



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

**EFEITOS DO *LASER* DE BAIXA INTENSIDADE E DO
BIOSILICATO® NO REPARO ÓSSEO DE
RATAS OSTEOPÊNICAS**

PAULO SÉRGIO BOSSINI

SÃO CARLOS – SP

2010

PAULO SÉRGIO BOSSINI

**EFEITOS DO *LASER* DE BAIXA INTENSIDADE E DO
BIOSILICATO[®] NO REPARO ÓSSEO DE
RATAS OSTEOPÊNICAS**

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

Orientador: Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto

SÃO CARLOS – SP

2010

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

B745eL

Bossini, Paulo Sérgio.

Efeitos do *laser* de baixa intensidade e do Biosilicato® no reparo ósseo de ratas osteopênicas / Paulo Sérgio Bossini. - São Carlos : UFSCar, 2010.

118 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Fisioterapia. 2. Laser de baixa intensidade. 3. Materiais bioativos. 4. Osteoporose. 5. Reparo ósseo. I. Título.

CDD: 615.82 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA PARA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE PAULO SÉRGIO BOSSINI, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 26 DE AGOSTO DE 2010.

BANCA EXAMINADORA:



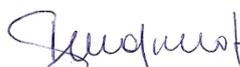
Nivaldo Antonio Parizotto
(UFSCar)



Daniela Cristina Carvalho de Abreu
(USP/RP)



Carlos Alberto Fortulan
(USP/SC)



Mariza Akemi Matsumoto
(USC)



Patrícia Driusso
(UFSCar)

A parte experimental desse trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Eletrotermofototerapia do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, sob orientação do Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto. Os créditos referentes às disciplinas foram obtidos junto ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos e Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia (Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos) da Universidade de São Paulo.

*Dedico este trabalho aos meus queridos
pais, Benta e Luiz Paulo, com muito
amor, orgulho e respeito.*

Por tudo que são!

Pela garra!

Pela fé na vida!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto, pessoa tão admirável em sua humildade e sabedoria, que tão prontamente abriu-me as portas da ciência, mostrando-se sempre disposto em contribuir para o meu engrandecimento tanto no aspecto profissional quanto pessoal. Obrigado pela confiança em mim depositada, pelos conhecimentos compartilhados e, sobretudo pela amizade construída durante esse período de convivência.

A você, minha eterna gratidão e eterno carinho.

À Profa. Dra. Ana Cláudia Muniz Rennó, pela amizade, companheirismo e incentivo constante ao crescimento profissional, acreditando sempre no meu trabalho. Muito obrigado pelas sugestões e contribuições ao longo de todas as etapas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Daniel Araki Ribeiro, pelas inúmeras contribuições e valiosas sugestões a este trabalho, por compartilhar seus conhecimentos e pelo exemplo de competência e profissionalismo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me guiado, protegido e me dado sabedoria para enfrentar todas as dificuldades encontradas nessa caminhada.

À minha namorada Elisângela, pela compreensão, companheirismo e, principalmente, por todo amor e felicidade que trouxe à minha vida.

À minha irmã Cláudia, minha grande amiga e fiel escudeira, pelo carinho e cumplicidade.

A toda minha família, por sempre me apoiar e torcer pelas minhas conquistas.

Aos professores: Profa. Dra. Mariza Akemi Matsumoto, Profa. Dra. Daniela Cristina Carvalho de Abreu, Profa. Dra. Patrícia Driusso, Prof. Dr. Carlos Alberto Fortulan, que se dispuseram participar da banca examinadora proporcionando suas contribuições científicas.

Ao pessoal do Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV) do Departamento de Engenharia de Materiais da UFSCar, por disponibilizar o biomaterial utilizado neste estudo.

Ao amigo Renan Fangel, pela ajuda prestada durante todo o período experimental.

Às alunas de iniciação científica do curso de Fisioterapia da UFSCar, Alessa Castro Ribeiro e Manoela Assis Lahoz, pela amizade e dedicação com o nosso trabalho.

À Profa. Dra. Keico Okino Nonaka por ter disponibilizado o aparelho para a realização do teste biomecânico.

À Profa. Dra. Patrícia Driusso, pela ajuda durante a realização da análise estatística.

À amiga Renata Neves Granito, pelo incentivo, apoio e sugestões na elaboração deste trabalho.

À amiga Luciana Di Thommazo, pelas sugestões na revisão do texto.

Ao amigo Fábio Mendes Camilo, pelo incentivo e pela amizade ao longo desses anos.

Ao amigo Hueliton Kido, pela amizade e companhia.

Aos amigos do Laboratório de Eletrotermofototerapia do Departamento de Fisioterapia da UFSCar, pelos momentos compartilhados.

À Kelly, secretária do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da UFSCar, pela presteza e auxílio em todos os momentos necessários.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

“A mais bela experiência que podemos ter é a do mistério. É a emoção fundamental existente na origem da verdadeira arte e ciência. Aquele que não a conhece e não pode se maravilhar com ela está praticamente morto e seus olhos estão ofuscados”.

(Albert Einstein)

RESUMO

A osteoporose é uma doença esquelética sistêmica caracterizada por baixa densidade óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, com conseqüente aumento do risco de fraturas. Fraturas de difícil consolidação são comumente encontradas em pacientes osteoporóticos com altos índices de morbidade e mortalidade. Dentro desse contexto, recursos biofísicos e bioquímicos têm sido estudados na tentativa de minimizar o tempo de consolidação óssea, destacando-se o uso da terapia *laser* de baixa intensidade (LLLT) e dos materiais bioativos. Vários estudos sugerem que ambos os recursos são capazes de estimular a proliferação de osteoblastos e a osteogênese no local da fratura, promovendo uma maior deposição de massa óssea, fundamental para o processo de consolidação. Diante disso, foram realizados dois estudos com o objetivo de verificar os efeitos da LLLT (Ga-Al-As, 830nm, 100mW), nas fluências de 60J/cm² e 120J/cm² e de uma vitrocerâmica bioativa (Biosilicato[®]), utilizados independentemente ou associados, na consolidação de defeitos ósseos induzidos em tíbias de ratas osteopênicas. Um total de 60 ratas da linhagem *Wistar* (12 semanas de idade, ± 250g) foram submetidas à ovariectomia (OVX) e, sessenta dias após a indução, foi realizado um defeito ósseo em ambas as tíbias de todos os animais, os quais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos com dez animais cada. No primeiro estudo, foram avaliados os efeitos da LLLT sobre o reparo ósseo de ratas osteopênicas, a partir de três grupos experimentais: grupo controle com defeito ósseo sem tratamento (GC); grupo defeito ósseo tratado com *laser* 60J/cm² (GL60) e grupo defeito ósseo tratado com *laser* 120J/cm² (GL120). Os animais foram submetidos à irradiação *laser* em um único ponto sobre o defeito ósseo por sete sessões, em dias alternados. Nos grupos tratados com *laser*, em ambas as fluências, foi evidenciada uma maior quantidade de osso neoformado comparado ao controle. A análise de birrefringência demonstrou que os defeitos ósseos irradiados apresentaram maior deposição e melhor organização estrutural das fibras colágenas, principalmente no grupo tratado com *laser* na fluência de 120J/cm². A imunorreatividade à COX-2, CBFA-1 e VEGF foi detectada de forma similar nas duas fluências utilizadas e na análise biomecânica não houve diferença estatística significativa entre os grupos. Portanto, a LLLT, nas duas fluências utilizadas, estimulou o reparo ósseo em tíbias de ratas osteopênicas. No segundo estudo, foram analisados os efeitos do Biosilicato[®] associado à LLLT no reparo ósseo de ratas osteopênicas, a partir de quatro grupos experimentais: grupo controle com defeito ósseo sem tratamento (GC); grupo defeito ósseo preenchido com Biosilicato[®] (GB); grupo defeito ósseo preenchido com Biosilicato[®] e irradiado com LLLT, com fluência de 60J/cm² (GBL60); e grupo defeito ósseo preenchido com Biosilicato[®] e irradiado com LLLT, com fluência de 120J/cm² (GBL120). O Biosilicato[®] foi utilizado na forma de partículas com granulometria de 180-212µm e os animais tratados com *laser* foram irradiados em um único ponto sobre o defeito ósseo por sete sessões, em dias alternados. Os resultados demonstraram que a LLLT, nas fluências de 60J/cm² e 120J/cm², estimulou a expressão de COX-2 nas células circunjacentes ao biomaterial, promoveu aumento na deposição de fibras colágenas e na resposta biomecânica. A análise morfométrica revelou que os animais com defeitos ósseos preenchidos com Biosilicato[®] e submetidos à irradiação *laser* com fluência de 120J/cm² apresentaram maior área de osso neoformado quando comparados aos animais dos demais grupos. Desse modo, a LLLT, principalmente na fluência de 120J/cm², associada à aplicação do Biosilicato[®], favoreceu o processo de reparo ósseo em defeitos induzidos em tíbias de ratas osteopênicas. Tais resultados são fundamentais na elucidação dos mecanismos biológicos envolvidos no reparo de fraturas de difícil consolidação, em especial àquelas associadas a processos patológicos osteometabólicos, como a osteoporose.

Palavras-chave: reparo ósseo, terapia *laser* de baixa intensidade, material bioativo, osteoporose, ovariectomia.

ABSTRACT

Osteoporosis is a systemic skeletal disease characterized by low bone density and microarchitectural deterioration of bone tissue, with consequent increase of the risk of fractures. Frequently, the lower mineral density due to osteoporosis leads to a delay in fracture healing rates and bone repair quality. Within this context, biochemical and biophysical resources have been studied in an attempt to enhance bone consolidation. Two of the most promising treatments are the use of low level laser therapy (LLLT) and bioactive materials. Several studies suggest that both resources are able to stimulate osteoblast proliferation and osteogenesis at the fracture site, promoting a greater deposition of bone mass. Thus, two studies were performed with the aim of evaluating the effects of LLLT (Ga-Al-As, 830nm, 100mW), with the fluences of 60J/cm² and 120J/cm² and a bioactive ceramic (Biosilicate[®]), used alone or associated on consolidation of bone defects induced in the tibiae of osteopenic rats. A total of 60 female *Wistar* rats (12 weeks-old, ± 250g) were submitted to ovariectomy (OVX) and, sixty days after the induction, a bone defect was performed in both tibiae of all animals. The animals were randomly divided into six groups (n=10). In the first study, the effects of LLLT on the bone repair of osteopenic rats were evaluated in three groups: group bone defect control without any treatment (GC); group bone defect irradiated with LLLT, at 60J/cm² (GL60); and group bone defect irradiated with LLLT, at 120J/cm² (GL120). The animals were submitted to laser irradiation at a single point on the bone defect for seven sessions, on alternated days. In the laser treated groups, at both fluences, it was possible to observe a greater amount of new bone formation compared to the control. Birefringence analysis demonstrated that irradiated bone defects presented greater deposition and improved the structural organization of collagen fibers, mainly in the group treated with the laser, at 120J/cm². COX-2, CBFA-1 and VEGF immunoreactivity was detected in a similar manner either 60J/cm² or 120J/cm² fluences. However, no differences were observed in the biomechanical analysis. Therefore, the LLLT, at the two fluences used, improved the bone repair in the tibia of osteopenic rats. In the second study, the effects of Biosilicate[®] associated with LLLT on bone repair in osteopenic rats were analyzed in four groups: group bone defect control without any treatment (GC); group bone defect filled with Biosilicate[®] (GB); group bone defect filled with Biosilicate[®], irradiated with LLLT, at 60J/cm² (GBL60); and group bone defect filled with Biosilicate[®], irradiated with LLLT, at 120J/cm² (GBL120). Biosilicate[®] was used in the form of particles with granulometry of 180-212µm and the treated animals were irradiated with laser at a single point on the bone defect for seven sessions, on alternated days. The results demonstrated that the LLLT, with fluences of 60J/cm² and 120J/cm² stimulated the expression of COX-2 in the circumjacent cells of the biomaterial, increased of the collagen deposition and the biomechanical bone properties. Morphometric analysis revealed that the animals with bone defects filled with Biosilicate[®] and irradiated with laser, at 120J/cm² showed a higher amount of newly formed bone compared to the other groups. Thus, the LLLT, mainly in fluency 120J/cm² in contact with Biosilicate[®] improved the bone repair process in osteopenic rats. These findings are fundamental in elucidating the biological mechanisms involved in the repair of fractures with difficult consolidation, especially those associated with bone metabolic disease processes, such as osteoporosis.

Key words: bone repair, low level laser therapy, bioactive material, osteoporosis, ovariectomy.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABNT	= Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA	= Análise de Variância
ATP	= Adenosina Trifosfato
°C	= Graus Celsius
Ca	= Cálcio
CBFA-1	= Fator de Transcrição de Diferenciação Osteoblástica
cm	= Centímetro
cm ²	= Centímetro Quadrado
cm/min	= Centímetro por Minuto
COX	= Ciclo-Oxigenase
COX-1	= Ciclo-Oxigenase-1
COX-2	= Ciclo-Oxigenase-2
C1	= Campo 1
C2	= Campo 2
C3	= Campo 3
DNA	= Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	= Ácido Etilenodiaminotetracético
g	= Grama
Ga-Al-As	= Arseneto de Gálio e Alumínio
GB	= Grupo Biosilicato [®]
GBL60	= Grupo Biosilicato [®] + <i>Laser</i> 60J/cm ²
GBL120	= Grupo Biosilicato [®] + <i>Laser</i> 120J/cm ²
GC	= Grupo Controle

GL60	= Grupo <i>Laser</i> 60J/cm ²
GL120	= Grupo <i>Laser</i> 120J/cm ²
HA	= Hidroxiapatita
HCA	= Hidroxicarbonoapatita
HE	= Hematoxilina – Eosina
He-Ne	= Hélio-Neônio
Hz	= Hertz
IgG	= Imunoglobulina G
J	= Joule
J/cm ²	= Joule por Centímetro Quadrado
KN	= Quilo Newton
LaMaV	= Laboratório de Materiais Vítreatos
<i>Laser</i>	= Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação
LLLT	= Terapia <i>Laser</i> de Baixa Intensidade
M	= Mol
mg/kg	= Miligrama por Quilograma de Massa Corporal
mm	= Milímetro
mW	= MiliWatts
mW/cm ²	= MiliWatts por centímetro quadrado
N	= Newton
Na	= Sódio
nm	= Nanômetro
O	= Oxigênio
OMS	= Organização Mundial de Saúde
OVX	= Ovariectomia

P	= Fósforo
PBS	= Solução de Tampão Fosfato
pH	= Potencial Hidrogeniônico
$\text{Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2$	= Composto do Biosilicato [®]
RNA	= Ácido Ribonucléico
rpm	= Rotação por Minuto
Si	= Silício
TM	= Tricrômico de Masson
UFSCar	= Universidade Federal de São Carlos
USP	= Universidade de São Paulo
VEGF	= Fator de Crescimento Endotelial Vascular
W	= Watts
W/cm^2	= Watts por Centímetro Quadrado
\leq	= Menor ou Igual
λ	= Comprimento de Onda
μm	= Micrômetro
μm^2	= Micrômetro Quadrado
%	= Porcentagem

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Procedimentos da ovariectomia: (A) tricotomia digital; (B) incisão cutânea; (C) incisão abdominal para retirada dos ovários; (D) sutura da região operada..... 31
- Figura 2.** Procedimentos para a realização do defeito ósseo: (A) tricotomia digital; (B) incisão na região tibial; (C) padronização do local do defeito ósseo com a utilização de um paquímetro; (D) realização do defeito ósseo com broca de 2mm de diâmetro; (E) defeito ósseo; (F) sutura da região operada..... 33
- Figura 3.** Tratamento com o Biosilicato[®]: (A) Biosilicato[®] (granulometria de 180-212 μ m); (B) aplicação do Biosilicato[®] 35
- Figura 4.** Tratamento com o *laser* de baixa intensidade: (A) equipamento emissor da radiação *laser*; (B) irradiação sobre o defeito ósseo..... 36
- Figura 5.** Morfometria da área de osso neoformado: (A) desenho ilustrativo da padronização dos campos selecionados na análise morfométrica; (B) fotomicrografia representativa do campo 2 (C2) de um defeito ósseo do grupo tratado com *laser* 60J/cm². A cor azul indica a área de osso neoformado. Coloração: TM. (Aumento de 10X)..... 38
- Figura 6.** Análise biomecânica: (A) máquina de ensaio universal Instron, modelo 4444; (B) posicionamento da tibia durante o teste de flexão, com a região do defeito ósseo voltado para baixo, na linha de ação da carga a ser aplicada..... 41

Figura 7. Fotomicrografias dos achados morfológicos dos diferentes grupos experimentais. Em (A) defeito ósseo do grupo controle, exibindo tecido ósseo neoformado (seta) e tecido medular (M). Em (B) e (C), grupo <i>laser</i> 60J/cm ² e grupo <i>laser</i> 120J/cm ² , respectivamente, nota-se a intensa presença de tecido ósseo neoformado (seta). (Coloração: H.E., Barra = 40µm).....	54
Figura 8. Médias e desvios-padrão da área de osso neoformado. GC: grupo controle; GL60: grupo tratado com <i>laser</i> com fluência de 60J/cm ² ; GL120: grupo tratado com <i>laser</i> com fluência de 120J/cm ² . * p≤0,05 versus GC.....	55
Figura 9. Fotomicrografias de defeitos ósseos, corados com <i>Picrosirius-red</i> . No grupo controle (A) o brilho de birrefringência é moderado e as fibras colágenas localizam-se circunjacentes à lesão. No grupo irradiado com <i>laser</i> 60J/cm ² (B) há um brilho mais intenso e difuso pelo sítio de lesão. No grupo irradiado com <i>laser</i> 120J/cm ² (C) percebe-se um incremento no brilho e na espessura das fibras. (Aumento de 50X).....	56
Figura 10. Médias e desvios-padrão de birrefringência das fibras colágenas. GC: grupo controle; GL60: grupo tratado com <i>laser</i> com fluência de 60J/cm ² ; GL120: grupo tratado com <i>laser</i> com fluência de 120J/cm ² . * p≤0,05 versus GC; # p≤0,05 versus GL60.....	57
Figura 11. Fotomicrografias representativas da imunoexpressão da COX-2 (setas): (A) grupo controle; (B) grupo tratado com <i>laser</i> com fluência de 60J/cm ² e (C) grupo tratado com <i>laser</i> com fluência de 120J/cm ² . (Coloração: Imunohistoquímica, Barra = 40µm).....	58

Figura 12. Fotomicrografias representativas da imunopressão de CBFA-1 (setas): (A) grupo controle; (B) grupo tratado com *laser* com fluência de 60J/cm² e (C) grupo tratado com *laser* com fluência de 120J/cm². (Coloração: Imunohistoquímica, Barra = 40µm)..... 59

Figura 13. Fotomicrografias representativas da imunopressão de VEGF (setas): (A) grupo controle; (B) grupo tratado com *laser* com fluência de 60J/cm² e (C) grupo tratado com *laser* com fluência de 120J/cm². (Coloração: Imunohistoquímica, Barra = 40µm)..... 60

Figura 14. Médias e desvios-padrão da carga máxima nos diferentes grupos experimentais. GC: grupo controle; GL60: grupo tratado com *laser* com fluência de 60J/cm²; GL120: grupo tratado com *laser* com fluência de 120J/cm²..... 61

Figura 15. Fotomicrografias dos achados morfológicos dos diferentes grupos experimentais. Em (A), defeito ósseo do grupo controle, com presença de tecido ósseo neoformado (*) e tecido medular (M). Em (B), grupo tratado com Biosilicato[®], notam-se as partículas do biomaterial (#) e tecido de granulação (seta). Em (C), grupo Biosilicato[®] + *laser* 60J/cm² e (D) grupo Biosilicato[®] + *laser* 120J/cm², observam-se a presença de biomaterial (#), tecido ósseo neoformado (*) e tecido de granulação (seta). (Coloração: H.E., Barra = 40µm)..... 82

Figura 16. Fotomicrografias representativas da imunopressão da COX-2 (setas): (A) grupo controle; (B) grupo tratado com Biosilicato[®]; (C) grupo tratado com Biosilicato[®] + *laser* 60J/cm² e (D) grupo tratado com Biosilicato[®] + *laser* 120J/cm². (Coloração: Imunohistoquímica, Barra = 30µm)..... 83

Figura 17. Fotomicrografias representativas da imunopressão de CBFA-1 (setas): (A) grupo controle; (B) grupo tratado com Biosilicato[®]; (C) grupo tratado com Biosilicato[®] + *laser* 60J/cm² e (D) grupo tratado com Biosilicato[®] + *laser* 120J/cm². (Coloração: Imunohistoquímica, Barra = 30µm)..... 84

Figura 18. Fotomicrografias representativas da imunopressão de VEGF (setas): (A) grupo controle; (B) grupo tratado com Biosilicato[®] e (C) grupo tratado com Biosilicato[®] + *laser* 120J/cm². (Coloração: Imunohistoquímica, Barra = 56µm)..... 85

Figura 19. Médias e desvios-padrão da área de osso neoformado nos diferentes grupos experimentais. GC: grupo controle; GB: grupo tratado com Biosilicato[®]; GBL60: grupo tratado com Biosilicato[®] + *laser* 60J/cm² e GBL120: grupo tratado com Biosilicato[®] + *laser* 120J/cm². * p≤0,05 versus GB; # p≤0,05 versus GBL120..... 86

Figura 20. Médias e desvios-padrão de birrefringência das fibras colágenas nos diferentes grupos experimentais. GC: grupo controle; GB: grupo tratado com Biosilicato[®]; GBL60: grupo tratado com Biosilicato[®] + *laser* 60J/cm² e GBL120: grupo tratado com Biosilicato[®] + *laser* 120J/cm². * p≤0,05 versus GC; # p≤0,05 versus GB; @ p≤0,05 versus GBL60..... 87

Figura 21. Médias e desvios-padrão da carga máxima nos diferentes grupos experimentais. GC: grupo controle; GB: grupo tratado com Biosilicato[®]; GBL60: grupo tratado com Biosilicato[®] + *laser* 60J/cm² e GBL120: grupo tratado com Biosilicato[®] + *laser* 120J/cm². * p≤0,05 versus GBL120..... 88

APRESENTAÇÃO DA TESE

Essa tese foi estruturada na forma de artigos, sendo dividida em três partes e redigida de acordo com as normas metodológicas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

A primeira parte é constituída de uma contextualização, objetivo e detalhamento da metodologia empregada.

A segunda parte compreende dois artigos que possuem como fundamentação a primeira parte acima descrita. O primeiro trabalho aborda os efeitos da terapia *laser* de baixa intensidade no reparo ósseo de ratas osteopênicas, denominado: “Terapia *laser* de baixa intensidade modula o reparo ósseo em ratas osteopênicas: similaridades a partir de duas fluências”, submetido ao periódico “*Experimental Gerontology*” em abril de 2010. O segundo artigo aborda os aspectos relacionados à associação de um biomaterial (Biosilicato[®]) com a terapia *laser* no reparo ósseo de ratas osteopênicas, intitulado: “Biosilicato[®] associado à terapia *laser* de baixa intensidade otimiza o reparo ósseo em ratas osteopênicas”, aceito para publicação no “*Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*” em abril de 2010. Vale ressaltar que cada um dos artigos estão apresentados seguindo as normas de publicação dos referidos periódicos.

A terceira parte é composta das considerações finais e perspectivas futuras, referências bibliográficas utilizadas e anexos.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

APRESENTAÇÃO DA TESE

PARTE I	22
1. CONTEXTUALIZAÇÃO	23
2. OBJETIVO	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Animais de Experimentação	30
3.2 Técnica Operatória	30
3.2.1 Ovariectomia	30
3.2.2 Defeito Ósseo	32
3.3 Delineamento Experimental	33
3.4 Tratamento	34
3.4.1 Biomaterial	34
3.4.2 Terapia <i>Laser</i> de Baixa Intensidade	35
3.5 Eutanásia dos Animais	36
3.6 Coleta das Amostras	36
3.7 Análises	37
3.7.1 Análise Histopatológica	37
3.7.2 Morfometria	37
3.7.3 Birrefringência	38
3.7.4 Imunohistoquímica	39
3.7.5 Análise Biomecânica	40
3.8 Análise Estatística	41
PARTE II	43
4. ESTUDO I	44

4.1	Resumo.....	44
4.2	Introdução.....	45
4.3	Materiais e Métodos.....	47
4.3.1	Análise Histopatológica.....	48
4.3.2	Morfometria.....	49
4.3.3	Birrefringência.....	49
4.3.4	Imunohistoquímica.....	50
4.3.5	Análise Biomecânica.....	51
4.3.6	Análise Estatística.....	52
4.4	Resultados.....	52
4.4.1	Análise Histopatológica.....	53
4.4.2	Morfometria.....	54
4.4.3	Birrefringência.....	55
4.4.4	Imunohistoquímica.....	57
4.4.5	Análise Biomecânica.....	60
4.5	Discussão.....	61
4.6	Referências.....	66
5.	ESTUDO II.....	71
5.1	Resumo.....	71
5.2	Introdução.....	72
5.3	Materiais e Métodos.....	74
5.3.1	Biomaterial.....	76
5.3.2	Terapia <i>Laser</i> de Baixa Intensidade.....	76
5.3.3	Análise Histopatológica.....	77
5.3.4	Imunohistoquímica.....	77
5.3.5	Morfometria.....	78
5.3.6	Birrefringência.....	79
5.3.7	Análise Biomecânica.....	80
5.3.8	Análise Estatística.....	80
5.4	Resultados.....	81
5.4.1	Achados Gerais.....	81
5.4.2	Análise Histopatológica.....	81

5.4.3 Imunohistoquímica.....	83
5.4.4 Morfometria.....	86
5.4.5 Birrefringência.....	87
5.4.6 Análise Biomecânica.....	88
5.5 Discussão.....	89
5.6 Conclusão.....	95
5.7 Referências.....	95
<u>PARTE III</u>	102
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	103
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104
ANEXOS	
ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal.....	113
ANEXO B - Submissão do Estudo I.....	115
ANEXO C - Publicação do Estudo II.....	117

PARTE I

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

2. OBJETIVO

3. MATERIAIS E MÉTODOS

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define a osteoporose como uma doença esquelética sistêmica caracterizada por diminuição da massa óssea e deterioração microarquitetural do tecido ósseo, com conseqüente aumento de sua fragilidade (MORRI; GENANT, 1997; PINTO NETO *et al.*, 2002). Estima-se que 200 milhões de pessoas em todo o mundo sejam atingidas pela doença, que afeta não somente os idosos, mas também as mulheres de meia-idade (AMADEI *et al.*, 2006).

Particularmente, a osteoporose após a menopausa é considerada um problema de extrema relevância para a área da saúde, pois constitui uma das doenças metabólicas ósseas mais comuns em nosso meio (DENNISON; COLE; COOPER, 2005; JAVAID; HOLT, 2008). O fator determinante e responsável por sua gênese é a diminuição do estrógeno após a menopausa, sendo que a perda óssea é mais intensa nos primeiros cinco anos que se seguem à interrupção fisiológica dos ciclos menstruais. Por isso, essa doença é mais frequente em mulheres, que chegam a perder cerca de 40% a 50% da massa óssea até o final da vida (SORNAY-RENDU *et al.*, 2005; BLIUC *et al.*, 2009).

As principais manifestações clínicas da osteoporose são as fraturas, principalmente as de vértebras, antebraço e fêmur (PINTO NETO *et al.*, 2002; JOHNEEL; KANIS, 2005). Essas têm grande importância na sociedade brasileira considerando o aumento da expectativa de vida da população, com graves conseqüências físicas, financeiras e psicossociais, afetando o indivíduo, a família e a comunidade. No Brasil, a cada ano, 70 mil pessoas fraturam o colo do fêmur, sendo que pelo menos 20% morrem devido a complicações nos primeiros seis meses e metade desse total desenvolve estado de dependência ou mesmo incapacidade física (AMADEI *et al.*, 2006).

