

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta
tese será disponibilizado somente
a partir de 07/05/2021.

Tárik Ocon Braga Polo

**Avaliação dos princípios de fotobiomodulação e
bioatividade na otimização do reparo ósseo na fixação
de fraturas em ratas ovariectomizadas**



Araçatuba – SP

2019

Tárik Ocon Braga Polo

Avaliação dos princípios de fotobiomodulação e bioatividade na otimização do reparo ósseo na fixação de fraturas em ratas ovariectomizadas

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Unesp, para obtenção do grau de Doutor em Odontologia - Área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
Coorientadora: Profa Associada Roberta Okamoto

Araçatuba – São Paulo
2019



Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

P778a Polo, Tárík Ocon Braga.
Avaliação dos princípios de biomodulação e bioatividade na otimização do reparo ósseo na fixação de fraturas em ratas ovariectomizadas / Tárík Ocon Braga Polo. – Araçatuba, 2019
79 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Leonardo Perez Faverani
Coorientadora: Profa. Roberta Okamoto

1. Osteoporose 2. Regeneração óssea 3. Fixação interna de fraturas I. T.

Black D7
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

*Avaliação dos princípios de biomodulação e bioatividade na otimização do reparo ósseo na
fixação de fraturas em ratas ovariectomizadas*

Dedicatória

Dedicatória

Dedico esta conquista aos amores da minha vida, aos meus alicerces como pessoa e cidadão. Aqueles que fundamentam a minha história: a minha família.

Aos meus pais (José Wilson Polo e Silvana Montanari Ocon Braga Polo) meus super-heróis, um homem e uma mulher de caráter especial, um exemplo a ser seguido. Vocês me ensinaram as maiores dádivas deste mundo: a honestidade e dedicação. Sempre me defenderam com muito amor e dedicação. Se hoje eu possuo dignidade e conheço o caminho da verdade é devido ao exemplo obtido dentro de casa. Eu te amo pai e eu te amo mãe, amarei por toda a minha vida, com todas as minhas forças. Esse doutorado é fruto da persistência em me fazer estudar lutando contra as dificuldades e persistindo sobre a minha procrastinação.

À minha irmã (Renata Ocon Braga Polo Zerbetto), que sempre foi um grande exemplo como irmã mais velha, maninha você me inspira! Te amo! Agora casada com o Mateus Zerbetto uma ótima aquisição para a família. Graças a vocês, temos o Bernardo e o Pedro, meus sobrinhos especialmente lindos!

À minha mulher (Mariane Machado Curbete) minha alma gêmea, pessoa honesta e cheia de atitudes honrosas, sempre trabalhadora buscando cada vez mais ser uma profissional completa e atender as necessidades de onde está atuando e sendo um grande exemplo dentro de casa e parceira na vida, envolvida comigo em todos os nossos compromissos individuais e como casal. Mari meu amor e mulher mais linda desse mundo, te respeito e te amo muito por ser tudo isso pra mim.

Agradecimentos Especiais

Agradecimentos Especiais

Tenho a maior gratidão a Deus pela oportunidade de ter tido oportunidades únicas e especiais e somadas a estas, a possibilidade de conviver próximo a pessoas exemplares e determinadas. Destas oportunidades e pessoas se destacam a minha família, mulher e poucos amigos, assim como outros citados. Desse modo, não poderia deixar de me sentir agradecido e demonstrar isso com algumas palavras.

Ao meu orientador e amigo Prof. Leonardo Perez Faverani, que foi acima de tudo um presente de Deus na minha vida. Começou como um mestrando que eu seguia enquanto aluno de graduação, pois de longe já brilhava um gigantesco profissional e exemplo pra se seguir. Já são uns nove anos de convívio, amizade e admiração que só tendem a aumentar. Ter você como meu orientador foi um presente divino que aconteceu no momento em que eu mais precisei e foi devidamente providencial. Deixo aqui meu reconhecimento e agradecimento por tudo ao longo deste tempo e espero que Deus continue a iluminar sua vida para que seja sempre prospera. MUITO OBRIGADO!

À minha coorientadora Professora Roberta Okamoto, por todo auxílio e direcionamento na minha pós-graduação desde minha orientação do mestrado. Muito Obrigado!

Ao Prof. Dr. Valentim Adelino Ricardo Barão e seu orientado de doutorado Jairo Matozinho Cordeiro pela contribuição e auxílio na execução de nosso trabalho. Muito Obrigado!

Aos Professores da Disciplina da Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial Doutores Osvaldo Magro Filho, Idelmo Rangel Garcia Junior, Alessandra Marcondes Aranega, Daniela Ponzoni, Ana Paula Farnezi Bassi, Francisley Ávila Souza e Leonardo Perez Faverani pela amizade desfrutada em nosso departamento. Recebam o meu carinho e admiração.

Aos Professores das demais áreas pela disposição e empenho com o crescimento da nossa faculdade. Pelo cuidado no trato com os alunos da graduação e da pós-graduação. Vocês são mestres por excelência.

Avaliação dos princípios de biomodulação e bioatividade na otimização do reparo ósseo na fixação de fraturas em ratas ovariectomizadas

Ao Dr. Gustavo Momesso “Momestre” meu irmão de Pós-graduação, grande parceiro de trabalho, de viagens, de cerveja, e papos elevadíssimos. O convívio com você me tornou uma pessoa muito melhor! Desejo sucesso absoluto em sua vida meu amigo.

Ao Dr. Willian Phillip “Phill”, outro grande parceiro de Pós-graduação, que com o convívio mostrou-se amigo, dedicado, tranquilo e feliz, alegrando nossos dias com um novo gás super-importante para todos nós! Desejo a você muito sucesso sempre.

Aos colegas de Pós-graduação que permitiram um convívio agradável e momentos de muito aprendizado em conjunto somados a muitos momentos especiais.

Aos alunos de iniciação científica que foram de suma importância para o desenvolvimento de todo esse trabalho assim como vários outros, em especial o aluno João Matheus Fonseca e Santos e a aluna Stefany Barbosa que estavam ligados diretamente a este trabalho e que forneceram a ajuda e convivência extremamente proveitosa. Desejo em nome de vocês representando todos os nossos alunos de “IC” imenso sucesso e felicidades.

À Empresa Engimplan, pela contribuição com o fornecimento das placas e parafusos do sistema de fixação que foram essenciais para que este trabalho pudesse ser realizado. Não houveram conflitos de interesse junto a essa parceria. Restando a nossa equipe o agradecimento por sua gentil contribuição.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de Doutorado durante todos os meses do curso. Meus sinceros agradecimentos por promover o apoio financeiro e com isso, permitir que fosse possível a realização do doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão do Auxílio (Processo 2016/20297-6), indispensável para a realização deste estudo como parte dos trabalhos de meu orientador.

*Avaliação dos princípios de biomodulação e bioatividade na otimização do reparo ósseo na
fixação de fraturas em ratas ovariectomizadas*

Agradecimentos

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, na pessoa do diretor Prof Titular Wilson Roberto Poi pela oportunidade de realização dos cursos de Graduação, Mestrado e Doutorado. A cada dia admiro mais esta universidade, e guardarei em meu coração os anos em que estive envolvido com ela.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Prof. Associado André Luiz Fraga Brizo, seu vice-coordenador Prof. Associado Wirley Gonçalves Assunção e seus membros, pela competência e afínco na condução da nossa pós-graduação.

