

**UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA
REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL**

OSMAR JOSÉ FERREIRA

**EFEITOS SISTÊMICOS E LOCAL DA FOTOBIMODULAÇÃO (660nm) NA
REPARAÇÃO ÓSSEA EM RATOS**

ARARAQUARA-SP, 2019

OSMAR JOSÉ FERREIRA

**EFEITOS SISTÊMICOS E LOCAL DA FOTOBIMODULAÇÃO (660nm) NA
REPARAÇÃO ÓSSEA EM RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto
Orientador

ARARAQUARA-SP
2019

FICHA CATALOGRÁFICA

F442e Ferreira, Osmar José

Efeitos sistêmicos e local da fotobiomodulação (660nm) na reparação óssea em ratos/Osmar José Ferreira. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2019.

40f.

Dissertação (Mestrado)- Curso de Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal – Universidade de Araraquara

Orientador: Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto

1. Terapia com luz de baixa intensidade. 2. Osteogênese.
3. Tomografia micro-computadorizada. 4. Colágeno. 5. ILIB. I. Título.

CDU 577.1:66



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA REGENERATIVA
E QUÍMICA MEDICINAL – PPGB-MROM

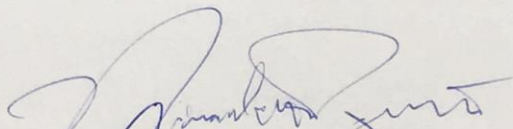


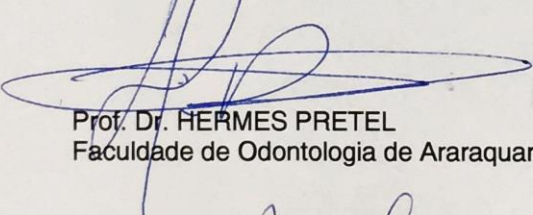
OSMAR JOSÉ FERREIRA

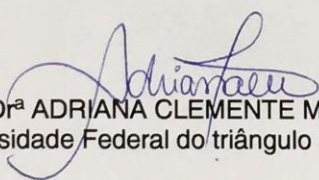
Dissertação apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 25 de fevereiro de 2019.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. NIVALDO ANTONIO PARIZOTTO (Orientador)
Universidade de Araraquara - UNIARA


Prof. Dr. HERMES PRETEL
Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP


Prof.ª Dr.ª ADRIANA CLEMENTE MENDONÇA
Universidade Federal do triângulo Mineiro em Uberaba/UFTM

Agradecimentos

Gostaria de iniciar agradecendo a Deus, por estar ao meu lado desde que nasci, junto a mim e meus familiares e no nobre trabalho de proteção realizado durante todo o período de estudo do mestrado em minhas viagens de motocicleta de Ribeirão Preto para Araraquara.

Agradecer aos meus pais, que diante de toda a limitação oferecida pela criação deles por parte de meus avós, nunca deixaram de me apoiar em todos os desafios ao qual me propuz em realizar, à atenção e também a criação formando meu caráter e minha integridade como homem.

A todo o grupo de estudo do professor Nivaldo, em especial a Glauce, Luvas, Geovana, Miguel, Ana Heloísa, Carla Tim, Cintia Martignago e principalmente ao meu mestre/orientador Nivaldo Antonio Parizotto.

Aos funcionários e professores da Uniara, da UFSCAR, da UNESP de Araraquara e da Embrapa instrumentação em São Carlos que em algum momento me auxiliou no desenvolvimento do trabalho.

Aos professores avaliadores da banca Prof. Dr. Hermes Pretel e Prof. Dra. Adriana Clemente Mendonça pela valiosa colaboração.

Finalmente a minha querida esposa Giovana pela compreensão, paciência, parceria, amor, insônias, traumas e também alegrias durante o período de trabalho.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Estatísticas brasileiras sobre acidentes de trânsito obtidas pelo DATASUS
- FIGURA 2** - Fotografia do defeito ósseo realizado na cirurgia
- FIGURA 3** - Fotografia de aplicação de Laser GL, GT e GP
- FIGURA 4** - Fotografia de aplicação de Laser GT
- FIGURA 5** - Fotografia de aplicação de Laser GP
- FIGURA 6** - Lâminas coradas com HE (5 campos) 5 dias
- FIGURA 7** - Lâminas coradas com HE (5 campos) 10 dias
- FIGURA 8** - Esquema da análise morfométrica para utilização de campos histológicos
- FIGURA 9** - Fotomicrografia das lâminas coradas com Picrosirius Red
- FIGURA 10** - Imagem da análise Micro-CT demonstrando a região de interesse ROI
- FIGURA 11** - Fotomicrografia das lâminas HE dos campos centrais 5 dias
- FIGURA 12** - Fotomicrografia das lâminas HE dos campos centrais 10 dias
- FIGURA 13** - Gráfico das médias das células ósseas 5 e 10 dias
- FIGURA 14** - Gráfico do percentual de preenchimento da matriz colagênica
- FIGURA 15** - Grupo controle (GC) e grupo local (GL) com seus subgrupos 5 dias e 10 dias
- FIGURA 16** - Grupo controle (GT) e grupo local (GP) com seus subgrupos 5 dias e 10 dias
- FIGURA 17** - Percentual de preenchimento espacial (%) 5 dias e 10 dias

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

T.I.L.B	Transcutaneous irradiation <i>light</i> of blood
I.L.I.B	Irradiation <i>light</i> intravascular of blood
(GC)	Grupo controle
(GL)	Grupo laser local
(GT)	Grupo laser transcutâneo
(GP)	Grupo laser peritoneal
FGF4	Fator de crescimento Fibroblásico 4
TGFbeta	Fator de transformação de crescimento beta
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
COX2	Ciclo-oxigenase 2
SUS	Sistema Unico de Saúde
BMPs	Proteínas Morigogênicas Ósseas
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
OC	Osteocalcina
IGF	Fator de crescimento insulínico
FGF	Fator de crescimento Fibroblásico
ANG	Angiopoitina
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
FBM	Fotobiomodulação
LLLT	Low level laser therapy
ALP	Proteína fosfatase alcalina
DNA	Ácido desoxi-ribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MC3T3-E1	Mouse osteoblastic cells type 3
MAPK-ERK	Mitogen-activated protein Kinase - extracellular-signal-regulated kinase
URSS	União das Repúblicas Socialistas Soviéticas
SOD	Superóxido dismutase
mg/Kg	micrograma por kilograma
mm	milímetro
cm	centímetro
mW	miliwatt
J/cm ²	Joule por centímetro quadrado
J	Joule

Nupen	Núcleo de Pesquisa e Ensino
MicroCT	microtomografia computadorizada de alta definição
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
µm	micrometro
H.E.	Hematoxilina-Eosina
KV	KiloVolt
µA	MicroAmpére
ROI	Região de Interesse
BV/TV	Bone Volume / Total Volume
nm	nanômetro
O2	Oxigênio
CEUA	Comitê de Ética para o Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional dos Comitês de Ética de Uso dos Animais
RPM	Rotações por minuto

SUMÁRIO

Resumo	I
Abstract	II
1. Introdução	1
2. Objetivos	4
3. Revisão da Literatura	5
3.1 Fotobiomodulação.....	5
3.2 FBM sistêmico.....	7
3.3 Peritônio.....	8
4. Materiais e Métodos	10
4.1. Animais	10
4.2. Procedimento Cirúrgico	10
4.3. Delineamento Experimental	11
4.4. Terapia Laser de Baixa Intensidade (Fotobiomodulação)	12
4.5. Coleta e Preparação das Amostras	15
4.6. Análise Histopatológica Descritiva	16
4.7. Análise Morfométrica	17
4.8. Análise Quantitativa do Colágeno.....	18
4.9. Microtomografia computadorizada de alta resolução (Micro-CT)	19
4.10. Análise estatística.....	20
5. Resultados	21
5.1. Análise Histopatológica Descritiva.....	21
5.2. Análise Morfométrica.....	23
5.3. Análise Quantitativa do Colágeno.....	23
5.4. Microtomografia computadorizada de alta resolução (Micro-CT).....	24
6. Discussão	28

7. Conclusão	32
8. Perspectivas Futuras.....	32
9. Referências Bibliográficas	33
Anexo I	39
Anexo II	40

RESUMO

Osmar José Ferreira. Efeitos sistêmicos e local da fotobiomodulação (660nm) na reparação óssea em ratos.

Avaliou-se comparativamente a ação da fotobiomodulação (FBM) por Laser de baixa intensidade de 660 nm na síntese de matriz óssea após lesão induzida em tibias de ratos com aplicação local para compará-las ao resultado da aplicação do mesmo laser sobre a corrente sanguínea de forma transcutânea (TILB) e a aplicação na região do peritônio. Foram utilizados 48 ratos Wistar adultos pesando em média 280 gramas distribuídos em 4 grupos iniciais; grupo controle (GC), grupo laser local 2J (GL) e grupo laser transcutâneo 90J (GT) e o grupo peritoneal 12J (GP) e subdivididos em 5 e 10 dias de eutanásia. Todos animais tiveram em suas tíbias um defeito ósseo para induzir uma fratura no córtex do osso e iniciaram as aplicações de laser imediatamente após a sutura. As aplicações de laser foram diárias, com as primeiras eutanásias ocorrendo com 5 dias (5 aplicações) após a cirurgia e a segunda ocorrendo no décimo dia (10 aplicações). Foram realizadas as coletas e preparações das amostras para análise histopatológica qualitativa e morfometria do número de células ósseas com destaque em 5 dias para o maior número destas, tecido de granulação, maior neoformação óssea, além da maior presença de colágeno nos animais tratados por 10 dias. Aos 10 dias, destacam-se os seguintes resultados: número de células ósseas de $181 \pm 29,8$ para o GC, $313,5 \pm 77,66$ para o grupo GL, $326,7 \pm 20,53$ para o grupo GP e $353,8 \pm 27,8$ para o GT. Para a análise quantitativa do colágeno no décimo dia de tratamento $7,80 \pm 1,279$ para o GC, $8,73 \pm 1,442$ para o GL, $10,89 \pm 1,123$ para o GP e $29,01 \pm 2,496$ para o GT. Além disso, na análise com microtomografia computadorizada de alta resolução aos 10 dias de tratamento, o valor de preenchimento ósseo sobre a área total da área de interesse, a média dos grupos tratados (GL, GP e GT) foi de 24% contra 17,25% do GC. Conclui-se que houve uma aceleração da osteogênese em todos os tratamentos realizados (GL, GP e GT) em relação ao controle, além de formação de matriz colagênica e número de células que variaram dependendo do local de aplicação da luz nas diversas regiões teciduais.

Palavras-Chave: Terapia com Luz de Baixa Intensidade, Osteogênese, Tomografia Micro-Computadorizada, Colágeno, ILIB.

ABSTRACT

Osmar José Ferreira. **Systemic and local effects of photobiomodulation (660nm) on bone repair in rats.**

Comparison of low-intensity 660 nm laser photobiomodulation (PBM) in bone matrix synthesis after injury induced in tibia of rats with local application was performed to compare them with the result of applying the same laser to the bloodstream of (TILB) and the application in the peritoneum region. We used 48 adult Wistar rats weighing on average 280 grams distributed in 4 groups: control group (CG), local laser group 2J (GL) and transcutaneous laser group 90J (GT) and peritoneal group 12J (GP) and subdivisions at 5 and 10 days of euthanasia. All animals had a bone defect in their tibia to induce fracture in the cortex of the bone and started the laser applications immediately after suture. Laser applications were daily, with the euthanasia was done with 5 days (5 applications) after the surgery and on the tenth day (10 applications). Samples were collected and prepared for qualitative histopathological analysis and morphometry of the number of bone cells with prominence in 5 days for the highest number of bone cells, granulation tissue, greater bone neoformation, and greater presence of collagen in the animals treated for 10 days. At 10 days, the following results were observed: number of bone cells from 181 ± 29.8 for GC, 313.5 ± 77.66 for GL group, 326.7 ± 20.53 for GP group and 353.8 ± 27.8 for GT. For the collagen quantitative analysis on the tenth day of treatment, 7.80 ± 1.279 for GC, 8.73 ± 1.442 for GL, 10.89 ± 1.123 for GP and 29.01 ± 2.496 for GT. Moreover, in the high resolution computerized microtomography analysis at 10 days of treatment, the bone filling value over the total area of interest of the treated groups (GL, GP and GT) was the average 24% versus 17.25% of GC. It was concluded that there was an acceleration of osteogenesis in all treatments (GL, GP and GT) in relation to the control, in addition to the formation of collagen matrix and number of cells that varied depending on the location of light in the various tissue regions.

Keywords: Low Level Light therapy, Osteogenesis, Micro-Computed Tomography, Collagen, ILIB.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil temos um Sistema Único de Saúde (SUS) que está sobrecarregado e tem ausência de financiamento adequado por vários motivos, porém alguns fatores que podemos destacar justificam a investigação e a possível solução de algumas respostas para a antecipação no processo de calcificação óssea. Com o aumento dos acidentes automobilísticos, principalmente com motocicletas, nas grandes áreas urbanas, vários cidadãos em plena fase produtiva têm ficado um grande tempo em tratamento e com isso, perdido um tempo profissional valioso que acarreta uma grande oneração ao Estado (Figura 1), bem como a diminuição de geração de renda. Com isso, se faz necessário a produção científica com objetivo de fornecer respostas que gerem menos sofrimento, despesas e retorno mais rápido ao mercado de trabalho do paciente por meio de terapêuticas que acelerem o processo de regeneração óssea.

FIGURA 1 - Estatísticas brasileiras sobre acidentes de trânsito obtidas pelo DATASUS.



