

POLIANI DE OLIVEIRA

**OS EFEITOS DO BIOSILICATO[®] E DO LASER
TERAPÊUTICO DE BAIXA POTÊNCIA NO
PROCESSO DE CONSOLIDAÇÃO EM TÍBIAS
DE RATOS**

São Carlos – SP
2009

POLIANI DE OLIVEIRA

**OS EFEITOS DO BIOSILICATO[®] E DO LASER
TERAPÊUTICO DE BAIXA POTÊNCIA NO
PROCESSO DE CONSOLIDAÇÃO EM TÍBIAS
DE RATOS**

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

Orientadores: Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia Muniz Renno
Prof. Dr. Nivaldo Antônio Parizotto

São Carlos – SP
2009

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

O48eb

Oliveira, Poliani de.

Os efeitos do Biosilicato[®] e do laser terapêutico de baixa potência no processo de consolidação em tíbias de ratos / Poliani de Oliveira. -- São Carlos : UFSCar, 2010.
74 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Lasers. 2. Ossos. 3. Materiais bioativos. 4. Ratos. I.
Título.

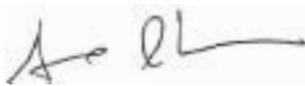
CDD: 615.83 (20^a)

Poliani de Oliveira

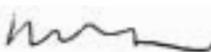
Dissertação de Mestrado submetida
à Coordenação do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia,
da Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

Aprovado em: 21/12/2009

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Ana Claudia Muniz Rennó (Orientador)
UNIFESP



Prof. Dr. Daniel Araki Ribeiro
UNIFESP



Prof. Dr. Oscar Peitl Filho
Universidade Federal de São Carlos - DEMa

DEDICATÓRIA

À minha mãe Terezinha, por seu amor incondicional, pelo carinho e esforço para
que meu sonho fosse realizado.

À meu pai Paulo, que infelizmente não pode presenciar este momento, mas que
com certeza me deu bases sólidas para que eu chegasse até aqui. Sei que ficaria
muito orgulhoso por esta conquista. Saudade imensa!

À minha irmã Priscila, por todo seu esforço, carinho e apoio a mim depositado.

Não tenho palavras para expressar o amor que sinto por vocês. Vocês são
presentes de Deus em minha vida!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Com todo carinho a minha orientadora Prof^a Dr^a Ana Cláudia Muniz Renno, por ter acreditado no meu trabalho, possibilitando meu crescimento profissional, e acima de tudo, pela amizade construída durante esse período de convivência. Agradeço por sua paciência, compreensão e incentivo constante.

Ao meu orientador Prof. Dr. Nivaldo Antônio Parizotto pela confiança em mim depositada, por estar sempre disponível a me ajudar quando precisei. Obrigada pela compreensão e amizade. Você é um exemplo profissionalismo e competência.

AGRADECIMENTOS

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

A toda minha família que sempre me apoiou e esteve presente em todos os momentos.

Ao meu lindo sobrinho Paulo Renato, que traz felicidade a minha vida.

Ao meu namorado Douglas pela ajuda, paciência e compreensão durante a realização deste trabalho. Também a seus pais, Sergio e Miriã, pelo carinho e incentivo constante.

À banca examinadora, pelas sugestões e críticas que contribuíram para maior clareza e entendimento deste trabalho.

Ao pessoal do laboratório de materiais vítreos (LAMAV), por disponibilizar o biomaterial utilizado neste estudo.

Ao técnico em histologia José Zuanon, pela amizade e paciência dedicada no ensino das técnicas envolvidas para o processamento histológico.

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

À amiga Karina Nogueira, pelas sugestões e imensa ajuda durante a realização deste trabalho.

À amiga Elaine Fávaro Pippi, por me ajudar durante o período experimental.

À Prof^a Dr^a. Patricia Driusso, Renata Granito e Mariana Aveiro pela ajuda durante a realização da análise estatística.

A Prof^a Dr^a Keico Okino Nonako por ter disponibilizado o aparelho para o teste biomecânico.

A minha amiga Ana Cristina, pela amizade, companhia e ajuda.

As minhas amigas do coração Wanessa, Aline e Tatiana, por estarem sempre presentes em minha vida.

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

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

Enfim, a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

RESUMO

Fraturas com atraso na consolidação e fraturas com não-união óssea são comumente encontradas na prática médica e estão associadas a altos índices de morbidade e mortalidade. Dentro deste contexto, recursos biofísicos e bioquímicos têm sido estudados na tentativa de minimizar o tempo de consolidação óssea. Dentre estes, podem ser destacados o uso dos materiais bioativos e do laser terapêutico de baixa potência (LLLT). 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 e acelerando o processo de consolidação. Diante disso, este estudo teve o objetivo de 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 uma vitrocerâmica bioativa, Biosilicato[®], utilizados independentemente ou associados na consolidação óssea de fraturas tibiais em ratos saudáveis. Para o estudo, foram utilizados 60 ratos, da linhagem Wistar, distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos: grupo GCF: controle, com fratura e sem tratamento; grupo GL60: fratura tratado com LLLT, fluência de $60\text{J}/\text{cm}^2$; grupo GL120: fratura tratado com LLLT, fluência de $120\text{J}/\text{cm}^2$; grupo GB: fratura tratado com Biosilicato[®]; grupo GB60: fratura tratado com Biosilicato[®] e LLLT, fluência de $60\text{J}/\text{cm}^2$ e grupo GB120: fratura tratado com Biosilicato[®] e LLLT, fluência de $120\text{J}/\text{cm}^2$. Foi utilizado um laser de baixa potência As-Ga-Al, 830nm, CW, 100 mW, 60 e $120\text{J}/\text{cm}^2$. Os ratos foram anestesiados por injeção intraperitoneal de Ketamina e Xilasina. Em seguida, realizou-se defeitos ósseos de 2mm de diâmetro nas tíbias dos animais. A irradiação laser iniciou-se imediatamente após a cirurgia e a cada 48 horas totalizando, 7 aplicações em 14 dias. O sacrifício foi realizado no 14º dia. A análise biomecânica das tíbias não revelou diferenças estatísticas entre os grupos experimentais. No entanto, a análise morfológica e morfométrica revelaram que o grupo laser, nas duas fluências avaliadas, apresentou valores estatisticamente maiores que o grupo controle e o grupo Biosilicato[®]. Interessante, os grupos tratados com a associação do biomaterial e laser, nas duas fluências, apresentaram valores estatisticamente menores de osso neoformado, mesmo quando comparados ao grupo controle. A microscopia eletrônica de varredura mostrou uma intensa presença do biomaterial nos defeitos ósseos dos respectivos animais. A partir dos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que o laser terapêutico de baixa potência foi mais eficaz no processo de reparo ósseo quando comparado ao biomaterial, ou mesmo com as duas modalidades de tratamento associadas.

Palavras-chave: reparo ósseo, terapia laser de baixa potência, material bioativo, ratos

ABSTRACT: THE EFFECTS OF BIOSILICATE[®] AND LOW LEVEL LASER THERAPY ON BONE CONSOLIDATION IN RATS

Fractures of delayed consolidation and fractures with non-union are commonly found in medical practice and are associated with high morbidity and mortality. Within this context, biochemical and biophysical resource have been studied in an attempt enhance bone healing. Among these may be highlighted the use of bioactive materials and low level laser therapy (LLLT). Several studies suggest that both resources are able to stimulate proliferation of osteoblasts and osteogenesis at the fracture site, promoting a greater deposition of bone mass and accelerating the process of consolidation. So the main purpose of the present work was to evaluate the effects of low-intensity laser ($\lambda = 830\text{nm}$), with fluencies of $60\text{J}/\text{cm}^2$ and $120\text{J}/\text{cm}^2$ and a bioactive ceramic, Biosilicate[®], used alone or associated on bone consolidation of the tibial fractures in healthy rats. For the study 60 male Wistar rats were randomly divided in 6 groups: group bone defect control (GCF); group bone defect irradiated with LLLT, at $60\text{ J}/\text{cm}^2$ (GL60); group bone defect irradiated with LLLT, at $120\text{ J}/\text{cm}^2$ (GL120); group bone defect filled with Biosilicate[®] (GB); group bone defect filled with Biosilicate[®], irradiated with LLLT, at $60\text{ J}/\text{cm}^2$ (GB60); and group bone defect filled with Biosilicate[®], irradiated with LLLT, at $120\text{ J}/\text{cm}^2$ (GB120). A low-energy GaAlAs 830nm, CW, 100 mW, 60 and 120 J.cm² was used in this study. The rats were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine and xylazine 2% and a standardized 2.0-mm-diameter bone defect was created by using a motorized drill under copious irrigation with saline solution. Laser irradiation was initiated immediately after the surgery procedure and it was performed every 48 h for 14 days. After 14 day post-surgery, biomechanical analysis revealed no statistical differences between experimental groups. However, the morphological and morphometric analysis showed that the laser, in the two fluencies evaluated showed values statistically higher than control group and the Biosilicate[®]. Interestingly, the groups treated with Biosilicate[®] and laser, in two fluencies, showed statistically lower values of newly formed bone in the area of the defect even when compared with the control group. The scanning electron microscopy showed an intense presence of the biomaterial in bone defects of their animals. From the results obtained in this study, we concluded that the low-intensity laser was more effective in the process of bone repair when compared with biomaterial or the two resources associated.

Key-words: bone repair, low level laser therapy, bioactive materials, rats.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- TABELA 1 -** Médias e Desvios Padrão do total da área de osso neoformado das tíbias, dos grupos experimentais**55**
- FIGURA 1-** Sequência das reações interfaciais envolvidas na ligação entre tecido e cerâmicas bioativas (HENCH, 1991).**34**
- FIGURA 2-** Fotos da cirurgia. A: tricotomia e assepsia da região a ser operada. B: exposição do terço médio da tíbia, após a incisão feita através de um bisturi. C: defeito ósseo sendo realizado com broca de 2 mm de diâmetro. D: defeito ósseo. E: preenchimento do defeito ósseo pelo Biosilicato[®], somente nos grupos GB, GB60 e GB120. F: sutura do músculo e pele.....**45**
- FIGURA 3-** Biosilicato[®] . Granulometria entre 180-212µm**46**
- FIGURA 4-** Aparelho portátil de laser DMC, THERALASE Versão 24, classe 3B, Ga-Al-As diodo.....**48**
- FIGURA 5-** Desenho ilustrativo da padronização dos campos selecionados na análise morfométrica..... **50**
- FIGURA 6-** A: Máquina de ensaio universal Instron, modelo 4444. B: Posicionamento da tíbia durante o teste de flexão. Note que a região da fratura fica voltada para baixo, na linha de ação da carga a ser aplicada.**52**
- FIGURA 7-** Fotomicrografia dos achados morfológicos dos diferentes grupos experimentais. Pode ser observado na região do defeito, tecido de granulação (setas), tecido neoformado (*) e nos respectivos grupos a presença do biomaterial (B). A: controle fratura; B: laser 60J/cm²; C: laser 120J/cm²; D: Biosilicato[®]; E: Biosilicato[®] + laser 60J/cm²; F: Biosilicato[®] + laser 120J/cm². Coloração: H.E.**54**
- FIGURA 8-** Média e desvio padrão da área de osso neoformado dos diferentes grupos experimentais. a p≤0,05 versus GL60; b p≤0,05 versus GL120; c p≤0,05 versus GB60; *p≤0,05 versus GB120. GCF: controle fratura; GL60: laser 60J/cm²; GL120: laser 120J/cm²; GB: Biosilicato[®]; GB60: Biosilicato[®] + laser 60J/cm²; GB120: Biosilicato[®] + laser 120J/cm².**56**
- FIGURA 9-** Fotomicrografia dos achados morfométricos dos diferentes grupos experimentais. Pode ser observado na região do defeito tecido ósseo neoformado (*) e nos respectivos grupos a presença do biomaterial (B). A: controle fratura; B: laser 60J/cm²; C: laser 120J/cm²; D: Biosilicato[®]; E: Biosilicato[®] + laser 60J/cm²; F: Biosilicato[®] + laser 120J/cm². Coloração: TM.**57**

- FIGURA 10-** Microscopia eletrônica de varredura dos diferentes grupos experimentais. Pode ser observado presença de osso intacto, sem lesão (*), e na região do defeito ósseo (DO) tecido ósseo neoformado e nos respectivos grupos a presença do biomaterial (B). A: controle fratura; B: laser 60J/cm²; C: laser 120J/cm²; D: Biosilicato[®]; E: Biosilicato[®] + laser 60J/cm²; F: Biosilicato[®] + laser 120J/cm².**59**
- FIGURA 11-** Média da carga máxima nos diferentes grupos experimentais (GCF: controle fratura; GL60; laser 60J/cm²; GL120: laser 120J/cm²; GB: Biosilicato[®]; GB60: Biosilicato[®] + laser 60J/cm²; G120: Biosilicato[®] + laser 120J/cm²).....**60**
- FIGURA 12-** Média da tenacidade nos diferentes grupos experimentais (GCF: controle fratura; GL60; laser 60J/cm²; GL120: laser 120J/cm²; GB: Biosilicato[®]; GB60: Biosilicato[®] + laser 60J/cm²; G120: Biosilicato[®] + laser 120J/cm²).....**61**
- FIGURA 13-** Média da resiliência nos diferentes grupos experimentais (GCF: controle fratura; GL60; laser 60J/cm²; GL120: laser 120J/cm²; GB: Biosilicato[®]; GB60: Biosilicato[®] + laser 60J/cm²; G120: Biosilicato[®] + laser 120J/cm²). * p< 0,05 vs D.**61**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Reparo ósseo	14
1.2 Laser	17
1.2.1 Princípios gerais do laser	18
1.2.2 Interação laser tecido	19
1.2.3 Efeitos osteogênicos do laser	25
1.3 Biomateriais	29
1.3.1 Material bioativo	32
1.3.2 Interação laser e material bioativo	38
2. OBJETIVO	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 Animais de Experimentação	43
3.2 Delineamento Experimental	43
3.3 Técnica Operatória	44
3.3.1 Defeito Ósseo	44
3.4 Tratamento	46
3.4.1 Biomaterial	46
3.4.2 Laser	47
3.5 Eutanásia dos Animais	48
3.6 Coleta da Amostra	48
3.7 Análises	48
3.7.1 Análise Histológica	48
3.7.1.1 Avaliação Morfológica	49
3.7.1.2 Avaliação Morfométrica	49
3.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	50
3.9 Análise Biomecânica	51
3.10 Análise Estatística dos Dados	52
4. RESULTADOS	53
4.1 Análise Histológica	53
4.1.1 Avaliação Morfológica	53
4.1.2 Avaliação Morfométrica	55

4.2 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura	58
4.3 Análise Biomecânica	60
5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÃO	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
ANEXOS	75

1. INTRODUÇÃO

Fraturas ósseas podem ser definidas como uma interrupção na continuidade do osso, podendo ser provocado por traumatismo ou por natureza patológica (RUBIN et al., 2006; BRASILEIRO FILHO, 2006). Essas estão relacionadas a um alto índice de mortalidade e morbidade entre os indivíduos acometidos (POLINDER et al., 2005). As fraturas ocorrem com maior incidência em homens jovens e em mulheres em idade avançada. Este fato pode ser atribuído ao estilo de vida mais perigoso dos jovens e aos fatores hormonais relacionados com a osteoporose em mulheres. Fraturas de rádio, metacarpo, fêmur, falange dos dedos e tornozelo compreendem 60% das fraturas que os cirurgiões ortopédicos mais atendem (COURT-BROWN; CAESAR, 2006). É estimado que, ocorram somente nos Estados Unidos, cerca de 6,2 milhões de fraturas, sendo que destas, aproximadamente 5-10% desenvolvem problemas no processo de reparo (CLAES; WILLIE, 2007).

Embora a ciência tenha avançado muito nos últimos anos, no sentido de desenvolver recursos que auxiliem na consolidação óssea, complicações no processo de reparo ainda ocorrem, o que pode culminar no aparecimento do quadro clínico de pseudoartroses e mesmo em não-união ósseas (CLAES; WILLIE, 2007; EINHORN, 1998). Com isso, um grande número de cirurgias necessitam ser realizadas para a colocação de implantes ou enxertos ósseos (POLINDER et al., 2005). Somente em 2002, foram vendidos aproximadamente 14 bilhões de dólares em implantes ortopédicos, com uma expectativa de crescimento de 7% a 9% anualmente (RATNER, 2004).

Diante do exposto, fica evidente que as complicações relacionadas ao processo de consolidação estão associadas a uma substancial incapacidade física para os

indivíduos acometidos e a altos custos sócio-econômicos, constituindo um importante desafio à clínica médica.

1.1 Reparo ósseo

Quando ocorre lesão no tecido ósseo, o organismo desencadeia uma série de eventos a fim de promover o reparo ósseo. Este, por sua vez, é um complexo processo fisiológico regenerativo onde uma série de eventos celulares e moleculares está envolvida. Devido a sua complexidade, qualquer déficit ocorrido em algum ponto da etapa, altera a sequência fisiológica e predispõe a complicações (EINHORN, 1998; GIANNOUDIS et al., 2007; TSIRIDIS et al., 2007).

O processo de consolidação óssea requer sucessivas fases, as quais diferem dependendo do tipo e intensidade do trauma e a extensão da lesão no osso. Após uma lesão, ocorre uma sequência de processos reparativos, no qual células osteogênicas do periósteo começam a proliferar-se e diferenciar-se em osteoblastos (EINHORN, 1998; PINHEIRO; GERBI, 2006; GIANNOUDIS et al., 2007).

A consolidação da fratura é convencionalmente dividida em três fases: fase inflamatória, fase de reparação e fase de remodelamento (RUBIN et al. 2006).