*Avaliação dos princípios de biomodulação e bioatividade na otimização do reparo ósseo na
fixação de fraturas em ratas ovariectomizadas*

Epígrafe



“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”

(Sir. Isaac Newton)

*Avaliação dos princípios de biomodulação e bioatividade na otimização do reparo ósseo na
fixação de fraturas em ratas ovariectomizadas*

Listas e Sumário

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Esquema da placa do Sistema 1,5mm com 4 furos, sem intermediários instalada fixando a fratura em fêmur de ratas.
- Figura 2** - Etapas cirúrgicas do procedimento cirúrgico de ovariectomia. (A) Incisão nos flancos das ratas. (B) Divulsão dos planos anatômicos subcutâneos. (C) Acesso ao peritônio. (D) Incisão do peritônio e acesso a cavidade abdominal. (E) Localização do ovário e chifre uterino. (F) Laqueadura do chifre uterino. (G) Ovário removido. (H) Reposição dos tecidos laqueados. (I) Sutura dos planos internos. (J) Sutura do plano superficial.
- Figura 3** - Etapas do procedimento cirúrgico para simulação de fraturas femurais. (A) Região femural após tricotomia e antisepsia. (B) e (C) Incisão na porção lateral do fêmur. (D) Divulsão dos planos anatômicos. (E) Visualização dos músculos lateral e bíceps do fêmur. (F) Visualização do fêmur entre a musculatura. (G) Exposição do fêmur. (H) Fixação da miniplaca tratada por oxidação por plasma eletrolítico. (I) Fixação da miniplaca de superfície usinada. (J) e (K) simulação da fratura com disco circular. (L) Aspecto final da fratura.
- Figura 4** - Fluxograma representando a divisão dos grupos experimentais de acordo com deficiência sistêmica (OVX ou SHAM), tipo de miniplaca (CONV ou PEO) e biomodulação (SB ou BLLLT).
- Figura 5** - Aplicação pontual e imediata na metáfise femural, na região do "gap" confeccionado e fixado pela miniplaca e parafusos.
- Figura 6** – Fotografia da placa posicionada para leitura no espectrofotômetro.
- Figura 7** - Imagem representativa da microscopia eletrônica de varredura, nas magnitudes de 30x (A e B), 300x (C) e 2000x (D), das miniplacas com texturização por oxidação por plasma eletrolítico.
- Figura 8** - Imagem representativa do mapeamento dos constituintes da miniplaca com a superfície texturizada por meio da oxidação por plasma eletrolítico (PEO), pela técnica de espectroscopia de energia dispersiva e mapa de cores referente à distribuição destes constituintes.
- Figura 9** – Representação gráfica da concentração de estrogênio plasmático, constatando hipostrogenismo no grupo OVX em comparação a SHAM ($P = 0,0003$). O * e # representam a diferença estatística houve entre os grupos.
- Figura 10** – Imagem de reconstrução 3D em três secções em orientação sagital, e sequência 2D em orientação axial, sagital e coronal e determinação da área de interesse "ROI" de um espécime representativo do grupos(OVX LASER PEO) e (OVX CO CONV), demonstrando o padrão de avaliação microtomográfico adotado.
- Figura 11** – Gráfico representativo dos valores médios e desvio padrão do parâmetro Po(Tot) da análise microtomográfica. (A) Grupos: SHAM LASER CONV, SHAM CO CONV, SHAM LASER PEO, SHAM CO PEO. (B) Grupos: OVX LASER CONV, OVX CO CONV, OVX LASER PEO, OVX CO PEO. Tanto nos grupos SHAM como OVX, a Po(Tot) foi similar nas comparações entre os grupos ($p > 0,05$).
- Figura 12** – Gráfico representativo dos valores médios e desvio padrão do parâmetro BVTv da análise microtomográfica. (A) Grupos: SHAM LASER CONV, SHAM CO CONV, SHAM LASER PEO, SHAM CO PEO: Todos os grupos foram similares

($p>0,05$). (B) Grupos: OVX LASER CONV, OVX CO CONV, OVX LASER PEO, OVX CO PEO: *A menor porcentagem de volume ósseo foi para o grupo (OVX CO CONV) em comparação aos demais ($p<0,05$).

Figura 13 – Gráfico representativo dos valores médios e desvio padrão do parâmetro Tb.N da análise microtomográfica. (A) Grupos: SHAM LASER CONV, SHAM CO CONV, SHAM LASER PEO, SHAM CO PEO: Todos os grupos foram similares ($p>0,05$). (B) Grupos: OVX LASER CONV, OVX CO CONV, OVX LASER PEO, OVX CO PEO. * O grupo (OVX CO CONV) apresentou menor número de trabéculas na comparação com os demais grupos ($p<0,05$).

Figura 14 – Gráfico representativo dos valores médios e desvio padrão do parâmetro Tb.Th da análise microtomográfica. (A) Grupos: SHAM LASER CONV, SHAM CO CONV, SHAM LASER PEO, SHAM CO PEO: Todos os grupos foram similares ($p>0,05$). (B) Grupos: OVX LASER CONV, OVX CO CONV, OVX LASER PEO, OVX CO PEO: * O grupo (OVX CO CONV) apresentou menor espessura das trabéculas na comparação com os demais grupos ($p<0,05$).

Figura 15 – Gráfico representativo dos valores médios e desvio padrão do parâmetro Tb.Sp da análise microtomográfica. (A) Grupos: SHAM LASER CONV, SHAM CO CONV, SHAM LASER PEO, SHAM CO PEO. (B) Grupos: OVX LASER CONV, OVX CO CONV, OVX LASER PEO, OVX CO PEO. Tanto nos grupos SHAM como OVX, a Tb.S foi similar nas comparações entre os grupos ($p>0,05$).

Figura 16 - Fotomicrografia da dinâmica do tecido ósseo por meio da precipitação de fluorocromos (calceína na cor verde e alizarina na cor vermelha), a coloração amarelada corresponde a sobreposição do vermelho sobre o verde, que foram analisados pela microscopia confocal a laser referente aos grupos: SHAM LASER CONV, SHAM CO CONV, SHAM LASER PEO e SHAM CO PEO. Dinâmica do tecido ósseo por meio da precipitação de fluorocromos (calceína e alizarina) analisados pela microscopia confocal a laser referente aos grupos: SHAM LASER CONV, SHAM CO CONV, SHAM LASER PEO e SHAM CO PEO.

Figura 17 – O gráfico de barras mostra os valores médios e desvio padrão representativos dos grupos analisados em função das precipitações dos fluorocromos. O laser no grupo SHAM mostrou maior dinamismo do tecido ósseo, com maiores precipitações de calceína no grupo SHAM LASER PEO em comparação ao SHAM CO PEO ($p<0,05$).

Figura 18 - Fotomicrografia da dinâmica do tecido ósseo por meio da precipitação de fluorocromos (calceína na cor verde e alizarina na cor vermelha) a coloração amarelada corresponde a sobreposição do vermelho sobre o verde, que foram analisados pela microscopia confocal a laser referente aos grupos: OVX LASER CONV, OVX CO CONV, OVX LASER PEO e OVX CO PEO. Dinâmica do tecido ósseo por meio da precipitação de fluorocromos (calceína e alizarina) analisados pela microscopia confocal a laser referente aos grupos: OVX LASER CONV, OVX CO CONV, OVX LASER PEO e OVX CO PEO.