Fonte: http://www.vias-seguras.com/os_acidentes/estatisticas/estatisticas_nacionais/estatisticas_do_ministerio_da_saude

A reparação óssea é um processo complexo, onde a interação de eventos biológicos determina a restauração da integridade do tecido ósseo (BUCKWALTER et al., 2007; ORYAN et al., 2015). Assim, a ossificação inicia-se imediatamente após a fratura óssea, na qual ocorre a destruição de matriz, morte celular, rompimento do perióstio e do endóstio. Vasos sanguíneos do tecido ósseo e dos tecidos moles

adjacentes são rompem-se e ocasionam hemorragia, resultando na formação de um coágulo no local da lesão (GUARTNER e HIATT, 2003). Estes coágulos sanguíneos induzem a sinalização de vários fatores moleculares como os de crescimento e angiogênicos, que por sua vez ativam a migração de células inflamatórias e conseqüentemente infiltram no coágulo e iniciam a degradação do tecido necrosado (HING, 2004; ECKARDT et al, 2005; LU et al, 2006).

Logo em seguida, ocorre a chegada de células mesenquimais que se diferenciam em fibroblastos, condroblastos e osteoblastos. Estas células são responsáveis pela formação do tecido de granulação, calo ósseo não mineralizado e, posteriormente, pela formação do tecido ósseo (MARSELL e EINHORN, 2011). Finalmente neste processo de reparo inicia-se o processo de remodelamento, caracterizado pela reestruturação do calo ósseo, formação de tecido ósseo mineralizado, reconstrução do canal medular e restauração óssea (ORYAN et al., 2015).

Essa seqüência de eventos requer a ação de diferentes células (macrófagos, fibroblastos, condrócitos, osteoblastos, osteoclastos) que são recrutadas para o sítio de lesão, onde expressam a ativação de genes, síntese de proteínas e fatores de transcrição e crescimento que controlam a produção e organização da matriz e estimulam a formação de novos vasos sanguíneos (SENA et al., 2005; CLAES e WILLIE, 2007; KAYAL et al., 2009). Podemos destacar: proteínas morfogênicas ósseas (BMPs) (KLOTING et al., 2005; YAOITA et al., 2000), fator de transformação de crescimento beta (TGF- β), RUNX-2 (do inglês "Runt-related transcription factor 2") (RATH et al., 2008), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), osteocalcina (OC) (SONG et al., 2006; YAOITA et al., 2000), fator de crescimento insulínico (IGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF), angiopoitina (ANG) e fator de crescimento endotelial (VEGF) (SCHINDELER et al., 2008; TSIRIDIS et al., 2007).

As BMPs e o TGF- β apresentam uma gama de funções celulares tais como recrutar células osteoprogenitoras para o local da lesão (CANALIS et al., 2003; CHEN et al., 2014; AGAS et al., 2013). Assim como, o RUNX-2 é um fator de transcrição importante no processo de osteogênico durante o desenvolvimento esquelético e também associa-se a proliferação de osteoblastos, desenvolvendo assim, um papel importante na formação óssea (STEIN et al., 2005; ZIROS et al., 2008). O PDGF é liberado pelas plaquetas e estimula a quimiotaxia dos macrófagos e assim como as BMPs, TGF- β and RUNX-2 que estimulam a diferenciação de osteoblastos (PHILLIPS,

2005). A OC é sintetizada e secretada por osteoblastos maduros e osteócitos, sendo utilizado como marcador da atividade osteoblástica (ZHANG et al., 2002). A proliferação de fibroblasto e condrócitos é estimulada pelos genes FGF, IGF, TGF- β e PDGF (SCHINDELER et al., 2008).

O desenvolvimento da angiogênese é regulado principalmente por duas vias moleculares, a ANG e através do VEGF (TSIRIDIS et al., 2007). A expressão de ANG é induzida precocemente na cascata de cicatrização sugerindo a promoção de uma resposta vascular inicial (LEHMANN et al., 2005). A outra via é o VEGF, um dos mais importantes fatores de crescimento endotelial e indutor da angiogênese (HANKENSON et al., 2011). A presença de novos vasos sanguíneos fornece um nível apropriado de oxigênio e também o suporte de células osteoprogenitoras responsáveis pelo reparo ósseo (PACICCA et al., 2003).

Existem alterações que podem interferir neste processo de reparo ósseo que envolve um grande número de ações celulares e moleculares para proporcionar um estado normal de regeneração, tais como suprimento sanguíneo insuficiente, presença de tumor ósseo, presença de infecção, utilização de medicação anti-inflamatória, entre outros fatores que irão culminar na deficiência da regeneração e conseqüentemente, no atraso da consolidação e até mesmo na não união óssea (SENA et al., 2005; MARSELL e EINHORN, 2010).

A FBM através do laser tem se mostrado eficiente em regeneração de tecidos ósseos (BOSSINI et al., 2012; TIM et al., 2013), em culturas de células ósseas de modelos experimentais de fraturas (SILVA e CAMILLI, 2006; RENNÓ et al., 2007; BOUVET-GERBETTAZ et al. 2009; FERNANDES et al., 2013) e também em fraturas de modelos experimentais em animais (FÁVARO-PIPI et al., 2011; FERNANDES et al., 2013; SELLA et al., 2015).

Portanto, há necessidade de desenvolvimento de novas tecnologias, de novos tratamentos ou até mesmo oferecer novas vias de administração capazes de melhorar e ou acelerar o o processo de reparo ósseo. Um tratamento promissor é o uso da fotobiomodulação (FBM) por Terapia Laser de Baixa Intensidade (LLLT) no tratamento de fraturas com deficiência na consolidação óssea (OLIVEIRA et al., 2009; BOSSINI et al., 2012).

2. OBJETIVO

Comparar a ação da FBM com laser 660 nm sobre a reparação óssea com aplicação local e também por meio da aplicação à distância (sistêmica) via transcutânea na corrente sanguínea (TILB e peritoneal) por meio das análises histopatológicas e micro-CT.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Fotobiomodulação

A FBM por LLLT é uma tecnologia terapêutica segura e efetiva que tem demonstrado resultados positivos em várias enfermidades e lesões, com múltiplos relatos de efeitos clínicos, dentre estes a cicatrização de tecidos moles (CHEN et al., 2014; PATROCÍNIO-SILVA et al., 2014) e também do osso (BOSSINI et al., 2012; TIM et al., 2013; RODRIGUES et al., 2013). Os seus efeitos nos tecidos biológicos podem ser explicados pela absorção da luz por moléculas fotorreceptoras localizadas nas células, chamadas cromóforos (DORTBUDAK, 2000). Uma vez absorvida, a energia da luz é convertida em energia fotoquímica (KARU e KOLYAKOV, 2005) e isso ocorre principalmente em nível de interação molecular, conectadas as alterações dos parâmetros de homeostase celular (pH, concentração de Ca^{+2} , ATP e outros), gerando resultados imediatos após a irradiação. Isto gera a ocorrência de possíveis mudanças na taxa de síntese de DNA e RNA, alterações na taxa de consumo de O_2 e alteração do potencial de membrana (BAXTER, 1997; KARU e KOLYAKOV, 2005). Estas alterações podem estimular a taxa respiratória celular e a síntese de ATP (KARU, 1999). A ativação da cadeia respiratória pela irradiação gera um gradiente de prótons na membrana mitocondrial que atua como um sinal iniciador para a proliferação celular. Com isso, serão geradas as respostas indiretas do laser nos tecidos. Entre essas respostas podemos destacar os efeitos anti-inflamatório, analgésico e cicatrizante (KARU e KOLYAKOV, 2005).

Com relação ao efeito de cicatrização, vários artigos evidenciam que a FBM pode estimular o metabolismo tecidual e a proliferação celular, justificando os resultados positivos da sua aplicação em processos de reparo após uma lesão (PINHEIRO et al., 2001, VLADIMIROV et al., 2004; NINOMIYA et al., 2007). Uma série de estudos apresentados sugerem que a FBM promova o aumento da síntese de colágeno, aumento da proliferação e diferenciação de osteoblastos e fibroblastos, (OZAWA et al., 1998; VLADIMIROV et al., 2004; NINOMIYA et al., 2007), estimulação da angiogênese, aumento do recrutamento de macrófagos e da atividade fagocitária, o que pode resultar na aceleração do reparo de tecidos (ORTIZ et al., 2001; LIRANI-GALVÃO et al., 2006; BOSSINI et al., 2009).

Devido aos diversos efeitos excitatórios apresentados pela FBM, muitos autores vêm investigando a ação desta tecnologia no tecido ósseo, principalmente em culturas de células ósseas e em modelos experimentais de fraturas (SILVA e CAMILLI, 2006; RENNÓ et al., 2007; BOUVET-GERBETTAZ et al. 2009; FERNANDES et al., 2013). Em estudos *in vitro* com células osteoblásticas, a FBM evidenciou um aumento da proliferação e diferenciação celular através da estimulação da expressão dos genes RUNX-2 e BMP-2 (BOUVET-GERBETTAZ et al., 2009), também estimulou a atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP) e da expressão do mRNA da osteopontina (STEIN et al., 2005). Em 2007, Rennó et al., avaliaram os efeitos da FBM em culturas de osteoblastos e evidenciaram que esta terapia aumenta significativamente a proliferação celular e a atividade da ALP. Da mesma forma, Aleksic et al., (2010) relataram que a FBM aumentou a proliferação de osteoblastos da linhagem MC3T3-E1 por meio da ativação da via de sinalização MAPK-ERK. Ainda, Pyo et al., (2013) mostraram que a FBM induz a expressão gênica de BMP-2, osteocalcina e TGF- β 1 em culturas de células osteoblásticas cultivadas 1 % de hipóxia.

Os benefícios da FBM também são evidenciados em estudos com fraturas em modelos animais (BOSSINI et al., 2012; FERNANDES et al., 2013; SELLA et al., 2015). Fávaro-Pipi et al., (2011), usando um modelo experimental de defeito ósseo tibial, demonstraram que os animais tratados com FBM apresentaram aumento da expressão do mRNA de BMP-4, ALP e RUNX-2 e ainda, maior área de tecido ósseo neoformado. Similarmente, Da Silva et al. (2012), investigaram o efeito da FBM em osteoblastos derivados da sutura mediana palatina de ratos após expansão rápida da maxila, no qual observou-se o aumento da atividade de ALP, aumento da mineralização e da expressão de mRNA de ALP, RUNX2, osteocalcina, colágeno tipo I e sialoproteína.

Outros artigos analisaram os efeitos da FBM no tecido ósseo, Fernandes et al., (2013) observaram que esta terapia foi capaz de modular o processo inflamatório e induzir a expressão gênica de ALP, OC e RUNX-2 que pode ter contribuído para acelerar o reparo ósseo nos estágios iniciais da consolidação. Além disso, Tim et al., (2013) observaram que a FBM acelerou a deposição de tecido ósseo neoformado através da ativação de fatores osteogênicos (COX-2, RUNX-2 e BMP-9) em defeitos tibiais de ratos. Sella et al., (2015), investigaram os efeitos da FBM no reparo ósseo de fratura femorais e evidenciaram que este tratamento aumentou a osteogênese, o que é relevante para o processo de reparo de fraturas e conseqüentemente, pode ser indicada como uma

ferramenta terapêutica adjuvante na prática clínica para o tratamento de lesões com déficit de reparo. Por outro lado, estudos clínicos têm investigado os efeitos da FBM no reparo ósseo em humanos. Angeletti et al., (2010) e Cepera et al., (2012) avaliaram os efeitos da FBM após a rápida expansão do maxilar em pacientes e revelaram que a FBM foi capaz de acelerar a reparação óssea. Chen et al., (2014) avaliaram a eficácia da terapia com laser no tratamento de fratura de punho e concluíram que este tratamento pode aliviar a dor e ainda, estimular o processo de consolidação de fraturas ósseas em humanos.

3.2 FBM sistêmico

Com relação a FBM aplicada sistemicamente, foi desenvolvida uma técnica intravenosa através de cateter denominada como Irradiação de Laser Intravascular do Sangue (ILIB em inglês) na antiga URSS na década de 70. O fato de ter que se utilizar de cateter e ser intravenoso nos remete a um ambiente controlado, livre de infecção e todos as outras dificuldades características destes tratamentos. Com a evolução dos lasers, aumento de potência, diversificação nos comprimentos de ondas e novos compostos emissores, iniciou-se o uso da técnica transcutânea, por ser mais seguro e não invasivo. Por não ser intravenoso, levou-nos a criar uma adequação na denominação para TILB (do inglês, *transcutaneous irradiation light of blood*), mais adequada para esta técnica.

Vários estudos demonstram as alterações metabólicas que nos convenceram que poderíamos obter um resultado semelhante quando comparado com a aplicação local. A FBM mostrou gerar alterações sistêmicas promovendo variação dos valores das proteínas séricas evidenciando um dos prováveis mecanismos envolvidos na modulação da resposta inflamatória articular promovida pelo laser (SANDOVAL-ORTIZ et al., 2003). O ILIB irradiado em pacientes com infarto agudo do miocárdio reduziu significativamente os níveis de colesterol total, bem como normalização da atividade da superóxido dismutase [SOD] (NECHIPURENKO et al., 2014), alívio do estresse oxidativo, síntese de ATP celular, peroxidação lipídica e a geração dislipidêmica (SHIH-FONG et al., 2012), também efeito sistêmico de bioestimulação, analgesia, anti-alérgico, anti-tóxico, vasodilatador, anti-arritmico, antibactericida, anti-hipoxia, espasmolítico e anti-inflamatório (MOSHKOVSKA et al., 2005). A maioria destes fatores são características

de melhora do estresse oxidativo de forma ampla no organismo pela FBM, o que permite inferir que poderia haver uma melhora significativa no processo de reparo ósseo.

