

**ELAINE FÁVARO PÍPI**

**EFEITOS DO LASER TERAPÊUTICO E DO ULTRASSOM  
PULSADO DE BAIXA INTENSIDADE NA EXPRESSÃO  
DE GENES RELACIONADOS À DIFERENCIAÇÃO  
CELULAR DURANTE O PROCESSO DE REPARO ÓSSEO**

São Carlos – SP  
2010

**ELAINE FÁVARO PÍPI**

**EFEITOS DO LASER TERAPÊUTICO E DO ULTRASSOM  
PULSADO DE BAIXA INTENSIDADE NA EXPRESSÃO  
DE GENES RELACIONADOS À DIFERENCIAÇÃO  
CELULAR DURANTE O PROCESSO DE REPARO ÓSSEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Orientadores: Profa. Dra. Ana Cláudia Muniz Renno  
Profa. Dra. Heloísa S S de Araújo

São Carlos – SP  
2010

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

P665el

Pípi, Elaine Favaro.

Efeitos do laser terapêutico e do ultrassom pulsado de baixa intensidade na expressão de genes relacionados à diferenciação celular durante o processo de reparo ósseo / Elaine Fávaro Pípi. -- São Carlos : UFSCar, 2010. 77 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Biotecnologia. 2. Laser de baixa intensidade. 3. Reparo ósseo. I. Título.

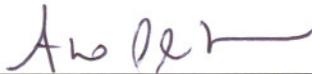
CDD: 660.6 (20<sup>a</sup>)

**Elaine Favaro Pipi**

Dissertação de Mestrado 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 Mestre em  
Biotecnologia

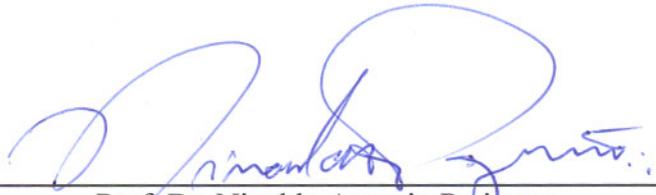
**Aprovado em: 22/06/2010**

**BANCA EXAMINADORA**



---

Profa. Dra. Ana Cláudia Muniz Renno (Orientadora)  
UNIFESP – Dfisio



---

Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto  
Universidade Federal de São Carlos – Dfisio/UFSCar



---

Profa. Dra. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari  
UNINOVE

## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a três pessoas que foram essenciais para que essa conquista acontecesse em minha vida:

Robinson (meu eterno amor),  
Angelo (meu irmão amado) e  
Paulo Bossini (meu amigo).

*"Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha,  
é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra.  
Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha, e não nos deixa só,  
porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós.  
Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova  
de que as pessoas não se encontram por acaso."*

*Charles Chaplin*

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

A minha orientadora Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Ana Cláudia Muniz Renno por ter me aceitado como aluna e me ensinado várias coisas que levarei por toda vida. Obrigada por ter acreditado em meu trabalho e por ter feito eu descobrir que sou capaz de me superar sempre. Agradeço seu ensinamento, seu incentivo e sua amizade.

A Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo por ter aceitado o convite para também orientar esse trabalho. Obrigada pela confiança quando iniciei os experimentos em seu laboratório, por ter me acolhido com todo carinho que demonstrou e pela amizade que foi crescendo a cada dia. Sou muito grata por tudo que fez por mim.

## AGRADECIMENTOS

À Deus por ter iluminado e guiado meu caminho me protegendo e me amando nos momentos de angústias, dúvidas e alegrias.

Aos meus pais que não mediram esforços para eu me tornar uma fisioterapeuta sempre me incentivando e dando todo suporte necessário para que meus objetivos fossem alcançados.

Ao meu noivo Robinson por ser meu conselheiro, amigo, companheiro e o maior incentivador durante esse período.

Ao meu irmão Angelo, pelo amor que demonstrou desde sempre.

À minha irmã Viviane e meus sobrinhos que mesmo não estando perto, sempre me incentivaram.

Ao meu grande amigo Paulo Bossini, desde a graduação formamos um laço de amizade que só fortaleceu com o tempo. Você é a pessoa fundamental para que isso tudo acontecesse em minha vida. Agradeço muito por ter acreditado em minha capacidade quando me falou sobre a vaga do mestrado.

Ao meus irmãos de coração Jean, Elizandra, Ariane e Cristiane por me apoiarem sempre.

À minha amiga Kerol, agradeço muito a sua amizade. Desde quando te conheci meus dias ficaram mais alegres. *Life is short, enjoy it!*

A todos os alunos do laboratório de eletrotermofototerapia, pelos momentos compartilhados.

As minhas amigas: Poliani, Carla, Karina, Vivian, Kelly e Suellen. Todas vocês contribuíram para que esse trabalho fosse finalizado, sou muito grata!

À Luciane Capello (USP – São Paulo) por ter esclarecidos minhas dúvidas no desenvolvimento desse trabalho e pela amizade formada.

À Patrícia Bueno, Juliana Uema, Carolina Martin e Carmen Pontes por me ajudar a entender um pouco sobre Biologia Molecular. Vocês foram muito especiais nessa conquista, obrigada!

À professora Tânia Salvini por permitir que eu utilizasse o laboratório de plasticidade muscular e à seus alunos: Sabrina Peviani, Gabriel Delfino e Thiago Russo por ter esclarecido algumas dúvidas que surgiram no decorrer desse trabalho.

À família Sabino da Silva pelo incentivo, dedicação e amor.

As minhas amigas do laboratório de bioquímica e biologia molecular (Carol, Carmen, Cyntia, Lívia, Kelli, Sílvia, Araceli, Verônica, Juliana, Patrícia, Dani e Márcia) foi perfeito ter conhecido vocês. Agradeço muito o carinho e a alegria que me proporcionaram durante os meses que passamos juntas. Levo todas em meu coração!

Ao meu amigo Charles Wang, você é muito especial.

Ao professor Nivaldo Parizotto por ter permitido que a maior parte desse trabalho fosse realizada em seu laboratório. Sua amizade e seus ensinamentos estarão sempre presentes em minha vida.

Ao professor Daniel Araki pela colaboração e correções que muito acrescentaram nesse trabalho.

Ao Elídio Piccinin e todas minhas amigas fisioterapeutas da clínica de fisioterapia São Carlos. Obrigada por me ouvirem, me apoiarem e me aconselharem durante esse tempo que passamos juntos!

Aos meus familiares e amigos que estiveram presentes nessa fase. Obrigada pela preocupação, incentivo e apoio. Amo vocês!

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo por ter proporcionado o apoio financeiro no desenvolvimento desse projeto.

## RESUMO

Fraturas de difícil consolidação e fraturas com não-união óssea são comumente encontradas na prática médica e estão associadas a altos índices de morbidade e mortalidade. Dentro deste contexto, recursos biofísicos e bioquímicos têm sido estudados na tentativa de minimizar o tempo de consolidação óssea. Dentre estes, podem ser destacados o uso do laser terapêutico de baixa intensidade (LLLT) e do ultrassom pulsado de baixa intensidade (LIPUS). Vários estudos sugerem que ambos os recursos são capazes de estimular a osteogênese no local da fratura, promovendo uma maior deposição de massa óssea e acelerando o processo de consolidação. No entanto, apesar de existir uma série de evidências radiográficas e biomecânicas da efetividade do LLLT e do LIPUS no processo de reparo ósseo, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nestes eventos são desconhecidos. Com isso, este projeto tem o objetivo de analisar os efeitos do LLLT e do LIPUS na expressão de genes relacionadas à formação óssea durante o processo de reparo ósseo e avaliar o calo ósseo através de análise histológica, em defeitos ósseos induzidos em tíbias de ratos. Foram utilizados ratos Wistar submetidos à cirurgia para a confecção de defeitos ósseos em ambas as tíbias. Os animais foram divididos em grupo controle (defeito ósseo sem tratamento), defeito ósseo tratado com LLLT e defeito ósseo tratado com LIPUS. Esses foram divididos em 3 subgrupos (n=10), que receberam 3, 6 e 12 sessões de tratamento e nos dias 7, 13, e 25, respectivamente, ocorreu a eutásia dos animais, sendo realizada 24 horas após a última sessão de tratamento. Ambas tíbias foram retiradas e submetidas aos protocolos de análise histológica e análise da expressão gênica por meio de PCR em tempo real. Foi observado na análise histológica qualitativa que os animais tratados com LLLT apresentaram uma maior área de tecido ósseo neoformado no período de 7, 13, 25 dias. Além disso, a análise morfométrica demonstrou aumento de tecido ósseo somente nos animais tratados com LLLT nos períodos de 13 e 25 dias. Foi verificado um aumento dos níveis de mRNA da BMP4 no período intermediário do grupo LLLT e da ALP, BMP4 e RUNX2 no período de 25 dias após a aplicação do LLLT e LIPUS, sendo que o mRNA da ALP mostrou-se mais expresso no grupo LLLT. Concluímos que o LLLT estimula a formação óssea pelo aumento da expressão do mRNA da BMP4 no período intermediário e da ALP no período tardio.

## ABSTRACT

Fractures of delayed consolidation and fractures with non-union are commonly found in medical practice and are associated with high morbidity and mortality. Within this context, biochemical and biophysical resource have been studied in an attempt enhance bone healing. Among these may be highlighted the use of low level laser therapy (LLLT) and low intensity pulsed ultrasound (LIPUS). Several studies suggest that both resources are able to stimulate osteogenesis at the fracture site, promoting a greater deposition of bone mass and accelerating the process of bone healing. However, despite a series of biomechanical and radiographic evidence of the effectiveness of LLLT and LIPUS in the bone repair, the cellular and molecular mechanisms that regulate and modulate the acceleration of the fracture consolidation are unknown. So the main purpose of the present work was to measure the effects of LLLT and LIPUS in the expression of osteogenic genes during the process of bone healing and to extend prior histological description after a bone created defect on of the tibiae in rats. For the study 90 male Wistar rats were underwent surgery for creation of bone defects in both tibias. The animals were randomly distributed into three groups: control group ( bone defect without treatment), bone defect treated with LLLT and bone defect treated with LIPUS. Each group were divided into 3 different subgroups (n=10) that received 3,6 and 12 sessions of treatment, and after 24 hours of each session was the euthanasia of animals on days 7, 13 and 25 days after surgery, respectively at each treatment session. Both tibias were removed and subjected to protocols for histological analysis and gene expression analysis by real time real time PCR. Was observed in the qualitative histological analysis that the animals treated with LLLT showed a greater area of new bone formation within 7, 13, 25 days. Furthermore, morphometric analysis demonstrated increased bone tissue only in animals treated with LLLT in 13 and 25 days. It was verified an increase in mRNA levels of BMP4 in the 13 days of the LLLT group and the ALP, Runx2 and BMP4 in 25 days after the application of LLLT and LIPUS, and the mRNA of ALP was more expressed in the LLLT group . We conclude that LLLT stimulates bone formation by increasing the mRNA expression of BMP4 in the 13 days and the ALP in the 25 days.

## LISTA DE TABELA E FIGURAS

<b>Tabela 1:</b> Sequências de <i>primers</i> utilizados nos experimentos de PCR em tempo real ....	42
<b>Figura 1:</b> Fotos da cirurgia. ....	34
<b>Figura 2:</b> Demonstração do local de aplicação do LLLT .....	36
<b>Figura 3:</b> Demonstração da aplicação de LIPUS .....	37
<b>Figura 4:</b> Desenho ilustrativo dos três campos selecionados na análise morfométrica.....	39
<b>Figura 5:</b> Fotomicrografia com a demarcação da área de neoformação óssea. Coloração com TM. ....	40
<b>Figura 6:</b> Análise de RNA total. Gel de agarose-formaldeído 1% .....	41
<b>Figura 7:</b> Análise dos produtos de PCR quantitativo em gel de agarose 2% dos genes ALP, BMP4, OC, Runx2 e RPS 18.....	43
<b>Figura 8:</b> Fotomicrografia dos achados morfológicos dos diferentes grupos experimentais (7 dias) .....	46
<b>Figura 9:</b> Fotomicrografia dos achados morfológicos dos diferentes grupos experimentais (13 dias) .....	47
<b>Figura 10:</b> Fotomicrografia dos achados morfológicos dos diferentes grupos experimentais (25 dias) .....	48
<b>Figura 11:</b> Análise do tecido ósseo neoformado em defeito ósseo de ratos controle e tratados com LLLT e LIPUS .....	48
<b>Figura 12:</b> Fotomicrografia dos achados morfométricos nos grupos controle, LLLT e LIPUS .....	49
<b>Figura 13:</b> Análise da expressão relativa do mRNA da Fosfatase Alcalina (ALP) normalizados por RPS18 em defeitos ósseos de ratos controles e tratados com LLLT e LIPUS, verificada por PCR em tempo real .....	51
<b>Figura 14:</b> Análise da expressão relativa do mRNA da Proteína Óssea Morfogenética 4 (BMP4) normalizados por RPS18 em defeitos ósseos de ratos controles e tratados com LLLT e LIPUS, verificada por PCR em tempo real.....	52

**Figura 15:** Análise da expressão relativa do mRNA da Osteocalcina (OC) normalizados por RPS18 em defeitos ósseos de ratos controles e tratados com LLLT e LIPUS, verificada por PCR em tempo real ..... 53

**Figura 16:** Análise da expressão relativa do mRNA da Runx2 normalizados por RPS18 em defeitos ósseos de ratos controles e tratados com LLLT e LIPUS, verificada por PCR em tempo real ..... 54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ALP** – Fosfatase Alcalina

**OC** – Osteocalcina

**BMP** – Proteína óssea morfogenética

**Runx2** – *Runt-related transcription factor 2*

**TGF- $\beta$**  - *Transforming growth factor-beta*

**RNA<sub>m</sub>** - Ácido ribonucleico mensageiro

**LLLT** - Laser terapêutico de baixa intensidade

**LIPUS** - Ultrassom pulsado de baixa intensidade

**He-Ne** – Hélio-Neônio

**As-Ga** – Arseneto de Gálio

**As-Ga-Al** – Arseneto de Gálio e Alumínio

**pH** – potencial de Hidrogeniônico

**ATP** – Adenosina trifosfato

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**RNA** – Ácido ribonucleico

**MMC** - *Mini-chromosome maintenance proteins*

**PZT**- Titanato Zirconato de Chumbo

**FDA** - *The Food and Drug Administration*

**NO** – Óxido Nitríco

**IGF** - Fator de crescimento insulínico

**PCR** – Reação em cadeia da polimerase

**EDTA** - ácido etilenodiamino tetra-acético

**HE** - Hematoxolína e eosina

**TM** - Tricômico de Masson

**RPS18** – Proteína Ribossomal S18

**Tm** – Temperatura de *melting*

**Ct** – *Treshould Cicle*

**UA** – Unidade arbitrária

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	16
1.1 Tecido ósseo.....	16
1.2 Reparo ósseo .....	18
1.3 Laser terapêutico de baixa intensidade (LLLT) .....	21
1.3.1 Efeitos osteogênicos do LLLT .....	23
1.4 Ultrassom pulsado de baixa intensidade (LIPUS).....	26
1.4.1 Características do ultrassom.....	26
1.4.2 O ultrassom pulsado de baixa intensidade no reparo ósseo .....	28
2. OBJETIVO.....	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	33
3.1 Animais de experimentação .....	33
3.2 Cirurgia .....	33
3.3 Modelo experimental .....	34
3.4 Tratamento .....	35
3.4.1 Laser terapêutico de baixa intensidade.....	35
3.4.2 Ultrassom pulsado de baixa intensidade .....	36
3.5 Eutanásia e coleta das amostras .....	37
3.6 Análises.....	37
3.6.1. Análise histológica.....	37
3.6.1.1 Análise histológica qualitativa descritiva.....	38
3.6.1.2 Análise histológica quantitativa .....	39
3.6.2 Análise gênica.....	40
3.6.2.1 Extração do RNA total .....	40
3.6.2.2 PCR em tempo real .....	42
3.6.3 Análise estatística.....	44
4. RESULTADOS.....	45
4.1 Análise histológica qualitativa descritiva.....	45
4.1.1 Grupo controle, LLLT e LIPUS no período de 7 dias .....	45
4.1.2 Grupo controle, LLLT e LIPUS no período de 13 dias .....	46
4.1.3 Grupo controle, LLLT e LIPUS no período de 25 dias .....	47
4.2 Análise histológica quantitativa (análise morfométrica).....	48
4.3 Análise da expressão gênica.....	50
4.3.1 Fosfatase alcalina (ALP) .....	50
4.3.2 Proteína óssea morfogénica 4 (BMP4).....	51
4.3.3 Osteocalcina (OC).....	52

4.3.4 Runx2.....	53
5. DISCUSSÃO.....	55
6. CONCLUSÕES.....	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA .....	66
ANEXO .....	77

## **1. INTRODUÇÃO**

Fraturas ósseas podem ser definidas como uma interrupção na continuidade do osso, podendo ser provocadas por traumatismo ou por natureza patológica (RUBIN et al., 2006; BRASILEIRO FILHO, 2006).

Milhões de pessoas em todo mundo sofrem algum tipo de fratura, gerando um grande problema sócio-econômico na saúde pública. Estima-se que, nos Estados Unidos, das 6,2 milhões de fraturas que ocorrem anualmente, cerca de 10% evoluem para a não-consolidação e para a pseudoartrose (EINHORN, 1998; HADJIARGYROU et al., 1998; SENA et al., 2005).

Embora a ciência tenha avançado muito nos últimos anos, desenvolvendo recursos que auxiliem na consolidação óssea, complicações no processo de reparo ainda ocorrem, o que pode culminar no aparecimento do quadro clínico de pseudoartroses e mesmo em não-união ósseas (CLAES et al., 2007; EINHORN, 1998).

Diante do exposto, fica evidente que as complicações relacionadas ao processo de consolidação estão associadas a uma substancial incapacidade física para os indivíduos acometidos e a altos custos sócio-econômicos, constituindo um importante desafio à clínica médica.

