury, Int J Care Injured**, v. 36, p. 20-27, 2005.

GRANITO, R.N. **Potencial osteogênico in vitro de uma nova vitrocerâmica bioativa (Biosilicato®)**. Tese (Doutorado em Fisioterapia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009a. 127p.

GRANITO, R.N.; RENNÓ, A.C.M.; RAVAGNANI, C.; BOSSINI, P.S.; MOCHIUTI, D.; JORGETTI, V.; DRIUSSO, P.; PEITL, O.; ZANOTTO, E.D.; PARIZOTTO, N.A.; OISHI, J. *In vivo* biological performance of a novel highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate®): A biomechanical and histomorphometric study in rat tibial defects. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 97B, p. 139-147, 2011.

GRANITO, R.N.; RIBEIRO, D.A.; RENNÓ, A.C.; RAVAGNANI, C.; BOSSINI, P.; PEITL-FILHO, O.; ZANOTTO, E.D.; PARIZOTTO, N.A.; OISHI, J. Effects of biosilicate and bioglass 45S5 on tibial bone consolidation on rats, a biomechanical and a histological study. **J Mater Sci Mater Med**, v. 20, p. 2521-2526, 2009b.

GUZZARDELLA, G.A.; TORRICELLI, P.; NICOLI-ALDINI, N.; GIARDINO, N. Osseointegration of endosseous ceramic implants after postoperative low-power laser stimulation: an *in vivo* comparative study. **Clin Oral Impl Res**, v. 14, p. 226-232, 2003.

HADJIARGYROU, M.; KENNETH, M.; RYABY, J.P.; RUBIN, C. Enhancement of fracture healing by low intensity ultrasound. **Clin Orthop Relat Res**, v. 355, p. 216-229, 1998.

HAMAJIMA, S.; HIRATSUKA, K.; KIYAMA-KISHIKAWA, M.; TAGAWA, T.; KAWAHARA, M.; OHTA, M.; SASAHARA, H.; ABIKO, Y. Effect of low-level laser irradiation on osteoglycin gene expression in osteoblasts. **Lasers Med Sci**, v. 18, p. 78-82, 2003.

HENCH, L.L. Bioceramics. **J Am Ceram Soc**, v. 81, p. 1705-1728, 1998.

HENCH, L.L. Bioceramics: From Concept to clinic. **J Am Ceram Soc**, v. 74, p. 1487-1510, 1991.

HENCH, L.L. Glass and genes: The 2001 W. E. S. turner memorial lecture. **Glass Technology**, v. 44, p. 1-10, 2003.

HENCH, L.L.; WEST, J.K. Biological Applications of bioactive glasses. **Life Chemistry Reports**, v. 13, p. 187-241, 1996.

HENCH, LL, POLAK, J.M. Third-generation biomedical materials. Review. **Science**, v. 295, p. 1014-1017, 2002.

HOLLINGER, J.O.; ONIKEPE, A.O.; MACKRELL, J.; EINHORN, T.; BRADICA, G.; LYNCH, S.; HART, C.E. Accelerated fracture healing in the geriatric, osteoporotic rat with recombinant human platelet-derived growth factor-BB and an injectable β -tricalcium phosphate/collagen matrix. **J Orthop Res**, v. 26, p. 83-90, 2008.

HOU, J.F.; ZHANG, H.; YUAN, X.; LI, J.; WEI, Y.J.; HU, S.S. In vitro effects of low-level laser irradiation for bone marrow mesenchymal stem cells, proliferation, growth factors secretion and myogenic differentiation. **Lasers Surg Med**, v. 40, p. 726-733, 2008.

JAMES, P.F. Glass ceramics: new compositions and uses. **J Non-Cryst Solids**, v. 181, p. 1-15, 1995.

JONES, J.R.; HENCH, L.L. Regeneration of trabecular bone using porous ceramics. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 7, p. 301-307, 2003.

KANG, Q.; SUN, M.H.; CHENG, H.; PENG, Y.; MONTAG, A.G.; DEYRUP, A.T.; JIANG, W.; LUU, H.H.; LUO, J.; SZATKOWSKI, VANICHAKARN, P.; PARK, J.Y.; LI, Y.; HAYDON, R.C.; HE, T-C. Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery. **Gene Therapy**, v. 11, p. 1312-1320, 2004.