3.3 Peritônio

Uma estrutura que passou a ser evidenciada em estudos recentes, o peritônio é derivado do mesoderma do embrião. É um tecido seroso e contínuo que recobre a cavidade abdominal formando reflexões sobre os órgãos ali presentes. Esse tecido origina a cavidade peritoneal. Ele possui duas lâminas denominadas de peritônio parietal e peritônio visceral, essas lâminas consistem de mesotélio, um epitélio pavimentoso simples de revestimento. O peritônio parietal possui uma rede de irrigação e inervação proveniente do mesmo local que reveste, portanto é sensível a dor, calor, pressão e frio. O peritônio visceral é a lâmina que recobre os órgãos abdominais e pélvicos em parte. Sendo assim possui a mesma rede linfática, de irrigação sanguínea e nervosa que a parede do órgão que recobre. Entre as lâminas parietal e visceral é considerado um espaço virtual preenchido por líquido que permite a mobilidade entre as camadas e consequentemente dos órgãos aos quais a lâmina visceral está aderida (MOORE; DALLEY; AGUR, 2014).

Mecanicamente a membrana peritoneal contribui para a proteção da cavidade abdominal, formando um ambiente que facilita a resposta ao estresse, de maneira que os órgãos ficam separados uns dos outros e podem deslizar facilmente. O líquido peritoneal além de diminuir o atrito entre as camadas visceral e parietal, permite a troca de nutrientes, remove patógenos e células e permite eventos de reparo. Fatores de crescimento, nutrientes, citocinas e leucócitos são constantemente trocados entre o líquido e o sangue (CAPOBIANCO et al., 2017). Foi também demonstrado experimentalmente, em ratos hipertensos, que a irradiação aguda por fotobiomodulação a 660nm do abdome promoveu um efeito estimulante da produção de óxido nítrico, que por sua vez resultou em consequente redução da pressão arterial (OISHI et al., 2017).

Com a descoberta das funções celulares e dos progenitores das células ósseas, o osso passou a ser melhor compreendido como um tecido vivo dinâmico e com certo metabolismo. A massa óssea compreendida como resultado do equilíbrio constante entre deposição de matriz óssea e reabsorção, tornou a osteoporose centro de atenção entre as doenças que acometem esse tecido (BIANCO, 2015). As fraturas ósseas possuem

elevada prevalência e são de grande relevância para saúde pública brasileira. No Brasil, foram registrados mais de 181 mil casos de fratura de fêmur em pessoas com idade maior ou igual a 60 anos em um período de 2008 a 2012 (SOARES et al., 2014). Além das fraturas ósseas terem aumentado muito em decorrência do envelhecimento das populações de maneira geral, estima-se que em 2050 existirão mais de 2 bilhões de pessoas com mais de 60 anos no mundo (SOARES et al., 2014). Sendo assim, de fato, é necessário o estabelecimento e aprimoramento de técnicas que aprimorem o reparo ósseo (ROBEY et al., 2015).

Levando em consideração que na regeneração óssea é fundamental a presença de fatores como de crescimento celular, angiogênicos, fluxo sanguíneo adequado e um microambiente bem estabelecido. E observando que o líquido peritoneal possui constante comunicação com o sangue e é local de passagem de células como macrófagos que produzem fatores de crescimento, bem como possui uma grande rede vascular capaz de absorver a luz pelo sangue localizado nesta região. Acreditamos que através da terapia com FBM de baixa intensidade sobre o abdome de ratos, com fraturas padronizadas previamente induzidas, é possível gerar efeitos sistêmicos que contribuam com o reparo ósseo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 48 ratos machos da linhagem Wistar com peso corporal médio de 280 gramas no início do experimento. Os animais foram mantidos no Biotério da Pós-Graduação em Biotecnologia da Uniara, alimentados com ração comercial e água a vontade, mantidos em regime de luz (12 horas claro e 12 horas escuro) e temperatura controlada a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ seguindo os preceitos éticos descritos no Guidelines for Ethical Conduct in the Care and Use of Nonhuman Animals in Research que foi desenvolvido pela American Psychological Association Committee on Animal Research and Ethics in 2010-11, assim como nas instruções do Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA) em sua normativa de 07 de dezembro de 2015, segunda edição. O presente estudo foi submetido a avaliação do Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) da Uniara e aprovado sob número 037-2017 (Anexo I) e número 041-2017 (Anexo II).

4.2 Procedimento Cirúrgico

Para a realização dos defeitos ósseos 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, foi realizada a tricotomia digital e antissepsia da área a ser operada, em seguida efetuada uma incisão no terço proximal da tíbia direita. A lesão foi realizada 10 mm abaixo da articulação do joelho, constantemente irrigada com soro fisiológico, com a utilização de uma broca odontológica para implante helicoidal, ponta plana da marca WF - Cirúrgicos (Brasil), com 2cm de comprimento, 2.0mm de diâmetro externo e acionada por um micromotor da marca BELTEC – Brasil, com rotação de 13.500 rpm, na posição vertical e perpendicular em relação ao eixo longitudinal do osso, de modo a penetrar a cortical medial e danificar o canal medular abaixo desta, porém sem atingir a face contralateral, promovendo um orifício com 2 mm de diâmetro (figura 2).

Em seguida, o tecido muscular e a pele foram suturados com fio de náilon monofilamentar (4.0) à distância de 0,5cm entre os pontos e realizada a antissepsia local.

Os animais foram mantidos em caixas com livre acesso à água e ração até o momento da eutanásia (TIM et al., 2013; BOSSINI et al., 2012).

FIGURA 2 - Defeito ósseo induzido através de cirurgia na tíbia esquerda dos animais.



Fonte: Próprio autor.

4.3 Delineamento Experimental

Após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (n=48):

- Grupo controle (GC): animais submetidos ao defeito ósseo, mas não receberam nenhum tipo de tratamento (n=12).
- Grupo Laser Local (GL): animais submetidos ao defeito ósseo e tratados com LLLT 660nm local (n=12).
- Grupo T.I.L.B. (GT): animais submetidos ao defeito ósseo e tratados com LLLT 660nm com aplicação na corrente sanguínea transcutânea (n=12).

- Grupo Peritoneal (GP): animais submetidos ao defeito ósseo e tratados com LLLT 660nm com aplicação na região peritoneal transcutânea (n=12).

Os quatro grupos foram divididos em 2 subgrupos (compostos por 6 animais cada) de acordo com os períodos de eutanásia no pós-operatório: subgrupo A (eutanásia 5 dias pós-cirurgia); subgrupo B (eutanásia 10 dias pós-cirurgia).

4.4 Terapia Laser de Baixa Intensidade (Fotobiomodulação)

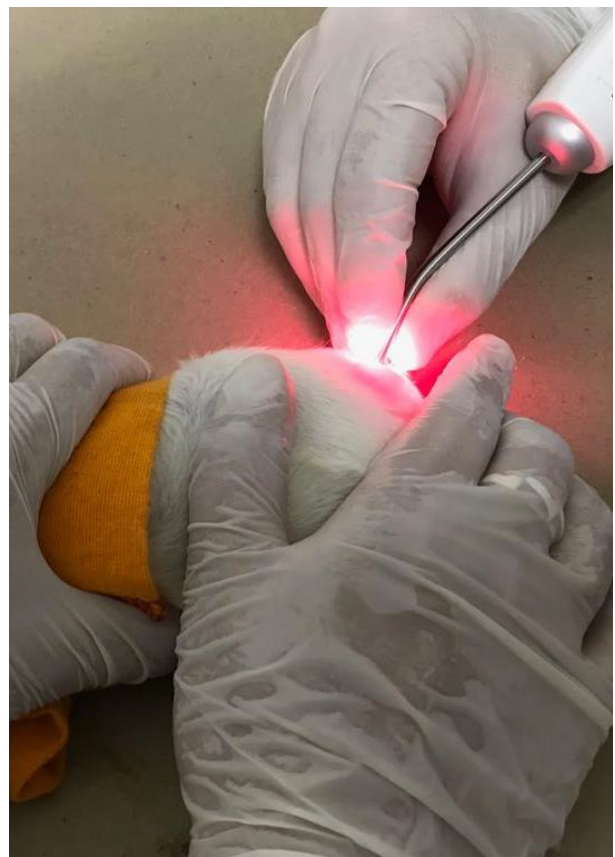
Foi utilizado um modelo portátil de Laser (Therapy ILIB - DMC, São Carlos - Brasil) com comprimento de onda 660 nm, emissão contínua, potência de saída de 100 mW, diâmetro do feixe de 1,0 mm, na fluência de 25 J/cm², de propriedade do autor e foi aferido pelo fabricante no laboratório do NUPEN. O tempo de aplicação para o grupo GL de 20 segundos e energia de 2J (50 J/cm²), no grupo GT foi administrado o Laser com tempo de aplicação de 900 segundos e energia de 90J (2.250 J/cm²), no grupo GP foi administrado 120 segundos com energia total de 12J (300 J/cm²) divididos em 6 pontos de 2J cada.

O protocolo de tratamento com a FBM iniciou-se imediatamente após o procedimento cirúrgico e foram realizados a cada 24 horas, totalizando 5 e 10 sessões, dependendo do período experimental.

Para o grupo GL foi utilizado um único ponto de aplicação sobre o defeito ósseo, o qual foi medido com um paquímetro para padronização do local de aplicação (figura 3). No grupo GT, foi aplicado na base da cauda do animal com posicionamento do aplicador do laser utilizando uma pinça (garra) para vidraria, emitindo luz sobre os vasos que passam na região com o animal contido em saco de confeiteiro do tamanho médio de uso único e a ponta aberta para respiração com uma flanela cobrindo a cabeça do animal para diminuição do possível estresse (figura 4). O tempo de aplicação é elevado para que se permita a recirculação sanguínea do animal. No grupo GP, foi feita aplicação em 6 pontos específicos do abdome do rato, da seguinte maneira: utilizando-se um suporte plástico apropriado que foi encaixado na região do pênis para que pudesse ser feita a padronização desses pontos (figura 5). O primeiro ponto marcado foi na linha Alba, meio centímetro em direção cranial em relação a altura no pênis. O segundo ponto foi marcado um centímetro cranialmente ao primeiro. Os pontos três e quatro foram marcados a um centímetro à direita dos respectivos pontos um e dois. Os pontos cinco e seis foram marcados um centímetro à esquerda dos respectivos pontos um e dois. Dessa maneira,

visamos irradiar o peritônio como um todo. Foi feita tricotomia digital sobre os 6 pontos delimitados anteriormente. Nas aplicações, foi utilizada a técnica pontual em contato, sendo a ponteira do equipamento posicionada perpendicularmente ao tecido e as irradiações realizadas sempre no mesmo horário.

Figura 3 - Aplicação de Laser no modo local sobre a pele sobrejacente a lesão óssea induzida. Notar a aplicação sempre de forma perpendicular ao local irradiado.



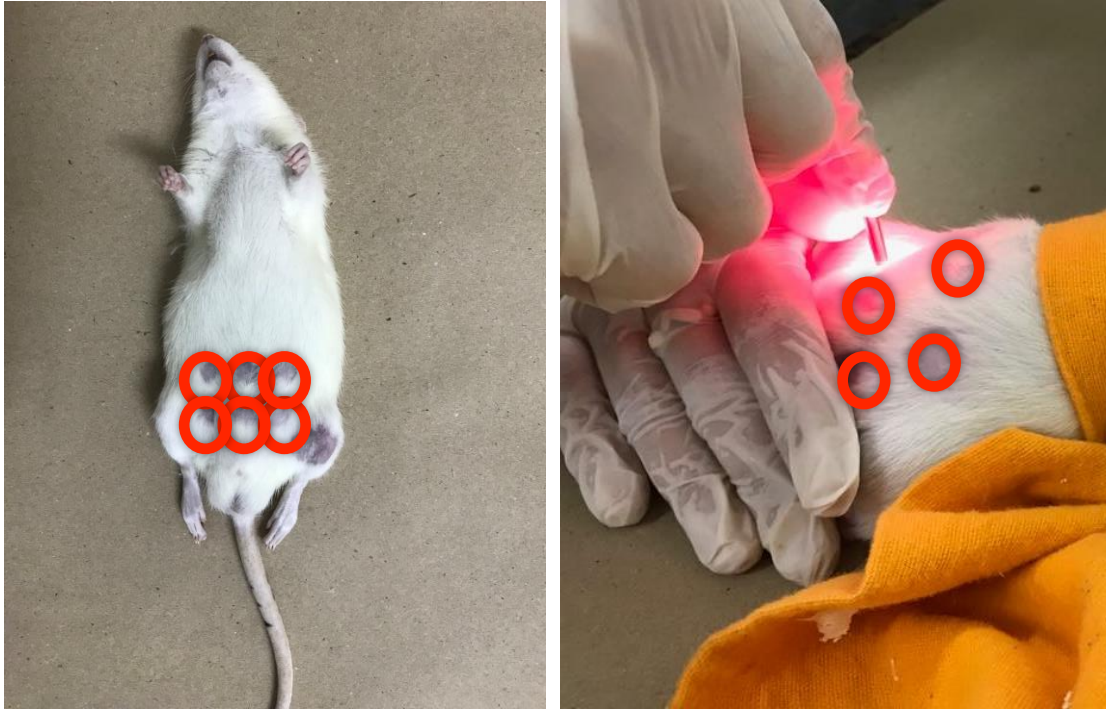
Fonte: Próprio autor.

Figura 4 – Aplicação do laser do grupo T.I.L.B na base da cauda do rato, com animal confinado em saco de plástico com abertura para respiração (confeiteiro descartável). O equipamento ficava fixo num pedestal pelo tempo de irradiação, além de estar sobre a pele sobrejacente à artéria caudal do rato.



Fonte: Próprio autor.

Figura 5 – Aplicação do laser no grupo peritoneal, realizado na região abdominal em seis pontos marcados pela tricotomia manual (círculos vermelhos), irradiação essa realizada com os animais com a cabeça coberta por um tecido, para amenização do estresse do mesmo. Irradiação sempre em 90° em relação à pele.



Fonte: Próprio autor.

4.5 Coleta e Preparação das Amostras

Os animais foram eutanasiados individualmente com aprofundamento anestésico após 5 dias ou 10 dias dependendo do grupo experimental. Após a eutanásia, foi realizada a remoção cirúrgica completa das tíbias, para análise. As tíbias foram utilizadas para análises histológicas e Micro-CT. Após dissecadas, as tíbias foram fixadas em formalina tamponada a 10% por 24 horas, lavadas em água corrente e colocadas em álcool 70% até que todas as amostras chegassem no mesmo estágio para serem levadas para análise em Micro-CT. Ao término da Micro-CT de todas as amostras, as tíbias foram lavadas em água corrente e submetidas à descalcificação em solução de ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) a 10% em água destilada, com trocas de 3 vezes por semana por aproximadamente 60 dias.

