

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**EFEITO DA IRRADIAÇÃO COM LASER DE BAIXA
INTENSIDADE NA QUALIDADE DE MEMBRANA
INDUZIDA PELA TÉCNICA DE MASQUELET EM
COELHOS**

JENIFFER GABRIELA FIGUEROA CORIS

Botucatu – SP

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EFEITO DA IRRADIAÇÃO COM LASER DE BAIXA
INTENSIDADE NA QUALIDADE DE MEMBRANA
INDUZIDA PELA TÉCNICA DE MASQUELET EM
COELHOS**

JENIFFER GABRIELA FIGUEROA CORIS

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal (Cirurgia de Pequenos Animais), como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Titular Sheila Canevese
Rahal

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Coris, Jeniffer Gabriela Figueroa.

Efeito da irradiação com laser de baixa intensidade na qualidade de membrana induzida pela técnica de Masquelet em coelhos / Jeniffer Gabriela Figueroa Coris. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Sheila Canevese Rahal

Capes: 50501070

1. Terapia a laser. 2. Ortopedia. 3. Substancias de crescimento. 4. Terapia com luz de baixa intensidade. 5. Ossos - Doenças.

Palavras-chave: Defeito ósseo; Fatores de crescimento; Infravermelho; Laserterapia; Ortopedia.

Nome do autor: Jeniffer Gabriela Figueroa Coris

**TÍTULO: EFEITO DA IRRADIAÇÃO COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE
NA QUALIDADE DE MEMBRANA INDUZIDA PELA TÉCNICA DE
MASQUELET EM COELHOS**

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Titular Sheila Canevese Rahal

Presidente da banca e orientadora

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a. Luciane dos Reis Mesquita

Membro

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a. Dra. Neuza de Barros Marques

Membro

Departamento de Medicina Veterinária

Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) - Recife - PE

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), no. Processo 19/01750-0, pela bolsa de Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo fornecimento de seis meses de bolsa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP (Botucatu), seus professores, técnicos e equipe administrativa pela oportunidade e por contribuírem com o desenvolvimento desta pesquisa.

Agradecimentos especiais:

Agradeço à Deus, primeiramente pela vida, mas também pela força e paciência a mim conferidas, permitindo ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo da realização deste trabalho, além de todas as bênçãos que adquiri no decorrer da vida.

Aos meus pais, aos quais me deram todo suporte financeiro e emocional, por me incentivarem nos momentos difíceis e compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho. Um agradecimento especial a mulher mais forte e dedicada que conheço, minha mãe, a única que me aguenta todos os dias, a qual me proporciona todos os cuidados diários, aguenta todo meu mau humor e momentos de estresse. Este trabalho não seria concluído sem seu suporte e carinho. A senhora é o grande amor da minha vida, espero que nunca duvide disso.

Aos meus filhos de quatro patas Toby, Pierre, Oliver, Tunico e Steve. Ao Toby, já falecido, mas foi quem me acompanhou dos nove anos até o início do segundo ano de residência, esteve presente em todos os momentos felizes e desafiadores dessa jornada, o qual mesmo sem dizer nada sabia me confortar. Pierre e Oliver, meus gatos, os quais me apresentaram um universo bastante

peculiar que é a o dos felinos, que diferente do que dizem, são extremamente carinhosos, te ensinam a amar, sem ter o sentimento de posse, e a respeitar a individualidade de cada um. Tunico, meu presentinho de Franca, abandonado no hospital, com sua forma cativante acabou me conquistando e mudando-se para Botucatu comigo. Ao novo membro da família, Steve, com apenas sete meses e pesando apenas um quilo, trouxe muita alegria para nosso lar.

As amigas Camila e Beatriz, amizade que cultivo desde o ensino médio, as quais mesmo distantes me dão todo o apoio. Sinto falta da nossa convivência diária. Suellen, Vanessa e Tiago, outros belos presentes de Franca, obrigada pela amizade que construímos e tenho certeza de que durará para sempre. Daniela e Catarina, amizades antigas, da época da graduação, a qual foi fortalecida com meu retorno à Botucatu, muito obrigada por tudo. Ao Ivaldo e ao Gustavo, amizades construídas há menos de um ano, mas que parece de uma vida inteira, pela sintonia e cumplicidade que temos. Cada um de vocês contribuiu de forma individual e única para meu crescimento pessoal e profissional. Gratidão eterna a todos!

Aos que colaboraram diretamente com o trabalho, Luciane, Washington, Luís, Shayra, Leticia, Camilo, Lídia, Túlio, Ramiro, Carlos Eduardo e muitos outros que diretamente ou indiretamente me ajudaram durante a execução do trabalho, obrigada pelo empenho e dedicação, sem vocês não teria sido possível concluí-lo.

Gratidão aos animais que participaram do estudo. Espero que este estudo seja benéfico à saúde dos animais e que os resultados possam contribuir para o bem-estar dos mesmos.

À profa. Dra. Sheila Canevese Rahal, quem me orienta desde o quarto ano de graduação, na qual me inspiro por ser uma excelente profissional e pessoa. Sempre muito paciente, disposta a compartilhar todo conhecimento que possui. Obrigada por me aceitar como orientada e por fazer parte do meu crescimento profissional.

Sumário

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELA.....	xi
Resumo	xii
Abstract	xiii
CAPÍTULO 1	1
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	2
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 Membrana induzida pela técnica de Masquelet.....	4
2.2 Laser de baixa intensidade.....	8
2.3 Tecido ósseo.....	13
2.4 Consolidação óssea.....	14
3 REFERÊNCIAS	17
CAPÍTULO 2	26
TRABALHO CIENTÍFICO: Efeito da irradiação com laser de baixa intensidade na qualidade de membrana induzida pela técnica de Masquelet em coelhos.....	27
Anexo	62
PROTOCOLO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	62

Lista de Figuras

Figura 1. Etapas cirúrgicas para substituição da falha segmentar pelo cilindro de cimento ósseo e posterior desenvolvimento da membrana induzida de Masquelet em coelhos. (a) Isolamento do rádio e mensuração da falha óssea. (b) secção do segmento ósseo com auxílio da serra oscilatória. (c) Falha óssea segmentar. (d) Aplicação do cilindro de cimento ósseo na falha segmentar.....	32
Figura 2. (a) Equipamento de laser portátil de Ga-Al-As. (b) Aplicação do laser de baixa intensidade por técnica pontual, estando o coelho imobilizado por contenção física.....	33
Figura 3. Exame ultrassonográfico na região da falha segmentar, estando o coelho imobilizado por contenção física.....	34
Figura 4. Imagens radiográficas em projeção mediolateral do antebraço de coelhos irradiados com laser de baixa intensidade no pós-operatório imediato (a) e com três semanas (b) da indução da membrana de Masquelet. Observe a falha segmentar preenchida com cilindro de polimetilmetacrilato (a) e a proliferação óssea partindo das extremidades da falha segmentar em direção ao cilindro (b).....	38
Figura 5. Imagens radiográficas em projeção mediolateral do antebraço de coelhos no pós-operatório imediato (a), com três semanas (b) e seis semanas (c) da indução da membrana de Masquelet em conjunto ao uso do laser de baixa intensidade. Observe a falha segmentar preenchida com cilindro de polimetilmetacrilato (a), a proliferação óssea partindo apenas da extremidade proximal da falha segmentar em direção ao cilindro (b), e sua ausência na avaliação com seis semanas de pós-operatório (c).....	38
Figura 6. Imagens ultrassonográficas em plano longitudinal de defeito segmentar no rádio de coelhos, preenchido com cilindro de polimetilmetacrilato, com 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E) e 6 (F) semanas de pós-operatório. Na ultrassonografia modo-B observa-se estrutura retilínea de superfície hiperecogênica formadora de sombreamento acústico posterior, correspondendo ao cilindro de polimetilmetacrilato (seta verde) e a formação da membrana induzida (seta amarela). No modo Power-Doppler visibiliza-se a presença de vasos sanguíneos junto à superfície óssea e cimento, representando vascularização da membrana induzida (seta azul).....	40

- Figura 7.** Aspecto macroscópico de membranas induzidas com três semanas de pós-operatório. Notar a maior espessura da membrana induzida no membro que recebeu irradiação laser de baixa intensidade (a), comparada aquela do membro sem irradiação (b)..... 41
- Figura 8.** Aspecto macroscópico de membranas induzidas em membros controles. Notar a maior espessura da membrana induzida com três semanas de pós-operatório (a), comparada aquela mais fina com seis semanas de pós-operatório (b)..... 42
- Figura 9.** Fotomicrografias demonstrando as características histológicas da membrana induzida (Masquelet) na terceira semana de pós-operatório, em membros que receberam a irradiação laser de baixa intensidade. **(a)** Verificam-se três camadas distintas: a primeira em contato com o cilindro de polimetilmetacrilato, composta por células inflamatórias mononucleares e polimorfonucleares e vasos sanguíneos; a segunda, composta por fibroblastos lineares e paralelos à resina e presença de colágeno organizado, além de vasos sanguíneos; a terceira, composta por tecido conjuntivo desorganizado, fibroblastos ativos e vasos sanguíneos (coloração H&E, 50x). **(b)** Observa-se a presença de células gigantes de corpo estranho na primeira camada (coloração H&E, 200x)..... 44
- Figura 10.** Fotomicrografia demonstrando as características histológicas da membrana induzida (Masquelet) na sexta semana de pós-operatório, em membros controles. Nota-se duas camadas, sendo a camada em contato com o cilindro de polimetilmetacrilato composta células inflamatórias e fibroblastos desorganizados e a segunda predominantemente muscular (coloração H&E, 50x)..... 45
- Figura 11.** Fotomicrografia demonstrando as características histológicas da membrana induzida (Masquelet) na sexta semana de pós-operatório, em membros controles. Observa-se duas camadas, a primeira em contato com o cilindro de polimetilmetacrilato com presença de células inflamatórias e a segunda composta por uma camada fibromuscular, com presença de fibras colágenas paralelas (coloração H&E, 50x). 46
- Figura 12.** Fotomicrografias demonstrando as características histológicas da membrana induzida (Masquelet) na sexta semana de pós-operatório, em membros que receberam a irradiação laser de baixa intensidade. **(a)** Observa-se a indiferenciação das camadas da membrana induzida e a presença de trabéculas ósseas (seta preta) (coloração H&E, 200x). **(b)** Nota-se a presença de tecido ósseo em formação (coloração H&E, 50x).. 47

Figura 13. Marcação citoplasmática de VEGF-A e PDGF nas células estromais da membrana induzida na terceira semana de pós-operatório. **(a)** Membro controle com distribuição de 3 e intensidade de 1. **(b)** Membro tratado com laser de baixa intensidade apresentando distribuição de 2 e intensidade de 1. **(c)** Membro controle com distribuição de 4 e intensidade de 2. **(d)** Membro tratado com laser de baixa intensidade com distribuição de 3 e intensidade de 2..... 51

Figura 14. Marcação citoplasmática de VEGF-A e PDGF nas células estromais da membrana induzida na terceira semana de pós-operatório. **(a)** Membro controle com distribuição de 2 e intensidade de 1. **(b)** Membro tratado com laser de baixa intensidade apresentando distribuição de 3 e intensidade de 2. **(c)** Membro controle com distribuição de 2 e intensidade de 1. **(d)** Membro tratado com laser de baixa intensidade com distribuição de 3 e intensidade de 2..... 52

Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Ocorrência (e porcentagem) de vasos, avaliados por ultrassonografia Doppler em membrana induzida, com ou sem o emprego da irradiação laser de baixa intensidade na falha óssea segmentar, imediatamente após a cirurgia (0) e de uma até a sexta semana de pós-operatório, conforme o número de membros (6 ou 12)..... 39
- Tabela 2.** Escore semiquantitativo da intensidade de inflamação, número total de vasos sanguíneos, presença ou ausência de metaplasia óssea e colágeno, na membrana induzida em coelhos (n=6), com ou sem o emprego da irradiação laser de baixa intensidade na falha óssea segmentar, na terceira semana de pós-operatório..... 48
- Tabela 3.** Escore semiquantitativo da intensidade de inflamação, número total de vasos sanguíneos, presença ou ausência de metaplasia óssea e colágeno, na membrana induzida em coelhos (n=5), com ou sem o emprego da irradiação laser de baixa intensidade na falha óssea segmentar, na sexta semana de pós-operatório..... 49
- Tabela 4.** Escore semiquantitativo da distribuição e intensidade quanto à expressão de VEGF e PDGF nas membranas induzidas em coelhos (n=6), com ou sem o emprego da irradiação laser de baixa intensidade na falha óssea segmentar, na terceira semana de pós-operatório..... 53
- Tabela 5.** Escore semiquantitativo da distribuição e intensidade quanto à expressão de VEGF e PDGF nas membranas induzidas em coelhos (n=5), com ou sem o emprego da irradiação laser de baixa intensidade na falha óssea segmentar, na sexta semana de pós-operatório..... 53

CORIS, J.G.F. Efeito da irradiação com laser de baixa intensidade na qualidade de membrana induzida pela técnica de Masquelet em coelhos. Botucatu, 2020. 74p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Animal – Cirurgia de Pequenos Animais) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – (FMVZ), Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

RESUMO

O estudo avaliou a influência da irradiação laser de baixa intensidade no desenvolvimento e características da membrana de Masquelet, induzida de forma ortotópica em coelhos. Foram utilizados 12 coelhos Norfolk com idade média de três meses. Em ambos os membros torácicos, foi induzida uma falha óssea segmentar de 1,0 cm de comprimento no rádio, a qual foi preenchida com um cilindro de cimento ortopédico. No período pós-operatório, em um dos membros a falha recebeu terapia laser de baixa intensidade (2J de energia) a cada 48 horas, durante 15 dias. As regiões das falhas segmentares foram avaliadas por exames ultrassonográficos e radiográficos. Seis animais foram submetidos à eutanásia com três semanas e seis com seis semanas de pós-operatório, para se proceder os exames histológicos e imuno-histoquímico das membranas de Masquelet. Em ambos os membros, radiograficamente notou-se na terceira semana de pós-operatório a presença de proliferação óssea ativa partindo das extremidades ósseas, sendo que na sexta semana o processo evolutivo mostrou-se em estágio mais avançado. O exame ultrassonográfico visibilizou, em ambos os membros, a presença da membrana induzida com uma semana de pós-operatório. Histologicamente não ocorreram diferenças estatísticas relativas ao escore semiquantitativo da intensidade de inflamação, número total de vasos sanguíneos, metaplasia óssea e colágeno. As espessuras médias das membranas induzidas foram 2050,17 μm e 1451,96 μm no membro controle e 2724,26 μm e 2081,03 μm no membro irradiado com laser, respectivamente na terceira e sexta semanas de pós-operatório. A expressão de VEGF e de PDGF foi presente nas membranas do membro controle e naquelas irradiadas, sem diferenças estatísticas. Foi possível concluir que pelos métodos de avaliação utilizados não foi possível comprovar estatisticamente a influência da irradiação laser de baixa intensidade sobre a membrana de Masquelet.

Palavras-chave: Ortopedia; Infravermelho; Laserterapia; Fatores de crescimento; Defeito ósseo.

CORIS, J.G.F. Effect of low-intensity laser irradiation on the quality of the induced membrane in Masquelet's technique. Botucatu, 2020. 74p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Animal – Cirurgia de Pequenos Animais) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – (FMVZ), Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

SUMMARY

This study aimed to evaluate the influence of low-intensity laser irradiation on the development and characteristics of the Masquelet membrane induced in orthotopic site in rabbits. Twelve Norfolk rabbits, mean age of 3 months were used. In both forelimbs, a segmental bone defect of 1.0 cm length was induced in the radius, which was filled with a cylinder of polymethylmethacrylate bone cement. Low-level laser therapy was used postoperatively in the bone defect of one of the forelimbs by point technique (2J energy) every 48 hours for 15 days. The bone defect were evaluated by ultrasound and radiographic examinations. Six rabbits were submitted to euthanasia at three weeks postoperatively and six rabbits at six weeks postoperatively to perform the histological and immunohistochemical examinations of the Masquelet's membranes. In both forelimbs, radiographs showed new bone growth from the cut ends of the radius on third postoperative week, and more advanced stage on sixth postoperative week. Sonographic examination identified in both forelimbs the presence of the induced membrane one week after the surgery. Histologically, there were no statistically significant differences in semi-quantitative score of inflammation intensity, total number of blood vessels, bone metaplasia and collagen. The average thickness of the induced membranes was 2050.17 μm and 1451.96 μm in the control forelimb and 2724.26 μm and 2081.03 μm in the laser irradiated limb, respectively on third and sixth postoperative weeks. VEGF and PDGF expression were present in the induced membranes of the control and irradiated forelimbs, but showed no significant difference. In conclusion, based on assessment methods was not possible to demonstrate statistically the influence of low-intensity laser irradiation in the Masquelet membrane.

Key words: Orthopedics; Infrared; Laser therapy; Growth factors; Bone defect.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A reconstrução de defeitos ósseos é um dos maiores desafios na ortopedia humana e veterinária (SCHULZ, 2007; MASQUELET e BEGUE, 2010; VIATEAU et al., 2010; HAN et al., 2017). Várias técnicas de reconstrução têm sido propostas, desde o uso de enxertos até o uso do método de alongamento ósseo ou transporte ósseo (GIANNOUDIS et al., 2005; VIATEAU et al., 2010). Apesar de ser uma excelente alternativa no reparo de falhas ósseas, o enxerto isolado apresenta limitações como: necessidade de grande volume de material, comorbidades associadas com a colheita, contenção do material dentro do defeito (GUGALA e GOGOLEWSKI, 2002; GIANNOUDIS et al., 2005).

Com o objetivo de assegurar que o enxerto implantado consiga realizar sua função, estudos na medicina vêm desenvolvendo materiais como membranas de polímero sintético (GUGALA e GOGOLEWSKI, 2002), gaiolas de titânio (COBOS et al., 2000) e membrana induzida (membrana de Masquelet) (MASQUELET et al., 2000).

A membrana de Masquelet foi acidentalmente descoberta em 1986, porém o conceito foi desenvolvido em 2010, abrindo novas perspectivas de tratamento (HAN et al., 2017). A técnica é composta por duas etapas (MASQUELET et al., 2000; MASQUELET e BEGUE, 2010; HAN et al., 2017; MASQUELET, 2017). Na primeira etapa, realiza-se o debridamento do local, seguida da colocação do espaçador de cimento ósseo de polimetilmetacrilato (PMMA) no defeito ósseo (MASQUELET e BEGUE, 2010; VIATEAU et al., 2010; MASQUELET, 2017). Realiza-se a segunda etapa após seis a oito semanas, o espaçador é então retirado com muita cautela, preservando-se a membrana (MASQUELET et al., 2000). Em seguida, realiza-se a colocação do enxerto ósseo no tubo formado e sutura-se a membrana e os tecidos moles adjacentes, formando um sistema de contenção (MASQUELET et al., 2000; MASQUELET e BEGUE, 2010).