### **1.1 Tecido ósseo**

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e matriz extracelular (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999; ALBERTS, 2004; DUPLOMB et al., 2007), sendo essa composta por material orgânico (proteínas não colagenosas, fatores de crescimento, colágeno tipo I e III, etc) e mineral ( cristais de hidróxiapatita). Esse tecido apresenta várias funções, tais como: propriedades mecânicas (proporcionando suporte e

movimento ao tecido muscular esquelético), proteção de órgãos vitais (coração, cérebro, medula óssea, etc) e função metabólica (DUPLOMB et al., 2007; KARSENTY, 2000).

O tecido ósseo é composto por quatro tipos de células:

- Células osteoprogenitoras: são células derivadas do mesênquima e apresentam potencial em se diferenciar em pré-osteoblastos e, quando devidamente estimuladas, ativarão células osteoblásticas produzindo osso (CORNELL & LANE, 1990).

- Osteoblastos: são as principais células envolvidas na formação óssea, e são derivadas de células osteoprogenitoras mesenquimais (KARSENTY et al., 2000; GARIMELLA et al., 2008). São responsáveis pela síntese da matriz óssea extracelular e regulam a mineralização desta (AGUILA & ROWE, 2005).

- Osteócitos: são células encontradas no interior da matriz óssea (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999). Os osteócitos são as células mais numerosas do tecido ósseo e correspondem às formas diferenciadas dos osteoblastos. São consideradas células do osso já formado e estão completamente rodeadas por matriz óssea, dentro de espaços isolados. (CARVALHO & COLLARES-BUZATO, 2005).

- Osteoclastos: são células multinucleadas (6 a 12 núcleos) formadas a partir da fusão de células progenitoras mononucleares da linhagem dos monócitos/macrófagos e sua principal função é promover a reabsorção óssea (GARTINER & HIATT, 2003; CARVALHO & COLLARES-BUZATO, 2005). Juntamente com os osteoblastos, os osteoclastos desempenham um complexo mecanismo de remodelação a nível celular, que incide de forma alternada entre formação e reabsorção respectivamente (APOLINÁRIO, 2008).

A formação do tecido ósseo pode ser dar de duas maneiras, intramembranosa e endocondral. Embora histologicamente um osso não seja diferente do outro, a ossificação intramembranosa faz-se diretamente a partir de células mesenquimais, diferenciando-se em osteoprogenitoras, que, por sua vez, se diferenciam em osteoblastos, secretando matriz em

forma de trabéculas. Na ossificação endocondral, as células mesenquimais diferenciam-se em condroblastos e esses passam a secretar matriz cartilaginosa. Certas regiões desse molde cartilaginoso tornam-se vascularizadas trazendo novas células mesenquimais à região que se diferenciam em osteoprogenitoras e osteoblastos. Desse modo, aparece tecido ósseo a partir de uma matriz cartilaginosa (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999; CARVALHO & COLLARES-BUZATO, 2005).

Em relação ao revestimento, as superfícies externas e internas do osso são recobertas por perióstio e endóstio, respectivamente. O perióstio possui células osteoprogenitoras que se multiplicam por mitose e se diferenciam em osteoblastos, desempenhando papel importante no crescimento dos ossos e na recuperação de fraturas; e o endóstio é constituído por células osteogênicas achatadas revestindo as cavidades do osso esponjoso, o canal medular, os canais de Havers e os de Volkmann (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999). As principais funções do perióstio e endóstio são nutrir o tecido ósseo, pois dos seus vasos partem ramos que penetram nos ossos pelos canais de Volkmann, além de servir como fonte de osteoblastos para que ocorra o crescimento e reparação óssea (CARANO & FILVAROFF, 2003).

## **1.2 Reparo ósseo**

O osso possui uma capacidade única de se auto-reparar (ROSENBERG, 2005). O reparo ósseo é um processo regenerativo altamente complexo, que inclui a interação de uma série de eventos biológicos, como a síntese ativa de genes e a ação de um grande número de células e proteínas, que determinam a restauração da integridade do tecido ósseo (SENA et al., 2005; KAYAL et al, 2009).

O processo de reparo de uma fratura óssea é compreendido em três estágios: (1) sangramento e coagulação seguida por proliferação de células mesenquimais; (2)

diferenciação das células mesenquimais em células cartilaginosas e células ósseas; e (3) reparo e remodelamento do tecido ósseo (YAOITA et al., 2000).

O primeiro dos três estágios de reparo da fratura é a fase inflamatória, na qual um hematoma é formado vindo da ruptura dos vasos sanguíneos através da lesão. Logo após, as células inflamatórias invadem o coágulo e inicia-se a degradação do tecido necrosado.

O segundo estágio, denominado como fase reparadora, inicia-se dentro de 4 a 5 dias após a lesão em seguida a fase inflamatória. Essa fase reparadora é caracterizada pela invasão de células mesenquimais que se diferenciam em fibroblastos, condroblastos e osteoblastos. Esta população diversificada de células é responsável pela formação do calo ósseo não mineralizado e posteriormente pela formação do tecido ósseo. (HADJIARGYROU et al., 1998).

A fase final no processo de reparo é a fase de remodelamento, caracterizada pela modelagem e remodelagem do calo ósseo, formação de tecido ósseo mineralizado, reconstrução do canal medular e restauração óssea. Esse processo pode levar alguns meses ou até alguns anos (CORNELL & LANE, 1992; HADJIARGYROU et al., 1998).

No entanto, esse intrincado processo de reparo ósseo requer uma adequada população celular (fibroblastos, macrófagos, condrócitos, osteoblastos, osteoclastos) que é recrutada no momento certo para o sítio de lesão, e também, alguns genes e proteínas que controlam a produção e organização da matriz (HADJIARGYROU et al., 1998). Entre esses genes podem ser destacados os genes da fosfatase alcalina (ALP), osteocalcina (OC) (SONG et al., 2006; YAOITA et al., 2000) proteína óssea morfogénica 4 (BMP 4) (KLOTING et al., 2005; YAOITA et al., 2000) e Runx2 (do inglês “*Runt-related transcription factor 2*”) (RATH et al., 2008).

A fosfatase alcalina é um gene marcador de diferenciação óssea (STEIN et al., 1996) e tem a função de promover a proliferação e diferenciação de osteoblastos (LIN et al., 2008). A

osteocalcina é uma proteína específica de osteoblastos e tem um papel importante na mineralização e na remodelação óssea (BAR et al, 2003). As BMPs, incluindo a BMP4, são da família TGF- $\beta$  (do inglês “*Transforming Growth Factor Beta*”) e apresentam uma ampla gama de funções celulares tais como proliferação e diferenciação de células mesenquimais e osteoprogenitoras no processo de reparo ósseo. (CARANO & FILVAROFF, 2003; KHANAL et al., 2008). A Runx2 é um fator de transcrição importante no processo de osteogênese durante o desenvolvimento esquelético (WOHL et al., 2009) e está associada a proliferação e diferenciação de osteoblastos desenvolvendo, com isso, um papel importante na formação óssea (STEIN et al., 2004; ZIROS et al., 2008).

Yaoita et al. (2000) em estudo com fratura de fêmur de rato observaram a expressão de alguns genes nos períodos de 6, 12, 48 e 72 horas e 5, 7, 14 e 30 dias após os ratos serem fraturados. A expressão do RNAm da ALP aumentou em uma semana após a fratura, enquanto que a expressão da OC aumentou após duas semanas. A expressão do gene da BMP4 apresentou-se inalterada no tecido ósseo somente após seis horas pós cirurgia. Em outro estudo Wohl et al. (2009) utilizaram ratos submetidos a diferentes cargas compressivas para promover lesão na ulna direita. A ulna esquerda serviu como controle (sem carga). Esses animais foram sacrificados 1 hora, 1, 3 e 7 dias após terem recebido as cargas e foi feita análise da expressão de alguns genes, entre eles OC e Runx2, em que observou-se um aumento na expressão de ambos do terceiro ao sétimo dia pós-carga.

Apesar do processo de reparo ósseo envolver um grande número de ações celulares e moleculares para proporcionar um estado normal de regeneração, no decorrer deste processo podem ocorrer alterações que irão culminar na deficiência da regeneração e conseqüentemente, no atraso da consolidação e até mesmo, na não união óssea (SENA et al., 2005). Com isso, pesquisas com o objetivo de investigação de recursos que estimulem a

osteogênese e que possam ser empregados no tratamento de fraturas com deficiência na consolidação são de extrema importância.

Dentro deste contexto, vários recursos biofísicos e bioquímicos têm sido estudados na tentativa de minimizar o tempo de consolidação óssea e de diminuir a chance de possíveis complicações advindas do processo anormal de regeneração (HADJIARGYROU et al., 1998). Dentre estes, podem ser citados os efeitos de tratamentos como a aplicação de proteínas ósseas morfogenéticas, materiais bioativos e o uso de campos eletromagnéticos. Mais recentemente vem se destacando a utilização do Laser terapêutico de baixa intensidade (LLLT) e do Ultrassom pulsado de baixa intensidade (LIPUS) (BRIGHTON & MCCLUSKY, 1988), que são alternativas promissoras para o tratamento de fraturas ósseas, pois, além de apresentarem um grande potencial osteogênico, constituem métodos de tratamento não-invasivos e apresentam um custo relativamente baixo.

### **1.3 Laser terapêutico de baixa intensidade (LLLT)**

O LLLT é um recurso que vem demonstrando efeitos positivos na proliferação de células ósseas e no processo de reparo ósseo em fraturas de animais (KARU, 1998). A palavra LASER é um acrônimo em inglês para “light amplification by the stimulated emission of radiation”, que significa amplificação da luz por emissão estimulada de radiação, sendo esse o princípio em que foi baseada sua criação (BAXTER et al., 1997; LOW & REED, 2001; KITCHEN & BAZIN, 2003).

A bioestimulação através da luz laser surgiu como tratamento medicamentoso em 1960. Nesse período o primeiro aparelho utilizado comercialmente foi o laser He-Ne sendo uma mistura dos gases Hélio-Neônio emitindo radiação visível do espectro eletromagnético, apresentando comprimento de onda de 632,8 nm (LOW & REED, 2001; SUN & TUNER, 2004). Outros equipamentos laser surgiram após o laser He-Ne, com emissão na faixa do

infravermelho, dentre eles podemos citar: o laser Arseneto de Gálio (As-GA), com comprimento de onda de 904 nm, profundidade de penetração de 0,3 a 0,5 cm, e o laser Arseneto de Gálio e Alumínio (As-Ga-Al), com comprimento de onda variando entre 780 a 890nm, profundidade de penetração entre 2 a 3 cm, variando de acordo com as propriedades do tecido (LOW & RED, 2001; ORTIZ et al., 2001; SUN & TUNER, 2004).

Diante disso, a parte do espectro mais comumente usada na prática da laserterapia de baixa intensidade está entre os comprimentos de onda de 630 nm a 1300 nm. Este por sua vez, inclui a luz visível e parte próxima do espectro infravermelho e é chamada de “janela terapêutica” para tecidos biológicos (KITCHEN & PARTRIDGE, 1991; KITCHEN & BAZIN, 2003).

Os efeitos do LLLT nos tecidos biológicos podem ser explicados pela absorção da luz por moléculas fotorreceptoras localizadas nas células, mais especificamente os cromóforos. Estes são definidos como componentes dos pigmentos da cadeia respiratória mitocondrial, de diferentes tamanhos e formas, os quais vão atuar com uma estimulação específica ou energia de radiação. Eles podem transferir a estimulação funcionalmente para os diferentes processos e componentes celulares envolvidos na cadeia respiratória mitocondrial (BAXTER, 1997). A partir da absorção do laser pelos cromóforos, estes irão realizar a conversão de energia fotoquímica para energia química (KARU & KOLYAKOV, 2005).

Os mecanismos de ações consequentes às reações bioquímicas e/ou biofísicas iniciadas, correspondem a transdução do fotosinal e amplificação ao núcleo por uma cascata de reações ocorridas no citoplasma e na membrana celular, conectadas a alterações dos parâmetros de homeostase celular (pH, concentração de  $Ca^{+2}$ , ATP e outros), as quais acontecem minutos ou horas após a irradiação. Isto condiciona a ocorrência de possíveis mudanças na taxa de síntese de DNA e RNA, alterações na taxa de consumo de  $O_2$  e alteração

do potencial de membrana (KITCHEN & PARTRIDGE, 1991; BAXTER,1997; KARU & KOLYAKOV, 2005).

Essas alterações podem estimular a taxa respiratória e a síntese de ATP (KARU, 1998). A ativação da cadeia respiratória pela radiação gera um gradiente de próton na membrana mitocondrial que atua como um sinal iniciador para a proliferação celular. Com isso, serão geradas as respostas indiretas do laser nos tecidos. Entre as respostas podemos citar o efeito anti-inflamatório, cicatrizantes e analgésicos (KARU & KOLYAKOV, 2005).

Em relação ao efeito cicatrizante, diversos trabalhos evidenciam que a irradiação laser de baixa potência tem um efeito significativo no metabolismo tecidual e na proliferação celular, justificando os resultados positivos da sua aplicação nos processos de reparação após uma lesão (PINHEIRO et al., 2001, VLADIMIROV et al., 2004; NINOMIYA et al., 2007). Resultados encontrados em uma série de estudos, sugerem que o LLLT promove um aumento da síntese de colágeno, aumento da proliferação e diferenciação de osteoblastos e fibroblastos, aumento da respiração mitocondrial e síntese de ATP, alterações na síntese de RNA (OZAWA et al., 1998; VLADIMIROV et al., 2004; NINOMIYA et al., 2007), maior recrutamento de macrófagos, aumento da angiogênese e da atividade fagocitária o que resultará na aceleração do reparo de tecidos (ORTIZ et al., 2001; LIRANI-GALVÃO et al., 2006; BOSSINI et al., 2009).

### **1.3.1 Efeitos osteogênicos do LLLT**

Devido aos diversos efeitos estimulatórios apresentados pela LLLT em vários tecidos, alguns autores vêm investigando a ação deste recurso no tecido ósseo, principalmente em culturas de células ósseas e em modelos experimentais de fraturas.

Em estudos com culturas de osteoblastos, o Laser He-Ne (632,8 nm, 10 mW, 0.14/0.43/1.43 J/cm<sup>2</sup>) foi capaz de promover a proliferação destas células, principalmente pelo

aumento na síntese de DNA (STEIN et al., 2005). Ozawa et al. (1998) evidenciaram um aumento significativo na atividade da fosfatase alcalina, na expressão do RNAm da osteocalcina, bem como na proliferação de células osteoblásticas através do laser As-Ga-Al (830 nm, 500 mW, 3.82 J/cm<sup>2</sup>).

Bouvet-Gerbettaz et al. (2009) aplicaram o LLLT (808 nm, 800 mW, 4 J/cm<sup>2</sup>) três vezes por semana em cultura de células progenitoras de osteoblastos. Avaliaram após 14 e 21 dias a expressão do RNAm da Runx2, colágeno tipo 1, ALP, BMP2, sialoproteína óssea 2 e osteocalcina e constataram que expressões similares do RNAm do colágeno tipo 1, ALP, OC e sialoproteína óssea 2 foram observadas para o grupo LLLT e controle (sem aplicação de LLLT). Além disso, foi observado um aumento na expressão do RNAm da Runx2 e BMP2 no grupo LLLT em 21 dias.

Yamamoto et al. (2001) verificaram que, após a irradiação com o LLLT As-Ga-Al (830 nm, 500 mW, 7.64 J/cm<sup>2</sup>), a síntese de RNAm para os genes MCM3 estava aumentada em culturas de osteoblastos, o que poderia ser a explicação para o aumento da proliferação celular após a irradiação com LLLT.

Stein et al. (2008) investigaram os efeitos da LLLT na proliferação e diferenciação de células osteoblásticas. As células foram irradiadas com fluências de 1 e 2 J/cm<sup>2</sup> usando um laser diodo de 670 nm e potência de 400mW. Após 24, 48 e 72 horas, as células foram coletadas e avaliadas a atividade da fosfatase alcalina, níveis de osteopontina e colágeno tipo I. Os autores concluíram que houve um efeito bioestimulatório nas células osteoblásticas durante as primeiras 72h de irradiação em que pôde ser observado um aumento significativo da atividade da fosfatase alcalina (48 h e 72 h) e na expressão do RNAm da osteopontina (24h) na fluência 1 J/cm<sup>2</sup>.

Renno et al. (2007) investigaram os efeitos da LLLT em diferentes comprimentos de onda ( 670nm, 780nm e 830 nm) e em diferentes fluências ( 0.5, 1, 5, e 10 J/cm<sup>2</sup>), na

proliferação celular de osteoblastos normais e tumorais. Foi realizada apenas uma aplicação e após 24 horas a proliferação celular e a atividade da fosfatase alcalina foram analisadas. A proliferação de células osteoblásticas normais aumentou após irradiação com 830 nm ( $10 \text{ J/cm}^2$ ) e diminuiu com 780 nm ( $1 \text{ J/cm}^2$ ,  $5 \text{ J/cm}^2$  e  $10 \text{ J/cm}^2$ ). Além disso, a proliferação de células tumorais aumentou após irradiação com laser 780 nm ( $1 \text{ J/cm}^2$ ,  $5 \text{ J/cm}^2$  e  $10 \text{ J/cm}^2$ ) e 670 nm ( $5 \text{ J/cm}^2$ ). A atividade da fosfatase alcalina não foi alterada com a aplicação dos comprimentos de ondas de 670 nm e 780 nm, para ambos tipos de células, diferente da aplicação 830 nm que demonstrou um aumento para células osteoblástica normais e uma diminuição para células tumorais. Esses achados mostram que diferentes tipos celulares respondem de forma diferente a específicos comprimentos de onda e fluência.

Em outro estudo, Garavello-Freitas et al. (2003) avaliaram os efeitos do laser He-Ne (633nm, 1mW, 0.03, 0.3 e 0.9J) em tíbias de ratos. O tratamento teve início 24 horas após a cirurgia e continuou diariamente por 7 e 14 dias. As análises histológicas mostraram que a terapia laser estimulou o crescimento de osso trabecular e concomitante invasão de osteoclastos durante a primeira semana, e na segunda semana, acelerou a organização de matriz colagenosa, o que não foi observado nos grupos controle e não irradiado.