O reparo ósseo é um processo regenerativo 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 determinarão a restauração da integridade do tecido (CLAES; WILLIE, 2007). No entanto, no decorrer desse processo, podem ocorrer alterações que culminarão na deficiência da regeneração e, conseqüentemente, no atraso da consolidação e mesmo, na não união óssea. Nos Estados Unidos, das 6,2 milhões de fraturas que ocorrem anualmente, cerca de 10% evoluem para a não consolidação e para a pseudoartrose (SENA *et al.*, 2005). Além disso, aproximadamente 100 mil cirurgias necessitam ser realizadas para a colocação de implantes ósseos, devido a problemas na regeneração do tecido ósseo (POLINDER *et al.*, 2005).

Dentro desse contexto, vários avanços biofísicos e bioquímicos têm sido estudados na tentativa de minimizar o tempo de reparo ósseo, bem como, diminuir a chance de desenvolvimento de possíveis complicações advindas do processo anormal de reparação (HADJIARGYROU *et al.*, 1998). Alguns desses recursos vêm apresentando resultados positivos na aceleração da consolidação de fraturas e também como substitutos eficazes do tecido ósseo. Dentre esses, podem ser citados os efeitos de tratamentos como a aplicação de proteínas ósseas morfogenéticas (YAOITA *et al.*, 2000), o ultrassom de baixa intensidade (RUTTEN *et al.*, 2007) e o uso de campos eletromagnéticos (PICKERING; SCAMMELL, 2002). Todavia, vêm se destacando mais recentemente as propriedades osteogênicas da terapia *laser* de baixa intensidade (LLLT) (PRETEL; LIZARELLI; RAMALHO, 2007; RENNÓ *et al.*, 2007; BLAYA *et al.*, 2008; ABOELSAAD *et al.*, 2009) e dos materiais bioativos (HENCH; POLAK, 2002; MOURA *et al.*, 2007; GRANITO *et al.*, 2009).

A LLLT tem sido utilizada, desde 1960, com fins terapêuticos, como um tratamento seguro e efetivo para uma série de condições patológicas nos mais diversos tecidos. Dentre os

principais efeitos da LLLT nos tecidos podemos citar seus efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e cicatrizantes (KARU, 1998; VLADIMIROV; OSIPOV; KLEBANOV, 2004).

O uso potencial dos *lasers* na biomodulação do reparo ósseo, por meio de suas propriedades fotoquímicas e fotobiológicas, tem sido estudado por pesquisadores em todo o mundo e seus efeitos na estimulação da osteogênese e na redução do tempo de consolidação óssea vêm sendo evidenciados (NICOLAU *et al.*, 2003; DA SILVA; CAMILLI, 2006; MATSUMOTO *et al.*, 2009). Em estudos com culturas de osteoblastos, o *laser* foi capaz de promover a proliferação celular, principalmente, pelo aumento na síntese de DNA (STEIN *et al.*, 2005, RENNÓ *et al.*, 2007). Além disso, Hamajima *et al.* (2003) observaram que o *laser* com comprimento de onda de 830nm promoveu um aumento significativo da expressão do gene osteoglicina em um estudo *in vitro* com culturas de osteoblastos.

Em estudos de fraturas com modelos animais, a LLLT promove uma série de modificações metabólicas e estruturais no local da fratura, como por exemplo, estimula a angiogênese, a maior formação de tecido de granulação, a estimulação de fibroblastos, a maior deposição de colágeno, o aumento na síntese de ATP e a estimulação de células ósseas (GARAVELLO-FREITAS *et al.*, 2003; LIRANI-GALVÃO; JORGETTI; da SILVA, 2006; LIU *et al.*, 2007; BLAYA *et al.*, 2008; KAZEM SHAKOURI *et al.*, 2010). Essas modificações são responsáveis pelo aumento da osteogênese bem como pela aceleração no processo de reparo ósseo (NINOMIYA *et al.*, 2003). Luger *et al.* (1998), utilizando o *laser* de hélio-neônio (He-Ne) (632,8nm, 35mW, 297J/cm²), e Pinheiro *et al.* (2001) utilizando o *laser* de arseneto de gálio e alumínio (Ga-Al-As) (830nm, 40mW, 57,6J/cm²), observaram a aceleração do processo de consolidação óssea em animais.

No Brasil, alguns grupos de pesquisa têm investigado a aplicação do *laser* terapêutico sob diferentes prismas. Em 2003, Marino e Parizotto, ao comparar os efeitos de duas fluências diferentes de *laser* (5 e 50J/cm²), observaram que esse recurso foi eficaz em aumentar a força

mecânica do calo ósseo, principalmente na maior fluência (MARINO, 2003). Em outro trabalho que investigou os efeitos da LLLT no tecido ósseo osteopênico, Rennó *et al.* (2006) observaram que a LLLT foi capaz de promover o aumento da força biomecânica de fêmures de ratas osteopênicas. Seguindo essa mesma linha, os mesmos autores avaliaram os efeitos do *laser* terapêutico em culturas de osteoblastos *in vitro*. Esse trabalho demonstrou que o *laser* com comprimento de onda de 830nm aumentou significativamente a proliferação dos osteoblastos e a atividade da fosfatase alcalina (RENNÓ *et al.*, 2007).

No entanto, as modificações moleculares e metabólicas globais produzidas pela LLLT que determinam a estimulação do metabolismo das células ósseas e aceleram o processo de consolidação após uma fratura ainda não estão completamente elucidadas.

O material bioativo é definido como um material capaz de produzir uma resposta biológica específica e uma interface entre o material e o tecido, formando uma ligação entre esses, sem induzir toxicidade ou promover respostas imunológicas (HENCH; POLAK, 2002; MOURA *et al.*, 2007).

Atualmente, um biomaterial que tem sido muito estudado é o vidro bioativo, composto por $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2$, o qual em contato com tecidos vivos reage e desenvolve uma camada de hidroxicarbonoapatita (HCA) em sua superfície, promovendo uma ligação química extremamente forte entre o tecido e o implante. Essa camada interfacial assemelha-se aos processos naturais de reconstrução dos tecidos e é química e estruturalmente equivalente à fase mineral do osso. Devido a essas propriedades, os vidros bioativos são utilizados há cerca de 30 anos na forma de implantes em cirurgias crânio-maxilo-faciais e ortopédicas (HENCH; POLAK, 2002).

Apesar dos seus efeitos benéficos para a formação óssea, o uso dos vidros bioativos tem sido limitado devido às baixas propriedades mecânicas destes materiais (JAMES, 1995). Esta constatação estimulou Hench, então pesquisador da *University of Florida*, e os

pesquisadores Zanotto e Peitl do Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), a buscarem uma vitrocerâmica que conservasse o elevado nível de bioatividade apresentado pelos vidros bioativos e, ao mesmo tempo, apresentasse propriedades mecânicas superiores. Assim, esses pesquisadores obtiveram, na década de 90, uma vitrocerâmica altamente bioativa e com elevadas propriedades mecânicas, denominada Biosilicato[®] (ZANOTTO *et al.*, 2004).

Como na maioria dos vidros bioativos, a composição química do Biosilicato[®] apresenta os elementos químicos silício, oxigênio, sódio, cálcio e fósforo (Si, O, Na, Ca e P), sendo liberados em solução na forma de Si(OH)_4 , Na^+ , Ca^{2+} e PO_4^{2-} . Eles são liberados em pequenas quantidades no processo de dissolução e formação da camada de HCA na superfície do Biosilicato[®], que possibilita o estabelecimento de uma ligação química extremamente forte com o tecido ósseo e semelhante química e estruturalmente à fase mineral do osso, assim como ocorre com os vidros bioativos (RAVAGNANI, 2003).

Em estudo *in vitro*, Moura *et al.* (2007) demonstraram que o Biosilicato[®] possui um potencial remineralizador sendo capaz de induzir a diferenciação e a proliferação de osteoblastos, podendo com isso acelerar o processo de consolidação de fraturas. Estes autores observaram que o Biosilicato[®] teve um efeito superior ao *Bioglass 45S5*[®] (que atualmente é considerado o material com maior índice de bioatividade do mercado) na proliferação de células osteoblásticas, bem como na síntese de proteínas ligadas à maturação celular e deposição de matriz óssea.

A partir dessas observações, surgiu a hipótese de que o Biosilicato[®] seria eficaz na aceleração do processo de consolidação de fraturas e poderia servir como um substituto para o tecido ósseo. Com isso, em 2005, nosso grupo de pesquisa iniciou um estudo *in vivo*, investigando os efeitos do Biosilicato[®], utilizado em duas granulometrias (180-212 μm e 300-355 μm), na consolidação de defeitos ósseos induzidos em tíbias de ratos. Foi observado que

20 dias após a lesão, os defeitos ósseos preenchidos com partículas de Biosilicato[®] na granulometria de 180-212µm apresentavam propriedades mecânicas similares a de ossos não fraturados. Quando comparados a defeitos preenchidos com partículas de *Bioglass* 45S5[®], as lesões ósseas com Biosilicato[®] apresentaram melhor reorganização tecidual, com maior volume ósseo e maior número de osteoblastos (GRANITO *et al.*, 2009).

Diante do exposto, nota-se que tanto os biomateriais como a LLLT vêm surgindo como alternativas promissoras no processo de reparo ósseo, devido à capacidade desses recursos em estimular a osteogênese. Um ponto importante a ser ressaltado na utilização do Biosilicato[®] como um substituto ósseo é que trata-se de um produto desenvolvido e produzido no Brasil, o que determina um custo reduzido em comparação a outros biovidros e biocerâmicas importados. De forma similar, a LLLT, que também demonstra grande potencial osteogênico e pode constituir um excelente coadjuvante no tratamento de fraturas, uma vez que é um método não invasivo e também apresenta custos relativamente baixos.

Contudo, existe uma grande lacuna na literatura em estudos que avaliem a eficácia da associação da LLLT e de materiais bioativos no tecido ósseo, especialmente no tecido osteopênico. Além disso, existem divergências em relação aos melhores parâmetros da LLLT para acelerar o processo de consolidação óssea, principalmente em relação à escolha da fluência a ser utilizada no tratamento. Dessa forma, esse estudo foi realizado com o intuito de analisar os efeitos da terapia *laser* sobre o tecido ósseo osteopênico, bem como entender a interação deste recurso com um material bioativo (Biosilicato[®]), para assim, propor tratamentos mais eficazes e confiáveis.

2. OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo verificar os efeitos do *laser* de baixa intensidade ($\lambda = 830\text{nm}$), com fluências de $60\text{J}/\text{cm}^2$ e $120\text{J}/\text{cm}^2$ e de um biomaterial (Biosilicato[®]), utilizados independentemente ou associados, na consolidação de defeitos ósseos induzidos em tíbias de ratas osteopênicas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais de Experimentação

Para a realização desse estudo foram utilizadas 60 ratas (*Rattus norvegicus: var. albinus, Rodentia, Mammalia*), da linhagem *Wistar*, fêmeas, com três meses de idade e massa corporal média de 250 gramas.

Os animais procedentes do Biotério Central da UFSCar foram mantidos no Biotério do Departamento de Fisioterapia da mesma instituição, durante todo o procedimento experimental. Permaneceram individualmente em gaiolas apropriadas de polietileno padrão, em condições ambientais controladas (ciclo claro/escuro de 12/12 horas, ambiente higienizado, temperatura de 19° a 23°C e ventilação adequada), recebendo ração própria (Primor Rações) e água à vontade.

Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Eletrotermofototerapia da UFSCar, sob responsabilidade do Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto. Esse estudo foi conduzido de acordo com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFSCar (Parecer 025/2006) (ANEXO A).

3.2 Técnica Operatória

3.2.1 Ovariectomia

As ratas foram pesadas e, em seguida, anestesiadas proporcionalmente à massa corporal com uma associação de Ketamina/Xilazina (80/10mg/Kg), injetada por via

intraperitoneal, utilizando-se uma seringa de insulina. Após a indução anestésica, a região abdominal foi tricotomizada digitalmente e foram realizadas incisões translobares bilaterais, o que possibilitou a localização e retirada dos ovários, de acordo com o método proposto por Kalu (1991). Ao final do procedimento, foram realizadas suturas internas com fio cirúrgico reabsorvível 3-0 (Shalon[®], Catgut Cromado) e suturas externas com fio de náilon monofilamentar 4-0 (Shalon[®]) (Figura 1). Depois disso, todos os animais foram acondicionados no biotério do Departamento de Fisioterapia (UFSCar) por um período de 60 dias, com o propósito de indução da osteopenia (KALU, 1991; RENNO *et al.*, 2006).

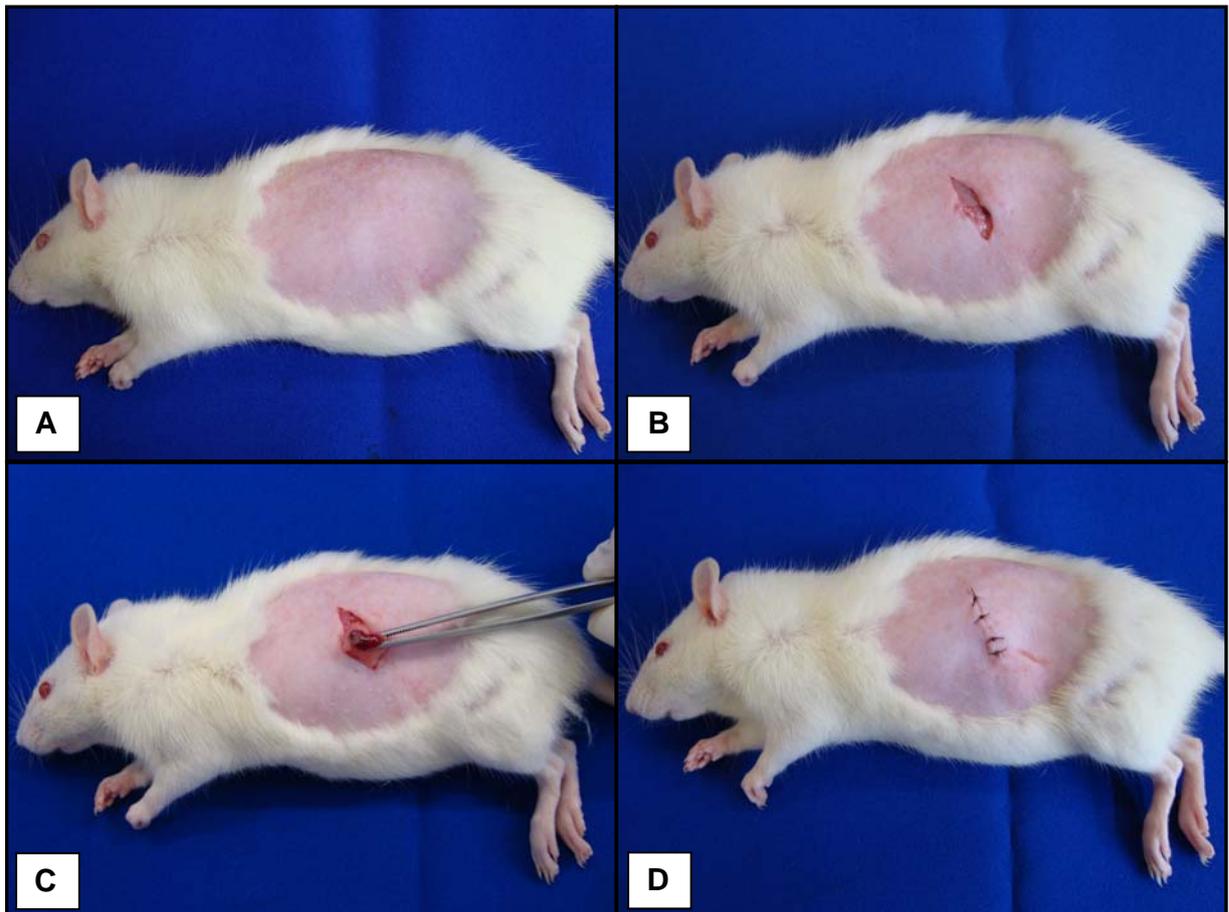


Figura 1. Procedimentos da ovariectomia: (A) tricotomia digital; (B) incisão cutânea; (C) incisão abdominal para retirada dos ovários; (D) sutura da região operada.

3.2.2 Defeito Ósseo

No 61º dia após a ovariectomia, foi realizado um defeito ósseo em ambas as tíbias de todos os animais. Para a realização dessas lesões foi utilizada uma mini-furadeira, da marca Toda Luz[®], acionada por um minidril com rotação de 12.000rpm, com uma broca helicoidal (Loyal[®]) de 2mm de diâmetro, irrigada constantemente com soro fisiológico para evitar queimaduras do tecido ósseo. O procedimento foi feito sob anestesia de Ketamina/Xilazina (80/10mg/Kg).

Após anestesia, tricotomia e assepsia da área a ser operada, os defeitos ósseos foram realizados 10mm abaixo da articulação do joelho, por meio de uma incisão no terço proximal da tíbia. O local do defeito foi previamente padronizado com a utilização de um paquímetro. A lesão foi realizada com a broca mantida na posição vertical 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. Em seguida, a musculatura e a pele foram suturadas com fio de náilon monofilamentar 4-0 (Shalon[®]) com distância de 1cm entre os pontos (Figura 2). Os animais foram mantidos em caixas individuais com livre acesso a água e ração até o momento da eutanásia (GRANITO *et al.*, 2009).

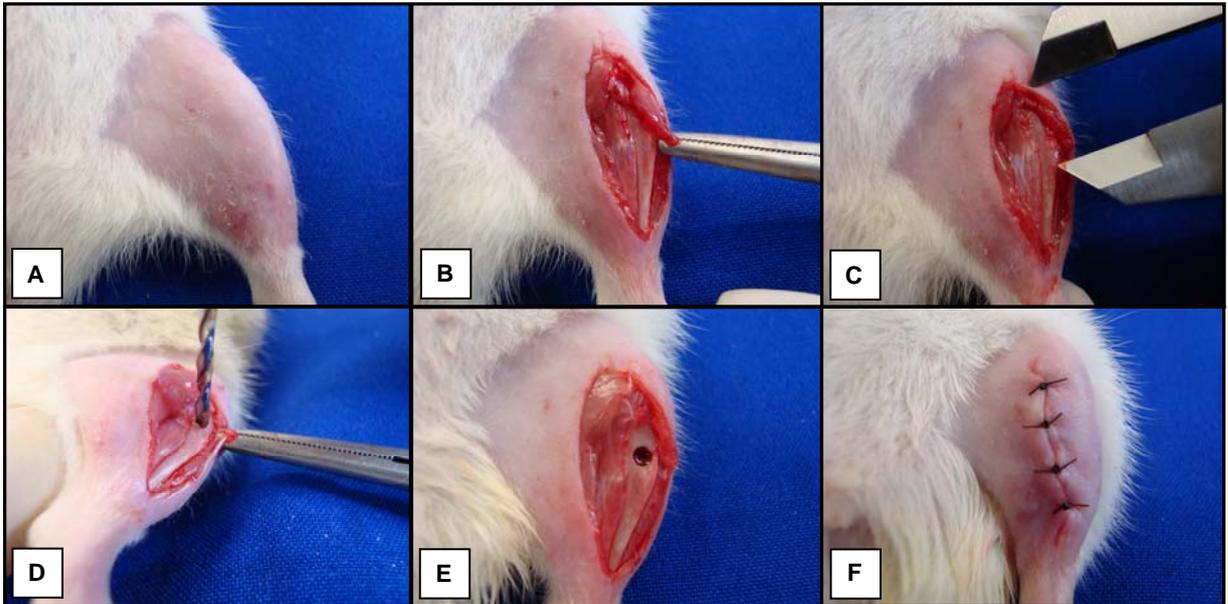


Figura 2. Procedimentos para a realização do defeito ósseo: (A) tricotomia digital; (B) incisão na região tibial; (C) padronização do local do defeito ósseo com a utilização de um paquímetro; (D) realização do defeito ósseo com broca de 2mm de diâmetro; (E) defeito ósseo; (F) sutura da região operada.

3.3 Delineamento Experimental

As 60 ratas utilizadas neste estudo foram distribuídas, aleatoriamente, em seis grupos (com dez animais cada):

Grupo controle (GC): os animais desse grupo foram submetidos à realização do defeito ósseo e não receberam nenhum tratamento.

Grupo *laser* 60J/cm² (GL60): os animais desse grupo foram submetidos à realização do defeito ósseo e foram tratados com *laser* ($\lambda = 830\text{nm}$), com fluência de 60J/cm², por 17 segundos, fornecendo 1,7J de energia.

Grupo *laser* 120J/cm² (GL120): os animais desse grupo foram submetidos à realização do defeito ósseo e foram tratados com *laser* ($\lambda = 830\text{nm}$), com fluência de 120J/cm², por 34 segundos, fornecendo 3,4J de energia.

Grupo Biosilicato[®] (GB): os animais desse grupo foram submetidos à realização do defeito ósseo e o mesmo foi preenchido com Biosilicato[®].

Grupo Biosilicato[®] e *laser* 60J/cm² (GBL60): os animais desse grupo foram submetidos à realização do defeito ósseo e o mesmo foi preenchido com Biosilicato[®]. Além disso, esses animais foram tratados com *laser* ($\lambda = 830\text{nm}$), com fluência de 60J/cm², por 17 segundos, fornecendo 1,7J de energia.

Grupo Biosilicato[®] e *laser* 120J/cm² (GBL120): os animais desse grupo foram submetidos à realização do defeito ósseo e o mesmo foi preenchido com Biosilicato[®]. Além disso, esses animais foram tratados com *laser* ($\lambda = 830\text{nm}$), com fluência de 120J/cm², por 34 segundos, fornecendo 3,4J de energia.

3.4 Tratamento

3.4.1 Biomaterial

O material bioativo utilizado nesse estudo foi o Biosilicato[®]. O Biosilicato[®] foi desenvolvido pelos pesquisadores do Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV) da UFSCar, com objetivo de produzir uma vitrocerâmica que conservasse o elevado nível de bioatividade que é apresentado pelos vidros bioativos, e que, ao mesmo tempo, apresentasse melhores propriedades mecânicas. Com este intuito, desenvolveram um material composto por um sistema quaternário de Na₂O-CaO-P₂O₅-SiO₂, completamente cristalizado por um tratamento térmico específico. Os detalhes da composição e do tratamento térmico estão descritos na patente WO 2004/074199 (ZANOTTO *et al.*, 2004).

O Biosilicato[®] foi utilizado na forma de partículas com granulometria de 180-212 μ m (GRANITO *et al.*, 2009) e foi aplicado por meio de uma espátula até o preenchimento completo do defeito ósseo, logo após a realização do mesmo (Figura 3).

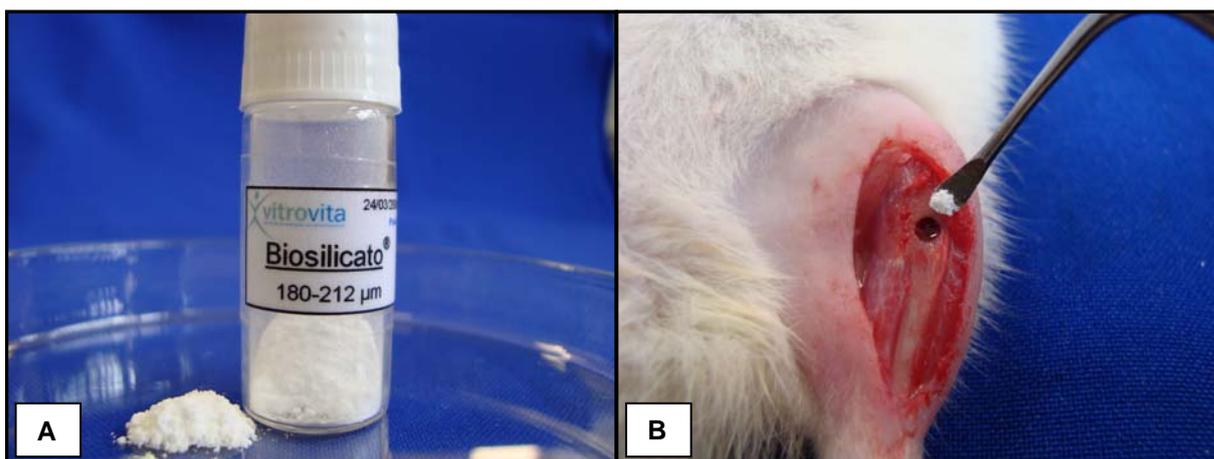


Figura 3. Tratamento com o Biosilicato[®]: (A) Biosilicato[®] (granulometria de 180-212 μ m); (B) aplicação do Biosilicato[®].

3.4.2 Terapia *Laser* de Baixa Intensidade

O equipamento emissor da radiação *laser* utilizado foi um modelo portátil Thera lase[®] (DMC São Carlos, SP, Brasil), versão 24, classe 3B, diodo com meio ativo composto por arseneto de gálio e alumínio (Ga-Al-As), comprimento de onda de 830nm, emissão contínua, potência de saída de 100mW, densidade de potência de 3,57W/cm² e área do feixe de 0,028cm².

Inicialmente o equipamento foi calibrado e após o procedimento experimental foi novamente aferido no Laboratório de Biofotônica do Grupo de Óptica do Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo (USP), a fim de se obter uma alta confiabilidade na intensidade efetiva da emissão *laser*.

O *laser* foi aplicado em um único ponto sobre o defeito ósseo, imediatamente após o procedimento operatório e no segundo, quarto, sexto, oitavo, décimo e décimo segundo dias de pós-operatório, totalizando sete aplicações em 14 dias. Nas aplicações, foi utilizada a técnica pontual em contato, sendo a caneta do equipamento posicionada perpendicularmente ao tecido e as irradiações foram realizadas sempre no mesmo horário (Figura 4).

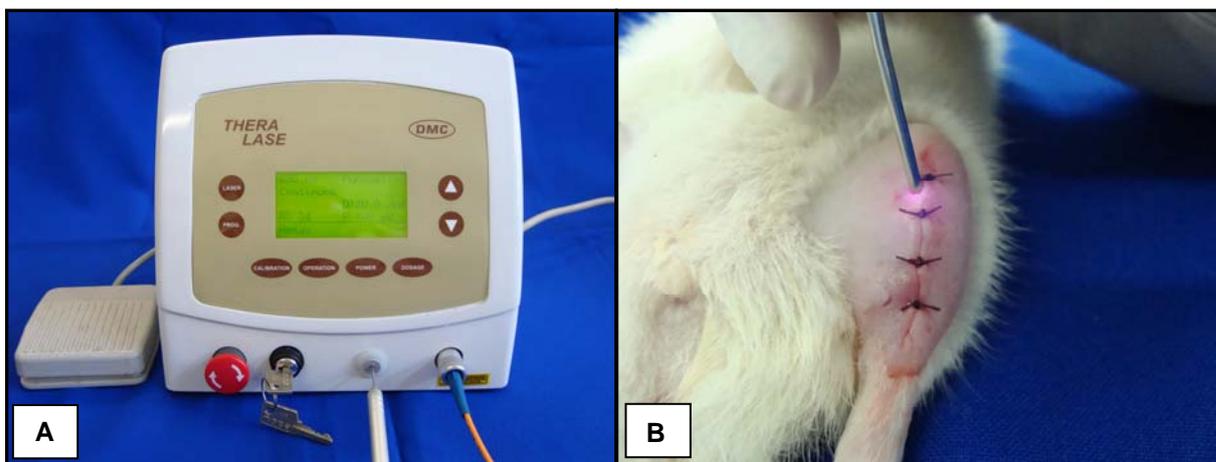


Figura 4. Tratamento com o *laser* de baixa intensidade: (A) equipamento emissor da radiação *laser*; (B) irradiação sobre o defeito ósseo.

3.5 Eutanásia dos Animais

No décimo quarto dia após a realização do defeito ósseo, os animais foram eutanasiados com uma dose letal de anestésico (Ketamina/Xilazina) injetado por via intraperitoneal.