KARAGEORGIU,V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis: Review. **Biomaterials**, v. 26, p. 5474-5491, 2005.

KARGMAN, S.; CHARLESON, S.; CARTWRIGHT, M.; FRANK, J.; RIENDEAU, D.; MANCINI, J.; EVANS, J.; O'NEILL, G. Characterization of prostaglandin G/H synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey and human gastrointestinal tracts. **Gastroenterology**, v. 111, p. 445-454, 1996.

KARU, T. **The science of low power laser therapy**. Amsterdam: Gordon and Breach, 1998.

KARU, T.; PYATIBRAT, L.; KALENDO, G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. **J Photochem Photobiol B**, v. 27, p. 219-223, 1995.

KAYAL, R.A.; ALBLOWI, J.; MCKENZIE E.; KROTHAPALLI, N.; SILKMAN, L.; GERSTENFELD, L.; EINHORN, T.A.; GRAVES D.T. Diabetes causes the accelerated loss of cartilage during fracture repair which is reserved by insulin treatment. **Bone**, v. 44, p. 357-363, 2009.

KEARNS, A.E.; KHOSLA, S.; KOSTENUIK, P.J. Receptor activator of nuclear factor κ b ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. **Endocrine Reviews**, v. 29, p. 155-192, 2008.

KHADRA, M.; KASEM, N.; HAANÆS, H. R.; ELLINGSEN, J.; LYGSTADAAS, S. Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy. **Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol Endod**, v. 97, p. 693-700, 2004.

KHOSLA, S.; WESTENDORF, J.J.; OURSLER, M.J. Building bone to reverse osteoporosis and repair fractures. **J Clin Invest**, v. 118, p. 421-428, 2008.

KIM, H.W.; KNOWLES, J.C.; KIM, H.E. Hydroxyapatite porous scaffold engineered with biological polymer hybrid coating for antibiotic vancomycin release. **J Mater Sci Mater**, v. 16, p. 189-195, 2005.

KITCHEN, S.; BAZIN, S. **Eletroterapia: Prática Baseada em Evidências**. 11 ed. Barueri: Manole, 2003.

KIYOSAKI, T.; MITSUI, N.; SUZUKI, N.; SHIMIZU, N. Low-level laser therapy stimulates mineralization via increased runx2 expression and ERK phosphorylation in osteoblasts. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28, p. S16-S172, 2010.

KOCHANOWSKA, I.; CHABEREK, S.; WOJTOWICZ, A.; MARCZYŃSKI, B.; WŁODARSKI, K.; DYTKO, M.; OSTROWSKI, K. Expression of genes for bone morphogenetic proteins BMP-2, BMP-4 and BMP-6 in various parts of the human skeleton. **BMC Musculoskelet Disord**, v. 8, p. 128, 2007.

KOMORI, T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. **Cell Tissue Res**, v. 339, p. 189-195, 2009.

KOMORI, T. Requisite roles of Runx-2 and Cbfb in skeletal development. **J Bone Miner Metab**, v. 21, p. 193-197, 2003.

KON, T.; CHO, T.J.; AIZAWA, T.; YAMAZAKI, M.; NOOH, N.; GRAVES, D.; GERSTENFELD, L.C.; EINHORN, T.A. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. **J Bone Miner Res**, v. 16, p. 1004-1014, 2001.

KONDO, N.; OGOSE, A.; TOKUNAGA, K.; ITO, T.; KATSUMITSU, A.; KUDO, N.; INOUE, H.; IRIE, H.; ENDO, N. Bone formation and resorption of highly purified b-tricalcium phosphate in the rat femoral condyle. **Biomaterials**, v. 26, p. 5600-5608, 2005.

LEMAIRE, V.; TOBIN, F.L.; GRELLER, L.D.; CHO, C.R.; SUVA, L.J. Modeling the interactions between osteoblast and osteoclast activities in bone remodeling. **J Theor Biol**, v. 229, p. 293-309, 2004.

LI, J.; BURR, D.B.; TURNER, C.H. Suppression of prostaglandin synthesis with NS-398 has different effects on endocortical and periosteal bone formation induced by mechanical loading. **Calcif Tissue Int**, v. 70, p. 320-329, 2002.