No estudo de Liu et al. (2007), foi avaliado os efeitos da terapia laser em tíbias de coelhos. Os resultados sugerem que o LLLT pode acelerar o processo de reparo da fratura, causar aumento no volume do calo e densidade mineral óssea, especialmente em estágios iniciais de absorção do hematoma e remodelamento ósseo. Esses autores trataram as fraturas com laser 830nm, potência de 200mW e fluência de  $40 \text{ J/cm}^2$ , irradiados em 4 pontos ao longo do local da fratura. O tratamento teve início logo após a cirurgia e foi realizado diariamente durante 4 semanas.

Matsumoto et al. (2009) analisaram o papel da ciclooxigenase 2 no reparo ósseo em ratos tratados com LLLT. Foi realizado defeito ósseo na tíbia dos ratos e estes foram

submetidos a laser As-Ga-Al 735 nm, 16J/cm<sup>2</sup>, por 1 minuto, durante 2, 7, 14 e 21 dias. Análises morfológicas e morfométricas revelaram que a qualidade na consolidação óssea e a quantidade de osso neoformado do grupo tratado foi superior ao controle. Da mesma forma, a presença de ciclooxygenase 2 foi mais intensa nas células ósseas do grupo LLLT.

Ainda, em alguns trabalhos realizados por nosso grupo de pesquisa foi verificado que o laser terapêutico (830nm, 60mW com fluências de 5J/cm<sup>2</sup> e 50 J/cm<sup>2</sup>), acelerou o processo de reparo ósseo em ratos, principalmente na maior fluência (MARINO, 2003).

Oliveira et al.(2009) avaliaram efeitos do laser As-Ga-Al (830 nm) e de um biomaterial na consolidação óssea de tíbias de ratos divididos em quatro grupos (controle, Biosilicato®, Biosilicato®/ LLLT 60 J/cm<sup>2</sup>, Biosilicato®/ LLLT 120 J/cm<sup>2</sup>). Os animais foram tratados por 14 dias em dias alternados. Os resultados demonstram que no teste de flexão de três pontos o grupo controle e Biosilicato® apresentaram maior rigidez óssea em relação aos demais grupos. No entanto, em relação à análise morfométrica, os grupos Biosilicato®/ LLLT 60 e 120 J/cm<sup>2</sup> apresentaram valores de área óssea neoformada diminuídos demonstrando que apesar do Biosilicato® exercer alguma atividade osteogênica durante a consolidação óssea, o LLLT não foi capaz de modular esse processo.

No entanto, por ser de uma tecnologia recente, a laserterapia necessita de melhor parametrização das variáveis para se obter os estímulos mais apropriados, pois muitos dos reais efeitos produzidos por essa terapia ainda não estão totalmente claros e ainda não se sabe os mecanismos de ação nos tecidos, principalmente em relação às mudanças metabólicas e moleculares produzidas pelo LLLT.

## **1.4 Ultrassom pulsado de baixa intensidade (LIPUS)**

### **1.4.1. Características do ultrassom**

O ultrassom é um recurso que se apresenta em forma de energia mecânica, sendo essa transmitida para os tecidos biológicos como uma onda de pressão acústica, e tem sido amplamente utilizado na medicina como uma ferramenta de diagnóstico e também na fisioterapia em procedimentos terapêuticos (MALIZOS et al., 2006). Uma onda mecânica é aquela na qual a energia é transmitida por vibrações das moléculas do meio (sólido, líquido ou gasoso) através do qual a onda está passando (LOW & REED, 2001).

O aparelho de ultrassom consiste em um gerador que produz uma tensão alternada de alta frequência que é convertida por um transdutor em vibrações mecânicas ou acústicas. O transdutor, que é constituído basicamente por um cristal (elemento piezoelétrico) introduzido entre dois eletrodos, que faz a conversão da voltagem alternada de alta frequência (energia elétrica) em vibrações mecânicas (energia acústica) pela inversão do efeito piezoelétrico. O cristal pode ser de quartzo, ou cerâmica sintética feita de uma mistura de sais complexos como o Titanato Zirconato de Chumbo (PZT) (LOW & REED, 2001; ALBERTIN, 2007).

As ondas do ultrassom podem ser produzidas na forma contínua ou pulsada. No modo contínuo, não ocorre interrupção da propagação de energia, ocorrendo transferência contínua dessa energia para o meio irradiado. Já o modo pulsado apresenta breves interrupções da propagação de energia e resulta em uma redução do aquecimento local, embora com o mesmo nível do estímulo mecânico (DOCKER, 1987). A escolha da forma contínua ou pulsada depende dos efeitos físicos que se deseja obter e a interação entre o ultrassom e o tecido em que está sendo aplicado (MCDIARMID & BURNS, 1987).

Tem sido proposto, em alguns estudos, que em consequência das vibrações longitudinais características do ultrassom, um gradiente de pressão é desenvolvido nas células. Como resultado desta variação de pressão, elementos da célula são obrigados a se moverem, ocorrendo um movimento de micromassagem, que aumenta o metabolismo celular, o fluxo sanguíneo e o suprimento de oxigênio, produzindo alteração da permeabilidade da

membrana celular e facilitando o fluxo de nutrientes. As ondas ultrassônicas se propagam através dos tecidos e a absorção de radiação depende do coeficiente de absorção relativo ao conteúdo protéico dos tecidos, sendo que a absorção desta energia determina os efeitos biológicos (DOUAT, 2004).

O tipo de ultrassom de interesse nesse estudo é o ultrassom pulsado de baixa intensidade (LIPUS). Esse equipamento apresenta duração de pulso de 200  $\mu$ s e 1,5 MHz de frequência. A potência gerada pelo LIPUS varia em torno de 150 mW e a intensidade em torno de 30 mW/cm<sup>2</sup>, estando essa dentro do intervalo considerado não térmico e não destrutivo (DUARTE 1983; KODAMA, 2004).

Esse importante recurso tem sido utilizado no restabelecimento das funções e promoção da cicatrização de alguns tecidos lesados, tais como tendinosos e ósseos (CUNHA et al., 2001; TAKIKAWA et al., 2001). A exposição do tecido ósseo a esse aparelho promove aceleração no processo de reparo de fraturas e indução de consolidação de fraturas em não-união óssea (KOKUBU et al., 1999).

#### **1.4.2 O ultrassom pulsado de baixa intensidade no reparo ósseo.**

O osso, ao receber um estímulo mecânico, gera potenciais elétricos de dois tipos: o potencial de corrente (ou fluxo) e o potencial piezoelétrico. A geração desses potenciais representa a conversão direta da energia mecânica em energia elétrica, fenômeno este conhecido como piezoelectricidade (KAPLAN et al., 1994).

Assim, ao se aplicar uma carga mecânica no osso, há deformação nos componentes orgânicos do material que gera potenciais elétricos (KAPLAN et al., 1994). Os potenciais elétricos funcionam como um sistema sinalizador para as células adjacentes (os osteoblastos e os osteoclastos), instruindo-as a aumentar/diminuir a formação do tecido, ou a aumentar/diminuir a absorção do tecido, como uma resposta ao estímulo mecânico imposto

(KITCHEN & BAZIN, 2003). Com isso, a energia ultrassônica aplicada ao local se identifica com a necessidade orgânica de promover potencial elétrico para disparar o mecanismo de reparo e acelerá-lo, restaurando o fluxo sanguíneo e promovendo com isso o reparo da lesão. Logo, a presença de cargas elétricas no osso é vital, não só para seu desenvolvimento mas principalmente para o reparo em caso de fratura (DUARTE, 1983).

Após a introdução do conceito de piezoelectricidade do osso, por Fukada e Yasuda, em 1957, alguns estudos começaram a preconizar seu uso para estimular a osteogênese e acelerar o processo de consolidação de fraturas (DUARTE, 1983).

Na década de 70 o professor Duarte, do Departamento de Engenharia Elétrica, da Universidade de São Paulo, campus de São Carlos iniciou alguns estudos para estimular a osteogênese através do LIPUS, demonstrando que as cargas elétricas necessárias para ocorrer a consolidação óssea são produzidas no osso por meio do efeito piezoelétrico, pois esse recurso atinge o tecido ósseo por uma sucessão de impulsos, cada um deles resultando em um sinal elétrico como resposta do osso. Com isso, o processo de crescimento ósseo é regulado pelo campo elétrico formado e o metabolismo ósseo é estimulado eletricamente. Em um trabalho pioneiro, com animais, esse pesquisador demonstrou que o LIPUS foi capaz de acelerar a consolidação em defeitos ósseos induzidos em coelhos (DUARTE, 1983).

Através dos resultados positivos dos estudos com LIPUS no tecido ósseo, em 1994, o FDA (do inglês: “*The Food and Drug Administration*”) americano aprovou o uso desta tecnologia para o tratamento de fraturas recentes e no ano de 2000, foi obtida a aprovação para o tratamento de fraturas com não-união óssea (SENA et al., 2005). A partir dessas evidências, outros autores também demonstraram a eficiência do LIPUS na aceleração da consolidação óssea após uma fratura. Alguns estudos *in vitro* com culturas de células osteoblásticas sugerem que o LIPUS é capaz de promover um aumento da proliferação celular (NARUSE et al., 2003), um aumento da atividade de fosfatase alcalina e um aumento do

conteúdo de cálcio (YANG et al., 2005). O óxido nítrico (NO) e as prostaglandinas, que constituem mediadores fundamentais para indução da formação óssea, também parecem estar aumentados após a estimulação com LIPUS (REHER et al., 2002). Além disso, Yang et al. (2005) demonstraram que o LIPUS promoveu a reorganização do citoesqueleto de osteoblastos, além de aumentar a síntese de integrinas, que tem um papel fundamental de sinalização na superfície celular e participa da construção da rede de matriz de colágeno.

As ondas de pressão acústica, transmitidas pelo LIPUS para o local da fratura óssea, facilitam o fluxo de fluídos que aumentam o fornecimento de nutrientes e auxiliam na eliminação de resíduos, estimulando assim a proliferação e diferenciação dos fibroblastos, condroblastos e osteoblastos no local da fratura (MALIZOS et al., 2006).

Em um estudo com células estromais da medula óssea de ratos foi observado que o LIPUS induz a expressão de genes de resposta iniciais como c-fos e eleva a expressão gênica da sialoproteína óssea, fator de crescimento insulínico -1 (IGF-1) e OC, que são genes que atuam no processo de formação óssea (NARUSE et al., 2000).

Estudos *in vivo*, em modelos de fraturas em animais, observaram que o LIPUS estimulou a síntese de genes relacionados à diferenciação celular no tecido ósseo, como os genes relacionados à produção de osteopontina e osteocalcina (HADJIARGYROU et al., 1998). Além disso, Rawool et al. (2003) demonstraram que este recurso é capaz de aumentar o fluxo sanguíneo na região da fratura, contribuindo para o maior aporte sanguíneo e fornecimento de nutrientes.

Takikawa et al. (2001) observaram em um estudo experimental, que após 6 semanas de tratamento diário (20 minutos por dia), o LIPUS aumentou significativamente o índice de consolidação em fraturas com não-união óssea comparando com o grupo controle. Estes mesmos resultados foram encontrados por Sun et al. (1999) e Lirani-Galvão et al. (2006).

Resultados positivos com a utilização do LIPUS foi notado por Guerino et al. (2008). Esse autores analisaram o efeito do LIPUS associado ou não com a atividade física (natação), no qual utilizaram modelos de fraturas em animais. O LIPUS foi aplicado por 5 minutos, diariamente, na intensidade de 0.2 W/cm<sup>2</sup> (modelo pulsado com 1.0 MHz, a eutanásia dos animais ocorreu no período de 5 e 20 dias pós fratura e foi realizada análise histológica. Os resultados mostraram que tanto o grupo sedentário como o de atividade física que receberam o tratamento apresentaram melhora no processo de consolidação óssea quando comparados com o grupo que não recebeu aplicação do LIPUS, em ambos períodos estudados.

Em humanos, o LIPUS também promove a aceleração do processo de consolidação óssea. Heckman et al. (1994) e Kristiansen et al. (1997) observaram que este recurso reduziu em aproximadamente 40% o tempo necessário para a consolidação após uma fratura recente. Além disso, Mayr et al. (2000) afirmam que o LIPUS também é capaz de promover o reparo de fraturas com atraso de consolidação, estimulando a união óssea em um período de tempo relativamente curto.

No entanto, apesar dos estudos demonstrados nesse trabalho, assim como no LLLT a seqüência de modificações moleculares e celulares induzidas pelo LIPUS no tecido ósseo durante o processo de consolidação ainda são desconhecidas e necessitam de maiores esclarecimentos.

Dessa forma, esse estudo foi realizado a fim de investigar os efeitos do LLLT e do LIPUS no reparo ósseo, analisando com isso, a ação desses recursos na deposição de tecido ósseo no local da fratura e na expressão de alguns genes relacionados à osteogênese.

## **2. OBJETIVO**

Este trabalho teve o objetivo de analisar e avaliar comparativamente os efeitos do LLLT e do LIPUS na expressão de genes relacionados a formação óssea, bem como na morfologia e morfometria do calo ósseo, durante o processo de consolidação em defeitos ósseos induzidos em tíbias de ratos, em diferentes períodos avaliados.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais de experimentação**

Foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus-albinus*) Wistar com peso corporal médio de 300-350g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos. Os animais foram acondicionados no biotério do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, nas seguintes condições: a) ciclo de 12/12 horas claro/escuro; b) temperatura controlada a  $22 \pm 2$  °C; e c) oferta plena de água e ração para roedores.

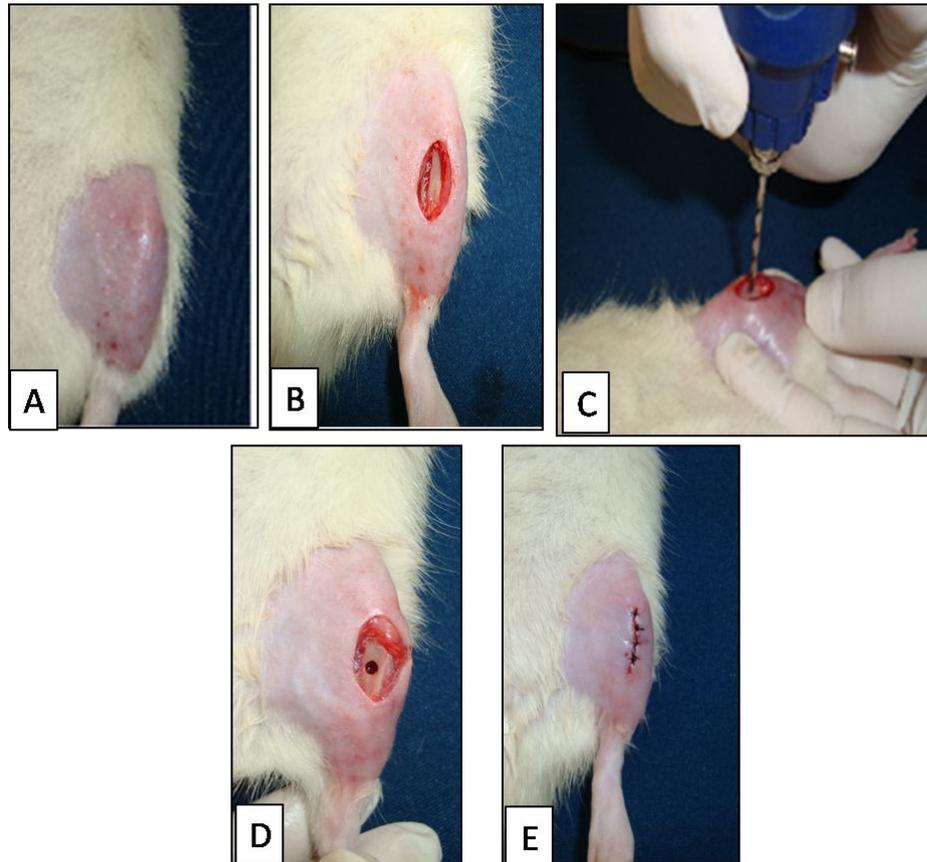
Todos os animais foram submetidos à cirurgia para a confecção de defeitos ósseos em ambas tíbias sob condições padrão de assepsia e anestesia geral.

Este trabalho experimental foi realizado de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR) através do protocolo 028/2008.

#### **3.2. Cirurgia**

Para a realização do defeito ósseo foi utilizada uma broca odontológica, da marca *MAILLEFER* - Suíça, com 2,0 cm de comprimento e acionada por um mandril com rotação de 12.500 RPM e com fresa de 2.4 mm de diâmetro, sob irrigação constante e abundante de soro fisiológico. Os animais foram anestesiados com Ketamina (80 mg/kg) e Xilazina (12 mg/kg), após foram tricotomizados e realizou-se assepsia da área a ser operada. O defeito ósseo foi obtido através de uma incisão no terço proximal da tíbia direita e esquerda. A lesão foi realizada a 10 milímetros da linha articular de ambas tíbias, medida por um paquímetro digital. A broca foi mantida na posição horizontal e perpendicular em relação ao eixo longitudinal do osso, de modo a penetrar a cortical medial e danificar o canal medular abaixo

desta, porém sem atingir a face contralateral, promovendo um orifício com 2,4 mm de diâmetro. Finalizando, a pele foi suturada e em seguida foi feita a assepsia local (figura 1). Os animais receberam analgesia (via oral, 200 mg de dipirona sódica diluídas em 300 ml de água, sendo a água trocada diariamente) e foram mantidos em caixas individuais, monitorados diariamente.



**FIGURA 1** – Fotos da cirurgia. A: tricotomia e assepsia da região a ser operada. B: exposição do terço médio da tíbia, após a incisão feita através de um bisturi. C: defeito ósseo sendo realizado com broca de 2,4 mm de diâmetro. D: defeito ósseo. E: sutura do músculo e pele.

### 3.3. Modelo experimental

Após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram divididos aleatoriamente nos seguintes grupos:

- 1) controle: animais submetidos a procedimento cirúrgico para confecção do defeito ósseo, porém não receberam nenhum tipo de tratamento.

- 2) defeito ósseo tratado com laser terapêutico de baixa intensidade (LLLT): animais submetidos a procedimento cirúrgico e tratados com LLLT (3, 6 ou 12 sessões).
- 3) defeito ósseo tratado com ultrassom de baixa intensidade (LIPUS): animais submetidos a procedimento cirúrgico e tratados com LIPUS (3, 6 ou 12 sessões).