Vários estudos têm sido realizados para uma melhor compreensão da membrana, quanto à sua estrutura e propriedades (KLAUE et al., 1993; PELISSIER et al., 2004; VIATEAU et al., 2010), porém a influência da aplicação de laser de baixa intensidade durante o desenvolvimento da membrana aparentemente ainda não foi descrita.

Desta forma, o presente estudo visou avaliar a influência da irradiação laser no desenvolvimento da membrana de Masquelet induzida de modo ortotópico em coelhos. Para tanto, foram estabelecidos dois capítulos: o primeiro relativo à introdução e revisão da literatura; o segundo relativo ao desenvolvimento ao artigo científico propriamente dito.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Membrana induzida de Masquelet*

O desenvolvimento da membrana de Masquelet inclui duas etapas (MASQUELET et al., 2000; MASQUELET e BEGUE, 2010; HAN et al., 2017; MASQUELET, 2017). Em ambas as etapas, o membro precisa estar imobilizado, seja por método interno ou fixador externo (HAN et al., 2017).

Na primeira etapa, deve-se realizar o debridamento do local, seguida da colocação do espaçador de cimento ósseo de polimetilmetacrilato (PMMA) no defeito ósseo (MASQUELET e BEGUE, 2010; VIATEAU, 2010). O debridamento radical é crítico para o sucesso no primeiro estágio, particularmente em defeito ósseo infectado, como nas não uniões sépticas e osteomielite (HAN et al., 2017). Por sua vez, o espaçador de PMMA tem a função de evitar o colapso entre as extremidades ósseas e entre os tecidos moles circundantes, além de evitar invasão de tecido fibroso no local receptor (MASQUELET et al., 2000). Além disso, o espaçador é capaz de induzir uma reação inflamatória local, formando assim uma membrana de encapsulação (VIATEAU et al., 2010).

A membrana biológica criada é ricamente vascularizada, sua parte interna é formada por epitélio como sinóvio e a parte externa é composta por fibroblastos, miofibroblastos e colágeno, além de secretar fatores de crescimento (VEGF, TGF Beta 1 e BMP-2) (MASQUELET e BEGUE, 2010). Segundo Han et al. (2017), a vascularização ocorre em todas as camadas da membrana e os vasos são apontados na orientação do osso. Além disso, a expressão de VEGF, e BMP-2 diminui um mês após a implantação do espaçador de cimento. Em termos de propriedades biológicas, a membrana induzida parece ter certas similaridades com o periósteo.

A segunda etapa é realizada após seis a oito semanas, o espaçador é retirado com muita cautela, preservando-se a membrana (MASQUELET et al., 2000). Em seguida, realiza-se a colocação do enxerto ósseo no tubo formado e sutura-se a membrana e os tecidos moles adjacentes, formando um sistema de contenção (MASQUELET et al., 2000; MASQUELET e BEGUE, 2010). A membrana produzida é capaz de impedir a reabsorção do enxerto ósseo, favorecendo a vascularização e a corticalização (MASQUELET, 2003; MASQUELET e BEGUE, 2010).

De acordo com Masquelet (2017), o padrão ouro é o osso esponjoso colhido da crista ilíaca, sendo osso córtico-esponjoso não recomendado, porque não será revascularizado pela membrana. O aloenxerto de osso esponjoso pode ser associado desde que não exceda um terço, porque o aloenxerto não contém células tronco e fatores de crescimento. Além disso, quando a quantidade de auto-enxerto é insuficiente, podem ser empregados substitutos ósseos como complementação, tais como uma combinação de hidroxiapatita (20%) e fosfato beta tricálcico (80%) (MASQUELET e BEGUE, 2010; MASQUELET, 2017). A corticalização do segmento ósseo reconstruído é obtida em poucos meses e independe do tamanho inicial do defeito (MASQUELET, 2017).

Com base em reconstruções efetuadas em 35 pacientes humanos, com defeitos que variaram de cinco a 25 cm, Masquelet (2003) ressaltou quatro pontos importantes que foram observados: nenhuma reabsorção do enxerto foi verificada pela avaliação radiográfica; o tempo da consolidação óssea foi independente do comprimento da reconstrução; a reconstrução de defeitos acima de 25 cm foi possível com enxerto ósseo esponjoso; o enxerto esponjoso pode ser usado mesmo se o leito receptor foi irradiado ou infectado, desde que o envelope protetivo tenha sido criado.

Com relação ao formato do espaçador, Masquelet (2017) citou que podem ser usados, em pacientes humanos, em três formatos: cilindro, pérolas e seixo plano. O mais comum é o cilindro que é aplicado antes de sua solidificação. Este deve ser tão grande quanto possível, porém sem comprometimento do fechamento dos tecidos moles e pele. O cimento não deve envolver as extremidades externamente, já que pode ser um fator de não-união

Pelissier et al. (2004) verificaram as características de membranas induzidas pela implantação de cilindros de PMMA no subcutâneo de coelhos. As análises histológicas realizadas com duas, quatro, seis e oito semanas de pós-operatório mostraram uma intensa vascularização. Na sexta e oitava semanas havia um menor número de células gigantes multinucleadas. Como a superfície do espaçador de cimento era lisa, ocorreu uma rara hiperplasia vilosa e pouca reação de corpo estranho. A imuno-histoquímica revelou a produção de fatores de crescimento e osteoindutivo (BMP-2), sendo a máxima produção deste último com quatro semanas. Altas concentrações de VEGF e TGF- β 1 foram encontradas na segunda semana e se mantiveram estáveis nas semanas seguintes. Segundo os autores, a membrana foi capaz de secretar fatores de crescimento, os quais atuam para proporcionar adequada vascularização e assim formação óssea, e pelos achados a reconstrução óssea poderia ser mais precocemente efetuada.

Cilindros de polimetilmetacrilato foram moldados *ex vivo*, por Liu et al. (2013), e colocados em três locais - subcutâneo, intramuscular e defeitos radiais - usando coelhos como modelos. Na região subcutânea as membranas se desenvolveram mais rapidamente e foram mais espessas, porém tinham densidade mais baixa de microvasos e não foram capazes de otimizar a formação óssea tão bem quanto a membrana induzida em defeito ósseo. Por sua vez, as membranas colocadas intramusculares se desenvolveram mais tarde e foram mais finas. As membranas nos defeitos ósseos tiveram a maior densidade de microvasos.

Henrich et al. (2013) avaliaram a membrana induzida pela técnica de Masquelet em defeitos ósseos no fêmur e em bolsas subcutâneas, empregando ratos como modelo. As membranas foram similares em ambos os locais e diferiram do periósteo com respeito as características estruturais, localização de vasos sanguíneos e espessura. Membranas induzidas no defeito ósseo (duas semanas) e o periósteo continham células mesenquimais (STRO-1+), as quais não foram observadas nas membranas induzidas no subcutâneo. BMP-2, TGF β e VEGF foram significativamente elevadas em membranas no defeito ósseo comparados as do subcutâneo. A atividade neovascular e osteogênica nas membranas foi máxima entre duas e quatro semanas e diminuiu

após seis semanas, sugerindo que a segunda fase da técnica pode ser efetuada mais cedo.

Fischer et al. (2016) quantificaram níveis séricos de três ocitocinas importantes na consolidação óssea, Fator de Crescimento Transformador beta (TGF- β), Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF-AB) e Fator de Crescimento de Insulina Tipo 1 (IGF-1), em pacientes humanos tratados com a técnica de Masquelet e pacientes com consolidação óssea normal. Estes pacientes foram divididos em três grupos: G1 (10 pacientes) com não-uniões de ossos longos, tratados com sucesso pela técnica de Masquelet; G2 (6 pacientes) tratados pela mesma técnica, mas sem sucesso; G3 (10 pacientes) com fraturas de ossos longos e consolidação óssea normal. Foram notadas altas expressões do TGF- β 1 em pacientes do G3, o qual exerceu papel importante na consolidação normal da fratura, ao passo que altos níveis séricos de PDGF-AB e IGF-1 foram correlacionados com uma terapia bem-sucedida na técnica de Masquelet.

Segundo Han et al. (2017), estudos têm mostrado que diferentes cimentos e o uso de antibióticos suplementares têm efeito significativo na membrana induzida. Entre os antibióticos usados estão a gentamicina, tobramicina e vancomicina. Contudo, o uso de antibiótico deve ser usado com cuidado, porque pode mascarar o debridamento inadequado. Por sua vez, Masquelet (2017) afirmou que faltam informações se os antibióticos modificam as propriedades biológicas da membrana. Além disso, como outros componentes do cimento podem influenciar na formação da membrana, tem sido utilizado cimento com sulfato de bário, o qual é o produto radiopaco mais irritante.

Nau et al. (2016) demonstraram, em modelo de defeito crítico do fêmur de ratos, que aditivos ao espaçador de polimetilmetacrilato, tais como antibióticos e carbonato de cálcio, afetam a espessura e proporção de fibras elásticas da membrana induzida. O conteúdo de células tronco, vascularização e proliferação celular foram mensurados usando imuno-histoquímica para detecção, respectivamente, de células positivas de STRO-1, fator de von Willebrandt e CD31, bem como Ki76 e CD14. De modo geral, independente do grupo, a análise histológica revelou um tecido vascularizado, rico em células, com estruturas fibrosas orientadas paralelas ao espaçador. As células

localizadas nas camadas de membrana mais afastadas do espaçador foram alongadas e orientadas paralelamente ao cimento, ao passo que as células na camada adjacentes ao cimento foram pequenas e redondas em formato.

Para compreender se a função da membrana induzida é biológica ou física, já que os fatores biológicos atribuídos a membrana são verificados no hematoma de fratura, defeitos de 3,5 cm foram induzidos na ulna de coelhos com seis meses de idade, por Tarchala et al. (2017). Os coelhos foram então divididos em: grupo controle – submetido à técnica tradicional de Masquelet, substituição por membrana de politetrafluoroetileno poroso ou não poroso preenchido com aloenxerto. Segundo os autores, não foi usada imobilização da ulna, porque o rádio atua como o osso de suporte de peso primário e promove estabilidade. Foram realizadas análises por Micro-CT e exames histológicos com fosfatase alcalina, fosfatase ácida resistente ao tartarato e coloração de von Kossa. Pelos resultados, o papel da membrana é principalmente como barreira física.

Yilmaz et al. (2018) avaliaram, na técnica de Masquelet, o emprego do gel rico em fibrina ao redor do polimetilmetacrilato, em defeito crítico de 15 mm induzido no rádio de coelhos, o qual foi estabilizado com placa e parafusos. Os animais foram submetidos à eutanásia em dois períodos, três e seis semanas de pós-operatório. Os resultados das análises imuno-histoquímicas e histopatológicas mostraram que a qualidade da membrana foi melhor no grupo que recebeu o gel rico em fibrina em relação à inflamação (MAC387) e proliferação (Ki67), nos dois períodos de avaliações. Com respeito às células tronco (STRO-1) e proporção de fibras elásticas (analisada em Van Gieson 40X) houve melhora apenas na fase inicial, e vascularização (CD31) e espessura da membrana (mensurada em HE 40X) apenas na fase tardia das análises.

2.2 Laser de baixa intensidade

A palavra LASER é uma sigla em inglês (*light amplification by stimulated emission of radiation*), a qual em português significa “amplificação da luz por emissão estimulada de radiação” (VINCK et al., 2003). Quanto ao tipo, segundo Cavalcanti et al. (2001), os lasers são divididos naqueles de alta intensidade e nos de baixa intensidade. Os lasers de alta intensidade possuem

poder destrutivo, sendo utilizado em procedimentos cirúrgicos como cortes, coagulação e cauterização, ao passo que os de baixa intensidade não possuem capacidade destrutiva, auxiliam no tratamento de diversas enfermidades, feridas, situações pós-cirúrgicas, contusões, artrite crônica, dermatose, dor crônica, entre outras.

Os lasers de baixa intensidade mais utilizados em procedimentos terapêuticos são o de Hélio-Neônio (HeNe) e o diodo (AsGa, AlGaInP, AsGaAl) (SHIELDS e O'KANE, 1994). O laser He-Ne utiliza uma associação de Hélio e Neônio, com potência variando entre cinco e 30mw e comprimento de onda de 632.8nm, que está situada dentro da faixa visível do espectro de luz, mais precisamente na região de cor vermelha (TUNER e HODES, 2010). Segundo SHIELDS e O'KANE (1994), os lasers de diodo são emissores de luz especializadas, baseados em junções positivo-negativo de semicondutores; o de Arseneto de Gálio (AsGa) apresenta comprimento de onda de 904,0 nm com forma de onda pulsada, feixe de luz invisível e potência de pico variando de 15 a 30 mW. O de Alumínio-Gálio-Índio-Fósforo (AlGaInP) possui 670,0 nm de comprimento de onda, pulso contínuo, feixe de luz visível e potência de 15 a 30 mW. O laser de Arseneto-Gálio-Alumínio (AsGaAl) apresenta comprimento de onda de 830,0 nm forma de onda é contínua, feixe de luz invisível e potência pico de 30 mW.

De acordo com Campana et al. (1998), os efeitos da terapia com laser de baixa intensidade podem ser divididos em primários e secundários. Quanto aos efeitos primários, podem ser citados os efeitos bioquímicos e bioelétricos, sendo que o efeito bioquímico inclui o controle da produção de substâncias como prostaglandinas, prostaciclina, serotonina, bradicinina, histamina, leucotrienos, entre outras.

Guirro e Guirro (2004) afirmaram que a irradiação laser atua nos tecidos vivos estimulando inicialmente a liberação de substâncias pré-formadas como, por exemplo, histamina, serotonina, bradicinina, ou modificando as reações enzimáticas normais, tanto no sentido de excitação como de inibição. É também capaz de alterar reações enzimáticas, estimulando ou inibindo a produção de ATP ou a síntese de prostaglandinas. Por sua vez, Passarella et al. (1984) confirmaram que a radiação laser é capaz de promover e acelerar

processos mitóticos, por meio da estimulação e produção de ATP. Ainda, verificaram que após a irradiação ocorre a geração de potenciais eletroquímicos, que seriam responsáveis pela normalização da atividade das membranas, caracterizando assim os efeitos bioelétricos.

Quanto aos efeitos secundários, Guzzardella et al. (2002) afirmaram que o laser estimula o trofismo celular e a microcirculação. Ao irradiar um tecido vivo, com o laser de baixa intensidade há aumento da produção de ATP e da velocidade de mitose, o qual por sua vez estimula a neoformação vascular e a multiplicação celular. No sistema circulatório atua no esfíncter pré-capilar, por meio de mediadores químicos que promovem seu fechamento ou abertura de forma constante, estimulando assim a microcirculação (BENEDICENTI et al., 1984).

Por promover microvasodilatação e neovascularização a terapia laser é eficaz no tratamento de feridas cutâneas (KURT et al., 1989; SHIELDS e O'KANE, 1994), reduz o edema por melhorar o fluxo linfático, promove formação de tecido de granulação, aumenta a atividade dos fibroblastos e a síntese de tecido colágeno, aumenta o número de mastócitos e macrófagos, resultado na aceleração da revitalização (SIMUNOVIC et al., 2000). Possui efeito analgésico, promovendo o alívio da dor, especialmente nos casos de dor crônica, por meio da liberação de beta-endorfinas (CASALECHI et al., 2014; KERPPERS et al., 2015). Reduz a inflamação por estimular a reabsorção de exsudatos, eliminação de substâncias alógenas, por interferir na síntese de prostaglandinas, eliminação de substâncias catabólicas, redução do consumo de oxigênio e da glicose pelas células (ASSIS et al., 2012; ZAGATTO, 2016). Ainda atua na reparação de lesão muscular (FELISMINO et al., 2014), regeneração de nervos periféricos (MASHHOUDI et al., 2017) e tem efeito bactericida (SOUSA et al., 2014), entre outros.

O laser de baixa intensidade pode agir no controle da produção de substâncias como prostaglandinas, prostaciclina, serotonina, bradicinina, histamina, leucotrienos, entre outras (CAMPANA et al., 1998). Também é capaz de alterar reações enzimáticas, estimulando ou inibindo a produção de ATP (GUIRRO e GUIRRO, 2004), aumenta a velocidade de mitose, que por sua vez estimula a neoformação vascular e a multiplicação celular (GUZZARDELLA et al., 2002).

Ademais, a terapia laser promove o aumento da secreção de fatores de crescimento, como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fatores de crescimento fibroblasto básico (FGF-2), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de necrose tumoral (TNF- α) e TGF- β (fator de crescimento transformador beta) (KIPSHIDZE et al., 2001; WHELAN et al., 2001; HOEBEN et al., 2004).

Kipshidze et al. (2001) comprovaram que a irradiação do laser aumentou a secreção de fatores de crescimento, como VEGF, TGF- β , além de estimular a proliferação de células endoteliais humanas cultivada *in vitro* em todos os tipos celulares estudados. Whelan et al. (2001) também verificaram o aumento dos níveis de fator de crescimento, após a terapia com laser em feridas cirúrgicas de ratos, observando aumento dos fatores de crescimento fibroblástico básico (FGF-2) e VEGF. Outros estudos demonstram a capacidade do laser de baixa intensidade em biomodular a expressão de outros fatores de crescimento como EGF (fator de crescimento epidérmico), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) e TNF- α (fator de crescimento de necrose tumoral) (HOEBEN et al., 2004).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é uma proteína homodimérica, a qual tem a capacidade de aumentar a vascularização tecidual, por meio da indução da migração e proliferação de células endoteliais, contribuindo assim para a angiogênese local (FERRARA, 1996). O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) é uma proteína catiônica dimérica, a qual interfere em vários eventos celulares e moleculares, como na regeneração dos tecidos, proliferação celular, quimiotaxia e síntese de matriz extracelular (LYNCH et al., 1991). Estudos vêm demonstrado a importância desses fatores no processo de regeneração óssea, pois este processo necessita de um aporte sanguíneo adequado e o VEGF desempenha este papel (KERAMARIS et al., 2008), como também o PDGF, a qual atua na remodelação óssea por promover a migração e proliferação de osteoblastos e uma melhor secreção de osteoclastos (KUBOTA et al., 2002).