LIRANI-GALVÃO, A.P.; JORGETTI, V.; DA SILVA, O.L. Comparative study of how low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound affect bone repair in rats. **Photomed Laser Surg**, v. 24, p. 735-740, 2006.

LIU, X.; LYON, R.; MEIER, H.T.; THOMETZ, J.; HAWORTH, S.T. Effect of lower-level laser therapy on rabbit tibial fracture. **Photomed Laser Surg**, v. 25, p. 487-494, 2007.

LUGER, E.J.; ROCHKIND, S.; WOLLMAN, Y.; KOGAN, G.; DEKEL, S. Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. **Lasers Surg Med**, v. 22, p. 97-102, 1998.

MALIZOS, K.N.; HANTES, M.E.; PROTOPAPPAS, V.; PAPACHRISTOS, A. Low-intensity pulsed ultrasound for bone healing: an overview. **Injury**, v. 37, p. S56-S62, 2006.

MARINO, J.A.M. **Efeito do laser terapêutico de baixa potência sobre o processo de reparação óssea em tibia de rato**. Dissertação (Mestrado em Fisioterapia) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2003. 107 p.

MATSUMOTO, M.A.; FERINO, F.V.; MONTELEONE, G.F. RIBEIRO, D.A. Low level laser therapy modulates cyclo-oxygenase-2 expression during bone repair in rats. **Lasers Med Sci**, v. 24, p. 196-201, 2009.

MAYR, E.; LAULE, A.; SUGER, G.; RÜTER, A.; CLAES, L. Radiographic results of callus distraction aided by pulsed low-intensity ultrasound. **J Orthop Trauma**, v. 15, p. 407-414, 2001.

MIRANDA, S.R.; NARY FILHO, H.; PADOVAN, L.E.; RIBEIRO, D.A.; NICOLIELO, D.; MATSUMOTO, M.A. Use of platelet-rich plasma under autogenous onlay bone grafts. **Clin Oral Impl Res**, v. 17, p. 694-699, 2006.

MOURA, J.; TEIXEIRA, L.N.; RAVAGNANI, C.; PEITL FILHO, O.; ZANOTTO, E.D.; BELOTI, M.M.; PANZERI, H.; ROSA, A.L.; OLIVEIRA, P.T. In vitro osteogenesis on a highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate®). Part A. **J Biomed Mater Res**, v. 82, p. 545-557, 2007.

NISSAN, J.; ASSIF, D.; GROSS, M.D.; YAFFE, A.; BINDERMAN, I. Effect of low intensity laser irradiation on surgically created bony defects in rats. **J Oral Rehabil**, v. 33, p. 619-924, 2006.

OKABE, K.; UEKI, K.; MARUKAWA, K.; MUKOZAWA, A.; MIYAZAKI, M.; NAKAGAWA, K. An experimental study of use of absorbable plate in combination with self-setting α -tricalcium phosphate for orthognathic surgery. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 110, p. 560-569, 2010.

OLIVEIRA, P. Os **efeitos do Biosilicato® e do laser terapêutico de baixa potência no processo de consolidação em tíbias de ratos**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009. 74p.

OLIVEIRA, P.; RIBEIRO, D.A.; FAVARO-PIPI, E.; DRIUSSO, P.; PARIZOTTO, N.A.; RENNO, A.C.M. Low level laser therapy does not modulate the outcomes of a highly bioactive glass–ceramic (Biosilicate®) on bone consolidation in rats. **J Mater Sci: Mater Med**, v. 21, p. 1379-1384, 2010.

OLIVEIRA, P.; SPERANDIO, E.; FERNANDES, K.R.; PASTOR, F.A.C.; NONAKA, K.O.; RENNO, A.C.M. Comparação dos efeitos do laser de baixa potência e do ultrassom de baixa intensidade no processo de reparo ósseo em tíbia de rato. **Rev Bras Fisioter**, v. 15, p. 200-205, 2011.

OLIVERA, M.I.; MARTÍNEZ, M.P.; CONTI, M.I.; BOZZINI, C.; BOZZINI, C.E.; ALIPPI, R.M. Permanent reduction of mandibular size and bone stiffness induced in post-weaning rats by cyclophosphamide. **Arch of Oral Biol**, v. 54, p. 6-11, 2008.

ORÉFICE, R.L.; PEREIRA, M.M.; MANSUR, H.S. **Biomateriais: fundamentos e aplicações**, Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006.