Todos os grupos foram divididos em 3 subgrupos (compostos por 10 animais cada) para a realização das análises em diferentes datas de sacrifício. Com isso, o subgrupo que recebeu 3 sessões de tratamento foi sacrificado no 7º dia pós-cirurgia, o subgrupo que recebeu 6 sessões de tratamento foi sacrificado no 13º dia pós-cirurgia e o subgrupo que recebeu 12 sessões de tratamento foi sacrificado no 25º dia pós-cirurgia. Da mesma forma, os animais do grupo controle também foram sacrificados nos mesmos intervalos de tempo dos grupos tratados.

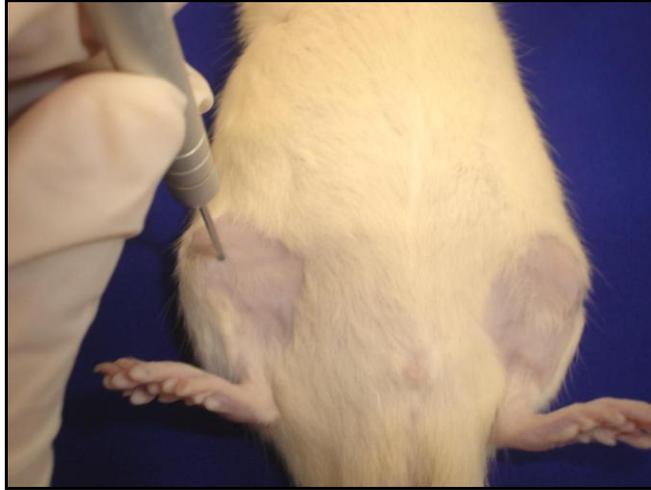
Os protocolos de tratamentos iniciaram-se 24 horas após o procedimento cirúrgico e foram realizados a cada 48 horas. A aplicação terapêutica foi feita na área correspondente a região da lesão. A eutanásia dos animais ocorreu 24 horas após a última sessão de tratamento.

### **3.4 Tratamento**

#### **3.4.1 Laser terapêutico de baixa intensidade**

O aparelho utilizado foi um modelo portátil de Laser DMC, classe 3B Ga-Al-As diodo, com comprimento de onda 830 nm, emissão contínua, potência de saída de 30 mW, densidade de potência de 30 mW/cm<sup>2</sup>, diâmetro do feixe de 0,028 cm, divergência de 1.5°, na fluência de 50 J/cm<sup>2</sup>, tempo de aplicação de 47 segundos por ponto e energia de 1,41 J. Este aparelho foi fornecido pelo laboratório de Eletrotermofototerapia, do Departamento de Fisioterapia, da Universidade de Federal de São Carlos, sob responsabilidade do Prof. Dr. Nivaldo A. Parizotto.

Durante a aplicação os animais foram posicionados para aplicação em um único ponto na tíbia esquerda e na tíbia direita (figura 2).



**Figura 2:** Demonstração do local de aplicação do LLLT

### **3.4.2 Ultrassom pulsado de baixa intensidade**

Foi utilizado um modelo portátil de LIPUS (Exogen, Estados Unidos), modo pulsado com *burst* 1,5 MHz, com duração de pulso de 200  $\mu$ s, frequência de repetição de pulso de 1KHz e intensidade de 30 mW/cm<sup>2</sup>. Este aparelho foi fornecido pelo Departamento de Bioengenharia, da Universidade de São Paulo, campus São Carlos, sob responsabilidade do Prof. Dr. Jose Marcos Alves.

Para a aplicação do LIPUS os animais foram anestesiados e posicionados em decúbito dorsal. O LIPUS foi aplicado de modo estático e transcutâneo, na região correspondente a área de fratura das tíbias direita e esquerda, num período de 20 minutos (figura 3).



**Figura 3:** Demonstração da aplicação de LIPUS

### **3.5 Eutanásia e Coleta das amostras**

No dia do sacrifício, os animais foram novamente anestesiados intraperitonealmente, conforme descrito anteriormente e, após a abolição do reflexo de retirada da pata à dor, foi realizada a ressecção cirúrgica completa das tíbias direitas. Essas, foram armazenadas no freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  para o posterior processamento da análise de expressão gênica por PCR em tempo real (Reação em Cadeia da Polimerase).

Em seguida, os animais foram submetidos à eutanásia por excesso de anestésico (Ketamina 300 mg/kg e Xilasina 60 mg/kg) e após foi realizada a ressecção cirúrgica completa das tíbias esquerdas, sendo essas armazenadas em solução de Formalina Tamponada a 10% para posterior realização das análises histológicas.

### **3.6 Análises**

#### **3.6.1 Análise histológica**

Estas análises foram realizadas no laboratório de eletrotermofoterapia do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos.

Completado os períodos experimentais, as tíbias esquerdas dos animais foram dissecadas, fixadas em 10% de formalina tamponada (Darmstadt, Merck, Alemanha) por 24 horas e lavadas em água corrente por 24 horas. Foram submetidas à descalcificação em 2% solução aquosa de ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA- Merck, Alemanha) com trocas a cada 2 dias até a completa descalcificação, aproximadamente 40 dias. Após a descalcificação as peças foram armazenadas em álcool 70% e em seguida foi realizado o processamento para inclusão em parafina com a desidratação em alcoóis crescentes (70%, 80%, 90% e absoluto), diafanização em xilol, embebição em parafina, confecção do bloco e microtomia em micrótomo rotatório (HM-324, Microm, Alemanha), obtendo-se cortes semi-seriados com espessura de 5µm. O plano de secção do corte foi longitudinal em relação à lesão.

As lâminas foram desparafinizadas e re-hidratadas para posterior coloração. Os cortes foram corados com Hematoxolína e Eosina (HE) para a análise morfológica e com Tricômico de Massom (TM) para a realização da morfometria. As imagens das análises qualitativa descritiva e quantitativa foram obtidas por meio de fotomicrografias utilizando um microscópio óptico comum (Olympus, Optical Co. Ltd, Tokyo, Japão).

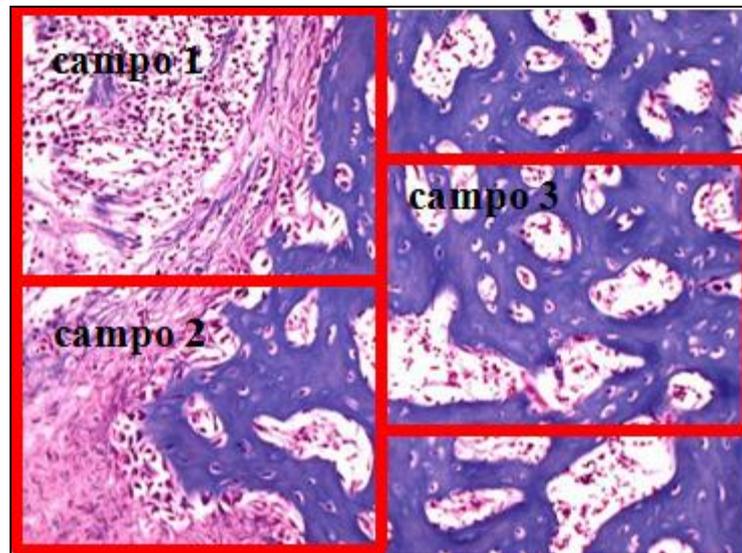
#### **3.6.1.1 Análise histológica qualitativa descritiva**

A avaliação qualitativa, lâminas coradas com HE, foi realizada considerando a presença de achados histopatológicos, como: tecido de granulação, tecido ósseo neoformado e organização tecidual. Esses critérios foram definidos tendo como base os estudos de Matsumoto et al. (2009) e Akyol et al. (2009) e levando em consideração as características de organização apresentadas pelas lâminas.

### 3.6.1.2 Análise histológica quantitativa

Através das lâminas coradas com TM foi realizada a análise morfométrica quantitativa na região da lesão. Foi avaliada e quantificada a presença de osso neoformado, pelas imagens obtidas por fotomicrografias. Para a realização da análise morfométrica foi utilizado um microscópio Nikon Eclipse E 2000 e o programa de análise de imagem Motic Images Plus versão 2.0 para obtenção de fotomicrografias e a análise das imagens.

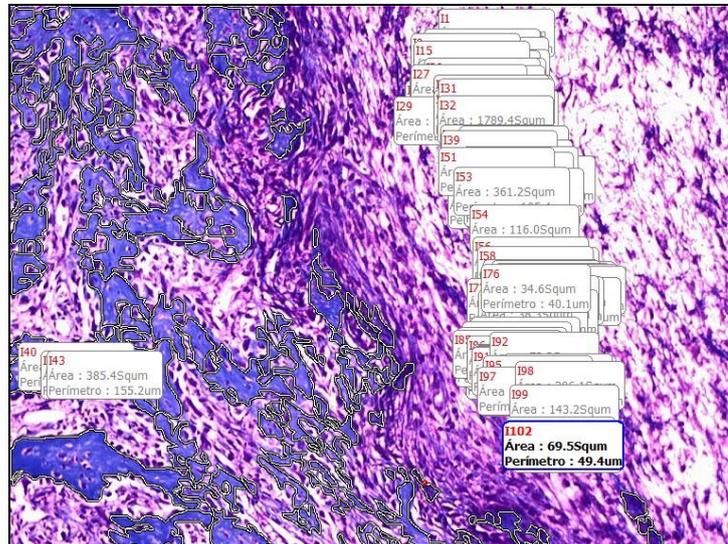
Foram selecionados 3 campos pré-determinados da região da lesão de cada lâmina: campo 1 (margem superior esquerda); campo 2 (margem inferior esquerda); campo 3 (região medial direita), ilustrados na figura 4.



**Figura 4:** Desenho ilustrativo dos três campos selecionados na análise morfométrica. Coloração: TM

Cada campo foi fotografado com a objetiva de 10x, e teve toda área de neoformação óssea contornada, com o valor expresso em  $\mu\text{m}^2$ , conforme demonstrado na figura 5. O contorno foi feito com o auxílio de um *mouse* de computador e os dados contornados eram arquivados no programa análise de imagem Motic Images Plus versão 2.0.

Os valores da área de osso neoformado de cada campo foram armazenados em arquivo Excel, e, por fim, o valor da área de osso neoformado dos três campos de uma mesma lâmina foi somado, revelando o valor total da área de osso neoformado para a amostra analisada.



**Figura 5:** fotomicrografia com a demarcação da área de neoformação óssea. Coloração: TM

### 3.6.2 Análises de expressão gênica

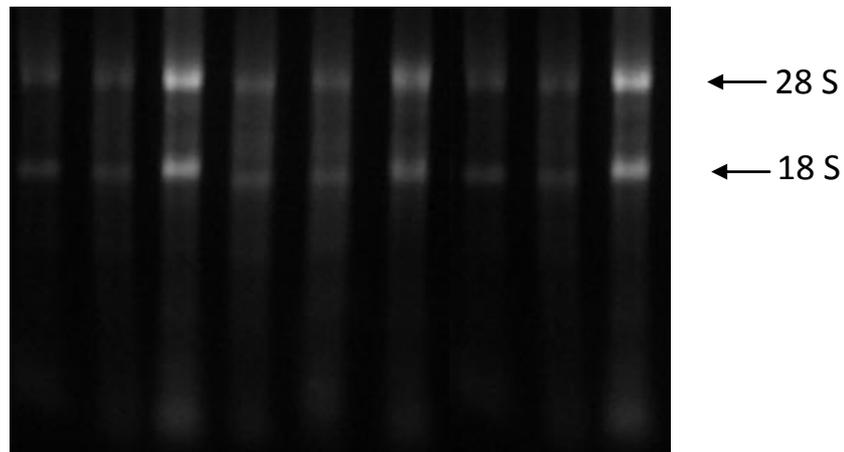
Esta análise foi realizada por meio da técnica de PCR em tempo real. As tíbias direitas dos animais foram utilizadas com o objetivo de verificar a expressão de genes da BMP4, OC, ALP e Runx2 durante o processo de consolidação óssea após o tratamento com LLLT e LIPUS. A quantificação relativa da expressão dos genes em estudo foi normalizada através da comparação da amplificação de um controle endógeno, utilizando-se o gene RPS18 (Proteína Ribossomal S18).

Essa análise foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (UFSCar), sob supervisão da Prof. Dr<sup>a</sup> Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo.

#### 3.6.2.1 Extração do RNA total

As tíbias congeladas foram cortadas 2 milímetros acima e abaixo do local da fratura e maceradas com o auxílio de um mortar e um pistilo de metal (D.L.MICOF, São Paulo, SP)

mantidos em gelo seco. O “pó” das tíbias maceradas foi transferido para um cadinho de porcelana resfriado com 1ml de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) no qual foi iniciado o processo de homogeneização com o auxílio de um pistilo de porcelana. Em seguida, as amostras foram novamente homogeneizadas no Power Gen 1000 S1 (Fisher Scientific) em tubos de micrografia e após iniciou-se o protocolo de extração de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total obtido foi quantificado através de leitura em espectrofotômetro ( $A_{260\text{nm}}$  e  $A_{280\text{nm}}$ ) e sua integridade foi confirmada pela visualização do padrão de eletroforese das bandas 28S e 18S do RNA ribossomal, em gel de agarose-formaldeído 1% (Figura 6).



**Figura 6:** Análise de RNA total. Gel de agarose-formaldeído 1%. 1) controle 7 dias; 2) controle 13 dias; 3) controle 25 dias; 4) LIPUS 7 dias; 5) LIPUS 13 dias; 6) LIPUS 25 dias; 7) LLLT 7 dias; 8) LLLT 13 dias; 9) LLLT 25 dias

Após a análise da integridade das bandas, o RNA total das espécimes de cada grupo experimental foi tratado com DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), segundo a indicação do fabricante. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir do RNA total extraído (1,0  $\mu\text{g}$ ), utilizando transcriptase reversa *M-MLV Reverse Transcriptase* (Promega, Madison, WI, USA), seguindo normas do fabricante.

O cDNA transcrito foi utilizado para avaliação da expressão do RNA mensageiro dos seguintes genes por PCR em tempo real: RPS18, utilizado como controle interno; OC, ALP, BMP4 e Runx2. As sequências de *primers* utilizados estão apresentados na tabela 1.

**Tabela 1: sequências de *primers* utilizados nos experimentos de PCR em tempo real**

Gene	Sequência de primers Forward	Sequência de primers Reverse	Produto amplifica do
OC	CTGCATTCTGCCTCTCTGACCT	GCCGGAGTCTATTCACCACCTT	108 bp
ALP	CGAGCAGGAACAGAAGTTTGC	TGGCCAAAAGGCAGTGAATAG	105 bp
BMP4	GAGCGCCATTTCCATGT	CTCCACCACCATCTCCTGATAATT	76 bp
Runx2	ATGGCCGGGAATGATGAGAA	TCTGTCTGTGCCTTCTTGGT	151 bp
RPS18	CTAGTGATCCCCGAGAAGTTTC	TGTCTGCTTTCCTCAACACC	142 bp

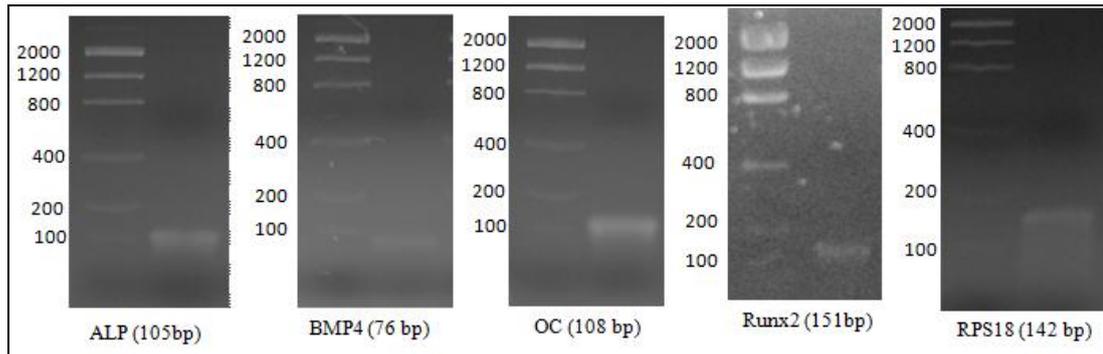
As sequências dos primers para os genes OC e ALP foram sintetizados baseando-se nas sequências fornecidas por Song *et al.* (2006), os primers para Runx2 foi fornecidos por Rath *et al.* (2008) e a sequência para o gene BMP4 por Kloting et al. (2005). Os primers para gene RPS18 foi desenhado a partir da sequência do RPS18 NM\_213557, através do site [www.idtdna.com](http://www.idtdna.com).

### 3.6.2.2 PCR em Tempo Real

A reação de PCR em tempo real foi realizada para os *primers* OC, ALP, BMP4, Runx2 e RPS18 (controle endógeno) utilizando-se o kit SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Cada reação consistiu de 0,5µl a partir da reação de cDNA molde; 1µl de cada *primer* 10µM (0,5µM final); 10µl do SYBR Green PCR Master Mix (AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, *sNTPs*, *MgCl<sub>2</sub>*, *Buffer* e *SYBR® Green*) e água estéril bi-destilada para um total de 25µl. As amostras foram processadas no Termociclador *Rotor- Gene, R 3000* (Cobertt Research) e a sequência de ciclos dos primers estudados foram padronizado de acordo com a temperatura de *melting* (*T<sub>m</sub>*) de cada um.

O programa consistia de um período de 10 minutos a 95°C, seguidos de 40 ciclos de amplificação a 95°C – 30 segundos (desnaturação); Tm 60°C (OC, ALP e RPS18) e 56°C (BMP4 e Runx2) – 30 segundos (anelamento); 72°C – 30 segundos (extensão).

O tamanho dos fragmentos amplificados (OC, ALP, BMP4, Runx2 e RPS18) foi confirmado através de eletroforese em gel de agarose 1%, conforme demonstrado na figura 7.



**Figura 7:** Análise dos produtos de PCR quantitativo em gel de agarose 2% dos genes ALP, BMP4, OC, Runx2 e RPS 18

Os valores de Ct (*Threshold cycle*) foram fornecidos pelo *Software Rotor Gene – 6*. O Ct é o ponto onde o sinal de fluorescência é notado pela primeira vez com o menor número de ciclos durante a fase exponencial da amplificação.