A primeira fase deste processo é a inflamação. Após uma fratura, há o rompimento de vasos sanguíneos no local, onde ocorre extravasamento de sangue (hemorragia) e formação de um hematoma que circunda toda a área de lesão óssea. Com isso, ocorre a migração de células inflamatórias, fibroblastos e o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos. Ao mesmo tempo, as plaquetas e células inflamatórias liberam fatores de crescimento (PDGF, TGB- β , FGF e IL), onde ocorre a ativação de células osteoprogenitoras que estimulam a atividade osteoblástica e osteoclástica (COTRAN et

al., 2000; SCHINDELER et al., 2008). Assim, no final da primeira semana ocorre a organização do hematoma por tecido fibroso e posteriormente por tecido osteocondróide. Esse tecido fusiforme e predominantemente não calcificado se desenvolve sob a forma de um colar, rico em células osteogênicas, em torno da fratura que propicia sustentação entre as extremidades do osso fraturado. Esse período de reparação inicia-se logo após a fratura e leva a formação do calo fibroso (BRASILEIRO FILHO, 2006; COTRAN et al., 2000). Segundo Tsiridis et al. (2007), nas primeiras 24 horas após a fratura as células da medula óssea diferenciam um fenótipo osteoblástico. Por volta do terceiro dia, osteoblastos e células osteoprogenitoras dividem-se e diferenciam-se, promovendo a deposição de osso imaturo.

A fase de reparo constitui a segunda etapa. Esta etapa representa o período mais ativo da osteogênese, onde ocorre alta atividade osteoblástica e formação de matriz óssea mineralizada. A medida que o calo mole recém formado vai sendo removido, ao mesmo tempo ocorre a revascularização e a formação de um novo tecido conhecido como calo duro (SCHINDELER et al., 2008; COTRAN et al., 2000). Os osteoblastos, responsáveis pela síntese de matriz óssea, diferenciam-se a partir de células osteoprogenitoras na presença de fatores osteogênicos. A fonte de células osteoprogenitoras responsáveis pelo reparo ósseo ainda não está bem definida. No entanto, o periósteo e a medula óssea são uma fonte de células mesenquimais capazes de contribuir para a formação do osso durante a reparação (SCHINDELER et al., 2008). Aproximadamente no meio da segunda semana, há uma abundância de tecido cartilaginoso sobre o local da fratura, e têm início algumas alterações bioquímicas que irão promover a calcificação do tecido (EINHORN, 1998).

Algumas semanas após a fratura, o crescimento interno do calo une totalmente as extremidades ósseas e inicia-se a remodelação. O remodelamento é a etapa final deste processo, onde ocorre a absorção progressiva de tecido ósseo primário pelos osteoclastos e sua substituição por osso lamelar (BRASILEIRO FILHO, 2006; SCHINDELER et al., 2008). Nesta fase, o osso é forte o suficiente a ponto de qualificar-se como fratura clinicamente consolidada. No entanto, no ponto de vista biológico, a fratura pode não estar completamente consolidada e continuar sofrendo remodelação durante anos (RUBIN et al., 2006). Esse processo inicia-se com a mobilização do osso e sua volta à função normal e termina quando ele readquire a estrutura e a arquitetura de antes da fratura (COTRAN et al., 2000).

O tempo de consolidação de uma fratura é muito variável e depende de diversos fatores. Em crianças, este processo ocorre mais rapidamente, sendo que o tempo aproximado para que se forme um calo e este se consolide é por volta de quatro a seis semanas. Já em adultos, o tempo aproximado para a consolidação de uma fratura de osso longo é de cerca de três meses, embora esse tempo possa se estender para quatro ou até cinco meses (ADAMS; HAMBLEN, 1994). No entanto, mediante a presença de qualquer alteração no processo de consolidação da fratura, ocorrerá um atraso ou até mesmo uma não-consolidação. Há vários fatores que podem influenciar no tempo do processo de reparo, como idade, condições gerais do organismo, suprimento sanguíneo insuficiente, cisalhamento excessivo entre os fragmentos fraturados, infecção no osso, perda da aposição entre os fragmentos, presença de tumor no osso, dentre outros, resultando em não-união (ADAMS; HAMBLEN, 1994; BROWNER, 2003, RUBIN et al., 2006). Além disso, o movimento contínuo no local da fratura não consolidada pode levar a uma pseudo-artrose, onde se forma no local da fratura, um tecido semelhante ao

articular. Nesses casos a fratura nunca consolida e este tecido formado precisa ser removido cirurgicamente para que ocorra o reparo (RUBIN et al., 2006).

Diante disso, a não-consolidação de uma fratura causa grande incapacidade e na maioria dos casos é necessário uma intervenção cirúrgica (ADAMS; HAMBLÉN, 1994). Dentro desse contexto, vários métodos vêm sendo utilizados, a fim de melhorar e acelerar o processo de consolidação. Dentre estes, podem ser citados os efeitos de tratamentos como a aplicação de proteínas ósseas morfogenéticas (YAOITA et al., 2000), uso de campos eletromagnéticos (PICKERING; SCAMMELL, 2002) e do ultra-som de baixa intensidade (RUTTEN et al., 2007). Mais recentemente vem se destacando a utilização de materiais bioativos (HENCH, POLAK, 2002; MOURA et al., 2007) e do laser terapêutico de baixa potência (LLLT) (NICOLAU et al., 2003).

1.2 Laser

O termo laser é um acrônimo para *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, que significa “*amplificação de luz por emissão estimulada de radiação*” (KITCHEN; BAZIN, 2003; LOW; REED, 2001).

Em 1916, Albert Einstein postulou os princípios básicos da emissão estimulada de fótons. No entanto, somente em 1960, Theodore Maiman, propôs o desenvolvimento do primeiro laser, com um material sólido, utilizando o cristal de rubi. Este equipamento emitia luz na região do vermelho do espectro eletromagnético (SUN; TUNER, 2004; KITCHEN; BAZIN, 2003).

Desde sua descoberta, os lasers têm sido utilizados em diversas áreas da medicina. Os primeiros a utilizarem esta tecnologia foram os cirurgiões oftálmicos, contando com as interações fototérmicas e fotoablativas para cortar e até mesmo destruir tecidos (KITCHEN; BAZIN, 2003).

Porém, as aplicações clínicas das interações não térmicas da luz laser com os tecidos, tiveram início no final da década de 1960, com os trabalhos do professor Endre Mester, em Budapeste. Nesses estudos, foram observados os efeitos da radiação laser na modulação de processos biológicos, reportando, assim, o efeito fotobioestimulante do laser sobre o processo de cicatrização e reparo tecidual. Desde então, muitos estudos envolvendo a terapia laser de baixa potência (LLLT – low level laser therapy) foram iniciadas nos países da Europa Oriental, União Soviética e China (KITCHEN; BAZIN, 2003; SUN; TUNER, 2004). Em 1980, começaram a aparecer as aplicações clínicas da terapia laser, onde esta começou a ganhar popularidade nos países da Europa, Ásia, América do Sul e Austrália (SUN; TUNER, 2004).

Atualmente, a terapia laser vem sendo utilizada como forma de tratamento em muitas condições patológicas, com relatos de múltiplos efeitos clínicos, incluindo a cicatrização de tecidos moles e osso. No entanto, estes ainda não foram explicados e há controvérsias em relação aos mecanismos de ação e aos melhores parâmetros a serem utilizados em diferentes tipos celulares (COOMBE, 2001).

1.2.1 Princípios gerais do laser

A radiação laser é produzida quando um elétron, em seu estado excitado, sofre um salto quântico, passando de um alto para um baixo nível de energia, emitindo um fóton incidente. Se o fóton incidente interage (colide) com um átomo que já se encontra excitado, este cai para um nível mais baixo, liberando um fóton de luz idêntico ao fóton colidido. Esse fenômeno é conhecido como emissão estimulada e pode levar a amplificação, produzindo uma grande quantidade de fótons idênticos (LOW; RED, 2001; KITCHEN; BAZIN, 2003).

Em um sistema de classificação que gradua os diferentes tipos de laser em uma escala de 1 a 4, os lasers terapêuticos encontram-se na classe 3B e possuem uma

potência que varia de 1 a 500 mW. Os lasers cirúrgicos são classificados na classe 4 e possuem uma alta potência, de 500mW acima (KITCHEN; BAZIN, 2003; SUN; TUNER, 2004).

Os lasers de baixa potência, ou lasers terapêuticos, encontram-se no intervalo do espectro eletromagnético variando entre o visível e o infravermelho próximo. Estes abrangem os comprimentos de onda que variam entre 630 a 980nm, sendo este intervalo chamado de “janela terapêutica” para tecidos biológicos (KITCHEN; BAZIN, 2003; KITCHEN; PARTRIDGE, 1991).

Um dos primeiros meios utilizados na terapia laser é a mistura dos gases Hélio-neônio (He-Ne). Estes emitem radiação na região visível do espectro eletromagnético, possuindo comprimento de onda de 632,8 nm (LOW; REED, 2001; SUN; TUNER, 2004).

Outro meio popularmente utilizado são os díodos semicondutores, com emissão na faixa do infravermelho. Dentre eles, incluem o Arseneto de Gálio (Ga-As), com comprimento de onda de 904 nm, profundidade de penetração de 30 a 50mm, e opera em modo pulsado. O outro meio é o Arseneto de Gálio e Alumínio (As-Ga-Al), com comprimento de onda variando entre 780 a 890nm, profundidade de penetração entre 2 a 3cm, variando de acordo com as propriedades do tecido (LOW; RED, 2001; ORTIZ et al., 2001; SUN; TUNER, 2004).

1.2.2 Interação laser tecido

Uma vez que a energia laser é absorvida pelos tecidos, esta pode fazer com que as biomoléculas específicas alcancem um estado de excitação eletrônica, onde são capazes de sofrer reações químicas como oxidação, redução, isomerização, ruptura de ligações covalentes ou interações com outras moléculas (PARRISH et al., 1985).

De acordo com BAXTER (1997), a absorção da luz ocorre predominantemente no nível de interação molecular. A energia laser ao ser absorvida pelas biomoléculas fotorreceptoras pode desencadear três possíveis respostas:

- ✓ Excitação das cadeias de elétrons nas mitocôndrias, gerada pelo espectro visível e infravermelho próximo, visto que tais moléculas excitadas apresentam um maior potencial para gerar reações químicas;
- ✓ Vibrações moleculares, que consistem na ocorrência de estiramento e batimento das ligações, causando um deslocamento dos núcleos atômicos, porém sem afetar suas posições de equilíbrio. Essas vibrações são geradas pela absorção da irradiação infravermelha;
- ✓ Rotação total da biomolécula, ou parte dela ao redor de um eixo gerado pelo campo eletromagnético da luz incidente. Isso poderia levar a um aumento discreto da temperatura.

As radiações ópticas podem ser não ionizantes, sendo que sua ação pode ser fotoquímica para as radiações ultravioletas ou termal para a faixa do infravermelho. A região visível está entre estes dois extremos, sendo uma região de transição caracterizada pela ocorrência de ambos os efeitos tanto termais quanto fotoquímicos (KITCHEN; PARTRIDGE, 1991). KITCHEN e PARTRIDGE (1991) relatam que devido aos baixos valores de intensidade de irradiação utilizados na LLLT, usualmente a elevação da temperatura da região irradiada é inferior a 1°C sugerindo, portanto, que as respostas observadas estejam mais relacionadas ao efeito fotoquímico da irradiação do que ao aquecimento. Esta colocação também é sustentada por BASFORD (1989), ao relatar que os efeitos biológicos da radiação não resultam do aquecimento, visto a

ocorrência de uma elevação mínima na temperatura de 0,1 a 0,5°C, considerando a utilização de baixas doses e potência de 50 mW ou menos. Em outro estudo, KARU et al. (1990), evidenciou um aumento pouco significativo da temperatura ao irradiar culturas da *Escherichia coli*, concluindo que as doses e intensidades usadas em experimentos com culturas celulares não promovem um aquecimento importante das células, independente da ocorrência do eventual aquecimento transitório e local dos cromóforos em decorrência dos estados de excitação eletrônica.

A magnitude do efeito biomodulatório ou fotobiorregulador atribuído a LLLT ao interagir com os tecidos, o qual pode influenciar as funções celulares estimulando ou inibindo atividades bioquímicas e biofísicas, é referido como sendo dependente do comprimento de onda, dose e densidade de potência selecionados, assim como da frequência de tratamento, do tipo de lesão e do espectro específico de absorção dos cromóforos moleculares (KITCHEN; PARTRIDGE, 1991; KARU, 2000).

O efeito bioestimulante do laser sofreu tentativas de explicação através de várias teorias. No entanto, segundo Ortiz et al. (2001), a teoria fotoquímica é atualmente, a mais estudada e fundamentada e oferece uma explicação a sensibilidade das células à luz laser, considerando que a energia eletromagnética estimula fotoreceptores ou cromóforos os quais vão responder a uma faixa específica de luz, realizando assim, a conversão em energia fotoquímica. Esses cromóforos são um grupo de moléculas inter-relacionadas que podem ser enzimas, membranas moleculares, ou qualquer outra substância extra-celular, que estão capacitadas para absorver a luz e apresentam algumas etapas comuns na realização de efeitos causados pelas diferentes faixas de luz (KARU, 1998; BECKERMAN et al., 1992).

De acordo com citações feitas por KARU (2000), vários trabalhos evidenciaram fotosensibilidade a irradiação com luz visível monocromática, tendo significância

fisiológica somente sob certas condições, em mitocôndria de animais superiores, fungos, assim como na cadeia respiratória de células procariontes (*Escherichia coli*). No entanto, a questão sobre qual (is) molécula (s) é/são fotoreceptora (es) na cadeia respiratória permanece em aberto.

É proposto como mecanismo primário de ação a ocorrência de quatro respostas a partir da incidência da radiação laser, havendo a possibilidade de que a energia dos fótons produza: (1) variações no estado de oxidação-redução dos componentes da cadeia respiratória, juntamente com uma aceleração da transferência de elétrons; (2) alterações na atividade bioquímica e estrutural pelo aquecimento transitório dos cromóforos; (3) aumento da produção de ânion; (4) geração de oxigênio molecular. Na seqüência, os mecanismos secundários de ação conseqüentes às reações bioquímicas e/ou biofísicas iniciadas, correspondem a transdução do fotosinal e amplificação ao núcleo por uma cascata de reações ocorridas no citoplasma e na membrana celular, conectadas a alterações dos parâmetros de homeostase celular (pH, concentração de Ca^{+2} , AMP cíclico, ATP e outros), as quais acontecem minutos ou horas após a irradiação. Isto condiciona a ocorrência de possíveis mudanças na taxa de síntese de DNA e RNA, alterações na taxa de consumo de O_2 , alteração do potencial de membrana, entre outras (ORTIZ et al., 2001; KARU, 2000, 1998, 1989; BAXTER, 1997; KITCHEN; PARTRIDGE, 1991).

Visto que os efeitos biomodulatórios promovidos pela radiação laser acontecem em um amplo intervalo espectral, considera-se, portanto que existam diferentes cromóforos como alvos fotoreceptores. Além disso, é proposto que a intensidade dos efeitos seja determinada pelo estado fisiológico prévio da célula a irradiação, o qual é condicionado no caso de cultura celular, por exemplo, pela quantidade de nutrientes disponíveis e a idade da cultura. No caso de uma baixa concentração de oxigênio e pH,

o que provoca a alteração do estado redox, ocorrerá influência na resposta biológica a irradiação. Assim, a resposta celular será fraca ou ausente quando o potencial redox estiver ótimo, e forte quando o mesmo estiver alterado (estado intermediário) (KARU, 1998; 1995; 2000). Citações sobre evidências experimentais comprovam que a alteração deste estado redox no sentido da oxidação está correlacionado com o efeito estimulatório da radiação laser, enquanto a alteração no sentido da redução correlaciona-se com o efeito inibitório. Isto explica porque o efeito bioestimulante nem sempre é obtido, havendo uma grande diversidade de resultados reportados na literatura (KARU, 2000; ORTIZ et al., 2001).

São reportados na literatura vários efeitos da terapia laser em tecidos biológicos, sendo os três principais, os efeitos anti-inflamatório, analgésico e cicatrizante.

A ação inibitória do laser sobre o processo inflamatório pode ser embasada na promoção de diversas ações tais como (a) inibir a emergência de fatores quimiotáticos nas primeiras etapas da lesão; (b) interferir com os efeitos dos mediadores químicos ou superóxidos induzidos pela inflamação; (c) diminuir o volume de exsudado alterando a permeabilidade vascular (ORTIZ et al., 2001; KARU, 1998).

De acordo com KITCHEN e BAZIN (2003), os benefícios da laserterapia no tratamento de disfunções como a artrite reumatóide, osteoartrite e dor artrogênica foram avaliados por diversos grupos de pesquisa, apresentando variados graus de êxito. Embora diversos artigos tenham evidenciado uma redução na dor e inflamação, juntamente com uma melhora do estado funcional articular seguido ao tratamento laser, vários outros grupos de pesquisa não conseguiram detectar qualquer benefício da laserterapia, em experimentos bem controlados e comunicados.

ORTIZ et al. (2001) concluiu que o laser apresenta uma ação modulatória sobre o processo inflamatório, induzido no modelo experimental de inflamação em joelhos de coelhos submetidos ao tratamento com laser de Ga-Al-As (830 nm, CW, 77 mW), densidade de energia de $27,5 \text{ W/cm}^2$, com melhores resultados na dose de $3,4 \text{ J/cm}^2$.