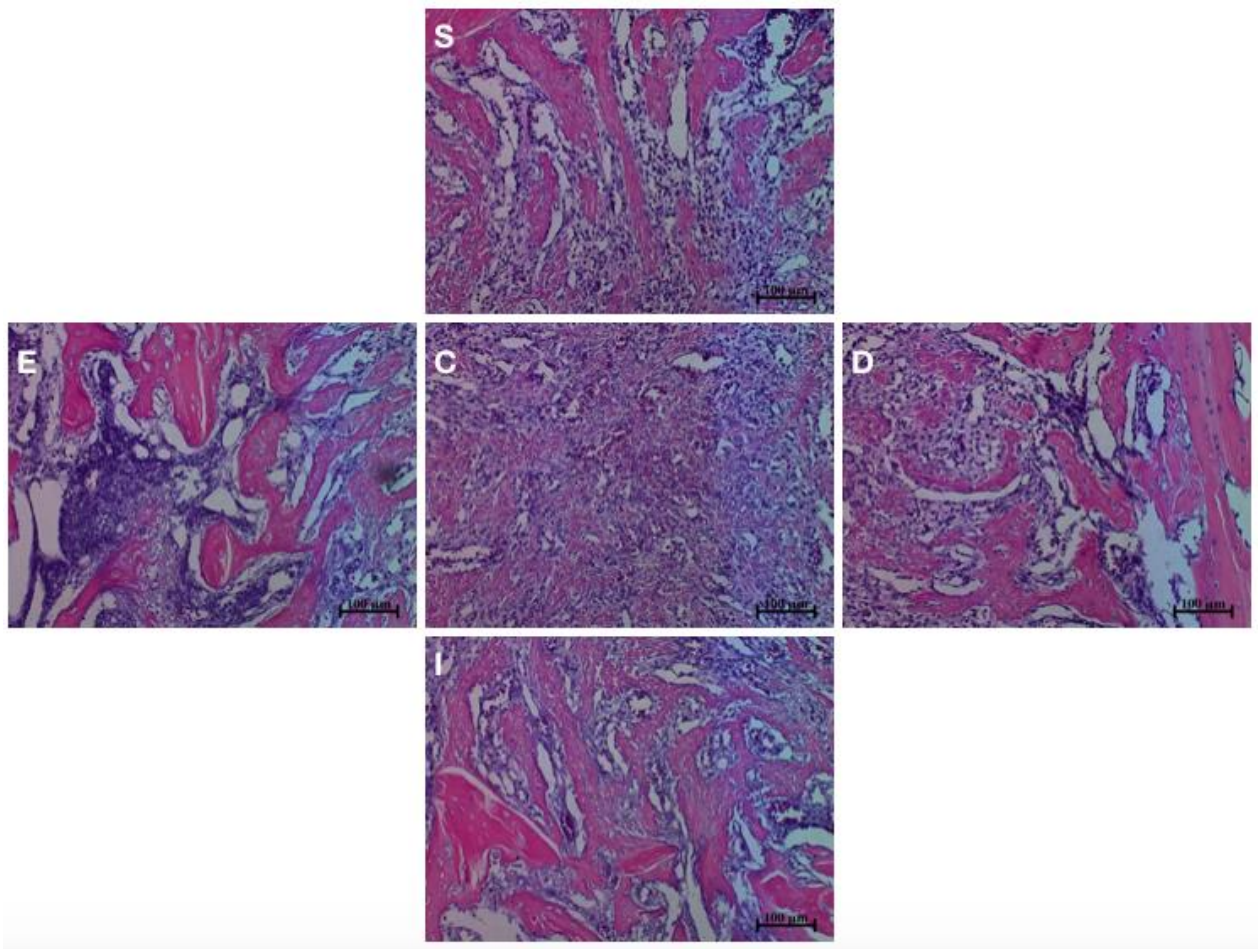
Depois de completada a descalcificação, as amostras foram reduzidas para processamento e para inclusão em parafina. Na sequência, os blocos de parafina foram

cortados longitudinalmente, em relação ao osso, por meio de um micrótomo rotativo numérico (Leica RM—2145, Darmstadt - Germany) obtendo-se cortes semi-seriados com espessura 5µm e corados com Hematoxilina e Eosina (H.E.) e picrosirius red (Merck, Darmstadt - Germany).

4.6 Análise Histopatológica Descritiva

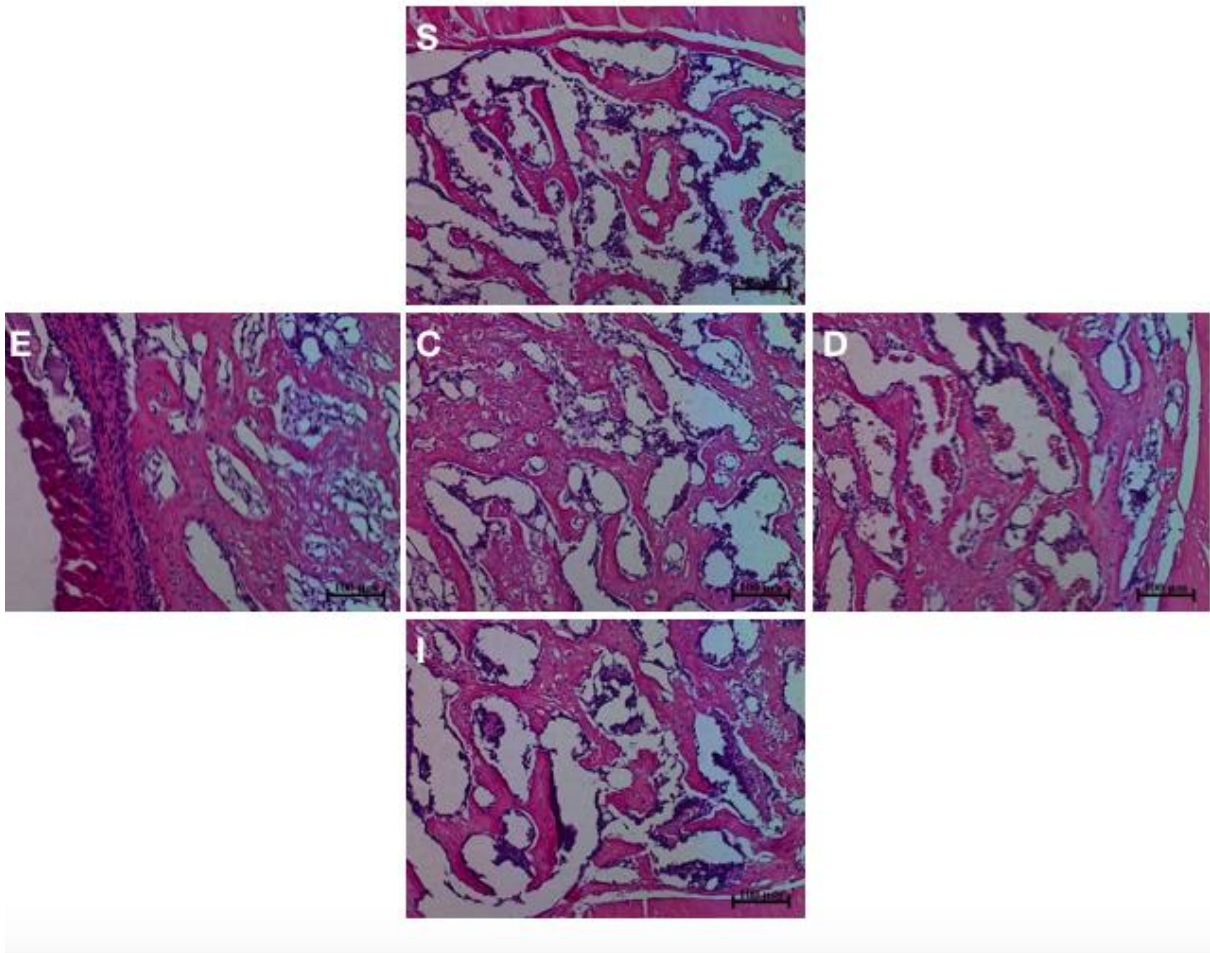
A análise histopatológica descritiva foi realizada por dois indivíduos, com a utilização das lâminas coradas em HE, considerando o campo central fotomicrografado de cada animal (centro das figuras 6 e 7), observando a presença de infiltrado inflamatório, hematoma, fibrina, osteoblastos, osso neoformado, organização tecidual, segundo Fernandes et al., (2013).

Figura 6 - Lâminas coradas em HE, animal representativo do grupo tratado por 5 dias, mostrando os cinco campos analisados, sendo um central e quatro nas regiões laterais e inferior e superior do centro da lesão.



Fonte: Próprio autor

Figura 7 - Lâminas coradas em HE, representativa do grupo de animais tratados por 10 dias, mostrando os cinco campos analisados, sendo um central e quatro nas regiões laterais e inferior e superior do centro da lesão.



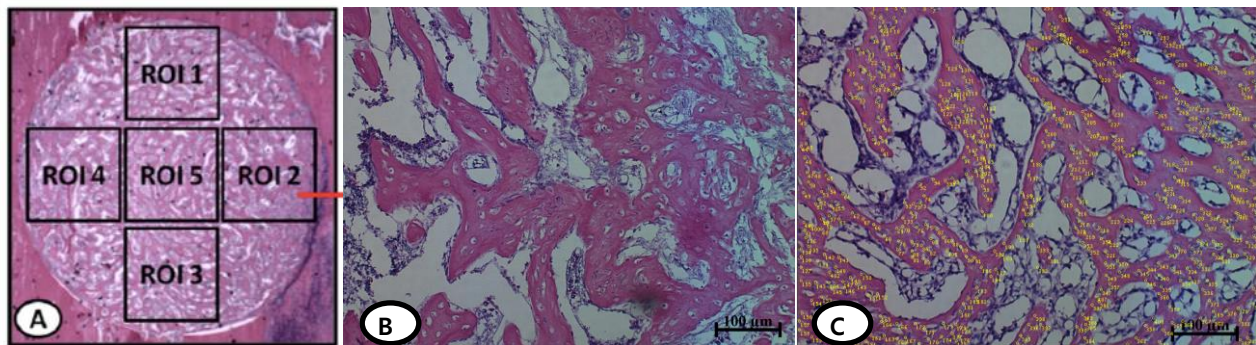
Fonte: Próprio autor

4.7 Análise Morfométrica Quantitativa

A análise morfométrica quantitativa foi realizada nas lâminas coradas com H.E. Para a realização desta análise, foi utilizado um microscópio AxioPhot 2 com câmera AxioCam HRc Carl Zeiss Microscopy e o programa de imagem AxioVision para a obtenção de fotomicrografias e análise das imagens. Foram selecionados 5 campos pré-determinados da região da lesão de cada lâmina: campo 1 (próximo da margem superior do defeito ósseo), campo 2 (próximo da margem direita do defeito ósseo), campo 3 (próximo da margem inferior do defeito ósseo), campo 4 (próximo da margem esquerda do defeito ósseo) e campo 5 (no centro do defeito ósseo) (Figura 8). Cada campo foi

fotografado com a objetiva de 200x, as imagens foram analisadas utilizando o software ImageJ versão 1.52a utilizando a ferramenta de marcação de pontos e seus valores totais de cada campo sendo inseridos em planilhas Numbers versão 5.3 e os valores dos cinco campos de uma mesma lâmina foram calculados a média dos campos, revelando o número do valor médio de células ósseas contados, para que se pudesse inserir numa planilha para as análises estatísticas.

FIGURA 8 - Lâminas coradas em HE para análise morfométrica; **A** - Esquema ilustrativo da análise morfométrica para utilização de campos histológicos de maneira aleatória 100X. fonte: Tim, C.R.; **B** - Lâmina corada em HE antes da contagem celular 200x; **C** - Após contagem de células ósseas através do software ImageJ 200X.



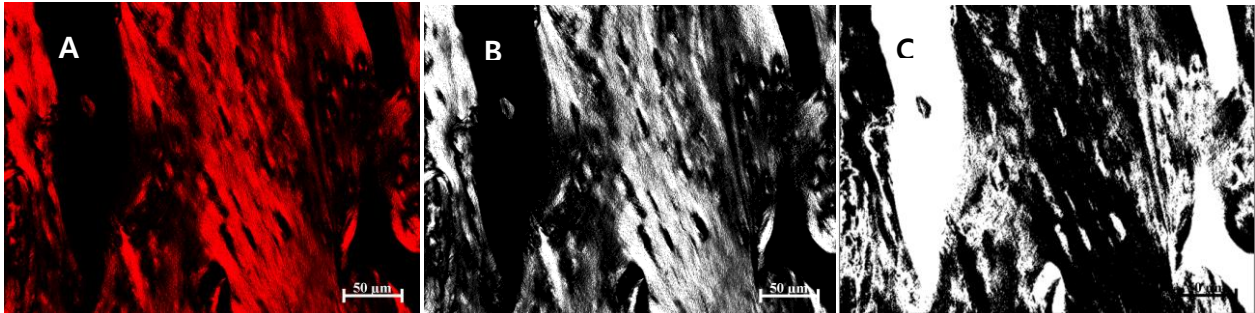
Fonte: próprio autor

4.8 Análise Quantitativa do Colágeno

Para a realização desta análise, foi utilizado um microscópio AxioPhot 2 com câmera AxioCam HRc Carl Zeiss Microscopy polarizado e o programa de imagem AxioVision para a obtenção de fotomicrografias e análise das imagens. Foram selecionados 5 campos pré-determinados da região da lesão de cada lâminas coradas com Picosirius Red: campo 1 (próximo da margem superior do defeito ósseo), campo 2 (próximo da margem direita do defeito ósseo), campo 3 (próximo da margem inferior do defeito ósseo), campo 4 (próximo da margem esquerda defeito ósseo) e campo 5 (no centro do defeito ósseo) (Figura 9). Cada campo foi fotografado com a objetiva de 400x, as imagens foram analisadas pelo software ImageJ versão 1.52a utilizando a ferramenta RGB Stack transformando-a em preto e branco, em seguida a ferramenta Threshold alternando os pontos pretos para branco e vice-versa segundo Manni et al., (2011). Desta forma, o software ImageJ calcula todos os pontos pretos da imagem resultantes do

percentual de preenchimento de colágeno. Os valores totais de cada campo foram inseridos em planilhas Numbers versão 5.3 e os valores dos cinco campos de uma mesma lâmina foram calculados a média do percentual da área, revelando o valor médio da área de osso neoformado para cada animal analisado.