Figura 19 – O gráfico de barras mostra os valores médios e desvio padrão representativos dos grupos analisados em função das precipitações dos fluorocromos. O laser no grupo OVX também mostrou maior dinamismo do tecido ósseo, com maiores

precipitações do vermelho de alizarina em comparação aos grupos sem a aplicação de laser ($p < 0,05$).

Figura 20 – *Fotomicrografias das lâminas histológicas coradas com azul de Stevenel e vermelho de alizarina em um aumento de x25, destacando-se maior presença de reparo ósseo no grupo SHAM PEO.*

Figura 21 – *Fotomicrografias das lâminas histológicas coradas com azul de Stevenel e vermelho de alizarina em um aumento de x25, destacando-se maior presença de reparo ósseo no grupo OVX PEO.*

Figura 22 – . *Os gráficos de barras mostram os valores médios e desvio padrão representativos dos grupos analisados em função das áreas de osso neoformado na região cortical óssea junto a placa. O grupo OVX/CO/CONV apresentou menor valor médio em porcentagem de tecido ósseo formado em comparação aos demais grupos ($p < 0,05$).*

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Protocolo de irradiação por laser de baixa intensidade.....	34
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

APMO	Área de precipitação mineral óssea
LASER	Grupo com aplicação do <i>laser</i>
CO	Grupo sem aplicação de <i>laser</i>
PEO	Texturização por Oxidação Eletrolítica por Plasma
CONV	Miniplacas convencionais
OVX	Ratas ovariectomizadas
SHAM	Ratas submetidas à cirurgia ficcional não ovariectomizadas
Ti	Titânio
MEV	Microscopia eletrônica de varregura
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva
NBF	Área de osso neoformado
APMO	Área em pixels ² de precipitação mineral óssea
DMO	Densidade mineral óssea
BV.TV.	Parâmetro microtomográfico de porcentagem de volume ósseo
Tb.N	Parâmetro microtomográfico de número de trabéculas
Tb.Th	Parâmetro microtomográfico de espessura de trabéculas
Tb.S	Parâmetro microtomográfico de separação de trabéculas
Po(tot)	Parâmetro microtomográfico de porcentagem de porosidade total

Sumário

Resumo.....	18
1. Introdução.....	21
2. Objetivos.....	25
4. Materiais e Métodos.....	27
4.1. Texturização de superfície através da oxidação por plasma eletrolítico	27
4.2. Caracterização estrutural baseline	27
4.3. Animais: Desenho experimental.....	28
4.3.1. Ovariectomia bilateral.....	29
4.3.2. Simulação de fraturas femurais	30
4.3.3. Biomodulação através da laserterapia de baixa intensidade (LLLT)	34
4.4. Métodos de análises	35
4.4.1. Microtomografia Computadorizada (Micro-Ct)	35
4.4.2. Fases laboratoriais para tecidos calcificados	36
4.4.3 Escaneamento por microscopia confocal a laser.....	36
4.4.4. Histometria	38
4.4.5. Imunoensaio para dosagem de estrógeno.....	38
4.5. Análise estatística.....	39
5. Resultados.....	41
5.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS) 41	
5.2. Imunoensaio para dosagem de estrógeno	42
5.3. Microtomografia Computadorizada (Micro-Ct).....	43
5.4. Escaneamento por microscopia confocal a laser (<i>análise da dinâmica óssea em reparação</i>)46	
5.5. Histometria (<i>Stevenel Blue & Alizarin Red</i>)	48
6.Discussão.....	52
7.Conclusão	57
8. Referências	58

Polo TOB. Avaliação dos princípios de biomodulação e bioatividade na otimização do reparo ósseo na fixação de fraturas em ratas ovariectomizadas [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2019.

Resumo

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da biomodulação e bioatividade no reparo ósseo de ratas ovariectomizadas submetidas à simulação de fraturas femurais. Sessenta e quatro ratas Wistar (*Rattus norvegicus*), fêmeas, com 6 meses de idade, em que metade dos animais foram submetidos à ovariectomia bilateral (OVX) e a outra metade à cirurgia fictícia de ovariectomia (SHAM), e um período de 3 meses foi acompanhado para a verificar se a osteoporose estava presente. As ratas foram submetidas à simulação de fratura em ambos os fêmures e a fratura foi fixada com miniplaca e parafusos do sistema 1,5 mm. A metade das amostras tiveram miniplacas com texturização de superfície tratadas por oxidação com plasma eletrolítico (PEO), que ficou em contato com o "gap" reparacional e, a outra metade com miniplacas convencionais, com superfície (CONV). Estes grupos experimentais não foram submetidos à biomodulação (CO). Para o mesmo desenho experimental dos grupos, no ato operatório, após a fixação das fraturas, os demais grupos experimentais foram submetidos à fotobiomodulação por meio da irradiação do laser de baixa intensidade (*LASER*), durante 5 minutos. Aos 14 e 42 dias de pós-operatório, foi administrada calceína e alizarina, respectivamente, pela via intramuscular, na dose de 20 mg/kg de peso. A eutanásia de todos os animais foi realizada aos 60 dias de pós-operatório. Os grupos experimentais (SHAM/LASER/CONV; SHAM/CO/CONV; SHAM/LASER/PEO; SHAM/CO/PEO; OVX/LASER/CONV; OVX/CO/CONV; OVX/LASER/PEO; OVX/CO/PEO), após a eutanásia, tiveram as regiões de interesse, inicialmente escaneadas em microtomografia computadorizada para avaliação dos parâmetros volumétricos do osso (BV/TV) e qualidade óssea PO(tot) (Tb.Th, Tb.Sp e Tb.N), em seguida as peças continuaram em processamento para inclusão em resina fotopolimerizável. As lâminas foram escaneadas em microscopia confocal a laser para análise da área em pixels² de precipitação mineral óssea (APMO). Após este processo, as lâminas foram coradas em vermelho de alizarina e azul de Stevenel para histometria de área de osso neoformado (NBF) no "gap" reparacional e análise do padrão reparacional. Os resultados foram inferiores e estatisticamente significantes ($p<0,05$) na análise de MicroCT na comparação do grupo OVX/CO/CONV com os demais grupos nos parâmetros (BV.TV, Tb.N e Tb.Th); APMO apresentou menor área para o fluorocromo vermelho de alizarina nos grupos OVX/CO/CONV e OVX/CO/PEO ($p<0,05$). No grupo OVX, o *laser* mostrou maior turnover ósseo ($p<0,05$); Histometricamente o grupo OVX/CO/CONV apresentou menor resultado ($p<0,05$) para NBF e pior padrão histológico. Conclusão: A fotobiomodulação e bioatividade otimizaram o reparo ósseo de fraturas em fêmures de ratas ovariectomizadas.

