

CARLA ROBERTA TIM

EFEITOS DO *LASER* DE BAIXA INTENSIDADE E DO  
*SCAFFOLD* DE BIOSILICATO<sup>®</sup> NO PROCESSO DE  
REPARAÇÃO ÓSSEA

São Carlos-SP

2011

CARLA ROBERTA TIM

EFEITOS DO *LASER* DE BAIXA INTENSIDADE E DO  
*SCAFFOLD* DE BIOSILICATO® NO PROCESSO DE  
REPARAÇÃO ÓSSEA.

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<sup>a</sup>.Dr. Ana Cláudia Muniz Rennó  
Prof. Dr. Oscar Peitl Filho

São Carlos-SP

2011

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

T582eL

Tim, Carla Roberta.

Efeitos do laser de baixa intensidade e do Scaffold de Biosilicato<sup>®</sup> no processo de reparação óssea / Carla Roberta Tim. -- São Carlos : UFSCar, 2011.  
78 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Biotecnologia. 2. Reparo ósseo. 3. Laser de baixa intensidade. 4. Biomateriais. I. Título.

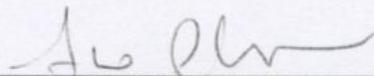
CDD: 660.6 (20<sup>a</sup>)

**Carla Roberta Tim**

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

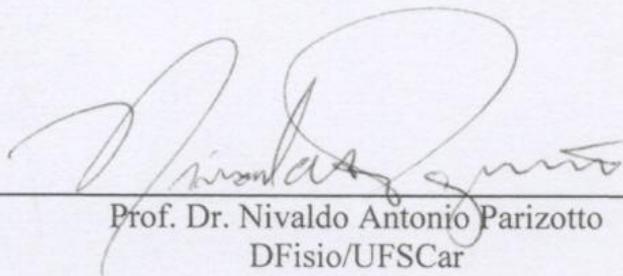
**Aprovado em: 24/02/2011**

**BANCA EXAMINADORA**



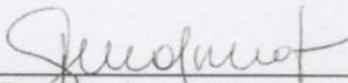
---

Prof. Dra. Ana Claudia Muniz Rennó (Orientadora)  
UNIFESP/Santos-SP



---

Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto  
DFisio/UFSCar



---

Prof. Dra. Mariza A. Matsumoto  
Universidade do Sagrado Coração/Bauru-SP

## **DEDICATÓRIA**

*À minha mãe Sirlene, exemplo de honestidade,  
humildade e dedicação a família.*

*Aos meus irmãos Silmara e Marcelo, por todo  
esforço, carinho e apoio a mim depositado.*

*Amo muito todos vocês.*

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

*Com carinho a orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Cláudia Muniz Rennó, pela oportunidade a mim dada, pelos ensinamentos, confiança e sobretudo pela amizade construída durante esse período de convivência. Agradeço por sua paciência, compreensão e incentivo constante.*

*Ao meu orientador Prof. Dr. Oscar Peitl, por ter acreditado no meu trabalho, por estar sempre disponível a me ajudar quando precisei. Obrigado pela compreensão e amizade. .*

## AGRADECIMENTOS

*Acima de tudo a Deus por ter me conduzido a realização desse sonho.*

*Aos meus pais que não mediaram esforços para eu me tornar uma Fisioterapeuta. Em especial, a minha querida e amada mãe, que possibilitou esta caminhada me guiando, apoiando, ensinando, com todo afeto e sabedoria. TE AMO.*

*Ao meu irmão Marcelo e sua esposa Milene, pela ajuda e pelo amor que demonstrou desde sempre.*

*À minha irmã Silmara, pelo incentivo, carinho e cumplicidade.*

*Aos meus lindos sobrinhos Gabriela e Felipe, que traz felicidade a minha vida.*

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

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

*Ao Prof. Dr. Nivaldo Parizotto por me acolher em seu laboratório, pela sua amizade e seus ensinamentos estarão sempre presentes em minha vida.*

*Ao pessoal do laboratório de Materiais Víteros (LaMaV), por disponibilizar o biomaterial utilizado neste estudo.*

*À amiga Karina Nogueira, pelo companheirismo, ajuda e sugestões na elaboração dessa dissertação e acima de tudo pela amizade construída durante esse período de convivência.*

*Ao Bruno Rossi, por toda ajuda essencial concedida durante os experimentos.*

*Às amigas Vivian e Mirian Cury, por abrirem as portas de sua casa para me receber, sem mesmo me conhecer, pelo incentivo e acima de tudo pela amizade.*

*Aos queridos amigos Davilene Gigo Benato e Thiago Russo pelos ensinamentos, incentivo constante, apoio, conversas, risadas e sobretudo pela amizade ao longo desses anos.*

*Às amigas que conquistei no laboratório Elaine Fávaro-Pípi, Poliane Oliveira, Livia R. Assis e Natália Rodrigues obrigada pela ajuda cedida neste trabalho, pelas risadas e momentos de divertimento.*

*Aos meus amigos e colegas de laboratório, Charles, Huelinton, Anderson, Emiliano, Paulo, pela ajuda, estima e pelos bons momentos compartilhados.*

*Ao aluno de iniciação científica do curso de Fisioterapia da UFSCar, Vitor Oliani, pelo auxílio no nosso trabalho.*

*À todos os meus amigos de Fernandópolis, Emerson Tarocco, Naiara, Andréia, Carla e Cristiane Sanitá, Gilberto, Fábio Faria, Marlon, Vitor Mininel, Vitor Ragiotto, Juliana e a todos com quem dividi uma balada e uma cerveja no final de semana.*

*Aos professores e funcionários do Departamento de Morfologia e Patologia da UFSCar, pela atenção e ajuda.*

*À Prof<sup>a</sup>. Dra. Mariza Akemi Matsumoto da Universidade do Sagrado Coração – Bauru pela ajuda durante a realização da análise histológica.*

*À Prof<sup>a</sup>. Dr. Keico Okino Nonaka, por ter disponibilizado o aparelho para a realização do teste biomecânico.*

*À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Patrícia Driusso, pela ajuda durante a realização da análise estatística.*

*Ao Prof. Dr. Daniel Araki Ribeiro, pela colaboração e ajuda na análise  
imunohistoquímica.*

*As Prof<sup>as</sup>. e amigas Patrícia Carrinho e Valéria Munhoz pelo carinho, incentivo  
e pela amizade.*

*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.*

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

*Muito Obrigado!!!*

## RESUMO

Vários recursos têm sido estudados com o intuito de acelerar o processo de reparação óssea. Dentre esses recursos, os materiais bioativos e a Terapia *Laser* de Baixa Intensidade (LLLT) vêm se destacando, vários estudos sugerem que ambos os recursos são capazes de estimular a proliferação de osteoblastos e a osteogênese no local da fratura, promovendo maior deposição de massa óssea, fundamental para o processo de consolidação. Dentro deste contexto, esse projeto teve como objetivo verificar os efeitos da LLLT ( $\lambda = 830\text{nm}$ ), com fluência de  $120\text{J}/\text{cm}^2$  e do *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup>, utilizados independentemente ou associados na consolidação de defeitos ósseos induzidos em tíbias de ratos. Foram utilizados 40 ratos machos da linhagem Wistar (3 meses de idade  $\pm$  250 gramas) distribuídos em 4 grupos experimentais com 10 animais cada: grupo controle com defeito ósseo e sem tratamento (GC); grupo defeito ósseo tratado com *Laser* 830nm (GL); grupo defeito ósseo tratado com implante de *scaffolds* de Biosilicato<sup>®</sup> (GB); grupo defeito ósseo tratado com implante de *scaffolds* de Biosilicato<sup>®</sup> e *Laser* 830nm (GBL). Os animais foram submetidos a irradiação *Laser* (Ga-As-Al, 830nm, 100mW) em um único ponto sobre o defeito ósseo por oito sessões de tratamento, em dias alternados. A eutanásia dos animais aconteceu no 15º dia após a cirurgia, 24 horas após a última sessão de tratamento *Laser*. A análise morfológica revelou que o grupo *Laser*, apresentou melhor organização tecidual em relação os demais grupos experimentais. Além disso, a análise morfométrica evidenciou uma maior quantidade de osso neoformado no grupo tratado com *Laser* comparado aos animais dos demais grupos. A expressão à COX-2 e a RUNX-2/CBFA-1 mostrou-se mais intensa nos grupos GB e GBL e na análise biomecânica não houve diferença estatística entre os grupos experimentais. A partir dos resultados obtidos neste estudo, pode-se sugerir que ambos os tratamentos apresentaram potencial osteogênico 15 dias após a cirurgia, porém a Terapia *Laser* de Baixa Intensidade foi mais eficaz no processo de reparo ósseo, quando comparado ao biomaterial, ou mesmo quando as duas modalidades de tratamento foram associadas.

**Palavras-Chave:** tecido ósseo, defeito ósseo, biomateriais, Terapia *Laser* de Baixa Intensidade.

**ABSTRACT: EFFECTS OF LOW LEVEL LASER THERAPY AND SCAFFOLD OF BIOSILICATE® IN THE PROCESS OF BONE REPAIR.**

Several resources have been studied in order to accelerate the process of bone repair. Among these resources, bioactive materials and low level laser therapy (LLLT) have gained prominence. Several studies suggest that both resources are able of stimulating osteoblast proliferation and osteogenesis at the fracture site, promoting a greater deposition of bone mass, which is fundamental for the consolidation process. Within this context, this project aimed to assess the effects of LLLT ( $\lambda = 830\text{nm}$ ), with the fluencies of  $120\text{J}/\text{cm}^2$  and scaffold Biosilicate®, used associated or not, on consolidation of induced tibial bone defects in the rats. In this study it was used 40 male Wistar rats (3 months  $\pm$  250g) divided into four groups (with 10 animals each): group control bone defect without any treatment (GC), group bone defect irradiated with LLLT 830nm (GL); group bone defect treated with implantation of scaffolds Biosilicate® (GB); group bone defect treated with implantation of scaffolds Biosilicate® and LLLT 830nm (GBL). The animals were submitted to laser irradiation (Ga-As-Al, 830nm, 100mW) at a single point on the bone defect for eight sessions, on alternate days. The euthanasia of animals occurred at day 15 after surgery, 24 hours after the last laser treatment session. Morphological analysis revealed that the laser group, showed better tissue organization in relation to other groups. Furthermore, morphometric analysis revealed that the irradiated animals showed a higher amount of newly formed bone compared to the other groups. The expression of COX-2 and RUNX-2/CBFA-1 were higher in GB and GBL groups. Also, biomechanical analysis revealed no statistical differences among experimental groups. From the results obtained in this study, it is possible to suggest that both treatments had osteogenic potential 15 days after surgery, but the LLLT was more effective in bone repair when compared to the biomaterials, or even when the two treatment modalities were associated.

**Key words: bone repair, bone defect, low level laser therapy, bioactive material.**

## LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS

**ALP** – Fosfatase alcalina

**AMP** – Adenosina monofosfato

**ANOVA** – Análise de variância

**AsGa** – Arseno de Gálio

**AsGaAl** – Arseneto de Gálio Aluminio

**ATP** – Adenosina trifosfato

**BMP** – Proteínas morfogenéticas ósseas

**BSP** – Sialoproteína óssea

**Ca** – Cálcio

**CBFA-1** – Fator de transcrição de diferenciação osteoblastica

**cm** – Centímetro

**DNA** – Ácido desorribonucleico

**EDTA** – Ácido etilenodiamino tetra-acético

**FGF-1** – Fator de crescimento fibroblastico

**H.E** – Hematoxilina eosina

**HA** – Hidroxiapatita

**HCA** – Hidroxicarbonatoapatita

**HIF** – Fator I induzido por hipóxia

**IGF** – Fator de crescimento insulínico

**J** – Joule

**J/cm<sup>2</sup>** – Joule por centímetro quadrado

**KN** – Quilo Newton

**Laser** – Amplificação da luz por emissão estimulada de radiação

**LLLT** – Terapia *laser* de baixa intensidade

**mg/kg** – Miligrama por quilograma de massa corporal

**MHz** – MegaHertz

**mm** – milímetro

**mW** – MiliWatts

**mW/cm<sup>2</sup>** – MiliWatts por centímetro quadrado

**N** – Newton

**Na** – Sódio

**nm** – nanômetro

**O<sub>2</sub>** – Oxigênio

**OP** – Osteopontina

**P** – Fosforo

**PDGF** – Fator de crescimento derivado de plaquetas

**pH** – Potencial hidrogeniônico

**PVB** – *Polvinil Butiral*

**RNA** – Ácido ribonucléico

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

**rpm** – Rotação por minut

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

**SBF** – Sorological body fluid

**Si** – Sílicio

**T.M** – Tricrômico de Masson

**TGFβ** – *Transforming growth factor beta*

**US** – Ultrassom

**VEGF** – Fator de crescimento vascular endotelial

**W/cm<sup>2</sup>** – Watts por centímetro quadrado

**ZAS** – Zirconia-alumina-silica

**μm** – micrômetro

**μm<sup>2</sup>** – micrômetro quadrado

**λ** – Comprimento de onda

**±** – Mais ou menos

**≤** – Menor ou igual

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** Fotos da cirurgia. A: tricotomia e assepsia da região a ser operada. B: exposição do terço médio da tíbia, após a incisão feita através de um bisturi. C: defeito ósseo sendo realizado com trefina de 3mm de diâmetro externo. D: defeito ósseo. E: preenchimento do defeito ósseo com *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup>, somente nos grupos GB e GBL. F: sutura do músculo e pele.....40
- FIGURA 2:** Aparelho portátil de *Laser* DMC, THERALASE Versão 24, classe 3B, AsGaAl diodo.....42
- FIGURA 3:** Esquema demonstrativo da data de eutanásia.....44
- FIGURA 4:** Desenho ilustrativo da padronização dos campos selecionados na análise morfométrica..... 46
- FIGURA 5:** Fotomicrografia com a demarcação da área de neoformação óssea. A cor azul indica a área de tecido ósseo neoformado. (Coloração T.M.; aumento 100x).....46
- 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.....49
- FIGURA 7:** Fotomicrografia dos achados morfológicos dos diferentes grupos experimentais. A: controle; B: *Laser*; C: *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup>; D: *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup> + *Laser*. #: tecido ósseo intacto; \*: tecido ósseo neoformado; setas: partículas de biomaterial (Coloração: H.E., Aumento: 100x).....51
- FIGURA 8:** Média e desvio padrão da área de osso neoformado dos diferentes grupos experimentais. \*  $p \leq 0,05$  versus GL; GC: controle; GL: *Laser*; GB: Biosilicato<sup>®</sup>; GBL: Biosilicato<sup>®</sup> + *Laser*.....52
- FIGURA 9:** Fotomicrografia dos achados morfométricos dos diferentes grupos experimentais. \*: tecido ósseo neoformado; #: tecido ósseo intacto; setas: biomaterial A: controle; B: *Laser*; C: Biosilicato<sup>®</sup>; D: Biosilicato<sup>®</sup> + *Laser*. (Coloração: T.M., Aumento 100x).....53
- FIGURA 10:** Fotomicrografias representativas da imunoposição de COX-2(setas), \*:Biomaterial. (A) grupo controle; (B) grupo tratado com *Laser*; (C) grupo tratado com *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup>; (D) grupo tratado com *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup> + *Laser*. (Coloração Imunohistoquímica, Aumento 500x).....54

**FIGURA 11:** Fotomicrografias representativas da imunoeexpressão de RUNX-2/CBFA-1 (setas): (A) grupo controle; (B) grupo tratado com *Laser*; (C) grupo tratado com *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup>; (D) grupo tratado com *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup> + *Laser*. (Coloração Imunohistoquímica, Aumento 500x).....55

**FIGURA 12:** Média da carga máxima nos diferentes grupos experimentais (GC: controle; GL: *Laser*; GB: *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup>; GBL: *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup> +*Laser*).....5  
6

**FIGURA 13:** Média da resiliência nos diferentes grupos experimentais (GC: controle; GL:*Laser*; GB: *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup>; GBL: *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup> +*Laser*).....56

**FIGURA 14:** Média da tenacidade nos diferentes grupos experimentais (GC: controle; GL: *Laser*; GB: *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup>; GBL: *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup> +*Laser*).....57