OZAWA, Y.; SHIMIZU, N.; KARIYA, G. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. **Bone**, v. 22, p. 347-354, 1998.

PEITL, O. **Vitro-cerâmica bioativa de alto desempenho mecânico**. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1995. 369 p.

PICKERING, S.A.W.; SCAMMELL, B.E. Electromagnetic Fields for Bone Healing. **Lower Extremity Wounds**, v. 1, p.152-160, 2002.

PINHEIRO, A.L.B.; GERBI, M.E.M.M. Photoengineering of bone repair processes. **Photomed Laser Surg**, v. 24, p. 169-178, 2006.

PINHEIRO, A.L.B.; LIMEIRA JÚNIOR, F.A.; GERBI, M.E.M.; RAMALHO, L.M.P.; MARZOLA, C.; PONZI, E.A.C.; SOARES, A.O.; CARVALHO, L.C.B.; LIMA, H.C.V.; GONÇALVES, T.O. Effect of low-level laser therapy on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone. **Braz Dent J**, v. 14, p. 177-181, 2003.

POLINDER, S.; MEERDING, W.J.; VAN BAAR, M.E.; TOET, H.; MULDER, S.; VAN BEECK, E.F. Cost estimation of injury-related hospital admissions in 10 European countries. **J Trauma**, v. 59, p. 1283-1290, 2005.

PRETEL, H.; LIZARELLI, R.F.; RAMALHO, L.T. Effect of low-level laser therapy on bone repair, histological study in rats. **Lasers Surg Med**, v. 39, p. 788-796, 2007.

PROFF, P.; RÖMER, P. The molecular mechanism behind bone remodelling: a review. **Clinical Oral Investigations**, v. 13, p. 355-362, 2009.

RAVAGNANI, C. **Biosilicato[®] para promoção da saúde oral**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003. 161 p.

RAWOOL, N.; GOLDBERG, B.B.; FORSBERG, F.; WINDER, A.A.; HUME, E. Power doppler assessment of vascular changes during fracture treatment with low-intensity ultra-sound. **J Ultrasound Med**, v. 22, p. 145-153, 2003.

RENNO, A.C.M.; MCDONNELL, P.A.; LAAKSO, L. Effect of 830nm laser phototherapy on osteoblasts grown *in vitro* on Biosilicate scaffolds. **Photomed Laser Surg**, v. 28, p. 131-133, 2010.

RENNO, A.C.M.; MCDONNELL, P.A.; PARIZOTTO, N.A.; LAAKSO, E-L. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation *in vitro*. **Photomed Laser Surg**, v. 25, p. 275-280, 2007.

RENNO, A.C.M.; MOURA, F. M.; SANTOS, N. S. A.; TIRICO, R. P.; BOSSINI, P. S.; PARIZOTTO, N. A. Effects of 830-nm laser, used in two doses, on biomechanical properties of osteopenic rat femora. **Photomed Laser Surg**, V. 24, P. 202-206, 2006.

RIBEIRO, D.A.; MATSUMOTO, M.A. Low-level laser therapy improves bone repair in rats treated with anti-inflammatory drugs. **J Oral Rehabil**, v. 35, p. 925-933, 2008.

ROCHKIND, S.; KOGAN, G.; LUGER, E.G.; SALAME, K.; KARP, E.; GRAIF, M.; WEISS, J. Molecular structure of the bony tissue after experimental trauma to the

mandibular region followed by laser therapy. **Photomed Laser Surg**, v. 22, p. 249-253, 2004.

RODAN, G.A. Coupling of bone resorption and formation during bone remodeling. In: MARCUS, R.; FELDMAN, D.; KELSEY, J. **Osteoporosis**. New York: Academic, p. 289-299, 1996.

ROSE, F.R.; CYSTER, L.A.; GRANT, D.M.; SCOTCHFORD, C.A.; HOWDLE, S.M.; SHAKESHEFF, K.M. In vitro assessment of cell penetration into porous hydroxyapatite scaffolds with a central aligned channel. **Biomaterials**, v. 25, p. 5507-5514, 2004.