Com relação aos mecanismos envolvidos na ação analgésica do laser, estes estão relacionados a múltiplos fatores. Segundo BORGES et al. (1996), os mecanismos que se destacam são provavelmente o relaxamento muscular e os mecanismos opióides endógenos. De acordo com COLLS (1985), o laser atua na redução da inflamação e da dor através da promoção da reabsorção de exsudatos, favorecendo assim a eliminação de substâncias algogênicas. Além disso, haveria uma elevação do limiar de dor nos nervos periféricos, interferindo assim na transmissão do estímulo nervoso, fato este evidenciado por demais autores (SNYDER-MACKLER; BORK, 1988; TAGUCHI, 1991).

Outra explicação proposta por COLLS (1985) é que poderia haver uma manutenção do gradiente iônico na membrana celular, evitando a sua despolarização devido ao aumento do ATP que favoreceria a expulsão de sódio mediante o mecanismo da bomba de sódio e potássio. Por outro lado, o autor comenta que o laser pode promover a diminuição da capacidade de modificar os gradientes iônicos de ambos os lados da membrana, impedindo assim as aberturas dos canais de sódio, provavelmente por uma mobilização de lipídios que atuam bloqueando os canais de penetração dos íons. Desta forma, pode-se inferir que o laser atua como um fator estabilizador do potencial de membrana em repouso (hiperpolarização), dificultando a transmissão do estímulo doloroso local.

O laser parece atuar também nos mecanismos envolvidos na cicatrização de tecidos. Diversos trabalhos evidenciam que a irradiação laser de baixa potência tem um

efeito significativo no metabolismo tecidual e na proliferação celular, justificando os resultados positivos da sua aplicação nos processos de reparação após uma lesão (PINHEIRO et al., 2001, VLADIMIROV et al., 2004; NINOMIYA et al., 2007). Resultados encontrados em uma série de estudos, sugerem que o LLLT promove um aumento da síntese de colágeno, aumento da proliferação e diferenciação de osteoblastos e fibroblastos, aumento da respiração mitocondrial e síntese de ATP (VLADIMIROV et al., 2004; NINOMIYA et al., 2007), maior recrutamento de macrófagos, aumento da angiogênese, aumento da atividade fagocitária o que resultará na aceleração do reparo de tecidos (BOSSINI et al., 2009; ORTIZ et al., 2001; LIRANI et al., 2006). Em cultura de condrócitos, Jia e Guo (2004) observaram um aumento do número de células, uma significativa elevação na atividade destas e maior deposição de matriz extracelular após a irradiação com laser terapêutico. Ainda, Chen et al. (2009) observaram aumento da proliferação de fibroblastos do tendão de Aquiles utilizando diferentes doses de laser GaAs (820 nm) e GaAsInP (635 nm).

1.2.3 Efeitos osteogênicos do laser

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

Hamajima et al. (2003) observaram que, após a irradiação com laser terapêutico (As-Ga-Al, 830nm, 500mW, $7.64\text{J}/\text{cm}^2$, por 20 min), houve um aumento da expressão do gene osteoglicina em culturas de osteoblastos. Renno et al. (2007) investigaram os efeitos da LLLT em diferentes comprimentos de onda (670nm, 780nm e 830 nm) e em diferentes fluências (0.5, 1, 5, e $10\text{ J}/\text{cm}^2$), na proliferação celular de osteoblastos e

osteosarcomas. Foi realizada apenas uma aplicação e após 24 horas a proliferação celular e a atividade da fosfatase alcalina foram analisadas. A proliferação de células osteoblásticas e atividade da fosfatase alcalina aumentaram após irradiação com laser 830 nm ($10\text{J}/\text{cm}^2$). No entanto, a proliferação de osteoblastos diminuiu após laser 780 nm ($1,5,10\text{J}/\text{cm}^2$), enquanto que a proliferação de osteosarcomas aumentou após irradiação com laser 670 nm ($5\text{J}/\text{cm}^2$) e 780 nm (1, 5, e $10\text{J}/\text{cm}^2$), mas diminuiu com laser 830 nm e a atividade da fosfatase alcalina não foi alterada. Esses achados mostram que diferentes tipos celulares respondem de forma diferente a específicos comprimentos de onda e fluência.

Stein et al. (2008) investigaram os efeitos da LLLT na proliferação e diferenciação de células osteoblásticas. As células foram irradiadas com fluências de 1 e $2\text{J}/\text{cm}^2$ usando um laser diodo de 670 nm e potência de 400mW. Após 24, 48 e 72 horas a irradiação, as células foram coletadas e avaliadas a atividade da fosfatase alcalina, níveis de osteopontina e colágeno tipo I. Os autores concluíram que houve um efeito bioestimulatório nas células osteoblásticas após 72h de irradiação.

Resultados positivos da laserterapia também podem ser encontrados em estudos *in vivo*. Freitas et al. (2000) investigaram os efeitos da terapia laser na osteogênese. Foram realizadas fraturas na tíbia de ratos e irradiadas com laser He-Ne ($\lambda = 633\text{nm}$, potência de 1mW, fluências de 3.15, 31.5 e $94.7\text{J}/\text{cm}^2$). As sessões iniciaram 24 horas após cirurgia e as aplicações foram feitas diariamente. Após 8 e 15 dias os ratos foram sacrificados. Análises histológicas e de microscopia eletrônica revelaram uma formação óssea trabecular mais espessa com fluências de 31.5 e $94.7\text{J}/\text{cm}^2$, o que indica uma maior síntese de fibras de colágeno e, portanto, um aumento da atividade osteoblástica. A fluência de $3.15\text{J}/\text{cm}^2$ não revelou ser eficiente, pois não houve nenhuma diferença aparente com o grupo controle. Em outro estudo, Garavello-Freitas et al. (2003)

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

Pinheiro et al. (2001) avaliaram o efeito da LLLT na cicatrização óssea após lesão cirúrgica criada no fêmur de ratos. Os resultados mostraram que o uso da LLLT de 830 nm pode aumentar o reparo ósseo no início da cicatrização.

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

Pretel et al. (2007) estudaram os efeitos do laser em defeitos ósseos em mandíbulas de ratos. Para o estudo, 30 ratos foram utilizados e distribuídos em 2 grupos, controle e irradiado com laser 780 nm, 35 mW, $178\text{J}/\text{cm}^2$ por 40 segundos. Os animais foram sacrificados 15, 45 e 60 dias após a cirurgia. Houve formação óssea em ambos os grupos, no entanto, o grupo laser exibiu uma resposta tecidual mais avançada em relação ao controle nos períodos de 15 e 45 dias. Porém, não houve diferenças significativas entre os grupos de 60 dias.

Em um recente estudo, Blaya et al. (2008) avaliaram os efeitos biomodulatórios do laser no reparo ósseo em ratos. Foi induzido um defeito ósseo com trefina de 2mm de diâmetro no fêmur dos ratos que foram distribuídos em 3 grupos. Grupo I serviu como controle, grupo II recebeu irradiação laser As-Ga-Al (830 nm, $10\text{J}/\text{cm}^2$, 50 mW) e o grupo III recebeu irradiação laser InGaAlP (685 nm, $10\text{J}/\text{cm}^2$, 35 mW). As aplicações foram realizadas a cada 48 horas em um total de 8 aplicações, sendo que os ratos foram sacrificados no 15º, 21º e 30º dias. Os resultados mostraram que, tanto o laser vermelho quanto o infravermelho, foram eficientes para promover o reparo ósseo, pois melhoraram a qualidade da estrutura óssea e formaram mais osso compacto que o grupo controle.

Shakouri et al. (2009) avaliaram o efeito da terapia laser em osteotomia em tibia de coelho através de análise de CT e análise biomecânica. O estudo consistiu de 2 grupos: controle e irradiado com laser (As-Ga-Al, 780 nm, $4\text{J}/\text{cm}^2$, 5 minutos durante 4 semanas). Os resultados sugerem que o laser pode facilitar o desenvolvimento do calo ósseo em estágios iniciais do processo de consolidação, porém com fracas propriedades biomecânicas.

Matsumoto et al. (2009) analisaram o papel da ciclooxygenase 2 no reparo ósseo em ratos tratados com LLLT. Foi realizado defeito ósseo na tibia dos ratos e estes foram submetidos a LLLT com laser As-Ga-Al 735 nm, $16\text{J}/\text{cm}^2$, por 1 minuto, durante 2, 7, 14 e 21 dias. Análises morfológicas e morfométricas revelaram que a qualidade do reparo ósseo e a quantidade de osso neoformado do grupo tratado foi superior ao controle. Da mesma forma, a ciclooxygenase 2 foi mais intensa nas células ósseas do grupo laser.

Ainda, em um trabalho realizado por nosso grupo de pesquisa foi verificado que o laser terapêutico (830nm, 60mW com fluências de $5\text{J}/\text{cm}^2$ e $50\text{J}/\text{cm}^2$), acelerou o processo de reparo ósseo em ratos, principalmente na maior fluência (Marino, 2003).

Apesar dos resultados positivos da terapia laser na aceleração do metabolismo tecidual e no processo de consolidação óssea, as modificações moleculares e metabólicas produzidas pela LLLT ainda não são completamente conhecidas.

1.3 Biomateriais

O conceito de biomateriais foi inicialmente postulado por Willians em 1987, que diz que “Biomaterial é um material utilizado em um dispositivo médico, destinado a interagir com sistemas biológicos” (RATNER, 2004).

Biomaterial é qualquer substância que pode ser utilizada como tratamento para substituição total ou parcial de qualquer tecido. Eles são usados clinicamente ou experimentalmente em dispositivos eletrônicos implantáveis, sistema de liberação de drogas, órgãos artificiais, substitutos ósseos, substituição de ligamento e tendão, dentre outros (SHI, 2004).

Se utilizados para substituir partes do sistema vivo do corpo humano, os biomateriais promovem ao paciente, benefícios como aumento da longevidade e aumento da qualidade de vida (SHI, 2004). Eles têm aplicações nas mais diversas áreas da medicina, tais como, implantes cardiovasculares, dentais, de tecidos moles, oftalmológicos, ortopédicos (RATNER, 2004; SHI, 2004). Os implantes ortopédicos representam um grande sucesso em restabelecer a mobilidade e qualidade de vida de milhões de pessoas em todo mundo. Em 2002, foram vendidos aproximadamente 14

bilhões de dólares em implantes ortopédicos, com uma expectativa de crescimento de 7% a 9% anualmente (RATNER, 2004). Diante do grande número de pessoas que necessitam desses implantes, é necessário o desenvolvimento de biomateriais cada vez mais sofisticados, e que induzam o mínimo de reação adversa possível.

O mecanismo de interação entre o implante e o tecido está diretamente relacionado com o tipo de resposta do tecido na interface tecido-implante. Nenhum material implantado em tecido vivo é inerte, pois todos os materiais induzem uma resposta para tecidos vivos. Há quatro tipos de respostas do material implantado, sendo elas tóxica, biologicamente próximos a inerte, bioativas e reabsorvíveis (HENCH, 1991; PEITL, 1995; RATNER, 2004).

Quando um material implantado é tóxico, ocorre morte dos tecidos vivos ao redor do implante (HENCH, 1991).

Nos materiais biologicamente próximos a inerte, ocorre o desenvolvimento de uma cápsula fibrosa ao redor do implante, que isola o implante do tecido hospedeiro. Essa cápsula fibrosa é uma auto proteção do organismo e com o passar do tempo forma uma completa encapsulação do implante. Como exemplos de materiais que desenvolvem esta resposta temos os metais e cerâmicas como alumina e zircônia (HENCH, 1991; PEITL, 1995; RATNER, 2004).

Materiais reabsorvíveis são designados para se degradar gradualmente por um período de tempo, sendo que o implante é gradativamente substituído pelo tecido formado, ocorrendo a reconstrução do tecido degenerado. Esses materiais são facilmente degradados pelos fluidos corpóreos ou pelas células macrófagas. Nesse grupo incluem o tricálcio fosfato e vidros bioativos (HENCH, 1991; PEITL, 1995; RATNER, 2004).

O outro tipo são os materiais bioativos que na presença de fluidos corpóreos desenvolvem uma camada de hidroxicarbonatoapatita na superfície, que promove uma ligação química entre o tecido e o implante. Vidros bioativos, vitrocerâmicas e hidroxiapatita são exemplos de materiais bioativos (HENCH, 1991; PEITL, 1995; RATNER, 2004).

Quando há uma lesão de grande extensão no tecido ósseo, dificilmente essa lesão será preenchida com tecido autógeno, proveniente do próprio indivíduo, pois a quantidade de tecido ósseo disponível é muito limitada. Além disso, a indução a uma cirurgia para retirada do osso autógeno pode levar a complicações pós operatórias. A utilização de tecidos alógenos, provenientes de cadáveres, também é limitada, devido a razões biológicas, mecânicas e até legais. Por isso, o desenvolvimento de materiais sintéticos são necessários. A utilização de materiais sintéticos vem crescendo a cada ano, pois possuem excelente biocompatibilidade e elevadas propriedades mecânicas. Dentre esses materiais estão os metais, as cerâmicas e os polímeros. No entanto, esses materiais são próximos a inertes e não tem interação com o tecido, por isso, frequentemente causam vários problemas na interface (PEITL, 1995; SHI, 2004).

Esse fato tem estimulado a utilização de materiais bioativos, por serem osteocondutores e produzirem uma ligação química direta com os ossos (PEITL, 1995). Quando um material bioativo é utilizado para preencher um defeito ósseo, há uma rápida regeneração do osso. O tecido formado tende a ser equivalente a arquitetura e as propriedades mecânicas do osso no local de reparo. Ocorre osteocondução e osteoprodução como consequência de uma rápida reação na superfície dos vidros bioativos. As reações de superfície liberam íons que provocam resposta intracelular e extracelular na interface dos vidros com seu ambiente celular (HENCH; POLAK, 2002).

1.3.1 Material bioativo

O conceito de materiais bioativos foi inicialmente postulado por Hench e diz que “um material bioativo é aquele que exibe uma resposta biológica específica na interface que resulta na formação de uma ligação química entre os tecidos e o material” (HENCH, 1991).

A introdução dos materiais bioativos teve início desde a guerra do Vietnã. Nesta época, em 1967, Hench estudava a interação de materiais vítreos e radiação nuclear. No entanto, devido a grande quantidade de pessoas que tinham seus membros amputados devido a rejeição a metais e polímeros que eram implantados no corpo, Hench começou a pesquisar um material que não provocasse rejeição no organismo. Em 1969, ele desenvolveu um projeto e testou vidros e vitrocerâmicas a base de silicato contendo quantidades críticas de íons Ca e P. Este material foi testado e apresentou resultados surpreendentes, pois em contato com os fluidos corpóreos desenvolveu uma camada de hidroxiapatita, que se ligava fortemente ao osso. Hench chamou esse biovidro de 45S5[®]. O desenvolvimento de novos biovidros segue, até hoje, a formulação descrita por Hench, devido ao excelente desempenho apresentado pelo material (RATNER, 2004).

Os materiais bioativos podem ser classificados em dois tipos: classe A e classe B. Os materiais da classe A são os que apresentam maiores níveis de bioatividade, apresentando osteoprodução e osteocondução. Osteoprodução é o processo no qual ocorre a colonização de células osteogênicas na superfície bioativa e osteocondução ocorre quando o material permite a migração do tecido ósseo sobre a interface do material. Bioatividade classe A ocorre quando um material exibe uma resposta intra e extracelular na sua interface. A classe B representa os materiais osteocondutivos, os quais exibem uma resposta extracelular na interface (CAO; HENCH, 1996).

A ligação química que ocorre entre os vidros bioativos e o osso deve-se a reatividade química dos vidros em fluidos corpóreos. As reações de superfície química resultam na formação de uma camada de hidroxicarbonatoapatita (HCA) na qual o osso pode se ligar. Essa ligação ocorre devido a uma sequência de reações (Figura 1). Quando um material bioativo entra em contato com fluidos corpóreos ocorre inicialmente a lixiviação dos íons Na^+ e formação de silanóis (SiOH), na qual caracteriza o estágio I. No estágio II ocorre aumento do pH devido ao aumento de concentração de OH^- , o que leva a ruptura das ligações Si-O-Si e a sílica é liberada na solução na forma de Si(OH)_4 . O estágio III ocorre a condensação do Si(OH)_4 para formar uma camada de sílica-gel. No estágio IV, uma fina camada de fosfato de cálcio começa a precipitar na camada de sílica gel e é seguida pela cristalização para formar cristais de hidroxicarbonatoapatita (estágio V) (HENCH, 1991; RATNER, 2004). Estes 5 estágios iniciais não dependem de tecido vivo para ocorrer. Eles ocorrem em água destilada ou em solução que simule o fluido corpóreo (*sorological body fluid* - SBF). No entanto, para que ocorra ligação com os tecidos, uma série de eventos adicionais deve ocorrer. Estes eventos não estão bem estabelecidos até o momento, porém a sequência de eventos biológicos que parecem estar envolvidas são os estágios 6 a 11, como mostra a figura 1 (HENCH, 1991).

Estágios	Processos envolvidos na ligação entre tecido e vidro bioativo
	Vidro bioativo
1 e 2	Formação de ligação SiOH e liberação de Si(OH) ₄
3	Policondensação de SiOH + SiOH → Si-O-Si para formar uma camada de sílica gel
4	Adsorção de Ca+PO ₄ +CO ₃ amorfo
5	Cristalização da hidroxicarbonatoapatita (HCA)
6	Adsorção de moléculas biológicas na camada de HCA
7	Ação de células macrófagas
8	Ligação de células mesenquimais
9	Diferenciação e proliferação de osteoblastos
10	Formação da matriz
11	Cristalização da matriz e crescimento do osso
	Osso

FIGURA 1- Sequência das reações interfaciais envolvidas na ligação entre tecido e cerâmicas bioativas (HENCH, 1991).