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Reparo Ósseo.....	18
1.2 Terapia <i>Laser</i> de Baixa Intensidade (Lllt).....	21
1.2.1 Princípios Gerais do <i>Laser</i> .....	21
1.2.2 Interação <i>Laser</i> Tecido .....	22
1.2.3 Terapia <i>Laser</i> de Baixa Intensidade no Reparo Ósseo.....	26
1.3 Material Bioativo.....	30
1.3.1 Interação <i>Laser</i> e Material Bioativo .....	34
2. OBJETIVO.....	38
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1 Animais Experimentais.....	39
3.2 Procedimento Cirúrgico.....	39
3.3 Delineamento Experimental .....	41
3.4 Tratamento.....	41
3.4. Aplicação do <i>Laser</i> de Baixa Intensidade .....	41
3.4.2 Caracterização dos <i>Scaffolds</i> de Biosilicato <sup>®</sup> .....	42
3.4.3 Síntese dos <i>Scaffolds</i> de Biosilicato <sup>®</sup> .....	43
3.4.4 Implantação dos <i>Scaffolds</i> de Biosilicato <sup>®</sup> .....	44
3.5 Eutanásia dos Animais .....	44
3.6 Coleta e Preparação das Amostras .....	44

3.7 ANÁLISES .....	45
3.7.1 Avaliação Morfológica Qualitativa .....	45
3.7.2 Avaliação Morfométrica.....	45
3.7.3 Análise Imunohistoquímica.....	47
3.7.4 Análise Biomecânica .....	48
3.7.5 Análise Estatística .....	49
4. RESULTADOS .....	50
4.1 Avaliação Morfológica Qualitativa .....	50
4.1.1 Avaliação Morfométrica.....	52
4.1 Análise Imunohistoquímica.....	53
4.2 Análise Biomecânica .....	55
5. DISCUSSÃO .....	57
6. CONCLUSÕES .....	67
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS .....	67
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	67
9. ANEXOS .....	76
9.1 Anexo 1.....	76
9.2 Anexo 2.....	77
9.3 Anexo 3.....	78

## 1. INTRODUÇÃO

O reparo ósseo é um processo regenerativo complexo, que inclui a interação de uma série de eventos biológicos, como a síntese ativa de genes e a ação de um grande número de células e proteínas, que determinarão a restauração da integridade do tecido (CLAES e WILLIE, 2007). No entanto, no decorrer desse processo, podem acontecer alterações que culminarão na deficiência da regeneração e, conseqüentemente, no atraso da consolidação e mesmo, na não união óssea. Estima-se que, ocorrem anualmente nos Estados Unidos, 7.9 milhões de fraturas, sendo que aproximadamente 5-10% desenvolvem problemas no processo de reparação, como as pseudoartroses e não consolidação óssea, requerendo muitas vezes a utilização de implantes ósseos (CLAES e WILLIE, 2007; VICTORIA et al., 2009).

Diante disso, diversas técnicas terapêuticas vêm sendo empregadas na tentativa de promover a aceleração e/ou intensificação da reparação óssea. Alguns exemplos são aplicações exógenas de fatores de crescimento (YAOITA et al., 2000), uso do ultrassom (RUTTEN et al., 2007), de campos eletromagnéticos (PICKERING e SCAMMELL, 2002) e enxertos ósseos alógenos e autógenos (CARSON e BOSTROM, 2007). Atualmente, vem se destacando as propriedades osteogênicas da Terapia *Laser* de Baixa Intensidade (RENNO et al., 2007) e dos materiais bioativos ( HENCH e POLAK, 2002; GRANITO et al., 2009b).

O biomaterial é definido como qualquer substância que pode ser utilizada como tratamento para substituição total ou parcial de qualquer tecido. Os materiais bioativos apresentam uma resposta biológica específica produzindo uma interface entre o material e o tecido, formando uma ligação entre eles, sem ser tóxico ou promover respostas imunológicas (HENCH e POLAK, 2002; SHI, 2004; MOURA et al., 2007). Recentemente, os biomateriais na forma de *scaffolds*, são utilizados em estratégias

regenerativas ósseas, pois estes servem como um guia para o crescimento do tecido ósseo e permitem o suprimento sanguíneo e de nutrientes para as células que estão dentro dos *scaffolds* (DAVIES et al., 2008).

Outro recurso que vem sendo estudado nos últimos anos no tratamento de fraturas ósseas é a Terapia *Laser* de Baixa Intensidade (LLLT), por meio de suas propriedades fotoquímicas e fotobiológicas têm demonstrado efeitos positivos na proliferação de células ósseas e no processo de consolidação de fraturas em animais (RENNO et al., 2007; MATSUMOTO et al., 2009).

Diante do exposto, nota-se que tanto os biomateriais como a LLLT vêm surgindo como alternativas promissoras no processo de reparo ósseo, devido à capacidade desses recursos em estimular a osteogênese. Contudo, existe uma grande lacuna na literatura de estudos que avaliem a eficácia da associação da LLLT e de materiais bioativos no tecido ósseo.

### **1.1 Reparo ósseo**

O reparo ósseo constitui uma integração de processos interativos dinâmicos, envolvendo mediadores químicos, elementos figurativos do sangue, fatores de crescimento e de transcrição que atuam estimulando a migração, proliferação e diferenciação celular (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

A fratura causa dano, destruição de matriz óssea, morte celular, rompimento do periósteo e do endósteo e um possível deslocamento das extremidades fraturadas. Vasos sanguíneos do tecido ósseo e dos tecidos moles adjacentes são rompidos e ocasionam extensa hemorragia, resultando na formação de um coágulo no local da lesão (GUARTNER e HIATT, 2003).

A ruptura dos vasos causa a interrupção do fluxo sanguíneo, que induz a falta de oxigênio para a célula, gerando um aumento na concentração intracelular da forma ativa do gene de uma proteína reguladora chamada fator I induzido por hipóxia (HIF). Este estimula a transcrição do gene fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), que atua na formação de novos vasos sanguíneos (ALBERTS et al., 2004). O VEGF é produzido por células endoteliais, macrófagos, fibroblastos, osteoblastos, condrócitos e células musculares lisas (BEAMER et al., 2009).

Ao mesmo tempo, neutrófilos e macrófagos removem o coágulo e o tecido necrótico, enquanto plaquetas e células inflamatórias migratórias liberam fatores de crescimento, os quais ativam as células osteoprogenitoras no periósteo, cavidade medular, tecidos moles circundantes e estimulam a atividade osteoblástica (COTRAN et al., 2000).

A diferenciação dos osteoblastos é controlada por fatores de crescimento e de transcrição. Vários membros da família de proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e o fator de crescimento transformação  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) regulam o desenvolvimento embrionário e a diferenciação dos osteoblastos (KIERSZENBAUM, 2008). O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) é liberado pelas plaquetas e estimula a diferenciação de osteoblastos e quimiotaxia dos macrófagos (PHLILLIPS, 2005). Já a proliferação e diferenciação de fibroblastos e condrócitos são estimulados pelos fatores de crescimento fibroblástico 1 (FGF-1), fator de crescimento insulínico (IGF), pelo TGF- $\beta$  e PDGF (SCHINDELER et al., 2008).

Os genes *Cbfa1* codifica um fator de transcrição que induz a diferenciação dos osteoblastos e controla a expressão de osteocalcina. O *Cbfa1* é o mais precoce e específico indicador de osteogênese e sua expressão é induzida pela BMP, seguida da expressão de osteocalcina e de osteopontina (KIERSZENBAUM, 2008).

Assim, após a fratura, as células osteoprogenitoras se diferenciam em fibroblastos, condroblastos e osteoblastos. Estas células são responsáveis pela formação do calo ósseo não mineralizado e, posteriormente, pela formação do tecido ósseo (HADIARGYROU et al., 1998).

À medida que o calo não mineralizado, recém-formado, vai sendo removido ocorre à revascularização e a formação de um novo tecido conhecido como calo duro ou mineralizado (SCHINDELER et al., 2008). A fase final de reparo da fratura é caracterizada pela reabsorção do calo excessivo que se desenvolve no espaço medular e circunda a face externa do local fraturado (HADJIAGYROU et al., 1998).

Esse intrincado processo de reparo pode ser frequentemente prejudicado ou, até mesmo bloqueado, resultando em déficit na regeneração óssea e conseqüentemente, no atraso da consolidação e até mesmo, na não união óssea (SENA et al., 2005). Diversos fatores podem influenciar o atraso da consolidação como interposição de tecido mole no local fraturado, suprimento sanguíneo insuficiente, presença de tumor ósseo, fratura cominutiva, entre outros fatores que culminarão na não união óssea (BRASILEIRO FILHO, 2006). Além disso, a imobilização insuficiente permite movimento constante no local da fratura não consolidada e pode ocasionar uma pseudoartrose, onde se forma um tecido semelhante ao articular no local da fratura. Nesses casos, a fratura nunca consolida e este tecido formado, precisa ser removido cirurgicamente para que ocorra o reparo (RUBIN et al., 2006).

Dentro deste contexto, há necessidade de desenvolvimento de novos tratamentos capazes de acelerar o processo de reparo ósseo. Atualmente, vem se destacando a utilização dos materiais bioativos e dos *Lasers* de Baixa Intensidade no tratamento de fraturas com deficiência na consolidação óssea (MOURA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009).

## **1.2 Terapia *Laser* de Baixa Intensidade (LLLT)**

A palavra *LASER* é um acrônimo para “Light Amplification by the Stimulated Emission of Radiation”, que significa Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação, sendo esse o princípio em que foi baseada sua criação (BAXTER et al., 1997; LOW e REED, 2001). Desde sua concepção, os *Lasers* encontraram uma aplicação imediata na medicina, em particular na cirurgia oftálmica que foi a primeira especialidade a usar o *Laser* com êxito no tratamento do deslocamento da retina em seres humanos (KARU, 2000).

Atualmente, a Terapia *Laser* vem sendo utilizada como forma de tratamento em diversas condições patológicas, com relatos de múltiplos efeitos clínicos, incluindo a cicatrização de tecido mole e osso. No entanto, estes ainda não foram completamente elucidados 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 produção da radiação *Laser* resulta de um elétron ou de uma molécula, que sofre um salto quântico quando previamente estimulado, passando de um baixo a um alto estado de energia, emitindo ondas na mesma frequência, comprimento de onda e direção, originando o feixe *Laser* que possui mais potência que outras radiações ópticas não modificadas (LOW e REED, 2001).

O intervalo do espectro eletromagnético utilizado com mais frequência na prática da LLLT varia entre o visível e o infravermelho próximo. Estes abrangem os comprimentos de onda entre 630 a 980nm, sendo este intervalo chamado de “janela terapêutica” para tecidos biológicos (KITCHEN e BAZIN, 2003). O *Laser* visível emite

ondas de luz geralmente em torno de 630nm e apresenta profundidade de penetração nos tecidos de 6 a 10mm, dependendo de sua potência. Os *Lasers* Arseneto de Gálio (AsGa) e Arseneto de Gálio Alumínio (AsGaAl) operam dentro do espectro infravermelho, com comprimentos de onda entre 780nm a 904nm, apresentam poder de penetração entre 30 a 50mm variando de acordo com as propriedades do tecido (BAXTER, 1997; KITCHEN e BAZIN, 2003). Em geral, os *Lasers* infravermelhos têm depósito energético pouco absorvível pelo componente aquoso e hemoglobina, por isso, uma vantagem da aplicação da radiação infravermelha próxima é sua maior penetração nos tecidos comparada com a radiação *Laser* vermelha e sua alta confiabilidade (KARU et al., 1990).

### **1.2.2 Interação *Laser* Tecido**

Quando a radiação *Laser* interage com os tecidos ocorrem os seguintes eventos: reflexão, refração, dispersão e absorção (LAAKSO et al., 1993; LOW e REED, 2001).

A primeira interação da luz *Laser* ocorre na pele, onde cerca de 5% a 7% da radiação incidente é refletida. Cerca de 93% a 97% da radiação que penetra nos substratos subsequentes passa a ser dispersada por reflexão interna, refração, divergência e ainda atenuada por absorção (KITCHEN e BAZIN, 2003).

A reflexão interna pode acontecer como resultado da não homogeneidade da pele e dos tecidos profundos. A grande variabilidade nos índices refrativos dos componentes do tecido leva a mudança na direção de propagação do feixe. Já a absorção da radiação ocorre quando um fóton de luz interage com um átomo ou moléculas (LAAKSO et al., 1993; KITCHEN e BAZIN, 2003).

Segundo BAXTER (1997) e KARU (1998), 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.

Alguns autores afirmam que os efeitos da LLLT são baseados em mecanismos não térmicos, pois 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 (BAXTER, 1997; KITCHEN e BAZIN, 2003).

Várias teorias que sugerem embasamento científico explicativo sobre o efeito biomodulatório da radiação *Laser* são citadas por Sandoval Ortiz (2001). A teoria fotoquímica é a mais estudada e oferece uma explicação para a sensibilidade das células à luz *Laser*. Esta teoria diz que, a energia eletromagnética estimula fotoreceptores ou cromóforos, os quais respondem a uma faixa de luz específica, realizando assim, a conversão de energia eletromagnética em energia fotoquímica. Estes cromóforos são um grupo de moléculas inter-relacionadas que podem ser enzimas, membranas celulares ou

qualquer outra substância extra-celular, que estão capacitados para absorver a luz e apresentam algumas etapas comuns na realização de efeitos causados pelas diferentes faixas de luz (KARU, 1998).

Os cromóforos também tem sido definidos como componentes dos pigmentos da cadeia respiratória, de diferentes tamanhos e formas, os quais vão atuar com uma estimulação específica ou energia de radiação. Eles podem transferir a estimulação funcionalmente para os diferentes processos e componentes da célula envolvida na cadeia respiratória mitocondrial (BAXTER, 1997).

É proposto como mecanismo primário de ação, a ocorrência de quatro respostas a partir da incidência da radiação *Laser* sob as moléculas fotorreceptoras, havendo a possibilidade de que a energia dos fótons produza: mudança no estado redox e aceleração na transferência de elétrons; alterações na atividade bioquímica e estrutural pelo aquecimento transitório dos cromóforos; aumento na produção de superóxido e, finalmente, a geração de oxigênio molecular ou singleto. Na sequência, os mecanismos secundários de ação consequente 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, essas reações são conectadas à alterações dos parâmetros de homeostase celular (pH, concentração de  $\text{Ca}^{+2}$ , AMP cíclico, ATP e outros), as quais acontecem minutos ou horas após a irradiação. Isto leva a ocorrência de possíveis mudanças na taxa de síntese de DNA e RNA, alterações na taxa do consumo de  $\text{O}_2$ , alteração do potencial de membrana, entre outras. Estas respostas são convencionalmente divididas em efeitos, a curto prazo ou direto e efeitos a longo prazo ou indiretos (SANDOVAL-ORTIZ, 2001; KARU, 1998, 2000).

As respostas a curto prazo são aquelas, onde o efeito da radiação *Laser* pode ser observado poucos segundos ou minutos após a radiação. Entre as respostas a curto prazo está a fotoestimulação da taxa respiratória e a síntese de ATP (KARU, 1998).

Visto que, os efeitos biomodulatórios promovidos pela radiação *Laser* acontecem em um amplo intervalo espectral, considera-se portanto que existam diferentes cromóforos com alvos fotoreceptores. Além disso, é proposto que a intensidade dos efeitos seja determinada pelo estado fisiológico prévio da célula a irradiação. Tal situação é condicionada pelo estado redox celular, onde a fotorresposta será fraca ou ausente quando o potencial redox estiver ótimo, e forte quando o mesmo estiver alterado (estado intermediário) (KARU, 1998). Citações sobre evidências experimentais comprovam que, a alteração deste estado redox no sentido da oxidação está correlacionada 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).

Os efeitos a longo prazo ou respostas indiretas à irradiação são observados horas ou ainda dias após o término da irradiação (KARU, 1998). Sendo os três principais efeitos fisiológicos reportados na literatura sobre a LLLT, os efeitos modulador do processo inflamatório, analgésico e cicatrizante.

Em relação ao efeito cicatrizante, diversos trabalhos evidenciaram que a irradiação *Laser* tem um efeito significativo sobre a proliferação celular, justificando os resultados positivos da sua aplicação nos processos de reparação após uma lesão. Diversos resultados encontrados na literatura sugerem que o *Laser* promove um aumento da síntese de colágeno (GERBI et al., 2008), da proliferação e diferenciação de osteoblastos (RENNÓ et al., 2007) e fibroblastos (FREDDO et al., 2008), aumento da

respiração mitocondrial e síntese de ATP (VLADIMIROV et al., 2004) maior recrutamento de macrófagos, aumento da angiogênese (BOSSINI et al., 2009), aumento da atividade fagocitária o que resultará na aceleração do reparo de tecidos (ORTIZ et al., 2001).