RUBIN, E.; GORSTEIN, F.; RUBIN, R.; SCHWARTING, R.; STRAYER, D. **Rubins Patologia: bases clinicopatológicas da medicina**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

RUTTEN, S.; NOLTE, P.A.; GUIT, G.L.; BOUMAN, D.E.; ALBERS, G.H.R. Use of Low Pulsed Ultrasound for Posttraumatic Nonunions of the Tibia: A Review of Patients Treated in the Netherlands. **J Trauma**, v. 62, p. 902-908, 2007.

SENA, K.; LEVEN, R.M.; MAZHAR, K.; SUMMER, D.R.; VIRDI, A.S. Early gene response to low intensity pulsed ultrasound in rat osteoblastic cells. **Ultrasound Med Biol**, v. 31, p. 703-708, 2005.

SHAKOURI S.K.; SOLEIMANPOUR, J.; SALEKZAMANI, Y.; OSKUIE, M.R. Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process. **Lasers Med Sci**, v. 25, p. 73-77, 2009.

SHAKOURI, K.; EFTEKHARSADAT, B.; OSKUIE, M.R.; SOLEIMANPOUR, J.; TARZAMNI, M.K.; SALEKZAMANI, Y.; HOSHYAR, Y.; NEZAMI, N. Effect of Low-Intensity Pulsed Ultrasound on Fracture Callus Mineral Density and Flexural Strength in Rabbit Tibial Fresh Fracture. **J Orthop Sci**, v. 15, p. 240-244. 2010.

SHIMIZU, N.; MAYAHARA, K.; KIYOSAKI, T.; YAMAGUCHI, A.; OZAWA, Y.; ABIKO, Y. Low-intensity laser irradiation stimulates bone nodule formation via insulin-like growth factor-I expression in rat calvarial cells. **Lasers Surg Med**, v. 39, p. 551-559, 2007.

SIMON, A.M.; MANIGRASSO, M.B.; O'CONNOR, J.P. Cyclo-oxygenase 2 function is essential for bone fracture healing. **J Bone Miner Res**, v. 17, p. 963-976, 2002.

SIQUEIRA, R.L.; ZANOTTO, E.D. Biosilicato: histórico de uma vitrocerâmica brasileira de elevada bioatividade. **Quim Nova**, v.34, p. 1231-1241, 2011.

STEIN, A.; BENAYAHU, D.; MALTZ, L.; ORON, U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts *in vitro*. **Photomed Laser Surg**, v. 23, p. 161-166, 2005.

STEIN, E.; KOEHN, J.; SUTTER, W.; WENDTLANDT, G.; WANSCHITZ, F.; THURNHER, D.; BAGHESTANIAN, M.; TURHANI, D. Initial effects of low-level

laser therapy on growth and differentiation of human osteoblast-like cells. **Wien Klin Wochenschr**, v. 120, p. 112-117, 2008.

SUDA, T.; TAKAHASHI, N.; UDAGAWA, N.; JIMI, E.; GILLESPIE, M.T.; MARTIN, T.J. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. **Endocr Rev**, v. 20, p. 345-357, 1999.

TAKEUCHI, H.; NAGAYAMA, M.; IMAIZUMI, Y.; TSUKAHARA, T.; NAKAZAWA, J.; KUSAKA, Y.; OHTOMO, K. Immunohistochemical analysis of osteoconductivity of β -tricalcium phosphate and carbonate apatite applied in femoral and parietal bone defects in rats. **Dental Materials Journal**, v. 28, p. 595-601, 2009.

TSUMAKI, N.; KAKIUCHI, M.; SASAKI, J.; OCHI, T.; YOSHIKAWA, H. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates maturation of callus in patients treated with opening wedge high tibial osteotomy by hemicallotaxis. **J Bone Joint Surg Am**, v. 86, p. 2399-2405, 2004.

USUBA, M.; AKAI, M.; SHIRASAKI, Y. Effect of low level lasertherapy (LLLT) on viscoelasticity of the contracted knee joint: comparison with whirlpool treatment in rats. **Lasers Surg Med**, v. 22, p. 81-85, 1998.

VAES, B.L.; DUCY, P.; SIJBERS, A.M.; HENDRIKS, J.M.; VAN SOMEREN, E.P.; JONG, N.G.; VAN DEN HEUVEL, E.R.; OLIJVE, W.; VAN ZOELLEN, E.J.; DECHERING, K.L. Microarray analysis on Runx-2 deficient mouse embryos reveals novel Runx-2 functions and target genes during intramembranous and endochondral bone formation. **Bone**, v. 39, p. 724-738, 2006.