De acordo com Pinheiro e Gerbi (2006), a terapia laser tem sido empregada com sucesso na melhora da regeneração óssea em diversas

condições, incluindo fraturas ósseas, alvéolo pós-extração, implantes dentários, entre outros. O osso irradiado, principalmente com comprimentos de onda infravermelhos, tem mostrado proliferação osteoblástica aumentada, deposição de colágeno e neoformação óssea. Parece que a terapia laser melhora a produção da matriz óssea pelo aumento da vascularização e efeitos anti-inflamatórios. Contudo, o efeito é mais efetivo se o tratamento é efetuado nos estágios iniciais, quando ocorre uma alta proliferação celular, ou seja, nas fases iniciais de proliferação de ambos fibroblastos e osteoblastos tão bem quanto na diferenciação de células mesenquimais. Além disso, o efeito na regeneração óssea depende não somente da dose de irradiação, mas também na duração e modo de irradiação.

Em estudo de revisão efetuado por Silva et al. (2010), foi citado que a terapia laser auxilia no processo de reparo tecidual em geral, incluindo o tecido ósseo, por alterar o comportamento celular e aumentar a formação vascular, assim como pela produção de colágeno, fibroblasto e tecido epitelial. Contudo, há grande variação em protocolos, materiais e comprimentos de onda, o que dificulta a comparação dos resultados.

Freitas et al. (2017) avaliaram o efeito da terapia por fotobiomodulação associada à regeneração óssea guiada, em defeitos de tamanho crítico em ratos. A maior produção de novo osso foi no grupo fotobiomodulação e membrana de colágeno, seguida pelos grupos fotomodulação, membrana de colágeno, osso autógeno com fotomodulação, e osso autógeno com fotomodulação mais membrana. Foi usado laser GaAlAs, em modo contínuo, espectro infravermelho, comprimento de onda de 808nm, densidade de energia de 210 J/cm² por ponto.

Em estudo sistemático efetuado por Escudero et al. (2019), a terapia com laser de baixa intensidade (ou fotobiomodulação) mostrou-se capaz de auxiliar no processo de nova formação óssea, encurtando o período de recuperação das lesões, principalmente devido a aumentada deposição de hidroxiapatita e colágeno na matriz, melhorando as propriedades biomecânicas do osso, aumentando a expressão de genes e proteína ósseas, e favorecendo a proliferação vascular.

Gerbi et al. (2018) avaliaram a eficácia da fotobiomodulação em defeitos ósseos críticos induzidos no fêmur de ratos (cavidade de 3 mm), os

quais foram também incluídos BMPs e membranas biológicas bovinas. Os grupos irradiados receberam sete aplicações do laser de diodo AlGaAs (830 nm, P = 40 mW, modo de emissão de onda contínua, para um total de 16 J/cm² por sessão). A análise histológica (colorações HE e Picrosirius) mostrou que a terapia por fotomodulação foi efetiva no reparo ósseo, principalmente quando associado com BMPs e uma membrana biológica.

Luca et al. (2020) analisaram o efeito da fotobiomodulação em defeitos promovidos no calvário de ratos (5 mm em diâmetro). Foram constituídos três grupos: controle negativo (sem tratamento); controle positivo - preenchido com xenoenxerto e coberto com membrana de colágeno, sem laser; teste - preenchido com xenoenxerto e coberto com membrana de colágeno e receberam laser de GaAlAs a cada 48 horas, por 14, 21 e 30 dias pós-operatórios. Segundo os autores, a fotobiomodulação proporcionou maior quantidade de volume ósseo, porém isto foi evidente apenas durante os primeiros 14 dias após a cirurgia. Dose administradas além de duas semanas após a cirurgia não pareceram efetivas.

2.3 Tecido ósseo

O tecido ósseo é considerado um tipo de tecido conjuntivo altamente especializado, formado por células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, bem como pela matriz óssea, a qual é composta por substâncias orgânicas e inorgânicas (ANDIA et al., 2006). A matriz é mineralizada e possui um certo grau de elasticidade, além de ser a maior reserva primária de cálcio (DEMPSTER, 1999).

A parte orgânica é composta em sua maioria por colágeno tipo I (95%), glicosaminoglicanos e proteoglicanos, e glicoproteínas (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004; LIRANI, 2004). A porção inorgânica é constituída por vários íons, como fosfato, cálcio, bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato, sendo que os sais de cálcio e fosfato se encontram em maior concentração e formam cristais de hidroxiapatita (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004; LIRANI, 2006).

As células que compõem o tecido ósseo, osteoblastos, osteoclastos e osteócitos, são de originárias de células osteoprogenitoras (LIRANI, 2006). As células osteoprogenitoras são de origem mesenquimal e possuem poder de diferenciação e proliferação em células formadoras de tecido ósseo, os osteoblastos. Os osteoblastos são células jovens com intensa atividade metabólica, responsáveis pela produção da parte orgânica da matriz óssea (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Após a formação da matriz e sua mineralização, os osteoblastos transformam-se em osteócitos (ANDIA et al., 2006). Os osteócitos são células maduras que não se diferenciam, estão localizados em lacunas dentro da matriz óssea, e tem como principal função a manutenção da regeneração óssea (LIRANI, 2006). Os osteoclastos são células gigantes multinucleadas, derivadas de macrófagos, participam dos processos de reabsorção e remodelação do tecido ósseo, por meio de mecanismos celulares que dissolve hidroxapatita e secreta collagenase e outras substâncias que degradam a matriz óssea (BETTI, 2011).

2.4 Consolidação óssea

A consolidação óssea pode ser dividida em três fases: inflamatória, reparo e remodelação (DYCE et al., 2004; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; SOUSA, 2008). A fase inflamatória ocorre imediatamente após o trauma, em que há a formação do hematoma (DYCE et al., 2004). O exsudato do hematoma contém mediadores inflamatórios, fatores angiogênicos e do crescimento liberados pelas plaquetas, mastócitos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos (DYCE et al., 2004; SOUSA, 2008). Inicialmente ocorre secreção de fator de necrose tumoral alfa ($TNF-\alpha$), interleucinas pelos macrófagos, células inflamatórias e células de origem mesenquimais (GERSTENFELD et al., 2003), as quais recrutam células inflamatórias, aumentam a síntese da matriz extracelular e estimulam a angiogênese (SFEIR et al., 2005). O $TNF-\alpha$ tem importante papel nesta fase, pois promove o recrutamento de células-tronco mesenquimais e induz a apoptose de condrócitos hipertróficos, os quais prejudicariam a formação óssea endocondral (KAYAL et al., 2007). Entre as interleucinas presentes nesta fase, a IL-1 e IL-6 são as mais importantes no

processo de regeneração óssea (KON et al., 2001; SFEIR et al., 2005). A IL-1 é produzida pelos macrófagos na fase aguda da inflamação e induz a produção de IL-6 nos osteoblastos, estimula a produção do calo cartilaginoso primário e promove angiogênese no local (KON et al., 2001; SFEIR et al., 2005; LEE e LORENZO, 2006). A IL-6 estimula a angiogênese, a produção do VEGF e atua na diferenciação de osteoblastos e osteoclastos (YANG et al., 2007).

As proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) são produzidas por células mesenquimais, osteoblastos e condrócitos, tendo por função o estímulo a quimiotaxia, proliferação e diferenciação de células mesenquimais, angiogênese e síntese da matriz extracelular (SAKOU, 1998; REDDI, 2001). O fator de crescimento transformador beta (TGF- β) são proteínas produzidas pela degranulação plaquetária, que estão presentes em todo o processo de condrogênese e formação endocondral, além de induzir a expressão de proteínas da matriz extracelular (CHO et al., 2002; LIEBERMAN et al., 2002).

As células troncos mesenquimais são de grande importância para a regeneração óssea, as quais ao serem recrutadas da medula óssea, dos tecidos moles adjacentes e no local da lesão, proliferam e se diferenciam em células osteogênicas (GRANERO-MOLTO et al., 2009; KITAORI et al., 2009). Durante o processo da formação do calo ósseo, as células troncos mesenquimais são recrutadas e ativam a cascata de colágeno tipo I e II, as quais juntamente com o TGF- β 2 e TGF- β 3 realizam a condrogênese e a ossificação endocondral (CHO et al., 2002; MARSELL e EINHORN, 2009). Já as BMP-5 e BMP-6 induzem proliferação celular na ossificação intramembranosa (CHO et al., 2002; MARSELL e EINHORN, 2009).

O processo de revascularização e neoangiogênese é regulado por vias moleculares, a via angiopoietina-dependente e a via de VEGF-dependentes (TSIRIDIS et al., 2007). As angiopoietinas (Ang) possuem quatro ligantes (Ang-1, Ang-2, Ang-3 e Ang-4), das quais a Ang-1 e 2 são as mais bem estudadas (THOMAS e AUGUSTIN, 2009). A Ang-1 promove a reorganização das células endoteliais, mantendo a integridade estrutural dos vasos sanguíneos, ainda inibe a ativação da barreira endotelial vascular e reduz vazamentos e a migração de leucócitos induzidos por agentes inflamatórios (KAPPOU et al., 2015). A Ang-2 torna as células mais sensíveis ao VEGF estimulando a angiogênese, porém por

atuar como antagonista da Ang-1, por romper as ligações entre o endotélio e as células perivasculares, resultando em morte celular e regressão vascular, caso os estímulos angiogênicos sejam insuficientes (WERNER e GROSE, 2003).

Os osteoblastos e condrócitos hipertróficos expressam altos níveis de VEGF no início do processo de regeneração óssea, promovendo o crescimento de ramos colaterais de vasos já existentes no periósteo, além de vasos de maior calibre (LEHMANN et al., 2005). Altos níveis de VEGF também promovem a transformação de uma matriz cartilaginosa avascular em um tecido ósseo vascular (KERAMARIS et al., 2008). O VEGF é responsável pela angiogênese (crescimento de novos vasos a partir de outros já existentes), agregação e proliferação de células endoteliais e células tronco mesenquimais em um plexo vascular, pela neoangiogênese e revascularização do local da fratura (KANCZLER e OREFFO, 2008). Sabe-se que quanto maiores as concentrações de VEGF, melhor será a consolidação da fratura, enquanto o bloqueio de receptores do VEGF inibe o crescimento vascular, resultando em atrasos ou até impedimento do processo regenerativo (Al-AQL et al., 2008; KERAMARIS et al., 2008).

O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) são secretados a partir de grânulos alfa de plaquetas, de células endoteliais, células vasculares do músculo liso e macrófagos (MEYER-INGOLD e EICHNER, 1995). A liberação, logo em seguida da lesão óssea, leva ao aumento da proliferação e quimiotaxia de osteoblastos, e da síntese de colágeno, que em associação com o TGF- β , estimula a diferenciação das células osteoblásticas. (FUJII et al., 1999; BOULETREAU et al., 2002). Além disso, o PDGF tem papel na remodelação do tecido conjuntivo por meio da estimulação da collagenase (BAUER et al., 1985), atuam na remodelação óssea por estimular a migração e proliferação de osteoblastos e uma melhor secreção de osteoclastos (KUBOTA et al., 2002). Juntamente com outros fatores, é considerado um componente essencial na consolidação óssea, uma vez que sua ausência está relacionada com a má consolidação (BROWNLOW et al., 2001).

3 REFERÊNCIAS

- AL-AQL, Z.S.; ALAGL, A.S.; GRAVES, D.T.; GERSTENFELD, L.C.; EINHORN, T.A. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction. *J. Dent. Res.*, v.87, n.2, p.107-118, 2008.
- ANDIA, D.C.; CERRI, P.S.; SPOLIDORIO, L.C. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. *Rev. Odontol. UNESP*, v.35, n.2, p.191-198, 2006.
- ASSIS, L.; MORETTI, A.I.; ABRAHÃO, T.B.; CURY, V.; SOUZA, H. P.; HAMBLIN, M.R.; PARIZOTTO, N.A. Low-level laser therapy (808 nm) reduces inflammatory response and oxidative stress in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. *Lasers Surg. Med.*, v.44, p.726-35, 2012.
- BAUER, E.A.; COOPER, T.W.; HUANG, J.S.; ALTMAN, J.; DEUEL, T.F. Stimulation of in vitro human skin collagenase expression by platelet derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.84, n.12, p.4132-4136, 1985.
- BENEDICENTI, A.; VERRANDO, M.; CHERLONE, F.; BRUNETTI, O. Effect of a 904 nm laser on microcirculation and arteriovenous circulation as evaluated using telethermographic imaging. *Parodontol. Stomatol. (Nuova)*, v.23, n.2, p.167-178, 1984.
- BETTI, L.V.; BRAMANTE, C.M.; GRANJEIRO, J.M.; TAGA, E.M.; CESTARI, T. M.; TAGA, R. Repair of rabbit femur defects treated with bovine bone organic cancellous matrix in blocks or cortical matrix in micro granules. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v.26, p.1167-1175, 2011.
- BOULETREAU, P.J.; WARREN, S.M.; SPECTOR, J.A.; STEINBRECH, D.S.; MEHRARA, B.J.; LONGAKER, M.T. Factors in the fracture microenvironment induce primary osteoblast angiogenic cytokine production. *Plast. Reconstr. Surg.*, v.110, p.139-148, 2002.
- BROWNLOW, H.C.; REED, A.; SIMPSON, A.H. Growth factor expression during the development of atrophic non-union. *Injury*, v.32, n.7, p.519-524, 2001
- CAMPANA, V.; MOYA, M.; GAVOTTO, A.; JURI, H.; PALMA, J.A. Effects of diclofenac sodium and He: Ne laser irradiation on plasmatic fibrinogen levels

- in inflammatory processes. *J. Clin. Laser Med. Surg.*, v.16, n.6, p.317-320, 1998.
- CASALECHI, H.L.; FARIAS, M.A.C.; SILVA, E.A. Analysis of the effect of phototherapy in model with traumatic Achilles tendon injury in rats. *Lasers Med. Sci.*; v.29, n.3, p.1075–1081, 2014.
- CAVALCANTI, T.M.; ALMEIDA-BARROS, R.Q.; CATÃO, M.H.C.V.; FEITOSA, A.P.A.; LINS, R.D.A.U. Conhecimento das propriedades físicas e da interação do laser com os tecidos biológicos na odontologia. *Anais Bras. Dermatol.*, v.86, n.5, p.955- 960, 2011.
- CHO, T.J.; GERSTENFELD, L.C.; EINHORN, T.A. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J. Bone Miner. Res.*, v.17, n.3, p.513-520, 2002.
- COBOS, J.A.; LINDSEY, R.W.; GUGALA, Z. The cylindrical titanium mesh cage for treatment of a long bone segmental defect: description of a new technique and report of two cases. *J. Orthop. Trauma*, v.14, p. 54–59, 2000.
- DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. *Tratado de anatomia veterinária*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.11-16.
- DEMPSTER, D.W. New concepts in bone remodeling. In: SEIBEL, M.J.; ROBINS, S.P.; BILEZIKIAN, J.P. *Dynamics of bone and cartilage metabolism*. San Diego: Academic Press, 1999. cap.18, p.261-273.
- ESCUADERO, J.S.B.; PEREZ, M.G.B.; ROSSO, M.P.O.; BUCHAIM, D.V.; POMINI, K.T.; CAMPOS, L.M.G.; AUDI, M.; BUCHAIM, R.L. Photobiomodulation therapy (PBMT) in bone repair: A systematic review. *Injury*, v.50, n.11, p.1853-1867, 2019.
- FELISMINO, A.S; COSTA, E.C.; AOKI, M.S; FERRARESI, C.; ARAÚJO MOURA LEMOS, T.M.A.M.; VIEIRA, W.H.B. Effect of low-level laser therapy (808 nm) on markers of muscle damage: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Lasers Med. Sci.*, v.29, n.3, p.933-938, 2014.
- FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor. *Eur. J. Cancer*, v.32, p.13-22, 1996.
- FISCHER, C.; DOLL, J.; TANNER, M.; BRUCKNER, T.; ZIMMERMANN, G.; HELBIG, L.; BIGLARI, B.; SCHMIDMAIER, G.; MOGHADDAM, A. Quantification of TGF- β 1, PDGF and IGF-1 cytokine expression after fracture

- treatment vs. non-union therapy via Masquelet. *Injury*, v.47, n.2, p.342-9. 2016.
- FITCH, R.; KERWIN, S.; NEWMAN-GAUGE, H.; SINIBALDI, K.R. Bone autografts and allografts in dogs. *Compend. Contin. Educ. Vet.*, v.19, p.558-578, 1997.
- FREITAS, N.R.; GUERRINI, L.B.; ESPER, L.A.; SBRANA, M.C.; DALBEN, G.D.S.; SOARES, S.; ALMEIDA, A.L.P.F. Evaluation of photobiomodulation therapy associated with guided bone regeneration in critical size defects. *In vivo study. J. Appl. Oral Sci.*, v.26, p.1-11, 2018.
- FUJI, H.; KITAZAWA, R.; MAEDA, S.; MIZUNO, K.; KITAZAWA, S. Expression of platelet-derived growth factor proteins and their receptor alpha and beta mRNAs during fracture healing in the normal mouse. *Histochem. Cell Biol.*, v.112, n.2, p.131-138, 1999.
- GERBI, M.E.M.M.; MIRANDA, J.M.; ARRUDA, J.A.A.; MORENO, L.M.M.; CARNEIRO, V.S.M.; BRASILINO, N.C.; MENEZES, R.F.; BRUGNERA JUNIOR, A.; PINHEIRO, A.L.B. Photobiomodulation therapy in bone repair associated with bone morphogenetic proteins and guided bone regeneration: a histomorphometric study. *Photomed. Laser Surg.*, v.36, n.11, p.581-588, 2018.
- GERSTENFELD, L.C.; CULLINANE, D.M.; BARNES, G.L. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J. Cell. Biochem.*, v.88, n.5, p.873-884, 2003.
- GIANNOUDIS, P.V.; DINOPOULOS, H.; TSIRIDS, E. Bone substitutes: an update. *Injury*, v.36, p.S20-S27, 2005.
- GRANERO-MOLTO, F.; WEIS, J.A.; MIGA, M.I.; LANDIS, B.; O'REAR, L.; LONGOBARDI, L.; JANSEN, E.D.; MORTLOCK, D.P.; SPAGNOLI, A. Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. *Stem Cells*, v.27, n.8, p.1887-1898, 2009.
- GUGALA, Z.; GOGOLEWSKI, S. Healing of critical-size segmental bone defects in the sheep tibiae using bioresorbable polylactide membranes. *Injury*, v.33, n. Suppl 2, p.B71-76, 2002.
- GUIRRO, E; GUIRRO, R. *Fisioterapia dermatofuncional*. 3 ed. Barueri: Editora Manole Ltda, 2004. 584p.