### **1.2.3 Terapia *Laser* de Baixa Intensidade no Reparo ósseo**

Os efeitos do *Laser* Terapêutico de Baixa Intensidade no processo de reparo ósseo vêm sendo amplamente estudados por pesquisadores em todo o mundo e seus efeitos positivos tanto *in vitro* como *in vivo* vem sendo evidenciados (SILVA e CAMILLI, 2006; RENNÓ et al., 2007; BOUVET-GERBETTAZ et al. 2009)

Stein et al., (2005), em um estudo *in vitro* investigaram os efeitos da Terapia *Laser* de Baixa Intensidade na proliferação e diferenciação de células osteoblásticas. Estas células foram irradiadas com *Laser* 632nm, 10mW de potência e fluências 0.14, 0.43 e 1.43J/cm<sup>2</sup>. Após 24 e 48 horas foram coletadas e avaliadas a atividade da fosfatase alcalina (ALP), osteopontina (OP), e sialoproteína óssea (BSP). Os autores concluíram que houve um efeito bioestimulatório nas células osteoblásticas durante as primeiras 48h, em que pode ser observado um aumento significativo da atividade da fosfatase alcalina, osteopontina e sialoproteína óssea. Ainda, Stein et al., (2008) investigando os efeitos da LLLT em culturas de células osteoblásticas, demonstraram que este recurso terapêutico aumentou significativamente a atividade da ALP (48h e 72h) e a expressão do mRNA da osteopontina (24h) quando tratada com *Laser* 670nm, 400mW de potência e fluência 1J/cm<sup>2</sup>. Da mesma forma, Bouvet-Gerbettaz et al., (2009), investigaram a ação do *Laser* (808nm, 800mW, 4 J/cm<sup>2</sup>) em cultura de células

osteoblásticas e demonstraram aumento da expressão dos genes RUNX-2 e BMP2 após irradiação.

Em estudos investigando os efeitos da LLLT no processo de consolidação em modelos animais, foi demonstrado que este recurso promove uma série de modificações metabólicas e estruturais no local da fratura, como por exemplo, o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, a maior formação de tecido de granulação, a estimulação de fibroblastos, a maior deposição de colágeno, o aumento na síntese de ATP e a estimulação de células ósseas (GARAVELLO-FREITAS et al., 2003). Essas modificações são responsáveis por um aumento da osteogênese bem como, aceleração no processo de reparo ósseo (NINOMIYA et al. 2003).

Khadra et al., (2004), investigaram os efeitos do *Laser* 830nm (GaAlAs), potência de 75mW, fluência 23J/cm<sup>2</sup>, em defeitos ósseos em calvária de ratos. O tratamento iniciou imediatamente após a cirurgia e seguiu por 6 dias consecutivos, após 14 e 28 dias os ratos foram sacrificados. A análise histoquímica revelou que a quantidade de cálcio, fósforo e proteínas nos grupos irradiados foram significativamente maiores que no grupo controle. As análises histológicas mostraram pronunciada angiogênese no período de 14 dias, formação de tecido conjuntivo e formação óssea mais avançada nos grupos irradiados, o que não aconteceu no grupo controle.

Resultados positivos da laserterapia também foram evidenciados por Lirani-Galvão et al., (2006), onde os autores avaliaram e compararam os efeitos da LLLT e do ultrassom no reparo ósseo em tíbias de ratos. Um grupo foi tratado com LLLT (*Laser* GaAlAs, 780nm, 30mW, 112,5 J/cm<sup>2</sup>) e outro grupo com ultrassom pulsado (1,5 MHz, 30 mW/cm<sup>2</sup>), ambos cinco vezes por semana, e um terceiro grupo controle. Após 20 dias, os ratos foram sacrificados e tiveram suas tíbias submetidas a um ensaio de flexão e análise histomorfométrica. Os resultados mostraram que o ultrassom acelerou o reparo

ósseo, em relação ao grupo controle, no entanto, o *Laser* foi capaz de acelerar ainda mais este processo.

Blaya et al., (2008), investigaram os efeitos dos *Laser* 830nm (50 mW, 10J/cm<sup>2</sup>) e 685nm (35mW, 10J/cm<sup>2</sup>) na reparação óssea. Foram realizadas fraturas nos fêmures dos ratos com 2mm de diâmetro e as sessões de tratamento *Laser* se iniciaram imediatamente após a cirurgia e seguiram a cada 48 horas, em um total de 8 aplicações. Após 15, 21 e 30 dias os ratos foram sacrificados. Os resultados da histologia mostraram que ambos os *Lasers* utilizados foram eficientes para promover o reparo ósseo.

Shakouri et al., (2009) através de análise de microtomografia (CT) e análise biomecânica, avaliaram o efeito da Terapia *Laser* em osteotomia nas tíbias de coelhos. O estudo consistiu de 2 grupos: controle e irradiado com *Laser* (As-Ga-Al, 780nm, 4 J/cm<sup>2</sup>, 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.

Da mesma forma, Liu et al., (2007), avaliaram 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 40J/cm<sup>2</sup>, 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.

Em trabalhos realizados por nosso grupo de pesquisa, Marino (2003) avaliou os efeitos do *Laser* de Baixa Intensidade, aplicado em diferentes fluências sobre o processo de reparação óssea em tíbias de ratos. Os animais foram divididos em: grupo 1 controle,

grupo 2 e 3 sendo irradiados com *Laser* nas doses de  $5\text{J}/\text{cm}^2$  e  $50\text{J}/\text{cm}^2$ , respectivamente. Foi utilizado o *Laser* 830nm, 60mW, contínuo, densidade de potência de  $20\text{W}/\text{cm}^2$ , em aplicações pontuais a cada 24 horas, com intervalo de 2 dias a cada 5 sessões. Após 7 e 14 dias os animais foram sacrificados. Os resultados sugerem que o *Laser* favoreceu o processo de reparação óssea durante os estágios iniciais. Em outro trabalho que investigou os efeitos do *Laser* 830nm no tecido ósseo osteopênico, Rennó et al., (2006), observaram que a LLLT foi capaz de promover um aumento da força biomecânica de fêmures de ratas osteopênicas. Ainda, Rennó et al., (2007), investigaram os efeitos da Terapia *Laser* em culturas de osteoblastos. Este trabalho demonstrou que o *Laser* 830nm,  $10\text{J}/\text{cm}^2$  aumentou, significativamente, a proliferação dos osteoblastos e a atividade da fosfatase alcalina destas células.

Fávaro-Pipi et al., (2010) compararam a ação da LLLT (830nm, 30mW,  $50\text{J}/\text{cm}^2$ ) e do ultrassom pulsado de baixa intensidade (1,5MHz,  $30\text{mW}/\text{cm}^2$ ) no processo de reparo ósseo em tíbias de ratos. As análises foram realizadas após 7, 13 e 25 dias pós-cirurgia. Os resultados demonstraram que os animais tratados com LLLT apresentaram maior área de tecido neoformado nos três períodos analisados. Houve aumento de mRNA da BMP4 após irradiação *Laser* (13 dias) e aumento da ALP, BMP4 e RUNX-2 no período de 25 dias após aplicação do LLLT e US, sendo que o mRNA da ALP mostrou-se mais expresso no grupo tratado com *Laser*.

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

### 1.3 Material Bioativo

Os biomateriais vêm sendo utilizados há décadas no reparo e reconstrução de partes doentes ou lesionadas do sistema músculo-esquelético e são classificados de acordo com o tipo de interação que apresentam com os tecidos vivos. Nenhum material implantado em tecidos vivos é inerte e todos induzem a um tipo de resposta do tecido na superfície do implante (HENCH, 1991; REYES, 2000).

Desta forma, os biomateriais são classificados como: biologicamente próximos a inertes, tóxicos, reabsorvíveis e bioativos. Se o material é biologicamente próximo à inerte, apresentam uma resposta interfacial mínima que não resulta na ligação ou na rejeição do tecido hospedeiro, formando uma cápsula fibrosa de espessura variável ao redor do material. No entanto, os materiais tóxicos aos tecidos vivos causam a morte dos tecidos ao redor do implante. Quando o material é reabsorvível, são incorporados no tecido vizinho, ou podem até mesmo ser completamente dissolvidos quimicamente pelos fluidos corpóreos ou facilmente digeridos pelas células do tipo macrófagos após certo tempo. Os produtos da degradação devem ser compostos químicos não tóxicos e facilmente extraídos para não danificar as células. O material bioativo é aquele que exhibe uma resposta biológica específica na interface e resulta na formação de uma ligação química entre os tecidos e o material (HENCH, 1991; REYES, 2000).

Ainda, os materiais bioativos podem apresentar osteoprodução e/ou osteocondução. A osteoprodução é o processo no qual ocorre a colonização de células osteogênicas na superfície bioativa. A osteocondução ocorre quando o material permite a migração do tecido ósseo sobre a interface do material. Os biomateriais são divididos em 2 classes, A e B. Os biomateriais de classe A apresentam simultaneamente osteocondução e osteoprodução, sendo os que apresentam maiores níveis de bioatividade. A classe B apresenta somente osteocondução (CAO e 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. Quando um material bioativo entra em contato com fluidos corpóreos, ocorre inicialmente a lixiviação dos íons  $\text{Na}^+$  e formação de silanóis ( $\text{SiOH}$ ), na qual caracteriza o estágio I. No estágio II ocorre aumento do pH devido ao aumento de concentração de  $\text{OH}^-$ , o que leva a ruptura das ligações  $\text{Si-O-Si}$  e a sílica é liberada na solução na forma de  $\text{Si(OH)}_4$ . O estágio III ocorre a condensação do  $\text{Si(OH)}_4$  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). 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: adsorção de moléculas biológicas na camada de HCA; ação de células macrófagas; ligação de células mesenquimais; diferenciação e proliferação de osteoblastos; formação da matriz; cristalização da matriz e crescimento do osso (HENCH, 1991).

Para que ocorra ligação com o tecido, é necessário que a camada biologicamente ativa de HCA se desenvolva que é química e estruturalmente similar à fase mineral do osso. 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).

Os vidros bioativos apresentam elevado nível de bioatividade, produzem uma rápida ligação com os tecidos, produzem um ambiente adverso ao crescimento de bactérias, evitando assim infecções e contém elementos naturalmente presentes no organismo humano e possibilidade de rejeição praticamente nula. No entanto, sua aplicação clínica tem sido limitada por apresentar baixas propriedades mecânicas. Algumas cerâmicas e vitrocerâmicas especialmente desenvolvidas para a obtenção de propriedades bioativas apresentam propriedades mecânicas superiores aos dos vidros bioativos, porém a introdução de cristalinidade no material, necessária para a obtenção de cerâmicas e vitrocerâmicas com melhores propriedades mecânicas, geralmente reduz drasticamente o nível de bioatividade (JAMES, 1995).

Estes motivos estimularam os pesquisadores Hench (University of Florida) e os pesquisadores Zanotto e Peitl do Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV) da UFSCar, a estudar uma vitrocerâmica bioativa, totalmente cristalina, pertencente ao sistema quaternário  $P_2O_5-Na_2O-CaO-SiO_2$ , denominada Biosilicato<sup>®</sup> (patente O2004/074199; Zanotto et al., 2004). Os processos de cristalização desenvolvidos para a melhoria das propriedades mecânicas também possibilitaram que o Biosilicato<sup>®</sup> mantivesse um nível de bioatividade comparável aos dos vidros bioativos de classe A (PEITL FILHO, 1995).

Como a maioria dos vidros bioativos, o Biosilicato<sup>®</sup> possibilita a formação da camada de hidroxicarbonatoapatita na superfície do biomaterial. Com isso, surgiu a hipótese que o Biosilicato<sup>®</sup> possui um potencial remineralizador e é capaz de estimular a diferenciação e proliferação de osteoblastos, bem como acelerar o processo de consolidação de fraturas (RAVAGNANI, 2003).

Moura et al., (2007) observaram *in vitro* que o Biosilicato<sup>®</sup> teve um efeito superior ao 45S5<sup>®</sup> (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. No entanto, seus efeitos *in vivo* ainda não tinham sido estudados. Desta forma, em estudo pioneiro Granito et al., (2009b), investigaram os efeitos do Biosilicato<sup>®</sup> na reparação óssea. Os pesquisadores compararam este novo biomaterial com o *Bioglass* 45S5<sup>®</sup> e também com defeitos ósseos não-preenchidos e com tíbias intactas. Após 20 dias, os animais foram sacrificados, realizado ensaio mecânico de flexão de três pontos e análise histomorfométrica. Os resultados demonstraram que os defeitos ósseos preenchidos com partículas de Biosilicato<sup>®</sup> (180-210µm de diâmetro) apresentavam propriedades mecânicas similares a de ossos não fraturados. Quando comparados a defeitos preenchidos com partículas de *Bioglass* 45S5<sup>®</sup>, as lesões ósseas preenchidas com partículas de Biosilicato<sup>®</sup> apresentaram melhor reorganização tecidual, com maior volume ósseo, número de osteoblastos e de osteoclastos.

Diante desses resultados e visando o uso clínico do Biosilicato<sup>®</sup> para favorecimento da regeneração óssea, especialmente em defeitos ósseos de grande extensão, que são aqueles cujos processos de consolidação frequentemente estão prejudicados, os pesquisadores do Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV) desenvolveram implantes com estruturas porosas tridimensionais, os denominados *scaffolds*, fabricados a partir do Biosilicato<sup>®</sup>.

De acordo com vários autores, os *scaffolds* devem possuir propriedades mecânicas similares às dos ossos e se degradarem em uma taxa compatível com a velocidade de remodelamento ósseo, para que possam servir como molde para a interação celular e a formação da matriz óssea extracelular, providenciando suporte estrutural para a formação tecidual. No entanto, além da qualidade do biomaterial e das suas propriedades mecânicas, são pré-requisitos fundamentais para que o *scaffold* seja utilizado como enxerto ósseo que o mesmo, tenha adequada arquitetura, porosidade,

tamanho e interconexão dos poros, o que garantirá o suporte mecânico para a regeneração óssea, também permitindo a passagem de células e suprimento sanguíneo, eventos essenciais para a osteogênese (KARAGEORGIOU e KAPLAN, 2005; JONES et al., 2006).

A alta porosidade, o tamanho e interconectividade dos poros, são necessários para facilitar a infiltração e difusão de células e nutrientes por todo o *scaffold*. O tamanho mínimo exigido dos poros para o crescimento ósseo e angiogênese em um *scaffold* é considerado 300 micrômetros. O *scaffold* deve integrar ao osso hospedeiro sem a formação de tecido cicatricial, criando uma interface estável, deve ser reabsorvido na mesma velocidade que o osso é regenerado, de forma que, o osso acabará por regressar ao seu estado e função original (JONES et al., 2006; COSTA et al., 2007).

Mesmo quando as características dos *scaffolds* são adequadas, um problema comum verificado em pesquisas é a rápida formação de tecido ósseo nas bordas do material e desenvolvimento de tecido necrótico no centro, provavelmente devido a limitações na penetração celular e ao inadequado suprimento sanguíneo (ROSE et al., 2004). Diante disso, um método que parece ter eficácia na solução deste problema é a associação do biomaterial com a Terapia *Laser* de baixa intensidade.

### **1.3.1 Interação *Laser* e material bioativo**

Diversos estudos investigaram a associação da Terapia *Laser* com uso de implantes e/ou enxerto no tratamento do tecido ósseo. No entanto, há um déficit em relação a trabalhos que investigam a interação de materiais bioativos com a LLLT.

No estudo de Carvalho et al., (2006), foram investigados a influência do *Laser* AsGaAl (650nm) sobre a ação das BMP em defeitos ósseos produzidas em fêmures de

ratos. Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais: defeitos preenchidos com uma pasta formada por substância osteoindutora Gen – Tech e tratados com *Laser* GaAlAs,  $4\text{J}/\text{cm}^2$ , 80 segundos; defeitos preenchidos com BMPs; tratados com o *Laser* e controle. As análises histológicas e morfométrica foram realizadas nos dias 7º, 14º e 21º de pós-operatório. A associação da Terapia *Laser* de Baixa Intensidade e a substância osteoindutora Gen Tech alcançou melhores resultados do que apenas a aplicação de *Laser* ou só o uso das BMPs.