3.6 Coleta das Amostras

Após a eutanásia, as tíbias, tanto direita quanto esquerda, de cada animal foram retiradas para serem analisadas posteriormente. A tíbia direita foi designada para as análises

histológicas, enquanto que a esquerda para a análise biomecânica. As análises foram realizadas contendo dez amostras de cada grupo.

3.7 Análises

3.7.1 Análise Histopatológica

Para a realização da análise histopatológica, as tíbias direitas foram fixadas em formalina tamponada a 10% (Merck, Darmstadt, Germany) por 24 horas, descalcificadas em solução de EDTA a 4% (Merck) e, posteriormente, incluídas em blocos de parafina. Na sequência, os blocos de parafina foram cortados longitudinalmente, com espessura padronizada de 5µm e os cortes foram montados em lâminas histológicas.

A análise qualitativa da região do defeito ósseo foi realizada por meio de lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina (HE, Merck). Para tal, foi utilizado um microscópio de luz (Olympus, Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan) e foram observadas as seguintes alterações no local da lesão: presença de tecido ósseo, tecido medular, processo inflamatório e/ou tecido de granulação e metaplasia em cada animal.

3.7.2 Morfometria

A morfometria da área de osso neoformado, na região do defeito ósseo de cada animal, foi mensurada utilizando um sistema de análise de imagem Motic Images Plus, versão 2.0. As lâminas foram coradas com Tricrômico de Masson (TM) e para a realização da análise foram selecionados três campos da região cortical do defeito, nomeados de C1 e C3 as regiões próximas à parede do defeito, e C2, correspondente à região central do defeito. O tecido ósseo

neoformado presente nessas regiões foi mensurado e a área registrada na objetiva de 10X (Figura 5). Depois de registradas, as áreas foram somadas, resultando na área total de tecido ósseo neoformado, com o valor expresso em micrômetros quadrados (μm^2) (MIRANDA *et al.*, 2006).

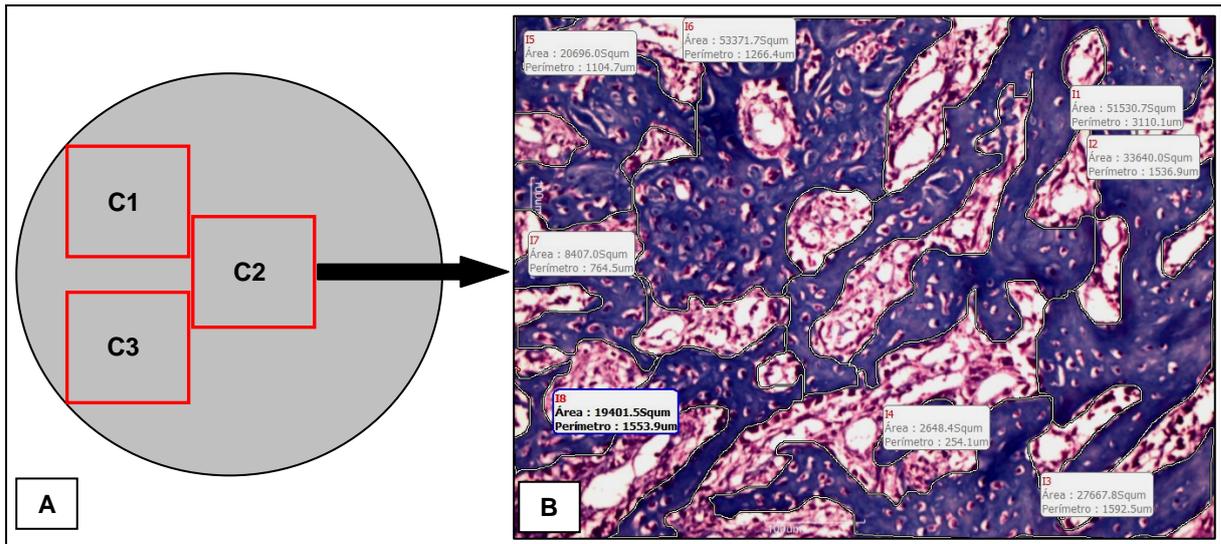


Figura 5. Morfometria da área de osso neoformado: (A) desenho ilustrativo da padronização dos campos selecionados na análise morfométrica; (B) fotomicrografia representativa do campo 2 (C2) de um defeito ósseo do grupo tratado com *laser* 60J/cm². A cor azul indica a área de osso neoformado. Coloração: TM. (Aumento de 10X)

3.7.3 Birrefringência

Os cortes histológicos corados pelo método do *Picrosirius-red* foram analisados em um microscópio de luz polarizada (Leica) para avaliar as alterações estruturais na neoformação da matriz trabecular. Este método permite uma avaliação qualitativa e quantitativa da fase de organização da matriz óssea, baseado na birrefringência dos feixes de

fibras colágenas após coloração com *Picrosirius-red* (MONTES, 1996; ANDRADE *et al.*, 1999; GARAVELLO-FREITAS *et al.*, 2003).

Para a realização da análise quantitativa foi utilizado o *software* ImageJ, em que é possível quantificar a intensidade do brilho de birrefringência calculando-se a intensidade em “*pixels*” da cor dada pelo *Picrosirius-red* sob luz polarizada. A intensidade de brilho da birrefringência é proporcional à organização das fibras colágenas. As fibras colágenas mais espessas e fortemente birrefringentes apresentam-se coradas em tons de laranja a vermelho, o que corresponde ao colágeno mais anisotrópico (GARAVELLO-FREITAS *et al.*, 2003). Foram avaliados dez campos na região do defeito, em aumento de 100X, possibilitando assim a análise de todo o foco de lesão. Os valores correspondentes a cada campo foram somados, resultando no valor total de birrefringência das fibras colágenas do defeito ósseo por animal.

3.7.4 Imunohistoquímica

A imunohistoquímica foi realizada no Departamento de Patologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), campus São Paulo. Inicialmente, foram confeccionadas lâminas histológicas com cortes seriados de 4µm de espessura. A parafina foi removida com xilol e os cortes foram reidratados em etanol e, em seguida, imersos em solução de tampão citrato a 0,01M (pH 6,0) em microondas (850W) por três ciclos de cinco minutos cada para recuperação antigênica. O material foi pré-incubado com peróxido de hidrogênio a 0,3% em solução de tampão fosfato (PBS) por cinco minutos para inativação da peroxidase endógena e, na sequência, bloqueado em soro fetal bovino a 5%, diluído em solução de PBS por dez minutos.

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

de transcrição de diferenciação osteoblástica) anticorpo primário policlonal (Santa Cruz Biotechnology, USA) na concentração de 1:200 e anti-VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) anticorpo primário monoclonal (Santa Cruz Biotechnology, USA) na concentração de 1:200. A incubação foi realizada em refrigerador (a 4°C) por um período de 12 horas, seguida de dois banhos em solução de PBS, com duração de cinco minutos cada.

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

3.7.5 Análise Biomecânica

A análise biomecânica foi realizada por meio do teste de flexão de três pontos na tíbia esquerda dos animais de todos os grupos. O teste foi realizado no Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar, em uma máquina de ensaio universal Instron, modelo 4444, em temperatura ambiente.

Para a realização do teste foi utilizada uma célula de carga com capacidade máxima de 1KN, pré-carga de 5N e velocidade constante de 0,5cm/min. As extremidades da tíbia foram apoiadas em dois suportes metálicos, com distância de 3,8cm entre eles, expondo somente

1,8cm do corpo de prova. As tíbias foram posicionadas com a região do defeito voltado para baixo e a força foi aplicada perpendicularmente ao eixo longitudinal do osso, por uma haste cilíndrica até o momento da fratura (Figura 6). A força aplicada e o deslocamento do endentador foram monitorados e registrados por meio de um *software* próprio do equipamento (Instron Series IX). A partir da curva de carga/deformação foram obtidos os valores de carga máxima (N) (RENNÓ *et al.*, 2006).

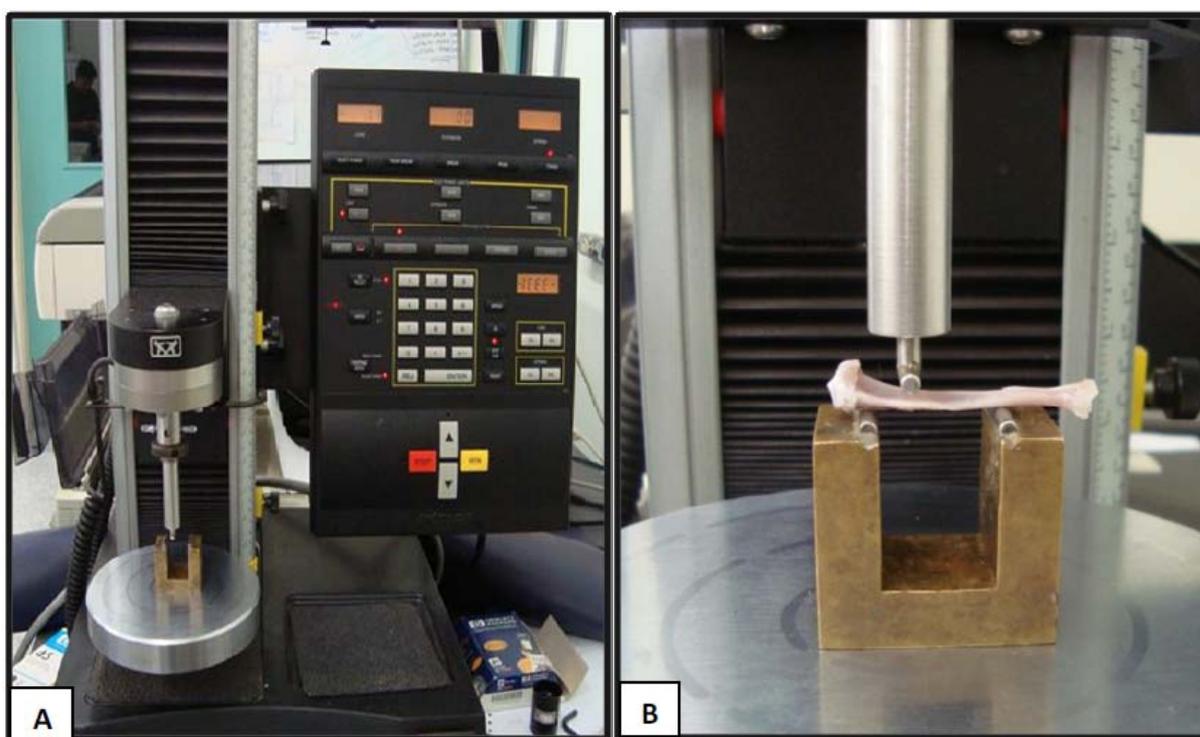


Figura 6. Análise biomecânica: (A) máquina de ensaio universal Instron, modelo 4444; (B) posicionamento da tíbia durante o teste de flexão, com a região do defeito ósseo voltado para baixo, na linha de ação da carga a ser aplicada.

3.8 Análise Estatística

Os dados foram analisados estatisticamente por meio de técnicas descritivas, na forma de médias e desvios-padrão. O teste de normalidade de Shapiro-Wilk's foi utilizado para

todas as variáveis. Nos casos em que houve distribuição normal da amostra, as comparações foram feitas utilizando testes de análise de variância (ANOVA), seguidas do *post-hoc* de Tukey. Nos casos não paramétricos, o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado, seguido do teste de Mann-Whitney para discriminar as diferenças. As análises foram realizadas no *software* STATISTICA, versão 7.0. Para as conclusões das análises estatísticas foi utilizado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

PARTE II

4. ESTUDO I

**“Terapia *laser* de baixa intensidade modula o reparo ósseo em ratas osteopênicas:
similaridades a partir de duas fluências”**

Submetido ao periódico “Experimental Gerontology”. (ANEXO B)

5. ESTUDO II

**“Biosilicato[®] associado à terapia *laser* de baixa intensidade otimiza o reparo ósseo em
ratas osteopênicas”**

Aceito para publicação no periódico “Journal of Tissue Engineering and
Regenerative Medicine”. (ANEXO C)

4. ESTUDO I

“Terapia *laser* de baixa intensidade modula o reparo ósseo em ratas osteopênicas: similaridades a partir de duas fluências”

Paulo Sérgio Bossini¹, Ana Claudia Muniz Rennó², Daniel Araki Ribeiro², Renan Fangel¹,
Alessa Castro Ribeiro¹, Manoela de Assis Lahoz¹, Nivaldo Antonio Parizotto¹

¹ Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Rodovia Washington Luís (SP-310), Km 235, CEP. 13565-905, São Carlos, SP, Brasil.

² Departamento de Biociências, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Avenida Ana Costa, 95, CEP. 11050-240, Santos, SP, Brasil.

4.1 RESUMO

Objetivo: Analisar os efeitos da terapia *laser* de baixa intensidade (LLLT), com fluências de 60J/cm² e 120J/cm², no reparo ósseo de ratas osteopênicas. **Materiais e Métodos:** Um total de 30 ratas, fêmeas, da linhagem *Wistar* (12 semanas de idade, ± 250g) foram submetidas à ovariectomia (OVX). Sessenta dias após a OVX foi realizado um defeito ósseo em ambas as tíbias de todos os animais, sendo distribuídos aleatoriamente em três grupos com dez animais cada: grupo controle com defeito ósseo sem tratamento (GC); grupo defeito ósseo tratado com *laser* 60J/cm² (GL60) e grupo defeito ósseo tratado com *laser* 120J/cm² (GL120). Os animais foram submetidos à irradiação *laser* (Ga-Al-As, 830nm, 100mW) em um único ponto sobre o defeito ósseo por sete sessões, em dias alternados. Para as conclusões das análises estatísticas foi utilizado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). **Resultados:** Nos grupos tratados com *laser*, em ambas as fluências, foi evidenciada uma maior quantidade de osso neoformado comparado ao controle. A análise de birrefringência demonstrou que os defeitos ósseos irradiados apresentaram maior deposição e melhor organização estrutural das fibras colágenas, principalmente no grupo tratado com *laser* na fluência de 120J/cm². A imunorreatividade à COX-2, CBFA-1 e VEGF foi detectada de forma similar nas duas fluências utilizadas e na análise biomecânica não houve diferença estatística significativa entre os grupos. **Conclusão:** Os resultados desse estudo demonstraram que a LLLT, nas duas fluências utilizadas, estimulou o reparo ósseo em tíbias de ratas osteopênicas, sugerindo que ambas as fluências podem ser usadas para tratar fraturas, em especial associadas a processos patológicos osteometabólicos, como a osteoporose.

Palavras-chave: reparo ósseo, osteoporose, terapia *laser* de baixa intensidade, ovariectomia, angiogênese.

4.2 INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma síndrome clínica em que a massa óssea é menor do que o esperado para indivíduos de uma mesma idade e raça, resultando em fragilidade óssea e aumento da suscetibilidade à fraturas (Culhan et al., 1994; Mitchel et al., 1998). Ela representa uma séria ameaça à saúde dos idosos e tem sido reconhecida como um dos principais problemas de saúde pública (Klein et al., 1998). Além disso, está relacionada com algumas manifestações clínicas, sendo que uma das principais ocorrências é o aumento do risco de fraturas (Klein et al., 1998; Sinaki et al., 1996). As fraturas mais frequentes ocorrem na região distal do antebraço, vértebras, costelas, úmero e quadril (Pickering e Scammell, 2002; Sinaki et al., 1996).

Após a fratura, o paciente fica incapacitado de retornar a sua plena funcionalidade até a completa consolidação óssea. Esse processo pode se prolongar por muitos meses e caso não ocorra um reparo ósseo adequado, sua evolução poderá culminar em uma grande fragilidade óssea e incapacidade do paciente de retornar as suas atividades de vida diária (Pickering e Scammell, 2002).

Nesse contexto, há necessidade de desenvolvimento de tecnologias capazes de melhorar o processo de reparo ósseo em indivíduos osteoporóticos. Um tratamento promissor é o uso da terapia *laser* de baixa intensidade (LLLT), capaz de induzir a osteogênese e estimular a consolidação de fraturas (Karu e Lubart, 2000; Pretel et al., 2007).

O mecanismo de ação do *laser* terapêutico é baseado na absorção da luz pelos tecidos, que produz alterações no metabolismo celular. Quando o *laser* é aplicado nos tecidos, a luz é absorvida por fotorreceptores localizados nas células, denominados cromóforos (Dortbudak, 2000). Uma vez absorvida, a luz pode modular as reações químicas celulares, que estimularão a respiração mitocondrial, a produção de oxigênio molecular e a síntese de ATP (Karu e

Lubart, 2000; Stein et al., 2005). Esses efeitos podem aumentar a síntese de DNA, RNA e proteínas reguladoras do ciclo celular, estimulando a proliferação celular (Dortbudak, 2000).

Em estudos *in vitro* com células osteoblásticas foi demonstrado que a LLLT promoveu o aumento da atividade mitocondrial (Pires-Oliveira et al., 2008), da síntese de DNA e RNA (Stein et al., 2005), da expressão gênica de osteocalcina e osteopontina (Liu et al., 2007) e da atividade da fosfatase alcalina (Rennó et al., 2007). Além disso, a LLLT tem mostrado ser capaz de acelerar o processo de reparo de fraturas em ratos e coelhos, aumentando o volume do calo e a densidade mineral óssea (Lirani-Galvão et al., 2006; Liu et al., 2007; Pretel et al., 2007).

Pinheiro et al. (2003) demonstraram que o *laser* com comprimento de onda de 830nm (10mW, 4,8J/cm²) foi capaz de aumentar a quantidade de tecido ósseo mineralizado em defeitos ósseos em fêmur de ratos. Há também evidências que a LLLT pode estimular o metabolismo do tecido ósseo em ratas osteopênicas (Rennó et al., 2006), no entanto, pouca atenção tem sido dada aos efeitos do *laser* no osso com osteopenia ou osteoporose (Diniz et al., 2009).

Sendo assim, a terapia *laser* ainda é discutida como tratamento efetivo nessa modalidade. Até o presente momento, ainda não foi determinada nenhuma janela terapêutica específica para a dosimetria ideal de tratamento (Coombe et al., 2001; Diniz et al., 2009). Embora os efeitos positivos da LLLT na proliferação de células ósseas têm sido evidenciados, os seus efeitos na consolidação de fraturas osteopênicas não são bem conhecidos. Antes da utilização dessa nova terapia como modalidade terapêutica, há necessidade de investigar os efeitos dose-resposta desse tratamento em estudos *in vivo* e dos parâmetros mais adequados para tratamento, com intuito de determinar a sua eficácia e segurança. Dessa forma, esse estudo teve como objetivo analisar os efeitos da LLLT, em duas diferentes fluências, 60J/cm² e 120J/cm², no reparo ósseo em tíbias de ratas osteopênicas.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Esse estudo foi conduzido de acordo com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) (Parecer 025/2006). Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Fisioterapia da UFSCar durante todo o período experimental e foram alojados individualmente em gaiolas apropriadas de polietileno padrão, em condições ambientais controladas (19-23°C e ciclo claro/escuro de 12/12 horas), com livre acesso a água e ração própria (Primor Rações).

Trinta ratas, fêmeas, da linhagem *Wistar* (12 semanas de idade, média de 250g) foram submetidas à ovariectomia. Para a realização da ovariectomia, os animais foram submetidos à anestesia composta por Ketamina/Xilazina (80/10mg/Kg). Em seguida, a região abdominal foi tricotomizada digitalmente e foram realizadas incisões translobares bilaterais, o que possibilitou a localização e retirada dos ovários. Após esses procedimentos, foram realizadas suturas internas com fio cirúrgico reabsorvível 3-0 (Shalon[®], Catgut Cromado) e suturas externas com fio de náilon monofilamentar 4-0 (Shalon[®]). Depois disso, todos os animais foram condicionados durante 60 dias com o propósito de indução da osteopenia (Kalu, 1991, Rennó et al., 2006).

No 61º dia após a ovariectomia, foi realizado um defeito ósseo em ambas as tíbias de todos os animais. O procedimento foi feito sob anestesia de Ketamina/Xilazina (80/10mg/Kg). As regiões mediais das tíbias foram tricotomizadas digitalmente e desinfetadas com iodopovidona. Incisões nas regiões cutâneas e musculares foram realizadas para expor a tíbia. Os defeitos ósseos, com cavidade de 2,0mm de diâmetro, foram realizados por meio de uma minifuradeira a 12.000rpm, sob irrigação constante com solução salina. A lesão foi realizada de modo a penetrar a cortical medial e danificar o canal medular abaixo,

porém, sem atingir a face contralateral. Em seguida, a musculatura e a pele foram suturadas com fio de náilon monofilamentar 4-0 (Shalon[®]) e as ratas foram observadas diariamente.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos, com dez animais cada: **grupo 1:** controle com defeito ósseo sem tratamento (GC); **grupo 2:** defeito ósseo tratado com *laser* com fluência de 60J/cm² (GL60) e **grupo 3:** defeito ósseo tratado com *laser* com fluência de 120J/cm² (GL120).

Nesse estudo foi utilizado o *laser* de diodo com meio ativo composto por arseneto de gálio e alumínio (Ga-Al-As), (Thera lase[®], DMC São Carlos, SP, Brasil), 830nm, área do feixe de 0,028cm², 100mW, 60J/cm² (1,7J) e 120J/cm² (3,4J) com um tempo de irradiação de 17s e 34s, respectivamente. A irradiação foi iniciada imediatamente após a realização dos defeitos ósseos e no segundo, quarto, sexto, oitavo, décimo e décimo segundo dias após a operação, totalizando sete aplicações. O *laser* foi aplicado utilizando a técnica pontual em contato em um único ponto sobre o defeito ósseo. No décimo quarto dia pós-operatório, os animais foram submetidos a uma dose letal de anestésico, injetado por via intraperitoneal. Após a eutanásia, as tíbias, tanto direita quanto esquerda, de cada animal foram retiradas para serem analisadas.

4.3.1 Análise Histopatológica

Para a realização da análise histopatológica as tíbias direitas foram fixadas em formalina tamponada a 10% (Merck, Darmstadt, Germany) por 24 horas, descalcificadas em solução de EDTA a 4% (Merck) e, posteriormente, incluídas em blocos de parafina. Na sequência, os blocos de parafina foram cortados longitudinalmente, com espessura padronizada de 5µm, sendo montados em lâminas histológicas.

A análise qualitativa da região do defeito ósseo foi realizada por meio de lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina (HE, Merck). Para tal, foi utilizado um microscópio de luz (Olympus, Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan) e foram observadas as seguintes alterações no local da lesão: presença de tecido ósseo, tecido medular, processo inflamatório e/ou tecido de granulação e metaplasia em cada animal.

4.3.2 Morfometria

A morfometria da área de osso neoformado, na região do defeito ósseo de cada animal, foi mensurada utilizando um sistema de análise de imagem Motic Images Plus, versão 2.0. As lâminas foram coradas com Tricrômico de Masson (TM) e para a realização da análise foram selecionados três campos da região cortical do defeito, nomeados de C1 e C3 as regiões próximas à parede do defeito, e C2, correspondente à região central do defeito. O tecido ósseo neoformado presente nessas regiões foi mensurado e a área registrada na objetiva de 10X. Depois de registradas, as áreas foram somadas resultando na área total de tecido ósseo neoformado, com o valor expresso em micrômetros quadrados (μm^2) (Miranda et al., 2006).

4.3.3 Birrefringência

Os cortes histológicos corados pelo método do *Picrosirius-red* foram analisados em um microscópio de luz polarizada (Leica) para avaliar as alterações estruturais na neoformação da matriz trabecular. Esse método permite uma avaliação qualitativa e quantitativa da fase de organização da matriz óssea, baseado na birrefringência dos feixes de fibras colágenas após coloração com *Picrosirius-red* (Andrade et al., 1999; Garavello-Freitas et al., 2003; Montes, 1996).

Para a realização da análise quantitativa, foi utilizado o *software* ImageJ, em que é possível quantificar a intensidade do brilho de birrefringência calculando-se a intensidade em “*pixels*” da cor dada pelo *Picrosirius-red* sob luz polarizada. A intensidade de brilho da birrefringência é proporcional à organização das fibras colágenas. As fibras colágenas mais espessas e fortemente birrefringentes apresentam-se coradas em tons de laranja a vermelho, o que corresponde ao colágeno mais anisotrópico (Garavello-Freitas et al., 2003). Foram avaliados dez campos na região do defeito, em aumento de 100X, possibilitando assim a análise de todo o foco de lesão. Os valores correspondentes a cada campo foram somados, resultando no valor total de birrefringência das fibras colágenas do defeito ósseo por animal.

4.3.4 Imunohistoquímica

Para a realização da imunohistoquímica foram confeccionadas lâminas histológicas com cortes seriados de 4µm de espessura. A parafina foi removida com xilol e os cortes foram reidratados em etanol e, em seguida, imersos em solução de tampão citrato a 0,01M (pH 6,0) em microondas (850W) por três ciclos de cinco minutos cada para recuperação antigênica. O material foi pré-incubado com peróxido de hidrogênio a 0,3% em solução de tampão fosfato (PBS) por cinco minutos para inativação da peroxidase endógena e, na sequência, bloqueado em soro fetal bovino a 5%, diluído em solução de PBS por dez minutos.

As amostras foram incubadas com anti-COX-2 (ciclo-oxigenase-2) anticorpo primário policlonal (Santa Cruz Biotechnology, USA) na concentração de 1:200, anti-CBFA-1 (fator de transcrição de diferenciação osteoblástica) anticorpo primário policlonal (Santa Cruz Biotechnology, USA) na concentração de 1:200 e anti-VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) anticorpo primário monoclonal (Santa Cruz Biotechnology, USA) na concentração

de 1:200. A incubação foi realizada em refrigerador (a 4°C) por um período de 12 horas, seguida de dois banhos em solução de PBS, com duração de cinco minutos cada.

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

4.3.5 Análise Biomecânica

A análise biomecânica foi realizada por meio do teste de flexão de três pontos na tíbia esquerda dos animais de todos os grupos. O teste foi realizado no Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar, em uma máquina de ensaio universal Instron, modelo 4444, em temperatura ambiente.

Para a realização do teste foi utilizada uma célula de carga com capacidade máxima de 1KN, pré-carga de 5N e velocidade constante de 0,5cm/min. As extremidades da tíbia foram apoiadas em dois suportes metálicos, com distância de 3,8cm entre eles, expondo somente 1,8cm do corpo de prova. As tíbias foram posicionadas com a região do defeito voltada para baixo e a força foi aplicada perpendicularmente ao eixo longitudinal do osso, por uma haste cilíndrica até o momento da fratura. A força aplicada e o deslocamento do endentador foram

monitorados e registrados por meio de um *software* próprio do equipamento (Instron Series IX). A partir da curva de carga/deformação foram obtidos os valores de carga máxima (N) (Rennó et al., 2006).

4.3.6 Análise Estatística

Os dados foram analisados estatisticamente por meio de técnicas descritivas, na forma de médias e desvios-padrão. O teste de normalidade de Shapiro-Wilk's foi utilizado para todas as variáveis. Nos casos em que houve distribuição normal da amostra, as comparações foram feitas utilizando testes de análise de variância (ANOVA), seguidas do *post-hoc* de Tukey. Nos casos não paramétricos, o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado, seguido do teste de Mann-Whitney para discriminar as diferenças. As análises foram realizadas no *software* STATISTICA, versão 7.0. Para as conclusões das análises estatísticas foi utilizado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

4.4 RESULTADOS

Durante o período experimental, os animais não apresentaram complicações pós-operatórias. Eles regressaram rapidamente à sua dieta normal e não demonstraram perda de massa corpórea. Além disso, nenhum animal morreu durante o experimento e não foi detectada a presença de infecção na área da lesão.

4.4.1 Análise Histopatológica

Na figura 7 estão representados os achados histopatológicos obtidos a partir da análise qualitativa descritiva.