FIGURA 9 - Fotomicrografia para análise de colágeno 400x; **A** - lâmina corada com corante picrossirius red; **B** - Imagem transformada em preto e branco pelo ImageJ; **C** - Imagem após o uso da ferramenta Threshold do ImageJ (inversão de pontos brancos e pretos).



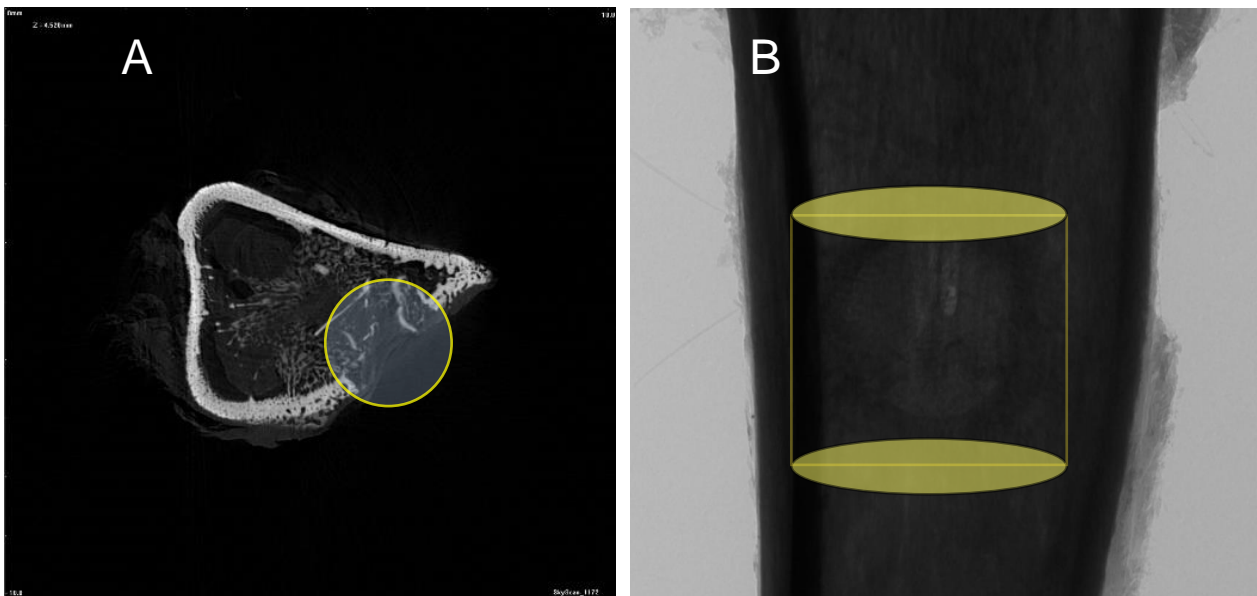
Fonte: Próprio autor.

4.9 Microtomografia computadorizada de alta resolução (Micro-CT)

Foi realizada a mensuração quantitativa da formação de massa óssea nas tíbias através de microtomografia computadorizada de alta resolução (Micro-CT) através do aparelho Skyscan modelo 1172 X-ray Micro-CT, Bruker Micro-CT, Kontich, Belgium, disponibilizado para uso pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Instrumentação) de São Carlos – SP. As tíbias armazenadas em álcool 70% foram secas com papel toalha e foram fixadas na plataforma com seu eixo sagital posicionado perpendicularmente ao plano de escaneamento. A voltagem e o feixe da fonte de Raio-X foram configurados para 61 kV e 168 μ A respectivamente. As amostras foram escaneadas em uma visão de 180° de rotação. As imagens foram capturadas pelo software de controle do DataViewer versão 1.5.1.2 e reconstituídas com o programas NReconversão 1.6.4.0. O programa Skyscan CT-Analyzer (CTAN) versão 1.14.4.1 foi usado para análise e avaliação da área de interesse em conjunto com o CTVol versão 2.2.3.0 e CTVOx 3.0 Mayer et al. (2016). No CTAN, foi convencionado o formato “Round” (cilindro) onde o tamanho da circunferência foi de aproximadamente 2,2 mm, passando cerca de 0,2 mm da circunferência da região de interesse para poder avaliar 0,1 mm de cada lado da borda, local onde a calcificação se inicia, e foi escolhido 281 frames, pois permite avaliação de aproximadamente 0,1 mm tanto acima quanto abaixo do orifício quando multiplicado pela espessura do corte tomográfico de 0,0786 microns (figura 10).

Para conseguir um ponto médio, foi escolhida o corte de número 141, ficando 140 acima do ponto central e 140 abaixo. Para definir a centralização do ponto médio, foi traçado uma linha entre a borda externa direita com a borda interna esquerda, cruzando com uma linha da borda externa esquerda com a borda interna direita. O ponto de interseção das linhas foi escolhido como ponto médio. Foi escolhido um filtro com limiar mínimo de cinza de 80 e o máximo 255, o que leva a avaliação de apenas os tons de cinza mais claros, caracterizando ossos mais densos e os resultados foram expressos em percentual de preenchimento de Fração de Volume de Osso BV/TV, segundo Bouxsein et al., (2010). Os parâmetros e análise foram supervisionadas pelo responsável pelas tomografias professor Doutor Paulo Renato Orlandi Lasso, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) de São Carlos – SP.

FIGURA 10 - Imagem da análise Micro-CT; **A** - Imagem demonstrando a região de interesse round vista sagital; **B** - Região de interesse vista antero-posterior para análise da formação óssea na região da lesão através do software de análise CTAn.



Fonte: Próprio autor.

4.10 Análise Estatística

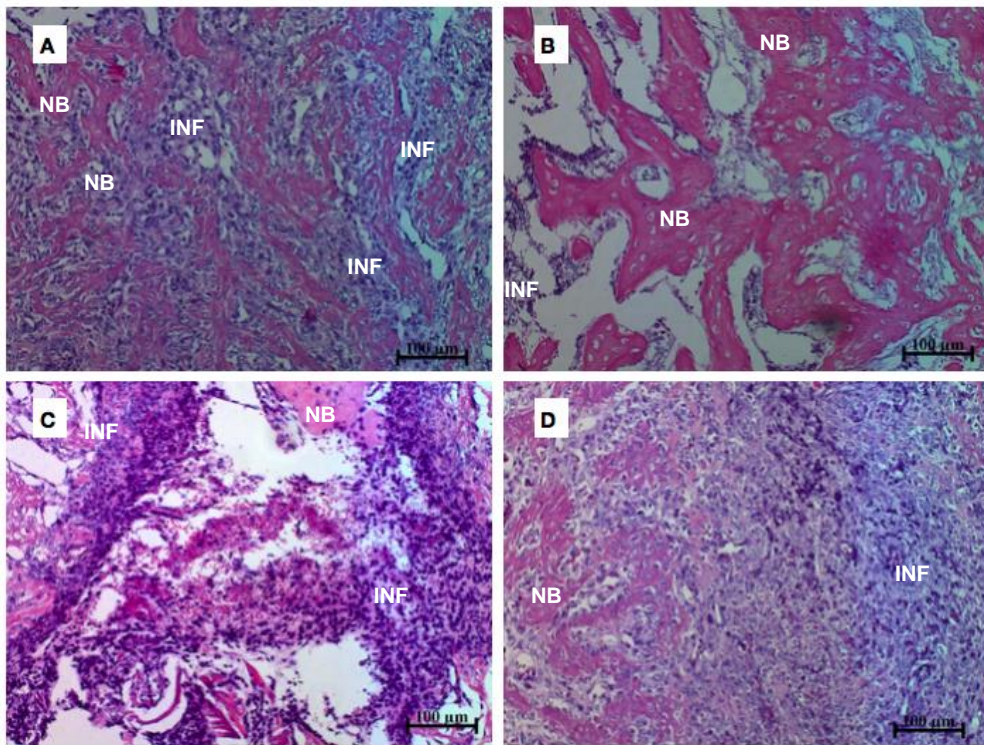
Os dados quantitativos foram analisados estatisticamente observando as normas descritivas, como gráficos e tabelas, demonstrando os resultados na forma da média e erro padrão da média (EPM). Foi utilizado para teste de normalidade Shapiro-Wilk. A diferença entre os grupos foi obtida pela análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey's. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como indicativos de significância. As análises estatísticas e os gráficos foram realizados com o programa Graphpad Prisma, versão 7.1.

5. RESULTADOS

5.1 Análise Histopatológica Descritiva

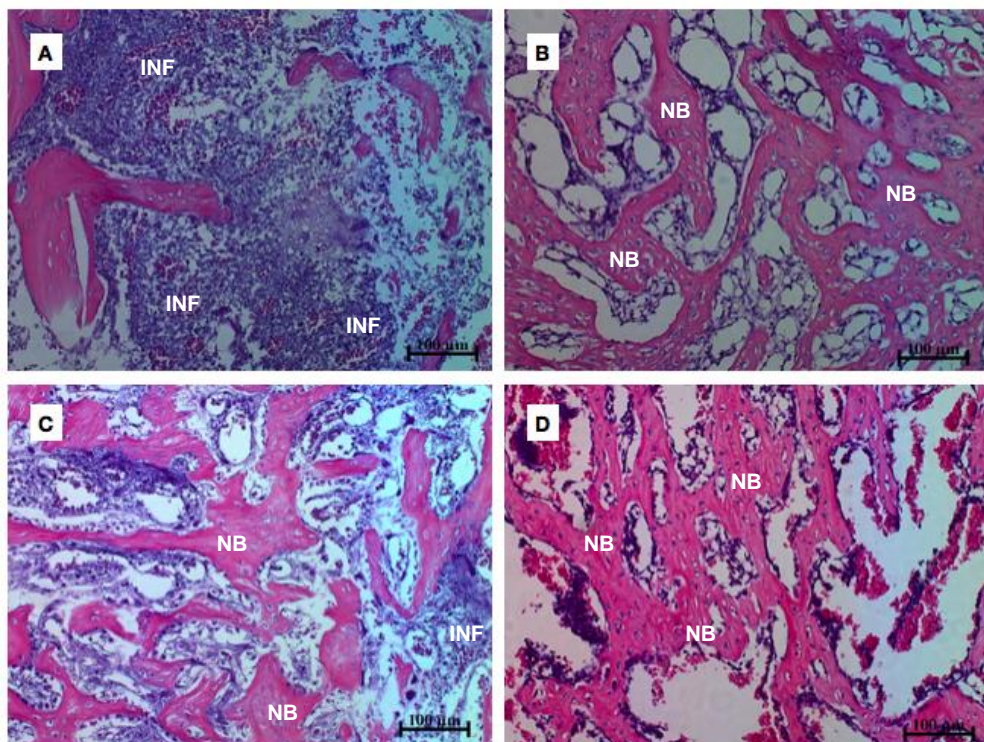
Aos 5 dias, na análise descritiva foram observadas grande presença de infiltrado com células inflamatórias em todos os grupos analisados. No entanto, há uma precoce neoformação óssea no grupo GL que aparentemente tem mais matriz óssea (figura 11). Se observa o início de presença da neoformação óssea que aparece na tonalidade rósea. Avaliando as lâminas referentes ao grupo 10 dias (Figura 12) GC, GL, GP e GT apresentaram um aumento da área de preenchimento de matriz colagênica e redução do espaço preenchido pelo tecido conjuntivo frouxo. Observou-se também o aumento do número de células ósseas bem como redução das células de caráter inflamatório (infiltrado) e osteoclastos nos 3 grupos tratados, ou seja, GL, GP e GT em comparação ao grupo não tratado GC, indicando uma maior progressão da regeneração óssea nos tratados. Quando comparados os 3 grupos tratados, no geral e pela análise qualitativa das lâminas, não se observou grandes diferenças quanto ao preenchimento por matriz óssea, tanto no aspecto inflamatório e quanto a neoformação óssea.