O nível comparativo da expressão de cada condição foi dado pela unidade arbitrária e calculado pelo método de  $\Delta\Delta Ct$ .

Depois de calculada a média dos Ct de cada gene (RPS18, ALP, BMP4, OC, Runx2) foi realizado:

- $\Delta Ct$  (delta Ct) = Ct ALP – Ct RPS18 ou Ct BMP4 - Ct RPS18 ou Ct OC – Ct RPS18 ou Ct Runx2 – Ct RPS18 (grupo fratura, LLLT e US), seguindo:

- Cálculo da média S: Média do  $\Delta Ct$ , seguindo:
- $\Delta\Delta Ct$  (delta delta Ct):  $\Delta Ct$  - média S

Os  $\Delta\Delta C_T$  dos grupos fratura, LLLT e LIPUS foram calculados em relação ao grupo fratura. O valor em UA (unidades arbitrárias) da expressão da ALP, BMP4, OC e Runx2 foi calculado por  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

Os experimentos, para a técnica descrita acima, foram realizados independentemente, em duplicata, e logo após foram realizadas as análises estatísticas dos dados com os valores em UA.

### **3.6.3 Análise estatística**

Os dados foram analisados estatisticamente seguindo-se técnicas descritivas, tais como tabelas e gráficos, na forma de médias e desvios padrão. Na comparação entre os grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA – Two Way) e nos casos significativos, o teste de Duncan foi utilizado para discriminar as diferenças. As análises foram realizadas com o auxílio do programa computacional GraphPad Prism®, v. 3,02 (GraphPad, USA). O nível de significância estabelecido foi de 5% (valor descritivo de  $P < 0,05$ ).

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Análise histológica qualitativa descritiva**

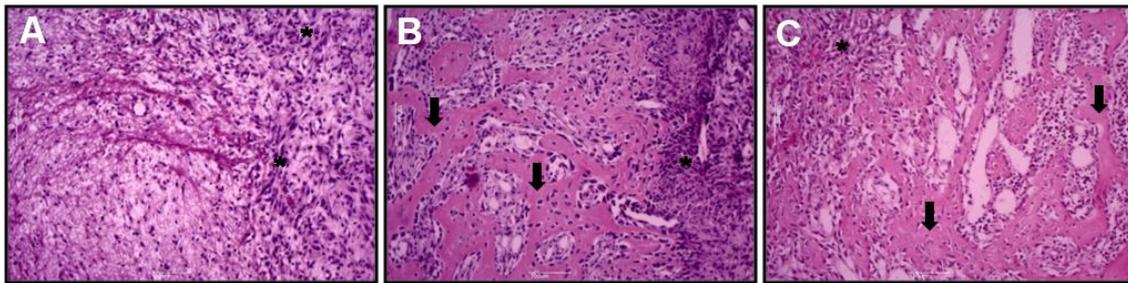
#### **4.1.1. Grupo controle, LLLT e LIPUS no período de 7 dias**

Os achados histológicos obtidos para os animais dos grupos controle, LLLT e LIPUS no período de 7 dias após a realização do defeito ósseo estão descritos na figura 8.

Os animais do grupo controle apresentam delimitação completa da borda da lesão e grande quantidade de tecido de granulação, correspondendo a um estágio inicial de reparo (figura 8A).

Ainda, a figura 8B evidencia que os animais pertencentes ao grupo LLLT 7 dias apresentam uma região da lesão sem delimitação completa da borda, pequena presença de tecido ósseo neoformado e grande quantidade de tecido de granulação. Neste grupo, seis dos dez animais apresentam uma pequena quantidade de tecido ósseo neoformado, e um padrão de reparo tecidual mais organizado quando comparado ao grupo controle do mesmo período. Esses achados são compatíveis com um estágio mais avançado no reparo ósseo quando comparado com o seu respectivo controle.

No grupo LIPUS 7 dias observou-se evidente presença de tecido de granulação, ausência de delimitação completa da borda da lesão e presença de tecido ósseo neoformado, sendo esses achados compatíveis com um estágio inicial no processo de reparação (figura 8C). Esse grupo apresenta um estágio de reparo tecidual avançado quando comparado ao controle do mesmo período. No entanto, quando comparado ao grupo LLLT 7 dias, foi observada menor quantidade de tecido ósseo neoformado e desorganização tecidual.



**Figura 8.** Fotomicrografia dos achados morfológicos dos diferentes grupos experimentais. Pode ser observado na região do defeito, tecido de granulação (setas) e tecido ósseo neoformado (\*) A: controle 7 dias; B: LLLT 7 dias; C: LIPUS 7 dias. Coloração com HE (10X).

#### 4.1.2. Grupo controle, LLLT e LIPUS no período de 13 dias

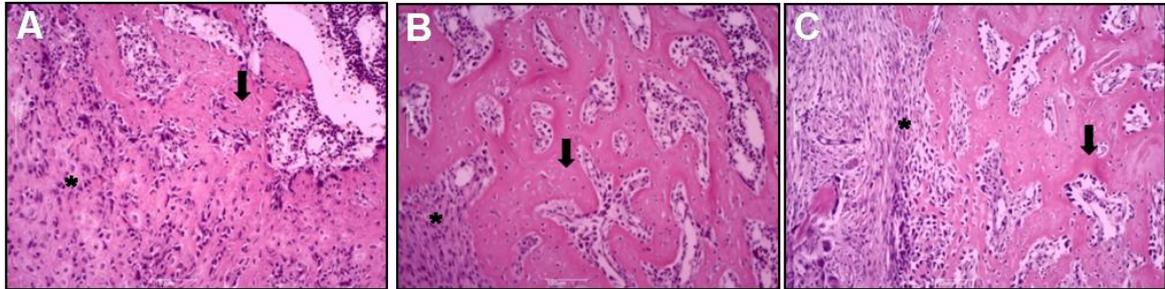
A figura 9 representa os achados histológicos dos grupos controle, LLLT e LIPUS no 13º dia após a realização do defeito ósseo.

No grupo controle (figura 9A) pode ser notada moderada quantidade de tecido de granulação e pequena presença de tecido ósseo neoformado. No entanto, quando comparado ao grupo controle 7 dias, foi observado menor presença de tecido de granulação e maior quantidade de tecido ósseo neoformado.

A figura 9B representa o grupo LLLT 13 dias, na qual pode ser observada moderada quantidade de tecido ósseo neoformado, pequena quantidade de tecido de granulação e não delimitação da borda da lesão, indicando um estágio avançado no processo de reparo e melhor organização tecidual em relação ao grupo LLLT 7 dias. O grupo LLLT 13 dias também apresentou melhor organização tecidual e maior quantidade de tecido ósseo neoformado em relação ao grupo controle no mesmo período.

O grupo LIPUS 13 dias, representado na figura 9C, apresentou um padrão de organização e reparo tecidual mais avançado quando comparado com o e LIPUS 7 dias, com aumento da quantidade de tecido ósseo neoformado e diminuição da área de tecido de granulação. No entanto, os achados histológicos observados nesses animais são muito

similares aos achados do grupo controle 13 dias. Ainda, esses achados apresentam-se em um estágio inferior de reparo quando comparados com o grupo LLLT do mesmo período.



**Figura 9.** Fotomicrografia dos achados morfológicos dos diferentes grupos experimentais. Pode ser observado na região do defeito, tecido de granulação (setas) e tecido ósseo neoformado (\*) A: controle 13 dias; B: LLLT 13 dias; C: LIPUS 13 dias. Coloração com HE (10X).

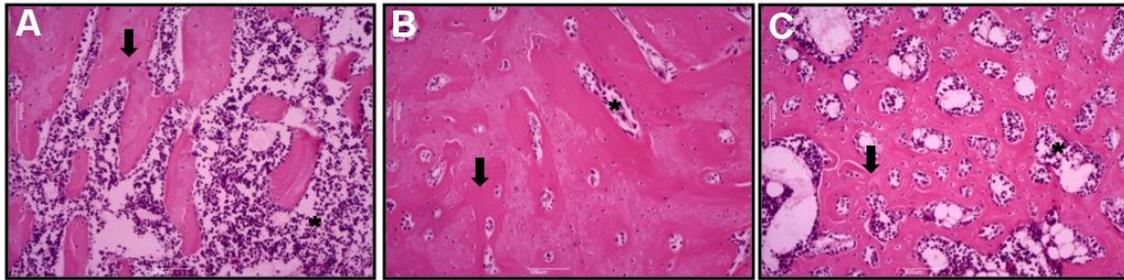
#### 4.1.3. Grupo controle, LLLT e LIPUS no período de 25 dias

A figura 10 representa os achados histológicos dos grupos controle, LLLT e LIPUS no 25º após a realização do defeito ósseo.

Na figura 10A foi observado que o grupo controle 25 dias apresentou área da lesão sem delimitação completa, maior quantidade de tecido ósseo primário, estágio avançado no processo de reparação e melhor organização tecidual em relação aos períodos anteriores.

Já no grupo LLLT 25 dias (figura 10B) pode ser observado área da lesão sem delimitação completa, presença de neoformação óssea em grande quantidade e pequena quantidade de tecido de granulação quando comparado com os demais períodos. Ainda, esse grupo apresentou melhor organização tecidual e um estágio avançado de reparação em relação aos grupos controle e LIPUS, ambos em 25 dias.

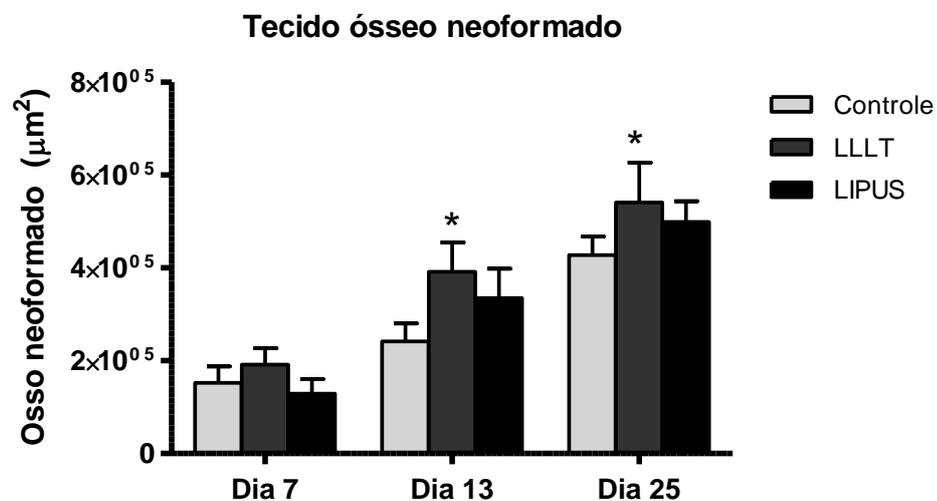
Na figura 10C foi observado que o grupo LIPUS 25 dias apresentou grande quantidade de tecido ósseo neoformado, pouca quantidade de tecido de granulação e área de lesão sem delimitação completa. Esse grupo apresentou melhor organização tecidual e um estágio avançado de reparo quando comparado aos grupos LIPUS 7 e 13 dias e controle 25 dias.



**Figura 10.** Fotomicrografia dos achados morfológicos dos diferentes grupos experimentais. Pode ser observado na região do defeito, tecido de granulação (setas) e tecido ósseo neoformado (\*) A: controle 25 dias; B: LLLT 25 dias; C: LIPUS 25 dias. Coloração com HE (10X).

#### 4.2. Análise histológica quantitativa (análise morfométrica)

A figura 11 mostra os resultados da análise morfométrica das lâminas coradas com TM.



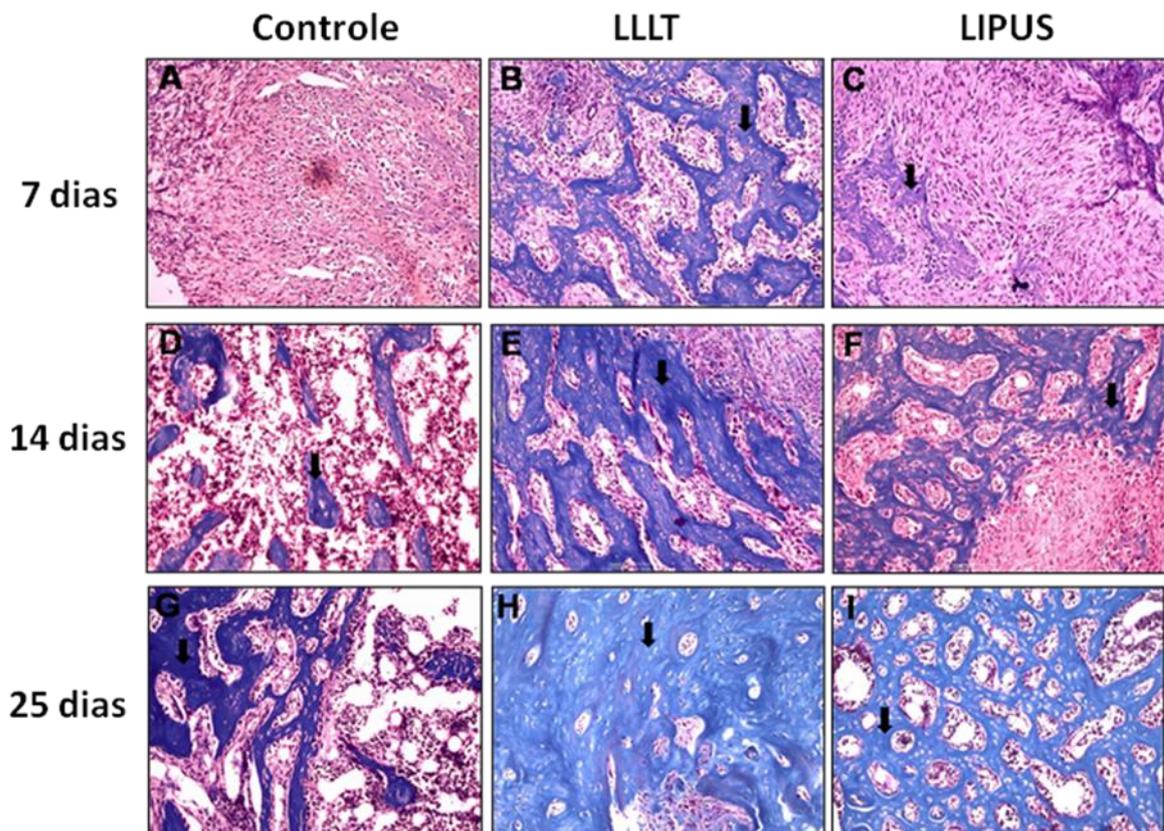
**Figura 11:** Análise do tecido ósseo neoformado em defeito ósseo de ratos controle e tratados com LLLT e LIPUS. As barras representam a média  $\pm$  SD (n=10). \* P<0.05 vs. controle

De acordo com a figura 11, observa-se que no período inicial (7 dias) foi encontrada maior média da área de osso neoformado para o grupo tratado com LLLT em comparação com o grupo controle e com o grupo tratado com LIPUS, porém, essa diferença não foi estatisticamente significativa.

No período intermediário (13 dias) o grupo LLLT apresentou média significativamente maior quando comparado ao controle.

Além disso, no período final (25 dias) o grupo LLLT também apresentou média significativamente maior quando comparado com o controle. No entanto, os animais tratados com LIPUS não apresentaram diferenças estatísticas quando comparados com o grupo controle em nenhum dos tempos experimentais.

A figura 12 ilustra as fotomicrografias da análise morfométrica.



**FIGURA 12** - Fotomicrografia dos achados morfométricos dos diferentes grupos experimentais. Pode ser observado presença de tecido ósseo neoformado na região do defeito ósseo (flecha) nos grupos controle 7 dias (A); LLLT 7 dias (B); LIPUS 7 dias (C); controle 13 dias (D); LLLT 13 dias (E); LIPUS 13 dias (F); controle 25 dias (G); LLLT 25 dias (H); LIPUS: 25 dias (I). Coloração: TM (10X).

### **4.3. Análise da expressão gênica**

#### **4.3.1 Fosfatase alcalina (ALP)**

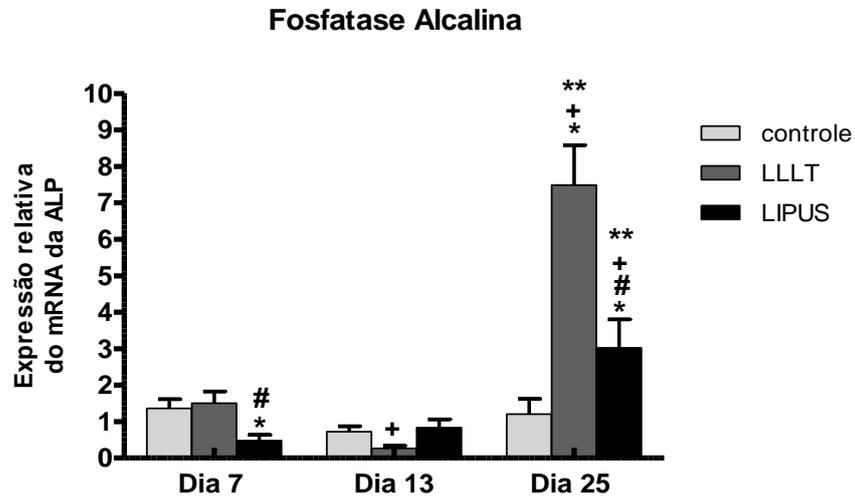
A figura 13 representa a expressão do RNAm da fosfatase alcalina (ALP) no 7º, 13º e 25º dias após a realização do defeito ósseo nos animais do grupo controle, LLLT e LIPUS.

No período de 7 dias, foi observado que não houve diferença estatisticamente significativa na expressão do RNAm da ALP do grupo irradiado com LLLT comparado com o controle. Nota-se ainda que ocorreu diminuição significativa na expressão do RNAm da ALP nos animais tratados com LLLT quando comparado com grupo LIPUS.

Já no período de 13 dias pós-cirurgia foi observado que não houve diferença estatística na expressão do RNAm da fosfatase alcalina entre os grupos controle, LLLT e LIPUS.