A figura 7A mostra a região cortical do defeito ósseo do grupo controle, onde pode ser observada a presença moderada de tecido ósseo neoformado, porém pouco celularizado em relação aos grupos irradiados. Além disso, foi evidenciada a presença de tecido medular e alguns fragmentos ósseos, possivelmente devido ao procedimento cirúrgico. Em nenhuma amostra deste grupo foi observada a presença de processo inflamatório agudo. Nas figuras 7B e 7C, observa-se que os grupos irradiados, tanto na fluência de 60 J/cm^2 quanto na de 120 J/cm^2 , apresentaram um padrão histológico compatível com um estágio mais avançado de reparo quando comparados ao grupo controle. Foi possível observar que esses animais apresentaram grande quantidade de tecido ósseo neoformado, maior recrutamento celular e, por conseguinte, uma melhor organização tecidual. No entanto, não foram observadas diferenças morfológicas entre os grupos irradiados.

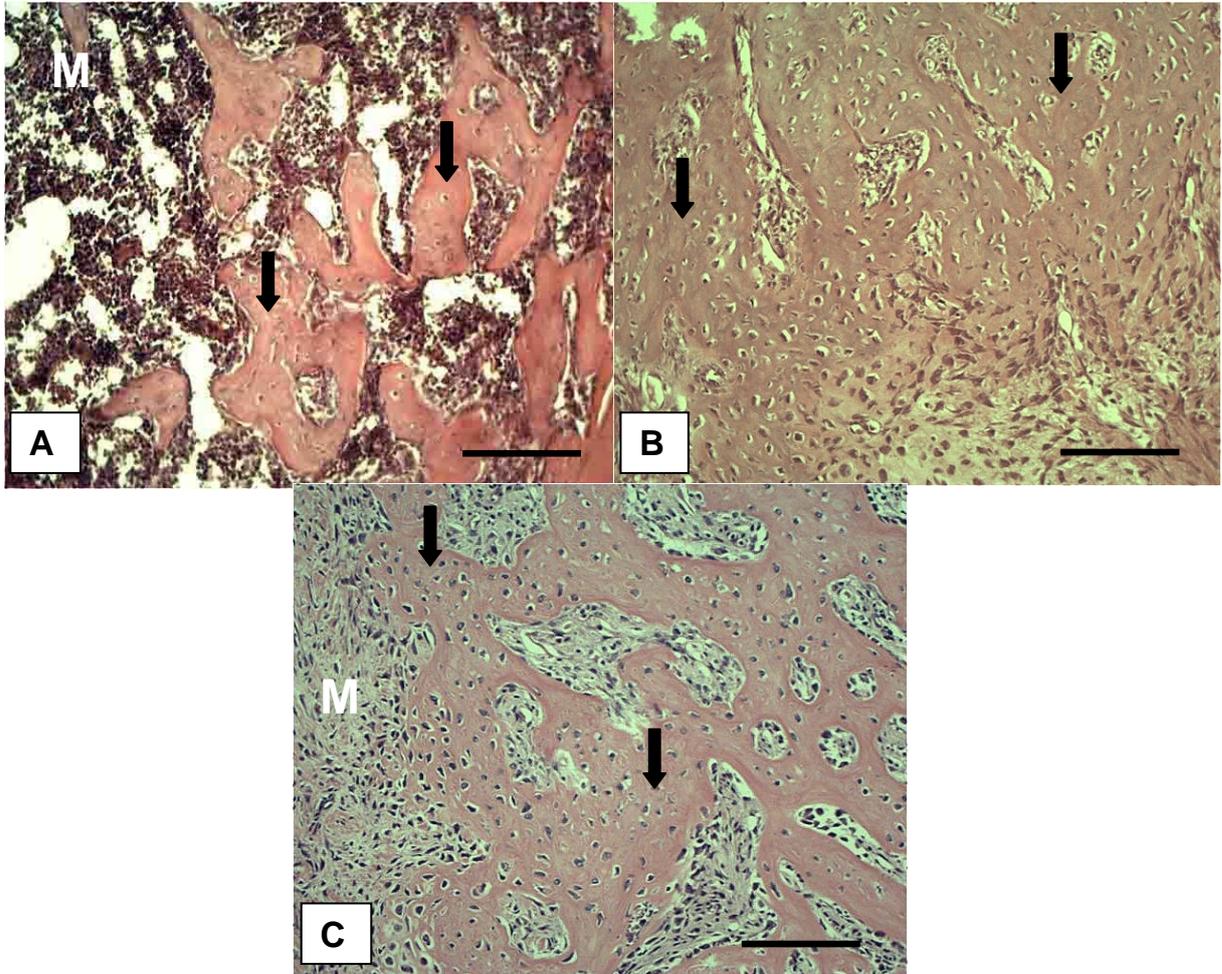


Figura 7. Fotomicrografias dos achados morfológicos dos diferentes grupos experimentais. Em (A) defeito ósseo do grupo controle, exibindo tecido ósseo neoformado (seta) e tecido medular (M). Em (B) e (C), grupo *laser* 60J/cm² e grupo *laser* 120J/cm², respectivamente, nota-se a intensa presença de tecido ósseo neoformado (seta). (Coloração: H.E., Barra = 40µm).

4.4.2 Morfometria

De acordo com a figura 8, observa-se que os grupos tratados com *laser*, nas duas fluências utilizadas nesse estudo, apresentaram médias estatisticamente maiores de tecido ósseo neoformado, quando comparados com a média do grupo controle (GC). No entanto,

quando os resultados dos grupos *laser* 60J/cm² (GL60) e *laser* 120J/cm² (GL120) foram comparados, não foram encontradas diferenças estatísticas entre eles.

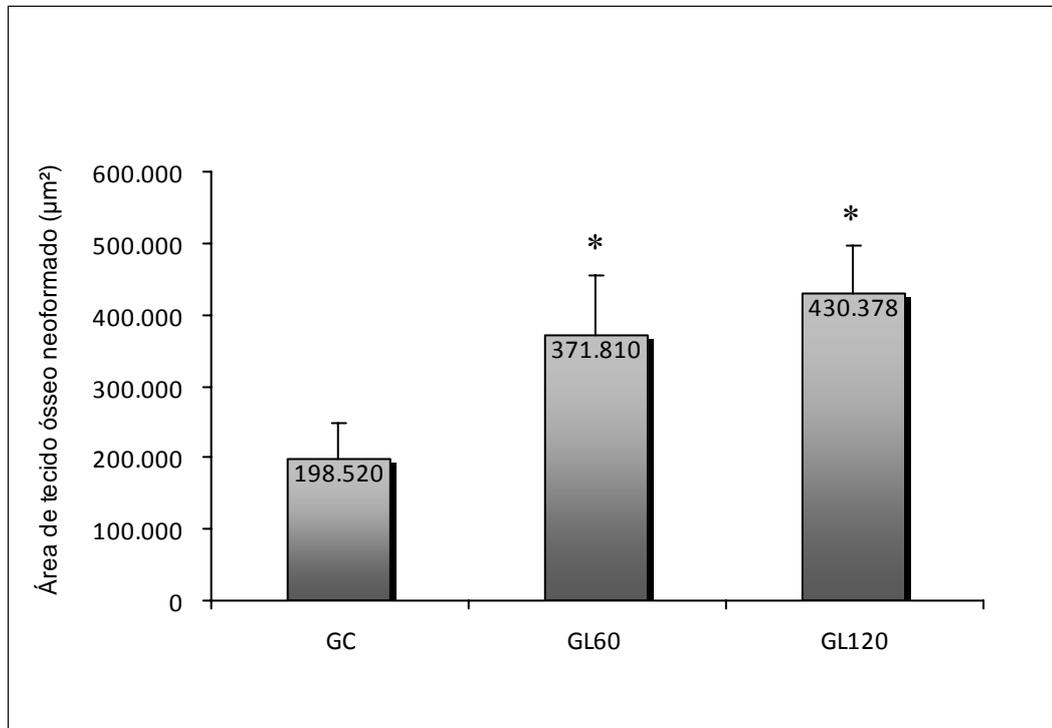


Figura 8. Médias e desvios-padrão da área de osso neoformado. GC: grupo controle; GL60: grupo tratado com *laser* com fluência de 60J/cm²; GL120: grupo tratado com *laser* com fluência de 120J/cm². * $p \leq 0,05$ versus GC.

4.4.3 Birrefringência

Nas figuras 9B e 9C, observa-se que os grupos tratados com *laser* apresentaram maior deposição de fibras colágenas e maior anisotropia, o que demonstra um melhor estado organizacional dessas fibras, quando comparados ao grupo controle (Figura 9A).

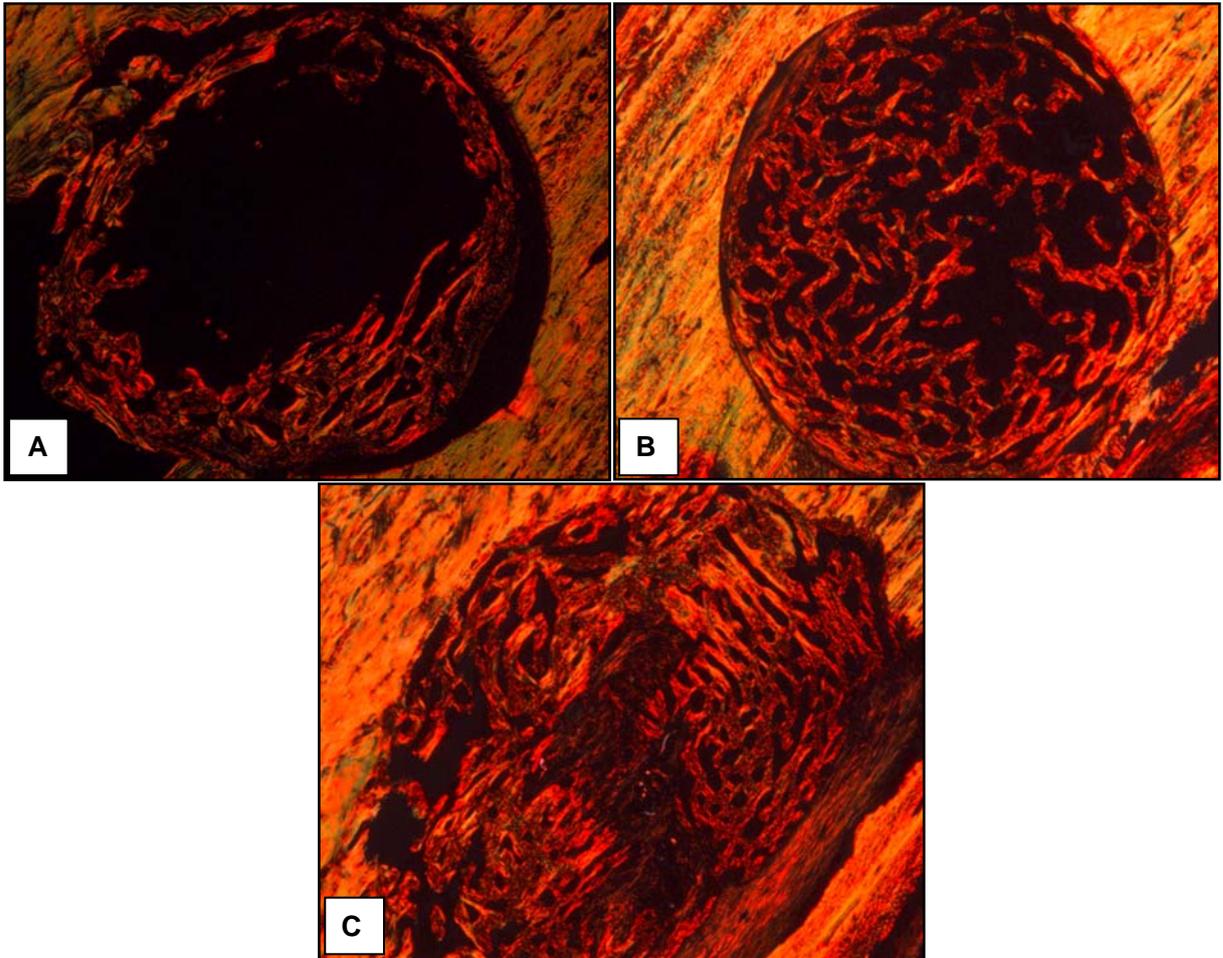


Figura 9. Fotomicrografias de defeitos ósseos, corados com *Picrosirius-red*. No grupo controle (A) o brilho de birrefringência é moderado e as fibras colágenas localizam-se circunjacentes à lesão. No grupo irradiado com *laser* 60J/cm² (B) há um brilho mais intenso e difuso pelo sítio de lesão. No grupo irradiado com *laser* 120J/cm² (C) percebe-se um incremento no brilho e na espessura das fibras. (Aumento de 50X).

Na figura 10, pode-se observar que os grupos tratados com *laser* (GL60 e GL120) apresentaram médias estatisticamente maiores de birrefringência das fibras colágenas, quando comparados com a média do grupo controle (GC). Na comparação entre os grupos *laser* 60J/cm² (GL60) e *laser* 120J/cm² (GL120) houve diferença estatisticamente significativa,

evidenciando que os defeitos ósseos irradiados com *laser* com fluência de 120J/cm² apresentaram maior deposição e melhor organização das fibras colágenas.

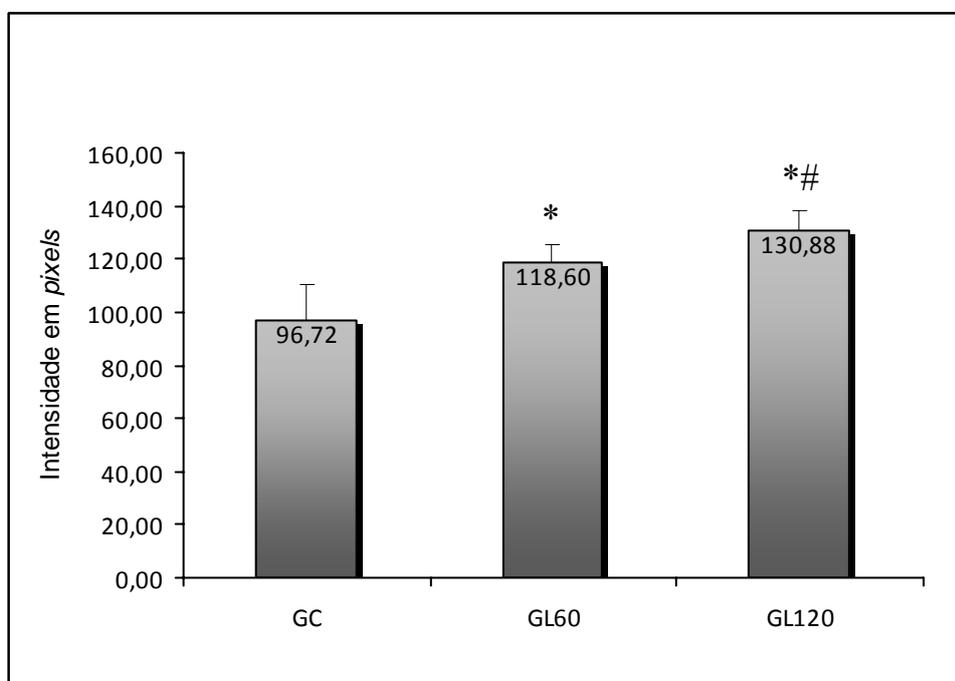


Figura 10. Médias e desvios-padrão de birrefringência das fibras colágenas. GC: grupo controle; GL60: grupo tratado com *laser* com fluência de 60J/cm²; GL120: grupo tratado com *laser* com fluência de 120J/cm². * $p \leq 0,05$ versus GC; # $p \leq 0,05$ versus GL60.

4.4.4 Imunohistoquímica

A expressão de COX-2 foi detectada predominantemente no citoplasma. No décimo quarto dia pós-operatório, a imunorreatividade à COX-2 estava presente no tecido medular dos defeitos ósseos do grupo controle. Nos grupos tratados com *laser*, nas fluências de 60J/cm² e 120J/cm², observou-se maior imunoexpressividade à COX-2 nos tecidos medular e de granulação (Figura 11).

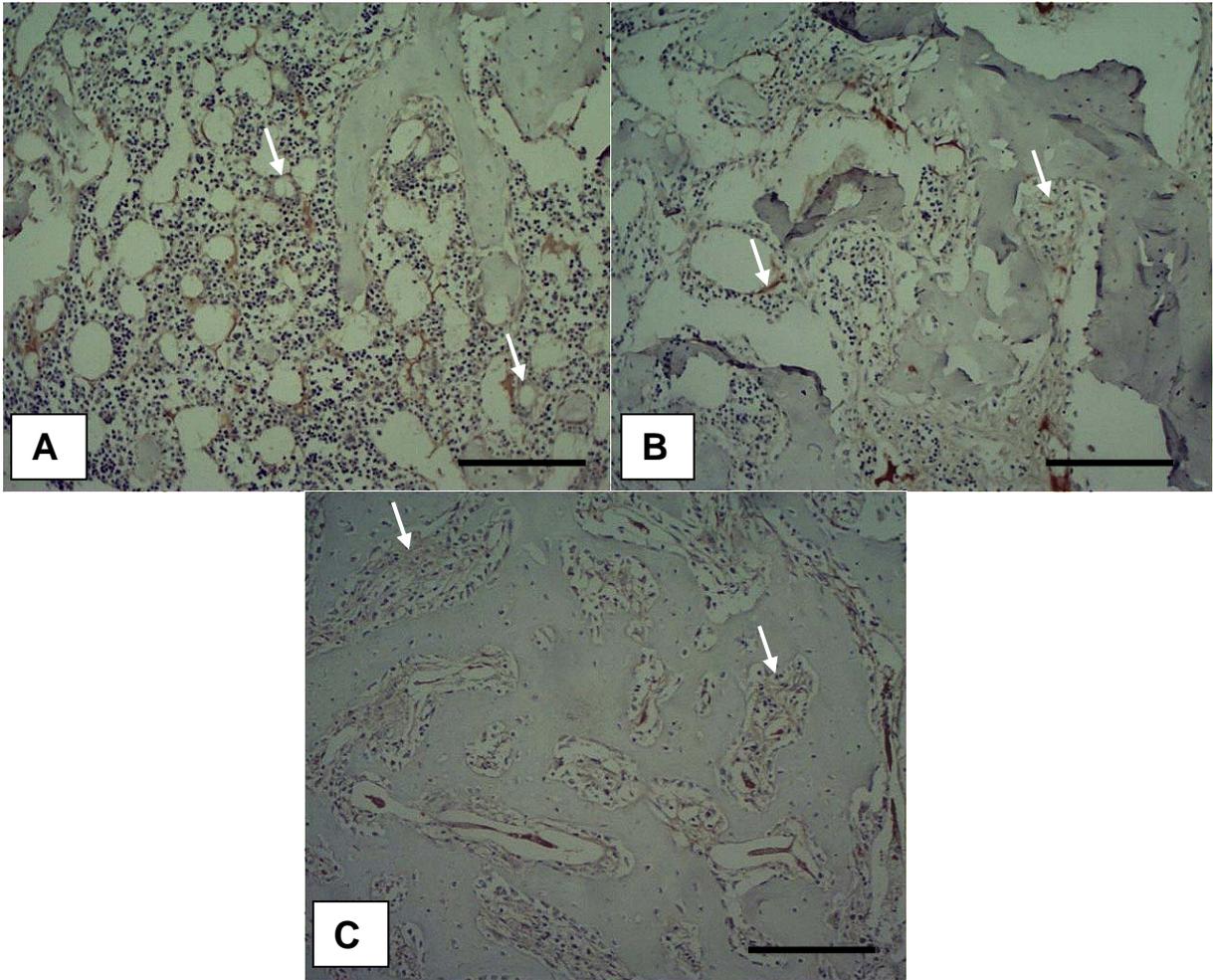


Figura 11. Fotomicrografias representativas da imunoposição da COX-2 (setas): (A) grupo controle; (B) grupo tratado com *laser* com fluência de 60J/cm² e (C) grupo tratado com *laser* com fluência de 120J/cm². (Coloração: Imunohistoquímica, Barra = 40µm).

A imunohistoquímica para o CBFA-1 foi detectada nas células do tecido medular do grupo controle. Nos grupos tratados com *laser* ocorreu um padrão semelhante ao do grupo controle, ou seja, células positivas ao CBFA-1 foram observadas principalmente no tecido medular (Figura 12).

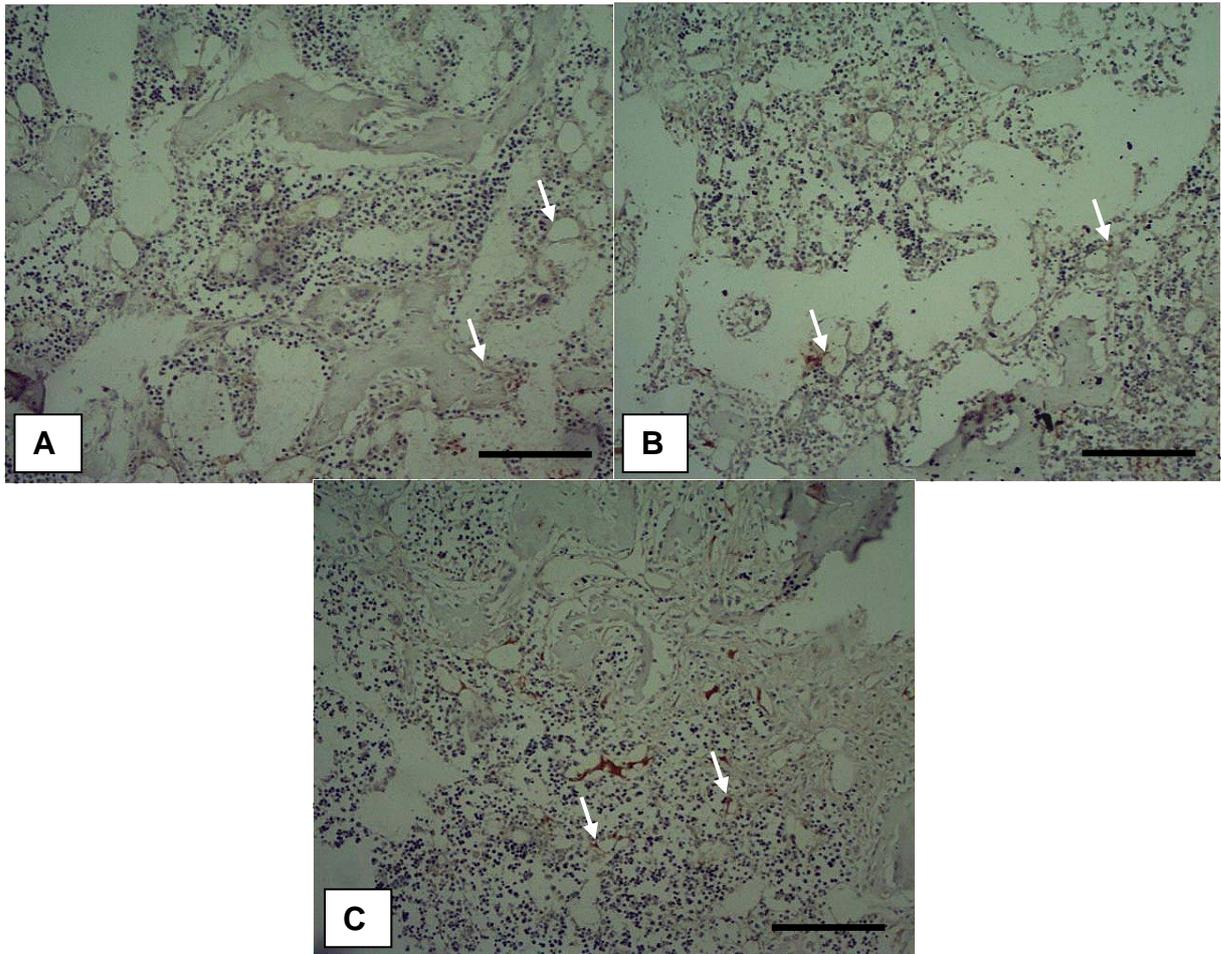


Figura 12. Fotomicrografias representativas da imunoposição de CBFA-1 (setas): (A) grupo controle; (B) grupo tratado com *laser* com fluência de 60J/cm² e (C) grupo tratado com *laser* com fluência de 120J/cm². (Coloração: Imunohistoquímica, Barra = 40µm).

Em relação à imunohistoquímica para o VEGF, nota-se que esta foi encontrada em células que envolvem as paredes dos capilares no interior dos defeitos ósseos do grupo controle, ou seja, nas células endoteliais. Pode-se observar que a terapia *laser*, em ambas as fluências utilizadas nesse estudo, foi capaz de induzir a angiogênese, conforme ilustrado pela intensa expressão deste imuno-marcador na região do defeito ósseo (Figura 13).

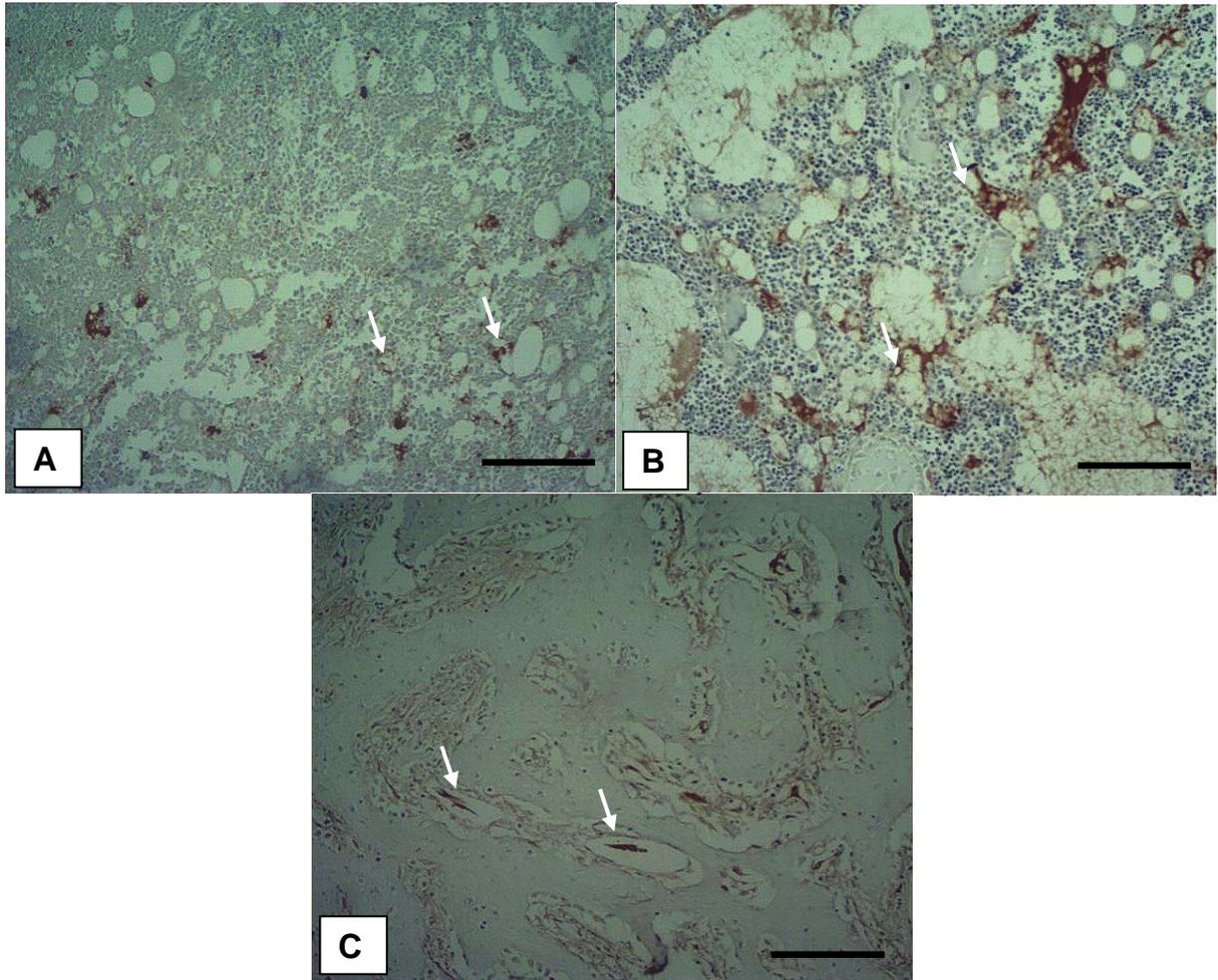


Figura 13. Fotomicrografias representativas da imunoposição de VEGF (setas): (A) grupo controle; (B) grupo tratado com *laser* com fluência de 60J/cm² e (C) grupo tratado com *laser* com fluência de 120J/cm². (Coloração: Imunohistoquímica, Barra = 40µm).