VALLET-REGI, M. Ceramics for medical applications. **J Chem Soc**, v. 2, p. 97-108, 2001.

VITALE-BROVARONE, C.; VERNÉ, E.; ROBIGLIO, L.; APPENDINO, P.; BASSI, F.; MARTINASSO, G.; MUZIO, G.; CANUTO, R. Development of glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering: characterization, proliferation of human osteoblasts and nodule formation. **Acta Biomater**, v. 3, p. 199-208, 2007.

VLADIMIROV, Y.A.; OSIPOV, A.N.; KLEBANOV, G.I. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. **Biochemistry**, v. 69, p. 81-90, 2004.

WOHL, G.R.; TOWLER, D.A.; SILVA, M.J. Stress fracture healing: fatigue loading of the rat ulna induces upregulation in expression of osteogenic and angiogenic genes that mimic the intramembranous portion of fracture repair. **Bone**, v. 44, p. 320-330, 2009.

WONG, B.R.; RHO, J.; ARRON, J.; ROBINSON, E.; ORLINICK, J.; CHAO, M.; KALACHIKOV, S.; CAYANI, E.; BARTLETT, F.S.; FRANKEL, W.N.; LEE, S.Y.; CHOI, Y. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. **J Biol Chem**, v. 272, p. 25190-25194, 1997.

YAIOTA, H.; ORIMO, H.; SHIRAI, Y.; SHIMADA, T. Expression of bone morphogenetic proteins and rat distal-less homolog genes following rat femoral fracture. **J Bone Miner Metab**, v. 18, p. 63-70, 2000.

YANG, S.; LEONG, K.F.; DU, Z.; CHUA, C.K. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part II. Rapid prototyping techniques. **Tissue Eng**, v. 8, p. 1-11, 2002.

YANG, S.; LEONG, K.F.; DU, Z.; CHUA, C.K. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. **Tissue Eng**, v. 6, p. 679-689, 2001.

YASUDA, H.; SHIMA, N.; NAKAGAWA, N.; YAMAGUCHI, K.; KINOSAKI, M.; MOCHIZUKI, S.; TOMOYASU, A.; YANO, K.; GOTO, M.; MURAKAMI, A.; TSUDA, E.; MORINAGA, T.; HIGASHIO, K.; UDAGAWA, N.; TAKAHASHI, N.; SUDA, T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 95, p. 3597-3602, 1998.

ZANOTTO, E.D.; *et al.*, FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS; UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. **Process and compositions for preparing particulate, bioactive or resorbable biosilicates for use in the treatment of oral ailments.** Int. C. C03C10/00, 20 Feb, WO2004/074199, 2004.

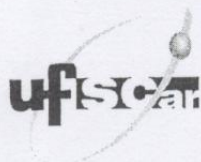
ZHANG, X.; MORHAM, S.G.; LANGENBACH, R.; YOUNG, D.A.; XING, L.; BOYCE, B.F.; PUZAS, E.J.; ROSIER, R.N.; O'KEEFE, R.J.; SCHWARZ, E.M. Evidence for a direct role of COX-2 in implant wear debris induced osteolysis. **J Bone Miner Res**, v. 16, p. 660-669, 2001.

ZHANG, X.; SCHWARZ, E.M.; YOUNG, D.A.; PUZAS, E.; ROSIER, R.N.; O'KEEFE, R.J. Cyclo-oxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. **J Clin Invest**, v. 109, p. 1405-1415, 2002.

ZIROS, P.G.; BASDRA, E.K.; PAPAVALASSILOU, A.G. Runx-2: of bone and stretch. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 40, p. 1659-1663, 2008.

ANEXO A

PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

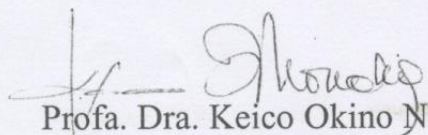


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
 PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
 Comissão de Ética em Experimentação Animal
 Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
 Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110
 Fax: (016) 3361.3176
 CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
propq@power.ufscar.br - www.propq.ufscar.br

Protocolo CEEA nº 002/2009

Aprovo *ad referendum* da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CEEA/UFSCar, o projeto pesquisa **Consolidação óssea: efeitos do laser terapêutico de baixa potência e de scaffolds de Biosilicato® em defeitos ósseos induzidos**, elaborado por Karina N. Z. Pinto, Ana Cláudia M. Rennó, Carla Tim, Nivaldo Parizotto.