Para que ocorra ligação com o tecido, é necessário que a camada biologicamente ativa de HCA se desenvolva. Esta parece ser a única característica em comum de todos os implantes bioativos conhecidos. Para um material ser bioativo e formar uma ligação interfacial, o tempo dos estágios 4 e 5 deve ser igual ao tempo de biomineralização que ocorre normalmente *in vivo* (HENCH, 1991).

A grande vantagem dos biovidros é sua rápida taxa de reação e ligação extremamente forte com os tecidos. A camada formada entre o material e o tecido é

química e estruturalmente equivalente a fase mineral dos ossos, e imita a interface que é formada nos processos naturais de reconstrução dos tecidos (RAVAGNANI, 2007).

Ravagnani (2007) cita algumas características importantes apresentadas pelos vidros bioativos, as quais envolvem: rápida ligação com os tecidos, o que reduz o tempo de recuperação das lesões; os materiais são sintéticos e com isso diminui o risco de contaminação viral e transmissão de doenças, como é o caso de materiais bovinos ou humanos; produzem um ambiente adverso ao crescimento de bactérias, evitando assim infecções; contém elementos naturalmente presentes no organismo humano e possibilidade de rejeição praticamente nula.

Apesar dos efeitos benéficos dos vidros bioativos, que apresentam uma rápida taxa de reação com os tecidos, sua aplicação clínica tem sido limitada devido às baixas propriedades mecânicas. Deste modo, algumas cerâmicas e vitrocerâmicas produzidas para a obtenção de propriedades bioativas, apresentam maiores propriedades mecânicas, porém, esses materiais possuem um índice de bioatividade muito baixo. As cerâmicas e vitrocerâmicas são materiais obtidos pela cristalização controlada de certos vidros. Porém, a introdução de cristalinidade necessária para a obtenção desses materiais, reduz muito seu índice de bioatividade. Com isso, o índice de bioatividade das cerâmicas e vitrocerâmicas são muito mais baixas do que os vidros bioativos, embora apresentem propriedades mecânicas superiores (RAVAGNANI, 2003; MOURA, 2007).

Diante disso, os pesquisadores Hench (University of Florida), Zanotto e Peitl, ambos do Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) iniciaram investigações, objetivando buscar uma vitrocerâmica que conservasse o elevado nível de bioatividade apresentado pelos vidros bioativos e ao mesmo tempo apresentasse elevadas propriedades mecânicas. Esses pesquisadores

obtiveram e patentearam, na década de 90, uma vitrocerâmica altamente bioativa com elevadas propriedades mecânicas, o Biosilicato[®] (RAVAGNANI, 2003).

Como a 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-} . Estes são liberados em pequenas quantidades no processo de dissolução e formação da camada de hidroxicarbonatoapatita na superfície do Biosilicato[®], que possibilita o estabelecimento de uma ligação química extremamente forte com o tecido ósseo, assim como ocorre com os vidros bioativos (RAVAGNANI, 2003).

Algumas evidências sugerem que o Biosilicato[®] possui um potencial remineralizador e é capaz de estimular a diferenciação e proliferação de osteoblastos, podendo, com isso, acelerar o processo de consolidação de fraturas (RAVAGNANI, 2003). Moura et al. (2007) observaram *in vitro* que o Biosilicato[®] teve um efeito superior ao 45S5[®] (que atualmente é considerado o material com maior índice de bioatividade) na proliferação de células osteoblásticas, bem como na síntese de proteínas ligadas a maturação celular e deposição de matriz óssea.

Tendo em vista o estudo *in vitro* de Moura et al. (2007) que previamente demonstrou um grande potencial osteogênico do Biosilicato[®], surgiu a hipótese de que este biomaterial seria eficaz na aceleração do processo de consolidação de fraturas *in vivo* e poderia servir como um substituto para o tecido ósseo. Com isso, os pesquisadores Parizotto, Granito e Rennó, do laboratório de Eletrotermofototerapia, Ravagnani e Peitl (LaMaV), ambos os laboratórios da UFSCar, iniciaram um estudo *in vivo*, investigando os efeitos do Biosilicato[®], na consolidação de defeitos ósseos. Neste estudo, os autores compararam os efeitos do biovidro 45S5[®] e do Biosilicato[®] em defeitos ósseos, utilizando duas granulometrias diferentes. Sabe-se que o tamanho das

partículas pode afetar a taxa de dissolução de um biomaterial, influenciando na cinética das reações subseqüentes e, como consequência, na modulação da atividade osteoprodutora (GRANITO et al., 2009a).

Para o estudo, foram realizados defeitos ósseos nas tíbias dos ratos que foram distribuídos em cinco grupos: grupo defeito ósseo controle (CG); defeito ósseo preenchido com Biosilicato[®] (granulometria de 180-212 μ m) (G1); defeito ósseo preenchido com Biosilicato[®] (granulometria de 300-355 μ m) (G2); defeito ósseo preenchido com Bioglas 45S5[®] (granulometria de 180-212 μ m) (G3) e defeito ósseo preenchido com Bioglas 45S5[®] (granulometria de 300-355 μ m) (G4). Os animais foram sacrificados 15 dias após a cirurgia. A análise biomecânica não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. A análise histopatológica revelou que a quantidade de osso neoformado nos grupos Biosilicato[®], em ambas granulometrias, foi maior quando comparado ao grupo controle. Ainda, a faixa granulométrica de 180 a 212 μ m exibiu melhor reabsorção, o que sugere que quanto menor o tamanho das partículas, mais rápida será a reabsorção do biomaterial. Por fim, os resultados deste estudo sugerem que o Biosilicato[®] exerceu maior atividade osteogênica quando comparado com o biovidro 45S5[®] (GRANITO et al., 2009a).

Ainda, o mesmo grupo de pesquisa realizou um estudo para verificar e comparar o desempenho biológico *in vivo* do Biosilicato[®] e do Bioglas 45S5[®] em defeitos ósseos de tíbias de ratos, através das análises biomecânica e histomorfométrica. Para este estudo, 4 grupos contendo 10 animais cada, foram selecionados. Os grupos consistiram em controle intacto, defeito controle, Bioglas 45S5[®] e Biosilicato[®] (ambos com granulometria de 180 - 212 μ m). Após 20 dias a análise biomecânica revelou que o grupo Biosilicato[®] suportou uma carga maior e apresentou maior rigidez quando comparado com o grupo defeito ósseo controle. Na análise histomorfométrica, ambos

exibiram um aumento significativo da formação óssea, porém o Biosilicato[®] foi superior ao Bioglass 45S5[®] tanto em volume ósseo quanto em número de osteoblastos. Isso demonstra o potencial do Biosilicato[®] em favorecer a formação óssea (GRANITO, 2009).

Diante dessas evidências, o Biosilicato[®] torna-se uma alternativa promissora para acelerar o processo de consolidação de fraturas bem como para ser um substituto para o tecido ósseo.

1.3.2 Interação laser e material bioativo

Diante do exposto, os materiais bioativos e a LLLT apresentam efeitos benéficos no tratamento de reparo de fraturas, apresentando um potencial osteogênico. Há na literatura diversos trabalhos que investigam a utilização da LLLT e do uso de implantes e/ou enxertos no tratamento em tecido ósseo. No entanto, há um déficit em relação a trabalhos que investigam a interação de materiais bioativos com a LLLT.

Guzzardella et al. (2003) avaliaram os efeitos da estimulação laser na osteointegração de biomateriais. O laser utilizado foi As-Ga-Al 780nm, 300 J/cm², 1W, 300 Hz, emissão pulsada por 10 minutos. Foram realizados defeitos ósseos em 12 coelhos em ambos os fêmures e colocados implantes de hidroxiapatita. O fêmur esquerdo foi irradiado por cinco dias consecutivos. Os fêmures direitos foram utilizados como controle. Análises histomorfométricas realizadas 3 e 6 semanas após a implantação revelaram que o laser facilitou o crescimento ósseo nesses implantes e que o laser pode promover a osteointegração de implantes cerâmicos.

Pinheiro et al. (2003) avaliaram histologicamente os efeitos da LLLT (830nm, 40mW, 16J/cm²) no reparo de defeitos ósseos de ratos, os quais foram preenchidos com osso bovino inorgânico Gen-ox[®]. Os ratos foram distribuídos em 3 grupos, sendo grupo

controle, grupo Gen-ox[®] e grupo Gen-ox[®] associado com LLLT. Os ratos foram irradiados imediatamente após a cirurgia e a cada 48 horas durante 15 dias. A análise histológica revelou um reparo mais avançado no grupo irradiado comparado ao não irradiado. No grupo irradiado, houve um aumento da formação óssea e um aumento na quantidade de fibras de colágeno ao redor do implante após 15 dias. Os autores concluíram que a LLLT pode ter um efeito positivo no processo de reparo ósseo em defeitos com implante de osso bovino inorgânico.

No estudo de Khadra et al. (2004), foram investigados os efeitos da LLLT As-Ga-Al (830 nm, 150mW) na consolidação e fixação de implantes de titânio no osso. Os implantes de titânio foram implantados na tíbia de 12 coelhos. A irradiação laser foi aplicada imediatamente após a cirurgia e por 10 dias consecutivos. Após 8 semanas de tratamento, a análise histomorfométrica revelou que o grupo irradiado tinha mais fixação osso-implante comparado ao controle. O peso de cálcio e fósforo foi maior no grupo irradiado sugerindo que a maturação óssea ocorreu mais rapidamente no grupo irradiado. Os autores sugerem que a LLLT poderia ter um efeito favorável sobre a consolidação e fixação de implantes de titânio.

Weber et al. (2006) avaliaram os efeitos da LLLT na consolidação de defeitos ósseos associados com enxerto de osso autólogo. Para o estudo, foram utilizados 60 ratos distribuídos nos seguintes grupos: G1 (controle), G2 (LLLT), G3 (LLLT no enxerto) e G4 (LLLT no enxerto). Nos grupos G3 e G4, o LLLT foi aplicado na superfície do enxerto antes de reposicioná-lo sobre o defeito. O laser foi aplicado diariamente por 15 dias. Os animais foram sacrificados 15, 21 e 30 dias após a cirurgia. Os resultados mostraram que os grupos nos quais o laser foi aplicado na superfície do enxerto (G2 e G4), o remodelamento ósseo foi qualitativa e quantitativamente mais evidentes comparado aos grupos G1 e G3. Isso sugere que o LLLT resulta em um

positivo efeito biomodulatório na consolidação de defeitos ósseos associado com enxerto de osso autólogo.

Ainda, AboElsaad et al. (2009) avaliaram clinicamente e radiologicamente a influência do laser terapêutico em defeitos ósseos preenchidos com vidro bioativo durante 3 e 6 meses. Foi utilizado o laser As-Ga-Al 830 nm, contínuo, 40 mW, fluência de $4\text{J}/\text{cm}^2$, com energia total de $16\text{J}/\text{cm}^2$ em defeitos ósseos tratados com vidros bioativos. Foram realizados defeitos ósseos em vinte pacientes com periodontite crônica, e tratados com vidro bioativo e laser. O laser foi aplicado durante o procedimento cirúrgico e nos dias 3, 5 e 7 após a cirurgia. No lado contralateral foram realizados 20 defeitos ósseos e tratados somente com material bioativo. Após 3 meses, houve diferença estatisticamente significativa nos locais de aplicação do laser. No entanto, com 6 meses não houve diferença significativa entre os grupos. Os resultados mostram efeitos positivos do laser em acelerar o processo de reparo do tecido.

Baseados nos estudos prévios de Moura et al. (2007) e Granito et al. (2009), onde resultados promissores do Biosilicato[®] foram encontrados, nosso grupo de pesquisa levantou a hipótese de que os efeitos osteogênicos do Biosilicato[®] poderiam ser potencializados pela ação da irradiação laser. Diante disso, Fangel (2009) desenvolveu um estudo com o objetivo de analisar os efeitos da terapia laser e do Biosilicato[®] em defeitos ósseos de tíbias de ratas osteopênicas. O Biosilicato[®] foi utilizado na forma particulada, com a granulometria de 180 – 212 μm , devido ao melhor resultado encontrado no trabalho de Granito et al. (2009). Para o estudo, foram utilizadas 70 ratas osteopênicas onde estas foram distribuídas em 7 grupos sendo: controle padrão, controle fratura, laser $60\text{J}/\text{cm}^2$; laser $120\text{J}/\text{cm}^2$; Biosilicato[®], Biosilicato[®] + laser $60\text{J}/\text{cm}^2$ e Biosilicato[®] + laser $120\text{J}/\text{cm}^2$. Com exceção do grupo controle padrão, todos os animais foram submetidos a defeitos ósseos circulares na

tíbia. O comprimento de onda do laser utilizado foi 830 nm e o tratamento realizado por 7 dias. Após 14 dias, o teste biomecânico de indentação revelou que o laser não apresentou resultado significativo em relação ao grupo controle. A melhor resposta biomecânica foi encontrada no grupo Biosilicato[®] + laser 120. Apesar dos resultados positivos, este é um estudo prévio, pois ainda não se sabe quais são as alterações biomecânicas e até mesmo morfológicas da associação destas duas modalidades de tratamento em tecido ósseo sadio.

De acordo com o exposto, existe uma grande lacuna na literatura em estudos que avaliem a eficácia da associação do laser terapêutico e de materiais bioativos no tecido ósseo. Também, existem controvérsias a respeito de qual é o melhor parâmetro da terapia laser a ser utilizada na obtenção de um resultado eficaz no tecido alvo, já que a janela terapêutica é muito ampla e cada tecido possui sua especificidade (COOMBE et al., 2001). Dessa forma, este estudo foi realizado na tentativa de analisar os efeitos do laser sobre o tecido ósseo, bem como entender a interação deste recurso com materiais bioativos, para assim, propor tratamentos mais efetivos e confiáveis.

2. OBJETIVO

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

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais de Experimentação

Para a realização deste estudo foram utilizados 60 ratos machos, da linhagem Wistar, com três meses de idade e massa corporal média de 280 a 320 gramas.

Os animais foram procedentes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), e mantidos no Biotério do Departamento de Fisioterapia da UFSCar. Durante todo o procedimento experimental, os animais permaneceram em gaiolas apropriadas de polietileno padrão, em condições ambientais controladas (ciclo claro/escuro de 12/12 horas, ambiente higienizado, temperatura de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e ventilação adequadas), onde receberam ração comum e água a vontade. Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Eletrotermofototerapia da UFSCar. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (Parecer 023/2006).

3.2 Delineamento Experimental

Foram utilizados 60 ratos, que foram pesados e distribuídos, aleatoriamente, nos seguintes grupos (com 10 animais cada):

Grupo controle com fratura (GCF): os ratos deste grupo foram submetidos à fratura e a nenhum tratamento.

Grupo com laser $60\text{J}/\text{cm}^2$ (GL60): os ratos deste grupo foram submetidos à fratura e foram tratados com laser ($\lambda = 830\text{nm}$), com fluência de $60\text{ J}/\text{cm}^2$, por 17 segundos, fornecendo $1,7\text{J}$ de energia.

Grupo com laser 120J/cm² (GL120): os ratos deste grupo foram submetidos à fratura e foram tratadas com laser ($\lambda = 830\text{nm}$), com fluência de 120 J/cm², por 34 segundos, fornecendo 3,4J de energia.

Grupo com Biosilicato[®] (GB): os ratos deste grupo foram submetidos à fratura e o defeito ósseo foi preenchido com Biosilicato[®].

Grupo com laser 60J/cm² e Biosilicato[®] (GB60): os ratos deste grupo foram submetidos à fratura e o defeito ósseo foi preenchido com Biosilicato[®]. Além disso, esses animais foram tratados com laser ($\lambda = 830\text{nm}$), com fluência de 60 J/cm², por 17 segundos, fornecendo 1,7J de energia.

Grupo com laser 120J/cm² e Biosilicato[®] (GB120): os ratos deste grupo foram submetidos à fratura e o defeito ósseo foi preenchido com Biosilicato[®]. Além disso, esses animais foram tratados com laser ($\lambda = 830\text{nm}$), com fluência de 120 J/cm², por 34 segundos, fornecendo 3,4J de energia.

3.3 Técnica Operatória

3.3.1 Defeito Ósseo

Para a realização destas lesões foi utilizada uma mini-furadeira com rotação de 18.000rpm e com fresa de 2 mm de diâmetro, irrigada com soro fisiológico para evitar queimadura do tecido ósseo. Os animais foram anestesiados de acordo com a massa corporal, com uma mistura de Ketamina e Xilasina (80/10 mg/Kg). Após anestesia, tricotomia e assepsia da área a ser operada, foram realizados defeitos ósseos 10 mm abaixo da articulação do joelho, em ambas as tíbias, por meio de uma incisão tibial, no terço proximal (figura 2). O local do defeito foi previamente medido com a utilização de um paquímetro. A lesão foi realizada com a broca mantida na posição horizontal e

perpendicular em relação ao eixo longitudinal do osso, de modo a penetrar a cortical medial e danificar o canal medular abaixo desta, porém sem atingir a face contralateral. Finalizando, a pele foi suturada com fio de náilon monofilamentar 4.0 e distância de 1 cm entre os pontos e foi feita a limpeza local. Os animais foram mantidos em caixas individuais com livre acesso a água e comida até o momento do sacrifício.