4.4.5 Análise Biomecânica

Conforme demonstra a figura 14, não houve diferença estatística significativa entre os grupos em relação à carga máxima no teste de flexão de três pontos.

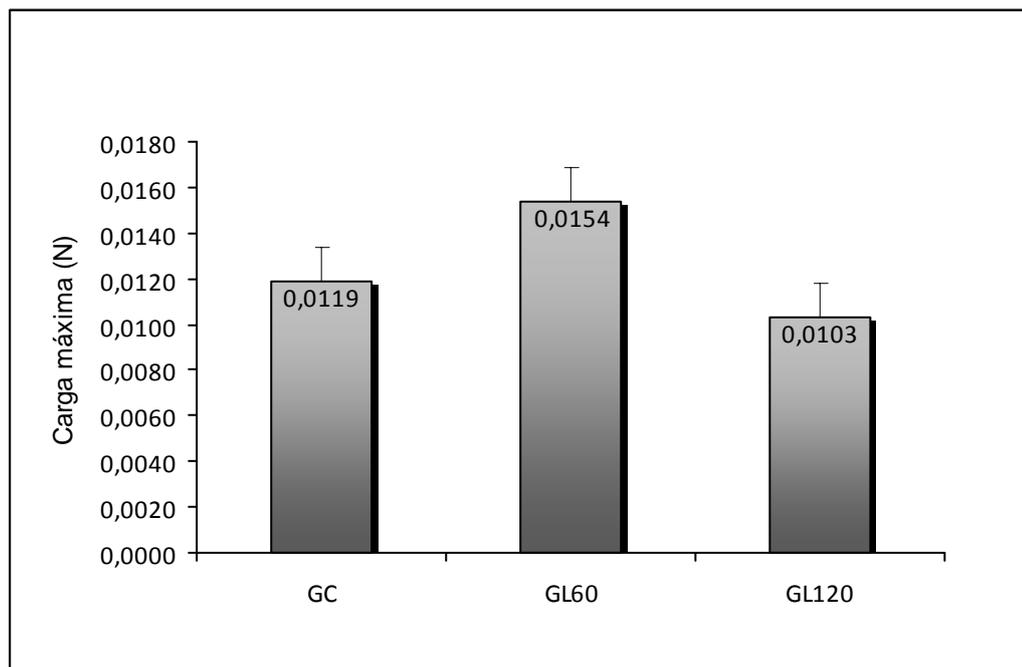


Figura 14. Médias e desvios-padrão da carga máxima nos diferentes grupos experimentais. GC: grupo controle; GL60: grupo tratado com *laser* com fluência de 60J/cm²; GL120: grupo tratado com *laser* com fluência de 120J/cm².

4.5 DISCUSSÃO

Em relação à metodologia empregada nesse estudo, é importante ressaltar que o modelo de ovariectomia é considerado um modelo experimental confiável e largamente utilizado para indução da osteopenia em ratas, com a diminuição da massa óssea e, conseqüente aumento da sua fragilidade (Comelekoglu et al., 2007; Kalu, 1991; Rennó et al., 2006). Os ossos osteopênicos apresentam reduções da área cortical e das propriedades biomecânicas e, portanto, são mais suscetíveis às fraturas (Comelekoglu et al., 2007; Pasco et al., 2006; Rennó et al., 2006).

Diversos autores vêm utilizando o modelo de defeitos circulares no tecido ósseo para investigar a ação de agentes terapêuticos na osteogênese, dentre eles a LLLT (Garavello-Freitas et al., 2000; Lirani-Galvão et al., 2006; Pinheiro et al., 2003). A LLLT constitui,

atualmente, uma das modalidades fotobioestimulantes mais utilizadas na reabilitação. Vários estudos demonstraram os efeitos positivos da terapia *laser* sobre o metabolismo do tecido ósseo, como proliferação de osteoblastos (Stein et al., 2005), presença de vasos sanguíneos recém-formados (Carvalho et al., 2006) e aumento da atividade da fosfatase alcalina (Rennó et al., 2007).

Nesse estudo, foi observado que a quantidade de tecido ósseo neoformado apresentada pelos grupos irradiados foi maior que a quantidade apresentada pelo grupo controle 14 dias após a cirurgia. No entanto, quando as duas fluências foram comparadas, não foram encontradas diferenças significativas, o que sugere que a LLLT foi eficaz para estimular o reparo ósseo, tanto na fluência de $60\text{J}/\text{cm}^2$ quanto na fluência de $120\text{J}/\text{cm}^2$. Além disso, os resultados demonstraram que a terapia *laser* foi capaz de induzir a expressão de COX-2 e VEGF, independente da fluência usada na irradiação. Tais dados corroboram com os estudos de Matsumoto et al. (2009) e Ribeiro e Matsumoto (2008), que também evidenciaram que a qualidade do reparo ósseo e a quantidade de osso neoformado do grupo tratado com *laser* (735nm, $16\text{J}/\text{cm}^2$, com tempo de irradiação de um minuto) foi superior ao controle. Da mesma forma, os autores demonstraram que a expressão de COX-2 é capaz de modular a cinética de reparo ósseo em ratos.

A ciclo-oxigenase é uma enzima chave na conversão do ácido araquidônico em prostanóides. A expressão da isoforma COX-2 é importante para muitos processos patológicos, incluindo a inflamação e o reparo tecidual (Tsuji et al., 1998). Neste estudo, quando se investigou a expressividade da COX-2, os resultados demonstraram que a terapia *laser* promoveu um aumento na regulação deste mediador inflamatório. O mesmo ocorreu com o VEGF, em que foi encontrado maior expressão para este imunomarcador. Alguns autores postularam que a LLLT é capaz de aumentar a formação de novos capilares por meio da liberação de fatores de crescimento, como o VEGF (Wang et al., 2009), estimular a síntese

de DNA e RNA e, conseqüentemente, aumentar a proliferação e a diferenciação celular (Sato et al., 1997, Zhang et al., 2002). Dessa forma, considera-se que a imunexpressão da COX-2 e do VEGF encontrados no tecido ósseo também possam favorecer o processo de reparo ósseo (Forwood, 1996; Li et al., 2002).

Em 1997, Sato et al. sugeriram que a COX-2 poderia estar envolvida na fase inicial da osteogênese, provavelmente associada à maturação dos osteoblastos. Além disso, Zhang et al. (2002) afirmaram que a enzima ciclo-oxigenase-2 age sobre a osteogênese, regulando genes de diferenciação osteoblástica, tais como CBFA-1 e osterix. Os resultados do presente trabalho estão de acordo com esses estudos anteriores. Em suma, parece que a terapia *laser* é capaz de melhorar o reparo ósseo em ratas osteopênicas, como resultado do aumento da regulação de COX-2 e VEGF, independente da fluência utilizada nesse estudo.

Na análise de birrefringência das fibras colágenas, os dados desse estudo demonstraram que os grupos tratados com *laser* apresentaram maior deposição e organização das fibras colágenas comparados ao controle; no entanto, o grupo irradiado com a fluência de 120J/cm² apresentou os melhores resultados. Esses resultados estão de acordo com o estudo de Garavello-Freitas et al. (2003) que observaram melhor organização estrutural das fibras de colágeno nos grupos submetidos à irradiação *laser* com fluências mais elevadas.

A análise biomecânica do presente estudo foi realizada através do teste de flexão de três pontos. Este teste tem sido amplamente utilizado em trabalhos que investigam os efeitos da ovariectomia na força óssea e em trabalhos que avaliam diferentes tipos de tratamentos em uma série de distúrbios ósseos, incluindo os efeitos do *laser* no reparo de fraturas (Garavello-Freitas et al., 2003; Lirani-Galvão et al., 2006; Luger et al., 1998). Os dados desse teste não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos, o que sugere que a LLLT não foi capaz de aumentar a força óssea em tíbias de ratas osteopênicas, 14 dias após a realização do defeito ósseo.

Alguns estudos verificaram que a LLLT promoveu melhora das propriedades biomecânicas em tíbias osteotomizadas de ratas saudáveis (Lirani-Galvão et al., 2006; Luger et al., 1998). Rennó et al. (2006), observaram aumento nas propriedades biomecânicas em fêmures não osteotomizados de ratas osteopênicas submetidas à irradiação *laser*. No entanto, não foi encontrado nenhum estudo na literatura que analisou a ação da terapia *laser* nas propriedades biomecânicas de ossos osteotomizados de ratas osteopênicas. Portanto, novos estudos são necessários com intuito de esclarecer se a terapia *laser* é capaz de melhorar as propriedades biomecânicas em ratas induzidas ao processo de osteoporose.

É importante ressaltar que é difícil comparar os estudos sobre os efeitos do *laser* de baixa intensidade no tecido ósseo, pois os parâmetros dosimétricos, modelos experimentais e duração de tratamento são muito distintos. Além disso, a ausência de uma janela terapêutica específica para a dosimetria no tratamento de consolidação óssea torna o uso clínico da terapia *laser* muito limitado. Nesse contexto, esse estudo teve como objetivo analisar os efeitos de duas diferentes fluências do *laser* (830nm), a fim de se definir um melhor parâmetro para a aplicação do *laser* em defeitos ósseos. Estudos recentes têm sugerido a utilização de fluências elevadas para estimular o metabolismo ósseo (Rennó et al., 2007). Em um estudo *in vitro*, Rennó et al. (2007) compararam os efeitos do *laser* de 830nm, nas fluências de 1, 5 e 10J/cm² e demonstraram que a maior fluência foi mais eficaz para produzir aumento da proliferação de osteoblastos e da atividade da fosfatase alcalina. Pretel et al. (2007) também mostraram um efeito bioestimulatório do *laser* (780nm, 35mW, 178J/cm²) no remodelamento ósseo em mandíbulas osteotomizadas de ratos. Após 15 dias, os grupos irradiados apresentaram maior formação de matriz óssea comparados ao grupo controle.

Cumpramos ressaltar que ainda não existem na literatura, dados conclusivos a respeito da melhor dosimetria a ser utilizada na estimulação do tecido ósseo, especialmente no tecido osteoporótico. No presente estudo, com base nas análises de tecido ósseo neoformado e de

birrefringência das fibras colágenas, pode-se sugerir uma tendência a uma resposta dose-dependente. Estes resultados corroboram com uma série de estudos que verificaram que o *laser* aplicado em fluências e potências altas promove uma melhor resposta tecidual e celular (Dortbudak, 2000; Ozawa et al., 1998; Tamura et al., 1998). Quanto ao comprimento de onda, considera-se que a escolha do valor de 830nm foi adequada, visto que o pico de penetração tecidual ocorre no limite do infravermelho próximo. É consenso que os comprimentos de onda mais longos, dentro da faixa do infravermelho próximo (700nm até 980nm) são mais adequados para o tratamento de estruturas mais profundas (Kawasaki e Shimizu, 2000; Pinheiro et al., 2001).

Embora os efeitos osteogênicos do *laser* na regeneração óssea já tenham sido verificados em estudos prévios, os mecanismos pelos quais a LLLT estimula as células ósseas não são totalmente conhecidos. Ainda não está claro se a bioestimulação da formação óssea é decorrente de um efeito nas células mesenquimais, estimulando sua diferenciação em osteoblastos. Pinheiro et al. (2001) afirmaram que a LLLT pode aumentar a liberação de fatores de crescimento, os quais estimulam a diferenciação e a proliferação celular, possibilitando maior deposição de matriz óssea. Além disso, segundo Rennó et al. (2006) a LLLT também pode estimular a atividade dos osteoblastos, que está diminuída com a ovariectomia.

Em síntese, os resultados deste estudo demonstraram que a LLLT, nas duas fluências utilizadas, foi eficaz para estimular o reparo ósseo em tíbias de ratas osteopênicas, sugerindo que ambas as fluências podem ser usadas para tratamento de fraturas de difícil consolidação, em especial associadas a processos patológicos osteometabólicos, como a osteoporose. No entanto, mais estudos são oportunos para melhor elucidar esta questão.

4.6 REFERÊNCIAS

- Andrade, G.B., Montes, G.S., Conceição, G.M.S., Saldiva, P.H.N., 1999. Use of the Picrosirius-polarization method to age fibrotic lesions in the hepatic granulomas produced in experimental murine schistosomiasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 93, 265–272.
- Carvalho, P.T.C., Silva, I.S., Reis, F.A., Belchior, A.C.G., Facco, G.G., Guimarães, R.N., Fernandes, G.H.C., Denadai, A.S., 2006. Effect of 650nm low-power laser on bone morphogenetic protein in bone defects induced in rat femors. *Acta Cir. Bras.* 21, 63-68.
- Comelekoglu, U., Bagis, S., Yalin, S., Ogenler, O., Yildiz, A., Sahin, O., Oguz, I., Hatungil, R., 2007. Biomechanical evaluation in osteoporosis: ovariectomized rat model. *Clin. Rheumatol.* 26, 380-384.
- Coombe, A.R., Ho, C.T., Darendeliler, M.A., Hunter, N., Philips, J.R., Chapple, C.C., Yum, L.W., 2001. The effects of low level laser irradiation on osteoblastic cells. *Clin. Orthod. Res.* 4, 3-14.
- Culhan, E.G., Jimenez, H.I., King, C.B.K., 1994. Thoracic kyphosis, rib mobility, and lung volumes in normal women and women with osteoporosis. *Spine.* 19, 1250-1255.
- Diniz, J.S., Nicolau, R.A., de Melo Ocarino, N., do Carmo Magalhães, F., de Oliveira Pereira, R.D., Serakides, R., 2009. Effect of low-power gallium-aluminum-arsenium laser therapy (830 nm) in combination with bisphosphonate treatment on osteopenic bone structure: an experimental animal study. *Lasers Med. Sci.* 24, 347-352.
- Dortbudak, O., 2000. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. *Clin. Oral Impl Res.* 16, 540-545.
- Forwood, M.R., 1996. Inducible cyclo-oxygenase (COX-2) mediates the induction of bone formation by mechanical loading in vivo. *J. Bone Miner. Res.* 11, 1688-1693.

- Garavello-Freitas, I., Baranauskas, V., Cruz-Höfling, M.A., 2000. Laser effects on osteogenesis. *Appl. Surf. Sci.* 154, 548-554.
- Garavello-Freitas, I., Baranauskas, V., Joazeiro, P.P., Padovani, C.R., Dal Pai-Silva, M., da Cruz-Höfling, M.A., 2003. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. *J. Photochem. Photobiol. B.* 70, 81-89.
- Gauthier, O., Müller, R., von Stechow, D., Lamy, B., Weiss, P., Bouler, J.M., Aguado, E., Daculsi, G., 2005. In vivo bone regeneration with injectable calcium phosphate biomaterial: A three-dimensional micro-computed tomographic, biomechanical and SEM study. *Biomaterials.* 26, 5444-5453.
- Kalu, D.N., 1991. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner.* 15, 171-192.
- Karu, T.I., Lubart, R., 2000. Effects of low-power light on biological systems. V. Amsterdam, Netherlands: Proceedings of SPIE, 01-17.
- Kawasaki, K., Shimizu, N., 2000. Effects of low-energy laser irradiation on bone remodeling during experimental tooth movement in rats. *Lasers Surg. Med.* 26, 282-291.
- Klein, R.F., Mitchel, S.R., Phillipis, T.J., Belknap, J.K., Orwoll, E.S., 1998. Quantitative trait loci affecting peak bone mineral density in mice. *J. Bone Miner. Res.* 13, 1648-1656.
- Li, J., Burr, D.B., Turner, C.H., 2002. Suppression of prostaglandin synthesis with NS-398 has different effects on endocortical and periosteal bone formation induced by mechanical loading. *Calcif. Tissue Int.* 70, 320-329.
- Lirani-Galvão, A.P., Jorgetti, V., da Silva, O.L., 2006. Comparative study of how low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound affect bone repair in rats. *Photomed. Laser Surg.* 24, 735-740.

- Liu, X., Lyon, R., Meier, H.T., Thometz, J., Haworth, S.T., 2007. Effect of lower-level laser therapy on rabbit tibial fracture. *Photomed. Laser Surg.* 25, 487-494.
- Luger, E.J., Rochkind, S., Wollman, Y., Kogan, G., Dekel, S., 1998. Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. *Lasers Surg. Med.* 22, 97-102.
- Matsumoto, M.A., Ferino, R.F., Monteleone, G.F., Ribeiro, D.A., 2009. Low-level laser therapy modulates cyclo-oxygenase-2 expression during bone repair in rats. *Laser Med. Sci.* 24, 195-201.
- Miranda, S.R., Filho, H.N., Padovan, L.E., Ribeiro, D.A., Nicolielo, D., Matsumoto, M.A., 2006. Use of platelet-rich plasma under autogenous onlay bone grafts. *Clin. Oral Impl. Res.* 17, 694-699.
- Mitchel, S.R., Klein, R.F., Phillipis, T.J., Belknap, J.K., Orwoll, E.S., 1998. Quantitative trait loci affecting peak bone mineral density in mice. *J. Bone Miner. Res.* 13, 1648-1656.
- Montes, G.S., 1996. Structural biology of the fibers of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol. Int.* 20, 15-27.
- Ozawa, Y., Shimizu, N., Kariya, G., 1998. Low-energy laser irradiation stimulates bone module formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *Bone.* 22, 347-354.
- Pasco, J.A., Seeman, E., Henry, M.J., Merriman, E.N., Nicholson, G.C., Kotowicz, M.A., 2006. The population burden of fractures originates in women with osteopenia, not osteoporosis. *Osteoporos. Int.* 17, 1404-1409.
- Pickering, S.A.W., Scammell, B.E., 2002. Electromagnetic fields for bone healing. *Low Extrem. Wounds.* 1, 152-160.
- Pinheiro, A.L.B., Oliveira, M.G., Martins, P.P., Ramalho, L.M.P., Oliveira, M.A.M., Novaes-Júnior, A., Nicolau, R.A., 2001. Biomodulatory effects of LLLT on bone regeneration. *Laser Ther.* 13, 73-79.

- Pinheiro, A.L., Limeira-Júnior, F.A., Gerbi, M.E., Ramalho, L.M., Marzola, C., Ponzi, E.A., Soares, A.O., Carvalho, L.C., Lima, H.C., Gonçalves, T.O., 2003. Effect of 830-nm laser light on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone and decalcified cortical osseous membrane. *J. Clin. Laser. Med. Surg.* 21, 383-388.
- Pires-Oliveira, D.A., de Oliveira, R.F., Zangaro, R.A., Soares, C.P., 2008. Evaluation of low-level laser therapy of osteoblastic cells. *Photomed. Laser Surg.* 26, 401-404.
- Pretel, H., Lizarelli, R.F.Z., Ramalho, L.T.O., 2007. Effect of low-level laser therapy on bone repair: histological study in rats. *Lasers Surg. Med.* 39, 788-796.
- Rennó, A.C.M., de Moura, F.M., dos Santos, N.S.A., Tirico, R.P., Bossini, P.S., Parizotto, N.A., 2006. Effects of 830-nm laser, used in two doses, on biomechanical properties of osteopenic rat femora. *Photomed. Laser Surg.* 24, 202-206.
- Rennó, A.C.M., McDoNneell, P.A., Parizotto, N.A., Laakso, E.L., 2007. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro. *Photomed. Laser Surg.* 25, 275-280.
- Ribeiro, D.A., Matsumoto, M.A., 2008. Low-level laser therapy improves bone repair in rats treated with anti-inflammatory drugs. *J. Oral Rehabil.* 35, 925-933.
- Sato, Y., Arai, N., Negishi, A., Ohya, K., 1997. Expression of cyclo-oxygenase genes and involvement of endogenous prostaglandin during osteogenesis in the rat tibial bone marrow cavity. *J. Med. Dent. Sci.* 44, 81-92.
- Sinaki, M., Wollan, P.C., Scott, R.W., Gelczer, R.K., 1996. Can strong extensor prevent vertebral fractures in women with osteoporosis? *Mayo Clinic. Proc.* 71, 951-956.
- Stein, A., Benayahu, D., Maltz, L., Oron, U., 2005. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed. Laser Surg.* 23, 161-166.

- Tamura, K., Hosoya, S., Hiratsuka, K., Abiko, Y., 1998. Enhancement of mouse CDC46 gene expression in the osteoblast by laser irradiation. *Laser Ther.* 10, 25-32.
- Tsuji, M., Kawano, S., Tsuji, S., Sawaoka, H., Hori, M., DuBois, R.N., 1998. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell.* 93, 705-716.
- Wang, W., Bergh, A., Damber, J.E., 2009. Increased expression of CCAAT/enhancer-binding protein beta in proliferative inflammatory process. *Lasers Med. Sci.* 24, 195-201.
- Zhang, X., Schwarz, E.M., Young, D.A., Puzas, E., Rosier, R.N., O'Keefe, R.J., 2002. Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. *J. Clin. Invest.* 109, 1405-1415.

5. ESTUDO II

“Biosilicato[®] associado à terapia *laser* de baixa intensidade otimiza o reparo ósseo em ratas osteopênicas”

Paulo Sérgio Bossini¹, Ana Claudia Muniz Rennó², Daniel Araki Ribeiro², Renan Fangel¹,
Oscar Peitl³, Edgar Dutra Zanotto³, Nivaldo Antonio Parizotto¹

¹ Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Rodovia Washington Luís (SP-310), Km 235, CEP. 13565-905, São Carlos, SP, Brasil.

² Departamento de Biociências, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Avenida Ana Costa, 95, CEP. 11050-240, Santos, SP, Brasil.

³ Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV), Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Rodovia Washington Luís (SP-310), Km 235, CEP. 13565-905, São Carlos, SP, Brasil.

5.1 RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos de um biomaterial (Biosilicato[®]) associado à terapia *laser* de baixa intensidade (LLLT) no reparo ósseo de ratas osteopênicas. Quarenta ratas, fêmeas, da linhagem *Wistar* (12 semanas de idade, \pm 250g) foram submetidas à ovariectomia (OVX). Sessenta dias após a OVX foi realizado um defeito ósseo em ambas as tíbias de todos os animais, sendo distribuídos aleatoriamente em quatro grupos com dez animais cada: grupo controle com defeito ósseo sem tratamento (GC); grupo defeito ósseo preenchido com Biosilicato[®] (GB); grupo defeito ósseo preenchido com Biosilicato[®] e irradiado com LLLT, com fluência de 60J/cm² (GBL60); e grupo defeito ósseo preenchido com Biosilicato[®] e irradiado com LLLT, com fluência de 120J/cm² (GBL120). O Biosilicato[®] foi utilizado na forma de partículas com granulometria de 180-212 μ m e os animais tratados com *laser* (Ga-Al-As, 830nm, 100mW) foram irradiados em um único ponto sobre o defeito ósseo por sete sessões, em dias alternados. Para as conclusões das análises estatísticas foi utilizado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). Os resultados demonstraram que a LLLT, nas fluências de 60J/cm² e 120J/cm², estimulou a expressão de COX-2 nas células circunjacentes ao biomaterial, promoveu aumento na deposição de fibras colágenas e na resposta biomecânica. A análise morfométrica revelou que os animais com defeitos ósseos preenchidos com Biosilicato[®] e submetidos à irradiação *laser* com fluência de 120J/cm²

apresentaram maior área de osso neoformado quando comparados aos animais dos demais grupos. Os dados deste estudo indicam que a LLLT, principalmente na fluência de 120J/cm², associada à aplicação do Biosilicato[®], favoreceu o processo de reparo ósseo em defeitos induzidos em tíbias de ratas osteopênicas. Tais achados são fundamentais na elucidação dos mecanismos biológicos envolvidos no reparo de fraturas de difícil consolidação.

Palavras-chave: biomateriais, terapia *laser* de baixa intensidade, reparo ósseo, osteoporose.

5.2 INTRODUÇÃO

A osteoporose, doença esquelética sistêmica, é caracterizada pela diminuição da massa óssea e pela deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, levando a um consequente aumento de sua fragilidade (Morri e Genant, 1997; Amadei *et al.*, 2006).

Muitos autores sugerem que em indivíduos osteoporóticos há uma diminuição da atividade proliferativa das células progenitoras de osteoblastos, diminuição da resposta osteoblástica aos estímulos de sinalização e um desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea (Morri e Genant, 1997; Kubo *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 2001). A redução da densidade mineral óssea devido à osteoporose, conseqüentemente, gera um possível atraso na consolidação de fraturas e compromete a qualidade do reparo ósseo (Hollinger *et al.*, 2008).

Neste contexto, há necessidade de avanços biofísicos e bioquímicos na tentativa de melhorar o processo de reparo ósseo (Gauthier *et al.*, 2005). Um tratamento promissor é o uso de biovidros e polímeros com o intuito de induzir a osteogênese e estimular a consolidação de fraturas (Clupper *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2005). Alguns estudos têm demonstrado que polímeros biodegradáveis e vidros bioativos podem ser usados como enxertos no tratamento de defeitos ósseos de grandes extensões, principalmente, pela facilidade em adaptarem-se à forma do defeito, ao seu potencial em estimular a osteogênese e à sua capacidade em promover a união óssea (Oonishi *et al.*, 1997; Vogell *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2008). No entanto, o sucesso dos biomateriais e a melhora no processo de consolidação de fraturas são

dependentes das características do material, tais como, a composição, a solubilidade e o tamanho das partículas (Vogell *et al.*, 2001).

Um dos vidros bioativos mais estudados é o *Bioglass*[®] 45S5, que tem sido conhecido com o maior índice de bioatividade (Clupper *et al.*, 2003). Recentemente, nosso grupo de pesquisa desenvolveu uma nova vitrocerâmica bioativa completamente cristalizada de composição quaternária Na₂O-CaO-P₂O₅-SiO₂ (Biosilicato[®], Zanotto *et al.*, 2004, patente WO 2004/074199) que apresenta indícios de um melhor índice de bioatividade e efeitos estimulatórios no metabolismo ósseo (Moura *et al.*, 2007). No estudo de Moura *et al.* (2007), os autores compararam o crescimento de células osteogênicas com Biosilicato[®] e *Bioglass*[®] 45S5 e não detectaram diferenças significativas no conteúdo protéico e na atividade da fosfatase alcalina no 11^o e 17^o dia. Entretanto, o Biosilicato[®] apresentou uma melhor resposta em relação às áreas de matriz calcificada no 17^o dia, *in vivo*. Tais resultados indicam que o Biosilicato[®] pode promover aumento da formação de tecido ósseo.

A partir dessas observações, surgiu a hipótese de que o Biosilicato[®] seria eficaz na aceleração do processo de consolidação de fraturas e poderia servir como um substituto para o tecido ósseo. Sendo assim, nosso grupo de pesquisa iniciou um estudo *in vivo*, investigando os efeitos do Biosilicato[®], utilizado em duas granulometrias (180-212µm e 300-355µm), na consolidação de defeitos ósseos induzidos em tíbias de ratos. Foi observado que 20 dias após a lesão, os defeitos ósseos preenchidos com partículas de Biosilicato[®] (180-212µm de diâmetro) apresentavam propriedades mecânicas similares a de ossos não fraturados. Quando comparados a defeitos preenchidos com partículas de *Bioglass* 45S5[®], as lesões ósseas com Biosilicato[®] apresentaram melhor reorganização tecidual, com maior volume ósseo e maior número de osteoblastos (Granito *et al.*, 2009).