- GUZZARDELLA, G.A.; FINI, M.; TORRICELLI, P.; GIAVARESI, G.; GIARDINO, R. Laser stimulation on bone defects healing: an in vitro study. *Laser Med. Sci.*, v.17, p.216-220, 2002.
- HAN, W.; SHEN, J.; WU, H.; YU, S.; FU, J.; XIE, Z. Induced membrane technique: advances in the management of bone defects. *Int. J. Surg.*, v.42, p.110-116, 2017.
- HENRICH, D.; SEEBACH, C.; NAU, C.; BASAN, S.; RELJA, B.; WILHELM, K.; SCHAIBLE, A.; FRANK, J.; BARKER, J.; MARZI, I. Establishment and characterization of the Masquelet induced membrane technique in a rat femur critical-sized defect model. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, v.10, n.10, p.382-396, 2016.
- HOEBEN, A.; LANDUYT, B.; HIGHLEY, M.S.; WILDIERS, H.; VANOOSTEROM, A.T.; DeBRUIJN, E.A. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol. Rev.*, v.56, n.4, p.549-80, 2004.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: _____. *Histologia básica*. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.136-148.
- KAPPOU, D.; SIFAKIS, S.; KONSTANTINIDOU, A.; PAPANTONIOU, N.; SPANDIDOS, D.A. Role of the angiopoietin/Tie system in pregnancy (Review). *Exp. Ther. Med.*, v.9, n.4, p.1091–1096, 2015.
- KAYAL, R.A.; TSATSAS, D.; BAUER, M.A.; ALLEN, B.; AL-SEBAEI, M.O.; KAKAR, S.; LEONE, C.W.; MORGAN, E.F.; GERSTENFELD, L.C.; EINHORN, T.A.; GRAVES, D.T. Diminished bone formation during diabetic fracture healing is related to the premature resorption of cartilage associated with increased osteoclast activity. *J. Bone Miner. Res.*, v.22, n.4, p.560-568, 2007.
- KANCZLER, J.M.; OREFFO, R.O. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur. Cells Mater.*, v.15, p.100-114, 2008.
- KERAMARIS, N.C.; CALORI, G.M.; NIKOLAOU, V.S. Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF. *Injury*, v.39, n.2, p.S45-S57, 2008.
- KERPPERS, I.I.; LIMA, C.J.; FERNANDES, A.B.; VILLAVERDE, A.B. Effect of light emitting diode (λ 627 nm and 945 nm λ) treatment on first intention healing: immunohistochemical analysis. *Lasers Med. Sci.*, v.30, p.397–400, 2015.

- KERT, J.; ROSE, L. *Clinical laser therapy: low level laser therapy*. Ballerup: Scandinavian Medical Laser Technology, 1989. p.160–162.
- KIPSHIDZE, N.; NIKOLAYCHIK, V.; KEELAN, M.H.; SHANKAR, L.R.; KHANNA, A.; KORNOWSKI, R.; LEON, M.; MOSES, J. Low-power helium: neo laser irradiation enhances production of vascular endothelial growth factor and promotes growth of endothelial cells in vitro. *Lasers Surg. Med.*, v.28, p.355-64, 2001.
- KITAORI, T.; ITO, H.; SCHWARZ, E.M.; TSUTSUMI, R.; YOSHITOMI, H.; OISHI, S.; NAKANO, M.; FUJII, N.; NAGASAWA, T.; NAKAMURA, T. Stromal cell-derived factor 1/CXCR4-signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model. *Arthritis Rheum.*, v.60, n.3, p.813-823, 2009.
- KLAUE, K.; ANTON, C.; KNOTHE, U.; RAMPOLDI, E.; MASQUELET, A.C.; PERREN, S.M. Biological implementation of “in situ” induced autologous foreign body membranes in consolidation of massive cancellous bone grafts. *J. Bone Joint Surg.*, v.79B (Suppl II), p.236, 1993.
- KON, T.; CHO, T.J.; AIZAWA, T.; YAMAZAKI, M.; NOOH, N.; GRAVES, D.; GERSTENFELD, L.C.; EINHORN, T.A. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related pro inflammatory cytokines during fracture healing. *J. Bone Miner. Res.*, v.16, n.6, p.1004-1014, 2001.
- KUBOTA, K.; SAKIKAWA, C.; KATSUMATA, M.; NAKAMURA, T.; WAKABAYASHI, K. Platelet-derived growth factor BB secreted from osteoclasts acts as an osteoblastogenesis inhibitory factor. *J. Bone Miner. Res.*, v.17, p.257-265, 2002.
- LEE, S.K.; LORENZO, J. Cytokines regulating osteoclast formation and function. *Curr. Opin. Rheumatol.*, v.18, n.4, p.411-418, 2006.
- LEHMANN, W.; EDGAR, C.M.; WANG, K. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) coordinately regulates the expression of specific matrix metalloproteinases (MMPs) and angiogenic factors during fracture healing, *Bone*, v.36, n.2, p.300-310, 2005.

- LIEBERMAN, J.R.; DALUISKI, A.; EINHORN, T.A. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J. Bone Joint Surg. Am.*, v.84, n.6, p.1032-1044, 2002.
- LIU, H.; HU, G.; SHANG, P.; SHEN, Y.; NIE, P.; PENG, L.; XU, H. Histological characteristics of induced membranes in subcutaneous, intramuscular sites and bone defect. *Orthop. Traumatol. Surg. Res.*, v.99, n.8, p.959-964, 2013.
- LIRANI, A.P.R.; JORGETTI, V.; SILVA, O.L. Comparative study of how low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound affect bone repair in rats. *Photomed. Laser Surg.*, v.24, p.735-740, 2006.
- LUCA, R.E.; GIULIANI, A.; MĂNESCU, A.; HEREDEA, R.; HOINOIU, B.; CONSTANTIN, G.D.; DUMA, V.F.; TODEA, C.D. Osteogenic potential of bovine bone graft in combination with laser photobiomodulation: an ex vivo demonstrative study in Wistar rats by cross-linked studies based on synchrotron microtomography and histology. *Int. J. Mol. Sci.*, v.21, n.E778, p.1-17, 2020.
- LYNCH, S.E.; CASTILLA, G.R.; WILLIAMS, R.C.; KIRITSY, C.P.; HOWELL, T.H.; REDDY, M.S. The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *J. Periodontol.*, v.62, p.458–67, 1991.
- MARSELL, R.; EINHORN, T.A. The role of endogenous bone morphogenetic proteins in normal skeletal repair. *Injury*, v.40, n.3, p.S4-S7, 2009.
- MASQUELET, A.C.; FITOUSSI, F.; BEGUE, T.; MULLER, G.P. Reconstruction of the long bones by the induced membrane and spongy autograft. *Ann. Chir. Plast. Esthet.*, v.45, n.3, p. 346–353, 2000.
- MASQUELET, A.C. Muscle reconstruction in reconstructive surgery: soft tissue repair and long bone reconstruction. *Langenbecks Arch. Surg.*, v.388, p.344–6, 2003.
- MASQUELET, A.C.; BEGUE, T. The concept of induced membrane for reconstruction of long bone defects. *Orthop. Clin. N. Am.*, v.41, p.27–37, 2010.
- MASQUELET, A.C. Induced membrane technique: pearls and pitfalls. *J. Orthop. Trauma*, v.31, n.Suppl 5, p.S36-S38, 2017.
- MASHHOUDI, B.M.; TAJZIEHCHI, M.; HEIDARI, M. H.; BUSHEHRI, A.; MOAYER, F.; MANSOURI, N.; SAFAVI, N.N.; MOVAFAGH, A. Stimulation

- effect of low level laser therapy on sciatic nerve regeneration in rat. *J. Lasers Med. Sci. Summer*, v.8 (Suppl 1), p.32-37, 2017.
- MEYER-INGOLD, W.; EICHNER, W. Platelet-derived growth factor. *Cell Biol. Int.*, v.19, n.5, p.389-398, 1995.
- NAU, C.; SEEBACH, C.; TRUMM, A.; SCHAIBLE, A.; KONTRADOWITZ, K.; MEIER, S.; BUECHNER, H.; MARZI, I.; HENRICH, D. Alteration of Masquelet's induced membrane characteristics by different kinds of antibiotic enriched bone cement in a critical size defect model in the rat's femur. *Injury*, v.47, n.2, p.325-334, 2016.
- PASSARELLA, S.; CASAMASSIMA, E.; MOLINARI, S.; PASTORE, D.; QUAGLIARIELLO, E.; CATALANO, I.M.; CINGOLANI, A. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. *FEBS Lett.*, v.175, n.1, p.95-99, 1984.
- PELISSIER, P.; MASQUELET, A.C.; BAREILLE, R.; PELISSIER, S.M.; AMEED, J. Induced membranes secrete growth factors including vascular and osteoinductive factors and could stimulate bone regeneration. *J. Orthop. Res.*, v.22, n.1, p.73-79, 2004.
- PINHEIRO, A.L.; GERBI, M.E. Photoengineering of bone repair processes. *Photomed. Laser Surg.*, v.24, n.2, p.169-178, 2006.
- REDDI, A.H. Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J. Bone Joint Surg. Am.*, v.83, p.S1-S6, 2001.
- SAKOU, T. Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. *Bone*, v.22, n.6, p.591-603, 1998.
- SCHULZ, K. Outras doenças de ossos e articulações. In: FOSSUM, T.W. *Cirurgia de pequenos animais*. 3ed. St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier, 2007. p.1333-1355.
- SFEIR, C.; HO, L.; DOLL, B.A.; AZARI, K.; HOLLINGER, J.O. Fracture repair. In: LIEBERMAN, J.R.; FRIEDLAENDER, G.E. *Bone regeneration and repair*. NJ: Humana Press, 2005. p.21-44.
- SHIELDS, D.; O'KANE, S. Laser photobiomodulation of wound healing. In: BAXTER, G.D. *Therapeutic lasers: theory and practice*. 1ed. Edinburgh: New York: Churchill Livingstone, 1994. p.89-138.

- SILVA, J.P.; SILVA, M.A.; ALMEIDA, A.P.; LOMBARDI JUNIOR, I.; MATOS, A.P. Laser therapy in the tissue repair process: a literature review. *Photomed. Laser Surg.*, v.28, n.1, p.17-21, 2010.
- SIMUNOVIC, Z. Laser in medicine and dentistry: basic science and up-to-date clinical application of low-level laser therapy. In: KLIMA, H. *Biophysical aspects of low level laser therapy*. Croatia: Vitagraf, 2000. p.75-125.
- SOUSA, G.R.; LEITE, N.F.; SILVEIRA, L.B.; SOARES, B.M.; GRECO, G.D.; FERREIRA, M.V.L. Terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento de candidíase em paciente com prótese total mucossuportada superior-relato de caso. *Full Dent. Sci.*, v.5, n.7, p.199-205, 2014.
- SOUSA, V.L.; ALVARENGA, J.; PADILHA FILHO, J.G.; CANOLA, J.C.; FERRIGNO, C.R.A.; ALVES, J.M.; DUARTE, L.R. Ultra-som pulsado de baixa intensidade em fraturas diafisárias: aplicação clínica em cães. *Ciênc. Rural*, v.38, p.1030-1037, 2008.
- TARCHALA, M.; ENGEL, V.; BARRALET, J.; HARVEY, E.J. A pilot study: Alternative biomaterials in critical sized bone defect treatment. *Injury*, v.49, n.3, p.523-531, 2018.
- THOMAS, M.; AUGUSTIN, H.G. The role of the Angiopoietins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis*, v.12, n.2, p.125–137, 2009.
- TUNER, J.; HODE, L. *The new laser therapy handbook*. Tallinn, Estônia: Prima Books AB, 2010. 847p.
- VIATEAU, V.; BENSIDHOUM, M.; GUILLEMIN, G.; PETITE, H.; HANNOUCHE, D.; ANAGNOSTOU, F.; PÉLISSIER, P. Use of the induced membrane technique for bone tissue engineering purposes: animal studies. *Orthop. Clin. North. Am.*, v.41, n.1, p.49-56, 2010.
- VINCK, E.M.; CAGNIE, B.J.; CORNELISSEN, M.J.; DECLEREQ, H.A.; CAMBIER, D.C. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. *Lasers Med. Sci.*, v.18, p.95-99, 2003.
- WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol. Rev.*, v.83, n.3, p.835-870, 2003.
- WHELAN, H.T.; SMITS, R.L. Jr.; BUCHMAN, E.V.; WHELAN, N.T.; TURNER, S. G.; MARGOLIS, D.A.; CEVENINI, V.; STINSON, H.; IGNATIUS, R.; MARTIN, T.; CWIKLINSKI, J.; PHILIPPI, A.F.; GRAF, W.R.; HODGSON, B.; GOULD, L.; KANE, M.; CHEN, G.; CAVINESS, J. Effect of NASA light-emitting diode

irradiation on wound healing. *J. Clin. Laser Med. Surg*, v.19, n.6, p.305-14, 2001.

ZAGATTO, A.M.; RAMOS, S.P.; NAKAMURA, F.Y.; LIRA, F.S.; LOPES-MARTINS, R.A.; CARVALHO, R.L.P. Effects of low-level laser therapy on performance, inflammatory markers, and muscle damage in young water polo athletes: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Lasers MedSci.*, v.31, n.3, p.511-521, 2016.

YANG, X.; RICCIARDI, B.F.; HERNANDEZ-SORIA, A.; SHI, Y.; CAMACHO, N.P.; BOSTROM, M.P.G. Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. *Bone*, v.41, n.6, p.928-936, 2007.

YILMAZ, O.; ÖZMERİÇ, A.; ALEMDAROĞLU, K.B.; CELEPLİ, P.; HÜCÜMENÖĞLU, S.; ŞAHİN, Ö. Effects of concentrated growth factors (CGF) on the quality of the induced membrane in Masquelet's technique - An experimental study in rabbits. *Injury*, v.49, n.8, p.1497-1503, 2018.

CAPÍTULO 2

TRABALHO CIENTÍFICO

Artigo científico a ser enviado para: Journal of Tissue Engineering
and Regenerative Medicine

Efeito da irradiação com laser de baixa intensidade na membrana induzida de Masquelet em coelhos

Resumo

O estudo avaliou a influência da irradiação laser de baixa intensidade no desenvolvimento e características da membrana de Masquelet, induzida de forma ortotópica em coelhos. Foram utilizados 12 coelhos com idade média de três meses. Em ambos os membros torácicos, foi induzida uma falha óssea segmentar de 1,0 cm de comprimento no rádio, a qual foi preenchida com um cilindro de cimento ortopédico. No período pós-operatório, em um dos membros a falha recebeu terapia laser de baixa intensidade (2J de energia) a cada 48 horas, durante 15 dias. As regiões das falhas segmentares foram avaliadas por exames ultrassonográficos e radiográficos. Seis animais foram submetidos à eutanásia com três semanas e seis com seis semanas de pós-operatório, para se proceder os exames histológicos e imuno-histoquímico das membranas de Masquelet. Em ambos os membros, radiograficamente notou-se na terceira semana de pós-operatório a presença de proliferação óssea ativa partindo das extremidades ósseas, sendo que na sexta semana o processo evolutivo mostrou-se em estágio mais avançado. O exame ultrassonográfico visibilizou, em ambos os membros, a presença da membrana induzida com uma semana de pós-operatório. Histologicamente não ocorreram diferenças estatísticas relativas ao escore semiquantitativo da intensidade de inflamação, número total de vasos sanguíneos, metaplasia óssea e colágeno. As espessuras médias das membranas induzidas foram 2050,17 μm e 1451,96 μm no membro controle e 2724,26 μm e 2081,03 μm no membro irradiado com laser, respectivamente na terceira e sexta semanas de pós-operatório. A expressão de VEGF e de PDGF foi presente nas membranas do membro controle e naquelas irradiadas, sem diferenças estatísticas. Foi possível concluir que pelos métodos de avaliação utilizados não foi possível comprovar estatisticamente a influência da irradiação laser de baixa intensidade sobre a membrana de Masquelet.

1. Introdução

A reconstrução de defeitos ósseos, em particular os segmentares extensos, causados por acidentes de alta energia ou por debridamento de fragmentos infectados, consiste em um dos maiores desafios na ortopedia (MASQUELET e BEGUE, 2010; VIATEAU et al., 2010; HAN et al., 2017). Várias técnicas de reconstrução têm sido propostas, desde o uso de enxertos até o uso do método de alongamento ósseo ou transporte ósseo (GIANNOUDIS et al., 2005; VIATEAU et al., 2010).

O auto enxerto esponjoso fresco é considerado o padrão ouro para a regeneração óssea, em virtude das propriedades osteogênicas, osteocondutivas e osteoindutivas (FITCH et al., 1997; GIANNOUDIS et al., 2005). Contudo, com o objetivo de assegurar que o enxerto implantado consiga realizar sua função, estudos têm sido desenvolvidos com o emprego de membranas de polímero sintético (GUGALA e GOGOLEWSKI, 2002), gaiolas de titânio (COBOS et al., 2000) e membrana induzida (membrana de Masquelet) (MASQUELET et al., 2000).

O desenvolvimento da membrana induzida pela técnica de Masquelet inclui duas etapas (MASQUELET et al., 2000; MASQUELET e BEGUE, 2010; HAN et al., 2017; MASQUELET, 2017). Na primeira etapa, realiza-se o debridamento do local, seguida da colocação do espaçador de cimento ósseo de polimetilmetacrilato (PMMA) no defeito ósseo (MASQUELET e BEGUE, 2010; VIATEAU et al., 2010; MASQUELET, 2017). Por sua vez, o espaçador de PMMA tem a função de evitar o colapso entre as extremidades ósseas e entre os tecidos moles circundantes, além de evitar invasão de tecido fibroso no local receptor (MASQUELET et al., 2000). Além disso, o espaçador é capaz de induzir uma reação inflamatória local, formando assim uma membrana de encapsulação (VIATEAU et al., 2010). A segunda etapa é realizada aproximadamente após seis a oito semanas, sendo o espaçador retirado, preservando-se a membrana (MASQUELET et al., 2000). Em seguida, realiza-se a colocação do enxerto ósseo no tubo formado e sutura-se a membrana e os tecidos moles adjacentes, formando um sistema de contenção (MASQUELET et al., 2000; MASQUELET e BEGUE, 2010). A membrana produzida é capaz de impedir a reabsorção do

enxerto ósseo, favorecendo a vascularização e a corticalização (MASQUELET, 2003; MASQUELET e BEGUE, 2010).