FIGURA 11 - Fotomicrografia dos campos centrais para os grupos 5 dias 200x; **A** - GC; **B** - GL; **C** - GP; **D** - GT. (NB - osso neoformado; INF - infiltrado inflamatório)



fonte: Próprio autor

FIGURA 12 - Fotomicrografia dos campos centrais para os grupos 10 dias 200x; **A** - GC; **B** - GL; **C** - GP; **D** - GT. (NB - osso neoformado; INF - infiltrado inflamatório)



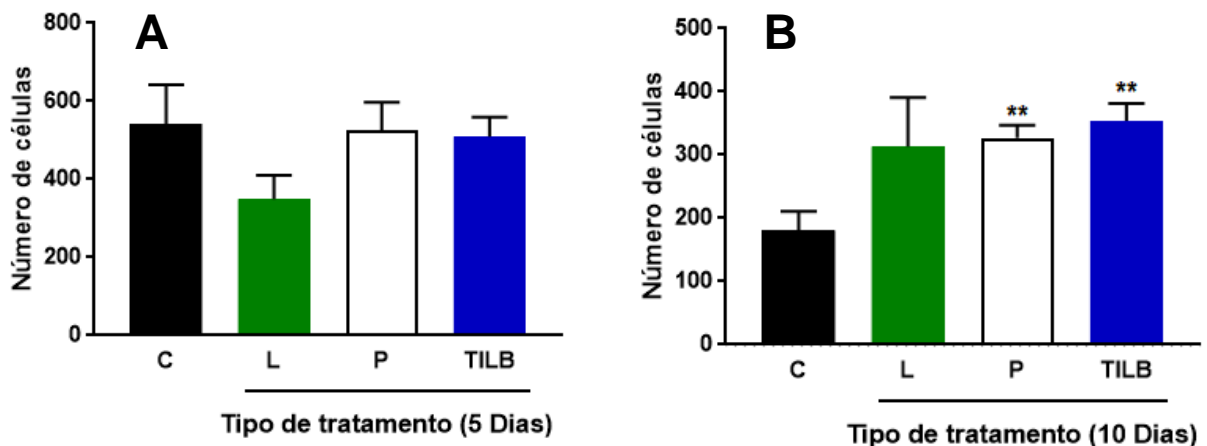
fonte: Próprio autor

5.2 Análise Morfométrica

Observou-se que não houve diferença estatística significativa no número de células ósseas (osteoblastos e osteócitos) entre os grupos 5 dias, observamos em média $542,6 \pm 99,75$ ($n=5$) para o grupo GC, $349,9 \pm 60,15$ ($n=5$) para o grupo GL, $526,5 \pm 71,13$ ($n=5$) para o grupo GP e $509,9 \pm 49,14$ ($n=5$) para o GT ($n=20$) [figura 13].

Por outro lado, nos grupos 10 dias, os grupos tratados GL, GP e GT apresentaram um maior número de células ósseas em relação ao não tratado GC, porém não houve diferença estatística significante entre os três tratamentos, nos quais observa-se em média $181 \pm 29,8$ ($n=5$) para o GC, $313,5 \pm 77,66$ ($n=5$) para o grupo GL, $326,7 \pm 20,53$ ($n=5$) para o grupo GP e $353,8 \pm 27,8$ ($n=5$) para o GT ($n=20$) [figura 14].

Figura 13 - Gráficos das médias das células ósseas na área de osso neoformado. **A** - Média de células após 5 dias de irradiação. C5: grupo controle não tratado; L5: grupo tratado com Laser 2J; P5: grupo tratado com Laser 12J e TILB5: grupo tratado com Laser 90J. **B** - Média de células após 10 dias de irradiação. C10: grupo controle; L10: grupo tratado com Laser 2J; P10: grupo tratado com Laser 12J e TILB10: grupo tratado com Laser 90J. ** $p < 0,01$, quando comparado com o grupo controle. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey.

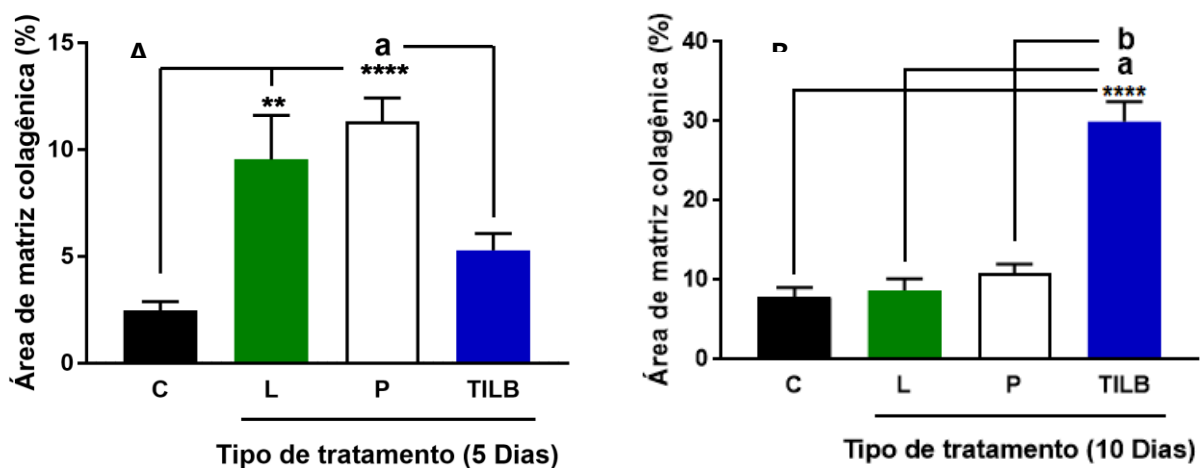


5.3 Análise Quantitativa do Colágeno

Houve diferença estatística significativa entre os grupos 5 dias, onde os grupos tratados GL e GP tiveram um percentual de preenchimento superior ao grupo não tratado GC e ao grupo tratado GT no qual se obteve média percentual de matriz $2,46 \pm 0,417$ ($n=6$) para o GC, $9,55 \pm 2,053$ ($n=6$) para o GL e $11,33 \pm 1,087$ ($n=6$) para o GP e $5,29 \pm 0,784$ ($n=6$) para o GT. A diferença entre a maior e menor média desses quatro grupos em 5 dias de tratamento foi de 8,87 ($n=24$) [figura 11A].

Por outro lado, nos grupos 10 dias, os tratados GL, GP apresentaram resultados semelhantes ao grupo não tratado GC, enquanto o grupo tratado GT obteve resultado superior no percentual de preenchimento espacial do colágeno, no qual se obteve média percentual de matriz de $7,80 \pm 1,279$ (n=6) para o GC, $8,73 \pm 1,442$ (n=6) para o GL, $10,89 \pm 1,123$ (n=6) para o GP e $29,01 \pm 2,496$ (n=6) para o GT. A diferença entre a maior e menor média nos quatro grupos em 10 dias de tratamento foi de 21,21 (n=24) [figura11B].

Figura 14 - Gráficos das áreas de preenchimento de matriz colagênica (%). **A** - Após 5 dias de irradiação. C: grupo controle; L: grupo tratado com Laser 2J; P: grupo tratado com Laser Peritoneal 12J e TILB: grupo tratado com Laser 90J. **B** - Após 10 dias de irradiação. C: grupo controle; L: grupo tratado com Laser 2J; P: grupo tratado com Laser peritoneal 12J e TILB: grupo tratado com Laser 90J. ****p<0,0001, quando comparado com o grupo controle com peritoneal; ^ap<0,0001 quando comparado com o grupo local com peritoneal e ^bp<0,0001. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey

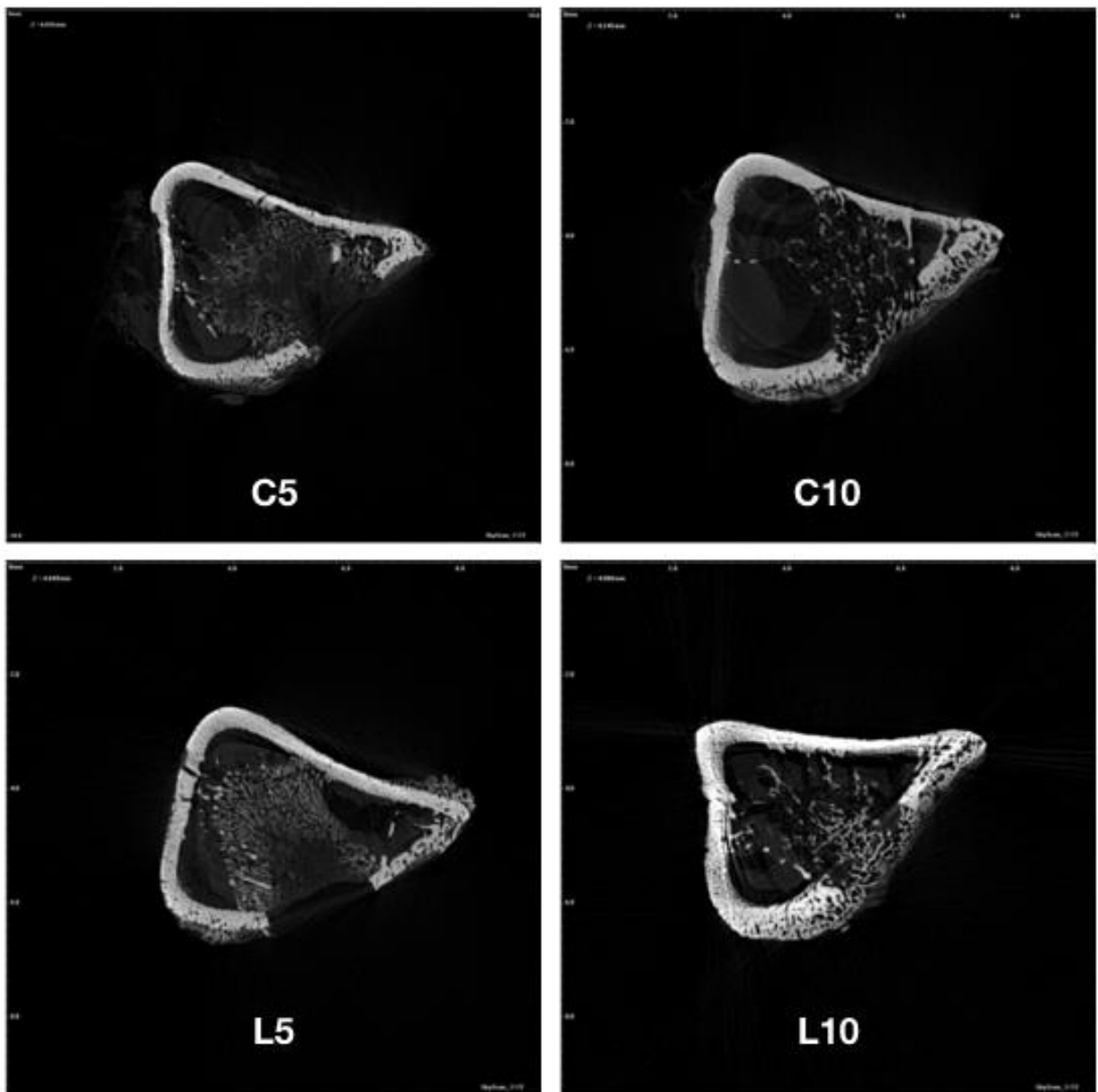


5.4 Análise Micro-CT

Para o grupo controle 5 dias (figura 12) houve uma média de percentual de preenchimento de BV/TV $11,58$ (n=4), grupo de tratamento local uma média BV/TV $11,37$ (n=4), para o grupo de tratamento peritoneal uma média BV/TV $12,87$ (n=4), para o grupo TILB uma média BV/TV $10,94$ (n=4) (figura 14A). Para o Grupo controle de 10 dias (figura 13) houve uma média de percentual de preenchimento de BV/TV $17,25$ (n=4), grupo de tratamento local uma média de percentual de preenchimento de BV/TV $23,69$ (n=4), para o grupo de tratamento peritoneal uma média de BV/TV $23,73$ (n=4), para o Grupo TILB

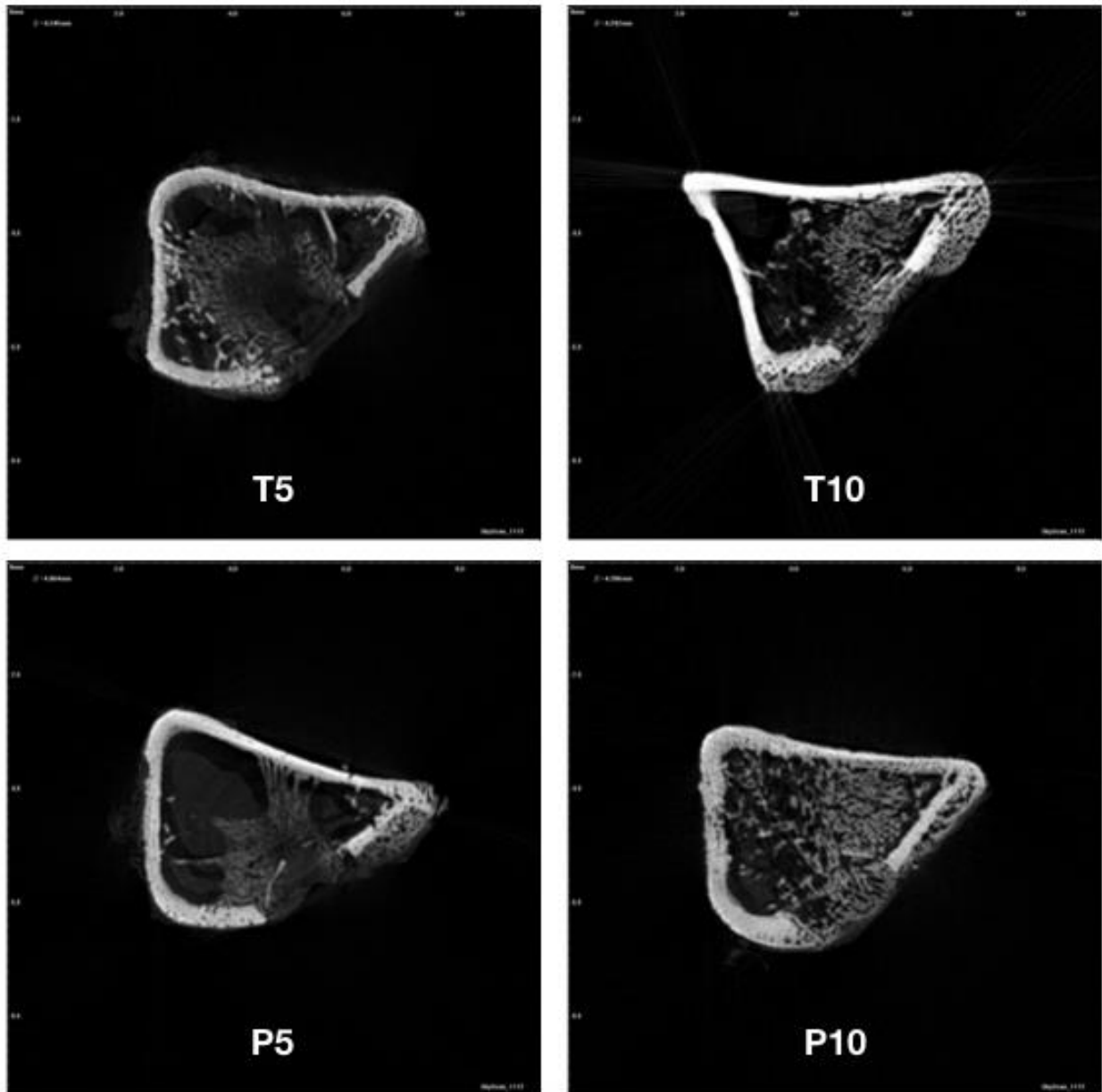
uma média de percentual de preenchimento de BV/TV 24,59 (n=4) (figura 14B). Para os grupos com 10 dias de tratamento houve diferença estatisticamente significativa (P-valor<0,05) na percentagem de preenchimento espacial da fratura BV/TV entre os grupos tratados com relação ao controle, porém entre os grupos tratados não houve diferença entre os grupos tratados GL, GT e GP.