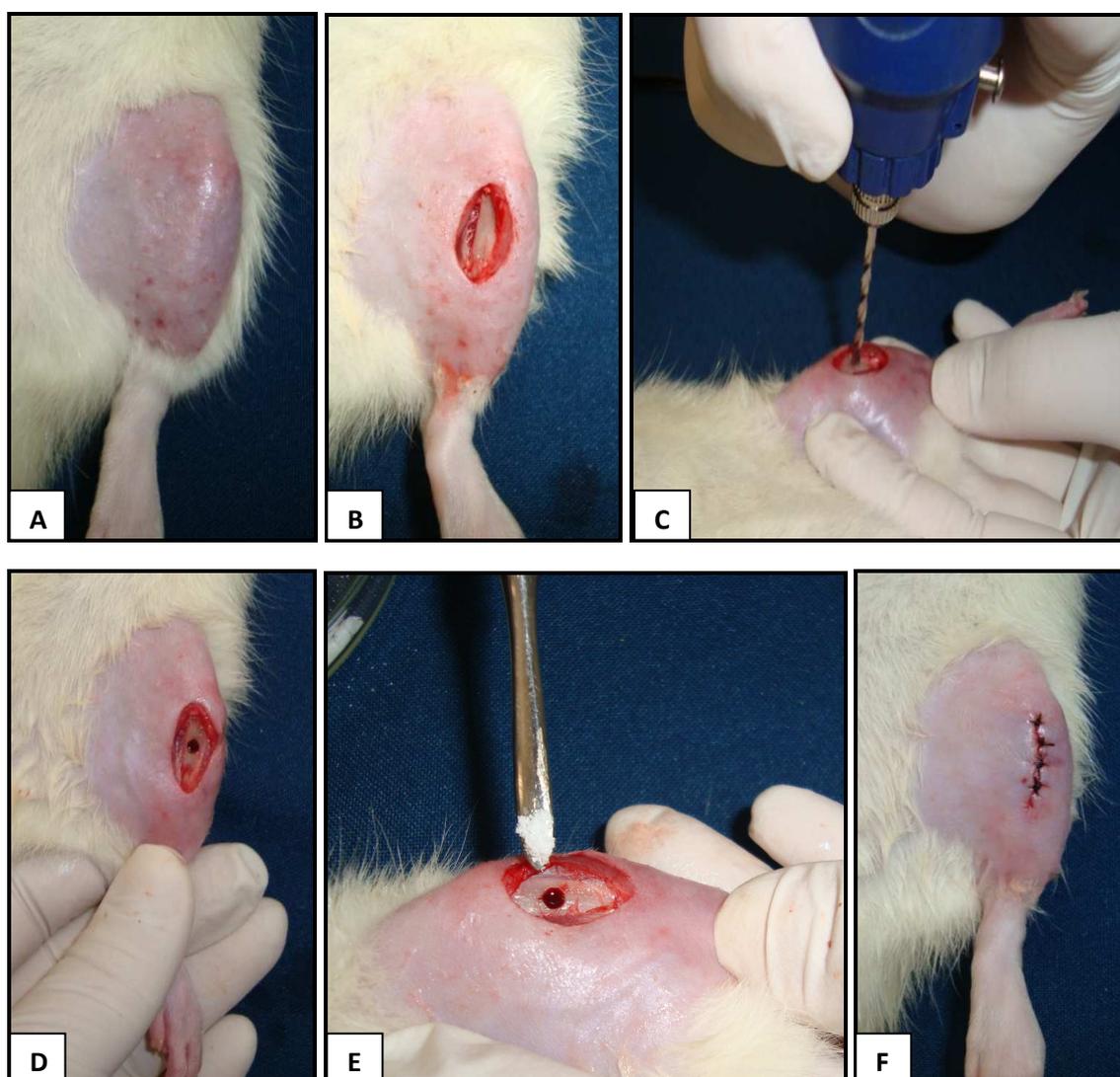


FIGURA 2 – Fotos da cirurgia. A: tricotomia e assepsia da região a ser operada. B: exposição do terço médio da tíbia, após a incisão feita através de um bisturi. C: defeito ósseo sendo realizado com broca de 2mm de diâmetro. D: defeito ósseo. E: preenchimento do defeito ósseo pelo Biosilicato®, somente nos grupos GB, GB60 e GB120. F: sutura do músculo e pele.

3.4 Tratamento

3.4.1 Biomaterial

O material bioativo utilizado foi o Biosilicato[®]. O Biosilicato[®] é uma vitrocerâmica altamente bioativa, apresentando os elementos químicos silício, oxigênio, sódio, cálcio e fósforo (Si, O, Na, Ca e P), sendo liberados em solução na forma de $\text{Si}(\text{OH})_4$, Na^+ , Ca^{2+} e PO_4^{2-} . O Biosilicato[®] foi empregado neste estudo através de grãos de aproximadamente 180-212 μm (figura 3). Este foi introduzido no defeito logo após a realização do mesmo, através de uma espátula apropriada até o preenchimento completo da fratura circular. Os detalhes da composição e do tratamento térmico estão descritas na patente WO 2004/074199.



FIGURA 3 - Biosilicato[®]. Granulometria entre 180-212 μm

3.4.2 Laser

O aparelho utilizado foi um modelo portátil de Laser DMC, THERALASE Versão 24, classe 3B, As-Ga-Al diodo, com comprimento de onda de 830nm, emissão contínua, potência de saída de 100mW, densidade de potência de $3,57\text{W}/\text{cm}^2$, área do feixe de $0,028\text{ cm}^2$, divergência de 1.5° (figura 4). A aplicação foi realizada em apenas um ponto, sendo na fluência de $60\text{ J}/\text{cm}^2$, por 17 segundos, fornecendo 1,7J de energia e também na fluência de $120\text{ J}/\text{cm}^2$, por 34 segundos, fornecendo 3,4J de energia.

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 imediatamente após o procedimento operatório e no segundo, quarto, sexto, oitavo, décimo e décimo segundo dias de pós-operatório, totalizando sete aplicações em quatorze dias. Foi utilizado somente um único ponto de aplicação sobre a fratura. Nas aplicações, foi utilizada a técnica pontual em contato, sendo a caneta do equipamento posicionada perpendicularmente ao tecido e as irradiações realizadas sempre no mesmo horário. Este aparelho foi fornecido pelo laboratório de Eletrotermofototerapia, do Departamento de Fisioterapia, da Universidade de Federal de São Carlos, sob responsabilidade do Prof. Dr. Nivaldo A. Parizotto.

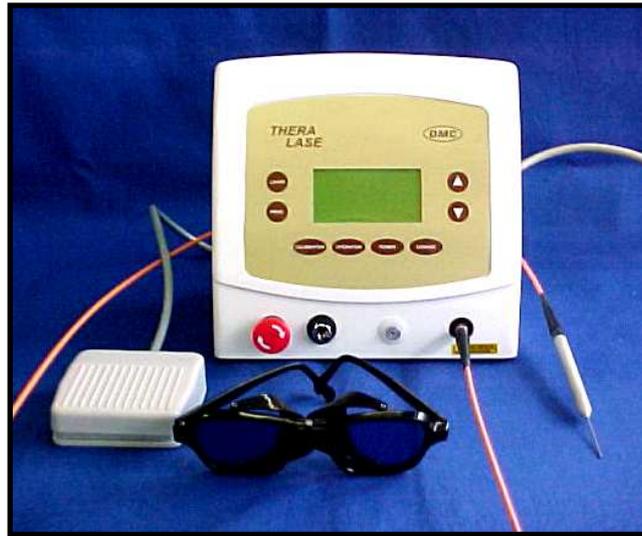


FIGURA 4 - Aparelho portátil de laser DMC, THERALASE Versão 24, classe 3B, As-Ga-Al diodo

3.5 Eutanásia dos Animais

No décimo quarto dia após o procedimento experimental, os animais foram submetidos a uma dose letal de anestésico, injetado por via intra peritonial.

3.6 Coleta da Amostra

Após a eutanásia, as tíbias tanto direita quanto esquerda de cada animal foram retiradas, para posteriormente serem analisadas. A tíbia direita foi designada para a análise biomecânica enquanto que a esquerda para a análise histológica. As análises foram realizadas contendo 10 amostras de cada grupo.

3.7 Análises

3.7.1 Análise histológica

Para uma avaliação qualitativa e quantitativa da concentração, estado de agregação e orientação das fibras de colágeno, as tíbias foram submetidas à

descalcificação em solução descalcificadora de MORSE (Citrato de Sódio a 20% e Ácido Fórmico a 50% em partes iguais) durante aproximadamente 15 dias, posteriormente reduzido, para então ser processado em parafina. Na seqüência, os blocos de parafina foram cortados longitudinalmente por meio de um micrótomo rotativo numérico (Ancap, modelo 297) do Laboratório de Eletrotermofototerapia (UFSCar) com espessura padronizada de 5.0µm. Os cortes foram então montados em lâminas histológicas e corados com Hematoxilina e Eosina (H.E.) e Tricrômico de Masson (TM). Cada animal foi representado por duas lâminas histológicas, cada uma com uma série de no mínimo 3 cortes consecutivos.

3.7.1.1 Avaliação Morfológica

A análise qualitativa da região do defeito ósseo foi realizada através das lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina. Por meio de um microscópio de luz (Olympus, Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan), foram observadas as seguintes mudanças no local da lesão: presença de tecido de granulação, quantidade de tecido ósseo neoformado, organização tecidual e área de necrose.

3.7.1.2 Avaliação Morfométrica

A morfometria da área de osso neoformado, na região do defeito de cada animal, foi mensurada utilizando um sistema de análise de imagem Motican 5.0. As lâminas coradas com Tricrômico de Masson foram observadas em duas áreas da região cortical do defeito. As duas áreas foram selecionadas e nomeadas C1 e C2 correspondendo a área cortical superior e inferior do defeito (figura 5). O tecido ósseo neoformado presente nessas regiões foram mensurados e a área registrada na objetiva de 10X. Depois de registradas, as áreas foram somadas, resultando no total da área de tecido neoformado do defeito.

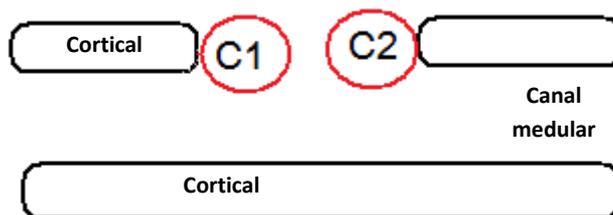


FIGURA 5- Desenho ilustrativo da padronização dos campos selecionados na análise morfométrica

3.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para o preparo das amostras foi utilizado a mesma metodologia para o preparo de lâminas histológicas. Após a realização dos cortes para a histologia de luz comum, foram realizados dois cortes seriados de 50 μm de espessura para análise por MEV. Após a realização dos cortes, estes foram desparafinizados usando banhos de xilol, álcool-xilol, álcool absoluto, álcool 90%, álcool 70% e finalizando em água destilada. Estas etapas são importantes para retirar elementos não pertencentes aos ossos e assim permitir analisá-los sem quaisquer interferências externas. Os cortes foram secos em estufas a 58°C e colocados sobre fitas de carbono dupla face no suporte utilizado para a realização da análise.

As fotomicrografias de MEV foram obtidas em um equipamento LEO (modelo 440) com detector OXFORD, operando com feixe de elétrons de 10kV. As amostras foram recobertas com 10nm de ouro em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020 e mantidas em dessecador até o momento de análise. Análise de Energia Dispersiva (EDS) foi realizada em um equipamento EDX LINK ANALYTICAL, (Isis System Series 200), com detetor de SiLi Pentafet, janela ultrafina ATW II (Atmosphere

Thin Window), de resolução de 133eV à 5,9KeV, acoplado a um Microscópio Eletrônico. Utilizou-se padrão de Cobalto para calibração, feixe de elétrons de 10 KV, distância focal de 25mm, *dead time* de 30%, corrente de 2,82A e I probe de 2000nA . A análise foi realizada no Departamento de Química da Universidade de São Paulo (EESC-USP).

3.9 Análise biomecânica

A análise biomecânica foi realizada através do teste de flexão de três pontos na tíbia direita dos animais de todos os grupos. O teste foi realizado no Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) através da 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 1 KN e pré-carga de 5 N. Foi utilizado um suporte de metal de 3,8cm de comprimento, expondo somente 1,8cm do corpo de prova. As tíbias foram posicionadas com a região do defeito voltadas para baixo, de modo a submeter esta região a uma tração (Figura 6). A partir deste teste foram obtidas as seguintes variáveis: Carga Máxima (KN), Resiliência (J) e Tenacidade (J).

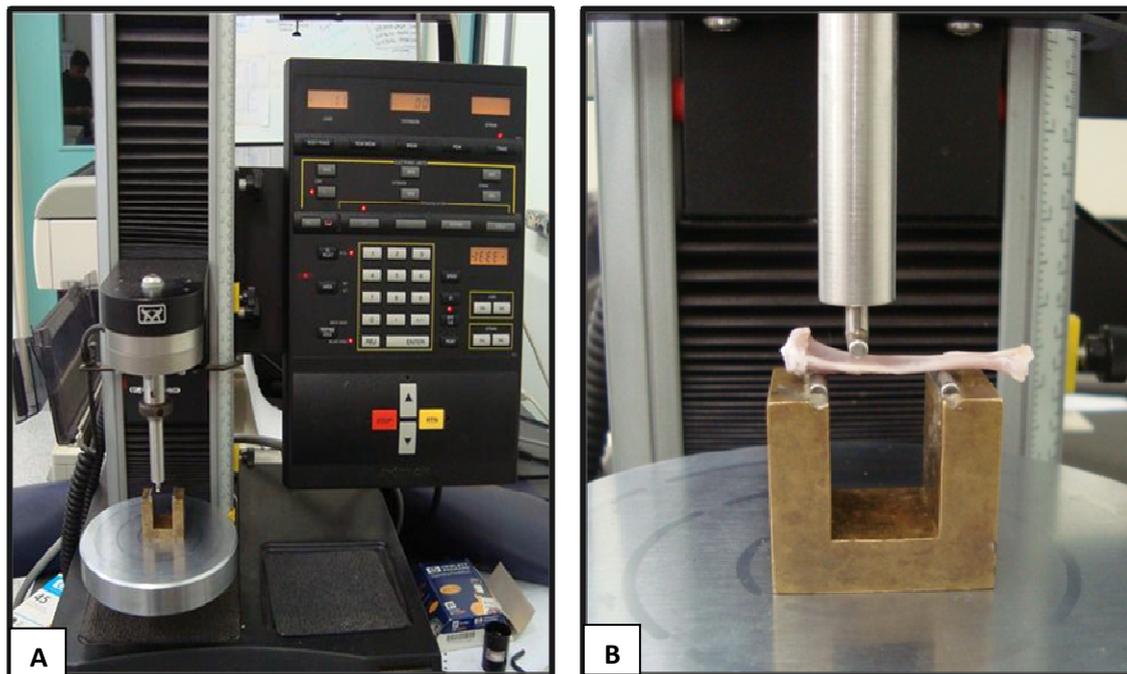


FIGURA 6- A: Máquina de ensaio universal Instron, modelo 4444. B: Posicionamento da tíbia durante o teste de flexão. Note que a região da fratura fica voltada para baixo, na linha de ação da carga a ser aplicada.

3.10 Análise estatística dos dados

Os dados foram analisados estatisticamente através de técnicas descritivas, tais como tabelas e gráficos, na forma de médias e desvios padrão. O teste de normalidade Shapiro–Wilk’s W test foi utilizado para todas as variáveis. Nos casos em que houve distribuição normal da amostra, as comparações foram feitas usando one-way (ANOVA) com post-hoc Tukey. Nos casos onde houve distribuição anormal da amostra, o teste Kruskal Wallis foi utilizado. As análises foram realizadas no software STATISTICA version 7.0 . O nível de significância foi de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Análise histológica

4.1.1 Avaliação morfológica qualitativa

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

A figura 7A mostra a região do defeito ósseo do grupo controle, onde pode ser observado presença moderada de tecido ósseo neoformado, porém pouco celularizado em relação aos demais grupos experimentais.

Através da figura 7B e 7C, observamos que os grupos irradiados, tanto na dose de 60 J/cm² quanto na dose de 120 J/cm², apresentaram um padrão histológico compatível com um estágio mais avançado de reparo quando comparados com o grupo controle. Foi possível observar que, estes animais apresentaram grande quantidade de tecido ósseo neoformado, um maior recrutamento celular e uma melhor organização tecidual. No entanto, não foram observadas diferenças morfológicas entre os grupos irradiados.

Nos animais tratados com Biosilicato[®], podemos observar a presença de partículas do biomaterial, circundadas por tecido ósseo neoformado (Figura 7D). É interessante notar que o crescimento ósseo nestes grupos ocorreu entre as partículas do biomaterial, formando trabéculas em toda a região do defeito. O grupo tratado somente com Biosilicato[®] apresentou uma quantidade de tecido ósseo neoformado semelhante ao grupo controle, porém um maior recrutamento celular foi observado no grupo Biosilicato[®]. Nos grupos onde houve a associação do laser e do biomaterial, foi encontrado menor quantidade de tecido ósseo em relação aos demais grupos experimentais e intensa presença de tecido de granulação. Através da figura 7E e 7F podemos visualizar esses achados.