Da mesma forma, há evidências de que a terapia *laser* de baixa intensidade (LLLT) apresenta efeitos positivos no metabolismo ósseo e na consolidação de fraturas (Luger *et al.*,

1998; Ozawa *et al.*, 1998; Rennó *et al.*, 2007; Blaya *et al.*, 2008; Matsumoto *et al.*, 2009). Resultados encontrados em uma série de estudos, sugerem que a LLLT promove aumento da atividade mitocondrial e síntese de ATP (Vladimirov *et al.*, 2004; Ninomiya *et al.*, 2007), aumento da síntese de colágeno, aumento da proliferação e diferenciação de osteoblastos, maior recrutamento de macrófagos e aumento da angiogênese, resultando na aceleração do processo de reparo tecidual (Stein *et al.*, 2005; Lirani-Galvão *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007).

De acordo com o exposto, tanto os materiais bioativos como a LLLT apresentam efeitos benéficos no reparo ósseo, demonstrando um importante potencial osteogênico. No entanto, existe uma grande lacuna na literatura em relação a estudos que avaliem a interação dos biomateriais com a LLLT, especialmente no tecido ósseo osteopênico. Existem também controvérsias a respeito de quais são os melhores parâmetros da terapia *laser* a serem utilizados na obtenção de resultados eficazes no tecido alvo, já que a janela terapêutica é muito ampla e cada tecido possui sua especificidade (Coombe *et al.*, 2001). Dessa forma, esse estudo teve como objetivo investigar os efeitos de um novo material bioativo (Biosilicato[®]), associado à terapia *laser*, no reparo de defeitos ósseos induzidos em tíbias de ratas osteopênicas.

5.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Esse estudo foi conduzido de acordo com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) (Parecer 025/2006). Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Fisioterapia da UFSCar durante todo o período experimental e foram alojados individualmente em gaiolas apropriadas de polietileno padrão, em condições

ambientais controladas (19-23°C e ciclo claro/escuro de 12/12 horas), com livre acesso a água e ração própria (Primor Rações).

Um total de 40 ratas, fêmeas, da linhagem *Wistar* (12 semanas de idade, média de 250g) foram submetidas à ovariectomia para indução da osteopenia. Este modelo é amplamente utilizado como um modelo experimental de osteopenia animal e é conhecido por diminuir significativamente a massa óssea, 60 dias após a operação (Kalu, 1991). Para a realização da ovariectomia, os animais foram submetidos à anestesia composta por Ketamina/Xilazina (80/10mg/Kg). Em seguida, a região abdominal foi tricotomizada digitalmente e foram realizadas incisões translobares bilaterais, o que possibilitou a localização e retirada dos ovários. Após esses procedimentos, foram realizadas suturas internas com fio cirúrgico reabsorvível 3-0 (Shalon[®], Catgut Cromado) e suturas externas com fio de náilon monofilamentar 4-0 (Shalon[®]).

No 61º dia após a ovariectomia, foi realizado um defeito ósseo em ambas as tíbias de todos os animais. O procedimento foi feito sob anestesia de Ketamina/Xilazina (80/10mg/Kg). As regiões mediais das tíbias foram tricotomizadas digitalmente e desinfetadas com iodopovidona. Incisões nas regiões cutâneas e musculares foram realizadas para expor a tíbia. Os defeitos ósseos, com cavidade de 2,0mm de diâmetro, foram realizados por meio de uma minifuradeira a 12.000rpm, sob irrigação constante com solução salina. A lesão foi realizada de modo a penetrar a cortical medial e danificar o canal medular abaixo, porém, sem atingir a face contralateral. Em seguida, a musculatura e a pele foram suturadas com fio de náilon monofilamentar 4-0 (Shalon[®]) e as ratas foram observadas diariamente (Granito *et al.*, 2009).

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, com dez animais cada: **grupo 1:** controle com defeito ósseo sem tratamento (GC); **grupo 2:** defeito ósseo preenchido com Biosilicato[®] (GB); **grupo 3:** defeito ósseo preenchido com Biosilicato[®] e

irradiado com *laser* com fluência de 60J/cm² (GBL60) e **grupo 4:** defeito ósseo preenchido com Biosilicato[®] e irradiado com *laser* com fluência de 120J/cm² (GBL120).

5.3.1 Biomaterial

O material bioativo (Biosilicato[®]) foi desenvolvido pelos pesquisadores do Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), com objetivo de produzir uma vitrocerâmica que conservasse o elevado nível de bioatividade que é apresentado pelos vidros bioativos, e que, ao mesmo tempo, apresentasse melhores propriedades mecânicas. Com este intuito, desenvolveram um material composto por um sistema quaternário de Na₂O-CaO-P₂O₅-SiO₂, completamente cristalizado por um tratamento térmico específico. Os detalhes da composição e do tratamento térmico estão descritos na patente WO 2004/074199 (Zanotto *et al.*, 2004).

O Biosilicato[®] foi utilizado na forma de partículas com granulometria de 180-212µm e foi aplicado por meio de uma espátula até o preenchimento completo do defeito ósseo, logo após a realização do mesmo (Granito *et al.*, 2009).

5.3.2 Terapia *Laser* de Baixa Intensidade

Nesse estudo foi utilizado um *laser* de diodo com meio ativo composto por arseneto de gálio e alumínio (Ga-Al-As), (Thera lase[®], DMC São Carlos, SP, Brasil), 830nm, área do feixe de 0,028cm², 100mW, 60J/cm² (1,7J) e 120J/cm² (3,4J) com um tempo de irradiação de 17s e 34s, respectivamente. A irradiação foi iniciada imediatamente após a realização dos defeitos ósseos e no segundo, quarto, sexto, oitavo, décimo e décimo segundo dias após a operação, totalizando sete aplicações. O *laser* foi aplicado utilizando a técnica pontual em

contato em um único ponto sobre o defeito ósseo. No décimo quarto dia pós-operatório, os animais foram submetidos a uma dose letal de anestésico, injetado por via intraperitoneal. Após a eutanásia, as tíbias, tanto direita quanto esquerda, de cada animal foram retiradas para serem analisadas.

5.3.3 Análise Histopatológica

Para a realização da análise histopatológica, as tíbias direitas foram fixadas em formalina tamponada a 10% (Merck, Darmstadt, Germany) por 24 horas, descalcificadas em solução de EDTA a 4% (Merck) e, posteriormente, incluídas em blocos de parafina. Na sequência, os blocos de parafina foram cortados longitudinalmente, com espessura padronizada de 5 μ m e os cortes foram montados em lâminas histológicas.

A análise qualitativa da região do defeito ósseo foi realizada por meio de lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina (HE, Merck). Para tal, foi utilizado um microscópio de luz (Olympus, Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan) e foram observadas as seguintes alterações no local da lesão: presença de tecido ósseo, tecido medular, processo inflamatório e/ou tecido de granulação e metaplasia em cada animal.

5.3.4 Imunohistoquímica

Para a realização da imunohistoquímica foram confeccionadas lâminas histológicas com cortes seriados de 4 μ m de espessura. A parafina foi removida com xilol e os cortes foram reidratados em etanol e, em seguida, imersos em solução de tampão citrato a 0,01M (pH 6,0) em microondas (850W) por três ciclos de cinco minutos cada para recuperação antigênica. O material foi pré-incubado com peróxido de hidrogênio a 0,3% em solução de tampão fosfato

(PBS) por cinco minutos para inativação da peroxidase endógena e, na sequência, bloqueado em soro fetal bovino a 5%, diluído em solução de PBS por dez minutos.

As amostras foram incubadas com anti-COX-2 (ciclo-oxigenase-2) anticorpo primário policlonal (Santa Cruz Biotechnology, USA) na concentração de 1:200, anti-CBFA-1 (fator de transcrição de diferenciação osteoblástica) anticorpo primário policlonal (Santa Cruz Biotechnology, USA) na concentração de 1:200 e anti-VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) anticorpo primário monoclonal (Santa Cruz Biotechnology, USA) na concentração de 1:200. A incubação foi realizada em refrigerador (a 4°C) por um período de 12 horas, seguida de dois banhos em solução de PBS, com duração de cinco minutos cada.

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

5.3.5 Morfometria

A morfometria da área de osso neoformado, na região do defeito ósseo de cada animal, foi mensurada utilizando um sistema de análise de imagem Motic Images Plus, versão 2.0. As lâminas foram coradas com Tricrômico de Masson (TM) e para a realização da análise

foram selecionados três campos da região cortical do defeito, nomeados de C1 e C3 as regiões próximas à parede do defeito, e C2, correspondente à região central do defeito. O tecido ósseo neoformado presente nessas regiões foi mensurado e a área registrada na objetiva de 10X. Depois de registradas, as áreas foram somadas resultando na área total de tecido ósseo neoformado, com o valor expresso em micrômetros quadrados (μm^2) (Miranda *et al.*, 2006).

5.3.6 Birrefringência

Os cortes histológicos corados pelo método do *Picrosirius-red* foram analisados em um microscópio de luz polarizada (Leica) para avaliar as alterações estruturais na neoformação da matriz trabecular. Este método permite uma avaliação qualitativa e quantitativa da fase de organização da matriz óssea, baseado na birrefringência dos feixes de fibras colágenas após coloração com *Picrosirius-red* (Montes, 1996; Andrade *et al.*, 1999; Garavello-Freitas *et al.*, 2003).

Para a realização da análise quantitativa foi utilizado o *software* ImageJ, em que é possível quantificar a intensidade do brilho de birrefringência calculando-se a intensidade em “*pixels*” da cor dada pelo *Picrosirius-red* sob luz polarizada. A intensidade de brilho da birrefringência é proporcional à organização das fibras colágenas. As fibras colágenas mais espessas e fortemente birrefringentes apresentam-se coradas em tons de laranja a vermelho, o que corresponde ao colágeno mais anisotrópico (Garavello-Freitas *et al.*, 2003). Foram avaliados dez campos na região do defeito, em aumento de 100X, possibilitando assim a análise de todo o foco de lesão. Os valores correspondentes a cada campo foram somados, resultando no valor total de birrefringência das fibras colágenas do defeito ósseo por animal.

5.3.7 Análise Biomecânica

A análise biomecânica foi realizada por meio do teste de flexão de três pontos na tíbia esquerda dos animais de todos os grupos. O teste foi realizado no Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar, em uma máquina de ensaio universal Instron, modelo 4444, em temperatura ambiente.

Para a realização do teste foi utilizada uma célula de carga com capacidade máxima de 1kN, pré-carga de 5N e velocidade constante de 0,5cm/min. As extremidades da tíbia foram apoiadas em dois suportes metálicos, com distância de 3,8cm entre eles, expondo somente 1,8cm do corpo de prova. As tíbias foram posicionadas com a região do defeito voltada para baixo e a força foi aplicada perpendicularmente ao eixo longitudinal do osso, por uma haste cilíndrica até o momento da fratura. A força aplicada e o deslocamento do endentador foram monitorados e registrados por meio de um *software* próprio do equipamento (Instron Series IX). A partir da curva de carga/deformação foram obtidos os valores de carga máxima (N) (Rennó *et al.*, 2006).

5.3.8 Análise Estatística

Os dados foram analisados estatisticamente por meio de técnicas descritivas, na forma de médias e desvios-padrão. O teste de normalidade de Shapiro-Wilk's foi utilizado para todas as variáveis. Nos casos em que houve distribuição normal da amostra, as comparações foram feitas utilizando testes de análise de variância (ANOVA), seguidas do *post-hoc* de Tukey. Nos casos não paramétricos, o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado, seguido do teste de Mann-Whitney para discriminar as diferenças. As análises foram realizadas no *software*

STATISTICA, versão 7.0. Para as conclusões das análises estatísticas foi utilizado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

5.4 RESULTADOS

5.4.1 Achados Gerais

Durante o período experimental, os animais não apresentaram complicações pós-operatórias. Eles regressaram rapidamente à sua dieta normal e não demonstraram perda de massa corporal. Além disso, nenhum animal morreu durante o experimento e não foi detectada a presença de infecção na área da lesão.

5.4.2 Análise Histopatológica

Em relação ao grupo controle, todas as amostras apresentaram tecido ósseo no interior do defeito, 14 dias após a operação. Além disso, os defeitos estavam preenchidos por tecido medular e alguns fragmentos ósseos, possivelmente devido ao procedimento operatório (Figura 15A). Em nenhuma amostra deste grupo foi observada a presença de processo inflamatório agudo. Nos animais tratados apenas com o Biosilicato[®], o defeito ósseo estava predominantemente preenchido pelo biomaterial, com ausência de tecido ósseo neoformado na maioria das amostras e presença de tecido de granulação nas áreas circunjacentes à parede do defeito ósseo (Figura 15B). Quanto ao grupo tratado com Biosilicato[®] e irradiado com *laser* com fluência de 60J/cm², observou-se a presença do biomaterial preenchendo todos os defeitos ósseos, associada à presença de tecido de granulação e tecido ósseo (Figura 15C). No grupo tratado com Biosilicato[®] e irradiado com *laser* com fluência de 120J/cm², evidenciou-se

um efeito mais acentuado, no que tange a formação óssea, ou seja, houve a presença de tecido ósseo em aposição à superfície do biomaterial na maioria dos casos. O tecido de granulação também estava presente neste grupo (Figura 15D). Em geral, os resultados indicam, por meio da análise morfológica subjetiva, que o Biosilicato[®] associado à terapia *laser* otimizou o reparo ósseo em ratas osteopênicas, principalmente com a fluência de 120J/cm².

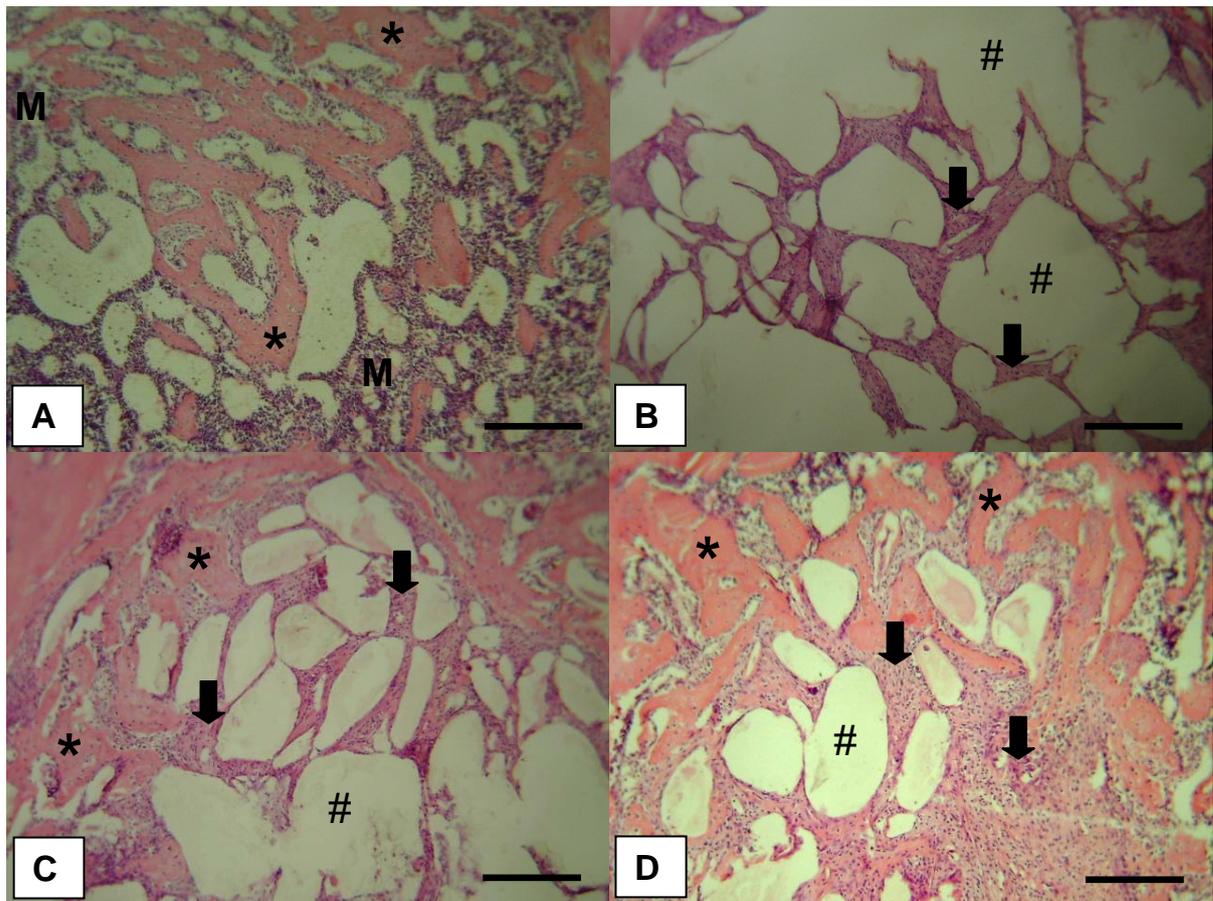


Figura 15. Fotomicrografias dos achados morfológicos dos diferentes grupos experimentais.

Em (A), defeito ósseo do grupo controle, com presença de tecido ósseo neoformado (*) e tecido medular (M). Em (B), grupo tratado com Biosilicato[®], notam-se as partículas do biomaterial (#) e tecido de granulação (seta). Em (C), grupo Biosilicato[®] + *laser* 60J/cm² e (D) grupo Biosilicato[®] + *laser* 120J/cm², observam-se a presença de biomaterial (#), tecido ósseo neoformado (*) e tecido de granulação (seta). (Coloração: H.E., Barra = 40µm).

5.4.3 Imunohistoquímica

A expressão de COX-2 foi detectada predominantemente no citoplasma. No décimo quarto dia pós-operatório, a imunorreatividade à COX-2 estava presente no tecido medular dos defeitos ósseos do grupo controle (Figura 16A). No grupo tratado apenas com o Biosilicato[®], a expressão de COX-2 foi observada, com um padrão inferior, nas células circunjacentes ao biomaterial (Figura 16B). No entanto, a terapia *laser* de baixa intensidade, nas fluências de 60J/cm² e 120J/cm², aumentou a expressão da COX-2 no tecido circunjacente ao biomaterial, bem como no tecido de granulação (Figuras 16C e 16D).

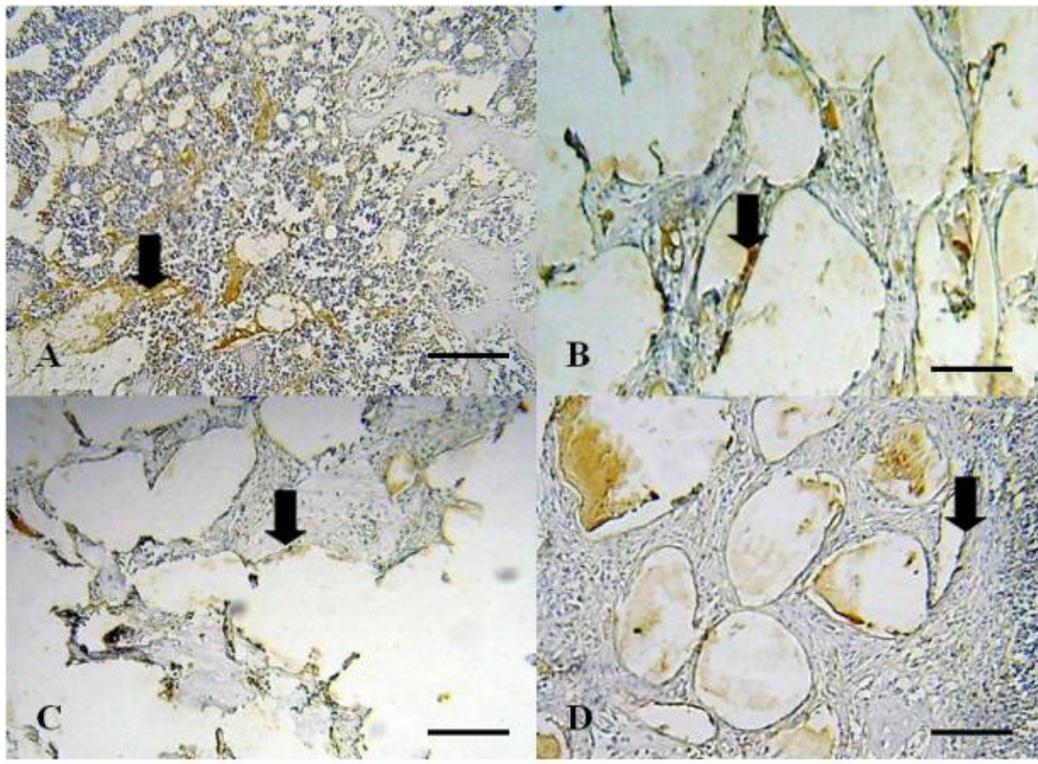


Figura 16. Fotomicrografias representativas da imunoexpressão da COX-2 (setas): (A) grupo controle; (B) grupo tratado com Biosilicato[®]; (C) grupo tratado com Biosilicato[®] + *laser* 60J/cm² e (D) grupo tratado com Biosilicato[®] + *laser* 120J/cm². (Coloração: Imunohistoquímica, Barra = 30µm).

Quanto à imunohistoquímica para o CBFA-1, nota-se que esta foi detectada predominantemente nas células do tecido medular no grupo controle (Figura 17A). O grupo tratado apenas com o Biosilicato[®] apresentou expressividade para este imuno-marcador nas áreas circunjacentes ao biomaterial (Figura 17B). Nos grupos tratados com *laser*, nas fluências de 60J/cm² e 120J/cm², ocorreu um padrão semelhante, ou seja, células positivas ao CBFA-1 foram observadas próximas às partículas de Biosilicato[®] e nas paredes do defeito ósseo (Figuras 17C e 17D, respectivamente). Não foi observada diferença significativa entre os grupos experimentais e controle.

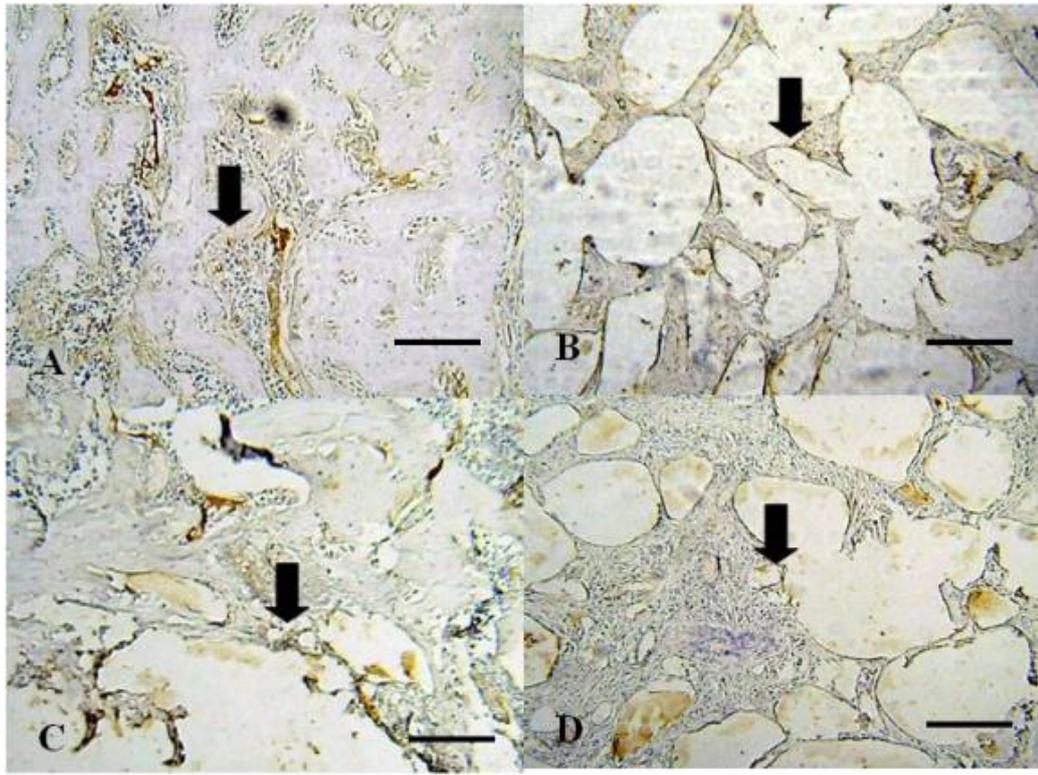


Figura 17. Fotomicrografias representativas da imunoexpressão de CBFA-1 (setas): (A) grupo controle; (B) grupo tratado com Biosilicato[®]; (C) grupo tratado com Biosilicato[®] + *laser* 60J/cm² e (D) grupo tratado com Biosilicato[®] + *laser* 120J/cm². (Coloração: Imunohistoquímica, Barra = 30µm).

A expressão do VEGF foi detectada predominantemente em células das paredes dos capilares, que é formado de células endoteliais. No décimo quarto dia pós-operatório, a imunorreatividade ao VEGF estava presente nas paredes dos capilares dos defeitos ósseos do grupo controle (Figura 18A). No grupo tratado apenas com o Biosilicato[®], a imunoexpressividade ao VEGF foi observada em alguns capilares presentes nas áreas circunjacentes ao biomaterial (Figura 18B). Nos grupos tratados com Biosilicato[®] e *laser*, nas fluências de 60J/cm² e 120J/cm², ocorreu um padrão semelhante, isto é, células positivas ao VEGF foram observadas nas paredes dos capilares dos defeitos ósseos (Figura 18C).

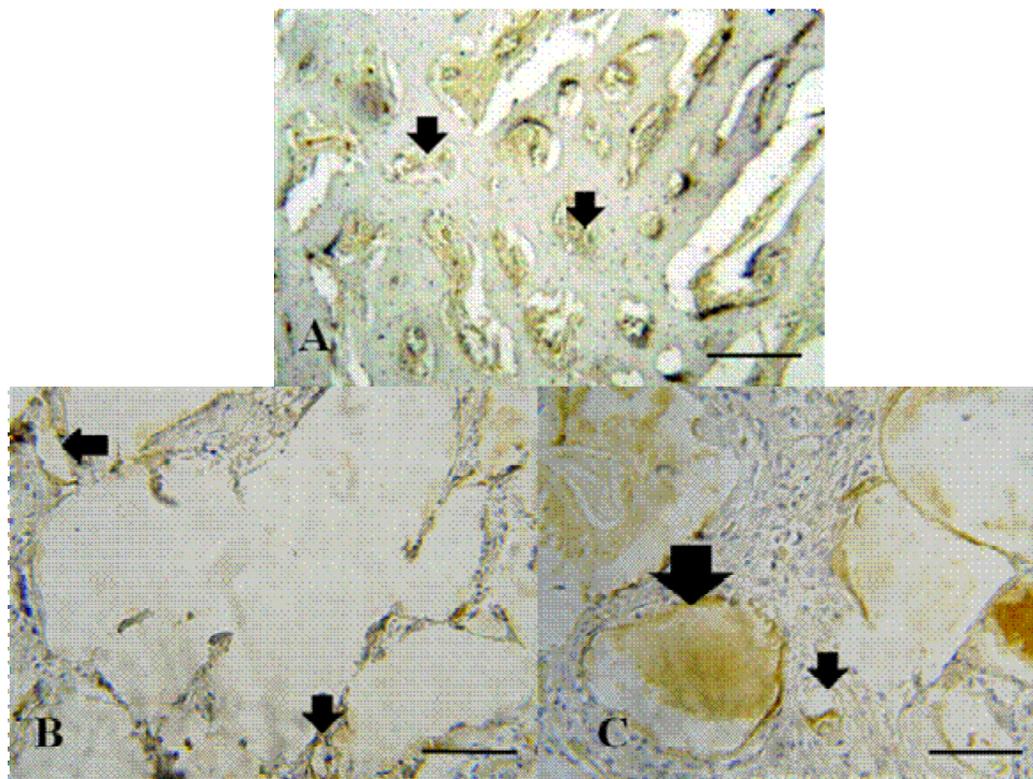


Figura 18. Fotomicrografias representativas da imunoexpressão de VEGF (setas): (A) grupo controle; (B) grupo tratado com Biosilicato[®] e (C) grupo tratado com Biosilicato[®] + *laser* 120J/cm². (Coloração: Imunohistoquímica, Barra = 56µm).