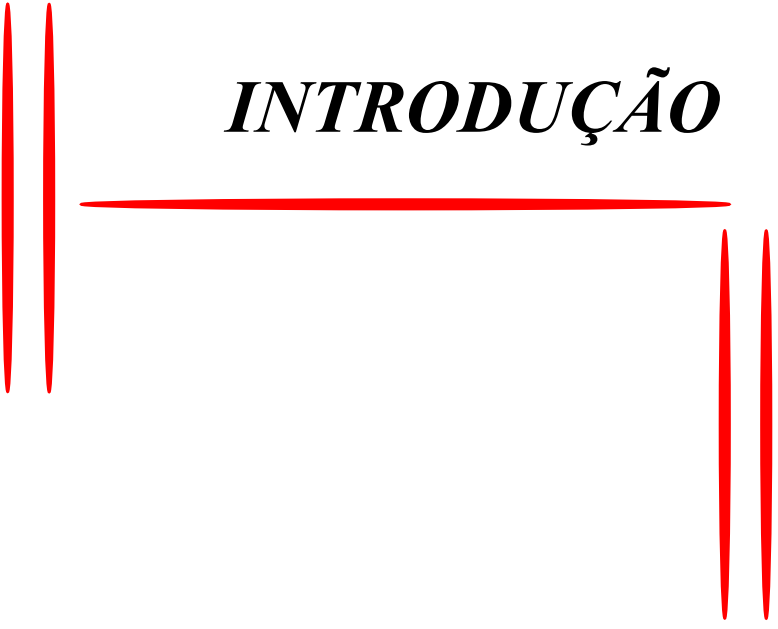
Palavras-chaves: Osteoporose, regeneração óssea e osteossíntese

Polo TOB. Biomodulation and bioactivity principles evaluation in the optimization of bone repair in fixation of fractures in ovariectomized rats [thesis]. Araçatuba: UNESP – São Paulo State University; 2019.

Abstract

*The aim of this study was to evaluate the effect of biomodulation and bioactivity on the bone repair of ovariectomized rats submitted to simulation of femoral fractures. 64 female adults Wistar rats (*Rattus norvegicus*), which half of the animals was submitted to bilateral ovariectomy (OVX) and the other half to the dummy ovariectomy surgery (SHAM), and after 3-month the osteoporosis was induced. The rats were submitted to fracture simulation in both of the femurs and the fracture was fixed with miniplate and screws of the system 1.5 mm. Half of the samples had surface-textured miniplates treated by with plasma electrolytic oxidation (PEO), which was in contact with the repair gap, and the other half with conventional miniplates with surface (CONV). These experimental groups were not submitted to biomodulation (CO). For the same experimental design of the groups, after fracture fixation, the other experimental groups were submitted to photobiomodulation through low level laser (laser), for 5 minutes. At 14 and 42 postoperative days, calcein and alizarin, respectively, were administered intramuscularly at a dose of 20 mg / kg body weight. The animals were euthanized at 60 postoperative days. The experimental groups (SHAM/LASER/CONV, SHAM/CO/CONV, SHAM/LASER/PEO, SHAM/CO/PEO, OVX/LASER/CONV, OVX/CO/CONV, OVX/LASER/PEO), after euthanasia, had the regions of interest, initially scanned in computerized microtomography to evaluate the bone volume parameters [BV / TV] and bone quality PO (tot) and (Tb.Th, Tb.Sp and Tb.N), then the samples were processed for inclusion in photopolymerizable resin.. The slides were scanned in confocal laser microscopy for analysis of the area in pixels² of bone mineral precipitation (APMO). After this process, the slides were stained in alizarin red and Stevenel blue for neoformed bone area (NBF) in the reparative gap and analysis of the histology pattern. The results showed lower and statistically significant results ($p < 0.05$) for MicroCT parameters (BV.TV, Tb.N and Tb.Th) in the comparison between OVX / CO / CONV and the other groups; APMO showed lower area for the alizarin red fluorochrome in the OVX / CO / CONV and OVX / CO / PEO groups ($p < 0.05$). In the OVX, the laser showed greater bone turnover ($P < 0,05$); The OVX / CO / CONV showed lower NBF ($p < 0.05$) and worse histological pattern. Conclusion: The photobiomodulation and bioactivity optimized the bone repair of femur fractures in ovariectomized rats.*

Key-words: Osteoporosis, bone regeneration and osteosynthesis



INTRODUÇÃO

1. Introdução

O metabolismo ósseo associada à demanda fisiológica na reparação de fraturas ósseas podem estar comprometidos quando alguns fatores influenciam negativamente. Dentre estes fatores, o grau do impacto, direção, velocidade e magnitude da força incidida sobre o osso envolvido, são fundamentais para a agressividade do trauma [1, 2]. Estes incidem na dissipação de forças que podem causar destruição do tecido ósseo, causando fraturas complexas, até com a possibilidade de perdas de substância com não união óssea, criando defeitos que demandará de uma resposta fisiológica bastante complexa [1].

Atrelado a esta problemática estrutural do tecido ósseo, algumas situações colaboram para o atraso do reparo tecidual, tais como condições inflamatórias, diabetes, anemia, desnutrição, tabagismo, etilismo, hipercortisonismo, hipovitaminoses, doença de Paget, pacientes irradiados, com histórico de uso crônico de bifosfonatos e outras drogas anti-reabsortivas no tratamento de tumores malignos ou da osteoporose [3-8]. No contexto reestruturação do tecido ósseo danificado pelo trauma, a diminuição da quantidade e das características microestruturais do tecido ósseo, como também da densidade óssea, promove o retardo nas fases cronológicas da reparação, que pode instabilizar o "gap" reparacional entre os cotos fraturados e, ao invés da produção de osso com bom grau de maturação, há interposição de tecido conjuntivo fibroso, denominado de pseudoartrose, levando a complicações, como mobilidade e as infecções e insucesso no tratamento [9, 10].

Neste trabalho foi simulada uma condição de redução da massa óssea, a osteoporose experimental em ratas adultas [11-13]. Esta condição sistêmica tem sido reportada como uma das complicações mais debilitantes, em especial nas mulheres com menopausa, levando à fraturas espontâneas [14]. O maior desafio nesses casos é a fixação das fraturas sem a perda da estabilidade dos parafusos e placas, com subsequente finalização do reparo. A reabsorção, seguida de nova formação de osso é denominada de remodelação acoplada ou *turnover* ósseo, que manterá de forma equilibrada durante toda a vida, seja em condições fisiológicas normais de oscilações térmico, químicas e mecânicas, bem como nas alterações traumáticas. Qualquer desequilíbrio, tal como ocorre na osteoporose, compromete o *turn-over* ósseo ou também denominada de dinâmica óssea [15]. O modelo experimental proposto por esta pesquisa, foi estudado anteriormente e foi possível evidenciar que a osteoporose induzida pela ovariectomia em ratas (OVX), causou o atraso do reparo nos "gaps" reparacionais em simulações de fraturas femorais [16].

Para a otimização do reparo ósseo nas situações críticas, um conceito bastante estudado é o de fotobiomodulação. O tratamento com *laser* em baixa densidade (*LLLT*) consiste na aplicação de luz monocromática com baixa densidade energética que promove efeitos fotoquímicos não térmicos em nível celular [17, 18]. Investigações *in vivo* e *in vitro* mostraram que a *LLLT* pode acelerar o reparo de defeitos ósseos [19]. Destes resultados, notou-se aumento da atividade osteoblástica a neoformação vascular, a organização das fibras colágenas e, as alterações mitocondriais [20, 21].