No entanto, no 25º dia pós-cirurgia, foi observado um aumento significativo de 6,2 vezes na expressão do RNAm da ALP no grupo LLLT e um aumento significativo de 2,5 vezes no grupo LIPUS quando comparados ao controle. Também foi verificado, nesse período, um aumento significativo de 4,5 vezes na expressão do RNAm da ALP do grupo LLLT em relação ao LIPUS.

Na comparação entre os períodos verificamos que os animais tratados com LLLT os valores na expressão do RNAm da ALP foi significativamente maior no período de 7 dias em relação ao período de 13 dias. Além disso, no 25º dia pós-cirurgia, tanto os grupos tratados com LLLT quanto os com LIPUS apresentaram um aumento significativo na expressão do RNAm da ALP quando comparados com 7 e 13 dias pós-cirurgia.



**Figura 13:** Análise da expressão relativa do RNAm da ALP, normalizados por RPS18, em defeitos ósseos de ratos controles e tratados com LLLT e LIPUS, verificada por PCR em tempo real. As barras representam a média  $\pm$  SD (n=5). \*  $P < 0,05$  vs. controle; #  $P < 0,05$  vs. LLLT; +  $P < 0,05$  vs. 7 dias; \*\*  $P < 0,05$  vs. 13 dias.

#### 4.3.2 Proteína óssea morfogênica 4 (BMP4)

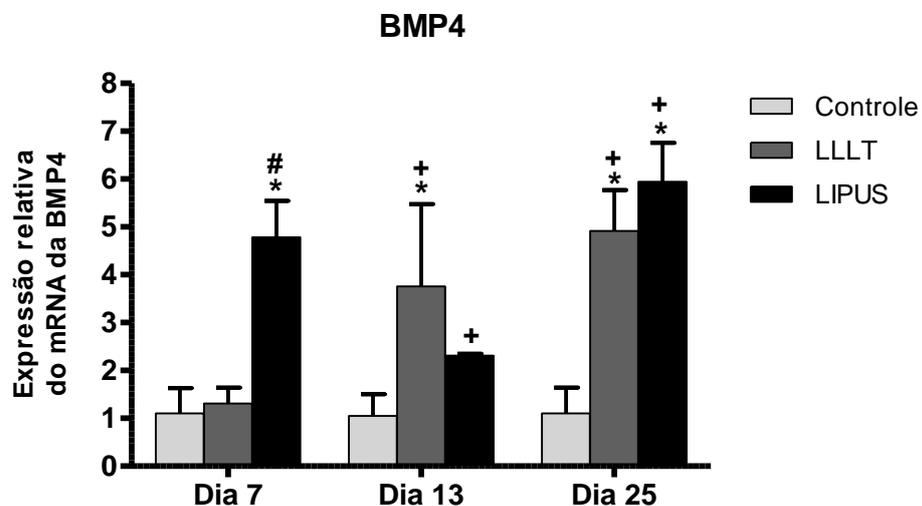
Na figura 14, pode ser observada a expressão do RNAm da BMP4 nos três períodos de tempos estudados (7, 13 e 21 dias pós-cirurgia).

No 7º dia pós-cirurgia, o grupo LLLT não apresentou diferenças significativas na expressão do RNAm da BMP4 em relação ao controle. Porém, o grupo LIPUS apresentou a expressão do RNAm da BMP4 aumentada em 4,3 vezes em relação ao controle e de 3,6 em relação ao LLLT.

No período 13 dias, o LLLT apresentou um aumento significativo na expressão do RNAm da BMP4 quando comparado o grupo controle. O grupo LIPUS não apresentou diferenças significativas nesse período.

Já no 25º dia foi observado que os grupos dos animais tratados apresentaram um aumento significativo na expressão do RNAm da BMP4 em relação ao controle, sendo que no grupo LLLT esse aumento foi de 4,4 vezes, já no grupo LIPUS foi de 5,4 vezes.

Foi analisada também a expressão de BMP4 intragrupos nos diferentes períodos de tempo. Foi observado que no período de 13 e 25 dias o grupo LLLT apresentou um aumento significativo na expressão do RNAm da BMP4 quando comparado ao LLLT 7 dias. O mesmo ocorreu com o grupo LIPUS 13 e 25 dias, quando comparado com o LIPUS 7 dias.



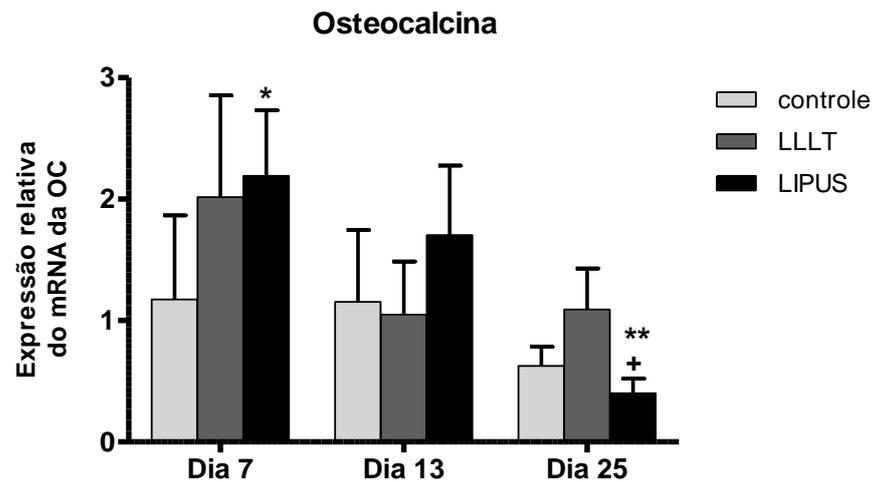
**Figura 14:** Análise da expressão relativa do RNAm da BMP4, normalizados por RPS18, em defeitos ósseos de ratos controles e tratados com LLLT e LIPUS, verificada por PCR em tempo real. As barras representam a média  $\pm$  SD (n=5). \* P<0,05 vs. controle; # P<0,05 vs. LLLT; + P<0,05 vs. 7 dias.

#### 4.3.3 Osteocalcina (OC)

Na figura 15 estão apresentados os resultados da expressão do RNAm da OC nos três diferentes períodos de tempo estudados. Pode ser observado que no 7º dia pós-cirurgia não houve diferença estatística do grupo LLLT em relação ao controle e ao LIPUS. No entanto, o grupo LIPUS apresentou um aumento significativo do RNAm da OC de 1,8 vezes quando comparado ao grupo controle do mesmo período.

No 13º e 25º dias os grupos controle, LLLT e LIPUS não apresentaram diferenças estatísticas entre si.

Já quando a comparação foi feita intragrupos nos três períodos foi observado diferenças estatísticas somente no período de 25 dias. Nesse período, o grupo LIPUS apresentou uma diminuição significativa na expressão do RNAm da OC quando comparado com 7 e 13 dias.



**Figura 15:** Análise da expressão relativa do RNAm da OC, normalizados por RPS18, em defeitos ósseos de ratos controles e tratados com LLLT e LIPUS, verificada por PCR em tempo real. As barras representam a média  $\pm$  SD (n=5). \* P<0,05 vs. controle; + P<0,05 vs. 7 dias; \*\* P<0,05 vs. 13dias.

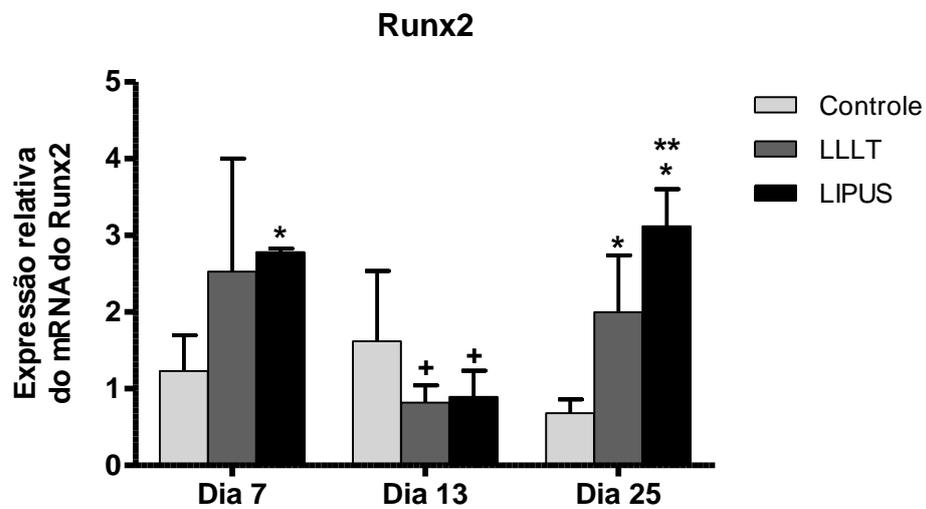
#### 4.3.4 Runx2

A figura 16 mostra a expressão do RNAm da Runx2 nos grupos controle, LLLT e LIPUS no período de 7, 13 e 25 dias pós procedimento cirúrgico. Pode ser observado que no período de 7 dias não ocorreu diferença entre LLLT e o controle. No entanto, o grupo LIPUS apresentou um aumento significativo da expressão da Runx2 em relação ao controle do mesmo período.

No período de 13 dias não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos.

Além disso, no 25º dia foi observado um aumento significativo nos animais dos grupos tratados quando comparados com o controle, indicando que o LLLT e o LIPUS promoveram um aumento da expressão do RNAm da Runx2.

Na comparação da expressão de RNAm da Runx2, entre os três períodos de tempo, foi observado que houve uma diminuição significativa da expressão do RNAm da Runx2 nos grupos LLLT e LIPUS no 13º dia quando comparados entre os respectivos grupos do 7º dia. Já no 25º dia pode ser observado que somente o grupo LIPUS apresentou um aumento significativo na expressão do RNAm da Runx 2 quando comparado com o grupo LIPUS no 13º dia.



**Figura 16:** Análise da expressão relativa do RNAm da Runx2 normalizados por RPS18 em defeitos ósseos de ratos controles e tratados com LLLT e LIPUS, verificada por PCR em tempo real. As barras representam a média  $\pm$  SD (n=5). \* P<0,05 vs. controle; + P<0,05 vs. 7 dias; \*\* P<0,05 vs. 13dias.

## 5. DISCUSSÃO

O LLLT e o LIPUS são recursos que vem sendo amplamente utilizados para promover a osteogênese e acelerar o processo de consolidação óssea (PINHEIRO et al., 2001; LIRANI-GALVÃO et al., 2006; DE OLIVEIRA et al., 2008). Entretanto, a comparação entre o efeito do LLLT e do LIPUS no reparo ósseo, bem como o mecanismo de ação através dos quais esses recursos interferem no processo de reparo têm sido pouco estudado. Com isso, este estudo teve como objetivo, investigar os efeitos do LLLT e do LIPUS no processo de reparo ósseo em tíbias de ratos, por meio de análise histológica qualitativa descritiva, morfométrica e da expressão dos genes ALP, BMP4, OC e Runx2, que estão envolvidos nesse processo.

Os resultados encontrados no presente trabalho demonstraram que os animais tratados com LLLT apresentaram uma maior área de tecido ósseo neoformado e um padrão de reparo tecidual mais organizado quando comparados com o controle e o LIPUS, verificados pela análise histológica qualitativa descritiva nos três períodos de tempo estudados (7, 13 e 25 dias pós cirurgia). Além disso, a análise morfométrica demonstrou aumento de tecido ósseo neoformado nos animais tratados com LLLT nos períodos intermediário e tardio. Ainda, nenhuma diferença estatística foi obtida na análise morfométrica nos animais tratados com LIPUS, em nenhum dos tempos analisados.

Esses resultados corroboram com vários trabalhos encontrados na literatura, que também demonstraram o papel positivo do LLLT na aceleração do processo de reparo ósseo. Liu et al. (2007) relataram que o LLLT acelerou o processo de reparo da fratura, com o aumento do volume do calo ósseo, especialmente nos estágios iniciais, após a aplicação do laser 830nm,  $10\text{J}/\text{cm}^2$ , aplicado em quatro pontos (total  $40\text{J}/\text{cm}^2$ ) por quatro semanas. A diminuição no tempo de reparo após uma fratura também foi encontrada no trabalho realizado por Luger et al. (1998) utilizando o laser He-Ne (632,8 nm, 35 mW,  $892\text{ J}/\text{cm}^2$ ) durante 14 dias consecutivos de aplicação. Nicola et al (2003) também observaram aumento do número de células ósseas no local da injúria após a aplicação do laser As-Ga-Al (660 nm,  $10\text{ J}/\text{cm}^2$ ).

Além disso, em um estudo conduzido por Kazem et al. (2010) foi verificado que o uso do laser As-Ga-Al (780 nm, 4 J/cm<sup>2</sup>, 5 minutos/dia), pode aumentar o desenvolvimento do calo ósseo em coelhos no período de 2, 5 e 8 semanas pós cirurgia, com melhora nas propriedades biomecânicas. Blaya et al. (2008) demonstraram que o uso de dois comprimentos de onda (830 nm, 50 mW, 10 J/cm<sup>2</sup> e 685 nm, 35 mW, 10 J/cm<sup>2</sup>), aplicados a cada 48 horas em fêmur de ratos, foram eficazes na formação óssea nos períodos de 15, 21 e 30 dias pós cirurgia. Além disso, nos dois comprimentos de onda a cicatrização óssea foi mais rápida.

Um outro recurso físico frequentemente utilizado para acelerar o processo de reparo ósseo é o LIPUS. O seu uso com este fim foi aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e seu efeito osteogênico foi demonstrado em diversos estudos (SENA et al., 2005; CLAES et al., 2007; GUERINO et al., 2008), porém não foi verificado em outros (RUE et al., 2004; SCHORTINGHUIS et al., 2005)

No presente estudo, foi observado que os animais tratados com LIPUS apresentaram melhor organização tecidual e maior presença de tecido ósseo no 7º e 25º dia em relação aos respectivos controles, e no 13º dia os animais apresentaram achados semelhantes quando comparado ao controle do mesmo período. Além disso, verificamos através da análise morfométrica que não houve diferenças significativas na quantidade de tecido ósseo neoformado entre os animais tratados com LIPUS, apesar desse aumento ter sido de 38% e 16% no período intermediário e tardio, respectivamente, comparado com seus controles. Resultados semelhantes foram encontrados por Schortinghuis et al. (2005) que não observaram um aumento da formação óssea em mandíbulas tratadas com LIPUS (1,5 MHz, 30 mW/cm<sup>2</sup>, 20 min/dia), 31 dias após a cirurgia de osteotomia.

Entretanto, Azuma et al. (2001) encontram resultados positivos com a utilização do LIPUS (1,5 MHz, 30 mW/cm<sup>2</sup>, 20min/dia), investigando seus efeitos no processo de consolidação em fraturas em fêmures de ratos, principalmente nas propriedades biomecânicas

do calo ósseo. Após 25 dias de tratamento, os autores observaram que a força mecânica do calo ósseo foi superior a do grupo controle. Estes autores sugerem que o LIPUS pode modular a resposta inflamatória inicial, estimular a angiogênese e o remodelamento ósseo, acelerando o processo de consolidação de fraturas. Gebauer et al. (2002) observaram que o tratamento com LIPUS (1.5MHz, 30mW/cm<sup>2</sup>, 20 minutos/dia) foi eficaz para aumentar a força do calo ósseo, no fêmur de ratos controles e diabéticos, em seis semanas após a cirurgia.

Erdogan et al. (2006) também observaram que o LIPUS (1.5MHz, 30mW/cm<sup>2</sup>, 20 minutos/dia, 20 dias) apresentou efeitos benéficos na consolidação óssea de mandíbulas de coelhos. Entre esses efeitos pode-se destacar melhora nas propriedades mecânicas da consolidação óssea, bem como aumento de tecido ósseo neoformado no grupo tratado com LIPUS.

Outro estudo demonstrou que o LIPUS (1.5MHz, 30mW/cm<sup>2</sup>, 20 min/dia, 87 dias), em fraturas de fíbula de humanos, promoveu uma aceleração na consolidação óssea aumentando a quantidade de osso neoformado, a aposição de minerais e o volume ósseo (RUTTEN et al, 2008). Ainda em humanos, Leug et al. (2004) observaram que o LIPUS (1.5MHz, 30mW/cm<sup>2</sup>, 20 min/dia, 90 dias) promoveu melhora na consolidação de tíbias.

Os resultados contraditórios encontrados no presente estudo e nos estudos da literatura sobre os efeitos do LIPUS no processo de reparo ósseo podem estar relacionados com o tempo e a frequência de tratamento. Por exemplo, a maioria dos trabalhos utilizaram 5 sessões por semana e o presente estudo utilizou 3 sessões neste período, afim de se assemelhar as condições clínica.

Poucos estudos foram realizados no intuito de comparar os efeitos do LLLT e do LIPUS no reparo ósseo. Lirani-Galvão et al. (2006,) compararam os efeitos do LLLT (AsGaAl, 780 nm, 30 mW, 112.5 J/cm<sup>2</sup>) e do LIPUS (1.5 MHz, 30 mW/cm<sup>2</sup>, 20 minutos/dia) em tíbias de ratos. Os autores encontraram que ambos agentes físicos promoveram mudanças

na consolidação óssea, mas em diferentes fases da recuperação. O LIPUS aumentou a consolidação óssea promovendo a reabsorção óssea na área fraturada, enquanto o LLLT acelerou esse processo através da formação óssea e promoveu um aumento da resistência máxima quando comparado aos grupos controle e LIPUS.

De acordo com o exposto, já estão estabelecidos na literatura os efeitos do LLLT e o LIPUS no processo de reparo ósseo (evidenciados através de estudos radiográficos e histológicos qualitativos) (AZUMA et al., 2001; LIRANI-GALVÃO et al., 2006; LIU et al., 2007). No entanto, existem poucos estudos que investigaram os mecanismos de ação celular e molecular no tecido ósseo após a aplicação destes recursos, modificações estas que parecem culminar na estimulação da osteogênese.

Com isso, o presente estudo investigou a expressão de alguns genes relacionados à diferenciação de células osteogênicas durante o processo de consolidação, na tentativa de elucidar alguns dos mecanismos de ação do LLLT e do LIPUS no metabolismo ósseo. Dentro deste contexto foi realizada a avaliação, por meio da técnica de PCR em tempo real, da expressão gênica da ALP, BMP4, OC e Runx2.