5.4.4 Morfometria

A área de tecido ósseo neoformado do grupo tratado apenas com Biosilicato[®] (GB) foi significativamente menor quando comparada aos demais grupos. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle (GC) e o grupo tratado com Biosilicato[®] e irradiado com *laser* com fluência de 60J/cm² (GBL60). No entanto, os animais tratados com Biosilicato[®] e irradiados com *laser* com fluência de 120J/cm² (GBL120) apresentaram um aumento estatisticamente significativo da área de osso neoformado, corroborando com a análise qualitativa (Figura 19).

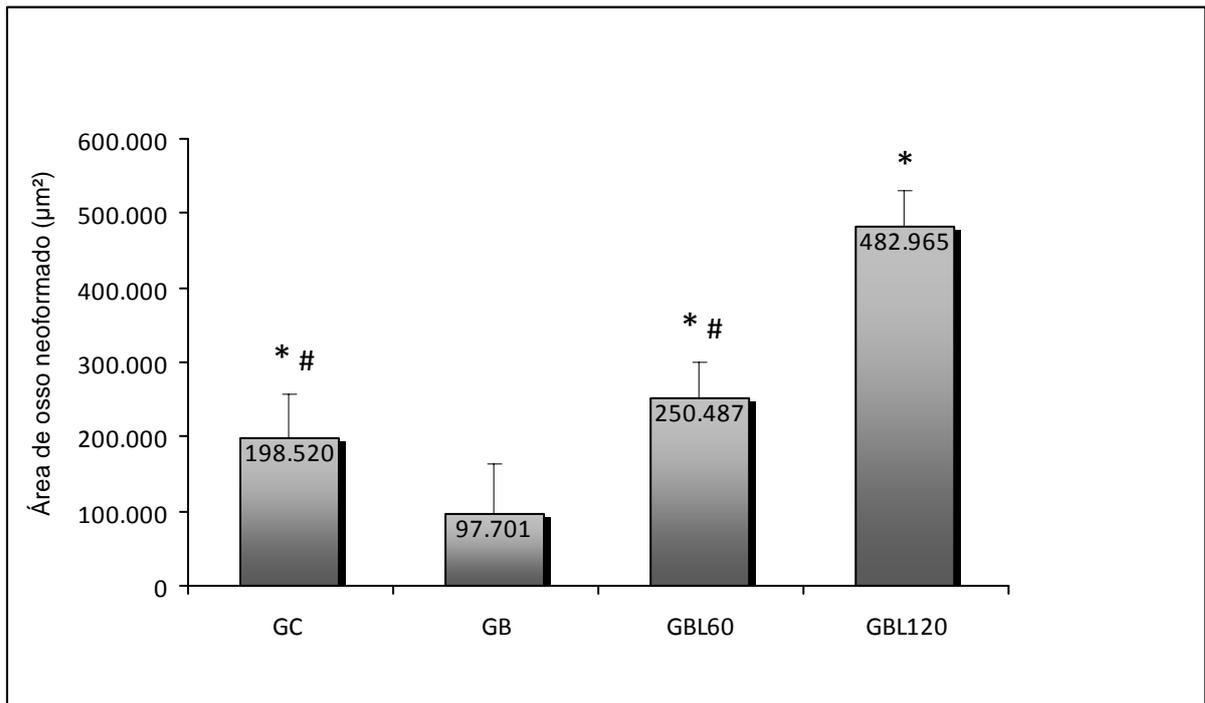


Figura 19. Médias e desvios-padrão da área de osso neoformado nos diferentes grupos experimentais. GC: grupo controle; GB: grupo tratado com Biosilicato[®]; GBL60: grupo tratado com Biosilicato[®] + *laser* 60J/cm² e GBL120: grupo tratado com Biosilicato[®] + *laser* 120J/cm². * p≤0,05 versus GB; # p≤0,05 versus GBL120.

5.4.5 Birrefringência

Na figura 20, observa-se que o grupo tratado apenas com Biosilicato[®] (GB) apresentou média de birrefringência das fibras colágenas estatisticamente menor quando comparado aos demais grupos (GC). Os grupos tratados com Biosilicato[®] e irradiados com *laser* (GBL60 e GBL120) demonstraram um aumento significativo na intensidade de *pixels*, principalmente na fluência de 120J/cm², indicando que esses animais apresentaram maior deposição e melhor organização das fibras colágenas.

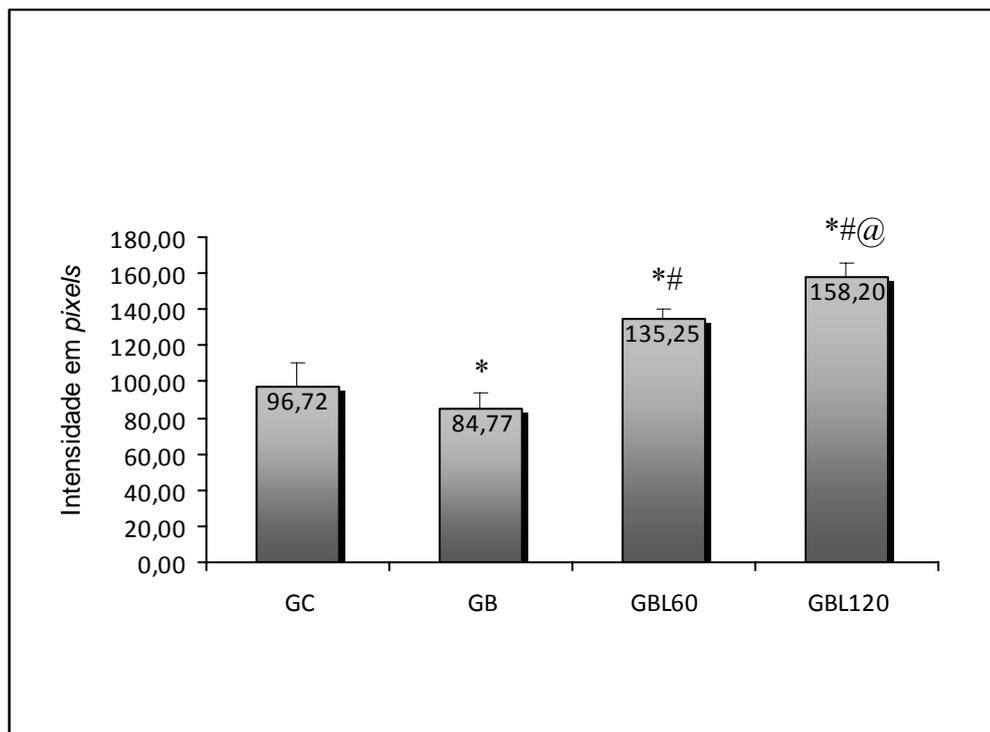


Figura 20. Médias e desvios-padrão de birrefringência das fibras colágenas nos diferentes grupos experimentais. GC: grupo controle; GB: grupo tratado com Biosilicato[®]; GBL60: grupo tratado com Biosilicato[®] + *laser* 60J/cm² e GBL120: grupo tratado com Biosilicato[®] + *laser* 120J/cm². * $p \leq 0,05$ versus GC; # $p \leq 0,05$ versus GB; @ $p \leq 0,05$ versus GBL60.

5.4.6 Análise Biomecânica

A figura 21 refere-se aos dados de carga máxima dos diferentes grupos experimentais. O grupo tratado com Biosilicato[®] e irradiado com *laser* com fluência de 120J/cm² (GBL120) apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle (GC) e ao grupo tratado apenas com Biosilicato[®] (GB). Não foi encontrada nenhuma outra diferença entre os grupos.

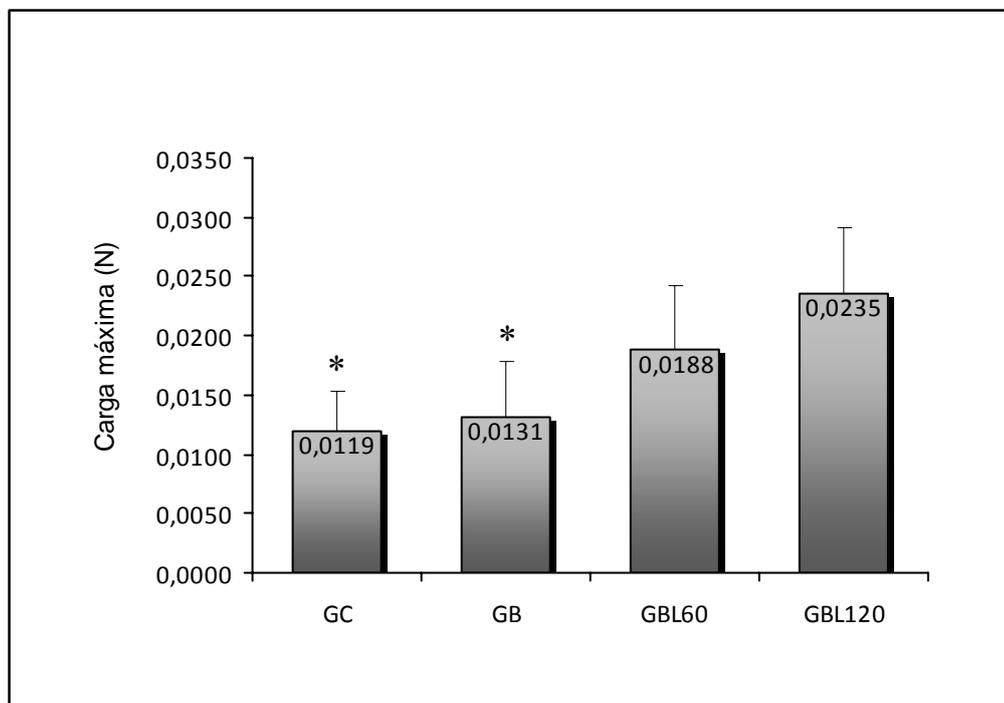


Figura 21. Médias e desvios-padrão da carga máxima nos diferentes grupos experimentais.

GC: grupo controle; GB: grupo tratado com Biosilicato[®]; GBL60: grupo tratado com Biosilicato[®] + *laser* 60J/cm² e GBL120: grupo tratado com Biosilicato[®] + *laser* 120J/cm².

* $p \leq 0,05$ versus GBL120.

5.5 DISCUSSÃO

Vários recursos têm sido propostos com o intuito de estimular a osteogênese e promover a consolidação óssea (Yaiota *et al.*, 2000; Peter *et al.*, 2006; Rutten *et al.*, 2007; Hollinger *et al.*, 2008). Dentre esses, vêm se destacando os efeitos positivos dos materiais bioativos (Hench e Polak, 2002; Moura *et al.*, 2007) e da LLLT (Nicolau *et al.*, 2003; Rennó *et al.*, 2007).

Os resultados desse estudo mostraram que os animais tratados apenas com Biosilicato[®] apresentaram valores inferiores de área de tecido ósseo neoformado, menor deposição de colágeno e menor carga máxima no teste biomecânico. Do mesmo modo, a análise histopatológica qualitativa mostrou que, na maioria das amostras deste grupo, pôde-se observar a ausência de tecido ósseo em aposição à superfície do biomaterial.

O Biosilicato[®] é uma vitrocerâmica bioativa que quando imersa em um meio aquoso promove a liberação de íons, seguida de uma reação de policondensação que produz hidroxicarbonoapatita (HCA) superficialmente. O crescimento de uma camada de HCA na superfície do material promove um ambiente ideal para a reação de colonização de osteoblastos, seguido pela proliferação e diferenciação celular para a neoformação óssea no local do defeito ósseo. A HCA é absorvida pela formação óssea e durante a absorção, a vitrocerâmica reage e transforma-se em HCA. A liberação de íons do biomaterial promove uma solução iônica que estimula a atração, diferenciação e proliferação de osteoblastos (Hench e Polack, 2002; Moura *et al.*, 2007). Talvez, o período de 14 dias pós-operatório utilizado nesse estudo, não tenha sido suficiente para produzir uma adequada interação do biomaterial com o tecido ósseo, quando aplicado isoladamente. Provavelmente, se o tempo do delineamento experimental fosse estendido, poderíamos encontrar resultados positivos.

Moura *et al.* (2007) realizaram um estudo *in vitro* que comparou o crescimento de culturas de células osteogênicas com Biosilicato[®] e Bioglass[®] 45S5 e detectaram que as culturas de células com Biosilicato[®] apresentaram áreas significativamente maiores de matriz calcificada no 17º dia. Além disso, em um estudo *in vivo*, Granito *et al.* (2009) demonstraram que o Biosilicato[®] foi eficaz em induzir a formação óssea e aumentar as propriedades biomecânicas de tíbias de ratos, 20 dias após a indução dos defeitos ósseos.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que o grupo tratado com Biosilicato[®] e irradiado com *laser*, principalmente na fluência de 120J/cm², apresentou maior quantidade de osso neoformado e maiores valores para a carga máxima, quando comparado ao grupo controle, com intensa presença de tecido ósseo neoformado em aposição à superfície do biomaterial.

A LLLT é um método não-invasivo promissor para estimular a osteogênese e acelerar o processo de consolidação de fraturas, por meio de seus efeitos bioquímicos e bioestimulatórios (Nicolau *et al.*, 2003; da Silva e Camilli, 2006; Ribeiro e Matsumoto, 2008). Kazem Shakouri *et al.* (2010) demonstraram que o uso do *laser* (780nm, 4J/cm², 5 minutos/dia) melhorou a formação do calo ósseo em defeitos ósseos induzidos em tíbias de coelhos. Os resultados revelaram aumento significativo da densidade mineral óssea em todos os períodos avaliados (2ª, 5ª e 8ª semanas pós-operatórias), porém, não houve aumento das propriedades biomecânicas. Além disso, alguns autores relataram que a terapia *laser* é capaz de estimular o metabolismo ósseo em ratas osteopênicas (Rennó *et al.*, 2006; Diniz *et al.*, 2009).

Na literatura existem poucos estudos que envolvem a associação da aplicação de biomateriais e da LLLT. Alguns têm demonstrado que os biomateriais promovem uma lenta e gradual neoformação óssea (Pinheiro *et al.*, 2003; Moura *et al.*, 2007) e que a associação com a LLLT promove uma maior estimulação do reparo ósseo por meio do aumento da

angiogênese (Carvalho *et al.*, 2006), das células ósseas (Pinheiro *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2006), da deposição de fibras colágenas organizadas (Pinheiro *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2006), das propriedades biomecânicas (Guzzardella *et al.*, 2003) e da diminuição das reações inflamatórias (Carvalho *et al.*, 2006).

O estudo de Guzzardella *et al.* (2003) demonstrou melhora do processo de reparo ósseo por meio da terapia *laser* (780nm, 300J/cm², 1W, 300Hz, durante 5 dias e tempo de aplicação de 10 minutos ao dia) associada à aplicação de implantes de hidroxiapatita (HA) em defeitos ósseos realizados em fêmures de coelhos. Os autores encontraram resultados positivos em relação ao aumento do tecido ósseo na região de interface entre os implantes de HA e o tecido vivo. Tais dados são referentes ao processo de osteointegração dessa cerâmica bioativa estimulada pela terapia *laser*. Outro aspecto positivo refere-se às propriedades biomecânicas, as quais apresentaram aumento da resistência do tecido irradiado, oriundo de um processo de maturação do tecido ósseo estimulado pela terapia *laser*. Esses resultados corroboram os encontrados em nosso estudo, pois nos dois estudos houve aumento da quantidade de osso neoformado e das propriedades biomecânicas do tecido ósseo associado à presença de biomateriais e da terapia *laser*. Entretanto, é temerário compará-los, devido às diferenças em relação aos modelos e delineamentos experimentais e também às terapias utilizadas, tanto ao que se refere aos biomateriais, quanto à dosimetria da terapia *laser*.

O estudo de Pinheiro *et al.* (2003) analisou o processo de reparo ósseo de fêmures de ratos tratados com Gen-ox[®], composto de osso bovino inorgânico (Gen-ox[®]; Baumer S/A, Mogi Mirim, SP, Brasil), isoladamente ou associado à LLLT. A irradiação *laser* (830nm, 40mW) foi realizada em 4 pontos ao redor do defeito ósseo, com 4J/cm² em cada ponto, em dias alternados, totalizando 7 sessões. Ao redor das partículas do biomaterial foi encontrada a formação de tecido ósseo, com evidente atividade osteogênica do material bioativo. Contudo, foi observado que 30 dias após a cirurgia, ainda havia a presença de biomaterial não

absorvido nos animais dos grupos tratados; assim, poder-se-ia supostamente afirmar que ocorreu um atraso no processo de reparo ósseo, devido à necessidade de reabsorção do material. Além disso, foi encontrada uma maior reação inflamatória nos grupos tratados com o Gen-ox[®], evidenciada por um grande número de macrófagos ao redor do biomaterial. O reparo ósseo do grupo que associou as duas terapias foi caracterizado por uma maior neoformação óssea, bem como uma maior proliferação de fibras colágenas, a partir do 15º dia pós-operatório, em comparação ao grupo que foi tratado somente com o biomaterial.

A análise de birrefringência realizada no presente estudo mostrou que a associação do Biosilicato[®] com a terapia *laser*, principalmente na maior fluência, produziu uma maior deposição de fibras colágenas e uma melhor organização dessas, que pode ser atribuída à energia fornecida pela terapia *laser*. Garavello-Freitas *et al.* (2003) também observaram um aumento na deposição de colágeno em defeitos ósseos irradiados com a LLLT, após o décimo quarto dia pós-operatório. Na birrefringência do colágeno, os tons entre amarelo e vermelho, observados por esses autores nos defeitos ósseos irradiados é indicativo de colágeno do tipo I, característico do tecido ósseo maduro.

Um mecanismo envolvido no processo de estimulação do *laser* sobre o processo de reparo ósseo é o aumento da expressão de ciclo-oxigenase 2 (COX-2) (Matsumoto *et al.*, 2009). A ciclo-oxigenase (COX) é uma enzima chave na conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas e duas isoformas foram identificadas durante o processo inflamatório, a ciclo-oxigenase 1 (COX-1) e a COX-2. A COX-1 é expressa em muitos tecidos e promove a síntese de prostaglandinas necessárias para as funções fisiológicas normais. A COX-2 não é normalmente detectável em tecidos saudáveis, mas é rapidamente induzida por estímulos mitogênicos como nos processos reparativos ou mesmo pró-inflamatórios (Kargman *et al.*, 1996; Hamajima *et al.*, 2003).

Os resultados deste estudo revelaram que a terapia *laser* promoveu o aumento da expressão de COX-2 no reparo ósseo de ratas osteopênicas. Da mesma forma que a irradiação *laser* é capaz de aumentar o suprimento sanguíneo por meio da liberação de fatores de crescimento, tais como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Tsuji *et al.*, 1998) e estimular a proliferação e diferenciação celular (Sato *et al.*, 1997; Dempke *et al.*, 2001), acredita-se que a maior liberação de COX-2 poderia também favorecer o processo de reparo ósseo. Esta hipótese foi confirmada em estudos anteriores, conduzidos pelo nosso grupo, que investigaram o papel da COX-2 durante o reparo ósseo em ratos (Ribeiro e Matsumoto, 2008; Matsumoto *et al.*, 2009). Além disso, Sato *et al.* (1997) relatam que a COX-2 poderia estar envolvida com o processo de osteogênese, provavelmente associada à maturação de osteoblastos.

Para melhor elucidar possíveis mecanismos de ação envolvendo o Biosilicato[®] e a terapia *laser* de baixa intensidade no reparo ósseo em ratas osteopênicas, foi realizada a imunohistoquímica para observar a expressão de CBFA-1, uma vez que alguns autores têm sugerido que a enzima COX-2 atua sobre a osteogênese, regulando genes de diferenciação osteoblástica, como CBFA-1 e osterix (Zhang *et al.*, 2002). Os resultados do presente estudo demonstraram uma expressão de CBFA-1 moderada nos grupos expostos ao biomaterial em associação ou não com a terapia *laser*. Em geral, parece que o Biosilicato[®] permite a diferenciação dos osteoblastos durante o processo de reparo ósseo em ratas osteopênicas.

Além disso, evidências sugerem que a neovascularização desempenha um papel crucial no tratamento de muitas doenças e em praticamente todas as abordagens da engenharia de tecidos. A falta de vascularização adequada leva à distribuição insuficiente de nutrientes e remoção de resíduos, desenvolvimento tecidual limitado, morte celular e perda de tecido (Boontheekul e Mooney, 2003).

A angiogênese, formação de novos vasos sanguíneos por brotamento das laterais e extremidades de vasos pré-existentes, tem sido amplamente estudada para determinar os mecanismos que orientam a formação dos vasos sanguíneos em tecidos adultos (Boontheekul e Mooney, 2003). Inúmeros fatores de crescimento têm sido identificados como reguladores desse processo, como por exemplo, o VEGF que é um mediador chave da angiogênese, pois é um potente mitógeno de células endoteliais. O VEGF e seus correspondentes receptores são reguladores chaves em uma cascata de eventos moleculares e celulares que conduzem para o desenvolvimento do sistema vascular por meio da angiogênese (Ferrara *et al.*, 2003).

Dessa forma, a expressão de VEGF também foi avaliada nesse estudo. Os resultados revelaram que o Biosilicato[®] foi capaz de induzir a angiogênese, conforme ilustrado pela imunexpressão positiva encontrada neste grupo. Em contrapartida, Sojo *et al.* (2005) relataram que a angiogênese ocorre, predominantemente, nas fases incipientes do processo de formação óssea. Estes resultados estão de acordo com o presente estudo, uma vez que a angiogênese foi detectada no décimo quarto dia pós-operatório, após a exposição ao Biosilicato[®]. Além disso, a terapia *laser* com fluência de 60J/cm² e 120J/cm² induziu a angiogênese de forma semelhante nos grupos tratados com o Biosilicato[®]. Independente de seu mecanismo de ação, acredita-se que a imunexpressão de VEGF encontrada nestes grupos também possa ter favorecido o reparo ósseo de ratas osteopênicas.

Além disso, o modelo animal pré-clínico mais utilizado para a investigação da osteoporose é a rata ovariectomizada. Este modelo reproduz a perda óssea e possíveis comprometimentos no processo de reparo de fraturas, prevalentes em mulheres na pós-menopausa que possuem deficiência estrogênica e, deste modo, estão mais propensas a fraturas osteoporóticas (Kalu, 1991; Hollinger *et al.*, 2008).

A terapia *laser* associada à aplicação de biomateriais, além de estimular o processo de reparo ósseo e a maior formação do tecido ósseo com conseqüente aumento das propriedades

biomecânicas desse tecido (Guzzardella *et al.*, 2003; Pinheiro *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2006), também pode promover a melhora do quadro clínico de pacientes por meio da diminuição da dor e da presença de edemas (Ozcelik *et al.*, 2008). Entretanto, ainda é difícil comparar os estudos sobre a ação da LLLT e do uso de biomateriais implantados uma vez que os modelos experimentais, os parâmetros dosimétricos e a duração dos tratamentos são muito distintos.

5.6 CONCLUSÃO

Em síntese, pode-se concluir que o Biosilicato[®] associado à terapia *laser* de baixa intensidade, principalmente na fluência de 120J/cm², foi eficaz no processo de reparo ósseo em defeitos induzidos em tíbias de ratas osteopênicas e pode ser fundamental no sentido de promover o reparo de fraturas de difícil consolidação em indivíduos com osteoporose. No entanto, mais estudos são oportunos para melhor elucidar esta questão.

5.7 REFERÊNCIAS

- Amadei SU, Silveira VAS, Pereira AC, Carvalho YR, Rocha RF. 2006, A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea, *J Bras Patol Med Lab*, 42: 5-12.
- Andrade GB, Montes GS, Conceição GMS, Saldiva PHN. 1999, Use of the Picrosirius-polarization method to age fibrotic lesions in the hepatic granulomas produced in experimental murine schistosomiasis, *Ann Trop Med Parasitol*, 93: 265–272.
- Blaya DS, Guimarães MB, Pozza DH, Weber JB, de Oliveira MG. 2008, Histologic study of the effect of laser therapy on bone repair, *J Contemp Dent Pract*, 9: 1-8.

- Boontheekul T, Mooney DJ. 2003, Protein-based signaling systems in tissue engineering, *Curr Opin Biotechnol*, 14: 559-565.
- Carvalho PTC, Silva IS, Reis FA, Belchior ACG, Facco GG, Guimarães RN, Fernandes, GHC, Denadai AS. 2006, Effect of 650nm low-power laser on bone morphogenetic protein in bone defects induced in rat femors, *Acta Cir Bras*, 21, 63-68.
- Clupper DC, Gough JE, Hall MM, Clare AG, LaCourse WC, Hench LL. 2003, In vitro bioactivity of S520 glass fibers and initial assessment of osteoblast attachment, *J Biomed Mater Res A*, 67: 285-94.
- Coombe AR, Ho CT, Darendeliler MA, Hunter N, Philips JR, Chapple CC, Yum LW. 2001, The effects of low level laser irradiation on osteoblastic cells, *Clin Orthod Res*, 4: 3-14.
- da Silva RV, Camilli JA. 2006, Repair of bone defects treated with autogenous bone graft and low-power laser, *J Craniofac Surg*, 17: 297-301.
- Dempke W, Rie C, Grothey A, Schomoll HJ. 2001, Cyclo-oxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy?, *J Cancer Res Clin Onco*, 127, 411-417.
- Diniz JS, Nicolau RA, de Melo Ocarino N, do Carmo Magalhães F, de Oliveira Pereira RD, Serakides R. 2009, Effect of low-power gallium-aluminum-arsenium laser therapy (830nm) in combination with bisphosphonate treatment on osteopenic bone structure: an experimental animal study, *Lasers Med Sci*, 24: 347-352.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. 2003, The biology of VEGF and its receptors, *Nat Med*, 9: 669-676.
- Garavello-Freitas I, Baranauskas V, Joazeiro PP, Padovani CR, Dal Pai-Silva M, da Cruz-Höfling MA. 2003, Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats, *J Photochem Photobiol B*, 70: 81-89.

- Gauthier O, Müller R, von Stechow D, Lamy B, Weiss P, Bouler JM. 2005, In vivo bone regeneration with injectable calcium phosphate biomaterial: a three-dimensional micro-computed tomographic, biomechanical and SEM study, *Biomaterials*, 26: 5444-5453.
- Granito RN, Ribeiro DA, Rennó AC, Ravagnani C, Bossini PS, Peitl-Filho O, Zanotto ED, Parizotto NA, Oishi J. 2009, Effects of biosilicate and bioglass 45S5 on tibial bone consolidation on rats: a biomechanical and a histological study, *J Mater Sci Mater Med*, 20: 2521-2526.
- Guzzardella GA, Torricelli P, Nicoli-Aldini N, Giardino R. 2003, Osseointegration of endosseous ceramic implants after postoperative low-power laser stimulation: an in vivo comparative study, *Clin Oral Impl Res*, 14: 226-232.
- Hamajima S, Hiratsuka K, Kiyama-Kishikawa M, Tagawa T, Kawahara M, Ohta M, Sasahara H. 2003, Effect of low-level laser irradiation on osteoglycin gene expression in osteoblasts, *Lasers Med Sci*, 18: 78-82.
- Hench LL, Polak JM. 2002, Third-Generation Biomedical Materials, *Science*, 295: 1014-1017.
- Hollinger JO, Onikepe AO, MacKrell J, Einhorn T, Bradica G, Lynch S. 2008, Accelerated fracture healing in the geriatric, osteoporotic rat with recombinant human platelet-derived growth factor-BB and an injectable beta-tricalcium phosphate/collagen matrix, *J Orthop Res*, 26: 83-90.
- Kalu DN. 1991, The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss, *Bone Miner*, 15: 171-192.
- Kargman S, Charleson S, Cartwright M, Frank J, Riendeau D, Mancini J, Evans J, O'Neill G. 1996, Characterization of prostaglandin G/H synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts, *Gastroenterology*, 111: 445-454.