Briteño-Vasequez et al. (2015) [22] avaliaram o efeito do *LLLT* em fraturas tibiais de ratas com 10 aplicações no pós-operatório na região da fixação da fratura. O protocolo utilizado para a irradiação com laser de Arsênio-Gálio foi por meio do comprimento de onda na ordem de 850 nm, na potência de 100 mW, energia de 8 J/cm², durante 64 segundos. Os parâmetros radiológicos e histopatológicos mostraram superioridade do grupo de animais que foram irradiados com laser de baixa intensidade quando comparados aos animais que não receberam o *LLLT*.

Ainda no contexto da otimização do reparo ósseo na estabilização das fraturas, a determinação do conceito da osseointegração pelo ortopedista sueco Per Ingvar Branemark, proporcionou um grande avanço no espectro médico-odontológico. Desde então, nos 50 anos dos princípios da osseointegração, a indústria biomédica desenvolveu modificações contínuas na busca por implantes com propriedades estruturais e biológicas satisfatórias [23, 24]. Assim, trazendo os conceitos utilizados nos implantes dentários, os processos de texturização de superfície surgiram com o objetivo principal de favorecer as respostas biológicas da osseointegração, pela maior área de superfície de contato, atraindo de forma mais eficaz e mais rapidamente células da linhagem osteoblástica, em especial em regiões de menor densidade do tecido ósseo [25-27].

Dentre as diversas alterações topográficas e físico-químicas da superfície dos implantes dentários, há o destaque para as técnicas de adição [28-31] ou de subtração [30, 32-34]. Os fatores que influenciam na melhor e mais rápida osteogênese para estas superfícies estão relacionados à melhor retenção do coágulo sanguíneo, aumento da migração, proliferação celular e aumento da área de contato da superfície do implante [34-36]. Sendo assim, esse conceito de bioatividade dos implantes metálicos na interface osso/implante torna-se bastante interessante para a utilização também na superfície das placas utilizadas nas fixações das fraturas. Este é um conceito bastante inovador, tendo em vista, que as placas disponíveis no mercado apresentam a superfície somente usinada. Assim, além da proposta de fotobiomodulação para a otimização do reparo, ainda se propoz neste projeto a criação de

uma superfície bioativa que possa aumentar o potencial de osteogênese por contato, em especial, na região entre os cotos fraturados e comprometidos pela diminuição da qualidade do tecido ósseo, numa situação de osteoporose induzida.

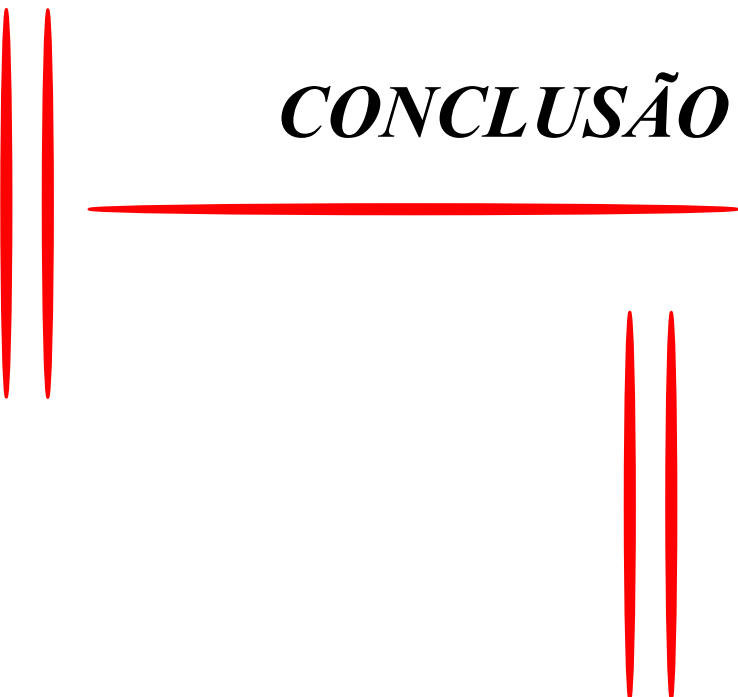
Dentre as possibilidades para a modificação topográfica dos implantes metálicos, uma preocupação diante desta gama de opções de texturização é reunir características favoráveis tanto nos aspectos microestruturais como nos aspectos biológicos reparacionais. Algumas ligas de Ti e texturizações são empregadas no mercado médico e odontológico sem apresentar antes da comercialização, no mínimo, estudos *in vitro* ou *in vivo* para a investigação das propriedades do material. Isso porque a literatura tem mostrado que alguns desses métodos alteram a resistência mecânica, o comportamento eletroquímico e as repostas reparacionais do Ti [29, 37-40].

A incorporação de elementos que são precipitados na matriz do tecido ósseo, tal como o cálcio, fósforo ou hidroxiapatita é uma técnica bastante interessante no processo de texturização por adição, a qual tem demonstrado maior afinidade com as células fundamentais de formação de osso [34, 36, 41]. As principais técnicas para a incorporação destes elementos na superfície dos implantes de Ti são a anodização e o tratamento biomimético [42, 43]. Recentemente, um novo método para a texturização superficial dos implantes foi desenvolvido, ainda está na fase de testes *in vitro*, descrito como oxidação por plasma eletrolítico (PEO), ou também denominado como deposição por faísca anódica [44, 45]. Este processo eletroquímico consiste na oxidação acompanhada por microdescargas na superfície do Ti ou suas ligas imersas em um eletrólito [45-47]. Além disso, a oxidação eletrolítica é uma técnica promissora com passos simples e com métodos químicos bem controlados para a produção de microporos bioativos na superfície dos implantes, mostrando superioridade mecânica, térmica, além das propriedades corrosivas e tribo-corrosivas [48-50].

Marques et al. (2015) publicaram dois estudos que avaliaram a PEO para a produção de texturização na superfície do Tici com a incorporação de cálcio, fósforo, prata e sílica, com diferentes concentrações destes elementos para estabelecer as melhores propriedades estruturais e de biocompatibilidade. As superfícies com as maiores concentrações de Ca e P mostraram a formação de uma estrutura cristalina mais homogênea, além de poros largos (aparência semelhante a vulcão, comprovado pela Microscopia de Força Atômica). Além disso, a PEO com incorporação de Ca/P promoveu propriedades antibacterianas nos testes microbiológicos e melhor proliferação de células tronco mesenquimais nos testes de cultura de células. Diante destes resultados, os autores encorajam novos estudos para a avaliação deste

processo de texturização para possibilitar o seu emprego no mercado de sistemas de fixação esquelética.[50]

Portanto, diante do nosso conhecimento, não existe até o momento a aplicação dos conceitos de fotobiomodulação e bioatividade no tratamento de fraturas em ossos de baixa densidade. Além do comprometimento da melhora na reabilitação dos indivíduos acometidos por essas situações aqui simuladas, o grupo de pesquisa busca o desenvolvimento de uma nova tecnologia, com possibilidade de uma patente para as aplicações médico e odontológicas.



CONCLUSÃO

7. Conclusão

Diante das limitações deste estudo *in vivo*, foi possível concluir que a fotobiomodulação pela irradiação com *laser* de diodo (808nm) e a bioatividade das miniplacas texturizadas por PEO promoveram melhores respostas reparacionais no tecido ósseo em fraturas simuladas por osteotomia de femures osteoporóticos de ratas ovariectomizadas.