Durante o processo de reparo ósseo vários genes e proteínas são sintetizados (SENA et al., 2005; KAYAL et al, 2009). A fosfatase alcalina óssea é uma proteína que retrata a formação óssea. Está relacionada à atividade dos osteoblastos e é utilizada como um índice de formação óssea. Durante o processo de reparo ósseo após uma fratura, a quantidade de fosfatase alcalina fica elevada e se mantém nesse nível por um longo período (NAKAGAWA et al, 2006).

Neste estudo foi observado aumento significativo do RNAm da fosfatase alcalina nos animais tratados com LLLT no período tardio de reparo ósseo (25 dias pós-operatório) comparado com controle. Também foi observado que o grupo LLLT apresentou aumento da expressão deste gene no período inicial (7 dias) e tardio (25 dias) comparado com o grupo

LIPUS. Nos animais tratados com LIPUS foi observado diminuição da expressão deste gene aos 7 dias e aumento da expressão deste gene no período tardio de reparo em relação ao controle.

Como explicitado anteriormente, a ALP é um marcador de formação óssea. Nos animais tratados com o LLLT o aumento da quantidade de neoformação óssea observada no período de 25 dias pode estar correlacionado com o aumento significativo da expressão do RNAm da ALP. Apesar do aumento de tecido ósseo neoformado também ter ocorrido nos animais tratados com LLLT no período de 13 dias, não é possível correlacionar com a expressão do RNAm da ALP pois nesse período não houve diferença significativa na expressão desse RNAm.

Os animais tratados com LIPUS no período de 25 dias apresentaram aumento na quantidade de tecido ósseo neoformado apesar de não ter sido significativo. Isso também pode estar correlacionado com o aumento da expressão do RNAm da ALP em 25 dias.

Saracino et al. (2009) em um trabalho que utilizou o laser superpulsado AsGa (904-910 nm, 200 mW, 6 J/cm<sup>2</sup>) durante 4, 10 e 20 dias em cultura de células osteoblásticas de humanos, observou que nos animais tratados com esse recurso ocorreu um aumento na expressão do RNAm da ALP em 10 e 20 dias.

Em um estudo investigando os efeitos do LIPUS no reparo ósseo, Yang et al (2005) demonstraram um aumento da expressão de ALP e TGF num período de 11 dias, sugerindo que a aceleração do processo de consolidação seguido do tratamento com LIPUS deve-se a estimulação desses genes. Hasegawa et al (2009) demonstraram que o LIPUS (1,5 MHz, 30 mW/cm<sup>2</sup>, 20 minutos diariamente) promoveu aumento na expressão do RNAm da fosfatase alcalina e osteocalcina em células mesenquimais.

Sant'Anna et al. (2005) utilizaram enxerto de BMP2 e/ou tratamento com LIPUS (1,5 MHz, 30 mW/cm<sup>2</sup>, 20 minutos diariamente) em células estromais da medula óssea de ratos

num período de 1, 3, 5 e 7 dias. Observaram que tanto as células que receberam o enxerto como as que foram tratadas com LIPUS apresentaram aumento no RNAm da ALP no período de 3 dias. O mesmo resultado foi encontrado para as células tratadas com LIPUS e enxerto associados, também em 3 dias.

Contrariamente, Sena et al (2005) demonstraram que o LIPUS (1,5 MHz, 30 mW/cm<sup>2</sup>, 20 min.) não promoveu um aumento da expressão da síntese do RNAm da fosfatase alcalina em células estromais derivadas da medula óssea nos períodos de 0,5, 1, 3, 6 e 12 horas.

Outra importante proteína envolvida no processo de diferenciação celular são as BMPs (MIYAZONO, 2000). As BMPs podem induzir a diferenciação celular, organização do tecido ósseo com vascularização intensa, formação de cartilagem e completa remodelação óssea. A BMP 4 quando se liga a receptores específicos, ativa genes no núcleo das células e inicia uma série de eventos de produção de proteínas relacionadas à mineralização (BANDYOPADHYAY et al., 2006).

O presente estudo demonstrou que os animais irradiados com LLLT apresentaram um aumento na expressão do gene da BMP4 nos períodos intermediário e tardio comparados com os respectivos controles. Também foi observado que o grupo LLLT apresentou diminuição da expressão deste gene no período inicial e um aumento no período tardio quando comparado com o tratado com LIPUS. A expressão do RNAm da BMP4, no grupo LIPUS, apresentou-se aumentada no 7º e no 25º dias pós-cirurgia em relação ao grupo controle de ambos períodos.

Palomares et al. (2009) em um estudo com fratura de ratos observaram que o RNAm da BMP4 apresentou-se diminuído quando eram realizados estímulos mecânicos no local da fratura 10 dias após a cirurgia e durante 1, 2 ou 4 semanas. Esse estímulos eram aplicados 15 minutos por dia durante 5 dias consecutivos.

Em outro trabalho, Saracino et al. (2009) utilizou o laser superpulsado AsGa (904-910 nm, 200 mW, 6 J/cm<sup>2</sup>) durante 4, 10 e 20 dias em cultura de células osteoblásticas de humanos. Foi observado que o RNAm da BMP4 apresentou um aumento significativo em sua expressão somente no período de 10 dias de aplicação desse recurso.

Há na literatura poucos trabalhos que investigaram a ação do LIPUS na expressão do RNAm da BMP4. No entanto, alguns outros estudos investigaram a ação deste recurso em outras BMPs.

Wijdicks et al. (2009), utilizaram dois recursos para acelerar o reparo ósseo em ratos: enxerto com rhBMP2 (do inglês “*recombinant human bone morphogenetic*”) e LIPUS (1,5 MHz, 30 mW/cm<sup>2</sup>, 20 min) e observaram que em quatro semanas a associação de ambos recursos induziu a formação óssea. Com isso, concluíram pela primeira vez que o LIPUS aumenta a formação óssea induzido pela rhBMP2.

Além disso, outro trabalho demonstrou que células de linhagem osteoblástica tratadas por 7 dias com LIPUS (1,5 MHz, 30 mW/cm<sup>2</sup>, 20 minutos) podem acelerar a atividade osteogênica. No entanto, foi observado que esse recurso promoveu o aumento na expressão da BMP2, 4 e 7 demonstrando, com isso, que a atividade osteogênica é mediada pelas BMPs quando utilizado o LIPUS diariamente (SUZUKI et al, 2009).

Sant’Anna et al. (2005) realizaram um estudo em que foi utilizado enxerto de BMP2 e/ou tratamento com LIPUS (1,5 MHz, 30 mW/cm<sup>2</sup>, 20 minutos diariamemnte) em cultura de células estromais da medula óssea de ratos num período de 1, 3, 5 e 7 dias. Avaliaram a expressão do RNAm da BMP2 e 7 e observaram que o grupo que recebeu o exerto e não foi tratado com LIPUS apresentou aumento no RNAm da BMP2 no período de 1 e 3 dias. No período de 3 dias a combinação de tratamento com LIPUS e enxerto apresentou aumento da expressão do RNAm da BMP2 em relação ao grupo que receberam tratamentos isolados. Em relação ao RNAm da BMP7 foi observado que sua expressão aumentou do dia 3 nos animais

tratados com LIPUS e após esse período nos animais que receberam o exerto associado com o LIPUS.

Outra importante proteína relacionada no reparo do tecido ósseo é a osteocalcina. Osteocalcina é uma proteína específica de osteoblastos e se acumula na matriz óssea extracelular. Embora a função da OC no tecido ósseo ainda seja imprecisa, sabe-se que ela tem um papel importante na mineralização e na remodelação óssea (BAR et al, 2003).

Não foi observada alteração na expressão do RNAm da osteocalcina em animais tratados com LLLT em nenhum dos períodos estudados. Entretanto, observamos um aumento da expressão desse RNAm no período inicial (7 dias) em animais tratados com LIPUS comparado com o grupo controle.

Apesar desse estudo ter demonstrado que o LLLT não alterou a expressão do RNAm da osteocalcina alguns autores verificaram resultados contrários. Stein et al (2008) observaram que o LLLT (670nm, 2 J/cm<sup>2</sup>), 72 horas após a aplicação, promoveu um efeito de estimulação de osteoblastos em células humanas, sendo comprovado através da análise de PCR pela expressão aumentada do RNAm da osteocalcina e do RNAm do colágeno tipo I.

Ozawa et al. (1998) utilizando LLLT (Ga-Al-As, 830 nm, 500 mW), em vários estágios de cultura de osteoblastos (1 a 16 dias), observaram que esse recurso promoveu uma significativa proliferação celular com aumento na expressão do RNAm da osteocalcina.

Da mesma forma, Hasegawa et al (2009) demonstraram que o LIPUS promoveu aumento na expressão do RNAm da e osteocalcina em células mesenquimais.

A Runx2 é um fator de transcrição essencial para diferenciação de osteoblastos (KOMORI, 2003). Tem sido demonstrado que ratos geneticamente modificados, que não expressam Runx2, não conseguem formar tecido ósseo e tem um bloqueio na maturação osteoblástica (VAES et al, 2006). Ainda, Vaes et al (2006) demonstraram que a Runx2 pode

ativar genes osteoblastos específicos, bem como aumentar a expressão de osteocalcina, osteopontina, fosfatase alcalina e colágeno tipo I.

No presente estudo foi demonstrado que o RNAm da Runx2 foi aumentado no grupo LLLT no período tardio (25 dias) de consolidação óssea comparado com controle. Não foram observadas alterações na expressão do RNAm da Runx2 na comparação entre os grupos LLLT e o grupo LIPUS. No entanto, também foi observado um aumento na expressão desse gene no grupo LIPUS (7 dias e 25 dias) quando comparado ao controle do mesmo período.

Contudo, Sena et al (2005) demonstraram que o LIPUS (1,5 MHz, 30 mW/cm<sup>2</sup>, 20 min.) não promoveu um aumento da expressão da síntese da Runx2 após 0,5, 1, 3, 6 e 12 horas, em células estromais derivadas da medula óssea.

No entanto, em outro trabalho foi demonstrado que a expressão do RNAm da RUNX2 apresentou-se elevada em células estromais da medula óssea tratadas com LIPUS (1,5 MHz, 30 mW/cm<sup>2</sup>, 20 minutos diariamente) em três dias (Sant'Anna et al, 2005).

O aumento na quantidade de osso neoformado verificado por meio da análise morfométrica no 13º dia pode estar relacionado com o aumento da expressão do gene da BMP4 no grupo LLLT, pois neste mesmo período o grupo LIPUS não apresentou aumento da formação óssea e aumento do RNAm da BMP4. Isso pode indicar o papel da BMP4 na formação óssea no período intermediário em animais tratados com LLLT.

Também verificamos que ocorreu aumento do RNAm da ALP, BMP4 e Runx2 no período tardio após a aplicação do LLLT e LIPUS. No entanto, ocorreu aumento significativo da formação óssea verificada pela morfometria somente no grupo LLLT. Isto pode estar relacionado com o aumento da expressão do gene da ALP neste período nos animais tratados com LLLT, indicando que a ALP pode ser usada como um marcador da proliferação e diferenciação de osteoblastos e também promover a formação óssea no período tardio.

Apesar do aumento do RNAm da ALP, BMP4 e RUNX2 não ser correlacionado diretamente com o aumento significativo da formação óssea no período tardio do grupo LIPUS, supomos que estes genes podem estar envolvidos no processo de reparo ósseo pois ocorreu um aumento de 18% na formação óssea desse grupo verificada pela análise morfométrica.

Pode ser sugerido que o aumento das expressões dos RNAm apresentados acima pode ser responsável pela diferenciação de células osteoblásticas, estimulação da osteogênese e a alta deposição de matriz óssea, o que pode corresponder aos nossos achados histológicos no período intermediário e tardio.

No presente estudo, foram empregadas várias técnicas, desde abordagens morfométricas até estudos moleculares, que proporcionaram um grande avanço no entendimento do processo de reparo ósseo após a utilização do LLLT e do LIPUS. Estudos futuros analisando outros genes, bem como outras proteínas envolvidas no processo de reparo são necessários para melhor compreender o processo de reparo ósseo fisiológico e a ação do LLLT e do LIPUS no tecido ósseo.

## 6. CONCLUSÕES

A análise histológica qualitativa descritiva e quantitativa demonstrou que a laserterapia promoveu melhora no processo de reparo ósseo comparado com o reparo fisiológico e com a aplicação do LIPUS no 13º (período intermediário) e no 25º (período tardio) dias pós-cirurgia.

O aumento da formação óssea verificado no período intermediário e tardio pode estar correlacionado com o aumento da expressão do RNAm da BMP4 e ALP, respectivamente. Isto indica que o LLLT estimula a formação óssea pelo aumento da expressão da BMP4 no período intermediário e da ALP no período tardio.

Apesar desses achados, novos estudos são necessários para demonstrar as ações moleculares e celulares do LLLT e do LIPUS no processo de reparo ósseo.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguila HL, Rowe DW. Skeletal development, bone remodeling, and hematopoiesis. *Immunol Rev.* 208: 7-18, 2005.
2. Albertin LM. Efeito do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre fêmur de ratas ovariectomizadas. Dissertação doutorado. UFSCar, São Carlos, 2007.
3. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia Molecular da Célula.* 4 ed. Porto Alegre-RS: Artmed, 2004.
4. Akyol UK, Güngörmüs M, Gündogdu C, Erdem H. Histologic evaluation of the effects of ER:Yang laser on bone ablation. *J Contemp Dent Pract.* 10:65-72, 2009.
5. Apolinário JC. Efeito do ultrassom de baixa potência na reparação óssea em ratos sob ausência de carga. Análise densitométrica e biomecânica. Dissertação mestrado. Unesp, Araçatuba, 2008.
6. Azuma Y, Ito M, Harada Y, Takagi H, Ohta T, Jingushi S. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates rat femoral fracture healing by acting on the various cellular reactions in the fracture callus. *J Bone Miner Res.* 16:671-680, 2001.
7. Bandyopadhyay A, Tsuji K, Cox K, Harfe BD, Rosen V, Tabin CJ. Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4 and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS Genetics.* 2:2116-2130, 2006.
8. Baxter GD. *Therapeutic lasers: theory and practice.* United States of America: Ed. Churchill Livingstone, p.1-19, 1997.
9. Blaya DS, Guimarães MB, Pozza DH, Weber JB, de Oliveira MG. Histologic study of the effect of laser therapy on bone repair. *J Contemp Dent Pract.* 9:41-48, 2008.
10. Bossini PS, Fangel R, Habenschus RM, Renno AC, Benze B, Zuanon JA, Neto CB, Parizotto NA. Low-level laser therapy (670 nm) on viability of random skin flap in rats. *Lasers Med Sci.* 24:209-213, 2009.
11. Bouvet-Gerbettaz S, Merigo E, Rocca JP, Carle, GF, Rochet N. Effects of low-level laser therapy on proliferation and differentiation of murine bone marrow cells into osteoblasts and osteoclasts. *Lasers Surg Med.* 41:291-297, 2009.

12. Brasileiro Filho G. Bogliolo Patologia. 7. Ed., Rio de Janeiro-RJ: Guanabara Koogan, 2006.
13. Brighton CT, McCluskey WP. Response of cultured bone cells to a capacitively coupled electric field: inhibition of cAMP response to parathyroid hormone. *J Orthop Res.* 6:567-571, 1988.
14. Carano RAD, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today.* 8: 980-989, 2003.
15. Carvalho HF, Collares-Buzato CB. Células: uma abordagem multidisciplinar. Barueri-SP: Manole, 2005.
16. Claes L, Willie B. The enhancement of bone regeneration by ultrasound. *Prog Biophys Mol Biol.* 93:384-398, 2007.
17. Cornell CN, Lane JM. Newest factors in fracture healing. *Clinical orthopaedics and related research* 277:297-310, 1992.
18. Cunha A, Parizotto NA, Vidal BC. The effect of therapeutic ultrasound on repair of the achilles tendon (tendo calcaneus) of the rat. *Ultrasound Med Biol.* 12:1691-1696, 2001.
19. De Oliveira RF, Oliveira DAAP, Monteiro W, Zangaro RA, Magini M, Soares CP. Comparison between the effect of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasonic irradiation in vitro. *Photomed Laser Surg.* 26:6-9, 2008.
20. Docker MF. A review of instrumentation available for therapeutic ultrasound. *Physiotherapy.* 73:154-155, 1987.
21. Douat ESV. Estudo comparativo do efeito do ultrassom terapêutico de 1 MHz com frequência de repetição de pulso de 100 HZ e 16 HZ no reparo de osteotomia por escareação em tibia de rato. Dissertação. São Carlos, 2004.
22. Duarte LR. The stimulation of bone growth by ultrasound. *Arch Orthop Trauma Surg.* 101: 153-159, 1983.

23. Duplomb L, Dagouassat M, Jourdon P, Heymann D. Differentiation of osteoblasts from mouse embryonic stem cells without generation of embryoid body. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 43: 21-24, 2007.
24. Erdogan Ö, Esen E, Üstun Y, Kürkçü M, Akova T, Gönlüsen G, Uysal H, Çevlik F. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on healing of mandibular fractures: an experimental study in rabbits. *J Oral Maxillofac Surg.* 64: 180-188, 2006.
25. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* 355S: 7-21, 1998.
26. Garavello-Freitas I, Baranauskas V, Joazeiro PP, Padovani CR, Dal Pai-Silva MD, da Cruz-Höfling MA. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. *J Photochem Photobiol B.* 70:81-89, 2003.
27. Garimella R, Tague SE, Jianghong Z, Belibi F, Nahar N, Sun BH., Insogna K, Wang J, Anderson C. Expression and synthesis of bone morphogenetic proteins by osteoclasts: a possible path to anabolic bone remodeling. *J Histochem Cytochem.* 56: 569-577, 2008.
28. Gartner LP, Hiatt JL. *Tratado de Histologia.* 2ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 456p., 2003.
29. Gebauer GP, Lin SS, Beam HA, Vieira P, Parsons JR. Low-intensity pulsed ultrasound increases the fracture callus strength in diabetic BB Wistar rats but does not affect cellular proliferation. *J Orthop Res.* 20:587-592, 2002.
30. Guerino MR, Santi FP, Silveira RF, Luciano E. Influence of ultrasound and physical activity on bone healing. *Ultrasound Med Biol.* 34:1408-1413, 2008.
31. Hadjiargyrou M, Kenneth M, Ryaby JP, Rubin C. Enhancement of fracture healing by low intensity ultrasound. *Clin Orthop Relat Res.* 355:216-229, 1998.
32. Hamajima S, Hiratsuka K, Kiyama-Kishikawa I, 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.* 18:78-82, 2003.