FIGURA 15 - Grupo controle (GC) e grupo local (GL) com seus subgrupos 5 dias (à esquerda) e 10 dias (à direita) de eutanásia após Micro-CT podendo observar quanto maior a opacidade da imagem nos grupos tratados, ou seja, nas imagens inferiores, demonstrando uma maior a densidade óssea em 10 dias.



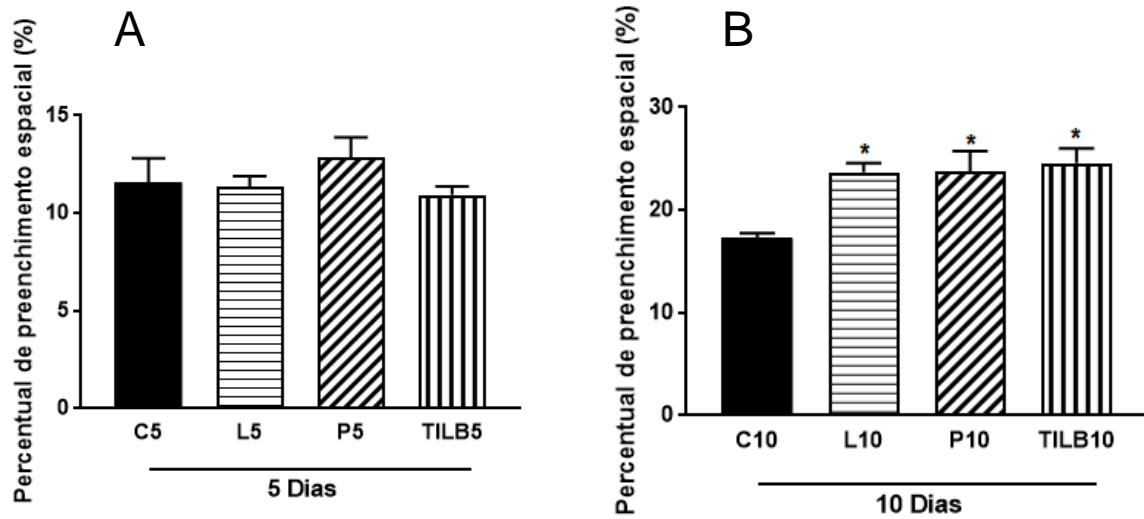
Fonte: Próprio autor

Figura 16 – Imagens das tíbias do grupo TILB (GT) e grupo Peritoneal (GP) com seus subgrupos 5 dias (à esquerda) e 10 dias (à direita) de eutanásia após Micro-CT, podendo ser observado que quanto maior a opacidade da imagem, maior a densidade óssea. Aos 10 dias há claramente uma densidade óssea maior.



Fonte: Próprio autor

Figura 17 - Percentual de preenchimento espacial (%) da área de osso neoformado avaliado com Micro-CT. **A** - Após 5 dias de irradiação. C5: grupo controle; L5: grupo tratado com Laser 2J; P5: grupo tratado com Laser 12J e TILB5: grupo tratado com Laser 90J. **B** - Percentual de preenchimento espacial (%) da área de osso neoformado após 10 dias de irradiação. C10: grupo controle; L10: grupo tratado com Laser 2J; P10: grupo tratado com Laser 12J e TILB10: grupo tratado com Laser 90J. * $p < 0,05$, quando comparado com o grupo controle. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey



6. Discussão

A FBM é uma técnica não invasiva e não traumática, com efeitos positivos bem estabelecidos pela literatura frente o reparo ósseo (FÁVARO–PÍPI et al., 2011; WU et al., 2012; HUERTAS et al., 2014; MAYER et al., 2016; WANG et al., 2018). Diante desta perspectiva de experimentar formas diferentes de administração da FBM com Laser, tivemos o desafio de pesquisarmos uma forma de tratamento condizente com cada sistema fisiológico a interagir. Para o tratamento GL foi a usualmente praticada, pois esta forma já está amplamente descrita e comprovada quanto a sua eficácia na literatura, como no caso do trabalho de Tim et al., (2016).

Para a aplicação sistêmica na região peritoneal nos baseamos nos estudos de Oishi et al., (2017) onde os autores fizeram uso da vasta rede de vasos sanguíneos e linfáticos que a região tem, o que facilita uma alta absorção da luz pelo sangue intravascular. Por esta razão, os seis pontos escolhidos foram suficientes para o abdome do rato. A presença de monócitos e macrófagos peritoniais ativam a expressão de fagocitose e atividade anti-oxidante e expressão de citocinas IL-6 e TNF α (pró) e IL-10 (anti-inflamatória) (RUIZ-ALCARAZ et al., 2018). No tratamento peritoneal obtivemos respostas semelhantes aos descritos com aplicação local, bem como outros autores descreveram em seus tratamentos com resultados sistêmicos (BRAVERMAN et al., (1989); TUNNER; HODE, (1998); SCHINDELER et al., 2008). Contudo efeito bioquímico sistêmico, incita a liberação de algumas substâncias pré-formadas, que estimulam o processo de cicatrização.

Para a técnica TILB, trabalhamos basicamente com um único conjunto de vasos, uma artéria e suas veias satélites que se localizam na cauda do animal, oferecendo portanto, uma localização privilegiada para ação da luz sobre o sangue intravascular, sem a necessidade de procedimentos invasivos, mas necessitando de um tempo maior de exposição da luz. Isso se dá em função de considerarmos o tempo total de recirculação sanguínea e assim obtermos os efeitos fisiológicos esperados, qual seja, a osteogênese de uma fratura distante do ponto de aplicação. A resposta sistêmica positiva em nossos animais tratados por 10 dias tem correlação aos resultados de Shi-Fong et al., (2012) pelo aumento da síntese de ATP de glóbulos brancos utilizando a técnica ILIB por 15 dias em pacientes com lesão medular crônica.

Na análise histopatológica descritiva dos grupos 5 dias deste trabalho houve a demonstração da presença de fibrina, infiltrados inflamatórios, componentes iniciais do processo de reparação. Além disso, a presença de osteoblastos assim como uma diferenciação celular logo após a invasão das células precursoras de osteoblastos, responsáveis pela formação dos tecidos de granulação como descritos por outros autores em diferentes períodos de tempos de estudo, como Marsell e Einhorn, (2011); Tim et al., (2013).

Já na análise morfométrica quantitativa neste mesmo período, também não houve diferenças entre os grupos, porém o número de células osteoblásticas nos grupos aos 5 dias teve valor superior a todos os grupos 10 dias, demonstrando que a fase inicial de reparação tecidual e de formação de calo ósseo não mineralizado está fortemente guardada de novas células osteoprogenitoras, o que foi acelerado pelo laser em qualquer uma das formas de administração, como demonstrado anteriormente pela aumento da expressão de COX-2, por meio da análise PCR em tempo real realizada por Tim et al., (2016).

Na análise quantitativa das fibras colágenas nos grupos 5 dias, houve uma diferença do percentual de preenchimento do colágeno, onde os grupos tratados local e peritoneal obtiveram percentual de preenchimento maior que o GC não tratado e o GT tratado. Tal fato pode ser explicado pelo provável aumento na síntese de ATP (KARU et al., 1999) gerado pelo laser na aplicação *in loco* ou na proximidade da lesão por meio da grande rede vascular peritoneal, pelo estímulo da FBM elevando a quantidade FGF, aumento do ATP e ácidos nucleicos no sítio da lesão óssea (GIULIANI et al., 2009).

A avaliação com Micro-CT não demonstrou diferenças entre todos os grupos de 5 dias, o que já era esperado para este tipo de análise. Este método avalia a formação de tecido mineralizado com uma configuração padronizada (BOUXSEIN et al., 2010). O resultado obtido no presente estudo tem a característica da fase do processo de ossificação ainda precoce, uma vez que Choi et al., (2013) obtiveram resultados em 3 e 7 dias em calvaria de camundongos com o uso do laser local, associado a células troncos mesenquimais derivadas de adipócitos junto com matriz acelular dérmica, nos quais foram realizadas avaliações por Micro-CT. Apesar de ser em calvaria de ratos e neste estudo estar sendo realizado em tíbias de ratos, os processos são bastante semelhantes.

Nos grupos de 10 dias, todos os grupos tratados com laser (GL, GP e GT) obtiveram resultados significativos estatisticamente com relação ao grupo controle,

resultado este também de acordo com a hipótese do trabalho, quando em comparação com os resultados de Choi et al, (2013) que utilizou também o tempo de 14 dias na avaliação dos tratamentos com laser, com diferença significativa entre seu grupo controle e os tratados com laser, concluindo inclusive que o laser acelera a formação inicial de matriz óssea principalmente até o décimo quarto dia. Apesar deste tempo ser maior que o que foi utilizado neste trabalho, que foi de 10 dias, houve uma clara demonstração de que o laser acelerou o processo naquele caso, assim como no estudo atual.

Os resultados semelhantes encontrados no presente estudo quando comparados com ratos tratados com laser em outros trabalhos, mesmo que em avaliações em cursos temporais diferenciados, como o trabalho de Tim et al (2013), nos fornecem uma boa evidência de que o modelo experimental foi bem realizado. Por esta razão, podemos afirmar que houve uma aceleração no processo de reparo ósseo em todos os grupos experimentais tratados com laser, indistintamente da via de administração.

Uma outra hipótese possível a se pensar seria obter resultados inferiores ao do grupo local pelos tratados via sanguínea, pela via peritoneal ou TILB. Pode ser pensado até mesmo o grupo peritoneal ser superior ao TILB e vice-e-versa, porém o fato dos resultados apresentados aos 10 dias terem se assemelhado entre si e serem superiores ao grupo controle não tratado, nos demonstram conformidade aos resultados de 08 e 12 dias de análise por meio da Micro-CT, em estudo recente de Wang et al, (2018), que obteve resultados superiores em seus grupos tratados com laser somente ou em associações com suportes celulares com relação ao seu controle não tratado com laser.

Trabalhos demonstram que a deposição de matriz se inicia nas bordas da lesão e evolui de maneira progressiva com o tempo (WANG et al., 2018), o que ficou bem evidente em nosso trabalho através da análise com Micro-CT nos 10 dias.

Estes resultados alcançados e avaliados com a análise com micro-CT aos 10 dias corroboram com a evolução dos resultados descritos anteriormente do colágeno, contagem de células precursoras de osso.

A avaliação com Micro-CT é considerada padrão ouro para avaliação do preenchimento por matriz óssea (PALMA; ISOLA, 2012).

O aumento da deposição de colágeno nos grupos tratados, diminuição do infiltrado inflamatório e consequente resolução precoce da fase inflamatória no presente estudo se assemelham aos resultados de Da Silva et al., (2012) e Bossini et al., (2012).

Pelos resultados encontrados neste trabalho, espera-se que surjam novas possibilidades de aplicação clínica futura do laser sistêmico, seja ele peritoneal ou TILB, objetivos de nosso trabalho. Pela dificuldade de acesso a aplicação em fraturas onde haja material de tratamento, como gessos, talas, órteses e também em estruturas anatômicas ósseas mais profundas, por vezes inatingíveis com a aplicação direta de luz, mas que possam sofrer um tratamento sistêmico, tanto pelo método peritoneal ou na artéria. Esta possibilidade de translação entre estudos em animais e as possibilidades de utilização de tecnologias inovadoras, como a biofotônica, com aplicações em medicina regenerativa, neste caso, em reparo ósseo, é viável e deve ser estruturado estudos que possam comprovar estes mesmos fenômenos em seres humanos.

7. Conclusão

Com a metodologia utilizada no presente estudo concluímos que a FBM com laser de 660nm estimula a osteogênese em tíbia de ratos, tanto na forma de aplicação local quanto sistêmica (aplicação transcutânea peritoneal e na corrente sanguínea com TILB).

Todas as técnicas de aplicação do laser foram superiores ao grupo controle e não diferenciaram entre si em relação a osteogênese, sendo TILB superior as outras técnicas somente na diferenciação de fibras colágenas.

Os resultados mostraram a viabilidade das técnicas, pois possibilitaram o desenvolvimento de novas alternativas de tratamentos, assim como o advento de novas tecnologias em equipamentos específicos para o propósito terapêutico, oferecendo possibilidades de utilização da técnica mesmo em condições adversas.