8. Referências

- [1] E. Gómez-Barrena, P. Rosset, D. Lozano, J. Stanovici, C. Ernthaller, F. Gerbhard, Bone fracture healing: cell therapy in delayed unions and nonunions, *Bone* 70 (2015) 93-101.
- [2] T. Toroyan, M.M. Peden, K. Ilaych, WHO launches second global status report on road safety, *Inj Prev* 19(2) (2013) 150.
- [3] L. Claes, S. Recknagel, A. Ignatius, Fracture healing under healthy and inflammatory conditions, *Nat Rev Rheumatol* 8(3) (2012) 133-43.
- [4] M.L. Fernández Soto, A. González Jiménez, M. Varsavsky, [Bone metabolism and fracture risk in anorexia nervosa], *Med Clin (Barc)* 135(6) (2010) 274-9.
- [5] V. Morelli, C. Eller-Vainicher, A.S. Salcuni, F. Coletti, L. Iorio, G. Muscogiuri, S. Della Casa, M. Arosio, B. Ambrosi, P. Beck-Peccoz, I. Chiodini, Risk of new vertebral fractures in patients with adrenal incidentaloma with and without subclinical hypercortisolism: a multicenter longitudinal study, *J Bone Miner Res* 26(8) (2011) 1816-21.
- [6] A. Moghaddam-Alvandi, G. Zimmermann, K. Hammer, T. Bruckner, P.A. Grützner, J. von Recum, Cigarette smoking influences the clinical and occupational outcome of patients with tibial shaft fractures, *Injury* 44(11) (2013) 1670-1.
- [7] S. Guo, L.A. Dipietro, Factors affecting wound healing, *J Dent Res* 89(3) (2010) 219-29.
- [8] S.L. Ruggiero, T.B. Dodson, J. Fantasia, R. Goodday, T. Aghaloo, B. Mehrotra, F. O'Ryan, American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw—2014 update, *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 72(10) (2014) 1938-1956.
- [9] P.N. Kannegaard, S. van der Mark, P. Eiken, B. Abrahamsen, Excess mortality in men compared with women following a hip fracture. National analysis of comorbidities, comorbidity and survival, *Age Ageing* 39(2) (2010) 203-9.
- [10] K.G. Thorngren, P.O. Norrman, A. Hommel, M. Cedervall, J. Thorngren, H. Wingstrand, Influence of age, sex, fracture type and pre-fracture living on rehabilitation pattern after hip fracture in the elderly, *Disabil Rehabil* 27(18-19) (2005) 1091-7.
- [11] J.M. Teofilo, A.C. Azevedo, S.O. Petenusci, R. Mazaro, T.L. Lamano-Carvalho, Comparison between two experimental protocols to promote osteoporosis in the maxilla and proximal tibia of female rats, *Pesqui Odontol Bras*, Brazil, 2003, pp. 302-6.
- [12] J.M. Teofilo, L.G. Brentegani, T.L. Lamano-Carvalho, Bone healing in osteoporotic female rats following intra-alveolar grafting of bioactive glass, *Arch Oral Biol* 49(9) (2004) 755-62.
- [13] B. Glosel, U. Kuchler, G. Watzek, R. Gruber, Review of dental implant rat research models simulating osteoporosis or diabetes, *Int J Oral Maxillofac Implants* 25(3) (2010) 516-24.
- [14] J. Compston, Osteoporosis: social and economic impact, *Radiol Clin North Am* 48(3) (2010) 477-82.
- [15] U.H. Lerner, Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis, *J Dent Res* 85(7) (2006) 584-95.
- [16] U. Thormann, T. El Khawassna, S. Ray, L. Duerselen, M. Kampschulte, K. Lips, H. von Dewitz, S. Heinemann, C. Heiss, G. Szalay, A.C. Langheinrich, A. Ignatius, R. Schnettler, V. Alt, Differences of bone healing in metaphyseal defect fractures between osteoporotic and physiological bone in rats, *Injury* 45(3) (2014) 487-93.
- [17] A. Schindl, M. Schindl, H. Pernerstorfer-Schön, L. Schindl, Low-intensity laser therapy: a review, *J Invest Med* 48(5) (2000) 312-26.
- [18] K. T., Photobiological fundamental of low power laser therapy., *IEEE J Quantum Electron* 1987.
- [19] A.L. Pinheiro, M.E. Martinez Gerbi, F. de Assis Limeira, E.A. Carneiro Ponzi, A.M. Marques, C.M. Carvalho, R. de Carneiro Santos, P.C. Oliveira, M. Nôia, L.M. Ramalho,

Bone repair following bone grafting hydroxyapatite guided bone regeneration and infra-red laser photobiomodulation: a histological study in a rodent model, *Lasers Med Sci* 24(2) (2009) 234-40.

[20] S.B. Nascimento, C.A. Cardoso, T.P. Ribeiro, J.D. Almeida, R. Albertini, E. Munin, E.A. Arisawa, Effect of low-level laser therapy and calcitonin on bone repair in castrated rats: a densitometric study, *Photomed Laser Surg* 28(1) (2010) 45-9.

[21] C.B. Lopes, A.L. Pinheiro, S. Sathaiyah, N.S. Da Silva, M.A. Salgado, Infrared laser photobiomodulation (lambda 830 nm) on bone tissue around dental implants: a Raman spectroscopy and scanning electronic microscopy study in rabbits, *Photomed Laser Surg* 25(2) (2007) 96-101.

[22] M. Briteño-Vázquez, G. Santillán-Díaz, M. González-Pérez, T. Gallego-Izquierdo, D. Pecos-Martín, G. Plaza-Manzano, N. Romero-Franco, Low power laser stimulation of the bone consolidation in tibial fractures of rats: a radiologic and histopathological analysis, *Lasers Med Sci* 30(1) (2015) 333-8.

[23] R.Z. LeGeros, R.G. Craig, Strategies to affect bone remodeling: osteointegration, *J Bone Miner Res* 8 Suppl 2 (1993) S583-96.

[24] B. Kasemo, Biocompatibility of titanium implants: surface science aspects, *J Prosthet Dent* 49(6) (1983) 832-7.

[25] G. Mendonça, D.B. Mendonça, F.J. Aragão, L.F. Cooper, Advancing dental implant surface technology--from micron- to nanotopography, *Biomaterials* 29(28) (2008) 3822-35.

[26] L. Le Guéhennec, A. Soueidan, P. Layrolle, Y. Amouriq, Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration, *Dent Mater* 23(7) (2007) 844-54.

[27] J.L. Calvo-Guirado, M. Satorres-Nieto, A. Aguilar-Salvatierra, R.A. Delgado-Ruiz, J.E. Maté-Sánchez de Val, J. Gargallo-Albiol, G. Gómez-Moreno, G.E. Romanos, Influence of surface treatment on osseointegration of dental implants: histological, histomorphometric and radiological analysis in vivo, *Clin Oral Investig* 19(2) (2015) 509-17.

[28] S.P. Xavier, P.S. Carvalho, M.M. Beloti, A.L. Rosa, Response of rat bone marrow cells to commercially pure titanium submitted to different surface treatments, *Journal of dentistry* 31(3) (2003) 173-80.

[29] M.G. Tavares, P.T. de Oliveira, A. Nanci, A.C. Hawthorne, A.L. Rosa, S.P. Xavier, Treatment of a commercial, machined surface titanium implant with H₂SO₄/H₂O₂ enhances contact osteogenesis, *Clin Oral Implants Res* 18(4) (2007) 452-8.

[30] A. Lin, C.J. Wang, J. Kelly, P. Gubbi, I. Nishimura, The role of titanium implant surface modification with hydroxyapatite nanoparticles in progressive early bone-implant fixation in vivo, *Int J Oral Maxillofac Implants* 24(5) (2009) 808-16.

[31] A. Gupta, M. Dhanraj, G. Sivagami, Status of surface treatment in endosseous implant: a literary overview, *Indian journal of dental research : official publication of Indian Society for Dental Research* 21(3) (2010) 433-8.

[32] P. Trisi, R. Lazzara, A. Rebaudi, W. Rao, T. Testori, S.S. Porter, Bone-implant contact on machined and dual acid-etched surfaces after 2 months of healing in the human maxilla, *J Periodontol* 74(7) (2003) 945-56.

[33] N.T. Oliveira, F.P. Guastaldi, V. Perrotti, E. Hochuli-Vieira, A.C. Guastaldi, A. Piattelli, G. Iezzi, Biomedical Ti-Mo alloys with surface machined and modified by laser beam: biomechanical, histological, and histometric analysis in rabbits, *Clin Implant Dent Relat Res* 15(3) (2013) 427-37.

[34] T.P. Queiroz, F.A. Souza, A.C. Guastaldi, R. Margonar, I.R. Garcia, E. Hochuli-Vieira, Commercially pure titanium implants with surfaces modified by laser beam with and without chemical deposition of apatite. Biomechanical and topographical analysis in rabbits, *Clinical Oral Implants Research* 24(8) (2013) 896-903.

[35] A. Wennerberg, T. Albrektsson, Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review, *Clin Oral Implants Res* 20 Suppl 4 (2009) 172-84.

[36] F.A. Souza, T.P. Queiroz, A.C. Guastaldi, R. Garcia, O. Magro, R.S. Nishioka, K.E. Sisti, C.K. Sonoda, Comparative in vivo study of commercially pure Ti implants with

surfaces modified by laser with and without silicate deposition: Biomechanical and scanning electron microscopy analysis, *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials* 101B(1) (2013) 76-84.

[37] R.L.W. Messer, G. Tackas, J. Mickalonis, Y. Brown, J.B. Lewis, J.C. Wataha, Corrosion of Machined Titanium Dental Implants Under Inflammatory Conditions, *J Biomed Mater Res B* 88B(2) (2009) 474-481.

[38] L.P. Faverani, W.G. Assuncao, P.S. de Carvalho, J.C. Yuan, C. Sukotjo, M.T. Mathew, V.A. Barao, Effects of dextrose and lipopolysaccharide on the corrosion behavior of a Ti-6Al-4V alloy with a smooth surface or treated with double-acid-etching, *PloS one* 9(3) (2014) e93377.

[39] L.P. Faverani, V.A. Barao, M.F. Pires, J.C. Yuan, C. Sukotjo, M.T. Mathew, W.G. Assuncao, Corrosion kinetics and topography analysis of Ti-6Al-4V alloy subjected to different mouthwash solutions, *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 43 (2014) 1-10.

[40] V.A. Barao, A.P. Ricomini-Filho, L.P. Faverani, A.A. Del Bel Cury, C. Sukotjo, D.R. Monteiro, J.C. Yuan, M.T. Mathew, R.C. do Amaral, M.F. Mesquita, W.J. da Silva, W.G. Assuncao, The role of nicotine, cotinine and caffeine on the electrochemical behavior and bacterial colonization to cp-Ti, *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 56 (2015) 114-24.

[41] W. Luo, J. Zhao, X. Meng, S. Ma, Q. Sun, T. Guo, Y. Wang, Y. Zhou, [Effect of Zinc Doped Calcium Phosphate Coating on Bone Formation and the Underlying Biological Mechanism], *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* 32(6) (2015) 1359-63.

[42] C. Ferreira Ribeiro, K. Cogo-Muller, G.C. Franco, L.R. Silva-Concilio, M. Sampaio Campos, S. de Mello Rode, A.C. Claro Neves, Initial oral biofilm formation on titanium implants with different surface treatments: An in vivo study, *Arch Oral Biol* 69 (2016) 33-39.

[43] M.W.D. Mendes, C.G. Agreda, A.H.A. Bressiani, J.C. Bressiani, A new titanium based alloy Ti-27Nb-13Zr produced by powder metallurgy with biomimetic coating for use as a biomaterial, *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications* 63 (2016) 671-677.

[44] A.K.-K. A. Krzakala, and W. Simka, Application of plasma electrolytic oxidation to bioactive surface formation on titanium and its alloys, *RSC Adv* 3 (2013) 19725.

[45] C.A. Laurindo, R.D. Torres, S.A. Mali, J.L. Gilbert, P. Soares, Incorporation of Ca and P on anodized titanium surface: Effect of high current density, *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 37 (2014) 223-31.

[46] X.N. A. L. Yerokhin, A. Leyland, A. Matthews, and S. J. Dowey, Plasma electrolysis for surface engineering, *Surface and Coatings Technology* 122(2-3) (1999) 73-93.

[47] C.T.J.L. F. C. Walsh, R. J. K. Wood, K. T. Stevens, J. Archer, A. R. Poeton, and A. Ryder, Plasma electrolytic oxidation (PEO) for production of anodised coatings on lightweight metal (Al, Mg, Ti) alloys, *Transactions of the IMF: The International Journal of Surface Engineering and Coatings* 87(3) (2009) 122-35.

[48] T. Akatsu, Y. Yamada, Y. Hoshikawa, T. Onoki, Y. Shinoda, F. Wakai, Multifunctional porous titanium oxide coating with apatite forming ability and photocatalytic activity on a titanium substrate formed by plasma electrolytic oxidation, *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 33(8) (2013) 4871-5.

[49] d.C.N. Marques Ida S, Landers R, Yuan JC, Mesquita MF, Sukotjo C, Mathew MT, Barão VA., Incorporation of Ca, P, and Si on bioactive coatings produced by plasma electrolytic oxidation: The role of electrolyte concentration and treatment duration, *Biointerphases* 10(4) (2015) 041002.

[50] I.D. Marques, V.A. Barao, N.C. da Cruz, J.C. Yuan, M.F. Mesquita, A.P. Ricomini-Filho, C. Sukotjo, M.T. Mathew, Electrochemical behavior of bioactive coatings on cp-Ti surface for dental application, *100* (2015) 133-146.