Gerbi et al., (2008), avaliaram histologicamente o efeito da fotobiomodulação *Laser* na reparação de defeitos cirúrgicos em fêmures de ratos tratados ou não tratados com proteína morfogenética óssea (BMPs) e enxerto de osso bovino orgânico. Os grupos foram irradiados com *Laser* 830nm, 40mW,  $16\text{J}/\text{cm}^2$  imediatamente após o procedimento cirúrgico totalizando sete aplicações a cada 48 horas. Os animais foram sacrificados após 15, 21 e 30 dias. Os resultados histológicos evidenciaram aumento da deposição de fibras colágenas (em 15 e 21 dias), bem como uma quantidade maior de trabéculas ósseas bem organizadas (30 dias) no grupo tratado com LLLT associado com BMPs e enxerto de osso bovino orgânico.

Ainda, Freddo et al., (2008), avaliaram o uso do *Laser* vermelho e do infravermelho após implante de placa bioabsorvível em fêmur de rato. Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos: controle, irradiado com o *Laser* vermelho 685nm, 35mW,  $10\text{J}/\text{cm}^2$ , *Laser* infravermelho 830nm, 50mW,  $10\text{J}/\text{cm}^2$ . Após 3, 7, 15 e 21 dias os ratos foram sacrificados e os resultados demonstraram que ambos os *Laser* promoveram uma fotobiomodulação positiva sobre a inflamação e estimularam a vascularização, proliferação de fibroblastos e deposição de colágeno.

Silva e Camilli (2006), investigaram os efeitos da LLLT na consolidação de defeitos ósseos associados com enxerto ósseo autógeno. Para o estudo, foram utilizados

60 ratos distribuídos nos seguintes grupos: G1 (controle não irradiado), G2 (irradiado com  $5,1 \text{ J/cm}^2$ ) e G3 (irradiadas com  $10,2 \text{ J/cm}^2$ ). O *Laser* 735nm foi aplicado três vezes por semana durante 4 semanas. Os resultados mostraram maior neoformação óssea no grupo G3, quando comparado aos outros grupos. Isso sugere que a LLLT resulta um efeito positivo na consolidação de defeitos ósseos associados com enxerto autógeno.

Da mesma forma, Torres et al., (2008), investigaram o efeito da fotobiomodulação *Laser* no reparo ósseo associado com enxerto autógeno. Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos: G1 (controle), G2 (LLLT + enxerto ósseo), G3 (BMP + enxerto) e G4 (BMP + enxerto + LLLT). Foi utilizado o *Laser* 790nm, 50mW,  $10\text{J/cm}^2$ . Os animais foram sacrificados após 40 dias e analisadas histologicamente. Os resultados histológicos mostraram que o uso de BMP + enxerto e LLLT evidenciou trabéculas ósseas maduras e melhor formação óssea quando comparado aos demais grupos.

Um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa demonstrou resultados positivos quando associaram Biosilicato<sup>®</sup> particulado e Terapia *Laser* no reparo de defeitos ósseos em tíbias de ratas osteopênicas. Os animais foram divididos em: controle padrão, controle com defeito ósseo, defeito preenchido com Biosilicato<sup>®</sup>, tratado com *Laser*  $60\text{J/cm}^2$ , tratado com *Laser*  $120 \text{ J/cm}^2$ , defeito preenchido com Biosilicato<sup>®</sup> e tratado com *Laser*  $60\text{J/cm}^2$ , defeito preenchido com Biosilicato<sup>®</sup> e tratado com *Laser*  $120\text{J/cm}^2$ . Os animais foram irradiados com *Laser* 830nm e iniciou-se imediatamente após a cirurgia e seguiu a cada 48 horas totalizando, 7 aplicações em 14 dias. Os testes de endentação e flexão a três pontos avaliaram as propriedades biomecânicas e demonstraram que a associação dos tratamentos Biosilicato<sup>®</sup> e *Laser*

120J/cm<sup>2</sup> promoveu um aumento das propriedades biomecânicas do calo ósseo a valores mais elevados do que o grupo que utilizou apenas o biomaterial (FANGEL, 2009).

Conforme exposto acima, a Terapia *Laser* de Baixa Intensidade e o Biosilicato<sup>®</sup> apresenta um alto potencial osteogênico, no entanto, ainda não sabemos quais são os mecanismos de ação e as interações biológicas que ocorrem durante a associação do *Laser* e do *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup> no tecido ósseo. Sendo assim, levantamos a hipótese de que a associação do *Laser* e do *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup> poderia ter um efeito positivo na aceleração do processo de reparação óssea.

## 2. OBJETIVO

Avaliar os efeitos do *Laser* de Baixa Intensidade ( $\lambda = 830\text{nm}$ ), fluência de  $120\text{J}/\text{cm}^2$  e do *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup>, utilizados independentes ou associados, na consolidação de defeitos ósseos induzidos em tíbias de ratos.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais experimentais**

Foram utilizados 40 ratos machos da linhagem Wistar, com três meses de idade e com peso corporal médio de 250-300 gramas no início do experimento, provenientes do biotério central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Morfologia e Patologia da UFSCar, em gaiolas de polipropileno padrão, alimentados com ração comercial e água a vontade, mantidos em ambiente controlado (ciclo claro/escuro 12/12 horas), ambiente higienizado e temperatura controlada a  $24 \pm 2^\circ \text{C}$ .

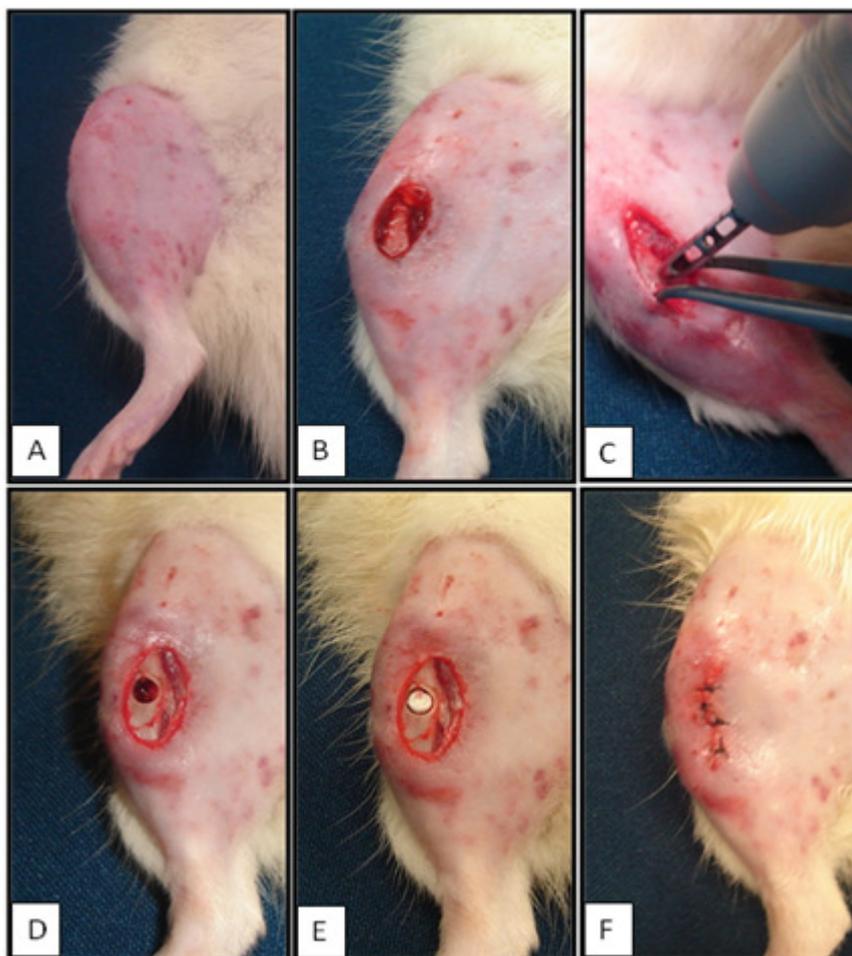
Este estudo experimental foi realizado de acordo com os princípios éticos de experimentação animal e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (protocolo 002/2009) (ANEXO 1).

#### **3.2 Procedimento Cirúrgico**

O modelo de defeito ósseo utilizado neste estudo foi baseado nos trabalhos de Barushka et al., (1995), Marino (2003), Oliveira et al., (2009) ao promoverem defeitos ósseos circulares de dimensões padronizadas na cortical da tíbia de ratos. Para a realização do defeito ósseo foi utilizada uma broca odontológica tipo trefina, da marca WMA - Brasil, com 2cm de comprimento, 3mm de diâmetro externo e acionada por um micromotor da marca BELTEC – Brasil, com rotação de 13.500 rpm, irrigada constantemente com soro fisiológico, para evitar queimadura do tecido ósseo.

Os animais foram pesados e posteriormente anestesiados de acordo com a massa corporal, utilizando-se uma combinação a base de cloridrato de Ketamina (80 mg/Kg) e cloridrato de xilazina 2% (12 mg/kg), aplicado intraperitonealmente. Após a anestesia, tricotomia digital e assepsia da área a ser operada, os defeitos ósseos foram obtidos

através de uma incisão no terço proximal da tíbia direita e esquerda. A lesão foi realizada 10mm abaixo da articulação do joelho, sendo o local do defeito previamente medido com a utilização de paquímetro digital e a lesão foi realizada com a trefina mantida na posição horizontal e perpendicular em relação ao eixo longitudinal do osso, de modo a penetrar a cortical medial e danificar o canal medular abaixo desta, porém sem atingir a face contralateral, promovendo um orifício com 3mm de diâmetro. Nos grupos GB e GBL foram implantados os scaffolds de Biosilicato<sup>®</sup>, finalizando, músculos e pele foram suturadas com fio de náilon monofilamentar 4.0 e foi feita a limpeza local (figura 1). Os animais foram mantidos em caixas individuais com livre acesso a água e comida até o momento da eutanásia.



**FIGURA 1:** Fotos da cirurgia. A: tricotomia e assepsia da região a ser operada. B: exposição do terço médio da tíbia, após a incisão feita através de um bisturi. C: defeito ósseo sendo realizado com trefina de 3mm de diâmetro externo. D: defeito ósseo. E: Implante *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup>, somente nos grupos GB e GBL. F: sutura do músculo e pele.

### 3.3 Delineamento Experimental

Os animais foram distribuídos, aleatoriamente em 4 grupos com 10 animais cada:

- ✓ **Grupo controle (GC):** animais submetidos ao defeito ósseo, mas não receberam nenhum tipo de tratamento.
- ✓ **Grupo *Laser* (GL):** animais submetidos ao defeito ósseo e tratados com *Laser* ( $\lambda = 830\text{nm}$ ).
- ✓ **Grupo *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup> (GB):** animais submetidos ao defeito ósseo e à implantação do *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup>.
- ✓ **Grupo *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup> e *Laser* (GBL):** animais submetidos ao defeito ósseo, a implantação do *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup> e tratados com *Laser* ( $\lambda = 830\text{nm}$ ).

### 3.4 Tratamento

#### 3.4.1 Aplicação do *Laser* de baixa intensidade

O aparelho utilizado foi um modelo portátil de *Laser* DMC, classe 3B GaAlAs diodo, com comprimento de onda 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  $1,5^\circ$ , na fluência de  $120\text{J}/\text{cm}^2$  (3,4J) com um tempo de aplicação por ponto 34 segundo. A escolha da fluência utilizada neste estudo foi baseada em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa (RENNO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009; BOSSINI et al., 2010). Este aparelho foi fornecido pelo Laboratório de Eletrotermofototerapia, do Departamento de Fisioterapia, da UFSCar, sob responsabilidade do Prof. Dr. Nivaldo A. Parizotto.

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*.

Os protocolos de tratamento com *Laser* de Baixa Intensidade se iniciaram imediatamente após o procedimento cirúrgico e foram realizados a cada 48 horas até o 14º dia, totalizando oito sessões de tratamento. As irradiações foram feitas em um ponto, através da técnica pontual por contato, acima da região da lesão. Além disso, a irradiações foram realizadas sempre no mesmo horário. A eutanásia dos animais aconteceu no 15º dia, 24 horas após a última sessão de tratamento.



**FIGURA 2:** Aparelho portátil de DMC, THERALASE Versão 24, classe 3B, AsGaAl diodo.

### 3.4.2 Caracterização dos *Scaffolds* de Biosilicato®

Neste estudo, foram utilizados *scaffolds* tridimensionais, competentes mecanicamente, bioativos e biodegradáveis, elaborados a partir do Biosilicato® (patente WO 2004/074199). Este é uma vitro-cerâmica do sistema  $P_2O_5$ - $Na_2O$ - $CaO$ - $SiO_2$ , altamente bioativa e totalmente cristalina. Foram utilizados *scaffolds* com 3mm de diâmetro, 1.5mm de espessura e poros direcionados com diâmetro máximo de 200 $\mu$ m.

Estas características são adequadas para a osteogênese, uma vez que permitem a passagem de células e suprimento sanguíneo através do mesmo (KARAGEORGIU e KAPLAN, 2005; VITALE-BROVARONE et al., 2006).

### 3.4.3 Síntese dos *Scaffolds* de Biosilicato<sup>®</sup>

Os *scaffolds* foram produzidos e fornecidos pelo Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV) da (UFSCar) e pela empresa Vitrovita – Instituto de Inovação em Vitrocerâmicos São Carlos, SP.

Inicialmente, o álcool isopropílico foi aquecido à temperatura de 50°C, mantido sob agitação magnética e adicionado Polvinil Butiral (PVB). Em seguida, o Biosilicato<sup>®</sup> em pó foi adicionado ao gel e essa mistura homogeneizada com um bastão de vidro, obtendo-se uma espécie de cimento. Após, adicionou-se fibras de polietileno, novamente homogeneizado e depositado em um cadinho de ZAS (zircônia-alumina-sílica) e seco à temperatura ambiente por 72 horas.

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

### 3.4.4 Implantação dos *scaffolds* de Biosilicato®

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

### 3.5 Eutanásia dos Animais

Os animais sofreram eutanásia por meio de overdose de anestésico no 15º dia após a cirurgia.

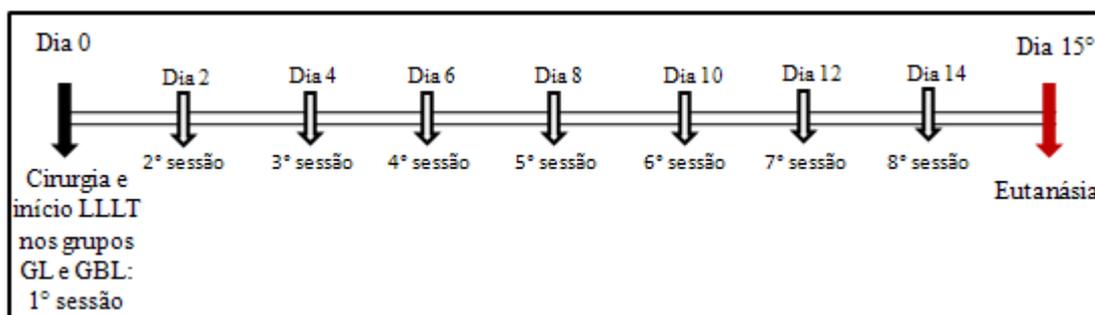


FIGURA 3: Esquema demonstrativo da data de eutanásia.

### 3.6 Coleta e preparação das amostras

Após a eutanásia, foi realizada a ressecção cirúrgica completa das tíbias, sendo a tíbia direita designada para análise histológica e imunohistoquímica e a tíbia esquerda para análise biomecânica.

As tíbias direitas foram fixadas em formalina tamponada a 10% por 24 horas, lavadas em água corrente por 24 horas e submetidas à descalcificação em solução de ácido etilendiamino tetra-cético (EDTA) por aproximadamente 40 dias.

Depois de completada a descalcificação, as amostras foram reduzidas para processamento e para inclusão em parafina. Na sequência, os blocos de parafina foram cortados longitudinalmente, em relação ao osso, por meio de um micrótomo rotativo

numérico (Ancap, modelo 297) do Laboratório de Eletrotermofototerapia (UFSCar), obtendo-se cortes semi-seriados com espessura 5 $\mu$ m.

### **3.7 ANÁLISES**

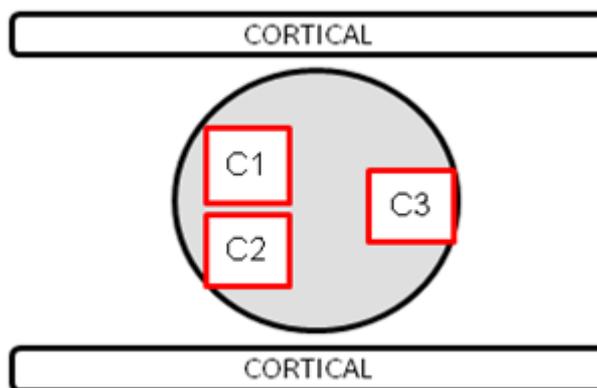
#### **3.7.1 Avaliação Morfológica Qualitativa**

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, quantidade de biomaterial, organização tecidual e área de necrose. Estes eventos foram descritos em escore leve, moderado e intenso (ANEXO 2).