8. Perspectivas Futuras

Nosso trabalho gera a possível viabilidade de novas técnicas através do desenvolvimento de novas alternativas de tratamentos e também novas tecnologias em equipamentos específicos para o propósito terapêutico, oferecendo possibilidades futuras de utilização das técnicas em outras formas de lesão onde as aplicações sistêmicas poderiam solucionar com maior efetividade e brevidade os quadros lesionais.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agas D. et al., "FGF-2 enhances Runx-2/Smads nuclear localization in BMP-2 canonical signaling in osteoblasts". *J Cell Physiol*, 11:2149-58 (2013).
- Aleksic V. et al., "Low-level Er:YAG laser irradiation enhances osteoblast proliferation through activation of MAPK/ERK". *Lasers Med Sci*, 4:559-69 (2010).
- Angeletti P. et al., "Effect of low-level laser therapy (GaAlAs) on bone regeneration in midpalatal anterior suture after surgically assisted rapid maxillary expansion". *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 3:e38-46 (2010).
- Barushka O. et al., "Effect of low-energy laser (He-Ne) irradiation on the process of bone repair in the rat tibia". *Bone*, 16:47-55 (1995)
- Bossini P.S. et al., "Low level laser therapy (830nm) improves bone repair in osteoporotic rats: similar outcomes at two different dosages," *Exp Gerontol*. 47(2), 136-42 (2012).
- Bossini P.S. et al., "Low-level laser therapy (670 nm) on viability of random skin flap in rats". *Lasers Med Sci*. 24:209-213 (2009).
- Bouvet-Gerbettaz S. et al., "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).
- Bouxsein M.L. et al., "Guidelines for Assessment of Bone Microstructure in Rodents Using Micro-Computed Tomography", *Journal of Bone and Mineral Research*, (2010).
- Buckwalter J.A. et al., "American Academy of Orthopaedic Surgeons Orthopaedic basic science: foundations of clinical practice". 3^o edition: Rosemont, American Academy of Orthopaedic Surgeons (2007).
- Canalis E. et al., "Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton". *Endocr. Rev.* 24: 218–235 (2003).
- Capobianco A. et al., "The peritoneum: healing, immunity and diseases Annalisa". *The journal of Pathology*, v. 243, n. 2, p. 137–147 (2017).

- Cepera F. et al., "Effect of a low-level laser on bone regeneration after rapid maxillary expansion". *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 141:444-50 (2012).
- Chen M.H. et al., "Second messengers mediating the proliferation and collagen synthesis of tenocytes induced by low- level laser irradiation". *Lasers Med Sci* 30:263-72 (2014).
- Choi K., Kang B.J., Kim H., Lee S., Bae S., "Osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal stem cells seeded on an acellular dermal matrix," *J Biomed Mater Res Part B* :101B:919–928. (2013).
- Claes L., Willie B. "The enhancement of bone regeneration by ultrasound". *Prog Biophys Mol Biol* 93:384–398 (2007).
- Da Silva A.P. et al., "Effect of low-level laser therapy after rapid maxillary expansion on proliferation and differentiation of osteoblastic cells". *Lasers Med Sci* 27:777-83 (2012).
- Dortbudak O., "Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser," *Clin. Oral Implants Res.* 11(16), 540–545 (2000).
- Eckardt H. et al., "Recombinant human vascular endothelial growth factor enhances bone healing in an experimental nonunion model". *J Bone Joint Surg Br,* 10:1434-8 (2005).
- Fávaro-Pípi E. et al., " Low-level laser therapy induces differential expression of osteogenic genes during bone repair in rats," *Photomed Laser Surg.* 29(5), 311-7 (2011).
- Fernandes K.P.S. et al., "Effect of photobiomodulation on expression of IL-1 β in skeletal muscle following acute injury," *Lasers Med Sci.* 28(3), 1043-6 (2013).
- Fernandes K.R. et al., "Effects of low-level laser therapy on the expression of osteogenic genes related in the initial stages of bone defects in rats," *J Biomed Opt.* 18(3), 038002 (2013).
- Guartner L.P. et al., "Tratado de histologia". 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan (2003).

- Hadi A.M. et al., "Rapid quantification of myocardial fibrosis: a new macro-based automated analysis". *Cell Oncol (Dordr)*, (2011).
- Hankenson K.D. et al., "Angiogenesis in bone regeneration". *Injury*, 6:556-61 (2011).
- Hing K.A. "Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering?" *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*, 1825:2821-50 (2004).
- Karu T., "Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells," *J Photochem Photobiol. B* 49(1), 1-17 (1999).
- Karu T.I.; Kolyakov, S.F. "Exact action spectra of cellular responses relevant to phototherapy". *Photomed Laser Surg*, 23:356-361 (2005).
- Kayal R.A. et al., "Diabetes causes the accelerated loss of cartilage during fracture repair which is reserved by insulin treatment". *Bone*, 44:357-363 (2009).
- Kloting N. et al., "Is there an autoimmune process in bone? Gene expression studies in diabetic and nondiabetic BB rat as well as BB rat-related and unrelated rat strains". *Physiol Genomics*, 24:59-64 (2005).
- Lehmann, W. et al., "Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) coordinately regulates the expression of specific matrix metalloproteinases (MMPS) and angiogenic factors during fracture healing". *Bone*, 2: 300–10 (2005).
- Lu C. et al., "Assessing angiogenesis during fracture healing". *Iowa Orthop J*, 26:17-26 (2006).
- Manni M.L. et al., "Extracellular Matrix Powder Protects Against Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis", *Tissue Engineering*, (2011).
- Marsell R. et al., "Emerging bone healing therapies". *J Orthop Trauma*, 24(1):S4–8 (2010).
- Mayer L. et al., "Peri-implant osseointegration after low-level laser therapy: micro-computed tomography and resonance frequency analysis in an animal model", *Lasers Medical science*, (2016).

- Moshkovska T., Mayberry J., "It is time to test low level laser therapy in Great Britain". *Postgrad Med J* 81:436–441 (2005).
- Nechipurenko N.I. et al., "Effect of intravenous laser irradiation on some blood biochemical indicators in the acute stage of lacunar infarcts" *Eksp Klin Gastroenterol.* (9):39-43 (2014).
- Ninomiya T. et al., "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).
- Oishi J.C. et al., (Hypotensive acute effect of photobiomodulation therapy on hypertensive rats). *Life Sciences*, v. 178, p. 56–60 (2017).
- Oliveira P. et al., "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. et al., "Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades – Parte 1". *Fisioterapia Brasil*, 2: 221-236 (2001).
- Oryan A et al., "Bone Injury and Fracture Healing Biology". *Biomed Environ Sci.* 28:57-71 (2015).
- Oryan A. et al., "Bone Injury and Fracture Healing Biology". *Biomed Environ Sci.* 28:57-71 (2015).
- Ozawa Y. et al., "Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells". *Bone*, 22:347-354 (1998).
- Pacicca D.M. et al., "Expression of angiogenic factors during distraction osteogenesis". *Bone*, 33: 889–898 (2003).
- Patrocínio-Silva T.L. et al., "The effects of low-level laser irradiation on bone tissue in diabetic rats". *Lasers Med Sci.* 29:1357-64 (2014)
- Phillips A.M. "Overview of the fracture healing cascade". *Injury* (2005).

- Pinheiro A.L.B. et al., "Biomodulatory effects of LLLT on bone regeneration". *Laser Therapy*, 13:73-79 (2001).
- Pyo S.J. et al., "Low-level laser therapy induces the expressions of BMP-2, osteocalcin, and TGF- β 1 in hypoxic-cultured human osteoblasts". *Lasers Med Sci* 2:543-50 (2013).
- Rath B. et al., "Compressive forces induce osteogenic gene expression in calvarial osteoblasts". *J Biomech.* 41:1095-1103 (2008).
- Renno A.C.M. et al., "The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro". *Photomed Laser Surg*, 25:275-80 (2007).
- Robey P.G. et al., "Generation of clinical grade human bone marrow stromal cells for use in bone regeneration". *Bone*, v. 70, p. 87–92 (2015).
- Rodrigues N.C. et al., "Low-level laser therapy (LLLT) (660nm) alters gene expression during muscle healing in rats". *J Photochem Photobiol B*, 120: 29-35 (2013).
- Sandoval-Ortiz M.C. et al., "Influência do laser de baixa potência nos níveis das proteínas plasmáticas dos coelhos". *Rev. Bras. Fisioter.* Vol. 7, No. 3, 187-194 (2003).
- Schindeler A. et al., "Bone remodeling during fracture repair: The cellular Picture". *Semin Cell Dev Biol*, 19:459- 466 (2008).
- Sella V.R. et al., "Effect of low-level laser therapy on bone repair: a randomized controlled experimental study". *Lasers Med Sci* (2015).
- Sena K. et al., "Early gene response to low-intensity pulsed ultrasound in rat osteoblastic cells," *Ultrasound Med. Biol.* 31(5), 703–708 (2005).
- Shih-Fong et al., "Effects of Intravascular Laser Irradiation of Blood in Mitochondria Dysfunction and Oxidative Stress in Adults with Chronic Spinal Cord Injury". *Photomed Laser Surg.* (2012).
- Silva R.V.; Camilli J.A. "Repair of Bone Defects Treated with Autogenous Bone Graft and Low-Power Laser". *J CranioFac Surg* (2006).
- Soares D.S. et al., "Fraturas de fêmur em idosos no Brasil: análise espaço-temporal de 2008 a 2012". *Cadernos de Saúde Pública*, v. 30, n. 12, p. 2669–2678 (2014).

- Song S.L. et al., "Temporal expression of proteoglycans in the rat limb during bone healing". *Gene*, 379: 92-100 (2006).
- Stein A. et al., "Low level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro," *Photomed Laser Surg.* 23(2), 161-6 (2005).
- Tim C.R. et al., "Effects of low level laser therapy on inflammatory and angiogenic gene expression during the process of bone healing: A microarray analysis." *J. Photochem Photobiol* (2016).
- Tim C.R. et al., "Low-level laser therapy enhances the expression of osteogenic factors during bone repair in rats," *Lasers Med Sci.* 29(1), 147-56 (2013).
- Tsiridis E. et al., "Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules?" *Injury*, (1):S11–25 (2007).
- Vladimirov Y.A., Osipov A.N., and Klebanov G.I., "Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation," *Biochemistry* 69(1), 81–90 (2004).
- Wang Y.H. et al., "Low power laser irradiation and human adipose-derived stem cell treatments promote bone regeneration in critical-sized calvarial defects in rats," *Plos One.* 13(4) (2018).
- Yaoita H. et al., "Expression of bone morphogenetic proteins and rat distal-less homolog genes following rat femoral fracture". *J Bone Miner Metab*, 18:63-70 (2000).
- Zhang X. et al., "Cyclo-oxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair," *J Clin Invest.* 109(11), 1405-15 (2002).
- Ziros P.G. et al., "Runx-2: of bone and stretch". *Int J Biochem Cell Biol.* 40:1659-1663 (2008).



UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA - UNIARA

Rua Voluntários da Pátria, 1309 - Centro - Araraquara - SP
CEP 14001-320 - Caixa Postal 66 - Fone/Fax: (61) 3301-7000 | www.uniara.com.br

COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Parecer do projeto sob o protocolo: nº037/17

Título do Projeto: Reparação óssea em tibia de ratos com Laser 660nm: Aplicação local versus irradiação transcutânea na corrente sanguínea (T.L.L.B.)

Pesquisador responsável: Osmar José Ferreira

PARECER

O Projeto de Pesquisa intitulado "Reparação óssea em tibia de ratos com LASER 660nm: aplicação local versus irradiação transcutânea na corrente sanguínea (T.L.L.B.)", sob a orientação do Professor Doutor Nivaldo Antônio Parizotto, com a participação da doutoranda Glauce Regina Pigatto foi analisado por este Comitê.

O trabalho tem por objetivo avaliar a ação do LASER de baixa intensidade (660 nm) na síntese de matriz óssea, após lesão óssea induzida em tibias de ratos, seguidas de aplicação local de LASER em comparação à aplicação na corrente sanguínea de forma transcutânea (T.L.L.B.).

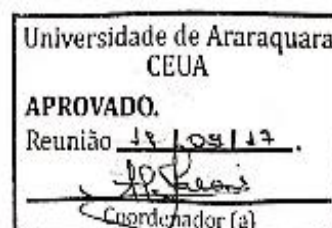
Para o estudo serão utilizados 46 ratos Wistar adultos, pesando de 250 a 350 gramas divididos em 3 grupos; grupo controle (GC), grupo laser local (GL) e grupo laser transcutâneo (GT). Após confecção dos defeitos ósseos nas tibias e sutura, serão realizadas as aplicações diárias de LASER, com as primeiras cutanásias ocorrendo nos três grupos 5 dias após a cirurgia e a segunda ocorrendo no 10º dia.

A análise do referido projeto encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** por este Comitê.

Os autores, ao concluírem o trabalho devem encaminhar ao CEUA-UNIARA o Relatório Final de Atividades, na íntegra contendo os resultados e conclusões obtidas.

Araraquara, 10 de outubro de 2017.

Relator/Colegiado





COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Parecer do projeto sob o protocolo: nº. 041/17

Título do Projeto: Reparação Óssea em Tibia de Ratos com Laser 660 nm: Aplicação Local Versus Irradiação do Peritônio

Pesquisador responsável: Nivaldo Antonio Parizotto

PARECER

O Projeto de Pesquisa intitulado "**Reparação Óssea em Tibia de Ratos com Laser 660 nm: Aplicação Local Versus Irradiação do Peritônio**", sob orientação do Doutor Nivaldo Antonio Parizotto, coorientação do mestrando Osmar José Ferreira, participação do discente Lucas Cabrini Gabrielli e colaboração de Geovana Andressa Viudes, Ana Heloisa Gomes e Carla Roberta Tim, foi analisado por este Comitê.

O trabalho tem por objetivo, avaliar os efeitos indiretos sistêmicos da *Low Level Laser Therapy* (LLLT) na regeneração óssea, por meio da irradiação do peritônio.

Para isto, serão utilizados 18 (dezoito) ratos machos (*rattus norvegicus* Wistar), com aproximadamente dois ou três meses de idade, pesando em torno de 180-250g.

A análise do referido projeto encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O projeto foi **APROVADO** por este Comitê em situação de *Ad referendum*.

Os autores, ao concluírem o trabalho, devem encaminhar ao **CEUA-UNIARA** o Relatório Final de Atividades na íntegra, contendo os resultados e conclusões obtidas.

Araraquara, 06 de fevereiro de 2018.

Relator/Colegiado