A terapia laser de baixa intensidade, ou fotobiomodulação, tem sido utilizada na melhora da regeneração óssea em diversas condições, incluindo defeitos e fraturas ósseas, alvéolo pós-extração, implantes dentários, entre outros (PINHEIRO e GERBI, 2006; ESCUDERO et al., 2019). Após a irradiação tem sido observado proliferação osteoblástica aumentada, neoformação óssea, deposição de hidroxapatita e colágeno, melhora das propriedades biomecânicas do osso, aumento da expressão de genes e proteínas ósseas, entre outros (PINHEIRO e GERBI, 2006; SILVA et al., 2010; ESCUDERO et al., 2019). Parece que a terapia laser melhora a produção da matriz óssea pelo aumento da vascularização e efeitos anti-inflamatórios (PINHEIRO e GERBI, 2006). Além disso, vários estudos de reconstrução óssea pela regeneração óssea guiada, com diferentes tipos de membrana, têm mostrado um aumento da produção óssea no grupo irradiado com laser de baixa intensidade, com ou sem o emprego conjunto de biomateriais no preenchimento do defeito (FREITAS et al., 2017; GERBI et al., 2018; LUCA et al., 2020).

Por outro lado, a influência da aplicação de fotobiomodulação durante o desenvolvimento da membrana induzida pela técnica de Masquelet aparentemente ainda não foi descrita. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar, por meio de exames radiográficos, ultrassonográficos, histológicos e imuno-histoquímicos, a influência da irradiação laser de baixa intensidade no desenvolvimento e características da membrana de Masquelet, induzida com o uso de cimento ósseo ortopédico em modelo de falha segmentar do rádio em coelhos. A hipótese foi que o emprego do laser promoveria uma membrana com características histológicas mais avançadas do que àquela induzida exclusivamente pelo cimento ósseo.

2. Materiais e Métodos

2.1. Animais e Ambiente de Experimentação

No presente estudo, a metodologia adotada foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (Unesp) – Botucatu, com número 0209/2018 ().

Foram utilizados 12 coelhos da raça Norfolk, fêmeas, com idade média de três meses (Desvio padrão: $\pm 0,41$ meses), pesando entre 2,04 kg e 3,13 kg (média $2,57 \text{ kg} \pm 0,35 \text{ kg}$), provenientes do Biotério Central da Unesp, Campus de Botucatu. Os animais foram alojados no Centro de Medicina e Pesquisa de Animais Selvagens (CEMPAS), em gaiolas individuais, com água e ração para coelhos (Presence Purina®) ad libitum.

Os animais foram divididos, por meio de randomização, conforme os momentos de observação no período pós-operatório, ou seja, seis com três semanas e seis com seis semanas, os quais foram respectivamente numerados de um a 12. Em todos os animais a falha segmentar do membro direito e esquerdo foram preenchidas com cimento ósseo. O laser de baixa intensidade foi aplicado em um dos membros operados, mediante a randomização.

2.2. Anestesia e Procedimento Cirúrgico

Os animais foram pré-medicadas com morfina (2 mg/kg) e midazolam (2 mg/kg), administrados por via intramuscular. Após 10 minutos, receberam anestesia dissociativa com cetamina (30mg/kg) e xilazina (0,5mg/kg), também administrados por via intramuscular no membro pélvico. Para manutenção do plano anestésico, receberam anestesia volátil com isoflurano por máscara.

Após a tricotomia dos membros torácicos direito e esquerdo, os coelhos foram posicionados em decúbito dorsal, para que se procedesse a antisepsia das áreas operatórias com clorexidina degermante a 2% e, posteriormente, com o clorexidina a 2% solução alcoólica. A porção distal à articulação antebraquiocárpica direita e esquerda foram isoladas com atadura de crepe estéril e, na sequência, foram dispostos os panos de campo operatório.

Inicialmente, foi realizado uma incisão longitudinal de pele na região craniomedial do terço médio-proximal do rádio direito. O tecido subcutâneo foi divulsionado para identificar os músculos extensor radial do carpo e extensor digital comum, os quais foram afastados. Foi então seccionado o músculo pronador redondo, isolando-se o rádio. Com o auxílio de uma serra óssea oscilatória foi induzida uma falha óssea segmentar de 1,0 cm de comprimento no terço médio-proximal do rádio (Figuras 1a e 1b). O periósteo foi removido juntamente com o osso (Figura 1c). A falha óssea foi preenchida com cilindros de cimento ortopédico à base de PMMA (Baumer Osteo-class; Baumer, Mogi-Mirim - São Paulo, Brasil) em fase sólida, confeccionados no momento do procedimento cirúrgico (Figura 1d).

Os músculos afastados foram aproximados com sutura contínua simples de poliglactina 910 no. 3-0, assim como o tecido subcutâneo. A síntese da pele foi procedida com pontos simples isolados empregando-se fio de náilon monofilamentar 3-0. O mesmo procedimento foi efetuado no rádio do membro esquerdo.

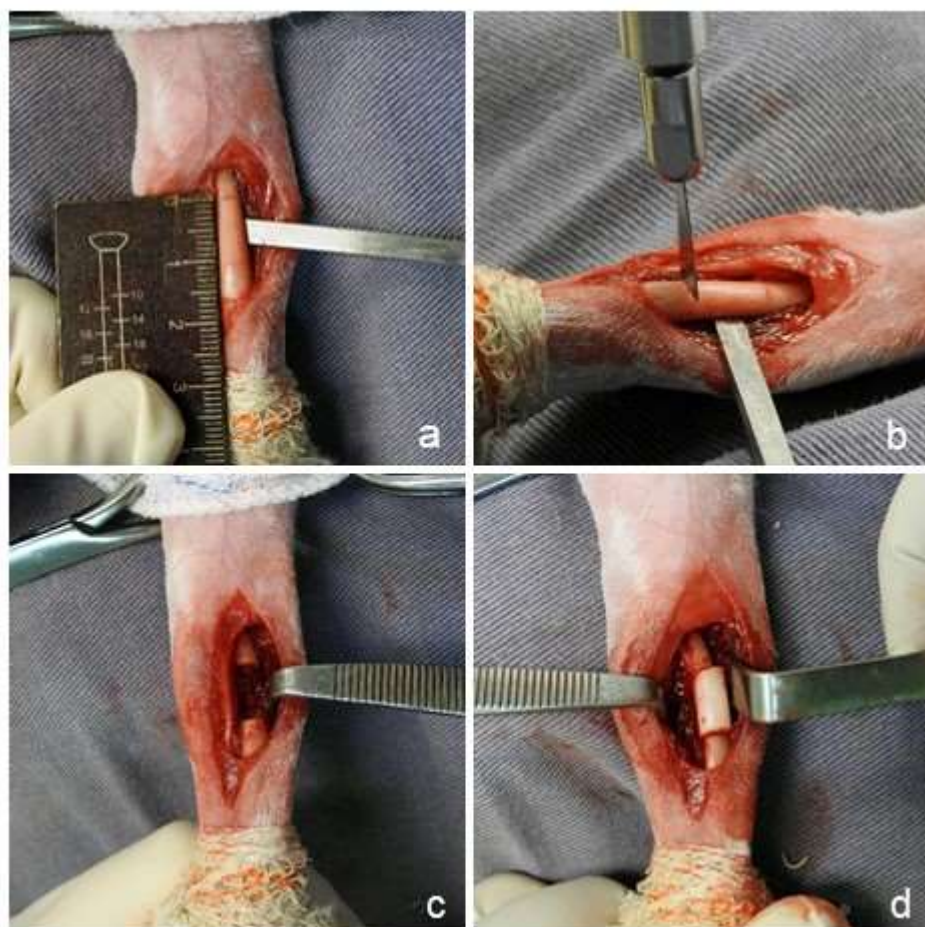


Figura 1. Etapas cirúrgicas para substituição da falha segmentar pelo cilindro de cimento ósseo e posterior desenvolvimento da membrana induzida de Masquelet em coelhos. (a) Isolamento do rádio e mensuração da falha óssea. (b) secção do segmento ósseo com auxílio da serra oscilatória. (c) Falha óssea segmentar. (d) Aplicação do cilindro de cimento ósseo na falha segmentar.

2.3. Condutas Pré-operatória e Pós-operatória

Após indução anestésica e no período pós-operatório foram administrados enrofloxacina (10mg/kg via subcutânea, a cada 24 horas, durante cinco dias), cloridrato de tramadol (10mg/kg via subcutânea, a cada 12 horas, durante cinco dias) e meloxicam (1mg/kg pré-cirúrgico e 0,5mg/kg no pós-operatório durante três dias, via subcutânea). Diariamente as feridas cirúrgicas foram limpas com solução salina 0,9%. Os pontos cutâneos foram removidos com 10 dias após o procedimento cirúrgico.

2.4. Terapia com Laser de Baixa Intensidade

Empregou-se um aparelho de laser portátil (Therapy XT, Laser DMC; São Carlos –São Paulo, Brasil) de Ga-Al-As diodo, com comprimento de onda de 808 nm, emissão contínua, potência de saída de 100 mW, densidade de potência 12, 70 W/cm², área do feixe de 0,028 cm², divergência de 0,45 rad $\pm$ 0,03 rad (Figura 2a). Com o coelho imobilizado pela contenção física, a aplicação do laser foi realizada por técnica pontual no membro torácico escolhido por sorteio, com a caneta do equipamento posicionada perpendicularmente ao centro da falha segmentar (Figura 2b). Foi utilizada radiação infravermelha por 20 segundos, fornecendo 2J de energia, a cada 48 horas, durante 15 dias.



Figura 2. (a) Equipamento de laser portátil de Ga-Al-As. (b) Aplicação do laser de baixa intensidade por técnica pontual, estando o coelho imobilizado por contenção física.

2.5. Avaliação Clínica

Diariamente, os animais foram observados quanto ao aspecto da ferida cirúrgica, presença ou não de edema nos membros, apoio ao solo, ingestão de ração e água, defecação e micção.

2.6. Avaliações Radiográficas e Ultrassonográficas

Radiografias do antebraço direito e esquerdo foram realizadas em posições médio-lateral e craniocaudal, imediatamente após o procedimento cirúrgico e com três e seis semanas de pós-operatório. Foi utilizado aparelho digital (GE DR-F; GE Healthcare; Barueri, São Paulo, Brasil), empregando distância foco-filme de um metro, com 45 kV, 8 mAs e 200 mA. Foram avaliados o posicionamento do cilindro de PMMA na falha segmentar, a reação dos tecidos e sinais de proliferação óssea.

Imediatamente após o procedimento cirúrgico e a cada sete dias foram realizados exames ultrassonográficos em modo B e com Doppler colorido na região da falha segmentar, afim de identificar o aparecimento da membrana induzida, bem como a presença ou não de neovascularização local (Figura 3). Foi utilizado equipamento ultrassonográfico equipado com transdutor linear de 8 a 13 MHz de frequências (LOGIQ-e; GE Healthcare). As imagens foram obtidas em planos sagital e medial, com o animal mantido sob contenção física.

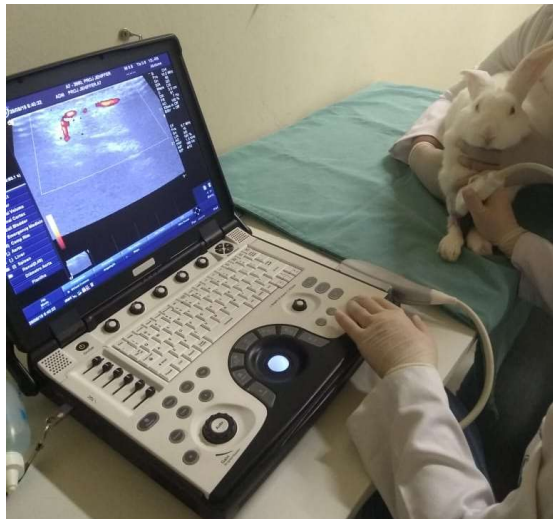


Figura 3. Exame ultrassonográfico na região da falha segmentar, estando o coelho imobilizado por contenção física.

2.7. Avaliação Histológica e Imuno-histoquímica

Para a realização do processamento histológico, os coelhos foram submetidos à eutanásia, sendo seis com três semanas (Grupo 1) e seis com seis semanas (Grupo 2) de pós-operatório. Para tanto, os animais receberam cloridrato de cetamina (50 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (1 mg/Kg), administrados por via intramuscular no membro pélvico. Na sequência foi aplicado cloreto de potássio a 19,1% intravenoso até ocorrer de parada cardiorrespiratória.

As amostras coletadas (membranas) foram fixadas em formol tamponado a 10%, durante 48 horas, e, após este período, foram acondicionadas e mantidas em álcool 70% até o processamento. As membranas foram processadas e incluídas em parafina, seguindo as técnicas de rotina do laboratório, com o material passando pelas fases de desidratação, clarificação, impregnação e inclusão. A partir dos blocos parafinados, confeccionaram-se cortes de 5µm, os quais foram distendidos sobre lâminas histológicas e corados pela coloração de hematoxilina e eosina (HE). Avaliou-se a composição das membranas quanto às características celulares e angiogênese. Foi utilizado escore semiquantitativo para classificar a intensidade de inflamação: grau 0 – ausente; grau 1 (leve): menos de 25%; grau 2 (moderado): entre 26% a 50%; grau 3 (intenso): acima de 51%. Para a quantificação da angiogênese foram contados os números de vasos sanguíneos presentes com auxílio de uma ocular com retícula de 1cm² (10 x10 mm) em objetiva de 40X. A mensuração da espessura das membranas foi realizada em triplicata em três regiões (esquerda, central e direita), usando o microscópio Olympus BX 53 operando com câmera DP-26 e software “CellSens Standard” e uma objetiva de 10x e aumento de 100x.

Para a realização da técnica de imuno-histoquímica, os blocos de parafina foram novamente cortados em micrótomo com espessura de 3 µm e distendidos em lâminas próprias para imuno-histoquímica (StarFrost, Knittel; Braunschweig, Alemanha) com o objetivo de promover maior aderência dos cortes às lâminas de vidro, evitando assim a perda do material durante o processamento imuno-histoquímico. As lâminas foram desparafinizadas em xilol e reidratadas em graduações decrescentes de álcool até a água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogênio 8% diluídos em

álcool metílico. A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato (pH 6,0) em uma panela de pressão (Pascal, Dako, Carpinteria, CA, EUA) por 10 minutos.

Foi utilizado anticorpos monoclonais VEGF de rato (Flk1, Abcam; Cambridge, Reino Unido), em diluição de 1: 300, e PDGF monoclonal de coelho (clone 26E1, sinalização celular; Danvers, MA, EUA) em diluição de 1: 200, durante 18 horas. Posteriormente, foi realizada a incubação com anticorpo secundário (Envision, Dako; Carpinteria, CA, EUA) por uma hora e as amostras foram incubadas com 3,30-diaminobenzidina (DAB, Dako; Carpinteria, CA, EUA) por cinco minutos. A contracoloração foi realizada com hematoxilina Harris por um minuto. Os controles positivos foram selecionados de acordo com as recomendações do Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org>). Para o VEGF foi utilizado fígado canino como controle positivo e para PDGF utilizou-se testículos caninos. As amostras foram avaliadas por microscopia óptica usando uma pontuação semiquantitativa de 0 a 4 (FONSECA-ALVES et al., 2018). Para a distribuição da marcação foi usado o seguinte escore: 0: ausência de marcação; 1: 1% a 25% das células são positivas; 2: 26% a 50% de células positivas; 3: 51% a 75% de células positivas; 4: > 75% de células positivas. Para o escore de intensidade empregou-se: negativo (0), fraco (1), moderada (2) e forte (3).

2.8. Análise Estatística

As variáveis contínuas foram avaliadas quanto sua distribuição com testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e análises gráficas (Histograma e QQ Plot). Foram utilizados testes de Qui-Quadrado e Fisher para verificar a associação entre o tipo de tratamento (laser ou controle) e a ocorrência das diferentes variáveis categóricas do estudo (presença de Vasos no exame ultrassonográfico; presença de metaplasia óssea e presença de colágeno no exame histológico) para cada momento avaliado. Para as variáveis histológicas (escore Inflamatório, número de vasos) e imuno-histoquímicas (distribuição e intensidade do VEGF e PDGF) o teste de Wilcoxon pareado foi utilizado para confrontar a mediana dos scores para os membros tratados com laser e os membros controle dentro de cada momento, e o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para confrontar a mediana de cada momento dentro de cada tratamento. A espessura média da membrana foi comparada entre os diferentes momentos e tratamentos utilizando

uma Análise de Variância seguida por Tukey. As análises foram efetuadas com o auxílio do GraphPad Prism (GraphPad, 2007) e do Statistical Analytical Software – SAS (SAS Institute, 2011). Foi considerado o nível de significância de 0,05.

3. Resultados

3.1. Avaliação clínica

No pós-operatório imediato, os animais não apoiavam o membro ao solo, porém não havia dor à palpação da área cirúrgica. Após 12 horas de pós-operatório, os coelhos retornaram o apoio ao solo. O consumo alimentar foi normal durante todo o estudo. Deiscência de pontos de pele foi identificada em dois animais, sem implicações locais ou presença de secreção. Ainda quanto à ferida, cinco coelhos (38,5%) apresentaram prurido no local, imediatamente após a aplicação do laser, cessando minutos depois.

3.2. Avaliações radiográficas e ultrassonográficas

Comparando-se as imagens radiográficas do pós-operatório imediato com aquelas dos animais avaliados até a terceira semana de pós-operatório, foi evidenciado proliferação óssea intensa partindo de ambas as extremidades ósseas da falha segmentar (proximal e distal) em todos os membros controles e irradiados com laser de baixa intensidade (Figura 4). Houve deslocamento de uma das extremidades do cilindro de PMMA em quatro (66,7%) membros controles e quatro (66,7%) membros irradiados com laser de baixa intensidade.

Ao se comparar as imagens radiográficas do pós-operatório imediato com aquelas dos animais avaliados até a sexta semana de pós-operatório, observou-se proliferação óssea de menor intensidade partindo de ambas as extremidades ósseas da falha segmentar em três (50%) membros controles e dois (33,3%) membros irradiados com laser de baixa intensidade. Em um membro (17,7%) controles e um membro (17,7%) irradiados com laser de baixa intensidade houve formação de ponte óssea entre as extremidades. Em dois (33,3%) membros controles e três (50%) irradiados com laser houve remodelamento da

proliferação óssea (Figura 5). Foi verificado deslocamento de uma das extremidades do cilindro de PMMA em todos os membros controles e em cinco (83,3%) membros irradiados com laser de baixa intensidade.



Figura 4. Imagens radiográficas em projeção mediolateral do antebraço de coelhos irradiados com laser de baixa intensidade no pós-operatório imediato (a) e com três semanas (b) da indução da membrana de Masquelet. Observe a falha segmentar preenchida com cilindro de polimetilmetacrilato (a) e a proliferação óssea partindo das extremidades da falha segmentar em direção ao cilindro (b).