#### **3.7.2 Avaliação Morfométrica**

A análise morfométrica quantitativa foi realizada nas lâminas coradas com Tricrômico de Masson (T.M.). Para a realização desta análise, foi utilizado um microscópio Nikon E 20000 e o programa de imagem Motic Imagens Plus versão 2.0 para a obtenção de fotomicrografias e análise das imagens.

Foram selecionados 3 campos pré-determinados da região da lesão de cada lâmina: campo 1 e 2 (próximo da margem do defeito ósseo esquerda) e campo 3 (próximo a margem do defeito ósseo direita).



**FIGURA 4:** Desenho ilustrativo da padronização dos campos selecionados na análise morfométrica.

Cada campo foi fotografado com a objetiva de 10x, e teve toda a área de neoformação óssea contornada, com o valor expresso em  $\mu\text{m}^2$ . Os valores das áreas de osso neoformado de cada campo foram armazenados em arquivo Excel e os valores dos três campos de uma mesma lâmina foram somados, revelando o valor total da área de osso neoformado para o animal analisado (MIRANDA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2009; FÀVARO-PÍPI et al., 2010; BOSSINI et al et al., 2010).



**FIGURA 5:** Fotomicrografia com a demarcação da área de neoformação óssea. A cor azul indica a área de tecido ósseo neoformado.

Coloração T.M. (aumento 100x).

### 3.7.3 Análise Imunohistoquímica

A avaliação imunohistoquímica foi realizada no Laboratório Multidisciplinar do Departamento de Ciências da Saúde da UNIFESP com contribuição do Prof. Dr. Daniel Araki Ribeiro.

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

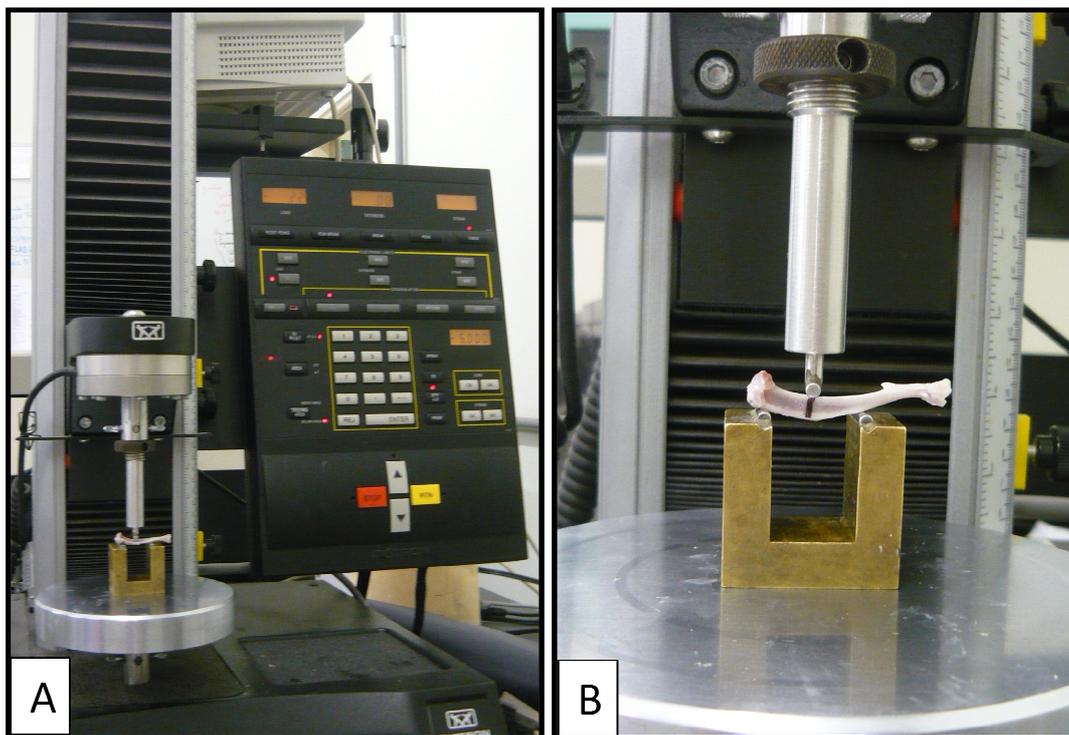
As amostras foram incubados com anti-COX 2 (ciclo-oxigenase-2) anticorpo primário policlonal (Santa Cruz Biotechnology, USA) na concentração de 1:200, anti-RUNX-2/CBFA-1 (fator de transcrição de diferenciação osteoblástica) anticorpo primário (Santa Cruz Biotechnology, USA) na concentração de 1:200.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

A seguir, os cortes foram incubados com biotina conjugada ao anticorpo secundário anti-IgG (imunoglobulina G) de coelho (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) na concentração de 1:200 em PBS por uma hora . Na sequência, os cortes foram lavados duas vezes com PBS, seguido por aplicação de complexo pré-formado de avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories) por 45 minutos. Os complexos foram visualizados por meio da aplicação de solução de 3,3 diaminobenzidina a 0,05% e

contra corados com Hematoxilina de Harris. Para confirmação dos resultados, alguns cortes foram submetidos ao mesmo tratamento omitindo-se somente os anticorpos primários, estes cortes serviram como controle negativo das reações.

#### **3.7.4 Análise Biomecânica**

A análise biomecânica foi realizada através do teste de flexão de três pontos na tíbia esquerda dos animais de todos os grupos. O teste foi realizado no Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Ciências Fisiológicas da 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 e a força foi aplicada perpendicularmente ao eixo longitudinal do osso, na região do defeito ósseo, por uma haste cilíndrica até o momento da fratura (Figura 5). 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.

### 3.7.5 Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente através de técnicas descritivas, tais como 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-Duncan. 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

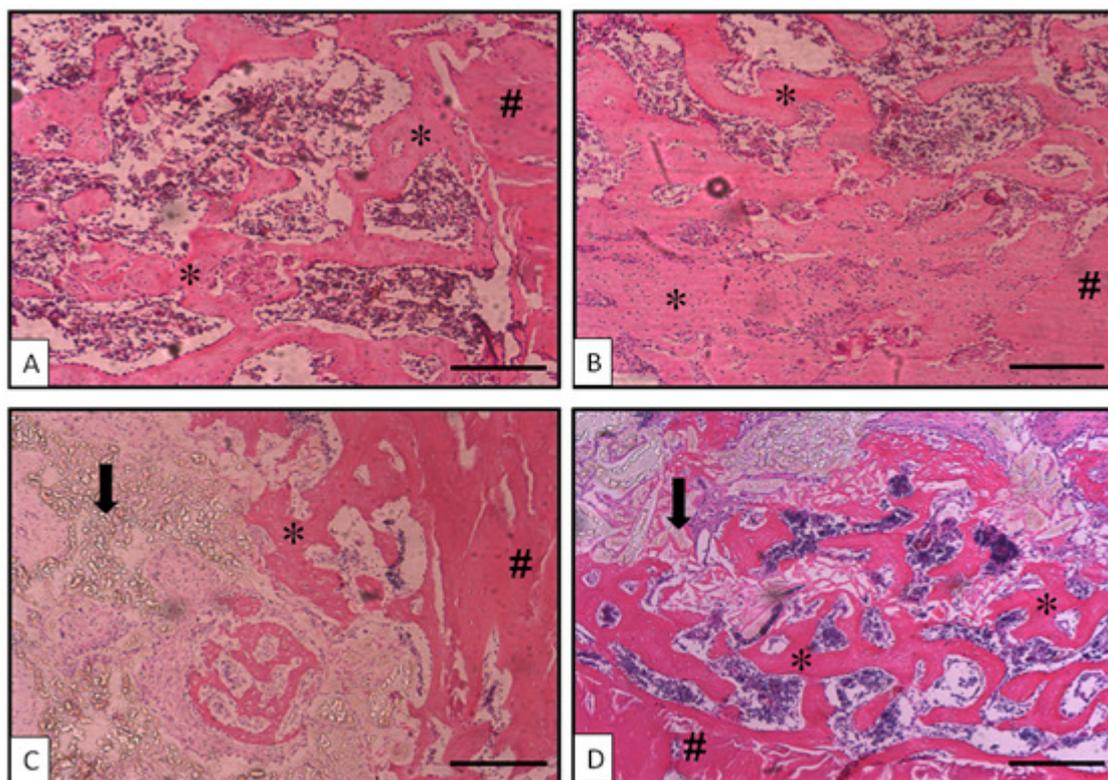
### 4.1 Avaliação Morfológica Qualitativa

A figura 7 representa os achados morfológicos obtidos a partir da análise qualitativa descritiva.

O grupo controle apresentou delimitação completa da margem da lesão, leve presença de infiltrado inflamatório, leve quantidade de tecido de granulação em diferentes áreas no interior do defeito, quantidade de osso neoformado de leve a moderado, com pouca interconectividade entre as trabéculas, correspondendo a um estágio inicial de reparo (Figura 7A).

No grupo irradiado observamos ausência de infiltrado inflamatório, discreta delimitação da borda da lesão, trabéculas ósseas concêntricas e interconectadas, apresentando um padrão histológico compatível com um estágio mais avançado de reparo quando comparado com o grupo controle. Foi possível observar que, este grupo apresentou moderada quantidade de tecido ósseo neoformado e uma melhor organização tecidual (Figura 7B).

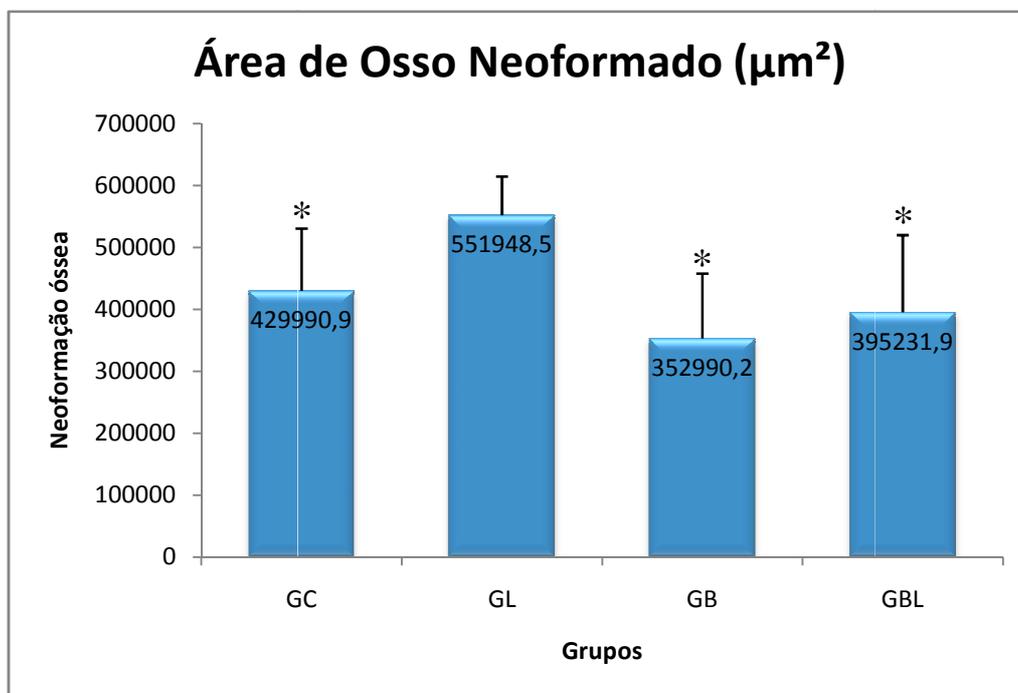
A figura 7C evidencia que os animais tratados com *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup>, apresentaram leve infiltrado inflamatório, moderada quantidade de tecido de granulação, trabéculas ósseas em pequena quantidade prevalentes nas bordas das lesões com organização concêntrica e moderada presença de biomaterial. No grupo onde houve a associação do *Laser* e do biomaterial, foi encontrado pouca quantidade de infiltrado inflamatório e intensa presença de tecido de granulação, moderada quantidade de tecido ósseo neoformado, porém com trabéculas pouco interconectadas e moderada quantidade de biomaterial (Figura 7D).



**FIGURA 7** - Fotomicrografia dos achados morfológicos dos diferentes grupos experimentais. A: controle; B: *Laser*; C: *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup>; D: *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup> + *Laser*. #: tecido ósseo intacto; \*: tecido ósseo neoformado; setas: partículas de biomaterial (Coloração: H.E., Aumento: 100x)

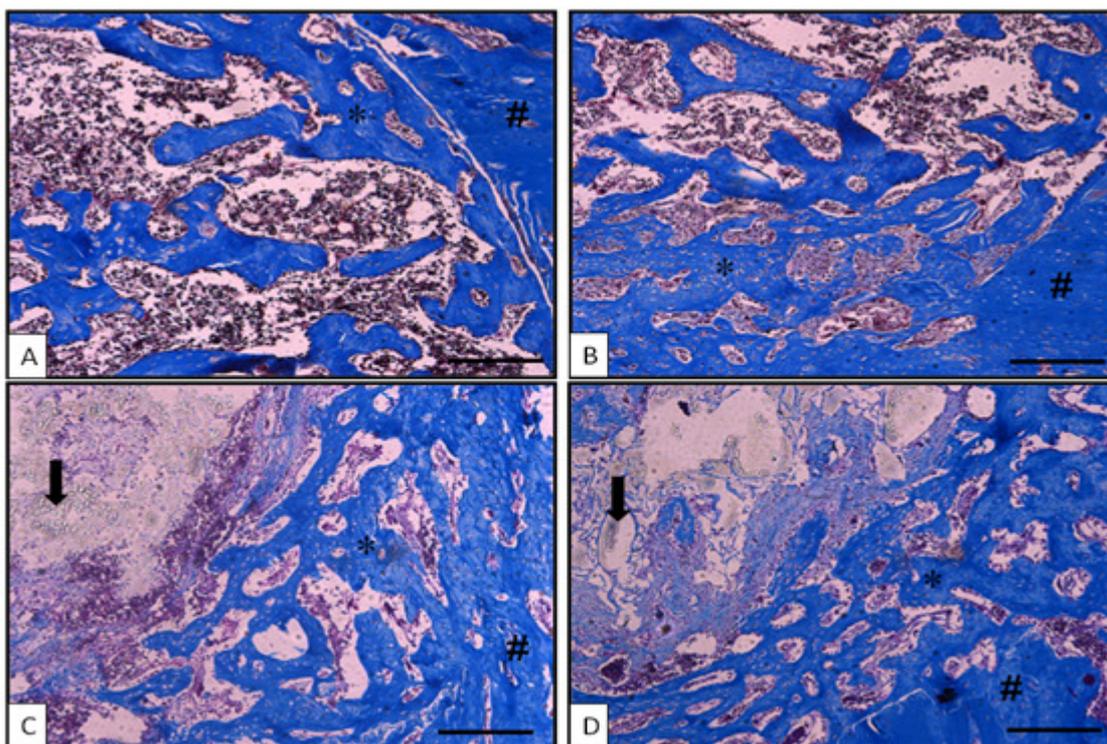
### 4.1.1 Avaliação Morfométrica

A figura 8 mostra os resultados da análise morfométrica para os diferentes grupos experimentais.



**FIGURA 8:** Média e desvio padrão da área de osso neoformado dos diferentes grupos experimentais. \*  $p \leq 0,05$  versus GL; GC: controle; GL: *Laser*; GB: Biosilicato®; GBL: Biosilicato® + *Laser*.

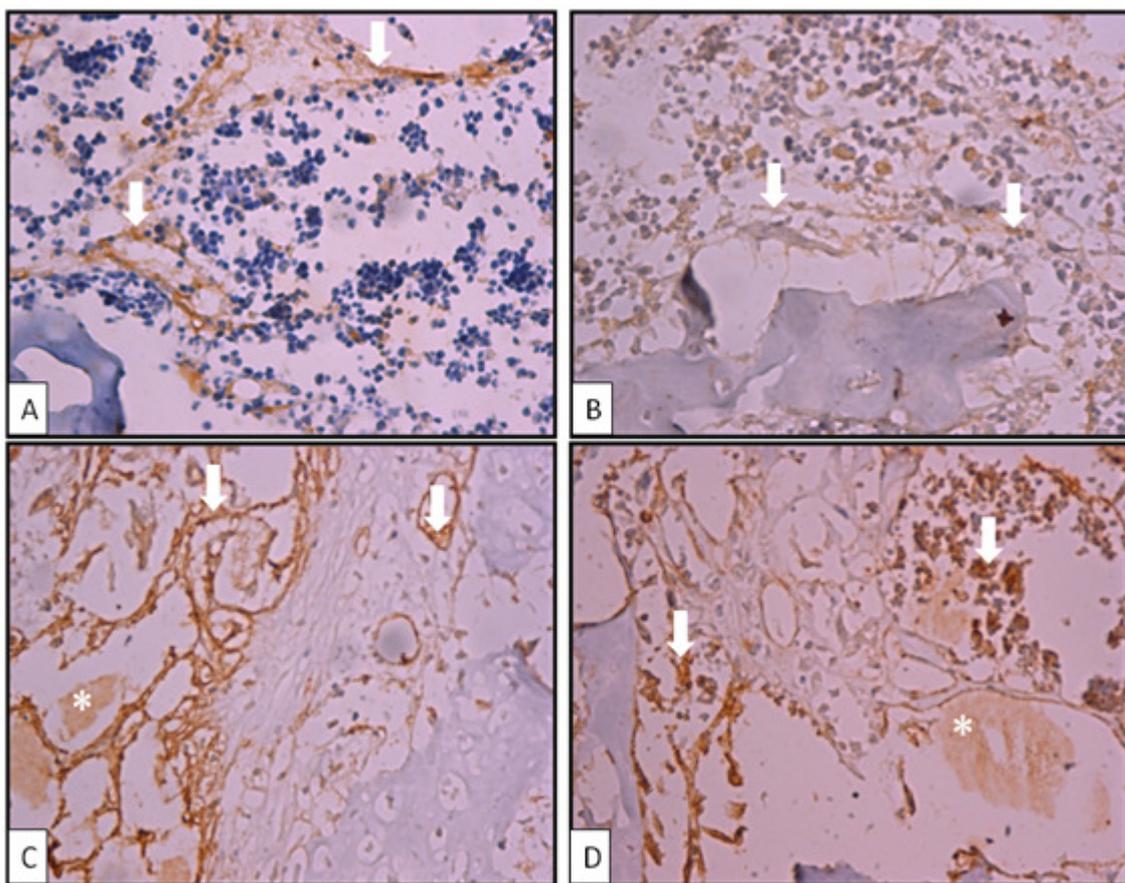
De acordo com a figura 8 pode ser observado que o grupo tratado com *Laser* apresentou média estatisticamente maior de tecido ósseo neoformado em relação aos demais grupos experimentais. Os grupos GB e GBL não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao grupo controle. A figura 9 ilustra as fotomicrografias da análise morfométrica.



**FIGURA 9:** Fotomicrografia dos achados morfométricos dos diferentes grupos experimentais. \*: tecido ósseo neoformado; #: tecido ósseo intacto; setas: biomaterial A: controle; B: *Laser*; C: Biosilicato<sup>®</sup>; D: Biosilicato<sup>®</sup> + *Laser*. (Coloração: T.M., Aumento 100x).

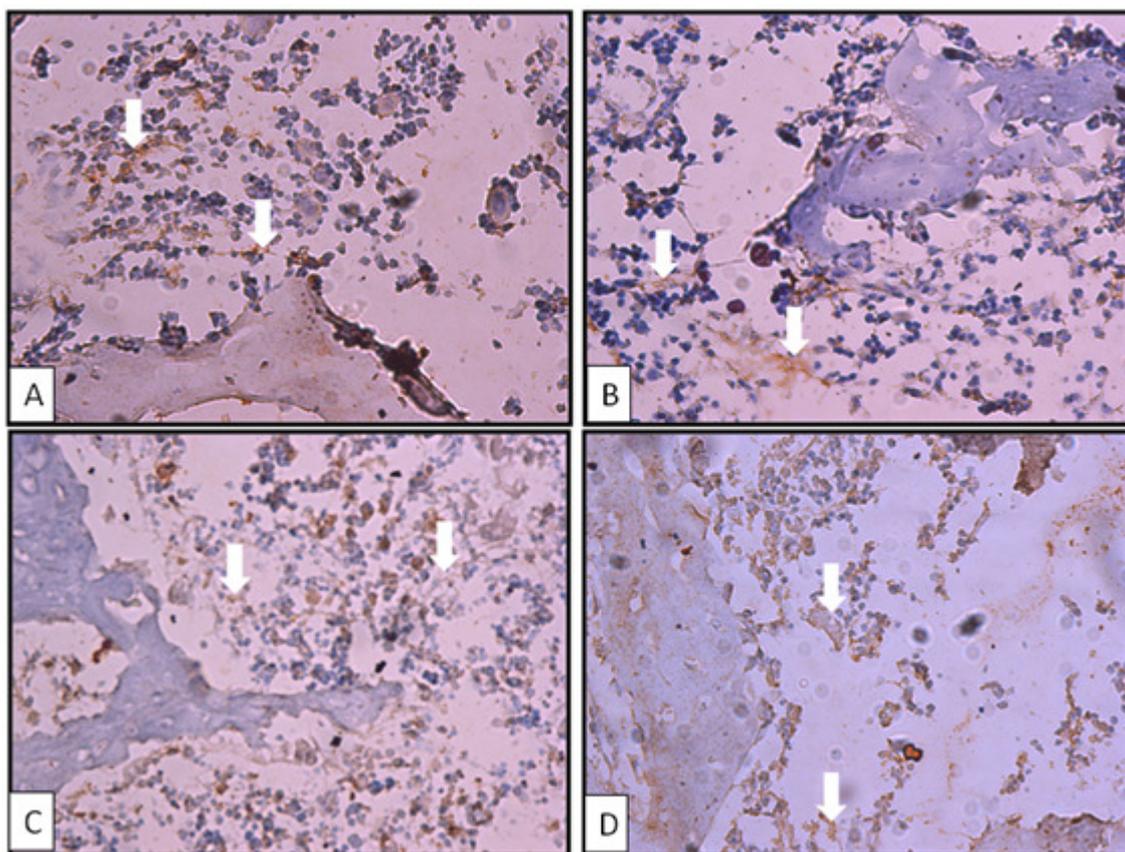
#### 4.1 Análise Imunohistoquímica

A figura 10A evidencia leve imunoreatividade para à COX-2, no tecido medular dos defeitos ósseos do grupo controle. No grupo irradiado, observou-se maior imunoreatividade à este fator inflamatório no tecido medular, quando comparado ao grupo controle (Figura 10B). No grupo tratado apenas com *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup>, foi observado imunoreatividade intensa para a COX-2 no tecido medular, quando comparado aos demais grupos experimentais (Figura 10C). No grupo onde houve a associação do *Laser* e do biomaterial foi observado moderada imunoreatividade deste mediador inflamatório, em relação aos demais grupos (Figura 10D).



**FIGURA 10:** Fotomicrografias representativas da imunoposição de COX-2(setas), \*:Biomaterial. (A) grupo controle; (B) grupo tratado com *Laser*; (C) grupo tratado com *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup>; (D) grupo tratado com *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup> + *Laser*. (Coloração Imunohistoquímica, Aumento 500x).

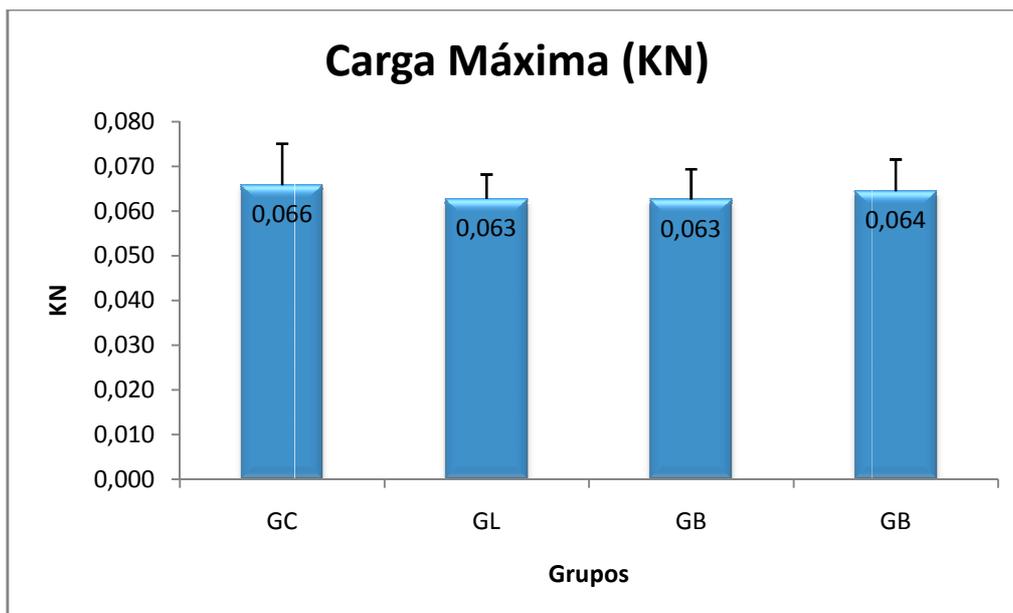
A imunohistoquímica para o RUNX-2/CBFA-1 foi detectada nas células do tecido medular do grupo controle (Figura 11A). No grupo irradiado com *Laser* ocorreu um padrão semelhante ao do grupo controle, ou seja, células positivas ao RUNX-2/CBFA-1 foram observadas principalmente no tecido medular (Figura 11B). O grupo tratado apenas com *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup> apresentou moderada expressividade para este imuno-marcador no tecido medular, quando comparado aos demais grupos experimentais (Figura 11C). No grupo onde houve a associação do *Laser* e do biomaterial foi observado intensa imunoreatividade ao RUNX-2/CBFA-1 no tecido medular, em relação aos demais grupos (Figura 11D).



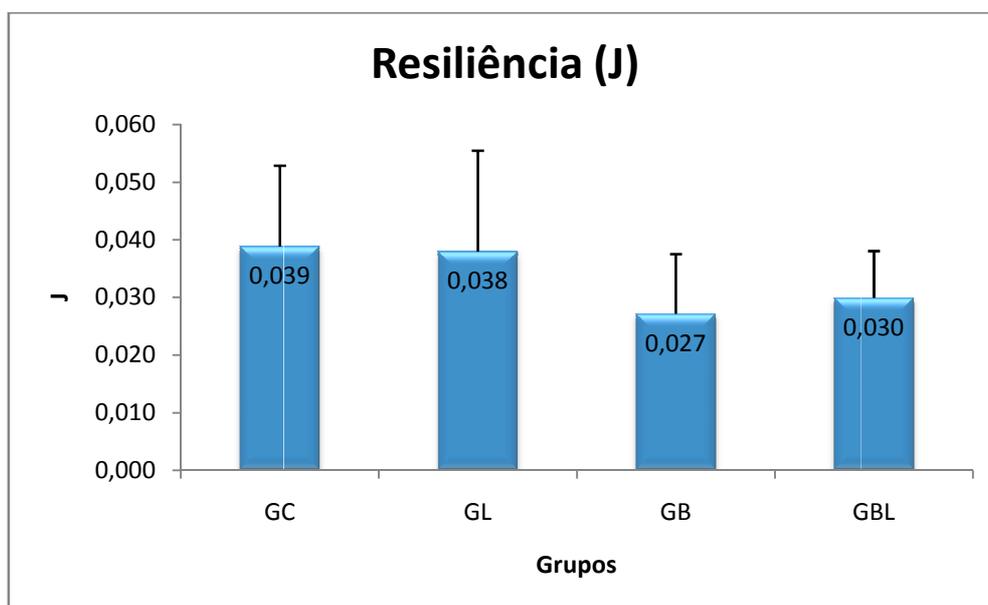
**FIGURA 11:** Fotomicrografias representativas da imunoposição de RUNX-2/CBFA-1 (setas): (A) grupo controle; (B) grupo tratado com *Laser*; (C) grupo tratado com *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup>; (D) grupo tratado com *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup> + *Laser*. (Coloração Imunohistoquímica, Aumento 500x).

#### 4.2 Análise Biomecânica

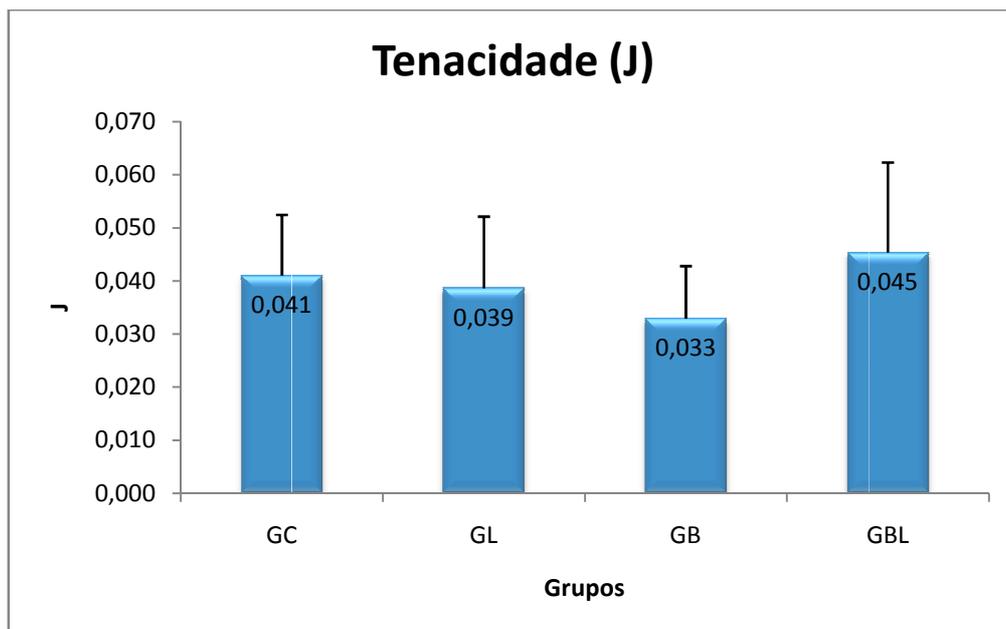
As figuras 12, 13 e 14 mostram os valores médios e desvio padrão referentes as propriedades biomecânicas das amostras pertencentes aos quatros grupos experimentais. Pode ser observado que não houve diferença estatisticamente significativa das propriedades biomecânicas entre os grupos.



**FIGURA 12:** Média da carga máxima nos diferentes grupos experimentais (GC: controle; GL: *Laser*; GB: *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup>; GBL: *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup> + *Laser*).



**FIGURA 13:** Média da resiliência nos diferentes grupos experimentais (GC: controle; GL: *Laser*; GB: *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup>; GBL: *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup> + *Laser*).



**FIGURA 14:** Média da tenacidade nos diferentes grupos experimentais (GC: controle; GL: *Laser*; GB: *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup>; GBL: *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup> + *Laser*).

## 5. DISCUSSÃO

Durante as últimas décadas, vários estudos têm demonstrado os efeitos positivos da laserterapia no processo de reparo ósseo, como proliferação e diferenciação de osteoblastos e fibroblastos (PEREIRA et al., 2002; NINOMIYA et al., 2007), aumento da angiogênese e atividade fagocitária (LIRANI-GALVÃO et al., 2006; BOSSINI et al., 2009), aumento da quantidade de RNA mensageiro para a síntese de colágeno tipo I, favorecendo a formação de tecido ósseo e conseqüentemente a regeneração de defeitos ósseos (SILVA e CAMILI et al., 2006).

No presente estudo, foi observado que os animais tratados com a terapia *Laser* apresentaram maior área de tecido ósseo neoformado e uma melhor organização tecidual na área do defeito quando comparado com o grupo controle e com os grupos tratados com biomaterial. Além disso, os resultados demonstraram que a terapia *Laser* foi capaz de induzir a expressão de COX-2 e RUNX-2/CBFA-1.