[51] L. Lara Rodriguez, P.A. Sundaram, E. Rosim-Fachini, A.M. Padovani, N. Difffoot-Carlo, Plasma electrolytic oxidation coatings on gammaTiAl alloy for potential biomedical

- applications, Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials 102(5) (2014) 988-1001.
- [52] H.M. Evans, J.A. Long, Characteristic Effects upon Growth, Oestrus and Ovulation Induced by the Intraperitoneal Administration of Fresh Anterior Hypophyseal Substance, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 8(3) (1922) 38-9.
- [53] E.R. Luvizuto, S.M. Dias, T.P. Queiroz, T. Okamoto, I.R. Garcia, Jr., R. Okamoto, R.C. Dornelles, Osteocalcin immunolabeling during the alveolar healing process in ovariectomized rats treated with estrogen or raloxifene, Bone 46(4) (2010) 1021-9.
- [54] E.R. Luvizuto, T.P. Queiroz, S.M. Dias, T. Okamoto, R.C. Dornelles, I.R. Garcia, Jr., R. Okamoto, Histomorphometric analysis and immunolocalization of RANKL and OPG during the alveolar healing process in female ovariectomized rats treated with oestrogen or raloxifene, Arch Oral Biol 55(1) (2010) 52-9.
- [55] G. Ramalho-Ferreira, L.P. Faverani, G.A. Grossi-Oliveira, T. Okamoto, R. Okamoto, Alveolar bone dynamics in osteoporotic rats treated with raloxifene or alendronate: confocal microscopy analysis, Journal of biomedical optics 20(3) (2015) 038003.
- [56] J. Chen, W. Liu, J. Zhao, C. Sun, J. Chen, K. Hu, L. Zhang, Y. Ding, Gelatin microspheres containing calcitonin gene-related peptide or substance P repair bone defects in osteoporotic rabbits, Biotechnology letters, 2016.
- [57] X. Chen, H. Giambini, E. Ben-Abraham, K.N. An, A. Nassr, C. Zhao, Effect of Bone Mineral Density on Rotator Cuff Tear: An Osteoporotic Rabbit Model, PLoS One 10(10) (2015) e0139384.
- [58] E.R. Luvizuto, T.P. Queiroz, S.M.D. Dias, T. Okamoto, R.C.M. Dornelles, I.R. Garcia, R. Okamoto, Histomorphometric analysis and immunolocalization of RANKL and OPG during the alveolar healing process in female ovariectomized rats treated with oestrogen or raloxifene, archives of oral biology 55(1) (2010) 52-59.
- [59] E.R. Luvizuto, S.S. Dias, T. Okamoto, R.C. Dornelles, R. Okamoto, Raloxifene therapy inhibits osteoclastogenesis during the alveolar healing process in rats, Arch Oral Biol 56(10) (2011) 984-90.
- [60] G. Ramalho-Ferreira, L.P. Faverani, G.A. Momesso, E.R. Luvizuto, I. de Oliveira Puttini, R. Okamoto, Effect of antiresorptive drugs in the alveolar bone healing. A histometric and immunohistochemical study in ovariectomized rats, Clin Oral Investig (2016).
- [61] Y. Liu, L. Cao, S. Ray, U. Thormann, J. Hillengass, S. Delorme, R. Schnettler, V. Alt, T. Bauerle, Osteoporosis influences osteogenic but not angiogenic response during bone defect healing in a rat model, Injury, 2013.
- [62] V. Alt, U. Thormann, S. Ray, D. Zahner, L. Dürselen, K. Lips, T. El Khassawna, C. Heiss, A. Riedrich, G. Schlewitz, A. Ignatius, M. Kampschulte, H. von Dewitz, S. Heinemann, R. Schnettler, A. Langheinrich, A new metaphyseal bone defect model in osteoporotic rats to study biomaterials for the enhancement of bone healing in osteoporotic fractures, Acta Biomater 9(6) (2013) 7035-42.
- [63] M.L. Bouxsein, S.K. Boyd, B.A. Christiansen, R.E. Guldberg, K.J. Jepsen, R. Müller, Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography, J Bone Miner Res 25(7) (2010) 1468-86.
- [64] V. Papalexiou, A.B. Novaes, M.F. Grisi, S.S. Souza, M. Taba, J.K. Kajiwarra, Influence of implant microstructure on the dynamics of bone healing around immediate implants placed into periodontally infected sites. A confocal laser scanning microscopic study, Clin Oral Implants Res 15(1) (2004) 44-53.
- [65] P. Hartjen, A. Hoffmann, A. Henningsen, M. Barbeck, A. Kopp, L. Kluwe, C. Precht, O. Quatela, R. Gaudin, M. Heiland, R.E. Friedrich, C. Knipfer, D. Grubeanu, R. Smeets, O. Jung, Plasma Electrolytic Oxidation of Titanium Implant Surfaces: Microgroove-Structures Improve Cellular Adhesion and Viability, In Vivo 32(2) (2018) 241-247.

- [66] M. Echeverry-Rendón, O. Galvis, R. Aguirre, S. Robledo, J.G. Castaño, F. Echeverría, Modification of titanium alloys surface properties by plasma electrolytic oxidation (PEO) and influence on biological response, *J Mater Sci Mater Med* 28(11) (2017) 169.
- [67] J. He, W. Feng, B.H. Zhao, W. Zhang, Z. Lin, In Vivo Effect of Titanium Implants with Porous Zinc-Containing Coatings Prepared by Plasma Electrolytic Oxidation Method on Osseointegration in Rabbits, *Int J Oral Maxillofac Implants* 33(2) (2018) 298–310.
- [68] K.C. Nune, R.D.K. Misra, Y. Bai, S. Li, R. Yang, Interplay of topographical and biochemical cues in regulating osteoblast cellular activity in BMP-2 eluting three-dimensional cellular titanium alloy mesh structures, *J Biomed Mater Res A* 107(1) (2019) 49-60.
- [69] A. Szeliga, M. Maciejewska-Jeske, B. Męczekalski, Bone health and evaluation of bone mineral density in patients with premature ovarian insufficiency, *Prz Menopauzalny* 17(3) (2018) 112-116.
- [70] C.H. Chen, L. Wang, U. Serdar Tulu, M. Arioka, M.M. Moghim, B. Salmon, C.T. Chen, W. Hoffmann, J. Gilgenbach, J.B. Brunski, J.A. Helms, An osteopenic/osteoporotic phenotype delays alveolar bone repair, *Bone* 112 (2018) 212-219.
- [71] P. Campenfeldt, A. Al-Ani, M. Hedström, W. Ekström, Low BMD and high alcohol consumption predict a major re-operation in patients younger than 70 years of age with a displaced femoral neck fracture-A two -year follow up study in 120 patients, *Injury* 49(11) (2018) 2042-2046.
- [72] S. Kazem Shakouri, J. Soleimanpour, Y. Salekzamani, M.R. Oskuie, Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process, *Lasers Med Sci* 25(1) (2010) 73-7.
- [73] F.C.J. Neto, A.L.C. Martimbianco, R.P. de Andrade, S.K. Bussadori, R.A. Mesquita-Ferrari, K.P.S. Fernandes, Effects of photobiomodulation in the treatment of fractures: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials, *Lasers Med Sci* (2019).

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Avaliação dos princípios de biomodulação e bioatividade na otimização do reparo ósseo na fixação de fraturas em ratas ovariectomizadas**", Processo FOA nº 00287-2017, sob responsabilidade de Leonardo Perez Faverani apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 15 de Março de 2017.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 01 de Abril de 2017.

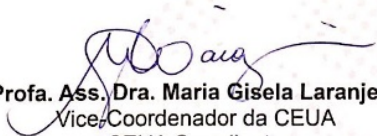
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Março de 2019.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Assessment of biomodulation and bioactivity principles in the bone healing optimization on fractures fixation in ovariectomized rats**", Protocol FOA nº 00287-2017, under the supervision of Leonardo Perez Faverani presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on March 15, 2017.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: April 01, 2017.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: March 01, 2019.


Prof. Ass. Dra. Maria Gisela Laranjeira
Vice-Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

ANEXO B – Normas da revista Biomaterials a qual essa tese será formatada para publicação.

<https://www.elsevier.com/journals/biomaterials/0142-9612/guide-for-authors>