Figura 5. Imagens radiográficas em projeção mediolateral do antebraço de coelhos no pós-operatório imediato (a), com três semanas (b) e seis semanas (c) da indução da membrana de Masquelet em conjunto ao uso do laser de baixa intensidade. Observe a falha segmentar preenchida com cilindro de polimetilmetacrilato (a), a proliferação óssea partindo apenas da extremidade proximal da falha segmentar em direção ao cilindro (b), e sua ausência na avaliação com seis semanas de pós-operatório (c).

Na avaliação ultrassonográfica da falha segmentar foi possível identificar o espaçador de PMMA em todos os 24 membros no pós-operatório imediato. Com uma semana de pós-operatório já foi possível observar a formação da membrana induzida, nos membros com e sem tratamento. A presença de vascularização na região da membrana induzida onde se localizava o cilindro de PMMA, conforme o período de avaliação, nos membros controle e os que receberam terapia laser estão apresentados na Tabela 1 e ilustrados na Figura 6. Não houve diferença estatística significativa entre os membros controle e os irradiados com laser, conforme o momento de avaliação.

Tabela 1. Ocorrência (e porcentagem) de vasos, avaliados por ultrassonografia Doppler em membrana induzida, com ou sem o emprego da irradiação laser de baixa intensidade na falha óssea segmentar, imediatamente após a cirurgia (0) e de uma até a sexta semana de pós-operatório, conforme o número de membros (6 ou 12).

Momentos	Controle	Irradiação Laser
0	0/12 (0%)	1/12 (8,33%)
1	7/12 (58,33%)	6/12 (50%)
2	7/12 (58,33%)	7/12 (58,33%)
3	8/12 (66,67%)	6/12 (50%)
4	3/6 (50%)	4/6 (66,67%)
5	3/6 (50%)	3/6 (50%)
6	2/6 (33,33%)	3/6 (50%)

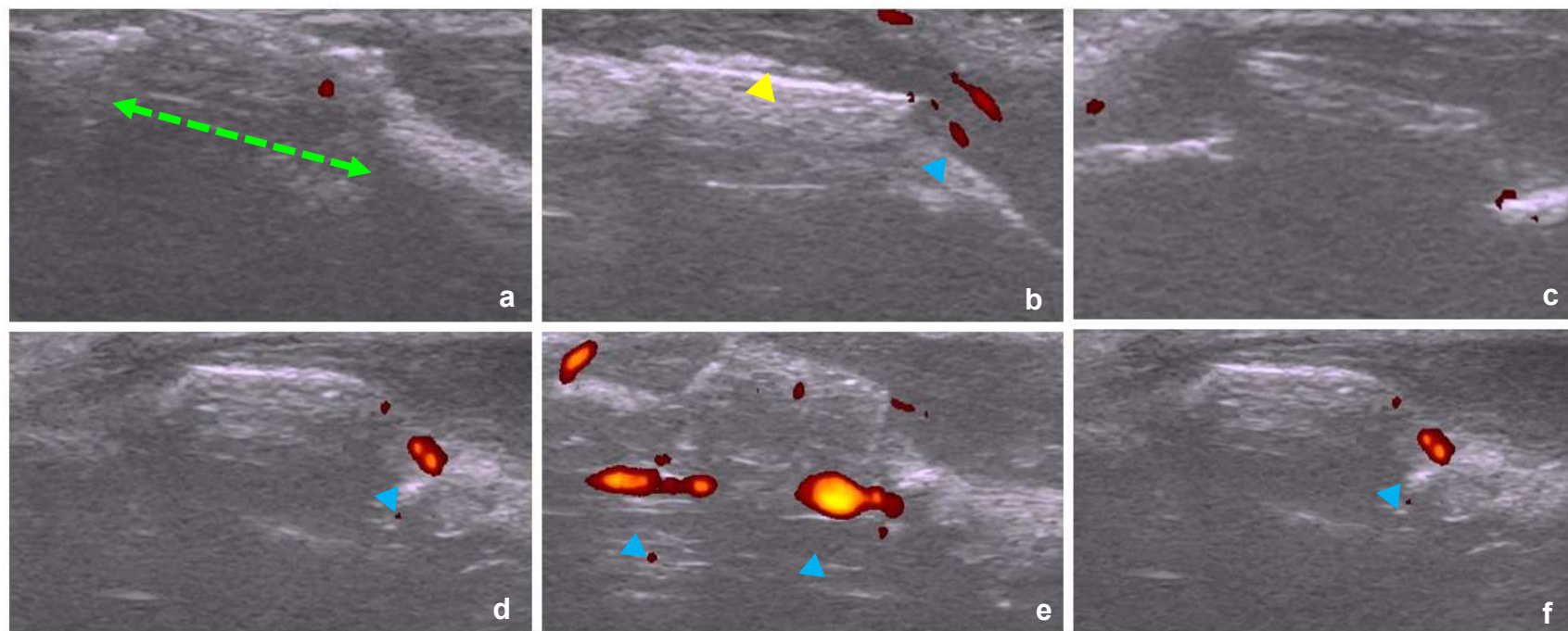


Figura 6. Imagens ultrassonográficas em plano longitudinal de defeito segmentar no rádio de coelhos, preenchido com cilindro de polimetilmetacrilato, com 1 (a), 2 (b), 3 (c), 4 (d), 5 (e) e 6 (f) semanas de pós-operatório. Na ultrassonografia modo-B observa-se estrutura retilínea de superfície hiper ecogênica formadora de sombreamento acústico posterior, correspondendo ao cilindro de polimetilmetacrilato (seta verde) e a formação da membrana induzida (seta amarela). No modo Power-Doppler visibiliza-se a presença de vasos sanguíneos junto à superfície óssea e cimento, representando vascularização da membrana induzida (seta azul).

3.3. Avaliações macroscópica, histológica e imuno-histoquímica

Na avaliação macroscópica com três semanas de pós-operatório, as membranas foram facilmente identificadas e coletadas, uma vez que não havia aderência ao cilindro, tendo um aspecto rugoso em sua porção mais externa e lisa na porção em contato direto com o cimento. Contudo, nos membros que receberam irradiação laser de baixa intensidade, a membrana apresentava-se aparentemente mais espessa e firme (Figura 7). Com seis semanas de pós-operatório, independente do tratamento, as membranas mostravam-se mais delgadas e aderidas aos tecidos adjacentes, o que dificultou a dissecação (Figura 8).

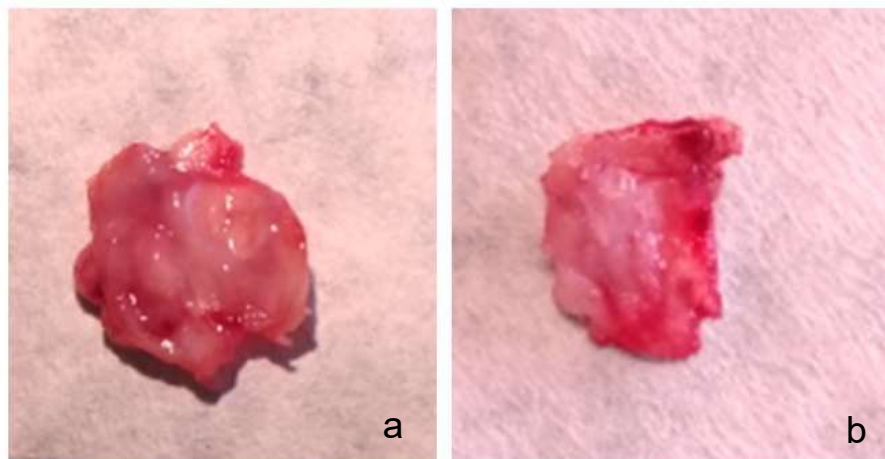


Figura 7. Aspecto macroscópico de membranas induzidas com três semanas de pós-operatório. Notar a maior espessura da membrana induzida no membro que recebeu irradiação laser de baixa intensidade (a), comparada aquela do membro controle (b).

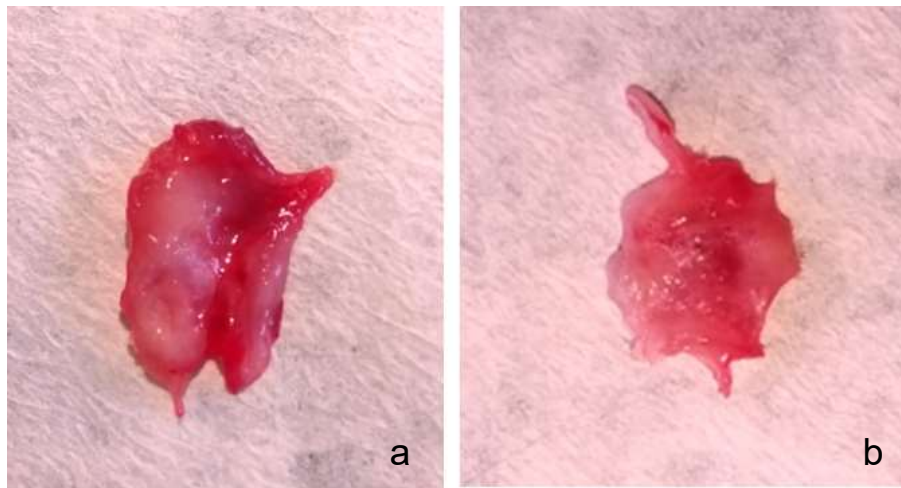


Figura 8. Aspecto macroscópico de membranas induzidas em membros controles. Notar a maior espessura da membrana induzida com três semanas de pós-operatório (a), comparada aquela mais fina com seis semanas de pós-operatório (b).

Em virtude de problemas no processamento histológico foram excluídos da análise microscópica duas membranas de um animal da sexta semana de pós-operatório.

Foram delimitadas três camadas (Figura 9) de diferentes celularidades em: quatro membranas do membro controle (66,7%) e três do membro irradiado com laser de baixa intensidade (50%) na terceira semana de pós-operatório; bem como em uma membrana do membro controle (20%) e outra do membro irradiado com laser de baixa intensidade (20%) na sexta semana de pós-operatório. Destas membranas, a primeira camada, a qual estava em contato com o cilindro de PMMA, apresentava células inflamatórias mononucleares e polimorfonucleares e vasos sanguíneos. Na segunda camada foi observado abundante quantidade de fibroblastos lineares e paralelos à resina e presença de colágeno organizado, além de vasos sanguíneos. A terceira camada estava em contato com a musculatura adjacente, consistindo em tecido conjuntivo desorganizado, fibroblastos ativos e vasos sanguíneos.

Não foi possível a delimitação entre a primeira e segunda camadas em: uma membrana de membro irradiado com laser de baixa intensidade (16,7%) da terceira semana de pós-operatório e em outra do membro controle (20%) da sexta semana de pós-operatório. Estas membranas apresentavam células inflamatórias e fibroblastos desorganizados (Figura 10). A segunda e a terceira camada não foram delimitadas em duas (33,3%) membranas controles na terceira semana de pós-operatório; bem como em uma membrana pertencente ao membro controle (20%) e uma membrana do membro irradiado com laser de baixa intensidade (20%), na sexta semana de pós-operatório. Nestas membranas observou-se a formação de uma única camada fibromuscular, com presença de fibras colágenas paralelas ao cilindro de PMMA (Figura 11). Não foi possível diferenciar as camadas em: duas membranas dos membros irradiados com laser (33,3%), na terceira semana de pós-operatório; bem como em duas (40%) membranas dos membros controles e em três (60%) membranas dos membros irradiados com laser de baixa intensidade, na sexta semana de pós-operatório, sendo formadas principalmente por trabéculas ósseas (Figura 12).

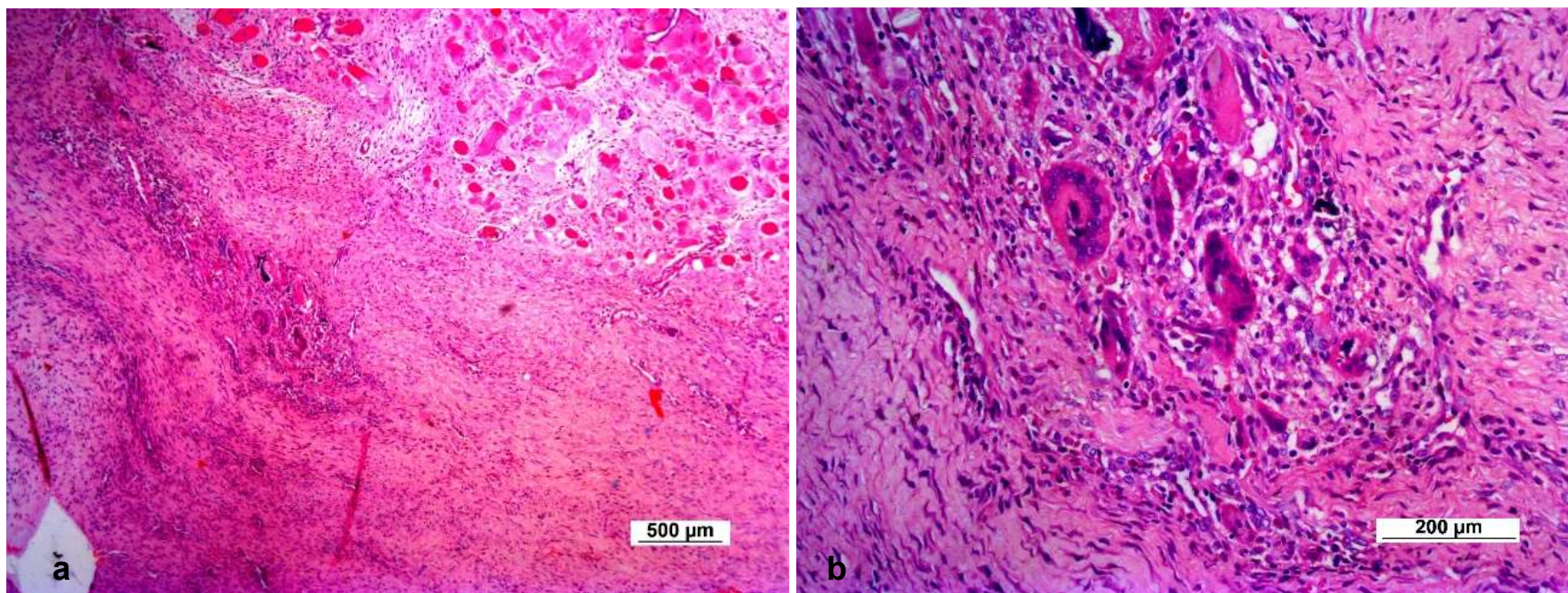


Figura 9. Fotomicrografias demonstrando as características histológicas da membrana induzida (Masquelet) na terceira semana de pós-operatório, em membros que receberam a irradiação laser de baixa intensidade. **(a)** Verificam-se três camadas distintas: a primeira em contato com o cilindro de polimetilmetacrilato, composta por células inflamatórias mononucleares e polimorfonucleares e vasos sanguíneos; a segunda, composta por fibroblastos lineares e paralelos à resina e presença de colágeno organizado, além de vasos sanguíneos; a terceira, composta por tecido conjuntivo desorganizado, fibroblastos ativos e vasos sanguíneos (coloração H&E, 50x). **(b)** Observa-se a presença de células gigantes de corpo estranho na primeira camada (coloração H&E, 200x).



Figura 10. Fotomicrografia demonstrando as características histológicas da membrana induzida (Masquelet) na sexta semana de pós-operatório, em membros controles. Nota-se duas camadas, sendo a camada em contato com o cilindro de polimetilmetacrilato composta células inflamatórias e fibroblastos desorganizados e a segunda predominantemente muscular (coloração H&E, 50x).

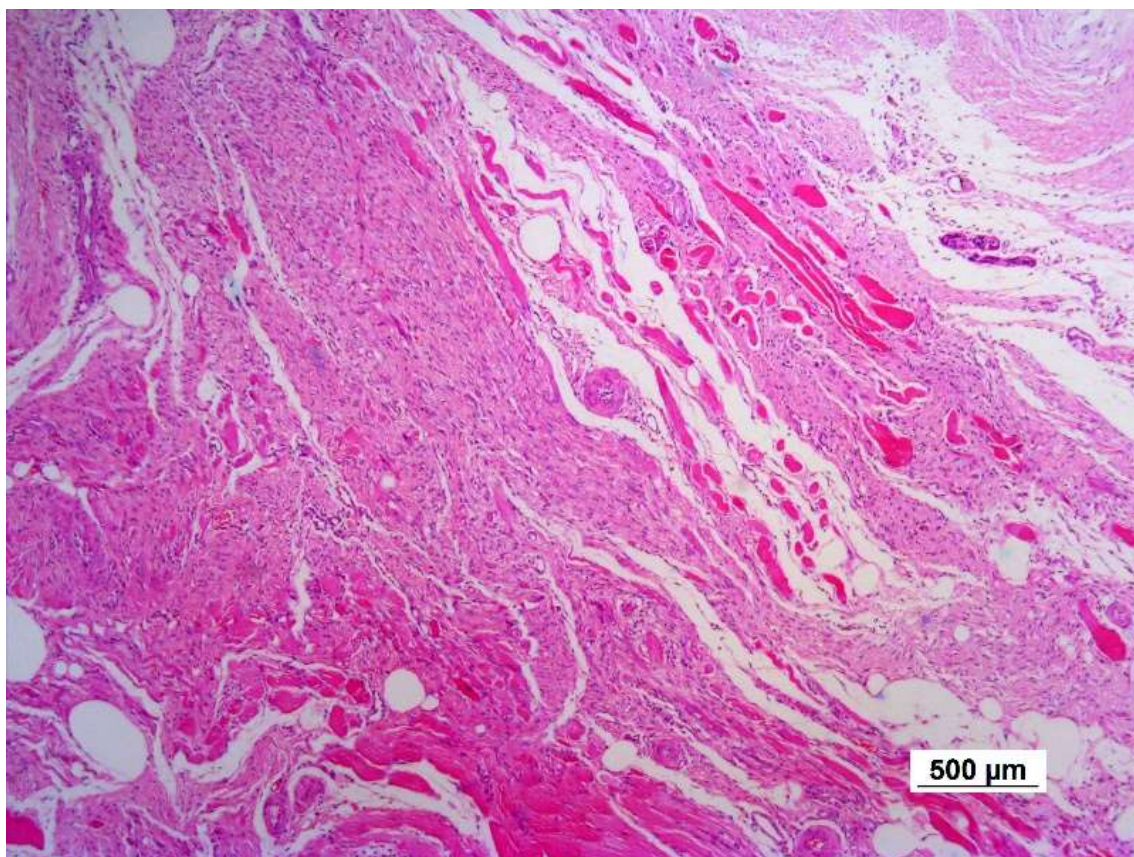


Figura 11. Fotomicrografia demonstrando as características histológicas da membrana induzida (Masquelet) na sexta semana de pós-operatório, em membros controles. Observa-se duas camadas, a primeira em contato com o cilindro de polimetilmetacrilato com presença de células inflamatórias e a segunda composta por uma camada fibromuscular, com presença de fibras colágenas paralelas (coloração H&E, 50x).