Esses resultados corroboram com diversos trabalhos encontrados na literatura, que também observaram o efeito positivo da LLLT na aceleração da consolidação óssea. Pretel et al., (2007) observaram em estudo histológico, que a LLLT (780nm, 35mW, 178J/cm<sup>2</sup>) promoveu a otimização do processo de reparo ósseo após 15 dias de pós-operatório. Da mesma forma, Matsumoto et al., (2009) também evidenciaram que a qualidade do reparo ósseo e a quantidade de osso neoformado do grupo tratado com *Laser* (735nm, 16J/cm<sup>2</sup>) foi superior ao controle. Ainda, em um estudo do nosso grupo de pesquisa Fávaro-Pípi et al., (2010) observaram que o grupo tratado com *Laser* (830nm, 30mW, 50J/cm<sup>2</sup>) demonstrou aumento do tecido ósseo neoformado, assim como uma melhor organização tecidual indicando um estágio de reparo avançado. Não obstante, Khadra et al., (2004) observaram resultados positivos após aplicação do *Laser* (830nm, 75mW, 23J/cm<sup>2</sup>) em fraturas ósseas. Após 2 semanas, os autores encontraram um aumento dos vasos sanguíneos e da área de tecido ósseo neoformado quando comparado ao grupo controle.

Vários autores vêm sugerindo hipóteses que explicam os mecanismos de ação através dos quais o *Laser* atua na aceleração do processo de reparo tecidual (FAVARO-PIPI, et al., 2010). Os efeitos da Terapia *Laser* são baseados em mecanismos não térmicos da luz sobre os tecidos biológicos (BASFOR, 1995). Quando a luz interage com o tecido, induz efeitos de modulação sobre a atividade celular, através de mecanismos fotoquímicos, ou seja, ocorrem modificações nas funções celulares, tais como, a estimulação ou a inibição das atividades bioquímicas, fisiológicas e proliferativas (BASFOR et al., 1995). Desta forma, esse recurso pode acelerar a maturação e diferenciação de osteoblastos, o que poderia determinar a deposição precoce de massa óssea (STEIN et al., 2008).

Da mesma forma, tem sido demonstrado que o *Laser* parece ser capaz de modular a liberação dos mediadores químicos e a expressão de enzimas envolvidas no processo inflamatório (CARVALHO, 2006). É descrito por Sandoval-Ortiz (2001), que o *Laser* exerce uma ação modulatória sobre o processo inflamatório, permitindo que este se desenvolva, mas sem uma resposta exagerada, contribuindo assim para sua resolução mais acelerada. Diversos estudos têm demonstrado que o *Laser* estimula a proliferação de macrófagos e aumenta a atividade quimiotática e fagocítica dos leucócitos, atuando seletivamente sobre o sistema imune, restaurando assim, a imunocompetência das células lesadas (TADAKUMA, 1993; LIRANI-GALVÃO et al., 2006).

A reação inflamatória é composta por uma série de fenômenos biológicos que se associam e se complementam, formando reações em cascata, envolvendo a interação complexa entre as células inflamatórias, tais como: neutrófilos, linfócitos e monócitos/macrófagos. Além disso, várias citocinas e fatores de crescimento estão presentes nos locais de inflamação, e cada um desses, pode potencialmente influenciar essa resposta inflamatória (TEDGUI e MALLAT, 2001) Ainda, condições inflamatórias estimulam a produção de prostaglandina, e esta apresenta efeito sobre a proliferação e diferenciação de osteoblastos e regulam também a diferenciação e a função dos osteoclastos (LI et al., 2002). As prostaglandinas são sintetizadas por duas distintas isoformas, cicloxigenase 1 e 2 (COX-1 e COX-2). A COX-1 é expressa em vários tipos de células regulando as funções fisiológicas normais, enquanto a COX-2 pode ser induzida na presença de citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento, e expressa caracteristicamente por células envolvidas no processo inflamatório (VANE et al., 1998). A COX-2 apresenta essencial importância na maturação dos osteoblastos e sua expressão está aumentada durante as primeiras duas semanas após a fratura. Além disso,

a COX-2 é requerida em ambos os processos de ossificação (endocondral e intramembranosa) e regula importantes fatores de transcrição, tais como RUNX2/CBFA-1 e osterix, os quais exercem papel fundamental na diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos (DUCY et al., 1997; ZHANG et al., 2002).

Com relação ao presente estudo, quando comparamos o grupo *Laser* com o controle, observamos que a Terapia *Laser* foi capaz de induzir de forma mais evidente a expressão deste mediador inflamatório, o que pode ter contribuído para aceleração do processo de consolidação óssea neste trabalho. Os resultados do presente trabalho estão de acordo com estudos de Matsumoto et al., (2009) e Ribeiro e Matsumoto (2008) que também observaram que a qualidade do reparo ósseo e a quantidade de osso neoformado do grupo irradiado (735nm, 16J/cm<sup>2</sup>) foi superior ao controle.

Além disso, Zhang et al., (2002) afirmaram que a enzima ciclo-oxigenase-2 age sobre a osteogênese, regulando genes de diferenciação osteoblástica, tais como o RUNX-2/CBFA-1. Este é um fator de transcrição essencial no processo de osteogênese durante o desenvolvimento esquelético e está associada a proliferação e diferenciação de osteoblastos desenvolvendo, com isso, um papel fundamental na formação óssea (KOMORI, 2003; ZIROS et al., 2008; WOHL et al., 2009). Da mesma forma, a RUNX-2/CBFA-1 pode ativar genes específicos para osteoblastos, bem como aumentar a expressão de osteocalcina, osteopontina, fosfatase alcalina e colágeno tipo I (VAES et al., 2006). Ainda, tem sido demonstrado que ratos geneticamente modificados, que não expressam a RUNX-2/CBFA-1, não conseguem formar tecido ósseo e tem um bloqueio na maturação osteoblástica (VAES et al., 2006).

Neste estudo, quando se investigou a expressividade da RUNX-2/CBFA-1, os resultados demonstraram que no grupo irradiado com *Laser* ocorreu um padrão semelhante ao do grupo controle, ou seja, células positivas ao RUNX-2/CBFA-1 foram

observadas principalmente no tecido medular. Tais dados corroboram com o estudo de Bossini et al., (2010), que também evidenciaram que a imunexpressão deste fator de transcrição, não apresentou diferença entre os grupos controle e irradiado.

Na análise biomecânica os resultados do presente estudo não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, o que sugere que a LLLT não foi capaz de aumentar as propriedades biomecânicas do calo ósseo das tíbias 15 dias após a cirurgia. Resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira et al., (2009) que também não demonstraram aumento das propriedades biomecânicas após uso do *Laser* 830nm. Ainda, em estudos do nosso grupo de pesquisa, Marino (2003) não obteve aumento das propriedades biomecânicas após tratamento *Laser* 830nm em tíbias de ratos. Da mesma forma, Otremski et al., (2004) utilizaram *Laser* vermelho 632.8nm no reparo ósseo e não encontraram resultados positivos na análise biomecânica após uso do LLLT. Contrariamente, Luger et al., (1998) observaram aumento nos valores carga máxima e rigidez do calo ósseo em tíbias tratados com *Laser* (632,8nm, 35mW). Resultados positivos também foram encontrados por Lirani-Galvão et al., (2006) após tratamento com *Laser* (780nm, 30mW, 112,5J/cm<sup>2</sup>) no processo de reparo ósseo em ratos. Mas, vale ressaltar que estes estudos utilizaram *Lasers* com diferentes dosimetrias e comprimentos de onda em relação aos aplicados no nosso trabalho.

O material bioativo é outro recurso osteogênico amplamente utilizado com o intuito de acelerar o processo de consolidação óssea (RATNER, 2004; MOURA et al., 2006). O presente estudo verificou os efeitos de um material vitrocerâmico altamente bioativo denominado de Biosilicato<sup>®</sup> na forma de *scaffold*, ou seja, estruturas porosas tridimensionais, no processo de consolidação em defeitos ósseos em ratos. De acordo com Moura et al., (2007) o Biosilicato<sup>®</sup> possui um potencial remineralizador e é capaz de estimular a diferenciação e proliferação de osteoblastos, podendo acelerar o processo

de consolidação de fraturas ou servir como substituto para o tecido ósseo, através da formação da camada de hidroxicarbonatoapatita na superfície do biomaterial.

Os resultados deste estudo demonstram que, na análise morfométrica, o grupo *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup> apresentou área de tecido neoformado semelhante ao grupo controle. A análise histológica qualitativa mostrou moderada quantidade de tecido de granulação, trabéculas ósseas prevalentes nas bordas da lesão com organização concêntrica e moderada presença de biomaterial. Ainda, foi possível observar a neoformação óssea tanto nos macroporos quanto nos microporos dos *scaffolds* implantados, observamos também a presença de células ósseas na superfície do biomaterial o que sugere um alto potencial osteogênico do *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup>.

Em estudo semelhante Granito et al., (2009b) preencheram defeitos ósseos em tíbias de ratos com Biosilicato<sup>®</sup> particulado e biovidro 45S5<sup>®</sup> e observaram após 20 dias maior formação óssea nos defeitos que foram preenchidos com Biosilicato<sup>®</sup> particulado quando este foi comparado ao grupo controle e ao biovidro 45S5<sup>®</sup>, considerado atualmente o padrão ouro em materiais bioativos.

Da mesma forma, Oliveira et al., (2009) preencheram defeitos ósseos tibiais com Biosilicato<sup>®</sup> particulado e observaram o crescimento ósseo entre as partículas do biomaterial, formando trabéculas em toda a região do defeito. Os autores evidenciaram também que o grupo tratado somente com Biosilicato<sup>®</sup> apresentou uma quantidade de tecido ósseo neoformado semelhante ao grupo controle, porém um maior recrutamento celular foi observado neste grupo.

Com relação aos resultados da análise imunohistoquímica, quando comparamos o grupo *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup> com o controle, observamos que este biomaterial apresentou intensa imunomarcagem para a COX-2 e moderada expressividade para a

RUNX-2/CBFA-1. Assim como na análise histológica, os achados da análise imunohistoquímica destacam o potencial osteogênico deste biomaterial.

Tais dados corroboram com o estudo de Souza Nunes et al., (2009) que observaram após 14 dias de pós operatório, menor formação óssea nos grupos preenchidos com *β-tricalciumphosphate* ( $\beta$ -TCP) e hidroxiapatita bovina (HA) em defeitos ósseos em calvárias de coelhos, quando comparados ao grupo de enxerto ósseo autógeno. Porém, os mesmos autores encontraram maior imunomarcação para CBFA-1 no grupo preenchido HA destacando a influencia dos implantes cerâmicos bioativos na expressão deste fator.

Em relação à análise biomecânica, o grupo *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup> não apresentou diferenças estatisticamente significativas quando comparado com os demais grupos. Esses resultados corroboram com os estudos de Granito et al., (2009a) e Oliveira et al., (2009) que preencheram defeitos ósseos com Biosilicato<sup>®</sup> particulado e não observaram aumento das propriedades biomecânicas após 15 dias de pós operatório. Porém, após 20 dias de cirurgia, Granito et al., (2009b) observaram melhores propriedades biomecânicas no grupo em que os defeitos ósseos foram preenchidos com Biosilicato<sup>®</sup> particulado quando comparado ao grupo controle. Sendo assim, é possível sugerir que o período experimental de 15 dias utilizado neste estudo não tenha sido suficiente para induzir modificações que poderiam levar a um aumento nas propriedades mecânicas óssea. Em geral, é possível sugerir que o *scaffold* de Biosilicato permite a diferenciação dos osteoblastos durante o processo de reparo ósseo em ratos.

Diante dos resultados promissores do Biosilicato<sup>®</sup> particulado no processo de reparo ósseo, foi levantada a hipótese que o efeito osteogênico do Biosilicato<sup>®</sup> na forma de *scaffold*, poderia ser potencializado com a aplicação *Laser*. No entanto, os resultados deste estudo demonstraram que a associação do *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup> e a aplicação

*Laser*, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas comparado ao grupo controle.

Esses resultados corroboram com os de Oliveira et al., (2009) onde associaram Biosilicato<sup>®</sup> particulado com tratamento *Laser* (830nm, 100mW) em defeitos tibiais de ratos e observaram uma diminuição da formação óssea. Os autores relatam que a associação destas duas modalidades de tratamento poderia ter provocado um excesso de estímulo no local da lesão. Ainda, Rennó et al., (2010), avaliaram *in vitro*, os efeitos da Terapia *Laser* (830nm, 30mW, 10J/cm<sup>2</sup>), na proliferação de células osteoblásticas em *scaffolds* de Biosilicato<sup>®</sup>. Foi demonstrado que estas células proliferaram com sucesso nestes *scaffolds*. No entanto, quando o biomaterial foi irradiado com *Laser* houve uma diminuição em 13% na proliferação de osteoblastos.

Contrariamente, outros autores vêm demonstrando resultados positivos da associação entre biomateriais e *Laser* no processo de reparo ósseo. Arruda (2008) avaliou os efeitos do laserterapia (780nm, 30mW, 112,5J/cm<sup>2</sup>) e da vitrocerâmica elaborada a partir do genérico do biovidro de composição: 45% SiO<sub>2</sub>, 24,5% Na<sub>2</sub>O, 24,5% CaO e 6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> em perfurações ósseas em tíbias de ratos. Os resultados histológicos demonstraram que quando o tecido é irradiado com *Laser* 780nm na presença do biomaterial, a interação é otimizada melhorando a qualidade do tecido ósseo neoformado e sua interação com o material. Guzzardela et al., (2003) investigaram os efeitos da LLLT e de implantes de hidroxiapatita (HA) em fraturas de fêmures em coelhos. Na análise histomorfométrica os animais que associaram os tratamentos apresentaram melhor maturação óssea na interface com o implante de HA, com mineralização óssea similar ao osso pré-existente após 3 semanas de P.O.

Na análise imunohistoquímica, o grupo *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup> associado com a Terapia *Laser* apresentou moderada expressão de COX-2 e intensa imunomarcagem para

a RUNX-2/CBFA-1, quando comparado ao grupo controle, o que indica novamente o potencial para formação óssea neste grupo, apesar de estar na fase inicial do desenvolvimento do calo ósseo, o que é confirmado pela análise histológica. Contrariamente, Bossini et al., (2010) associaram *Laser* e Biosilicato<sup>®</sup> particulado no tratamento de defeitos ósseos em tíbias de ratas osteopênicas e observaram aumento estatisticamente significativo da área de osso neoformado e também aumento da expressão de COX-2 no tecido circunjacente ao biomaterial, bem como no tecido de granulação. Ainda, observaram moderada expressão de CBFA-1 nos grupos expostos ao biomaterial em associação ou não com a Terapia *Laser*.

Os resultados da análise biomecânica não apresentaram diferenças quando comparadas com os demais grupos experimentais. Da mesma forma, Oliveira et al., (2009) observaram que os animais que tiveram os defeitos ósseos preenchidos com Biosilicato<sup>®</sup> particulado e expostos ao *Laser*, na análise biomecânica não revelaram diferenças estatisticamente significativas em relação aos demais grupos.

Assim, os dados deste estudo sugerem que, apesar do grupo *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup> ter apresentado neoformação óssea semelhante ao grupo controle, este biomaterial apresentou também um potencial osteogênico, pois promoveu integração do *scaffold* com o tecido ósseo hospedeiro criando uma interface estável entre o implante e tecido. No entanto, quando esse biomaterial foi associado com a terapia *Laser*, também não demonstrou diferença na formação óssea comparado ao controle. As razões para estes resultados não são claras, porém uma hipótese que poderia explicá-los seria que, ao ser irradiado pela aplicação *Laser*, o material vitrocerâmico poroso pode ter refletido, refratado ou absorvido os fótons incidentes. Ainda é possível que o período experimental de 15 dias utilizado neste estudo não seja suficiente para induzir modificações que poderiam levar a um aumento da força óssea.

Os parâmetros da laserterapia como potência, comprimento de onda, fluência e duração do tratamento também podem ter influenciado o reparo ósseo e inibido a migração e crescimento celular na superfície da vitrocerâmica. 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

A partir dos resultados obtidos neste estudo, pode-se sugerir que ambos os tratamentos apresentaram potencial osteogênico após 15 dias de cirurgia, porém a Terapia *Laser* de Baixa Intensidade foi eficaz para estimular o reparo ósseo em tíbias de ratos. No entanto, mais estudos são necessários para tentar elucidar possíveis mecanismos de ação e as interações biológicas que envolvem o *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup> e a Terapia *Laser* sobre o processo de reparo ósseo em ratos.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Este estudo avaliou os efeitos da Terapia *Laser* de Baixa Intensidade e do Biosilicato<sup>®</sup> na forma de *scaffold*, utilizados independentes ou associados no tratamento de defeitos ósseos em tíbias de ratos, mas algumas questões necessárias a uma correta e segura aplicação dos tratamentos propostos ainda precisam ser analisadas. Podem-se enumerar eventuais limitações do estudo atual e sugestões a serem pesquisadas em trabalhos futuros:

1. Comparação do biomaterial utilizado com um implante bioinerte;
2. Realização de defeitos ósseos considerados de tamanho crítico;
3. Realização de estudos longitudinais do tratamento *Laser* para verificar a sua influência sobre o tecido ósseo após o período de tratamento;
4. Definição dos mecanismos de ação do *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup> em vivo e *in vitro* com observações longitudinais em diversos tipos de tecido;
5. Analisar genes e proteínas envolvidas na consolidação óssea para melhor compreender o processo de reparo ósseo fisiológico e ação da LLLT e do *scaffold* de Biosilicato<sup>®</sup> no tecido ósseo.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M. ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4 ed. Porto Alegre-RS:Artmed, 2004.