- Kazem Shakouri S, Soleimanpour J, Salekzamani Y, Oskuie MR. 2010, Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process, *Lasers Med Sci*, 25: 73-77.
- Kubo T, Shiga T, Hashimoto J, Yoshioka M, Honjo H, Urabe M, Kitajima I, Semba I, Hirasawa, Y. 1999, Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 68: 197–202.
- Lirani-Galvão AP, Jorgetti V, da Silva OL. 2006, Comparative study of how low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound affect bone repair in rats, *Photomed Laser Surg*, 24: 735-740.
- Liu X, Lyon R, Meier HT, Thometz J, Haworth ST. 2007, Effect of lower-level laser therapy on rabbit tibial fracture, *Photomed Laser Surg*, 25: 487-494.
- Lu HH, Vo JM, Chin HS, Lin J, Cozin M, Tsay R, Eisig S, Landesberg R. 2008, Controlled delivery of platelet-rich plasma-derived growth factors for bone formation, *J Biomed Mater Res A*, 86: 1128-1136.
- Luger EJ, Rochkind S, Wollman Y, Kogan G, Dekel S. 1998, Effect of Low-Power Laser Irradiation on the Mechanical Properties of Bone Fracture Healing in Rats, *Lasers Surg Med*, 22: 97–102.
- Matsumoto MA, Ferino RF, Monteleone GF, Ribeiro DA. 2009, Low-level laser therapy modulates cyclo-oxygenase-2 expression during bone repair in rats, *Lasers Med Sci*, 24: 195-201.
- Meyer RA Jr, Tsahakis PJ, Martin DF, Banks DM, Harrow ME, Kiebzak, GM. 2001, Age and ovariectomy impair both the normalization of mechanical properties and the accretion of mineral by the fracture callus in rats, *J Orthop Res*, 19: 428–435.
- Miranda SR, Filho HN, Padovan LE, Ribeiro DA, Nicolielo D, Matsumoto MA. 2006. Use of platelet-rich plasma under autogenous onlay bone grafts, *Clin Oral Impl Res*, 17: 694–699.

- Montes GS. 1996, Structural biology of the fibers of the collagenous and elastic systems, *Cell Biol Int*, 20: 15-27.
- Morri H, Genant HK. 1997, Statement on the diagnosis and management of osteoporosis from the Consensus Development Conference at the Second International Conference on Osteoporosis, Osaka. *J Bone Miner Metabol*, 16: 206-214.
- Moura J, Teixeira LN, Ravagnani C, Peitl O, Zanotto ED, Beloti MM. 2007, In vitro osteogenesis on a highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate[®]), *J Biomed Mater Res A*, 82: 545-557.
- Nicolau RA, Jorgetti V, Rigau J, Pacheco MT, dos Reis LM, Zângaro RA. 2003, Effect of low-power GaAlAs laser (660 nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study, *Lasers Med Sci*, 18: 89-94.
- Ninomiya T, Hosoya A, Nakamura H, Sano K, Nishisaka T, Ozawa H. 2007, 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.
- Oonishi H, Kushitani S, Yasukawa E, Iwaki H, Hench LL, Wilson J, Tsuji E, Sugihara T. 1997, Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute, *Clin Orth Rel Res*, 334: 316-325.
- Ozawa Y, Shimizu N, Kariya G, Abiko Y. 1998, Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells, *Bone*, 22: 347-54.
- Ozcelik O, Haytac MC, Seydaoglu G. 2008, Enamel matrix derivate and low-level laser therapy in the treatment of intra-bony defects: a randomized placebo-controlled clinical trial, *J Clin Periodontol*, 35: 147-156.
- Peter B, Gauthier O, Laïb S, Bujoli B, Guicheux J, Janvier P. 2006, Local delivery of bisphosphonate from coated orthopedic implants increases implants mechanical stability in osteoporotic rats, *J Biomed Mater Res A*, 76: 133-143.

- Pinheiro AL, Limeira Júnior FA, Gerbi ME, Ramalho LM, Marzola C, Ponzi EA, Soares AO, Carvalho LC, Lima HC, Gonçalves TO. 2003, Effect of 830-nm laser light on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone and decalcified cortical osseous membrane, *J Clin Laser Med Surg*, 21: 383-388.
- Rennó ACM, de Moura FM, dos Santos NSA, Tirico RP, Bossini PS, Parizotto NA. 2006, Effects of 830-nm laser, used in two doses, on biomechanical properties of osteopenic rat femora, *Photomed Laser Surg*, 24: 202-206
- Rennó ACM, McDoNneell PA, Parizotto NA, Laakso EL. 2007, The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro, *Photomed Laser Surg*, 25: 275-280.
- Ribeiro DA, Matsumoto MA. 2008, Low-level laser therapy improves bone repair in rats treated with anti-inflammatory drugs, *J Oral Rehabil*, 35: 925-933.
- Rutten S, Nolte PA, Guit GL, Bouman DE, Albers GHR. 2007, Use of low pulsed ultrasound for posttraumatic nonunions of the tibia: A review of patients treated in the Netherlands, *J Trauma*, 62: 902-908.
- Sato Y, Arai N, Negishi A, Ohya K. 1997, Expression of cyclooxygenase genes and involvement of endogenous prostaglandin during osteogenesis in the rat tibial bone marrow cavity, *J Med Dent Sci*, 44: 81-92.
- Sojo K, Sawaki Y, Hattori H, Mizutani H, Ueda M. 2005, Immunohistochemical study of vascular endothelial growth factor (VEGF) and bone morphogenetic protein-2, -4 (BMP-2, -4) on lengthened rat femurs, *J Craniomaxillofac Surg*, 33: 238-245.
- Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. 2005, Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro, *Photomed Laser Surg*, 23: 161-166.

- Thomas MV, Puleo DA, Al-Sabbagh M. 2005, Bioactive glass three decades on. *J Long Term Eff Med Implants*, 15: 585–597.
- Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. 1998, Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells, *Cell*, 93: 705-716.
- Vladimirov YA, Osipov AN, Klebanov GI. 2004, Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry*, 69: 81-90.
- Vogell M, Voigt T, Gross U, Muk C. 2001, In vivo comparison of bioactive glass particles in rabbits, *Biomaterials*, 29: 357–362.
- Yaiota H, Orimo H, Shirai Y, Shimada T. 2000, Expression of bone morphogenetic proteins and rat distal-less homolog genes following rat femoral fracture. *J Bone Miner Metab*, 18: 63-70.
- Zanotto ED et al. 2004, *Process and compositions for preparing particulate, bioactive or resorbable biosilicates for use in the treatment of oral aliments*. Fundação Universidade Federal de São Carlos; Universidade de São Paulo. Int. C. C03C10/00, 20, WO2004/074199.
- Zhang X, Schwarz EM, Young DA, Puzas E, Rosier RN, O’Keefe RJ. 2002, Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair, *J Clin Invest*, 109: 1405-1415.

PARTE III

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEXOS

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Com base nos resultados obtidos nos dois estudos é possível chegar às seguintes conclusões:

- A terapia *laser* de baixa intensidade ($\lambda= 830\text{nm}$), nas duas fluências utilizadas, favoreceu o processo de reparo ósseo em tíbias de ratas osteopênicas.
- O Biosilicato[®] utilizado isoladamente apresentou potencial osteogênico, observado pela expressão de CBFA-1 e VEGF, no entanto, o período de 14 dias pós-operatório utilizado neste estudo, talvez não tenha sido suficiente para produzir uma adequada interação do biomaterial com o tecido ósseo osteopênico, ressaltando a necessidade de novos estudos a longo prazo.
- O Biosilicato[®] associado à terapia *laser* de baixa intensidade, com fluência de $120\text{J}/\text{cm}^2$, otimizou o processo de reparo ósseo em defeitos induzidos em tíbias de ratas osteopênicas quando comparado aos grupos experimentais tratados apenas com a terapia *laser*.

Quanto às perspectivas futuras, estudos longitudinais com a realização de análises moleculares estão sendo desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa, com o intuito de melhor elucidar possíveis mecanismos de ação envolvendo o Biosilicato[®] e a terapia *laser* de baixa intensidade sobre a cinética do processo de reparo ósseo em ratos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AMADEI, S.U.; SILVEIRA, V.A.S.; PEREIRA, A.C.; CARVALHO, Y.R.; ROCHA, R.F. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **J Bras Patol Med Lab**, v. 42, p. 5-12, 2006.

ANDRADE, G.B.; MONTES, G.S.; CONCEIÇÃO, G.M.S.; SALDIVA, P.H.N. Use of the Picrosirius-polarization method to age fibrotic lesions in the hepatic granulomas produced in experimental murine schistosomiasis. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 93, p. 265-272, 1999.

BLAYA, D.S.; GUIMARÃES, M.B.; POZZA, D.H.; WEBER, J.B.; de OLIVEIRA, M.G. Histologic study of the effect of laser therapy on bone repair. **J Contemp Dent Pract**, v. 9, p. 1-8, 2008.

BLIUC, D.; NGUYEN, D.N.; MILCH, V.E.; NGUYEN, T.V.; EISMAN, J.A.; CENTER, J. R. Mortality risk associated with low-trauma osteoporotic fracture and subsequent fracture in men and women. **JAMA**, v. 301, p. 513-521, 2009.

BOONTHEEKUL, T.; MOONEY, D.J. Protein-based signaling systems in tissue engineering. **Curr Opin Biotechnol**, v. 14, p. 559-565, 2003.

CARVALHO, P.T.C.; SILVA, I.S.; REIS, F.A.; BELCHIOR, A.C.G.; FACCO, G.G.; GUIMARÃES, R.N.; FERNANDES, G.H.C.; DENADAI, A.S. Effect of 650nm low-power laser on bone morphogenetic protein in bone defects induced in rat femors. **Acta Cir. Bras**, v. 21, p. 63-68, 2006.

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

CLUPPER, D.C.; GOUGH, J.E.; HALL, M.M.; CLARE, A.G.; LaCOURSE, W.C.; HENCH, L.L. In vitro bioactivity of S520 glass fibers and initial assessment of osteoblast attachment. **J Biomed Mater Res A**, v. 67, p. 285-294, 2003.

COMELEKOGLU, U.; BAGIS, S.; YALIN, S.; OGENLER, O.; YILDIZ, A.; SAHIN, O.; OGUZ, I.; HATUNGIL, R. Biomechanical evaluation in osteoporosis: ovariectomized rat model. **Clin Rheumatol**, v. 26, p. 380-384, 2007.

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

CULHAN, E.G.; JIMENEZ, H.I.; KING, C.B.K. Thoracic kyphosis, rib mobility, and lung volumes in normal women and women with osteoporosis. **Spine**, v. 19, p. 1250-1255, 1994.

da SILVA, R.V.; CAMILLI, J.A. Repair of bone defects treated with autogenous bone graft and low-power laser. **J Craniofac Surg**, v. 17, p. 297-301, 2006.

DEMPKE, W.; RIE, C.; GROTHEY, A.; SCHOMOLL, H.J. Cyclo-oxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 127, p. 411-417, 2001.

DENNISON, E.; COLE, Z.; COOPER, C. Diagnosis and epidemiology of osteoporosis. **Curr Opin Rheumatol**, v. 17, p. 356-361, 2005.

DINIZ, J.S.; NICOLAU, R.A.; de MELO OCARINO, N.; do CARMO MAGALHÃES, F.; de OLIVEIRA PEREIRA, R.D.; SERAKIDES, R. Effect of low-power gallium-aluminum-arsenium laser therapy (830 nm) in combination with bisphosphonate treatment on osteopenic bone structure: an experimental animal study. **Lasers Med Sci**, v. 24, p. 347-352, 2009.

DORTBUDAK, O. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. **Clin Oral Impl Res**, v. 16, p. 540-545, 2000.

FERRARA, N.; GERBER, H.P.; LeCOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nat Med**, v. 9, p. 669-676, 2003.

FORWOOD, M.R. Inducible cyclo-oxygenase (COX-2) mediates the induction of bone formation by mechanical loading in vivo. **J Bone Miner Res**, v. 11, p. 1688-1693, 1996.

GARAVELLO-FREITAS, I.; BARANAUSKAS, V.; CRUZ-HÖFLING, M.A. Laser effects on osteogenesis. **Appl Surf Sci**, v. 154, p. 548-554, 2000.

GARAVELLO-FREITAS, I.; BARANAUSKAS, V.; JOAZEIRO P.P.; PADOVANI, C.R.; DAL PAI-SILVA, M.; CRUZ-HÖFLING, M.A. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. **J Photochem Photobiol B**, v. 70, p. 81-89, 2003.

GAUTHIER, O.; MÜLLER, R.; VON STECHOW, D.; LAMY, B.; WEISS, P.; BOULER, J.M.; AGUADO, E.; DACULSI, G. In vivo bone regeneration with injectable calcium phosphate biomaterial: a three-dimensional micro-computed tomographic, biomechanical and SEM study. **Biomaterials**, v. 26, p. 5444-5453, 2005.

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

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

HADJIARGYROU, M.; McLEOD, K.; RYABY, J.P.; RUBIN, C. Enhancement of fracture healing by low intensity ultrasound. **Clin Orthop Relat Res**, Suppl. 355, p. 216-229, 1998 (Review).

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

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

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

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

JAVAID, M.K.; HOLT, R.I. Understanding osteoporosis. **J Psychopharmacol**, v. 22, p. 38-45, 2008.

JOHNEEL, O.; KANIS, J. Epidemiology of osteoporotic fractures. **Osteoporos Inter**, v. 16, Suppl. 2, p. 3-7, 2005.

KALU, D.N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss, **Bone Miner**, v. 15, p. 171-192, 1991.

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

KARU, T.I. **The science of low-power laser therapy**. Australia: Gordon and Breach Science Publishers, 1998.

KARU, T.I.; LUBART, R. Effects of low-power light on biological systems. Amsterdam, Netherlands: **Proceedings of SPIE**, v. 4159, p. 1-7, 2000.

KAWASAKI, K.; SHIMIZU, N. Effects of low-energy laser irradiation on bone remodeling during experimental tooth movement in rats. **Lasers Surg Med**, v. 26, p. 282-291, 2000.

KAZEM SHAKOURI, S.; SOLEIMANPOUR, J.; SALEKZAMANI, Y.; OSKUIE, M.R. Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process. **Lasers Med Sci**, v. 25, p. 73-77, 2010.

KLEIN, R.F.; MITCHEL, S.R.; PHILLIPIS, T.J.; BELKNAP, J.K.; ORWOLL, E.S. Quantitative trait loci affecting peak bone mineral density in mice. **J Bone Miner Res**, v. 13, p. 1648-1656, 1998.

KUBO, T.; SHIGA, T.; HASHIMOTO, J.; YOSHIOKA, M.; HONJO, H.; URABE, M.; KITAJIMA, I.; SEMBA, I.; HIRASAWA, Y. Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet, **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 68, p. 197-202, 1999.

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

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

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

LU, H.H.; VO, J.M.; CHIN, H.S.; LIN, J.; COZIN, M.; TSAY, R.; EISIG, S.; LANDEBERG, R. Controlled delivery of platelet-rich plasma-derived growth factors for bone formation. **J Biomed Mater Res A**, v. 86, p. 1128-1136, 2008.

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

MARINO, J.A.M. **Efeitos do laser terapêutico de baixa intensidade no processo de reparação óssea em tíbias de ratos**. 2003. 107 p. Dissertação (Mestrado em Fisioterapia) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos/SP.

MATSUMOTO, M.A.; FERINO, V.; MONTELEONE, G.; RIBEIRO, D.A. Low level laser therapy modulates cyclo-oxygenase-2 expression during bone repair in rats. **Lasers Med Sci**, v. 24, p. 195-201, 2009.

MEYER, R.A.Jr.; TSAHAKIS, P.J.; MARTIN, D.F.; BANKS, D.M.; HARROW, M.E.; KIEBZAK, G.M. Age and ovariectomy impair both the normalization of mechanical properties and the accretion of mineral by the fracture callus in rats. **J Orthop Res**, v. 19, p. 428-435, 2001.

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

MITCHEL, S.R.; KLEIN, R.F.; PHILLIPIS, T.J.; BELKNAP, J.K.; ORWOLL, E.S. Quantitative trait loci affecting peak bone mineral density in mice. **J Bone Miner Res**, v. 13, p. 1648-1656, 1998.

MONTES, G.S. Structural biology of the fibers of the collagenous and elastic systems, **Cell Biol Int**, v. 20, p. 15-27, 1996.

MORRI, H.; GENANT, H.K. Statement on the diagnosis and management of osteoporosis from the Consensus Development Conference at the Second International Conference on Osteoporosis, Osaka. **J Bone Miner Metabol**, v. 16, p. 206-214, 1997.

MOURA, J.; TEIXEIRA, L.N.; RAVAGNANI, C.; PEITL-FILHO, O.; ZANOTTO, E.D.; BELOTI, M.M.; PANZERI, H.; ROSA, A.L.; OLIVEIRA, P.T. In vitro osteogenesis on a highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate®). **J Biomed Mater Res A**, v. 82, p. 545-57, 2007.

NICOLAU, R.; JORGETTI, V.; RIGAU, J.; PACHECO, M.T.T.; REIS, L.M.; ZÂNGARO, R.A. Effect of low-power GaAlAs laser (660 nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. **Lasers Med Sci**, v. 18, p. 89-94, 2003.

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**, v. 40, p. 140-148, 2007.

NINOMIYA, T.; MIYAMOTO, Y.; ITO, T.; YAMASHITA, A.; WAKITA, M.; NISHISAKA, T. High-intensity pulsed laser irradiation accelerates bone formation in metaphyseal trabecular bone in rat femur. **J Bone Miner Metab**, v. 21, p. 67-73, 2003.

OONISHI, H.; KUSHITANI, S.; YASUKAWA, E.; IWAKI, H.; HENCH, L.L.; WILSON, J.; TSUJI, E.; SUGIHARA, T. Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute. **Clin Orth Rel Res**, v. 334, p. 316-325, 1997.

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

OZCELIK, O.; HAYTAC, M.C.; SEYDAOGLU, G. Enamel matrix derivate and low-level laser therapy in the treatment of intra-bony defects: a randomized placebo-controlled clinical trial. **J Clin Periodontol**, v. 35, p. 147-156, 2008.

PASCO, J.A.; SEEMAN, E.; HENRY, M.J.; MERRIMAN, E.N.; NICHOLSON, G.C.; KOTOWICZ, M.A. The population burden of fractures originates in women with osteopenia, not osteoporosis. **Osteoporos Int**, v. 17, p. 1404-1409, 2006.

PETER, B.; GAUTHIER, O.; LAÏB, S.; BUJOLI, B.; GUICHEUX, J.; JANVIER, P. Local delivery of bisphosphonate from coated orthopedic implants increases implants mechanical stability in osteoporotic rats. **J Biomed Mater Res A**, v. 76, p. 133-143, 2006.

PICKERING, S.A.W.; SCAMMELL, B.E. Electromagnetic fields for bone healing. **Int J Low Extrem Wounds**, v. 1, p. 152-160, 2002.

PINHEIRO, A.L.; LIMEIRA-JÚNIOR, F.A.; GERBI, M.E.; RAMALHO, L.M.; MARZOLA, C.; PONZI, E.A.; SOARES, A.O.; CARVALHO, L.C.; LIMA, H.C.; GONÇALVES, T.O. Effect of 830-nm laser light on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone and decalcified cortical osseous membrane. **J Clin Laser Med Surg**, v. 21, p. 383-388, 2003.

PINHEIRO, A.L.B.; OLIVEIRA, M.G.; MARTINS, P.P.M.; RAMALHO, L.M.P.; OLIVEIRA, M.A.M.; JUNIOR, A.N.; NICOLAU, R.A. Biomodulatory effects of LLLT on bone regeneration. **Laser Therapy**, v.13, p. 73-79, 2001.

PINTO NETO A. M.; *et al.* Congresso brasileiro de osteoporose 2002. **Rev Bras Reumatol**, v. 42, p. 343-354, 2002.

PIRES-OLIVEIRA, D.A.; de OLIVEIRA, R.F.; ZÂNGARO, R.A.; SOARES, C.P. Evaluation of low-level laser therapy of osteoblastic cells. **Photomed Laser Surg**, v. 26, p. 401-404, 2008.

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

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

RAVAGNANI, C. **Biosilicato[®] para promoção da saúde oral**. 2003. 161 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos/SP.

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

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

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

RUTTEN, S.; NOLTE, P.A.; GUIT, G.L.; BOUMAN, D.E; ALBERS, G.H.R. Use of low pulsed ultrasound for posttraumatic nonunions of the tibia: a review of patients treated in the Netherlands. **J Trauma**, v. 62, p. 902-908, 2007.

SATO, Y.; ARAI, N.; NEGISHI, A.; OHYA, K. Expression of cyclo-oxygenase genes and involvement of endogenous prostaglandin during osteogenesis in the rat tibial bone marrow cavity. **J Med Dent Sci**, v. 44, p. 81-92, 1997.

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

SINAKI, M.; WOLLAN, P.C.; SCOTT, R.W.; GELCZER, R.K. Can strong extensor prevent vertebral fractures in women with osteoporosis? **Mayo Clinic Proc**, v. 71, p. 951-956, 1996.

SOJO, K.; SAWAKI, Y.; HATTORI, H.; MIZUTANI, H.; UEDA, M. Immunohistochemical study of vascular endothelial growth factor (VEGF) and bone morphogenetic protein-2, -4 (BMP-2, -4) on lengthened rat femurs. **J Craniomaxillofac Surg**, v. 33, p. 238-245, 2005.

SORNAY-RENDU, E.; MUNOZ, F.; GARNERO, P.; DUBOEU, F.; DELMAS, P.D. Identification of osteopenic women at high risks of fracture: the OFELY study. **J Bone Miner Res**, v. 20, p. 1813-1819, 2005.

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

TAMURA, K.; HOSOYA, S.; HIRATSUKA, K.; ABIKO, Y. Enhancement of mouse CDC46 gene expression in the osteoblast by laser irradiation. **Laser Ther**, v. 10, p. 25-32, 1998.

THOMAS, M.V.; PULEO, D.A.; AL-SABBAGH, M. Bioactive glass three decades on. **J Long Term Eff Med Implants**, v. 15, p. 585-597, 2005.

TSUJII, M.; KAWANO, S.; TSUJI, S.; SAWAOKA, H.; HORI, M.; DUBOIS, R.N. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. **Cell**, v. 93, p. 705-716, 1998.

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

VOGELL, M.; VOIGT, T.; GROSS, U.; MUK, C. In vivo comparison of bioactive glass particles in rabbits. **Biomaterials**, v. 29, p. 357-362, 2001.

WANG, W.; BERGH, A.; DAMBER, J.E. Increased expression of CCAAT/enhancer-binding protein beta in proliferative inflammatory process. **Lasers Med Sci**, v. 24, p. 195-201, 2009.

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**, v. 18, p. 63-70, 2000.

ZANOTTO, E.D.; *et al.*, **Process and compositions for preparing particulate, bioactive or resorbable biosilicates for use in the treatment of oral aliments**. Fundação Universidade Federal de São Carlos; Universidade de São Paulo. Int. C. C03C10/00, 20, WO2004/074199, 2004.

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

ANEXO A

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



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

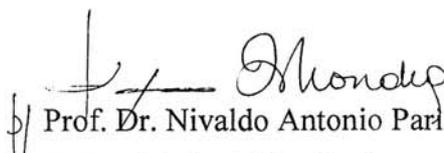
Parecer 023/2006

Protocolo nº 025/2006

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CCEA/UFSCar, durante sua 9ª. Reunião concluiu a apreciação ética do projeto de pesquisa “Análise dos efeitos do biosilicato e do laser de baixa intensidade no processo de consolidação de defeitos ósseos em tecido ósseo saudável e osteopênico: Projeto Multidisciplinar” elaborado do por Nivaldo Antonio Parizotto.

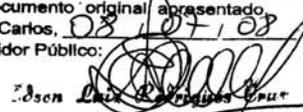
Conclusão: Projeto Aprovado.

São Carlos, 21 de novembro de 2006.


 Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto
 Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal

 Universidade Federal de São Carlos
 Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

Certifico que esta cópia confere com o documento original apresentado.
 São Carlos, 08/10/06
 Servidor Público:


 Rosana Maria de Almeida
 Analista em Administração

ANEXO B

SUBMISSÃO DO ESTUDO I

E-mail recebido em 21/04/2010 do periódico “*Experimental Gerontology*” apontando a submissão do artigo intitulado “*Low level laser therapy improves bone repair in osteoporotic rats: similar outcomes at two different dosages*” (Estudo I).

E-mail de iG Mail - A manuscript number has been assigned: EXG-10-79

Página 1 de 1



Paulo Sérgio Bossini <paulobossini@ig.com.br>

A manuscript number has been assigned: EXG-10-79

2 mensagens

Experimental Gerontology <exg@elsevier.com>
Para: paulobossini@ig.com.br

21 de abril de 2010 05:50

Ms. Ref. No.: EXG-10-79
Title: LOW LEVEL LASER THERAPY IMPROVES BONE REPAIR IN OSTEOPOROTIC RATS: SIMILAR OUTCOMES AT TWO DIFFERENT DOSAGES
Experimental Gerontology

Dear paulobossini,

Thank you for preparing the article mentioned above for Experimental Gerontology. The review process is under way, and we will inform you about the outcome as soon as possible. Please refer to the manuscript number stated above in all future correspondence.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/exg/>.

Your username is: paulobossini
If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/exg/automail_query.asp
Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Brendan Daly
Journal Manager
Experimental Gerontology

E-mail recebido em 14/04/2010 do periódico “*Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*” apontando a aprovação do artigo intitulado “*Biosilicate® and low level laser therapy improve bone repair in osteoporotic rats*” (Estudo II).



Paulo Sérgio Bossini <paulobossini@ig.com.br>

Enc: Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine - Decision on Manuscript ID TERM-10-0014.R1

3 mensagens

Daniel Araki Ribeiro <daribeiro@unifesp.br>
Para: paulobossini@ig.com.br, acmr_ft@yahoo.com.br

14 de abril de 2010 14:59

Prof. Dr. Daniel Araki Ribeiro, DDS, PhD
Adjunt Professor and Researcher
Vice Dean - Department of Biosciences
Discipline of Pathology
Federal University of Sao Paulo - UNIFESP
Paulista Medical School - EPM

----- Mensagem encaminhada de rgreis@dep.uminho.pt -----

Data: Wed, 14 Apr 2010 13:50:27 -0400 (EDT)

De: rgreis@dep.uminho.pt

Endereço para Resposta (Reply-To): rgreis@dep.uminho.pt

Assunto: Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine - Decision on Manuscript ID TERM-10-0014.R1

Para: daribeiro@unifesp.br

14-Apr-2010

Dear Dr. Ribeiro,

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "BIOSILICATE® AND LOW LEVEL LASER THERAPY IMPROVE BONE REPAIR IN OSTEOPOROTIC RATS" in its current form for publication in Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine.

The charge for colour processing is £500 for one page. If your manuscript contains colour figures please confirm your agreement to assume this cost by emailing the production editor Robert Huston (rhuston@wiley.co.uk) giving the numbers of the figures which are to be printed in colour, or state that you wish all figures to be printed black and white.

A signed copyright transfer agreement is needed for publication. If you have not already provided us with one you can access the copyright transfer agreement at:

<http://media.wiley.com/assets/1540/86/ctaaglobal.pdf>

To enable the publisher to disseminate the author's work to the fullest extent, the author must sign a Copyright Transfer Agreement, transferring the copyright of the article from the author to the publisher.

If you have not yet uploaded a CTA, please ensure that you have identified the form with the manuscript ID number; scan your signed CTA and e-mail to ctaforms@wiley.com stating the manuscript ID number in the subject line of the e-mail.

Please note that this does not take away your rights to reuse your own article after publication, and that if the copyright belongs to your employing institution, they should sign the form instead of you.

If you have already provided us with the signed form, you do not need to do anything at this stage. You will be contacted by our typesetters/copyeditors shortly.

Thank you for your fine contribution.

Sincerely,

Prof. Rui Reis
Editor-in-Chief, Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine
rgreis@dep.uminho.pt