São Carlos, 17 de março de 2009.


 Profa. Dra. Keico Okino Nonaka

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal

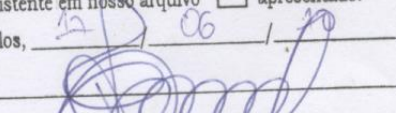


Universidade Federal de São Carlos
 Pró-Reitoria de Pesquisa

Certifico que esta cópia confere com o documento original.

existente em nosso arquivo apresentado.

São Carlos, 12/03/09


 Edson Luiz Rodrigues Cruz
 Assistente em Administração

ANEXO B**MODELO DE FICHA UTILIZADA PARA A ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA****FICHA ANÁLISE HISTOLÓGICA**

Lâmina: _____ Grupo: _____ Aumento: **40X**
 AMOSTRA: 1:() 2:() 3:()
 Foto: SIM () NÃO ()

	1	2
--	---	---

1) Presença de infiltrado inflamatório:

<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Leve (menor do que 35%)	<input type="checkbox"/> Moderado (de 35% a 65% da região da lesão)	<input type="checkbox"/> Intenso (maior do que 65%)
----------------------------------	---	---	--

OBS: _____

2) Presença de tecido de granulação:

<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Leve (menor do que 35%)	<input type="checkbox"/> Moderado (de 35% a 65% da região da lesão)	<input type="checkbox"/> Intenso (maior do que 65%)
----------------------------------	---	---	--

OBS: _____

3) Presença de tecido ósseo neoformado:

<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Leve (menor do que 35%)	<input type="checkbox"/> Moderado (de 35% a 65% da região da lesão)	<input type="checkbox"/> Intenso (maior do que 65%)
----------------------------------	---	---	--

OBS: _____

A. Organização tecidual:

<input type="checkbox"/> Estágio inicial	<input type="checkbox"/> Estágio Intermediário	<input type="checkbox"/> Estágio avançado
--	--	---

OBS: _____

SE GRUPO BIOMATERIAL:**1) Quantidade de Biomaterial no defeito:**

<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Leve (menor do que 35%)	<input type="checkbox"/> Moderado (de 35% a 65% da região da lesão)	<input type="checkbox"/> Abundante (maior do que 65%)
----------------------------------	---	---	--

OBS: _____

ANEXO C

MODELO DE FICHA UTILIZADA PARA A ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

FICHA IMUNOHISTOQUIMICA

FATOR: _____

Lâmina: _____ Grupo: _____ Aumento: 40X

AMOSTRA: A:() B:() C:()

Foto: SIM () NÃO ()

	A	B
--	---	---

CAMPO (1)

Células ósseas:

() Ausente	() Leve (menor do que 35%)	() Moderada (de 35% a 65% da região da lesão)	() Intensa (maior do que 65%)
-------------	-----------------------------------	---	--------------------------------------

Matriz Extracelular:

() Ausente	() Leve (menor do que 35%)	() Moderada (de 35% a 65% da região da lesão)	() Intensa (maior do que 65%)
-------------	-----------------------------------	---	--------------------------------------

CAMPO (2)

Células ósseas:

() Ausente	() Leve (menor do que 35%)	() Moderada (de 35% a 65% da região da lesão)	() Intensa (maior do que 65%)
-------------	-----------------------------------	---	--------------------------------------

Matriz Extracelular:

() Ausente	() Leve (menor do que 35%)	() Moderada (de 35% a 65% da região da lesão)	() Intensa (maior do que 65%)
-------------	-----------------------------------	---	--------------------------------------

CAMPO (3)

Células ósseas:

() Ausente	() Leve (menor do que 35%)	() Moderada (de 35% a 65% da região da lesão)	() Intensa (maior do que 65%)
-------------	-----------------------------------	---	--------------------------------------

Matriz Extracelular:

() Ausente	() Leve (menor do que 35%)	() Moderada (de 35% a 65% da região da lesão)	() Intensa (maior do que 65%)
-------------	-----------------------------------	---	--------------------------------------