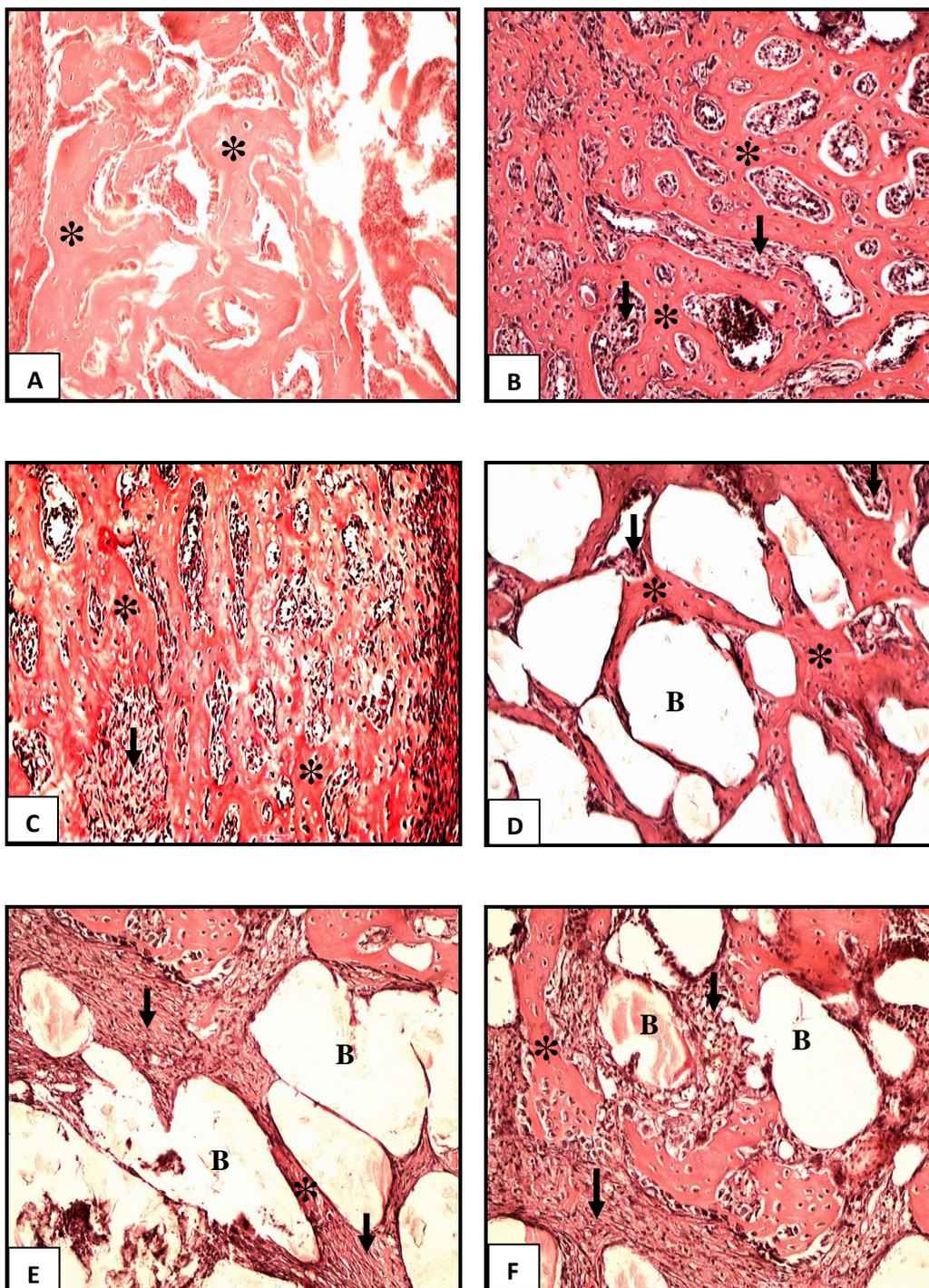


FIGURA 7 - Fotomicrografia dos achados morfológicos dos diferentes grupos experimentais. Pode ser observado na região do defeito, tecido de granulação (setas), tecido neoformado (*) e nos respectivos grupos a presença do biomaterial (B). A: controle fratura; B: laser 60J/cm²; C: laser 120J/cm²; D: Biosilicato[®]; E: Biosilicato[®] + laser 60J/cm²; F: Biosilicato[®] + laser 120J/cm². Coloração: H.E.

4.1.2 Avaliação morfométrica

A tabela 1 e a figura 8 mostram os resultados da análise morfométrica das lâminas coradas com tricrômico de Masson.

Tabela 1- Médias e Desvios Padrão do total da área de osso neoformado das tíbias, dos grupos experimentais

Grupo	Oosso neoformado (μm^2)
GCF	174.446 \pm 47.696 abc*
GL60	268.664 \pm 63.699
GL120	252.365 \pm 70.334
GB	166.223 \pm 69.465 abc*
GB60	47.964 \pm 20.916 ab
GB120	64.647 \pm 24.066 ab

a $p \leq 0,05$ versus GL60; b $p \leq 0,05$ versus GL120; c $p \leq 0,05$ versus GB60; * $p \leq 0,05$ versus GB120.; GCF: controle fratura; GL60: laser 60J/cm²; GL120: laser 120J/cm²; GB: Biosilicato[®]; GB60: Biosilicato[®] + laser 60J/cm²; GB120: Biosilicato[®] + laser 120J/cm².

De acordo com a tabela 1 e a figura 8, observa-se que os grupos tratados somente com laser, nas duas fluências utilizadas neste estudo, apresentaram médias estatisticamente maiores quando comparadas com as médias dos demais grupos experimentais. No entanto, quando os resultados dos grupos GL60 E GL120 foram comparados, não foram encontradas diferenças estatísticas entre eles.

Pode-se observar ainda que, o grupo tratado somente com Biosilicato[®] não apresentou diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle, porém apresentou melhores resultados quando comparado aos grupos onde houve a associação do Biosilicato[®] e laser. Esses grupos apresentaram valores estatisticamente

menores quando comparados com os outros grupos tratados e com o grupo controle fratura. A figura 9 ilustra as fotomicrografias da análise morfométrica.

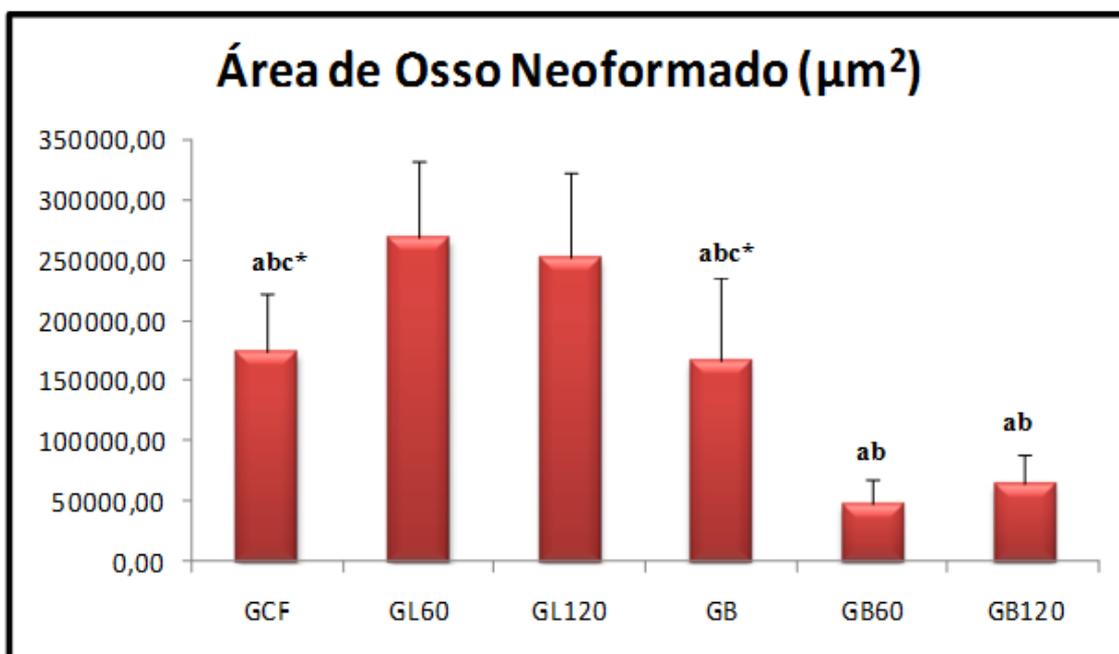


FIGURA 8- Média e desvio padrão da área de osso neoformado dos diferentes grupos experimentais. a $p \leq 0,05$ versus GL60; b $p \leq 0,05$ versus GL120; c $p \leq 0,05$ versus GB60; * $p \leq 0,05$ versus GB120. GCF: controle fratura; GL60: laser 60J/cm²; GL120: laser 120J/cm²; GB: Biosilicato[®]; GB60: Biosilicato[®] + laser 60J/cm²; GB120: Biosilicato[®] + laser 120J/cm².

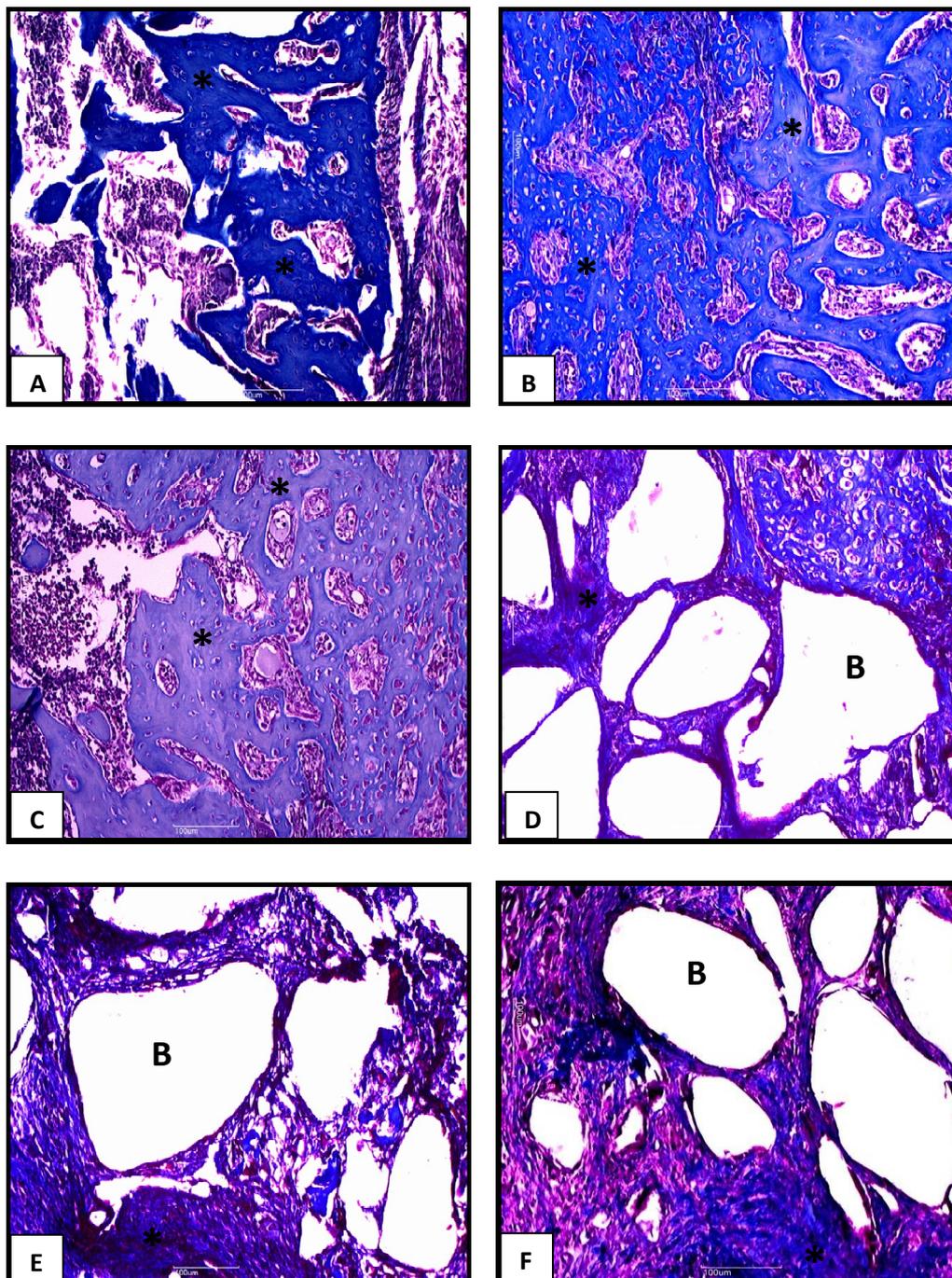


FIGURA 9 - Fotomicrografia dos achados morfométricos dos diferentes grupos experimentais. Pode ser observado na região do defeito tecido ósseo neoformado (*) e nos respectivos grupos a presença do biomaterial (B). A: controle fratura; B: laser 60J/cm²; C: laser 120J/cm²; D: Biosilicato[®]; E: Biosilicato[®] + laser 60J/cm²; F: Biosilicato[®] + laser 120J/cm². Coloração: TM.

4.2 Análise por microscopia eletrônica de varredura

Através da microscopia eletrônica de varredura foi possível comparar qualitativamente as diferenças estruturais das tíbias entre os grupos experimentais. Na figura 10A pode-se notar a presença de tecido ósseo neoformado no grupo controle. Nas figuras 10B e 10C é possível observar que o defeito ósseo no grupo laser (GL60 e GL120) apresentou-se preenchido por tecido ósseo neoformado, enquanto que o grupo controle (figura 10A) também apresentava preenchimento por tecido ósseo neoformado, porém em menor quantidade. É evidente nos grupos Biosilicato[®] a presença de partículas do biomaterial, mostrando que o mesmo ainda se encontrava presente em toda a região do defeito (Figuras 10D, 10E e 10F).

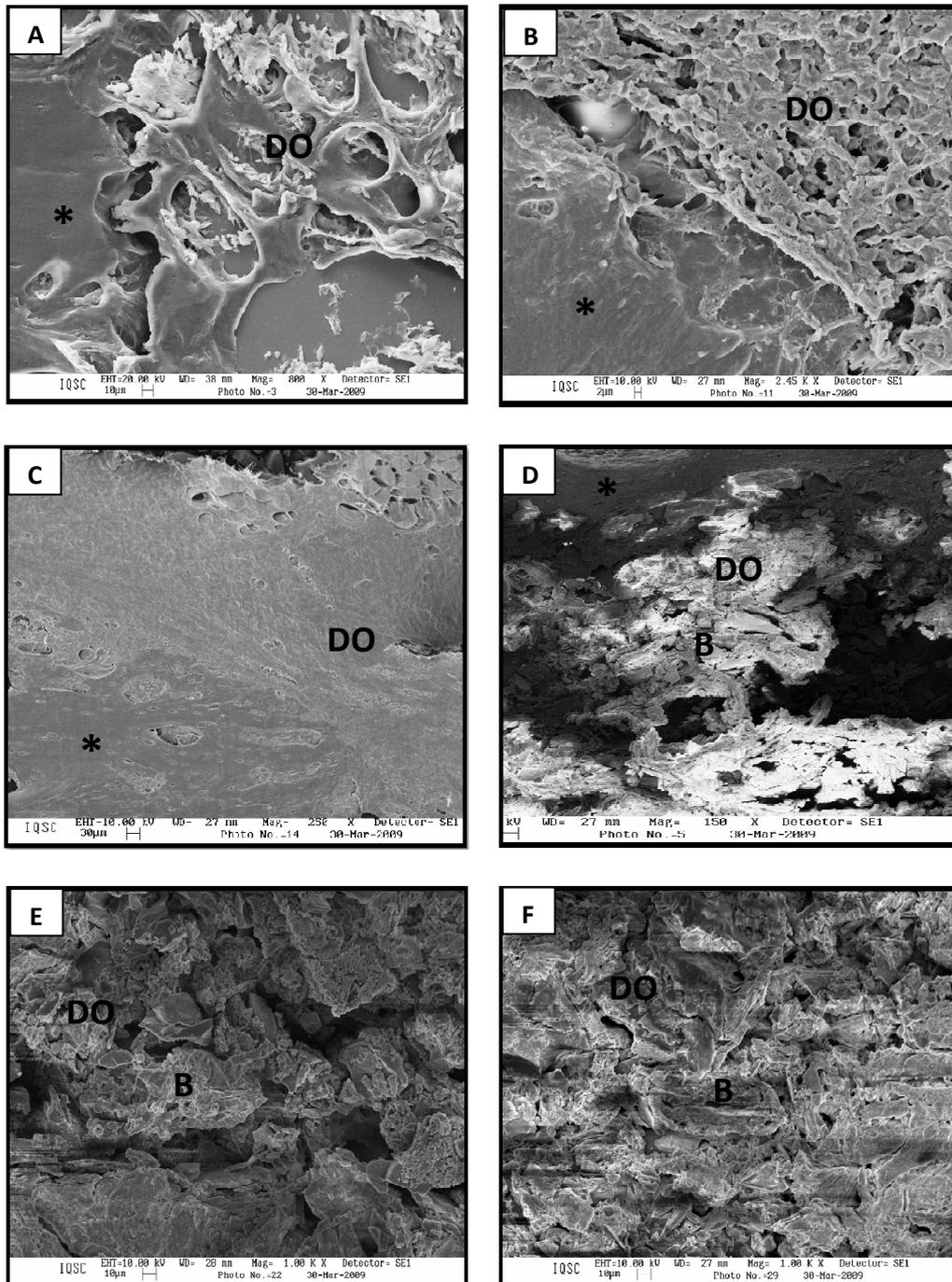


FIGURA 10 – Microscopia eletrônica de varredura dos diferentes grupos experimentais. Pode ser observado presença de osso intacto, sem lesão (*), e na região do defeito ósseo (DO) tecido ósseo neoformado e nos respectivos grupos a presença do biomaterial (B). A: controle fratura; B: laser 60J/cm²; C: laser 120J/cm²; D: Biosilicato[®]; E: Biosilicato[®] + laser 60J/cm²; F: Biosilicato[®] + laser 120J/cm².

4.3 Análise biomecânica

Por meio dos dados obtidos no teste de flexão em três pontos, foi possível comparar os valores das propriedades biomecânicas entre os grupos. As figuras 11, 12 e 13 mostram os valores médios das diferentes variáveis do ensaio biomecânico. Pode ser observado que não houve diferença estatisticamente significativa das propriedades biomecânicas entre os grupos experimentais.

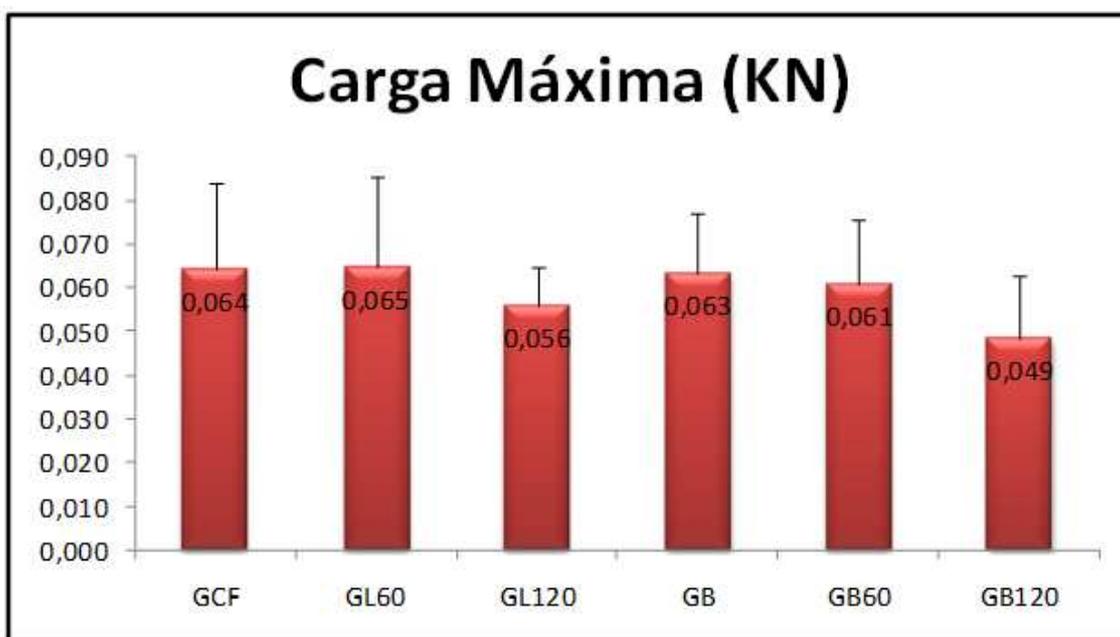


FIGURA 11- Média da carga máxima nos diferentes grupos experimentais (GCF: controle fratura; GL60; laser 60J/cm²; GL120: laser 120J/cm²; GB: Biosilicato[®]; GB60: Biosilicato[®] + laser 60J/cm²; G120: Biosilicato[®] + laser 120J/cm²).

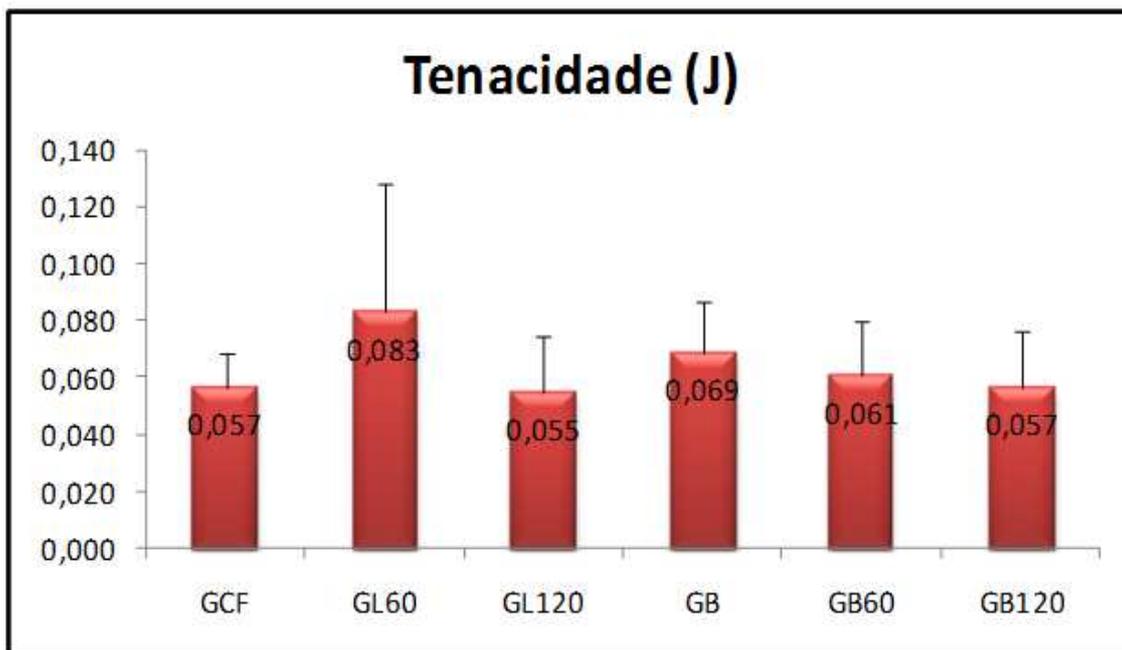


FIGURA 12- Média da tenacidade nos diferentes grupos experimentais (GCF: controle fratura; GL60: laser 60J/cm²; GL120: laser 120J/cm²; GB: Biosilicato[®]; GB60: Biosilicato[®] + laser 60J/cm²; G120: Biosilicato[®] + laser 120J/cm²)

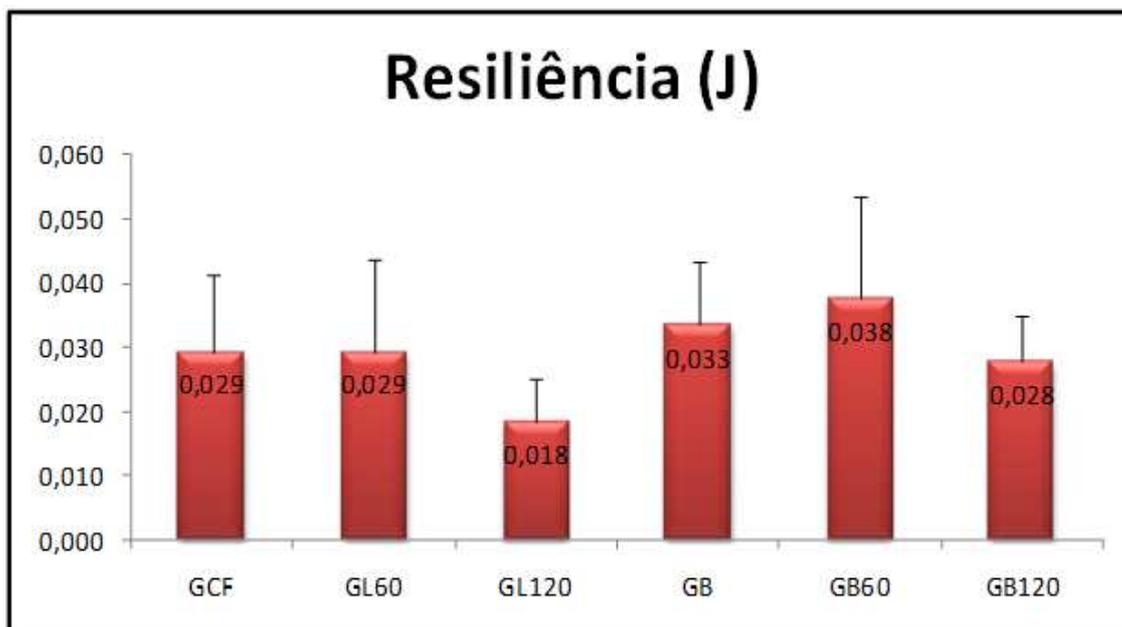


FIGURA 13- Média da resiliência nos diferentes grupos experimentais (GCF: controle fratura; GL60: laser 60J/cm²; GL120: laser 120J/cm²; GB: Biosilicato[®]; GB60: Biosilicato[®] + laser 60J/cm²; G120: Biosilicato[®] + laser 120J/cm²).

5. DISCUSSÃO

Muitos autores vêm utilizando o modelo de defeitos circulares no tecido ósseo para investigar agentes terapêuticos na osteogênese, dentre eles a LLLT e os biomateriais (PINHEIRO et al., 2003; LIRANI et al., 2006; FREITAS et al., 2000; GRANITO et al., 2009).

O laser terapêutico de baixa potência 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, 2005), formação de nódulo ósseo (OZAWA, 1998) e aumento da atividade fosfatase alcalina (RENNO et al., 2007). O laser AS-GA-AL com comprimento de onda de 830 nm é atualmente o laser mais indicado na estimulação do tecido ósseo, pois este tem mostrado excelentes resultados no processo de reparo ósseo (PINHEIRO et al., 2001; LIU, 2007).

No presente estudo, foi observado através da análise morfométrica, que a quantidade de tecido ósseo neoformado apresentada pelos grupos irradiados foi maior que a quantidade apresentada pelos demais grupos. No entanto, quando as duas fluências foram comparadas, não foram encontradas diferenças estatísticas entre elas, o que sugere que a LLLT foi eficiente para estimular o reparo ósseo tanto na dose de $60\text{J}/\text{cm}^2$ quanto na dose de $120\text{J}/\text{cm}^2$.

Esses resultados concordam com os de Silva Junior et al. (2002) que utilizaram laser AS-GA-AL (830 nm, 40mW) em defeitos ósseos. Os autores encontraram através da análise morfométrica um aumento da formação óssea nos grupos irradiados comparado com o controle. Barushka et al. (1995) avaliaram os efeitos do laser HeNe no reparo ósseo de tíbias de ratos e a análise morfométrica revelou um rápido acúmulo

de tecido ósseo no local da lesão de ratos irradiados com laser. Merli et al. (2005) também demonstraram resultados positivos após aplicação de laser (AS-GA-AL 670nm, 15mW) em defeitos ósseos. Após 14 dias, os autores encontraram um aumento da área de tecido neoformado no grupo tratado com laser comparado ao grupo controle. Pretel et al. (2007) em análise histológica, observaram um efeito bioestimulatório do laser no remodelamento ósseo. Após 15 dias de LLLT (780nm, 35mW) os grupos irradiados apresentaram mais rápida formação da matriz óssea comparado com o grupo controle. Pinheiro et al. (2001) e Liu et al. (2007) após utilizarem laser 830nm verificaram que a LLLT pode acelerar o processo de reparo ósseo.

A análise biomecânica do presente estudo foi realizada através do teste de flexão de três pontos. Este teste é amplamente utilizado para avaliar diferentes tipos de tratamentos sobre o tecido ósseo, especialmente sobre o processo de reparo de fratura (LUGER et al., 1998; LIRANI et al., 2006). Os dados de tal teste não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos, o que sugere que a LLLT não foi capaz de aumentar a força óssea dos ratos após 14 dias de P.O. Marino (2003) utilizando um modelo experimental parecido, não obteve aumento das propriedades mecânicas após uso do laser AS-GA-AL 830nm. David et al. (2001) utilizaram laser HeNe 632nm, 10mW sobre o processo de reparo ósseo. Os autores não obtiveram resultados positivos no teste biomecânico após o uso desta terapia. Da mesma forma, Otremski et al. (2004) não encontraram evidências de aumento da força óssea após irradiação com laser HeNe 632nm.

Contrariamente, outros autores vêm demonstrando resultados positivos da LLLT sobre a força óssea. Luger et al. (1998) observaram que o laser HeNe (632.8nm 35mW) elevou a carga máxima e a rigidez das tíbias irradiadas após 14 dias, sugerindo que a

LLLT pode intensificar o processo de reparo ósseo. Também, Lirani et al. (2006) verificaram que a LLLT promoveu uma aceleração do processo de formação óssea e um aumento da resistência do osso após irradiação com laser AS-GA-AL 780nm, 30mW. Porém, é difícil a comparação entre os estudos, pois os modelos de fratura supracitados são diferentes do modelo empregado no presente estudo.

Outro recurso que vem sendo amplamente utilizado no processo de reparo ósseo são os biomateriais, onde sua utilização tem crescido consideravelmente nos últimos anos (RATNER, 2004). O presente estudo utilizou um material vitrocerâmico altamente bioativo chamado Biosilicato[®]. É relatado na literatura que quando um material bioativo entra em contato com fluidos corpóreos, ocorre uma série de reações químicas, onde uma camada de hidroxicarbonatoapatita é formada na superfície, promovendo assim a osteogênese (HENCH, 1991). A escolha da granulometria do Biosilicato[®] utilizado neste estudo baseou-se em estudo anterior realizado por Granito et al. (2009), onde foram comparadas duas faixas granulométricas do Biosilicato[®] sendo 180-212 μm e 300-355 μm . A granulometria de 180 a 212 μm exibiu melhor reabsorção, o que sugere que quanto menor o tamanho das partículas, mais rápida será a reabsorção do biomaterial.

Os resultados deste estudo demonstram que, na análise morfométrica, o grupo Biosilicato[®] apresentou área de osso neoformado semelhante ao grupo controle. No entanto, a análise qualitativa mostrou um maior recrutamento celular no grupo Biosilicato[®] quando este foi comparado ao grupo controle.

Estudos prévios, também demonstram um alto potencial osteogênico do Biosilicato[®]. No estudo de Moura et al. (2007) foi observado *in vitro*, que o Biosilicato[®] pode induzir a formação de tecido ósseo em um sistema de cultura de células

osteoblásticas. Baseados nestes resultados promissores, foi realizado um estudo *in vivo* em defeitos ósseos por Granito et al. (2009). Observou-se uma maior formação óssea em defeitos preenchidos com Biosilicato[®] quando este foi comparado ao biovidro 4SS5[®], considerado atualmente o padrão ouro em materiais bioativos.

Com relação a análise biomecânica, o grupo Biosilicato[®] não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparados com os demais grupos experimentais 14 dias após a cirurgia. No entanto, em estudo realizado por Granito et al. (2009), os defeitos ósseos que foram preenchidos com Biosilicato[®] exibiram maior área de tecido ósseo neoformado e também melhores propriedades biomecânicas 20 dias após a cirurgia, onde estes suportaram maior carga e apresentaram maior rigidez comparados ao grupo controle. Sendo assim, é possível que o período experimental de 14 dias utilizado neste estudo não seja suficiente para induzir modificações que poderiam levar a um aumento na força óssea.

A partir dos resultados promissores do Biosilicato[®] no processo de reparo ósseo, foi suposto que o efeito deste material poderia ser modulado com a irradiação laser. Porém, os resultados do presente estudo mostram que os animais que tiveram os defeitos ósseos preenchidos com Biosilicato[®] e expostos ao laser, apresentaram médias estatisticamente menores de tecido ósseo neoformado comparado aos demais grupos experimentais.

Além disso, a análise biomecânica dos grupos Biosilicato[®] não revelou diferenças estatisticamente significativas entre os demais grupos experimentais.

De fato, as situações de tratamento utilizadas neste estudo são bastante diferentes, pois nos grupos tratados somente com laser, não houve preenchimento do defeito ósseo por biomaterial, onde nas primeiras horas após a fratura, este

provavelmente foi preenchido somente por fluidos corpóreos e células vivas. Isso possivelmente permitiu com que a luz laser fosse absorvida pelas células, promovendo aceleração do reparo ósseo, como foi observado na análise morfométrica. Já nos defeitos ósseos onde houve tratamento com Biosilicato[®], esses defeitos estavam totalmente preenchidos pelas partículas do biomaterial. Provavelmente, a aplicação da luz laser não promoveu uma absorção adequada na região do defeito, devido a menor quantidade de tecido vivo no local, resultando em uma estimulação não adequada do tecido ósseo.

Os dados deste estudo sugerem que o Biosilicato[®] possui um potencial osteogênico. No entanto, quando esse biomaterial foi associado com a terapia laser, uma inibição foi observada na formação óssea. Não é claro o mecanismo pela qual isso ocorre. Uma hipótese que poderia explicar esses resultados seria que a associação destas duas modalidades de tratamento poderia ter provocado um excesso de estímulo no local da lesão. Além disso, parâmetros como potência, comprimento de onda e fluência podem ter influenciado nesse processo e podem ter inibido a migração e crescimento celular na superfície da vitrocerâmica.

Resultados similares foram encontrados por Renno et al. (2009), que avaliaram *in vitro*, os efeitos da terapia laser 830 nm, 10J/cm² na proliferação de células osteoblásticas em *scaffolds* de Biosilicato[®]. Foi demonstrado que as células osteoblásticas (MC3T3) cresceram com sucesso em *scaffolds* compostos por Biosilicato[®], com células apresentando morfologia normal e aderiram e proliferaram facilmente através da superfície dos discos. Por outro lado, a irradiação laser produziu uma diminuição em 13% na proliferação de osteoblastos (MC3T3) nos discos de Biosilicato[®].

Entretanto, ainda é difícil comparar os estudos da ação da LLLT e do uso de biomateriais implantados porque os parâmetros dosimétricos, os modelos experimentais e a duração de tratamento são muito diferentes. Neste contexto, aplicações clínicas da LLLT em osteointegração de biomateriais não podem ainda ser aplicadas eficientemente porque os mecanismos de ação não estão totalmente esclarecidos.

6. CONCLUSÕES

O laser de baixa potência ($\lambda= 830\text{nm}$) foi eficaz no processo de reparo ósseo em defeitos circulares de tíbias de ratos, nas duas fluências analisadas.

O biomaterial Biosilicato[®] utilizado independentemente foi mais eficaz no processo de reparo ósseo quando comparado com a associação das duas modalidades de tratamento.

Com isso, tanto o laser quanto o Biosilicato[®] apresentaram potencial osteogênico após 14 dias de lesão, no entanto, quando estes foram associados, não foram encontrados resultados positivos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOELSAAD, N.S.; SOORY, M.; GADALLA, L.M.A.; RAGAB, L.I.; DUNNE, S.; ZALATA, K.R.; LOUCA, C. Effect of soft laser and bioactive glass on bone regeneration in the treatment of infra-bony defects (a clinical study). **Lasers Medical Science**, v. 24, n. 3, p. 387-95, 2009.

ADAMS, J.C.; HAMBLEN, D.L. **Manual de fraturas**: incluindo lesões articulares. 10^o ed. Ed. Artes Médicas, 1994.

BECKERMAN, H.; DE BIE, R.; BOUTER, L.; DE CUYPER, H.; OOSTENDORP, R. The efficacy of laser therapy for musculoskeletal and skin disorders: a criteria based meta-analysis of randomized clinical trials. **Phys. Ther.**, v.72, p. 483-91, 1992.

BORGES, D.S.; MORETTI, J.A.; PARIZOTTO, N.A.; CHARGAS, E.F. Influência do laser arseneto de gálio (Ga-As) sobre a dor no modelo experimental de contorsão abdominal em camundongos. **Rev. Bras. Fisiot.**, v.1, p.1-7, 1996.

BOSSINI, P.S.; FANGEL, R.; HABENSCHUS, R.M. ; RENNO, A.C.M. ; BENZE, B.; ZUANON, J.A.; BENNATI NETO, C.; PARIZOTTO, N.A. Low-level laser therapy (670 nm) on viability of random skin flap in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 24, p. 209-213, 2009.

BROWNER, B.D. et al. **Skeletal trauma**: basic science, management, and reconstruction. 3 ed. Philadelphia: Saunders, 2003.

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

BARUSHKA, O.; YAAKOBI, T.; ORON, U. Effect of low-energy laser (He-Ne) irradiation on the process of bone repair in the rat tibia. **Bone**, v. 16, n. 1; p. 47-55, 1995.

BASFORD, J.R. Low energy laser therapy: controversies and new research findings. **Lasers Surg. Medicine.**, v.9, p. 1-5, 1989.

BAXTER, G.D. **Therapeutic lasers: theory and practice**. United States of America: Ed Churchill Livingstone, 1997.

BLAYA, D.S. et al. Histologic study of the effect of laser therapy on bone repair. **J. Contemp. Dent. Pract.**, v. 9, n. 6, p. 1-8, 2008.

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

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

CHEN, C.H.; TSAI, J.L.; WANG, Y.H.; LEE, C.L.; CHEN, J.K.; HUANG, M.H. Low-level laser irradiation promotes cell proliferation and mRNA expression of type I

collagen and decorin in porcine Achilles tendon fibroblasts *in vitro*. **J. Orthop. Res.**, v. 27, n.5, p. 646-50, 2009.

CLAES, L; WILLIE , B. The enhancement of bone regeneration by ultrasound. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 93; p. 384–398, 2007.

COLLS, J. **La terapia laser hoy**. Barcelona: Edición Centro de Documentacion Laser, 1985.

COOMBE, A.R. et al. The effects of low level laser irradiation on osteoblastic cells. **Clin. Orthod. Res.**, v. 4, p 3-14, 2001.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins Patologia estrutural e funcional**. 6. Ed., Rio de Janeiro-RJ: Guanabara Koogan, 2000.

COURT-BROWN, C.M.; CAESAR, B. Epidemiology of adult fractures: A review. **Injury**, v. 37, n. 8, p. 691-7, 2006.

DAVID, R.; NISSAN, M.; COHEN, I.; SOUDRY, M. Effect of low-power He-Ne laser on fracture healing in rats. **Lasers Surg Med.**, v. 19, n.4, p. 458-64, 1996.

EINHORN, T.A. The cell and molecular biology of fracture healing. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 355S, p. S7-S21, 1998.

FANGEL, R. **Os efeitos do laser de baixa intensidade e do Biosilicato®, utilizados independentemente ou associados, sobre o reparo ósseo em ratas osteopênicas**. Dissertação (Mestrado em Fisioterapia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009. 135 p.

FREITAS, I.G.F.; BARANAUSKAS, V.; CRUZ-HOFLING, M.A. Laser effects on osteogenesis. **Applied Surface Science**, v. 154-155, p. 548-54, 2000.

GARAVELLO-FREITAS, I.; BARANAUSKAS, V.; JOAZEIRO, P.P.; PADOVANI, C.R.; PAI-SILVA, M.D.; CRUZ-HOFLING, M.A. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 70, p. 81-9, 2003.

GIANNOUDIS, P.V.; EINHORN, T.A.; MARSH, D. Fracture healing: The diamond concept. **Injury**, v. 38, p. S3-S6, 2007.

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

GRANITO, R.N.; RIBEIRO, D.A.; RENNO, A.C.M.; RAVAGNANI, C.; BOSSINI, P.S.; PEITL-FILHO, O.; ZANOTTO, E.D.; PARIZOTTO, N.A.; OISHI, J. Effects of biosilicate and bioglass 45S5 on tibial bone consolidation on rats: a biomechanical and a histological study. **J. Mater. Sci.: Mater. Med.**, 2009. doi: 10.1007/s10856-009-3824-z.

GUZZARDELLA, G.A.; TORRICELLI, P.; NICOLI-ALDINI, N.; GIARDINO, N. Osseointegration of endosseous ceramic implants after postoperative low-power laser

stimulation: an *in vivo* comparative study. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 14, p. 226-32, 2003.

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

HENCH, L.L. Bioceramics: From Concept to clinic. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 74, n. 7, p. 1487-510, 1991.

HENCH, L.L.; POLAK, J.M. Third-Generation Biomedical Materials. **Science**, v. 295, p. 1016-1017, 2002.

JIA, Y-L.; GUO, Z-Y. Effect of low-power He-Ne laser irradiation on rabbit articular chondrocytes *in vitro*. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 34, p. 323-328, 2004.

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

KARU, T.I. **Photobiology of low power laser therapy**. London: Harwood Academic Publishers, 1898.

KARU, T.I. Mechanisms of interaction of monochromatic visible light with cells. **Proceedings of effects of low power light on biological systems**, v. 2630, p 2-9, 1995.

KARU, T.I. Mechanisms of low-power laser light action on cellular level. In: KARU, T.I.; LUBART, R. **Effect of low-power light on biological systems V**. Amsterdam, Netherlands: Proceedings of SPIE, v. 4159, p. 1-7, 2000.

KHADRA, M.; KASEM, N.; HAANÆS, H. R.; ELLINGSEN, J.; LYGSTADAAS, S. Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics**, v. 97, n. 6, p. 693-700, 2004.

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

KITICHEN, S.S.; PARTRIDGE, C.J. A review of low level laser therapy. **Physiotherapy**, v. 77, n. 3, p. 161-8, 1991.

LIRANI, A.P.; JORGETTI, V.; LOPES DA SILVA, O. Comparative study of how low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound affect bone repair in rats. **Photomed. Laser Surg.**, v. 24, p. 735-40, 2006.

LIU, X.; LYON, R.; MEIER, H.T.; THOMETZ, J.; HAWORTH, S.T. Effect of lower-level laser therapy on rabbit tibial fracture. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 25, n. 6, p. 487-94, 2007.

LOW, L.; REED, A. **Eletroterapia Explicada: Princípios e Prática**. 3ª ed., Barueri-SP; Ed. Manole Ltda, 2001.

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 in Surgery and Medicine**, v. 22, p. 97–102, 1998.

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

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

MERLI, L.A.S.; SANTOS, M.T.B.R.; GENOVESE, W.J.; FALOPPA, F. Effect of low-intensity laser irradiation on the process of bone repair. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 23, n. 2, p. 212-15, 2005.

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®). **Journal of Biomedical Materials Research: Part 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 Medical Science**, 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.

OBRADOVIC, R. R.; KESIC, L. G. PESEVSKA, S. Influence of low-level laser therapy on biomaterial osseointegration: a mini review. **Laser in Medical Science**, v. 24, n. 3, p. 447-51, 2009.

ORTIZ, M.C.S.; CARRINHO, P.M.; SANTOS, A.A.S. dos; GOLÇALVES, R.C.; PARIZOTTO, N.A. Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades – parte 1. **Fisioterapia Brasil**, v. 2, n. 4, p. 221-40, 2001.

OTREMSKI, I.; IRGA, D.; EDELSTEIN, S.; ORNOY, A.; NEWMAN, R. Does Laser Irradiation Effect Fracture Healing? **Med. Laser Appl.**, v. 19, p. 146–49, 2004.

OZAWA, Y.; SHIMIZU, N.; KARIYA, G.; ABIKO, Y. Low-Energy Laser Irradiation Stimulates Bone Nodule Formation at Early Stages of Cell Culture in Rat Calvarial Cells. **Bone**, v. 22, n. 4, p. 347-54, 1998.

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

PICKERING, S.A.W.; SCAMMELL, B.E. Electromagnetic fields for bone healing. **Lower Extremity Wounds**, v. 1, n. 3, p. 152-160, 2002.

PINHEIRO, A.L.B. et al. Biomodulatory effects of LLLT on bone regeneration. **Laser Therapy**, v. 13, p. 73-9, 2001.

PINHEIRO, A.L.B.; LIMEIRA JÚNIOR, F.A.; GERBI, M.E.M.; RAMALHO, L.M.P.; MARZOLA, C.; PONZI, E.A.C. Effect of low level laser therapy on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone. **Braz. Dent. J.**, v. 14, n. 3, p. 177-81, 2003.

PINHEIRO, A.L.B.; GERBI, M.E.M.M. Photoengineering of bone repair processes. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, n. 2, p. 169-178, 2006.

POLINDER, S.; MEERDING, W.J.; BARR, M.E.V.; TOET, H. Cost estimation of injury-related hospital admissions In 10 European countries. **The Journal of trauma**, v. 59, n. 6, p. 1283-91, 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 in Surgery and Medicine**, v. 39, p. 788–796, 2007.

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

RAVAGNANI, C. **Desenvolvimento de processo de produção em escala piloto do Biosilicato para dentes sensíveis**. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007. 228 p.

RATNER, B.D. **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine**. 2 ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2004.

RENNO, A.C.M.; McDONNELL, P.A.; PARIZOTTO, N.A.; LAAKSO, E-L. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation *in vitro*. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 25, n. 4, p. 275-80, 2007.

RENNO, A.C.M.; MCDONNELL, P-A.; LAAKSO, L. Effect of 830nm laser phototherapy on osteoblasts grown *in vitro* on Biosilicate scaffolds. **Photomedicine & Laser Surgery**, 2009. doi: 10.1089/pho.2009.2487.

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

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. **The journal of Trauma**, v. 62, p. 902-908, 2007.

SCHINDELER, A.; MCDONALD, M.M.; BOKKO, P.; LITTLE, D.G. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. **Seminars in Cell e Developmental Biology**, v. 19, n. 5, p. 459-66, 2008.

SHAKOURI S.K.; SOLEIMANPOUR, J.; SALEKZAMANI, Y.; OSKUIE, M.R. Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process. **Lasers Med. Sci.**, 2009. doi: 10.1007/s10103-009-0670-7.

SHI, D. **Biomaterials and tissue engineering**. Berlin: Springer-Verlag, 2004.

SILVA JÚNIOR, A.N.; PINHEIRO, A.L.B.; OLIVEIRA, M.G.; WEISMANN, R.; RAMALHO, L.M.P.; NICOLAU, R.A. Computerized morphometric assessment of the effect of low-level laser therapy on bone repair: an experimental animal study. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 20, n. 2, p. 83-7, 2002.

SNYDER-MACKLER, L.; BORK, C. E. Effect of helium-neon laser irradiation on peripheral sensory nerve latency. **Phys. Ther.**, v. 68, n. 2, p. 223-5, 1988.

STEIN, A.; BENAYAHU, D.; MALTZ, L.; ORON, U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts *in vitro*. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 23, n. 2, p. 161-6, 2005.

STEIN, E.; KOEHN, J.; SUTTER, W.; WENDTLANDT, G.; WANSCHITZ, F.; THURNHER, D.; BAGHESTANIAN, M.; TURHANI, D. Initial effects of low-level laser therapy on growth and differentiation of human osteoblast-like cells. **Wien. Klin. Wochenschr.**, v. 120, n. 3-4, p. 112-117, 2008.

SUN, G.; TUNER, J. Low-level laser therapy in dentistry. **Dent. Clin. N. Am.**, v. 48, p. 1061-1076, 2004.

TAGUCHI, Y.; KUROKAWA, Y.; OHARA, I.; OUCHI, H. Thermographie changes following laser irradiation for pain relief. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 9, n. 2, p. 143-146, 1991.

TSIRIDIS, E.; UPADHYAY, N.; GIANNOUDIS, P. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? **Injury**, v. 38, p. S11-S25, 2007.

VLADIMIROV, Y.A.; OSIPOV, A.N.; KLEBANOV, G.I. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. **Biochemistry (Moscow)**, v. 69, n. 1, p. 81-90, 2004.

WEBER, J.B.B.; PINHEIRO, A.L.B.; OLIVEIRA, M.G.; OLIVEIRA, F.A.M.; RAMALHO, L.M.P. Laser therapy improves healing of bone defects submitted to autologous bone graft. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, n. 1, p. 38-44, 2006.

YAOITA, H.; ORIMO, H.; HHIRAI, Y.; SHIMADA, T. Expression of bone morphogenetic proteins and rat distal-less homolog genes following rat femoral fracture. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 18, p. 63-70, 2000.

ANEXO A



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

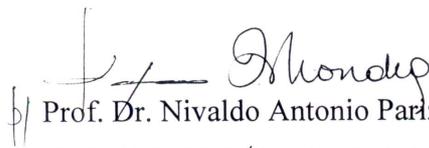
Parecer 023/2006

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.


b/ 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, 20/11/2006
Servidor Público: 

ANEXO B

J Mater Sci: Mater Med
DOI 10.1007/s10856-009-3945-4

Low level laser therapy does not modulate the outcomes of a highly bioactive glass–ceramic (Biosilicate®) on bone consolidation in rats

Poliani Oliveira · Daniel Araki Ribeiro ·
Elaine Favaro Pipi · Patricia Driusso ·
Nivaldo A. Parizotto · Ana Claudia Muniz Renno

Received: 29 May 2009 / Accepted: 12 November 2009
© Springer Science+Business Media, LLC 2009

Abstract The main purpose of the present work was to evaluate if low level laser therapy (LLLTT) can improve the effects of novel fully-crystallized glass–ceramic (Biosilicate®) on bone consolidation in tibial defects of rats. Forty male Wistar rats with tibial bone defects were used. Animals were divided into four groups: group bone defect control (CG); group bone defect filled with Biosilicate® (BG); group bone defect filled with Biosilicate®, irradiated with LLLT, at 60 J cm^{-2} (BG 60) and group bone defect filled with Biosilicate®, irradiated with LLLT, at 120 J cm^{-2} (BG 120). A low-energy GaAlAs 830 nm, CW, 0.6 mm beam diameter, 100 W cm^{-2} , 60 and 120 J cm^{-2} was used in this study. Laser irradiation was initiated immediately after the surgery procedure and it was performed every 48 h for 14 days. Fourteen days post-surgery, the three-point bending test revealed that the structural stiffness of the groups CG and BG was higher than the values of the groups BG60 and BG120. Morphometric analysis revealed no differences between the control group and the Biosilicate® group. Interestingly, the groups treated with Biosilicate® and laser (BG 60 and BG120) showed statistically significant lower values of newly formed bone in the area of the defect when compared to negative control (CG) and bone defect group filled with Biosilicate (CB). Our findings suggest that although Biosilicate® exerts some osteogenic activity

during bone repair, laser therapy is not able to modulate this process.

1 Introduction

Fracture healing is a complex physiologic process in which bone heals for the purpose of transferring mechanical loads [1]. In fracture consolidation, the original tissue is regenerated and the properties of the preexisting tissue, in general, are restored. However, clinical situations involving great bone loss or the presence of wide variety of diseases or tumor resection can result in delayed fracture healing or even nonunion [2].

In this context, there is a critical need to know more about the biology of fracture healing to develop strategies for ensuring normal repair of the skeleton [3]. One promising treatment is the use of bioactive glasses as bone graft substitutes due to their ability to bond and integrate with living bone by forming a biologically active bonelike apatite layer on their surfaces [4, 5]. Moreover, surface reactions release critical concentrations of soluble silicon, calcium, phosphorus and sodium ions that stimulate the attachment, proliferation and differentiation of osteoblasts (bone-forming cells) [5]. Our research group has developed nucleation and growth thermal treatments to obtain a novel fully-crystallized bioactive glass–ceramic of the quaternary $\text{P}_2\text{O}_5\text{--Na}_2\text{O--CaO--SiO}_2$ system (Biosilicate®, patent application WO 2004/074199) [6]. In vitro experiments demonstrated that Biosilicate® promotes enhanced bone-like matrix formation in comparison to its parent glass and to Bioglass® 45S5 in an osteogenic cell culture system [7]. Recently, Granito et al. [8] found that the Biosilicate was capable of increasing the biomechanical properties of the bone callus of tibial defects in rats compared to the 45S5 (gold standard).

P. Oliveira · E. F. Pipi · P. Driusso · N. A. Parizotto
Department of Physiotherapy, Federal University of São Carlos,
Rodovia Washington Luís (SP-310), Km 235, São Carlos,
SP, Brazil

D. A. Ribeiro · A. C. M. Renno (✉)
Department of Bioscience, Federal University of São Paulo,
Av. Ana Costa, 95, Vila Mathias, Santos, SP 11050-240, Brazil
e-mail: a.renno@unifesp.br

Published online: 27 November 2009

 Springer