ARRUDA, E.R. de BARROS. **Avaliação de um vitrocerâmico elaborado a partir do genérico do biovidro 45S5 em perfurações de tíbias de ratos, e seu comportamento sob influência da radiação Laser de baixa intensidade** (Dissertação Mestrado) Universidade de São Paulo - São Carlos, 2008.

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**, 16:47-55, 1995.

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

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

BEAMER, B.; HETTRICH, C.; LANE, J. Vascular Endothelial Growth Factor: An Essential Component of Angiogenesis and Fracture Healing. **Hosp Special Surg**, 2009.

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

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

BOSSINI, P.S.; RENNÓ, A.C.M.; RIBEIRO, D.A.; FANGEL, R. PEITL, O.; ZANOTTO, E.D.; PARIZOTTO, N.A. Biosilicate<sup>®</sup> and low level laser therapy improve bone repair in osteoporotic rats. **J. Tissue Eng Regen Med**. 2010.

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

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

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

CARSON, J. S.; BOSTROM, M. P.G. Synthetic bone scaffolds and fracture repair. **Injury**, p.33-37, 2007.

CARVALHO, P.T.C.; SILVA, I.S.; REIS, F.A.; BELCHIOR, A.C.G.B.; FACCO, G.G.; GUIMARÃES, R.N.; FERNANDES, G.H.C.; DENADAI, A.S. Effect of 650 nm low-

power laser on bone morphogenetic protein in bone defects induced in rat femors. **Acta Cir Bras.**, 2006.

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

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

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

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

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

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

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.

FÁVARO-PÍPI, E.; FEITOSA, S.M.; RIBEIRO, D.A., BOSSINI, P.; OLIVEIRA, P.; PARIZOTTO, N.A.; RENNO, A.C. Comparative study of the effects of low-intensity pulsed ultrasound and low-level laser therapy on bone defects in tibias of rats. **Lasers Med Sci**. 25:727-32, 2010.

FREDDO, A.L.; RODRIGO, S.M.; MASSOTTI, F.P.; ETGES, A.; OLIVEIRA, M.G. Effect of low-level laser therapy after implantation of poly-L-lactic/polyglycolic acid in the femurs of rats. **Lasers Med Sci**, 24:721-728, 2009.

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. **J Photochem Photobiol**, 70:81-9, 2003.

GERBI, M.E.M. ;MARQUES, A.M.C.; RAMALHO, L.M.P. ; PONZI, E.A.C.; CARVALHO, C.M.; SANTOS, R.C. ;OLIVEIRA, P.C.; NÓIA, M.; PINHEIRO, A.L.B. Infrared Laser Light Further Improves Bone Healing When Associated with Bone Morphogenetic Proteins: An *in Vivo* Study in a Rodent Model. **Photomed Laser Surg**, 2008.

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**, 2009a.

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, 2009b.

GUARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de histologia**. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

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**, 14:226-32, 2003.

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

HENCH, L.L. Bioceramics: From Concept to clinic. **J Am Ceram Soc**, 74:1487-510, 1991.

HENCH, LL, POLAK, J.M. Third-generation biomedical materials. Review. **Science**, 295:1014-7, 2002.

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

JONES, J.R.; EHRENFRIED, L.M.; SARAVANAPAVAN, P.; HENCH, L.L. Controlling ion release from bioactive glass foam scaffolds with antibacterial properties. **J Mater Sci: Mater Med**, 17:989-996, 2006.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

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

KARU, T. The science of low power laser therapy. Australia: **Gordon and breach science publishers**, 1998.

KARU, T.; TIPHLOVA, O.; SAMOKHINA, M.; DIAMANTOPOULOS, C. Effects of near-infrared laser and superluminous diode irradiation on Escherichia coli division rate. **IEEE Journal of Quantum Electronics**, 26:2162-2165, 1990.

KARU, T.I. Mechanisms of low Power laser light action on cellular level. In: Karu, T.I. e LUBART, R. **Effects of low power light on biological systems V**. Amsterdam, Netherlands: Proceedings of SPIE, v.4159, p.01-17, 2000.

KAWACHI, E.Y.; BERTRAN, C.A.; REIS, R.R.; ALVES, O. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, 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 Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol Endod**, 97:693-700, 2004.

KIERZENBAUM, A. L. **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia**. 2 ed. Elsevier: Rio de Janeiro, 2008.

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

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

LAAKSO, L.; RICHARDSON, C.; CRAMOND, T. Quality of light is laser necessary for effective photobiostimulation? Australian: **J Physiother.**, 39:87-92, 1993.

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

LIRANI-GALVÃO, A.P.; JORGETTI, V.; 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**, 24:735-40, 2006.

LIU, X.; LYON, R.; MEIER, H.T.; THOMETZ, J.; HAWORTH, S.T. Effect of lower level laser therapy on rabbit tibial fracture. **Photomed Laser Surg**, 25:487-94, 2007.

LOW, L.; REED, A. **Eletroterapia Explicada: Princípios e Prática**. 3 ed. Barueri: Manole, 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 Surg Med**, 22:97-102, 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**, 24:196-201, 2009.

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

- NINOMIYA, T.; HOSOYA, A.; NAKAMURA, H.; SANO, K.; NISHISAKA, T.; OZAWA, H. Increase of bone volume by a nanosecond pulsed laser irradiation is caused by a decreased osteoclast number and an activated osteoblast. **Bone**, 40:140-148, 2007.
- NUNES, L.S.S.; OLIVEIRA, R.V.; HOLGADO, L.A.; NARY FILHO, H.; RIBEIRO, D.A.; MATSUMOTO, M.A. Immunoexpression of Cbfa-1/Runx2 in sinus lift procedures using bone substitutes in rabbits. **Clin Oral Impl Res**, 21:584–590, 2010.
- OLIVEIRA, P.; RIBEIRO, D.A.; FAVARO-PIPI, E.; DRIUSSO, P.; PARIZOTTO, N.A.; RENNO, A.C.M. Low level laser therapy does not modulate the outcomes of a highly bioactive glass–ceramic (Biosilicate®) on bone consolidation in rats. **J Mater Sci: Mater Med.**, 2009.
- ORTIZ, M.C.S.; CARRINHO, P.M.; SANTOS, A.A.S.; GOLÇALVES, R.C.; PARIZOTTO, N.A. Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades – parte 1. **Fisio Brasil**, 2:221-40, 2001.
- OTREMSKI, I.; IRGA, D.; EDELSTEIN, S.; ORNOY, A.; NEWMAN, R. Does Laser Irradiation Effect Fracture Healing? **Med Laser Appl.**, 19:146–49, 2004.
- 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.
- PEREIRA, A. N.; EDUARDO, C.P.; MATSON, E.; MARQUES, M.M. Effect of Low-Power Laser Irradiation on Cell Growth and Procollagen Synthesis of Cultured Fibroblasts. **Lasers Surg Med**, 31:263–267, 2002.
- PHILLIPS, A.M. Overview of the fracture healing cascade. **Injury**, 2005.
- PICKERING, S.A.W.; SCAMMELL, B.E. Electromagnetic Fields for Bone Healing. **Lower Extremity Wounds**, p.152-60, 2002.
- PINHEIRO, A.L.B. et al. Biomodulatory effects of LLLT on bone regeneration. **Laser Therapy**, 13:73-79, 2001.
- PIRES-OLIVEIRA, D.A.A.; OLIVEIRA, R.F.; MACHADO, A.H.A.; ZANGARO, R.A.; PACHECO-SOARES, C. Laser Biomodulation on L 929 Cell Culture. **Photomed Laser Surg**. 28: 167–171, 2010.
- PRETEL, H.; LIZARELLI, R.F.Z.; RAMALHO, L.T.O. Effect of low-level laser therapy on bone repair: histological study in rats. **Lasers Surg Med**. 39:788–796, 2007.
- RATNER, B.D. **Biomaterials science**: an introduction to materials in medicine. 2 ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2004.
- 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.

RENNO, A.C.; DE MOURA, F.M.; DOS SANTOS, N.S.; TIRICO, R.P.; BOSSINI, P.S.; PARIZOTTO, N.A. Effects of 830-nm laser, used in two doses, on biomechanical properties of osteopenic rat femora. **Photomed Laser Surg**, 24:202-6, 2006.

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

RENNO, A.C.M.; McDONNELL, P.A.; PARIZOTTO, N.A.; LAAKSO, E-L. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation *in vitro*. **Photomed Laser Surg**, 25:275-80, 2007.

REYES, L.C.V. **Aplicação de im vidro bioativo em tíbias de coelhos**. (Mestrado em Bioengenharia) Departamento de Interidades Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

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

ROSE, F.R.; CYSTER, L.A.; GRANT, D.M.; SCOTCHFORD, C.A.; HOWDLE, S.M.; SHAKESHEFF, K.M. In vitro assessment of cell penetration into porous hydroxyapatite scaffolds with a central aligned channel. **Biomaterials**. 25:5507-14, 2004.

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

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

SANDOVAL-ORTIZ, M.C. **Efeito do laser de baixa potência sobre o processo inflamatório articular de coelhos**. 2001. 161 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

SCHINDELER, A.; MCDONALD, M.M.; BOKKO, P.; LITTLE, D.G. Bone remodeling during fracture repair: The cellular Picture. **Semin Cell Dev Biol**, v.19, p.459-466, 2008.

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

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

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

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

SOUZA NUNES, L.S.S.; Oliveira, R.V.; Holgado, L.A.; Nary Filho, H.; Ribeiro, D.A.; Matsumoto, M.A. Immunoexpression of Cbfa-1/Runx2 in sinus lift procedures using bone substitutes in rabbits. **Clin. Oral Impl. Res.** 21:584–590, 2010.

STEIN, A.; BENAYAHU, D.; MALTZ, L.; ORON, U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts *in vitro*. **Photomed Laser Surg**, 23:161-6, 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.**, 120:112-117, 2008.

TADAKUMA, T. Possible application of the laser in immunobiology. *Keio J. Med.* v.42: 180-182, 1993.

TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. **Cir. Res.** v.88: 877-887, 2001.

TORRES, C.S.; SANTOS, J.N.; MONTEIRO, J.S.C.; AMORIM, P.G.M.; PINHEIRO, A.L.B. Does the Use of Laser Photobiomodulation, Bone Morphogenetic Proteins, and Guided Bone Regeneration Improve the Outcome of Autologous Bone Grafts? An *in Vivo* Study in a Rodent Model. **Photomed Laser Surg**, 2008.

VAES, B.L.; DUCY, P.; SIJBERS, A.M.; HENDRIKS, J.M.; VAN SOMEREN, E.P.; JONG, N.G.; VAN DEN HEUVEL, E.R.; OLIJVE, W.; VAN ZOELLEN, E.J.; DECHERING, K.L. Microarray analysis on Runx-2 deficient mouse embryos reveals novel Runx-2 functions and target genes during intramembranous and endochondral bone formation. **Bone.** 39:724-738.2006.

VANE, J.R.; BAKHLE, Y.S.; BOTTING, R.M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.** v.38. p.97-120, 1998.

VICTORIA, G.; PETRISOR, B.; DREW, B.; DICK, D. Bone stimulation for fracture healing: What's all the fuss?. **IJO**, 2009.

VITALE-BROVARONE, C.; VERNÉ, E.; ROBIGLIO, L.; APPENDINO, P.; BASSI, F.; MARTINASSO, G.; MUZIO, G.; CANUTO, R. Development of glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering: characterization, proliferation of human osteoblasts and nodule formation. **Acta Biomater**, 2006.

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

WERNECK, C.E.; PINHEIRO, A.B.; PACHECO, M.T.T.; SOARES, C.P.; CASTRO, J.L.F. Laser Light Is Capable of Inducing Proliferation of Carcinoma Cells in Culture: A Spectroscopic *in Vitro* Study. **Photomed Laser Surg.** 23:300–303, 2005.

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

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

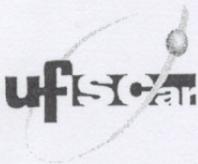
ZANOTTO et al. FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS; UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Process and compositions for preparing particulate, bioactive or resorbable biosilicates for use in the treatment of oral ailments. Int. C. C03C10/00, 20 Feb. 2004, WO2004/074199.

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

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

## 9. ANEXOS

### 9.1 ANEXO 1



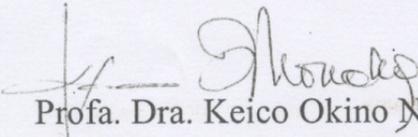
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**Comissão de Ética em Experimentação Animal**  
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676  
Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110  
Fax: (016) 3361.3176  
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil  
[propp@power.ufscar.br](mailto:propp@power.ufscar.br)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

---

Protocolo CEEA nº 002/2009

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

São Carlos, 17 de março de 2009.



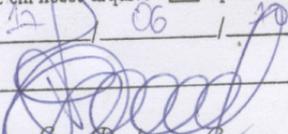
**Profa. Dra. Keico Okino Nonaka**  
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal



Universidade Federal de São Carlos  
Pró-Reitoria de Pesquisa

Certifico que esta cópia confere com o documento original  
 existente em nosso arquivo  apresentado.

São Carlos, 17 / 03 / 2009



**Edson Luiz Rodrigues Cruz**  
Assistente em Administração

## 9.2 ANEXO 2

## FICHA ANÁLISE HISTOLÓGICA

**Presença de infiltrado inflamatório:**

<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Leve	<input type="checkbox"/> Moderado (cerca de 50% da região da lesão)	<input type="checkbox"/> Abundante
----------------------------------	-------------------------------	---	------------------------------------

OBS: \_\_\_\_\_

**Presença de tecido de granulação:**

<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Leve	<input type="checkbox"/> Moderado (cerca de 50% da região da lesão)	<input type="checkbox"/> Abundante
----------------------------------	-------------------------------	---	------------------------------------

OBS: \_\_\_\_\_

**Presença de tecido ósseo neoformado:**

<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Leve	<input type="checkbox"/> Moderado (cerca de 50% da região da lesão)	<input type="checkbox"/> Abundante
----------------------------------	-------------------------------	---	------------------------------------

OBS: \_\_\_\_\_

**Organização tecidual:**

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

OBS: \_\_\_\_\_

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

<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Leve	<input type="checkbox"/> Moderado (cerca de 50% da região da lesão)	<input type="checkbox"/> Abundante
----------------------------------	-------------------------------	---	------------------------------------

## 9.3 ANEXO 3

## FICHA ANÁLISE HIMUNOHISTOQUÍMICA

**Campo 1****Células ósseas**

<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Leve	<input type="checkbox"/> Moderado (cerca de 50% da região da lesão)	<input type="checkbox"/> Abundante
----------------------------------	-------------------------------	---	------------------------------------

OBS: \_\_\_\_\_

**Matriz extracelular**

<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Leve	<input type="checkbox"/> Moderado (cerca de 50% da região da lesão)	<input type="checkbox"/> Abundante
----------------------------------	-------------------------------	---	------------------------------------

OBS: \_\_\_\_\_

**Campo 2****Células ósseas**

<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Leve	<input type="checkbox"/> Moderado (cerca de 50% da região da lesão)	<input type="checkbox"/> Abundante
----------------------------------	-------------------------------	---	------------------------------------

OBS: \_\_\_\_\_

**Matriz extracelular**

<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Leve	<input type="checkbox"/> Moderado (cerca de 50% da região da lesão)	<input type="checkbox"/> Abundante
----------------------------------	-------------------------------	---	------------------------------------

OBS: \_\_\_\_\_

**Campo 3****Células ósseas**

<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Leve	<input type="checkbox"/> Moderado (cerca de 50% da região da lesão)	<input type="checkbox"/> Abundante
----------------------------------	-------------------------------	---	------------------------------------

OBS: \_\_\_\_\_

**Matriz extracelular**

<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Leve	<input type="checkbox"/> Moderado (cerca de 50% da região da lesão)	<input type="checkbox"/> Abundante
----------------------------------	-------------------------------	---	------------------------------------

OBS: \_\_\_\_\_