33. Hasegawa T, Miwa M, Sakai Y, Niikura T, Kurosaka M, Komori T. Osteogenic activity of human fracture haematoma-derived progenitor cells is stimulated by low intensity pulsed ultrasound in vitro. *J Bone Joint Surg Br.* 91:264-270, 2009.
34. Heckman JD, Ryaby JP, McCabe J, Frey JJ, Kilcoyne RF. Acceleration of tibial fracture-healing by non-invasive, low-intensity pulsed ultrasound. *J Bone Joint Surg Am.* 76:26-34, 1994.
35. Heino TJ, Hentunen TA, Vaananen HK. Conditioned medium from osteocytes stimulates the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells and their differentiation into osteoblasts. *Exp Cell Res.* 294:458-468, 2004.
36. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica.* 9 Ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
37. Kaplan FS, Hayes WC, Keaveny TM, Boskey A, Einhorn TA, Iannotti JP. Form and function of bone. *J Orthopaedic Basic Science.* Cap. 4, 127-184, 1994.
38. Karsenty G. The central regulation of bone remodeling. *Trends Endocrinol Metab.* 11: 437-439, 2000.
39. Karu TI. Mechanisms of interaction of monochromatic visible light with cells. *Proceedings of effects of low power light on biological systems.* 2630:2-9, 1995.
40. Karu TI. *The science of low-power laser therapy.* Amsterdam: Copyringht, 1998.
41. Karu TI, Kolyakov SF. Exact action spectra of cellular responses relevant to phototherapy. *Photomed Laser Surg.* 23:356-361, 2005.
42. Kazen Shakouri S, Soleimanpour J, Salekzamani Y, Oskuie MR. Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process. *Lasers Med Sci.* 25:73-77, 2010.
43. Kayal RA, Alblowi J, Mckenzie E, Krothapalli N, Silkman L, Gerstenfeld L, Einhorn TA, Graves DT. Diabetes causes the accelerated loss of cartilage during fracture repair which is reserved by insulin treatment. *Bone.* 44:357-363, 2009.
44. Khanal A, Yoshioka I, Tominaga K, Furuta N, Habu M, Fukuda J. The BMP signaling and its Smads in mandibular osteogenesis. *Oral Dis.* 14:347-355, 2008.

45. Kidd LJ, Stephens AS, Kuliwaba JS, Fazzalari NL, Wu ACK, Forwood MR. Temporal pattern of gene expression and histology of stress fracture healing. *Bone*. 46:369-378, 2010.
46. Kitchen SS, Partridge CJ. A review of low level laser therapy. *Physiotherapy* 77:161-168, 1991.
47. Kitchen S, Bazin S. *Eletroterapia: Prática Baseada em Evidências*. 11 ed. São Paulo: Manole, 2003.
48. Kloting N, Follak N, Kloting I. Is there an autoimmune process in bone? Gene expression studies in diabetic and nondiabetic BB rat as well as BB rat-related and-unrelated rat strains. *Physiol Genomics* 24:59-64, 2005.
49. Kristiansen TK, Ryaby JP, McCabe J, Frey JJ, Roe LR. Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific, low-intensity ultrasound. A multicenter, prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Bone Joint Surg Am*.79:961-973, 1997.
50. Kokubu T, Matsui N, Fujioka H, Tsunoda M, Mizuno K. Low intensity pulsed ultrasound exposure increases prostaglandin E2 production via the induction of Cyclooxygenase-2 mRNA in mouse osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 256:284-287, 1999.
51. Kodama AC. Efeitos do ultrassom pulsado de baixa intensidade em um modelo ósseo de ratas ovariectomizadas analisados por meio do ensaio de flexo-compressão. Dissertação mestrado. USP, São Carlos, 2003.
52. Komori T. Requisite roles of Runx2 and Cbfb in skeletal development. *J Bone Miner Metab*. 21: 193-197, 2003.
53. Leung KS, Lee WS, Tsui HF, Liu PP, Cheung WH. Complex tibial fracture outcomes following treatment with low-intensity pulsed ultrasound . *Ultrasound Med Biol*. 30:389-395, 2004.
54. Lin L, Chow KL, Leng U. Study of hydroxyapatite osteoinductivity with an osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A*. 89:326-335, 2008.

55. Lirani-Galvão AP, Jorgetti V, da Silva OL. Comparative study of how low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound affect bone repair in rats. *Photomed Laser Surg.* 24: 735-740, 2006.
56. Liu X, Lyon R, Meier HT, Thometz J, Haworth ST. Effect of low-level laser therapy on rabbit tibial fracture. *Photomed Laser Surg.* 25: 487-494, 2007.
57. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods.* 25: 402-408, 2001.
58. Low L, Reed A. *Eletroterapia Explicada: Princípios e Prática.* 3ª ed., Barueri-SP: Ed. Manole Ltda, 2001.
59. Lu H, Qin L, Lee K, Cheung W, Chan K, Leung K. Identification of genes responsive to low-intensity pulsed ultrasound stimulations. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 378:569-573, 2009.
60. Luger EJ, Rochkind S, Wollman Y, Kogan G, Dekel S. Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. *Lasers Surg Med.* 22:97-102, 1998.
61. McDiarmid T, Burns PN. Clinical application of therapeutic ultrasound. *Physiotherapy.* 73:155-162, 1987.
62. Malizos KN, Hantes ME, Protopappas V, Papachristos A. Low-intensity pulsed ultrasound for bone healing: an overview. *Injury.* 375: S56-S62, 2006.
63. Marino JAM. Efeito do laser terapêutico de baixa potência sobre o processo de reparação óssea em tibia de rato. *Dissertação Mestrado.* UFSCar, 2003.
64. Matsumoto MA, Ferino FV, Monteleone GF, Ribeiro DA. Low level laser therapy modulates cyclo-oxygenase-2 expression during bone repair in rats. *Lasers Med Sci.* 24:195-201, 2009.
65. Mayr E, Rudzki MM, Rudzki M, Borchardt B, Hausse H, Ruter A. Does low intensity, pulsed ultrasound speed healing of scaphoid fractures? *Handchir Mikrochir Plast Chir.* 32:115-122, 2000.
66. Miyazono K. Positive and negative regulation of TGF-beta signaling. *J Cell Sci.* 113: 1101-1109, 2000.

67. Nakagawa H, Kamimura M, Takahara K, Hashidate H, Kawaguchi A, Uchiyama S, Miyasaka T. Changes in total alkaline phosphatase level after hip fracture: comparison between femoral neck and trochanter fractures. *J Ortho Sci.* 11:135-139, 2006.
68. Naruse K, Mikuni-Takagaki Y, Azuma Y. Anabolic response of mouse bone-marrow-derived stromal cell clone ST2 cells to low-intensity pulsed ultrasound. *Biochem Biophys Res Commun.* 268: 216-220, 2000.
69. Naruse K, Miyauchi A, Itomani M, Mikuni-Takagaki Y. Distinct anabolic response of osteoblast to low-intensity pulsed ultrasound. *J Bone Miner Res.* 18:360-369, 2003.
70. Nicola RA, Jorgetti V, Rigau J, Pacheco MT, dos Reis LM, Zângaro RA. Effect of low-power GaAlAs laser (660 nm) on bone structure and cell activity: in experimental animal study. *Lasers Med Sci.* 18:89-94, 2003.
71. Ninomiya T, Hosoya A, Nakamura H, Sano K, Nishisaka T, Ozawa H. Increase of bone volume by a nanosecond pulsed laser irradiation is caused by a decreased osteoclast number and an activated osteoblast. *Bone.* 40:140-148, 2007.
72. Nissan J, Assif D, Gross MD, Yaffe A, Binderman I. Effect of low intensity laser irradiation on surgically created bony defects in rats. *J Oral Rehabil.* 33:619-924, 2006.
73. Okuno E, Caldas IL, Chow C. Física para ciências biológicas e biomédicas. Harba. São Paulo, 1986.
74. Oliveira P, Ribeiro DA, Pipi EF, Driusso P, Parizotto NA, Renno AC. Low level laser therapy does not modulate the outcomes of a highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate) on bone consolidation rats. *J Mater Sci Mater Med*, 2009. [Epub ahead of print]
75. Ortiz MCS, Carrinho PM, dos Santos AAS, Golçalves RC, Parizotto NA. Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades – Parte 1. *Fisioterapia Brasil.* 2: 221-236, 2001.
76. Ozawa Y, Shimizu N, Kariya G, Abiko Y. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *Bone.* 22:347-354, 1998.

77. Palomares KTS, Gleason RE, Mason ZD, Cullinane DM, Einhorn TA, Gerstenfeld LC, Morgan EF. Mechanical stimulation alters tissue differentiation and molecular expression during bone healing. *J Orthop Res.* 27:1123-1132, 2009.
78. Pinheiro ALB, Oliveira GM, Martins PPM, Ramalho LMP, Oliveira MAM, Júnior NA, Nicolau RM. Biomodulatory effects of LLLT on bone regeneration. *Laser Therapy.* 13:73-79, 2001.
79. Polinder S, Meerding WJ, Barr MEV, Toet H. Cost estimation of injury-related hospital admissions in 10 European countries. *J Trauma,* 59:1283-91, 2005.
80. Rath B, Nam J, Knobloch TJ, Lannutti JJ, Agarwall, S. Compressive forces induce osteogenic gene expression in calvarial osteoblasts. *J Biomech.* 41:1095-1103, 2008.
81. Rawool NM, Goldberg BB, Forserg F, Winder AA, Hume E. Power Doppler assessment of vascular changes during fracture treatment with low-intensity ultrasound. *J Ultrasound Med.* 22:145-153, 2003.
82. Reher P, Harris M, Whiteman M, Hai HK, Meghji S. Ultrasound stimulates nitric oxide and prostaglandin E2 production by human osteoblasts. *Bone.* 31:236-241, 2002.
83. Renno ACM, McDonnell PA, Parizotto NA, Laakso EL. The Effects of Laser Irradiation on Osteoblast and Osteosarcoma Cell Proliferation and Differentiation in Vitro. *Photomed Laser Surg.* 25:275-280, 2007.
84. Rosemberg AE. Ossos, Articulações e Tumores de Tecidos Moles. In: ROBBINS, S.L., COTRAN, R.S. *Patologia - Bases Patológicas das Doenças.* Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
85. Rue JP, Armstrong DW, Frassica FJ, Deafenbaugh M, Wilckens JH. The effect of pulsed ultrasound in the treatment of tibial stress fractures. *Orthopedics.* 27:1192-1195, 2004.
86. Rubin E, Gorstein F, Rubin R, Schwarting R, Strayer D. *Rubins Patologia: bases clinicopatológicas da medicina.* 4. ed., Rio de Janeiro-RJ: Guanabara Koogan, 2006.
87. Rutten S, Nolte PA, Korstjens CM, van Duin MA, Klein-Nulend J. Low-intensity pulsed ultrasound increases bone volume, osteoid thickness and mineral apposition rate in the area of fractures healing in patients with a delayed union of the osteotomized fibula. *Bone.* 43:348-354, 2008.

88. Sant'Anna EF, Leven RM, Viridi AS, Summer DR. Effect of low intensity pulsed ultrasound and BMP2 on rat bone marrow stromal cell gene expression. *J Orthop Res.* 23:646-652, 2005.
89. Santana LA. Tratamento de úlceras venosas por ultra-som de baixa intensidade: avaliação por análise de imagem e imunohistoquímica. Dissertação mestrado. USP, 2006.
90. Saracino S, Mozzati M, Martinasso G, Pol R, Canuto RA, Muzio G. Superpulsed laser irradiation increases osteoblast activity via modulation of bone morphogenetic factors. *Lasers Surg Med.* 41:298-304, 2009.
91. Schortinghuis J, Bronckers AL, Stegenga B, Raghoobar GM, de Bont LG. Ultrasound to stimulate early bone formation in a distraction gap: a double blind randomised clinical pilot trial in the edentulous mandible. *Arch Oral Biol.* 50:411-420, 2005.
92. Sena K, Leven RM, Mazhar K, Summer DR, Viridi AS. Early gene response to low-intensity pulsed ultrasound in rat osteoblastic cells. *Ultrasound Med Biol.* 31:703-708, 2005.
93. Song SL, Hutmacher D, Nurcombe V, Cool SM. Temporal expression of proteoglycans in the rat limb during bone healing. *Gene.* 379: 92-100, 2006.
94. Stein A, Benayahu D, Maltz R, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg.* 23:161-166, 2005.
95. Stein A, 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.* 120:112-117, 2008.
96. Stein GS, Lian JB, Stein JL, Van Wijnen AJ, Montecino M. Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiol Rev.* 76:593-629, 1996.
97. Stein GS, Lian JB, van Wijnen AJ, Stein JL, Montecino M, Javed A, Zaidi SK, Young DW, Choi JY, Pockwinse SM. Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. *Oncogene.* 23:4315-4329, 2004.

98. Sun JS, Tsuang YH, Lin FH, Liu HC, Tsai CZ, Chang WH. Bone defect healing enhanced by ultrasound stimulation: an in vitro tissue culture model. *J Biomed Mater Res.* 46:253-261, 1999.
99. Sun G, Tuner J. Low-level laser therapy in dentistry. *Dent. Clin. N. Am.* 48:1061-1076, 2004.
100. Suzuki A, Takayama T, Suzuki N, Kojima T, Ota N, Asano S, Ito K. Daily low-intensity pulsed ultrasound stimulates production of bone morphogenetic protein in ROS 17/2.8 cells. *J Oral Sci.* 51:29-36, 2009.
101. Takikawa S, Matsui N, Kokubu T, Tsunoda M, Fujioka H, Mizuno K, Azuma Y. Low-intensity pulsed ultrasound initiates bone healing in rat nonunion fracture model. *J Ultrasound Med.* 20: 197-205, 2001.
102. Vaes BL, Ducy P, Sijbers AM, Hendriks JM, van Someren EP, de Jong NG, van den Heuvel ER, Olijve W, van Zoelen EJ, Dechering KJ. Microarray analysis on Runx2-deficient mouse embryos reveals novel Runx2 functions and target genes during intramembranous and endochondral bone formation. *Bone.* 39:724-738, 2006 .
103. Vladimirov YA, Osipov AN, Klebanov GI. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Bochemistry.* 69:81-90, 2004.
104. Weber JBB, Pinheiro ALB, Oliveira MG, Oliveira FAM, Ramalho LMP. Laser therapy improves healing of bone defects submitted to autologus bone grafts. *Photomed Laser Surg.* 24:38-44, 2006.
105. Wijdicks CA, Viridi AS, Sena K, Sumner DR, Leven RM. Ultrasound enhances recombinant human BMP-2 induced ectopic bone formation in a rat model. *Ultrasound Med Biol.* 35:1629-1637, 2009.
106. Wohl GR, Towler DA, Silva MJ. 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.* 44:320-330, 2009.
107. Yamamoto M, Tamura K, Hiratsuka K, Abiko Y. Stimulation of MCM3 gene expression in osteoblast by low level laser irradiation. *Lasers Med Sci.* 16:213-217, 2001.

108. Yang RS, Lin WL, Chen YZ, Tang CH, Huang TH, Lu BY, Fu WM. Regulation by ultrasound treatment on the integrin expression and differentiation of osteoblasts. *Bone*. 36:276-283, 2005.
109. Yaoita 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*. 18:63-70, 2000.
110. Xu M, Deng T, Mo F, Deng B, Lam W, Deng P, Zhang X, Liu S. Low-intensity pulsed laser irradiation affects RANKL and OPG mRNA expression in rat calvarial cells. *Photomed Laser Surg*. 27:309-15, 2009.
111. Ziros PG, Basdra EK, Papavassiliou AG. Runx2: of bone and stretch. *Int J Biochem Cell Biol*. 40:1659-1663, 2008.
112. Zimmerman LB, De Jesús-Escobar JM, Harland RM. The spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell*. 86:599-606, 1996.

## ANEXOS

### ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA LASERS IN MEDICAL SCIENCE

Lasers Med Sci. 2010 Sep;25(5):727-32. Epub 2010 Jun 3.

#### **Comparative study of the effects of low- intensity pulsed ultrasound and low level laser therapy on bone healing in tibias of rats**

Elaine Fávaro-Pípi<sup>1</sup>, Suellen Maurin Feitosa<sup>2</sup>, Daniel Araki Ribeiro<sup>2</sup>, Paulo Bossini<sup>1</sup>, Poliani Oliveira<sup>1</sup>, Nivaldo A Parizotto<sup>1</sup>, Ana Claudia Muniz Renno<sup>2</sup>

1 Department of Physiotherapy, Federal University of São Carlos. Rodovia Washington Luís (SP-310), Km 235, São Carlos, SP – Brazil.

2 Department of Bioscience, Federal University of São Paulo. Av. Ana Costa, 95, Santos, SP – Brazil.

#### **ABSTRACT**

The aim of this study was to investigate and to compare the effects of ultra-sound and low level laser therapy during the process of fracture healing by means of histopathological and morphometric analysis. The animals were randomly distributed into three groups of 10 animals each: control group (bone defect without treatment); laser treated: (bone defect treated with laser) and US treated (bone defect treated with ultra-sound). Each group were divided into 3 different subgroups, sacrificed in 3 different periods (subgroup A: 7 days post-surgery; subgroup B: 13 days post-surgery and sub-group C: 25 days post-surgery). The results pointed out intense new bone formation surrounded by highly vascularized connective tissue presenting a slight osteogenic activity, with primary bone deposition was observed in the group exposed to laser after 13 or 25 days of therapy. This was confirmed by morphometric analysis, in wich significant statistically differnces ( $p < 0.05$ ) were noticed when compared to negative control. No remarkable differences were noticed to the specimens treated with ultra-sound with regard to the amount of newly formed bone. Taken together, our results indicate that laser therapy improves bone repair in rats as depicted by histopathological and morphometric analysis in a short-term assay.