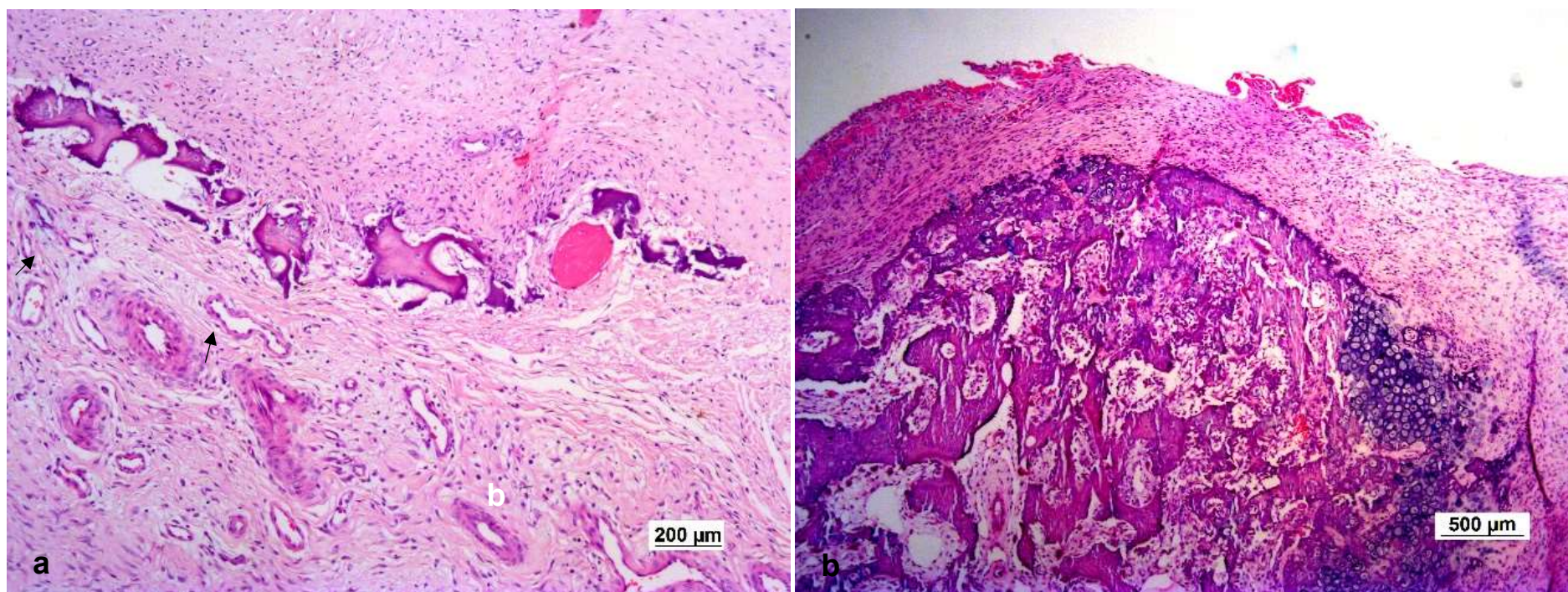


Figura 12. Fotomicrografias demonstrando as características histológicas da membrana induzida (Masquelet) na sexta semana de pós-operatório, em membros que receberam a irradiação laser de baixa intensidade. **(a)** Observa-se a indiferenciação das camadas da membrana induzida e a presença de trabéculas ósseas (seta preta) (coloração H&E, 200x). **(b)** Nota-se a presença de tecido ósseo em formação (coloração H&E, 50x).

Na análise histológica com três semanas de pós-operatório da porção central das membranas induzidas, foi observado que nos membros controles todas as membranas (100%) apresentavam vascularização. Nos membros irradiados com laser de baixa intensidade, foi verificado presença de vascularização em cinco membranas (83,3%), e ausência de vascularização em uma (16,7%), a qual foi composta de trabéculas ósseas. O escore inflamatório variou de 1 (83,3%) a 2 (16,7%) nas membranas controles e de 0 (50%) a 1 (50%) nas membranas irradiadas com laser de baixa intensidade. A metaplasia óssea foi detectada em todas (100%) as membranas controles e em cinco membranas (83,3%) irradiadas com laser de baixa intensidade. Foi notada presença de colágeno em cinco (83,3%) membranas controles e em três (50%) membranas irradiadas com laser de baixa intensidade. Não ocorreram diferenças estatisticamente significantes destas variáveis entre os membros controles e os que receberam terapia laser (Tabela 2).

Tabela 2. Escore semiquantitativo da intensidade de inflamação, número total de vasos sanguíneos, presença ou ausência de metaplasia óssea e colágeno, na membrana induzida em coelhos (n=6), com ou sem o emprego da irradiação laser de baixa intensidade na falha óssea segmentar, na terceira semana de pós-operatório.

Variáveis	Membros	A1	A2	A3	A4	A5	A6	Mín.	Máx.	Mediana	Valor de <i>p</i>
Escore de inflamação	controle	1	1	2	1	1	1	1	2	1	0,1250
	laser	0	1	1	1	0	0	0	1	0,5	
Nº total de vasos sanguíneos	controle	7	15	16	5	11	11	5	16	11	0,1875
	laser	3	14	10	11	2	0	0	14	6,5	
Metaplasia óssea	controle	1	1	1	1	1	1	1	1	-	1,0000
	laser	1	1	1	1	1	0	0	1	-	
Colágeno	controle	1	1	1	1	1	0	0	1	-	0,0606
	laser	1	0	1	0	0	1	0	1	-	

Escore de inflamação: ausente (grau 0), leve (grau 1), moderada (grau 2) e intensa (grau 3).
 Escor de inflamação: ausente (grau 0), leve (grau 1), moderada (grau 2) e intensa (grau 3).
 Metaplasia óssea: ausente (0), presente (1). Colágeno: ausente (0), presente (1).
 A: animal

Na análise histológica com seis semanas de pós-operatório da porção central das membranas induzidas, foi observado vascularização nas membranas de todos os membros controles (100%) e em quatro (80%) membranas irradiadas com laser de baixa intensidade. O escore inflamatório variou de 0 (60%) a 1 (40%), tanto nas membranas controles como nas irradiadas com laser de baixa intensidade. A metaplasia óssea foi detectada em duas (40%) membranas controles, e em três (60%) membranas irradiadas com laser de baixa intensidade. Foi notada presença de colágeno em três (60%) membranas controles e em duas (40%) membranas irradiadas com laser de baixa intensidade. Não ocorreram diferenças estatisticamente significantes destas variáveis entre os membros controles e os que receberam terapia laser (Tabela 3).

Tabela 3. Escore semiquantitativo da intensidade de inflamação, número total de vasos sanguíneos, presença ou ausência de metaplasia óssea e colágeno, na membrana induzida em coelhos (n=5), com ou sem o emprego da irradiação laser de baixa intensidade na falha óssea segmentar, na sexta semana de pós-operatório.

Variáveis	Membros	A7	A8	A9	A10	A11	Mín.	Máx.	Mediana	Valor de p
Escore inflamatório	controle	1	0	1	0	0	0	1	1	0,9999
	laser	1	0	1	0	0	0	1	0	
Nº total de vasos sanguíneos	controle	9	11	4	7	3	3	11	7	0,6250
	laser	4	9	7	1	7	1	9	7	
Metaplasia óssea	controle	0	1	1	0	0	0	1	-	1,0000
	laser	1	0	1	0	1	0	1	-	
Colágeno	controle	1	0	0	1	1	0	1	-	1,0000
	laser	0	0	1	1	0	0	1	-	

Escore de inflamação: ausente (grau 0), leve (grau 1), moderada (grau 2) e intensa (grau 3).

Metaplasia óssea: ausente (0), presente (1). Colágeno: ausente (0), presente (1).

A: animal

A espessura média das membranas induzidas, incluindo as três áreas de aferição, foi de 2050,17 μm (DP: 600,28 μm) no membro controle e 2724,26 μm (DP: 737,46 μm) no membro irradiado com laser de baixa intensidade na terceira semana de pós-operatório. Na sexta semana de pós-operatório a espessura média foi 1451,96 μm (DP: 265,07) no membro controle e 2081,03 μm (DP: 1227,61) no membro irradiado com laser de baixa intensidade. Não ocorreu diferença estatística significativa entre os tratamentos.

A expressão de VEGF foi presente nas membranas do membro controle e naquelas irradiadas com laser de baixa intensidade (Figuras 13 e 14). Com três semanas de pós-operatório o escore de distribuição nas membranas do membro controle variou de 2 (66,7%) até 3 (33,3%) e a intensidade de 1 (66,7%) até 2 (33,3%). Naquelas irradiadas com laser de baixa intensidade o escore de distribuição variou de 1 a 3, sendo uma (16,7%) com escore 1, duas (33,3%) com escore 2 e três (50%) com escore 3. Por sua vez, o escore de intensidade variou de 1 (33,3%) até 2 (66,7%). Na sexta semana de pós-operatório, observou-se que a expressão de VEGF manteve-se igual quanto a distribuição e a intensidade em todas as membranas do membro controle, sendo igual a 2 e 1, respectivamente. Nas membranas irradiadas com laser de baixa intensidade, a distribuição variou de 1 (40%) a 2 (60%), e a intensidade foi igual a 1 em todo grupo (100%). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os membros controles e os que receberam terapia laser (Tabela 4).

Observou-se a expressão de PDGF em ambos os membros, com escore de distribuição variando de 2 (50%) até 3 (50%) em cada membro (Figuras 13 e 14). Por sua vez, o escore de intensidade variou de 1 a 2, sendo dois (33,3%) com escore 1 e quatro com escore 2 (66,7%) no membro controle, e três (50%) com escore 1 e três (50%) com escore 2 no membro irradiado com laser de baixa intensidade. Com seis semanas de pós-operatório, o escore de distribuição manteve-se entre 2 (40%) e 3 (60%), tanto no membro controle como naquele irradiado com laser de baixa intensidade. A intensidade variou entre 1 (40%) e 2 (60%) em ambos os membros. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os membros controles e os que receberam terapia laser (Tabela 5).

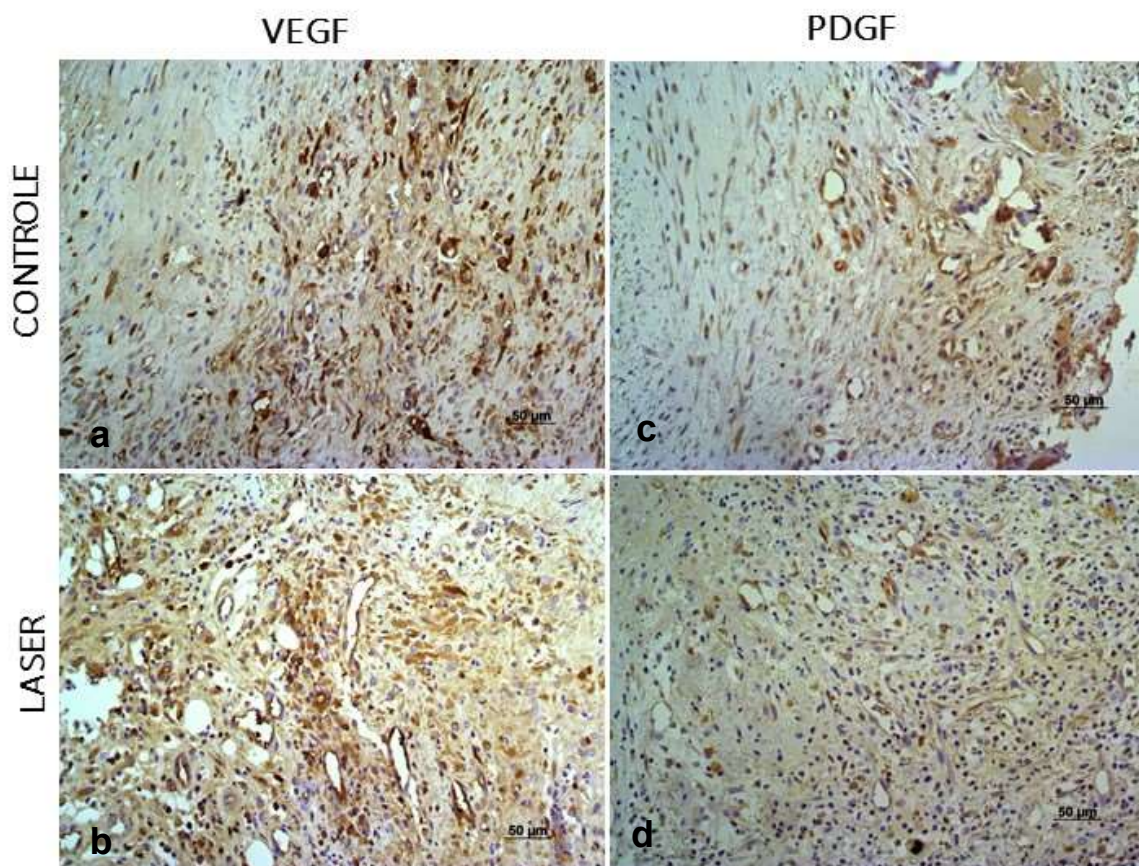


Figura 13. Marcação citoplasmática de VEGF-A e PDGF nas células estromais da membrana induzida na terceira semana de pós-operatório. **(a)** Membro controle com distribuição de 3 e intensidade de 1. **(b)** Membro tratado com laser de baixa intensidade apresentando distribuição de 2 e intensidade de 1. **(c)** Membro controle com distribuição de 4 e intensidade de 2. **(d)** Membro tratado com laser de baixa intensidade com distribuição de 3 e intensidade de 2.

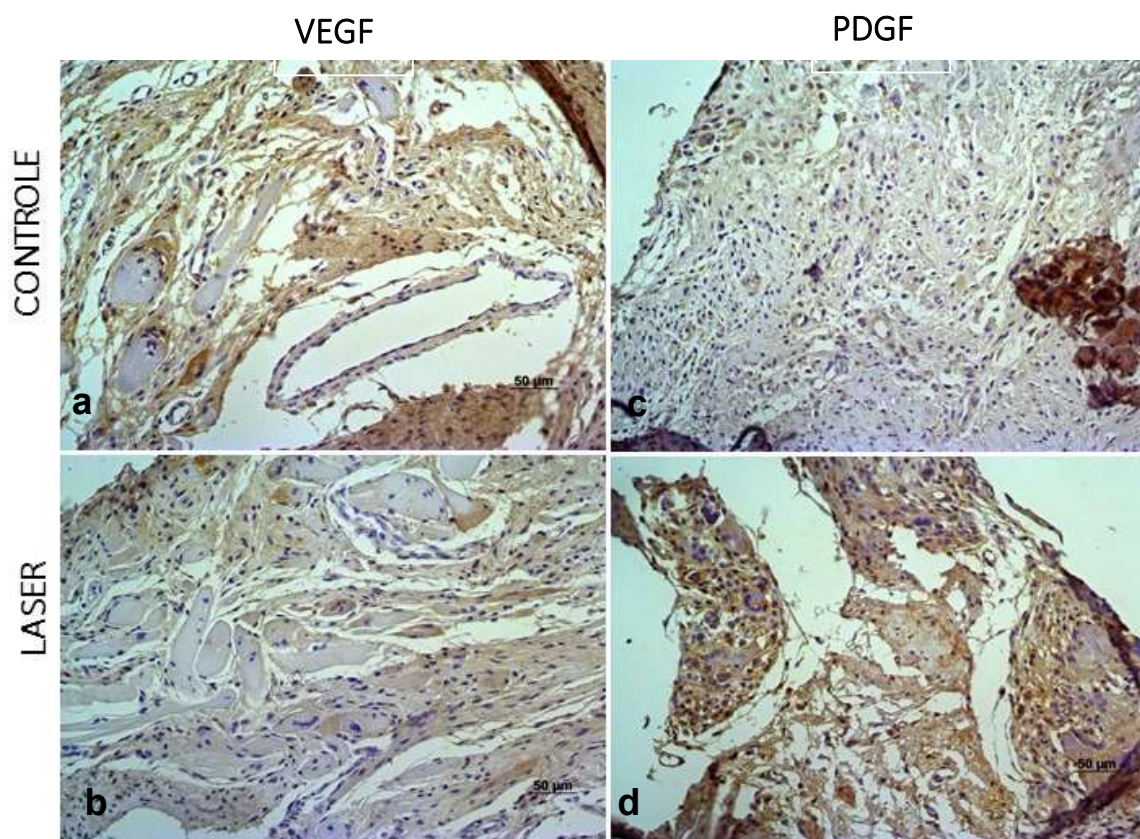


Figura 14. Marcação citoplasmática de VEGF-A e PDGF nas células estromais da membrana induzida na sexta semana de pós-operatório. **(a)** Membro controle com distribuição de 2 e intensidade de 1. **(b)** Membro tratado com laser de baixa intensidade apresentando distribuição de 3 e intensidade de 2. **(c)** Membro controle com distribuição de 2 e intensidade de 1. **(d)** Membro tratado com laser de baixa intensidade com distribuição de 3 e intensidade de 2.

Tabela 4. Escore semiquantitativo da distribuição e intensidade quanto à expressão de VEGF e PDGF nas membranas induzidas em coelhos (n=6), com ou sem o emprego da irradiação laser de baixa intensidade na falha óssea segmentar, na terceira semana de pós-operatório.

Variáveis	Membros	A1	A2	A3	A4	A5	A6	Mín.Máx.	Mediana	Valor de p
Distribuição VEGF	controle	2	3	3	2	2	2	2	3	2
	laser	1	2	2	3	3	3	1	3	2,5
Intensidade VEGF	controle	1	1	2	2	1	1	1	2	1
	laser	1	2	1	2	2	2	1	2	2
Distribuição PDGF	controle	3	3	3	2	2	2	2	3	2,5
	laser	2	2	3	2	3	3	2	3	2,5
Intensidade PDGF	controle	2	2	2	2	1	2	1	2	2
	laser	1	1	2	2	1	2	1	2	1,5

Escore de Distribuição: ausência de marcação (0), 1% a 25% das células são positivas (1); 26% a 50% (2), 51% a 75% (3) e > 75% (4).

Escore de Intensidade: negativo (0), fraco (1), moderada (grau 2) e forte (grau 3). A: animal

Tabela 5. Escore semiquantitativo da distribuição e intensidade quanto à expressão de VEGF e PDGF nas membranas induzidas em coelhos (n=5), com ou sem o emprego da irradiação laser de baixa intensidade na falha óssea segmentar, na sexta semana de pós-operatório.

Variáveis	Membros	A7	A8	A9	A10	A11	Mín.Máx.	Mediana	Valor de p
Distribuição VEGF	controle	2	2	2	2	2	2	2	2
	laser	1	1	2	2	2	1	2	2
Intensidade VEGF	controle	1	1	1	1	1	1	1	1
	laser	1	1	1	1	1	1	1	1
Distribuição PDGF	controle	3	3	3	2	2	2	3	3
	laser	2	3	3	3	2	2	3	3
Intensidade PDGF	controle	2	1	2	1	2	1	2	2
	laser	2	2	2	1	1	1	2	2

Escore de Distribuição: ausência de marcação (0), 1% a 25% das células são positivas (1); 26% a 50% (2), 51% a 75% (3) e > 75% (4).

Escore de Intensidade: negativo (0), fraco (1), moderada (2) e forte (3).

A: animal

4. Discussão

O estudo avaliou a influência da irradiação laser de baixa intensidade na membrana induzida de Masquelet e não foram observadas diferenças significativas nas características histológicas comparada ao controle.

Utilizou-se uma falha segmentar de 1 cm sem manutenção do periósteo, porém a falha não pode ser considerada crítica devido ao tamanho e em virtude da idade dos animais (ZHAO et al., 2016). Apesar disso, foi possível avaliar o desenvolvimento da membrana. O cimento ósseo foi colocado na forma de cilindro pré-moldado, em volume maior (diâmetro) que a falha segmentar, supondo que assim haveria um maior tamanho da membrana de indução, para facilitar a segunda fase de reconstrução do defeito, em que o espaçador é removido e a falha óssea preenchida com enxerto, biomateriais ou combinações (MASQUELET, 2003; MASQUELET e BEGUE, 2010; MASQUELET, 2017). Em pacientes humanos o formato do espaçador tem sido aplicado nas formas de cilindro, pérolas e seixo plano, porém o mais comum é o cilindro aplicado antes da solidificação (MASQUELET, 2017).

Radiograficamente foi visibilizado que o cilindro apresentou algum grau de deslocamento durante o período de pós-operatório, porém este não interferiu no desenvolvimento da membrana, baseado nos achados de ultrassom e análises macroscópicas e histológicas. Uma opção para evitar o deslocamento do cimento em futuros estudos seria incluir cimento pastoso nas extremidades de forma a auxiliar a fixação do cilindro junto ao osso. O uso do cimento ósseo de PMMA aplicado na forma pastosa e incluindo as extremidades ósseas foi aplicado em um estudo que induziu falha segmentar crítica na ulna em coelhos, o que não interferiu com o segundo estágio do procedimento (TARCHALA et al., 2018). Além disso, tanto nos defeitos ósseos dos membros controles como naqueles irradiados com laser, notou-se na terceira semana de pós-operatório a presença de proliferação óssea ativa partindo das extremidades ósseas, compatível com um defeito ósseo mantido sem estabilização rígida, no qual a consolidação óssea ocorre de forma secundária (HENRY, 2013). Por sua vez, na sexta semana de pós-operatório, o processo evolutivo mostrou-se em estágio mais avançado, inclusive com sinais de remodelação, porém sem diferenças estatística entre os membros controle e os irradiados com laser.

Como foram utilizados coelhos jovens foi possível verificar, pelos exames macroscópico e histológico, que com três semanas de pós-operatório a membrana induzida já estava bem desenvolvida, tanto no membro controle como naquele que recebeu a terapia laser de baixa intensidade. Além disso, pelo exame ultrassonográfico a membrana induzida já foi passível de identificação com uma semana de pós-operatório em ambos os grupos. Em pacientes humanos, tem sido recomendado um período em torno de seis a oito semanas para o desenvolvimento da membrana (MASQUELET, 2003; MASQUELET e BEGUE, 2010; GIANNOUDIS et al., 2005). Em coelhos há variações entre estudos, tendo sido empregado períodos entre quatro e seis semanas; contudo, é preciso considerar as diferenças em idades e tamanho da falha segmentar e forma de imobilização (LIU et al., 2013; YILMAZ et al., 2018; TARCHALA et al., 2018).

No exame histológico foi verificada a presença de três camadas distintas, em quatro membranas controles e três irradiadas com laser na terceira semana de pós-operatório, e em uma controle e outra irradiada com laser na sexta semana de pós-operatório. Isso diferiu de um estudo em ratos, no qual a identificação de três zonas distintas foi verificada em todas as membranas induzidas com três e seis semanas de avaliação (GOURON et al., 2014). O fato pode estar associado com a diferença de maturidade entre os animais estudados, já que os ratos tinham 12 meses de idade e os coelhos três meses de idade. Além disso, as membranas induzidas no presente estudo mostraram presença de metaplasia óssea tanto na terceira como na sexta semana de pós-operatório, sugerindo um estágio mais avançado de diferenciação celular.

A vascularização das membranas foi detectada tanto pelo ultrassom com a ferramenta Doppler como nas avaliações histológicas. Contudo, pela análise histológica, a vascularização estava presente em todas as membranas do membro controle, ao passo que no membro irradiado com laser esta não foi observada em um membro na terceira semana de pós-operatório e dois na sexta semana de pós-operatório. A terapia laser, principalmente com comprimentos de onda infravermelhos, parece melhorar a produção da matriz óssea pelo aumento da vascularização e efeitos anti-inflamatórios; porém, o efeito é mais efetivo se o tratamento é efetuado nos estágios iniciais, quando ocorre uma alta

proliferação celular, ou seja, nas fases iniciais de proliferação de ambos fibroblastos e osteoblastos tão bem quanto na diferenciação de células mesenquimais (PINHEIRO e GERBI, 2006). A não identificação de vascularização em três membranas dos membros irradiados pode ser um indicativo que, por se tratar de animais jovens, houve uma rápida evolução da membrana induzida, uma vez que estas já continham trabéculas ósseas. Além disto, em um estudo em coelhos foi observado que a vascularização da membrana induzida diminui gradualmente com o tempo para formar um tecido como periósteo (WANG et al., 2014). Desta forma, o tempo para a realização do segundo estágio da técnica poderia ser efetuado antes da sexta semana, em especial se usada a irradiação laser. Uma membrana ricamente vascularizada em todas as camadas é essencial para o sucesso do segundo estágio, uma vez que a membrana promove vascularização e corticalização do osso esponjoso (MASQUELET e BEGUE, 2010).

No exame de imuno-histoquímica, tanto no membro controle como no irradiado com laser, foi evidenciada a presença dos dois fatores de crescimento testados, ou seja, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que é responsável pela angiogênese local por aumentar a vascularização tecidual, por induzir a migração e proliferação de células endoteliais (FERRARA, 1996; KERAMARIS et al., 2008); e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o qual atua na proliferação celular, quimiotaxia e síntese de matriz extracelular, contribuindo assim para a regeneração de tecidos (LYNCH et al., 1991; KUBOTA et al., 2002). Outros estudos em coelhos também mostraram a capacidade das membranas induzidas de secretar fatores de crescimento (PELISSIER et al., 2004; WANG et al., 2014).

Importante citar que os fatores de crescimento foram presentes em ambos os períodos de avaliação. Em estudo com coelhos, altas concentrações de VEGF e TGF- β 1 foram encontradas na segunda semana da indução da membrana, os quais se mantiveram estáveis na quarta, sexta e oitava semanas de pós-operatório (PELISSIER et al., 2004). Contudo, em estudo com pacientes humanos, foi notada alta expressão de VEGF, IL-6 e Col-1 com um mês de desenvolvimento da membrana induzida, os quais foram expressos em níveis menores que 40% em membranas com dois meses de indução (AHO et al., 2013).

No presente estudo não houve diferença significativa entre membros controle e os irradiados com laser nos fatores de crescimento avaliados. Entretanto, alguns estudos têm mostrado que a terapia laser é capaz de promover aumento ou biomodular fatores de crescimento, tais como VEGF, FGF-2, EGF, PDGF, TNF- α e TGF- β (KIPSHIDZE et al., 2001; WHELAN et al., 2001; HOEBEN et al., 2004). Contudo, em defeitos promovidos no calvário de ratos preenchidos com xenoenxerto e cobertos com membrana de colágeno foi observado que a fotobiomodulação proporcionou maior quantidade de volume ósseo apenas durante os primeiros 14 dias após a cirurgia (LUCA et al., 2020). Desta forma, avaliações em fases mais precoces dos que os utilizados na atual pesquisa seriam importantes para determinar a validade desta premissa.

Macroscopicamente a membrana irradiada com laser de baixa intensidade mostrava-se aparentemente mais espessa que as membranas controles. Embora sem diferença estatística, pela mensuração no exame histológico as membranas irradiadas com laser mostraram média de 2724,26 μm e 2081,03 μm , com três e seis semanas de pós-operatório, comparado aos valores de 2050,17 μm e 1451,96 μm dos membros controles nos mesmos períodos. Desta forma, o fato sugere que a irradiação laser mostrou algum grau de ação na proliferação tecidual. Em estudo de revisão foi citado que a terapia laser auxilia no processo de reparo tecidual em geral, por alterar o comportamento celular e aumentar a formação vascular, assim como pela produção de colágeno, fibroblasto e tecido epitelial (SILVA et al., 2010).

A espessura da membrana foi menor na sexta semana de pós-operatório, tanto nos membros controle como nos irradiados com laser, indicando que este tempo seria inadequado para a segunda etapa do procedimento. Da mesma forma, um estudo em coelhos também observou diminuição da espessura das membranas induzidas, com médias de 1360 μm , 1045 μm , 1015 μm e 1008 μm , correspondendo a segunda, quarta, sexta e oitava semana de pós-operatório, respectivamente (WANG et al., 2015).

Vale ainda citar que o efeito da fotomodulação na regeneração óssea depende não somente da dose de irradiação, mas também na duração e modo de irradiação (PINHEIRO e GERBI, 2006). Neste sentido, uma outra limitação é que o estudo incluiu apenas um protocolo de irradiação. Desta forma, estudos

com diferentes doses de irradiação seriam importantes para avaliar o impacto sobre a membrana induzida.

5. Conclusão

Foi possível concluir que pelos métodos de avaliação utilizados não foi possível comprovar estatisticamente a influência da irradiação laser de baixa intensidade sobre a membrana de Masquelet.

Referências

- Aho OM, Lehenkari P, Ristiniemi J, Lehtonen S, Risteli J, Leskelä HV. The mechanism of action of induced membranes in bone repair. *J Bone Joint Surg Am.* 95(7):597-560, 2013.
- Cobos JA, Lindsey RW, Gugala Z. The cylindrical titanium mesh cage for treatment of a long bone segmental defect: description of a new technique and report of two cases. *J Orthop Trauma.* 14(1):54-59, 2000
- Escudero JSB, Perez MGB, de Oliveira Rosso MP, Buchaim DV, Pomini KT, Campos LMG, Audi M, Buchaim RL. Photobiomodulation therapy (PBMT) in bone repair: A systematic review. *Injury.* 50(11):1853-1867, 2019.
- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Eur. J. Cancer.*, v.32, p.13-22, 1996.
- Fitch R, Kerwin S, Newman-gauge H, Sinibaldi KR. Bone autografts and allografts in dogs. *Compend. Contin. Educ. Vet.*, 19:558-578, 1997.
- Fonseca-Alves CE, Kobayashi PE, Rivera Calderón LG, Felisbino SL, Rinaldi JC, Drigo SA, Rogatto SR, Laufer-Amorim R. Immunohistochemical panel to characterize canine prostate carcinomas according to aberrant p63 expression. *PLoS One.* 13(6):e0199173, 2018.
- Freitas NR, Guerrini LB, Esper LA, Sbrana MC, Dalben GDS, Soares S, Almeida ALPF. Evaluation of photobiomodulation therapy associated with guided bone regeneration in critical size defects. In vivo study. *J Appl Oral Sci.* 26:e20170244, 2018.
- Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury.* 36 Suppl 3:S20-27, 2005.

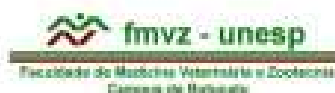
- Gugala Z, Gogolewski S. Healing of critical-size segmental bone defects in the sheep tibiae using bioresorbable polylactide membranes. *Injury*. 33 Suppl 2:B71-76, 2002.
- Gouron R, Petit L, Boudot C, Six I, Brazier M, Kamel S, Mentaverri R. Osteoclasts and their precursors are present in the induced membrane during bone reconstruction using the Masquelet technique. *J Tissue Eng Regen Med*. 11(2):382–389, 2014.
- Han W, Shen J, Wu H, Yu S, Fu J, Xie Z. Induced membrane technique: Advances in the management of bone defects. *Int J Surg*. 42:110-116, 2017.
- Henrich D, Seebach C, Nau C, Basan S, Relja B, Wilhelm K, Schaible A, Frank J, Barker J, Marzi I. Establishment and characterization of the Masquelet induced membrane technique in a rat femur critical-sized defect model. *J Tissue Eng Regen Med*. 10(10):e382-E396, 2016.
- Henry, GA. Fracture healing and complications. In: Thrall, DE. *Textbook of veterinary diagnostic radiology*. St. Louis: Elsevier Saunders, p.283-305, 2013.
- Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev*. 56(4):549-580, 2004.
- Keramaris NC, Calori GM, Nikolaou VS. Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF. *Injury*, v.39, n.2, p.S45-S57, 2008.
- Kipshidze N, Nikolaychik V, Keelan MH, Shankar LR, Khanna A, Kornowski R, Leon M, Moses J. Low-power helium: neon laser irradiation enhances production of vascular endothelial growth factor and promotes growth of endothelial cells in vitro. *Lasers Surg Med*. 28(4):355-364, 2001.
- Kubota K, Sakikawa C, Katsumata M, Nakamura T, Wakabayashi K. Platelet-derived growth factor BB secreted from osteoclasts acts as an osteoblastogenesis inhibitory factor. *J Bone Miner Res*. 17(2):257-265, 2002.
- Lynch SE, Castilla GR, Williams RC, Kiritsy CP, Howell TH, Reddy MS, Antoniades HN. The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *J Periodontol*. 62(7):458-467, 1991.
- Luca RE, Giuliani A, Mănescu A, Heredea R, Hoinoiu B, Constantin GD, Duma VF, Todea CD. Osteogenic potential of bovine bone graft in combination with

- laser photobiomodulation: an ex vivo demonstrative study in Wistar rats by cross-linked studies based on synchrotron microtomography and histology. *Int J Mol Sci.* 21(3). pii: E778, 2020.
- Liu H, Hu G, Shang P, Shen Y, Nie P, Peng L, Xu H. Histological characteristics of induced membranes in subcutaneous, intramuscular sites and bone defect. *Orthop Traumatol Surg Res.* 99(8):959–964, 2013.
- Masquelet AC, Fitoussi F, Begue T, Muller GP. Reconstruction of the long bones by the induced membrane and spongy autograft. *Ann Chir Plast Esthet.* 45(3):346-353, 2000.
- Masquelet AC. Muscle reconstruction in reconstructive surgery: soft tissue repair and long bone reconstruction. *Langenbecks Arch Surg.* 388(5):344-346, 2003.
- Masquelet AC, Begue T. The concept of induced membrane for reconstruction of long bone defects. *Orthop Clin North Am.* 41(1):27-37, 2010.
- Masquelet AC. Induced membrane technique: pearls and pitfalls. *J Orthop Trauma.* 31 Suppl 5:S36-S38, 2017.
- Pelissier P, Masquelet AC, Bareille R, Pelissier SM, Amedee J. Induced membranes secrete growth factors including vascular and osteoinductive factors and could stimulate bone regeneration. *J. Orthop. Res.*, v.22, n.1, p.73–79, 2004.
- Pinheiro AL, Gerbi ME. Photoengineering of bone repair processes. *Photomed Laser Surg.* 24(2):169-178, 2006.
- Silva JP, da Silva MA, Almeida AP, Lombardi Junior I, Matos AP. Laser therapy in the tissue repair process: a literature review. *Photomed Laser Surg.* 28(1):17-21, 2010.
- Tarchala M, Engel V, Barralet J, Harvey EJ. A pilot study: Alternative biomaterials in critical sized bone defect treatment. *Injury.* 49(3):523-531, 2018.
- Viateau V, Bensidhoum M, Guillemin G, Petite H, Hannouche D, Anagnostou F, Pélissier P. Use of the induced membrane technique for bone tissue engineering purposes: animal studies. *Orthop Clin North Am.* 41(1):49-56, 2010.
- Wang X, Wei F, Luo F, Huang K, Xie Z. Induction of granulation tissue for the secretion of growth factors and the promotion of bone defect repair. *J Orthop Surg Res.* 17;10:147, 2015.

- Whelan HT, Smits RL Jr, Buchman EV, Whelan NT, Turner SG, Margolis DA, Cevenini V, Stinson H, Ignatius R, Martin T, Cwiklinski J, Philippi AF, Graf WR, Hodgson B, Gould L, Kane M, Chen G, Caviness J. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing. *J Clin Laser Med Surg.* 19(6):305-314, 2001.
- Yılmaz O, Özmeriç A, Alemdaroğlu KB, Celepli P, Hücümenoğlu S, Şahin Ö. Effects of concentrated growth factors (CGF) on the quality of the induced membrane in Masquelet's technique - An experimental study in rabbits. *Injury.* 49(8):1497-1503, 2018.
- Zhao MD, Huang JS, Zhang XC, et al. Construction of Radial Defect Models in Rabbits to determine the critical size defects. *PLoS One.* 2016;11(1):e0146301.

ANEXO I

PROTOCOLO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



ATESTADO

Atesto que o Projeto "Efeito da irradiação com laser de baixa intensidade na qualidade de membrana induzida pela técnica de Masquelet em coelhos " **Protocolo CEUA 0209/2018**, a ser conduzido por JENIFFER GABRIELA FIGUEROA CORIS, responsável/orientador Sheila Canevese Rahal, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 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.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	17/09/2018 a 30/11/2018
Nome Comum / Espécie / Linhagem	COELHO / ORYCTOLAGUS CUNICULUS / BOTUCATU
Raça	Norfolk
Nº de animais machos	0
Nº de animais fêmeas	12
Nº de animais sexo indefinido	0
Peso médio de animais machos	0
Peso médio de animais fêmeas	2,5
Peso médio de animais sexo indefinido	0
Idade	0 ano(s) e 0 mes(es) e 60 dia(s).
Procedência	Biotério Central da Unesp, Campus de Botucatu

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 12/09/2018

JOSÉ NICOLAU PRÓSPERO PUOLI FILHO
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu