



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

JOÃO MATHEUS FONSECA E SANTOS

**Efeito da fotobiomodulação na reparação de fraturas
femorais em ratas com osteoporose experimentalmente
induzida**

**Araçatuba
2023**

JOÃO MATHEUS FONSECA E SANTOS

**Efeito da fotobiomodulação na reparação de fraturas
femorais em ratas com osteoporose experimentalmente
induzida**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho – UNESP”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, na área de concentração de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial.

Orientador: Prof. Assoc. Leonardo Perez Faverani

**Araçatuba
2023**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S237e Santos, João Matheus Fonseca e.
Efeito da fotobiomodulação na reparação de fraturas femorais em ratas com osteoporose experimentalmente / João Matheus Fonseca e Santos. - Araçatuba, 2023
47 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Leonardo Perez Faverani

1. Terapia com luz de baixa intensidade 2. Fraturas do fêmur 3. Osteoporose 4. Lasers I. T.

Black D7
CDD 617.6

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

*A minha mãe, minha estrelinha, que me guia e
ilumina desde os meus primeiros passos, e por
toda essa jornada, te amo pra sempre.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, quem permitiu que eu realizasse este sonho, e vem abençoando e guiando minha jornada durante a graduação e pós-graduação, me dando força em todas as dificuldades, dando sabedoria para superar todos os obstáculos da melhor maneira possível, e colocando pessoas especiais em meu caminho, das quais sou extremamente grato.

Ao **meu orientador Prof. Associado Leonardo Perez Faverani**, grande referência e inspiração como pesquisador, cirurgião e pessoa, poder conviver com o senhor é um privilégio, agradeço imensamente toda confiança que sempre depositou em mim, assim como oportunidades e ensinamentos ao longo de todos esses anos, que foram essenciais para a minha formação e desenvolvimentos deste trabalho, você ensina muito mais que ciência ou sobre cirurgia, mas como ser uma pessoa melhor e digna, não como professor, mas a partir de toda sua bondade e maneira de agir, serve a todos ao seu redor como exemplo a ser seguido. Sempre terá minha gratidão.

A **Prof^a. Associada Letícia Helena Theodoro** sou grato por todo auxílio na elaboração deste trabalho, pelo carinho e atenção que sempre dispõe, pela senhora tenho muita admiração e respeito, pois é um exemplo de como uma professora deve ser. É uma honra poder contar com sua presença em minha banca examinadora.

Ao **Prof. Dr. Gabriel Ramalho Ferreira** agradeço o pronto aceite e disponibilidade em ser banca examinadora deste trabalho, a sua colaboração será essencial para engrandecer o trabalho realizado.

Ao **Prof. Titular Valdir Gouveia Garcia** que dentro de sua sabedoria e conhecimento também muito colaborou na elaboração deste trabalho, por ti tenho muita admiração, gratidão e respeito.

Ao **Prof. Associado Edilson Ervolino** grande professor e pessoa especial, que muito colaborou em toda minha trajetória desde a graduação até a pós-graduação, o senhor é uma pessoa ímpar, obrigado por todo auxílio no desenvolvimento do trabalho e por sempre dispor de seu laboratório, eterna gratidão.

A **todo o grupo de pesquisa**, orientado pelo professor Leonardo, que me permitiu conhecer pessoas muito talentosas e competentes, que foram fundamentais

para o desenvolvimento deste trabalho, e de muitos outros que realizamos em todo esse período.

À **Engimplan Engenharia de Implantes**, que contribuiu grandemente para este estudo, fornecendo os materiais necessários para a realização de todo o estudo.

A **minha namorada, Arieli**, minha companheira de vida, que me dá forças em todos os momentos, e compartilha comigo todas as minhas dores, sem o seu suporte eu não chegaria até onde estou chegando hoje, afinal por trás de um grande homem sempre há uma grande mulher e você sempre me impulsiona a ir além, pra mim é uma dádiva poder ter você ao meu lado. Amo você!

Aos **meus pais**, por toda a base que sempre me deram, o que sempre me motivou a ir mais longe, a vocês tenho gratidão eterna e todo amor do mundo, sem vocês como alicerce eu não seria nada. Obrigado por tudo.

Aos colegas de pós-graduação, obrigado por toda convivência e o compartilhamento de experiência, ter vocês ao meu lado tornou o caminho mais leve.

A todos alunos de iniciação científica do nosso grupo de pesquisa, que tanto auxiliam em nossos trabalhos de pesquisa, sem vocês o desenvolvimento desde trabalho não seria possível, sempre serei muito grato, em especial a **Rafaela Sandro Stuque “Rafa”**, que participou comigo em todas as etapas deste trabalho.

A todos os funcionários e professores da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, em especial do departamento de Diagnóstico e Cirurgia e desta faculdade, pelo auxílio prestado ao longo desses anos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 pela bolsa concedida.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

SANTOS, J. M. F. **Efeito da fotobiomodulação na reparação de fraturas femorais em ratas com osteoporose experimentalmente induzida.** 2023. 47 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

RESUMO

Para que a reparação óssea de fraturas aconteça é fundamental que haja homeostasia, entretanto algumas condições sistêmicas podem influenciar negativamente neste processo de reparo, por algumas condições inflamatórias crônicas e alterações na microarquitetura do tecido ósseo. Para isso, 18 ratas adultas, com 6 meses de idade, foram inicialmente submetidas à ovariectomia bilateral, para indução de osteoporose, sendo que após 90 dias, as ratas foram submetidas às fraturas femorais e fixação com placas e parafusos do sistema 1,5 mm. As ratas foram divididas aleatoriamente em FBM (n=9), aquelas que foram irradiadas no período trans-cirúrgico com laser de baixa potência e SFBM (n=9), as que não foram irradiadas. Nos animais do grupo FBM, foi utilizado laser de baixa potência com comprimento de onda de 808 nm, área do spot de 0,0283 cm², potência de 100 mW durante 60 segundos, energia de 6 J/ponto, densidade de energia de 212 J/cm², de modo pontual em 5 pontos ao redor de todo o “gap” reparacional, seguindo as aplicações uma vez ao dia, durante 8 dias de pós-operatório com um intervalo de 24 horas. Os animais foram eutanasiados aos 14 e 42 dias pós-operatórios, e as amostras foram encaminhadas para análises microtomográfica, histométrica e imuno-histoquímica. Os dados foram submetidos a análise estatística (p<0,05). A análise microtomográfica não demonstrou diferenças estatísticas entre os grupos, em nenhum período experimental (p>0,05). A histometria evidenciou maior área de tecido ósseo neoformado no grupo FBM em comparação ao grupo SFBM (p<0,05), corroborando com o resultado imuno-histoquímico em que se notou maior imunomarcagem de TGF-B e VEGF. Conclui-se que a utilização da terapia de fotobiomodulação por meio da irradiação com laser de diodo infra-vermelho melhorou o reparo de fraturas em fêmures de ratas com osteoporose experimentalmente induzida.

Palavras-chave: Terapia com Luz de Baixa Intensidade. Fratura femoral. Osteoporose. Lasers.

SANTOS, J. M. F. **Effect of photobiomodulation on fracture repair on femoral fracture in rats with experimentally induced osteoporosis**. 2023. 47 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

ABSTRACT

Homeostasis is essential for bone repair of fractures to occur, however some systemic conditions may negatively influence this repair process, due to some chronic inflammatory conditions and changes in the microarchitecture of bone tissue. For this, 18 adult rats, aged 6 months, were initially submitted to bilateral ovariectomy, to induce osteoporosis, and after 90 days, the rats were submitted to femoral fractures and fixation with plates and screws of the 1.5 mm system. Rats were randomly divided into FBM (n=9), those that were irradiated in the trans-surgical period with low power laser, and SFBM (n=9), those that were not irradiated. In animals from the FBM group, a low power laser was used with a wavelength of 808 nm, spot area of 0.0283 cm², power of 100 mW for 60 seconds, energy of 6 J/point, energy density of 212 J /cm², punctually in 5 points around the entire reparative “gap”, following the applications once a day, during 8 postoperative days with an interval of 24 hours. The animals were euthanized at 14 and 42 days after surgery, and the samples were sent for microtomographic, histometric and immunohistochemical analyses. Data were submitted to statistical analysis (p<0.05). The microtomographic analysis did not demonstrate statistical differences between the groups, in any experimental period (p>0.05). Histometry showed a greater area of newly formed bone tissue in the FBM group compared to the SFBM group (p<0.05), corroborating the immunohistochemical result in which greater immunostaining of TGF- β and VEGF was noted. It is concluded that the use of photobiomodulation therapy through infrared diode laser irradiation improved the repair of fractures in femurs of female rats with experimentally induced osteoporosis.

Keywords: Low-Level Light Therapy. Femoral Fractures. Osteoporosis. Lasers.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Etapas cirúrgicas do procedimento cirúrgico de 19
ovariectomia. (A) Incisão nos flancos das ratas. (B) Divulsão dos
planos anatômicos subcutâneos. (C) Acesso ao peritônio. (D) Incisão
do peritônio e acesso a cavidade abdominal. (E) Localização do
ovário e chifre uterino. (F) Laqueadura do chifre uterino. (G) Ovário
removido. (H) Reposição dos tecidos laqueados. (I) Sutura dos planos
internos. (J) Sutura do plano superficial.
- Figura 2 – Etapas cirúrgicas do procedimento cirúrgico de simulação 21
de fratura femoral (A) Incisão na porção lateral do fêmur. (B)
Exposição do fêmur. (C) Fixação prévia do fêmur com placas e
parafusos do sistema 1.5 mm. (D) Osteotomia realizada para
simulação de fratura femoral – aspecto final.
- Figura 3 – Protocolo de terapia de FBM com laser em baixa 22
intensidade.
- Figura 4 – Imagem esquemática da terapia de FBM com laser - 23
pontos vermelhos indicam os 5 pontos selecionados para a irradiação
trans-cirúrgica.
- Figura 5 – Imagem esquemática da suspensão pela cauda dos 24
animais.
- Figura 6 – Valores médios de BV/TV, onde (* e #) representam a 28
diferença estatisticamente significativa entre os tempos experimentais
($p < 0.05$).
- Figura 7 – Valores médios de Tb.Th, Tb.N e Tb.SP, onde não houve 29
diferença estatisticamente significativa.
- Figura 8 – Representação tridimensional dos grupos FBM e SFBM, 29
representados de forma sequencial de tempos experimentais.
- Figura 9 – Representação gráfica da Área de osso neoformado 30
(AON), para os grupos FBM e SFBM, onde (* e #) representam a
diferença estatística entre os grupos ($p < 0.05$).
- Figura 10 – Imagens representativas dos grupos experimentais, na 31
região do “gap” reparacional, FBM e SFBM, objetiva de 4x.
- Figura 11 – Gráfico e fotomicrografias representativas da contagem 31

do número de osteócitos, onde (* e #) representam a diferença estatística entre os grupos experimentais. Objetiva de 100x

Figura 12 – Imagem representativa em uma objetiva de 10x, 32 demonstrando maior volume de tecido ósseo neoformado na região do “gap” reparacional para o grupo FBM quando comparado a SFBM, em ambos os tempos experimentais.

Figura 13 - Representação gráfica da Área de tecido conjuntivo, para 33 os grupos FBM e SFBM, onde (* e #) representam a diferença estatística entre os grupos ($p < 0.05$).

Figura 14 – Gráfico e fotomicrografias representativas da contagem 33 de células inflamatórias. Objetiva de 100x.

Figura 15 – Gráfico e fotomicrografias representativas da contagem 34 de células inflamatória. Objetiva de 100x.

Figura 16 – (1) Gráficos representativos da média do número de 35 células imunomarcadas por BMP-2, OCN, TGF- β e VEGF; (2) Fotomicrografias representativas da contagem de células imunomarcadas. Objetiva de 100x.

LISTA DE SIGLAS

AON	Área de osso neoformado
CEUA	Comissão de de Ética no uso de animais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
FBM	Fotobiomodulação/Grupo experimental com fotobiomodulação
nm	Nanômetros
SFBM	Grupo experimental sem fotobiomodulação
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
OCN	Osteocalcina
TGF- β	Fator de crescimento transformante beta- β
BMP-2	Proteína morfogenética óssea

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	16
3 METODOLOGIA	17
3.1 Animais	17
3.2 Cálculo amostral	17
3.3 Ovariectomia Bilateral	18
3.4 Fraturas femorais	19
3.5 Grupos experimentais	21
3.6 Terapia de Fotobiomodulação	22
3.7 Suspensão pela cauda	23
3.2 Métodos de análises	24
3.2.1 Microtomografia Computadorizada (Micro-Ct)	24
3.2.2 Processamento laboratorial para tecidos descalcificados	25
3.2.3 Análises histológica e histométrica	26
3.2.3 Processamento e Análise Imuno-histoquímica	26
3.3 Análise estatística	27
4 RESULTADOS	28
4.1 Microtomografia Computadorizada (Micro-Ct)	28
4.2 Análises histológica e histométrica	30
4.3 Análise imuno-histoquímica	34
5 DISCUSSÃO	36
6 CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	41
ANEXOS	45
ANEXO B	46

1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo pode ser lesado por uma série de mecanismos, incluindo infecções, tumores, comprometimento do suporte sanguíneo, e também os traumas, que comumente dão origem às fraturas, que são de grande importância no âmbito médico-odontológico (SATHYENDRA; DAROWISH, 2013). O reparo ósseo de fraturas envolve um processo complexo, que necessita de uma grande quantidade de citocinas, mediadores químicos inflamatórios e grupos celulares, a fim de substituir o tecido lesado, por um novo tecido ósseo sadio, e assim restabelecendo as suas propriedades mecânicas e biológicas (BORRELLI et al., 2012; DATTA et al., 2008; SATHYENDRA; DAROWISH, 2013).

Para que o reparo ósseo ocorra é fundamental que haja boas condições para promoção do mecanismo complexo da reparação óssea. Por outro lado há diversos fatores que podem influenciar diretamente no desempenho do metabolismo ósseo como o tipo e intensidade do trauma, a estabilidade na osteossíntese de fraturas, outros fatores locais e sistêmicos (CLAES; RECKNAGEL; IGNATIUS, 2012).

As alterações sistêmicas como artrite reumatoide, doenças pulmonares obstrutivas e lúpus eritematoso sistêmico desencadeiam um quadro inflamatório crônico, que influenciam negativamente o reparo, já que uma grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias associadas a essas doenças promovem uma ação osteoclastogênica (CLAES; RECKNAGEL; IGNATIUS, 2012; JIAO; XIAO; GRAVES, 2015). Além disso, algumas condições podem causar alterações diretas na microarquitetura óssea, como é o caso da osteoporose, caracterizada como um distúrbio no tecido ósseo que leva a diminuição significativa da densidade mineral óssea. Diante de algumas condições sistêmicas pode haver aumento da incidência de complicações no tratamento de fraturas, como a maior taxa de morbidade, pseudoartroses e infecções (GIANNOUDIS et al., 2007; ISLAM et al., 2005).

Com o avanço da idade e aumento da expectativa de vida, condições crônicas tornam-se mais prevalentes na população, assim, é comum que no âmbito médico-odontológico, o tratamento de fraturas seja de maior dificuldade e com maior número de complicações, sendo assim tornam-se necessárias estratégias para obtenção de uma otimização do reparo ósseo (THORNGREN et al., 2005).

Os princípios da terapia de fotobiomodulação (FBM), vem sendo amplamente estudados e demonstrando benefícios clínicos na odontologia (CRONSHAW et al.,

2020). A terapia de FBM com laser em baixa intensidade consiste na aplicação de uma luz vermelha, com comprimento de onda na faixa de 600 a 700 nm, ou infravermelha, de 780 a 1100 nm, com o objetivo de otimizar a reparação tecidual, além de diminuir a intensidade do processo inflamatório e promover analgesia (GARCIA;THEODORO, 2020).

Estudos *in vitro* demonstraram utilizando diferentes comprimentos de onda (630 e 808 nm), o potencial da terapia de FBM na estimulação da diferenciação de células mesenquimais em células da linhagem osteogênica, influenciando dessa forma diretamente a ossificação, e assim encorajando novos estudos experimentais (ABRAMOVITCH-GOTTLIB et al., 2005; AMAROLI et al., 2018).

Estudos *in vivo* sugerem o grande potencial osteogênico por demonstrarem que animais tratados com terapia de FBM apresentaram maior neoformação óssea e consequentemente melhor reparo ósseo em fraturas (MOSTAFAVINIA et al., 2015; SELLA et al., 2015). A terapia de FBM promove a proliferação de vasos sanguíneos e angiogênese, favorecendo a irrigação local, melhora a resposta celular, diminui o estresse oxidativo, promove a organização das fibras colágenas, tornando o ambiente favorável para a migração de células osteoblásticas e para deposição de tecido mineralizado (MOSTAFAVINIA et al., 2018).

Batista *et al.* (2015) concluiu que a terapia de FBM promove um efeito biomodulador, principalmente nos estágios iniciais do reparo, tanto em tecidos moles quanto em tecidos mineralizados, dessa forma, modulando o processo inflamatório e induzindo a uma rápida deposição de matriz óssea, o que é importante principalmente para pacientes que apresentem condições que atrasem o reparo.

No entanto não há um consenso na literatura sobre os parâmetros físicos e clínicos adequados que devem ser utilizados durante terapia de FBM em tecidos biológicos. Tem-se observado nos estudos uma variabilidade muito grande em relação ao comprimento de onda, energia de irradiação, frequência e número de irradiações de luzes em baixa intensidade nos tecidos biológicos. Entretanto, já é estabelecido que luzes emitidas nas faixas do infra-vermelho próximo (760 à 850 nm de comprimento de onda), tem maior capacidade de penetração tecidual e resposta biológica (BAYAT et al., 2018).

Hamblin e Demidova (2006) já definiram o possível mecanismo de ação da luz no tecidos bioológicos, como também descreveram que a irradiação na faixa do infra-vermelho é mais efetiva para terapia de FBM dos tecidos mais profundos.

Segundo os autores o efeito direto da FBM sobre as mitocôndrias gera maior produção de ATP, modulação das espécies reativas de oxigênio e indução de fatores de transcrição . Seus efeitos, por sua vez, levam ao aumento da proliferação e migração celular (particularmente por fibroblastos), modulação nos níveis de citocinas, aumento da liberação de fatores de crescimento, modulam os mediadores inflamatórios e aumentam a oxigenação tecidual.

Diante da problemática de atraso do reparo ósseo, e a necessidade do estabelecimento de parâmetros adequados de irradiação dos tecido na terapia de FBM, tornam-se relevantes o desenvolvimneto de pesquisas experimentais que avaliem o efeito da FBM na reparação do tecido ósseo em fraturas, em ratas ovariectomizadas.

A hipótese nula é de que a terapia de FBM utilizando laser em baixa intensidade não interferiria no processo de reparo do tecido ósseo em comparação a não aplicação da fotobiomodulação (SFBM).

2 OBJETIVOS

Constitui objetivo do presente estudo avaliar o potencial da terapia de FBM, utilizando laser de diodo com 808 nm de comprimento de onda no reparo ósseo de fraturas femorais, por meio de estudo experimental em ratas ovariectomizadas.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, assim como os *guidelines* recentes publicados no “Animal Arrive Guidelines” (PERCIE DU SERT et al., 2020). Para tanto, este estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de de Ética no uso de animais (CEUA), da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP (Processo FOA nº 0462-2021) (ANEXO A).

Para a análise da reparação de fraturas em fêmures, foram incluídas 24 ratas (*Rattus novergicus albinus Wistar*), fêmeas, adultas (n=6 fêmures por grupo), com 6 meses de idade, com peso corporal variando de 250 a 300 gramas, de uma linhagem mantida no Biotério do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA) – UNESP, as quais foram fornecidas pelo Biotério Central da mesma instituição.

Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, num ambiente com temperatura estável ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), com ciclo de luz controlado (12 horas claro e 12 horas escuro), alimentados com ração sólida (Ração Ativada Produtor®, Anderson & Clayton S.A. – Laboratório Abbot do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) durante todo o experimento e água *ad libitum*, exceto no período de 12 horas antecedentes aos procedimentos cirúrgicos, para a ração sólida.

3.2 Cálculo amostral

A determinação do número amostral por grupo foi realizada através do programa SigmaPlot 12.0 (Exakt Graphs and Data Analysis, San Jose, California, USA), por meio da função “Sample Size for Anova”, tendo como base estudos prévios, os quais apresentassem desfecho primário e metodologia semelhantes. Sendo assim, o número amostral considerado foi o número de fêmures, utilizando diferença entre médias de 13,46, desvio padrão de 4,57 (BATISTA et al., 2015) e poder estatístico de 95%, obtendo-se um n=5 fêmures. Tendo em vista o risco de perdas e complicações no desenvolvimento do projeto, foi adicionado um fêmur no número amostral, portanto, foram utilizado no mínimo 6 fêmures por grupo (FBM e SFBM) e por período (14 e 42 dias).

Vinte e quatro ratas foram aleatoriamente, por meio de sorteio, divididas em dois grupos totalizando 24 fêmeas para o grupo FBM e 24 fêmeas para o grupo SFBM, para que os espécimes (n=6) fossem direcionados para análises microtomográfica, histológica/histométrica e imuno-histoquímica

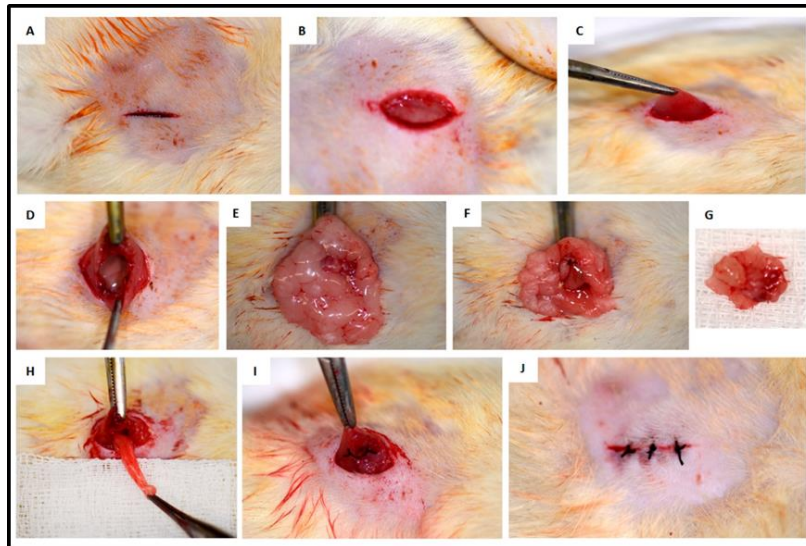
3.3 Ovariectomia Bilateral

Nos primeiros oito dias, após a ambientalização, que corresponde a 2 ciclos estrais regulares (ciclo estrogênio), as ratas foram submetidas ao esfregaço vaginal, de acordo com técnica descrita em estudos prévios (DE OLIVEIRA et al., 2017; EVANS; LONG, 1922; FAVERANI et al., 2018; POLO et al., 2020; RAMALHO-FERREIRA et al., 2015a). A obtenção de células epiteliais através do esfregaço foi disposta em lâminas histológicas e analisadas em microscópio óptico. Com isso, durante os oito dias, a regularidade do ciclo estral foi avaliada. Os animais que não tiveram a regularidade entre as fases estrais (proestro, estro, metaestro e diestro) foram desconsiderados do estudo.

Após esta fase da pesquisa, todas as ratas incluídas foram submetidas à ovariectomia bilateral (CHEN et al., 2015, 2017; RAMALHO-FERREIRA et al., 2015). Inicialmente, estas foram anestesiadas com cloridrato de xilazina (Xilazina - Coopers, Brasil, Ltda.) na dose de 5 mg/kg e Cloridrato de quetamina (Ketamina, Fort Dodge, Saúde Animal Ltda.) na dose de 50mg/kg. Após anestesia as ratas foram imobilizadas sobre prancha cirúrgica em posição de decúbito lateral. Na sequência incisão de 1,5 cm em ambos os flancos foi realizada, seguida de divulsão por planos do tecido subcutâneo e, em seguida, do peritônio para acessar à cavidade abdominal. Os ovários e os chifres uterinos foram localizados e laqueados com fio de Poliglactina 910 4.0 (Vicryl™ – Johnson & Johnson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos). A seguir foi realizada a remoção dos ovários (ovariectomia). A seguir, realizou-se a sutura por planos com fio de Poliglactina 910 4.0 (Vicryl™ – Johnson & Johnson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos) (**Figura 1**). Estas ratas continuaram no biotério, sendo alimentadas com ração e água *ad libitum* durante todo o tempo experimental e foram mantidas em gaiolas que comportaram até 4 animais. A temperatura do ambiente se manteve estável ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), com ciclo de luz controlado (12 horas claro e 12 horas escuro). Passados 90 dias da indução da

osteoporose (35) as ratas foram submetidas ao procedimento de osteotomia para a confecção da fratura de fêmur.

Figura 1 – Etapas cirúrgicas do procedimento cirúrgico de ovariectomia. (A) Incisão nos flancos das ratas. (B) Divulsão dos planos anatômicos subcutâneos. (C) Acesso ao peritônio. (D) Incisão do peritônio e acesso a cavidade abdominal. (E) Localização do ovário e chifre uterino. (F) Laqueadura do chifre uterino. (G) Ovário removido. (H) Reposição dos tecidos laqueados. (I) Sutura dos planos internos. (J) Sutura do plano superficial.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

3.4 Fraturas femorais

Nesta proposta, placas do sistema 1,5 mm com 4 furos, sem intermediário na sua extensão foram utilizadas para a fixação das fraturas em fêmur de ratas. As miniplacas e parafusos foram fornecidas pela empresa Engimplan® (Engimplan - Materialise Company - Rio Claro, SP, Brasil).

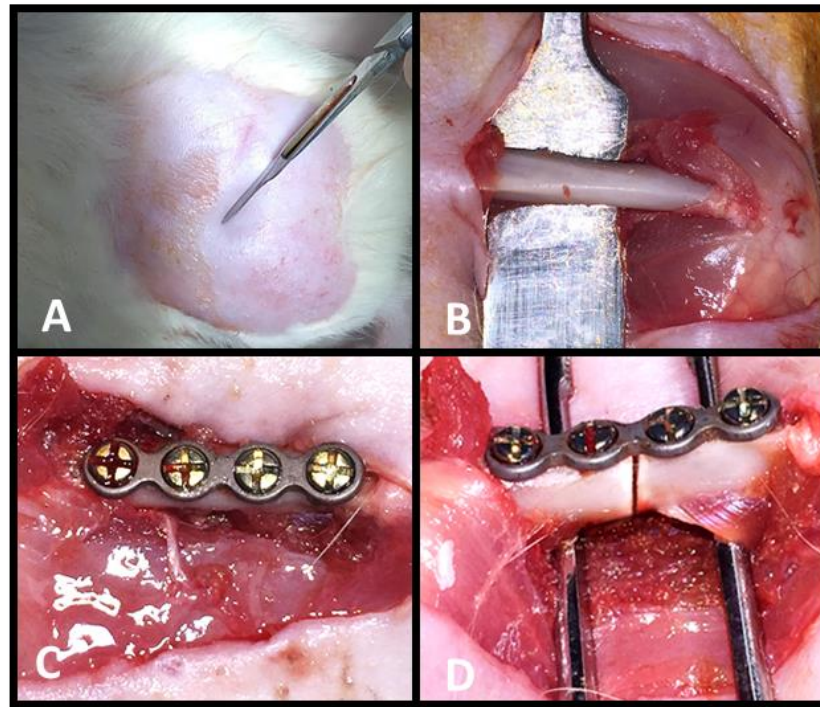
Após o jejum durante 12 horas prévias ao procedimento cirúrgico, sem restrição hídrica, as ratas foram sedadas pela combinação de 50mg/kg de ketamina intramuscular (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5mg/Kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda – Osasco, São Paulo, Brasil) e receberam cloridrato de mepivacaína (0.3 ml/Kg, Scandicaíne 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont, França) como anestesia local e para hemostasia do campo operatório.

Após a sedação dos animais, foi realizada a tricotomia na porção lateral do fêmur direito e esquerdo e, anti-sepsia da região a ser incisada com Polivinil

Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), associado à PVPI tópico. A seguir uma incisão de 4 cm de comprimento foi realizada na porção lateral do fêmur e assim, expondo o polo lateral do côndilo do fêmur, entre o músculo lateral e o músculo bíceps do fêmur. Para a confecção da fratura, uma serra circular com cerca de 1,5 mm de espessura foi utilizada e assim, a osteotomia foi realizada na metáfise epifisária, distando 5 mm da cartilagem articular epifisária (ALT et al., 2013; THORMANN et al., 2014). A partir deste momento, uma placa do sistema 1,5 mm com 4 furos, sem intermediário, foi fixada, sendo uma placa convencionalmente disponível pelo mercado. A porção mais proximal da placa tinha 2 furos para serem fixados, em que foram utilizados dois parafusos do mesmo sistema, com o comprimento de 6 a 8 mm, previamente determinado pelo profundímetro, após a perfuração bicortical com parafusos do sistema (1,5 mm). Na porção mais distal da placa, mais dois parafusos, com comprimento de 5 a 6 mm, determinado pelo profundímetro, foram parafusados para estabilização da fratura (POLO et al., 2021).

Durante todo o procedimento, tanto para a osteotomia como para a perfuração com as brocas cirúrgicas, as regiões foram irrigadas copiosamente com solução salina fisiológica (Fisiológico®, Laboratórios Biosintética Ltda®, Ribeirão Preto, SP, Brasil), para evitar-se o aquecimento do tecido ósseo e assim, influenciar negativamente no reparo ósseo. Após isso, os tecidos foram suturados em planos empregando-se fio absorvível (Poligalactina 910 – Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com pontos contínuos no plano profundo, e com fio monofilamentar (Nylon 4.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos no plano mais externo (**Figura 2**). Todas as cirurgias foram realizadas pelo mesmo operador em um mesmo período.

Figura 2 – Etapas cirúrgicas do procedimento cirúrgico de simulação de fratura femoral (A) Incisão na porção lateral do fêmur. (B) Exposição do fêmur. (C) Fixação prévia do fêmur com placas e parafusos do sistema 1.5 mm. (D) Osteotomia realizada para simulação de fratura femoral – aspecto final.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

3.5 Grupos experimentais

A randomização dos animais foi realizada por sorteio, sendo assim, um envelope continha um papel com a sigla “FBM” e um outro com a sigla “SFBM”, para que, no início da cirurgia um pesquisador que está fora do procedimento cirúrgico realizasse o sorteio, e os animais foram separados aleatoriamente em seus grupos. Os animais foram divididos em dois grupos: FBM- ratas osteoporóticas com as fraturas tratadas com terapia de FBM e SFBM - ratas osteoporóticas e as fraturas não receberam terapia de fotobiomodulação.

Os fêmures não foram aleatorizados, uma vez que, a terapia de FBM apresenta também efeito sistêmico, o que impossibilita a aleatorização dos fêmures, pois os animais sorteados para o grupo “FBM” devem ter os dois fêmures irradiados, evitando que houvesse alterações nos resultados. Ambos os fêmures dos animais que foram submetidos a osteotomia, foram irradiados por meio do laser de diodo em baixa intensidade, em que ambos os fêmures passarão por esse processo, e o outro grupo não foi irradiado.

No pós-operatório imediato, pela via intramuscular, foi administrada tramadol na dose de 1mg UI/kg para analgesia e Pentabiótico na dose de 0,1 mg UI/kg como antibioticoterapia profilática.

3.6 Terapia de Fotobiomodulação

Os animais pertencentes ao grupo FBM, ainda no ato cirúrgico, imediatamente após a fixação das fraturas com miniplacas e parafusos, foram irradiados com laser de baixa potência de Gallium-Arsenium (GaAs, Photon Lase III, DMC Equipamentos Ltd., São Carlos, SP, Brazil). As regiões correspondentes aos “gaps reparacionais” nas fraturas foram irradiadas com: laser no comprimento de onda de 808 nm; potência de 100 mW; densidade de energia de 212 J/cm²; durante 60 segundos; intensidade de potência de 3,53 W/cm²; com energia de irradiação de 6J por ponto, em 5 pontos determinados (Figura 3)(BRITEÑO-VÁZQUEZ et al., 2015; POLO et al., 2021). A irradiação foi realizada de forma pontual na metáfise femural, na região do “gap” reparacional no transoperatório em 5 pontos (Figura 4). Em seguida, os tecidos foram fechados por planos anatômicos. Além disso, os animais deste grupo foram irradiados nos próximos 8 dias pós-operatórios com intervalos de 24 horas na região onde a cirurgia foi realizada, sobre a linha de incisão.

Figura 3 – Protocolo de terapia de FBM com laser em baixa intensidade.

Parâmetros de Irradiação	Valores
Modo de emissão Laser	Contínuo
Comprimento de onda	808 nm
Potência	100 mW
Area do Spot	0,0283 cm ²
Intensidade da potência	3,53 W/cm ²
Energia por ponto	6 J
Densidade da energia/ponto	212 J/cm ²
Tempo de irradiação	60 s
Número de pontos	5

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Figura 4 – Imagem esquemática da terapia de FBM com laser - pontos vermelhos indicam os 5 pontos selecionados para a irradiação trans-cirúrgica.



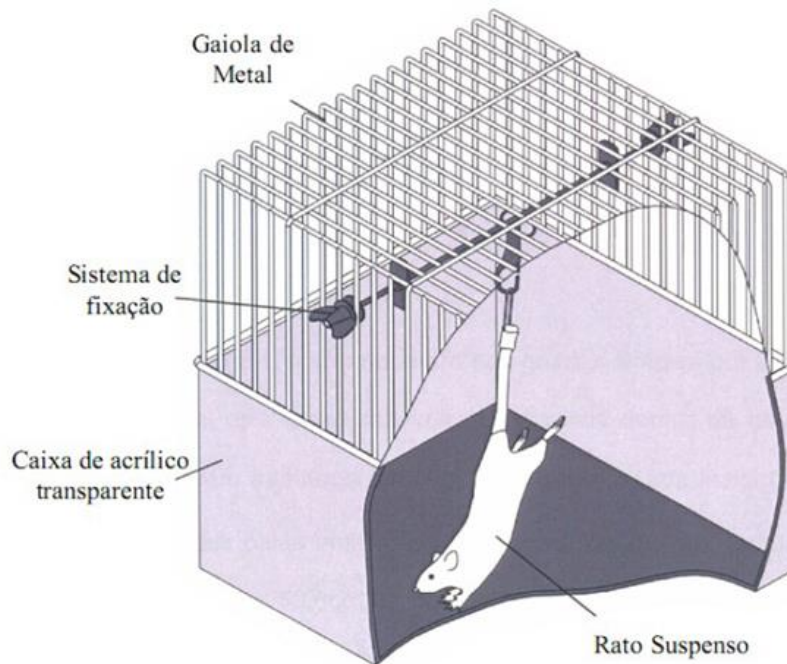
Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

3.7 Suspensão pela cauda

Com a finalidade de imobilizar as patas traseiras dos animais e evitar a ocorrência de fadiga das miniplacas ou má consolidação das fraturas, após as cirurgias, os animais, ainda sedados, foram suspensos pela cauda, por meio de uma modificação da técnica proposta por Meira et al. (2010). A suspensão foi realizada com o auxílio de uma fita elástica adesiva (Kinesio Tape). Desse modo, após o posicionamento no animal, a própria fita foi utilizada para confecção de uma espécie de alça, que possibilita sua apreensão à uma presilha metálica, que se encontrava conectada a uma barra de ferro, onde é possível regular a altura da suspensão.

Para reforçar a bandagem, foram utilizados três pedaços, de pequena largura, de esparadrapo, colados nas periferias e no centro da fita elástica adesiva presa a cauda do animal. Neste sistema de suspensão, os animais tiveram liberdade para movimentação dos membros torácicos, pois foram mantidos visualmente inclinados em aproximadamente 30 graus em relação ao assoalho da caixa (PERES-UENO et al., 2017; VALADARES; SILVA; BATISTA VOLPON, 2004)(Figura 5).

Figura 5 – Imagem esquemática da suspensão pela cauda dos animais.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

3.2 Métodos de análises

Todos os animais foram submetidos à eutanásia aos 14 (n=24 fêmeas) e 42 (n=24 fêmeas) dias após a cirurgia para fixação das fraturas femorais, por perfusão cardíaca. Os animais foram sedados pela mesma dosagem citada anteriormente, da combinação de quetamina e xilazina via intramuscular. A cavidade torácica foi acessada para a localização do átrio esquerdo, em que uma cânula foi inserida para recebimento contínuo de em média 500 mL de solução de formaldeído a 4%. Os fêmures foram coletados e armazenados em formol 10% para a fixação dos tecidos e posteriormente as peças foram destinadas às análises de microtomografia (tecidos mineralizados), histológica/histométrica e imunohistoquímica.

3.2.1 Microtomografia Computadorizada (Micro-Ct)

Para a análise tridimensional, após a fixação em formol 10% por 48 horas, as peças foram armazenadas em álcool 70% e, primeiramente submetidas à análise por varredura de feixe de raios-X em um sistema de microtomografia digital

computadorizada. As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) utilizando cortes de 5 µm de espessura (50Kv e 500µ), com filtro de cobre e alumínio e passo de rotação de 0,3 mm. As imagens obtidas pela projeção dos raios-X nas amostras foram armazenadas e reconstituídas determinando a área de interesse pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0).

No software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) as imagens foram reconstruídas para adequação do posicionamento padrão para todas as amostras, podendo ser observada em três planos (transversal, longitudinal e sagital). Em seguida, utilizando o software CTAnalyser – CTAn (2003-11SkyScan, 2012 Bruker MicroCT Versão 1.12.4.0), foi definida uma área de interesse (ROI) delimitada pela interface placa e o "gap" reparacional, criado pela osteotomia entre os dois cotos do fêmur. O software CTAn analisa e mede a imagem de acordo com a escalas de cinza (thershould). O threshold utilizado na análise foi de 25-90 tons de cinza, que possibilitou a obtenção do volume de osso formado no ROI referente ao tecido ósseo neoformado (POLO et al., 2020, 2021).

Portanto, seguindo os parâmetros volumétricos sugeridos pela Academia Americana de Pesquisa em Osso Mineralizado foram obtidos os parâmetros referentes à quantidade do tecido ósseo (BV/TV= porcentagem do volume ósseo) e qualidade do tecido ósseo (Tb.Th= espessura do trabeculado ósseo, Tb.SP= separação das trabéculas ósseas e Tb.N= número das trabéculas) (BOUXSEIN et al., 2010).

3.2.2 Processamento laboratorial para tecidos descalcificados

Todas as amostras dos animais eutanasiados aos 14 e 42 dias, passaram pelo processo de desmineralização, onde os fêmures com as placas e parafusos, sofreram descalcificação em EDTA (10%) por aproximadamente 8 semanas. Neste momento, após a descalcificação, as placas e parafusos foram removidos. Assim, as peças foram desidratadas numa sequência crescente de álcoois (70 a 100%). Após estas etapas, diafanização com xilol foi realizada, para posterior inclusão em parafina para obtenção de corte com 5 µm de espessura e montados em lâminas histológicas, as quais foram analisadas pela análise histológica e histométrica.

3.2.3 Análises histológica e histométrica

As lâminas pares após a microtomia foram destinadas para a coloração em hematoxilina e eosina (HE) para serem analisadas quanto à cronologia do reparo ósseo na interface do “gap” das fraturas e fixação, observando a diferença entre os grupos experimentais com ênfase nos parâmetros de qualidade com avaliação da angiogênese e quantidade de tecido ósseo, assim como análise do perfil inflamatório. Para análise histométrica as lâminas foram microfotografadas em uma objetiva de 4x e as imagens obtidas foram analisadas com auxílio do *software* “Image J”, com a ferramenta “free hands” para a quantificação da área tecido ósseo neoformado (AON). Também foi realizada a contagem do número de células inflamatórias e vasos sanguíneos, em microfotografias em objetiva de 100x, usando a ferramenta “grid” sendo padronizado 130 pontos para a contagem das células no campo selecionado para a análise.

3.2.3 Processamento e Análise Imuno-histoquímica

As lâminas ímpares, seguiram para as reações imuno-histoquímicas, a recuperação antigênica foi feita imergindo as lâminas histológicas em solução tampão (Diva Decloaker; Biocare Medical, Concord, CA, EUA) em câmara pressurizada (Decloaking Câmara; Biocare Medical) a 95 ° C por 10 min. Os cortes foram lavados com solução salina tamponada com fosfato 0,1 M (pH 7,4) no final de cada etapa da reação imuno-histoquímica. Os cortes histológicos foram imersos em peróxido de hidrogênio a 3% por 1 hora e em albumina de soro bovino a 1% por 12 horas para bloquear a atividade endógena da peroxidase e os receptores inespecíficos, respectivamente (STATKIEVICZ et al., 2018).

Para análise imuno-histoquímica, as secções histológicas ímpares foram submetidas à técnica da imunoperoxidase indireta empregando-se os seguintes anticorpos primários: anti-VEGF (SC-7269, Santa Cruz Biotechnology®), anti-OCN (SC-18319, Santa Cruz Biotechnology®), anti-BMP-2 (SC-9003 Santa Cruz Biotechnology®) e anti-TGF- β (SC 146, Santa Cruz Biotechnology ®) (CINTRA et al., 2016).

Os anticorpos primários foram diluídos em tampão fosfato solução salina com 0,1% de Triton X-100 (Sigma Chemical Co.) e colocados em câmara úmida por 24 h. As secções histológicas foram incubadas com anticorpo secundário por 2 h e

posteriormente tratados com estreptavidina-peroxidase conjugado por 1 h (Universal Dako Kit marcado com estreptavidina-biotina (Dako Laboratories, Carpinteria, CA, EUA). A reação foi desenvolvida usando o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina tetracloridrato (cromogênio DAB kit; Dako Laboratories) e contra-corada com hematoxilina de Harris. Para o controle negativo foram utilizadas amostras submetidas ao referido procedimento, mas sem os anticorpos primários (STATKIEVICZ et al., 2018).

As reações imuno-histoquímicas foram avaliadas através da análise quantitativa, realizada a partir da contagem das células imunomarcadas. As imagens foram capturadas com o mesmo protocolo utilizado para a contagem de células na histometria. A contagem de células imunomarcadas foi realizada a partir de imagens capturadas em aumento de 1000X (BENETTI et al., 2019). Para contabilizar as células, foi utilizada a ferramenta “grid” tipo “crosses” no programa IMAGE J com 10000 pixels por área, totalizando 130 “crosses” por imagem. As imagens foram capturadas em três áreas distintas na região do centro do defeito, no sentido supero-inferior do corte.

3.3 Análise estatística

Os dados quantitativos da histometria, contagem de células inflamatórias, osteócitos, vasos sanguíneos e dados da análise por meio do microCT foram submetidos inicialmente ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, mostrando homogeneidade ($p > 0,05$). Portanto, o teste ANOVA 2 fatores (grupos experimentais – 2 níveis vs tempo – 2 níveis) foi aplicado, seguindo o pós-teste de Holm Sidak, quando $p < 0,05$. O nível de significância de 5% foi usado para todos os testes. O programa estatístico utilizado foi o SigmaPlot 12.0 (Exakt Graphs and Data Analysis, San Jose, California, USA).

4 RESULTADOS

4.1 Microtomografia Computadorizada (Micro-Ct)

Através das análises de Micro-Ct, foi possível avaliar os parâmetros de quantidade de tecido ósseo. A partir da porcentagem de volume ósseo (BV/TV), não observou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais ($p > 0,05$), mesmo tendo um maior volume para o grupo FBM aos 42 dias em comparação a SFBM ($48,22\% \pm 1,29$ x $45,04\% \pm 4,49$)(Figura 6). Observou-se diferença estatística intragrupos quando comparados os períodos de 14 dias aos 42 dias ($p < 0,05$).

Figura 6 – Valores de média e desvio padrão de BV/TV. Símbolos: * e # representam a diferença estatisticamente significativa entre os períodos experimentais ($p < 0,05$).

BV/TV(%)	FBM	SD	SFBM	SD2
14D	25,76*	4,49	32,89*	1,35
42D	48,22#	1,29	45,04#	1,54
P-valor	$P < 0.05$		$P < 0.05$	

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Nos demais parâmetros microtomográficos de Tb.Th, Tb.N e Tb.SP, não observou-se diferença estatística entre os grupos experimentais (Figura 7).

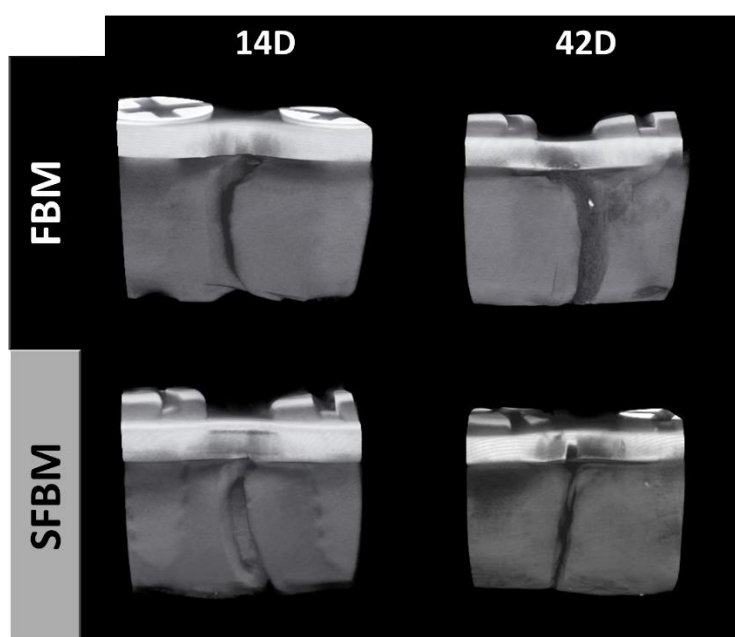
Figura 7 – Valores de média e desvio padrão (SD) de Tb.Th, Tb.N e Tb.SP.

Tb.Th (mm)	FBM	SD	SFBM	SD2
14D	0,24	0,05	0,25	0,10
42D	0,17	0,03	0,41	0,10
P-valor	P>0.05		P>0.05	
Tb.N (1/mm)	FBM	SD	SFBM	SD2
14D	1,06	0,04	1,43	0,56
42D	2,25	1,20	1,08	0,45
P-valor	P>0.05		P>0.05	
Tb.Sp (mm)	FBM	SD	SFBM	SD2
14D	0,43	0,03	0,16	0,01
42D	0,27	0,22	0,54	0,01
P-valor	P>0.05		P>0.05	

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Na reconstrução tridimensional, pode-se observar um maior preenchimento da região de “gap” reparacional, o que pode ser justificado pela maior espessura trabecular (Tb.Th) e número de trabéculas (Tb.N) para o grupo FBM (Figura 8) .

Figura 8 – Representação tridimensional dos grupos FBM e SFBM, representados nos períodos experimentais avaliados.

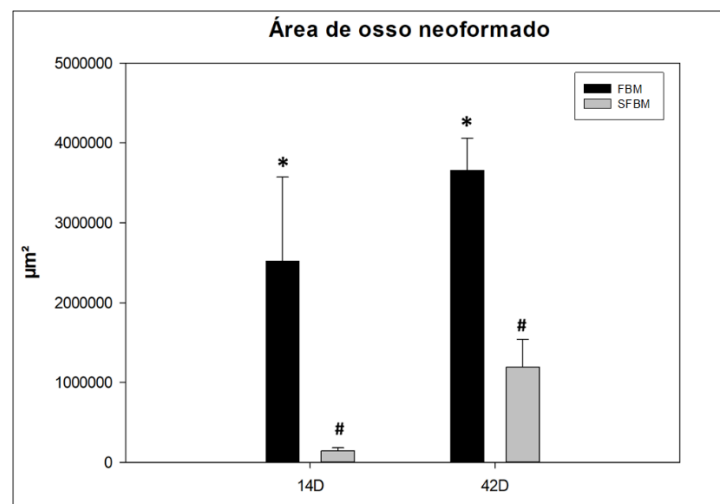


Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

4.2 Análises histológica e histométrica

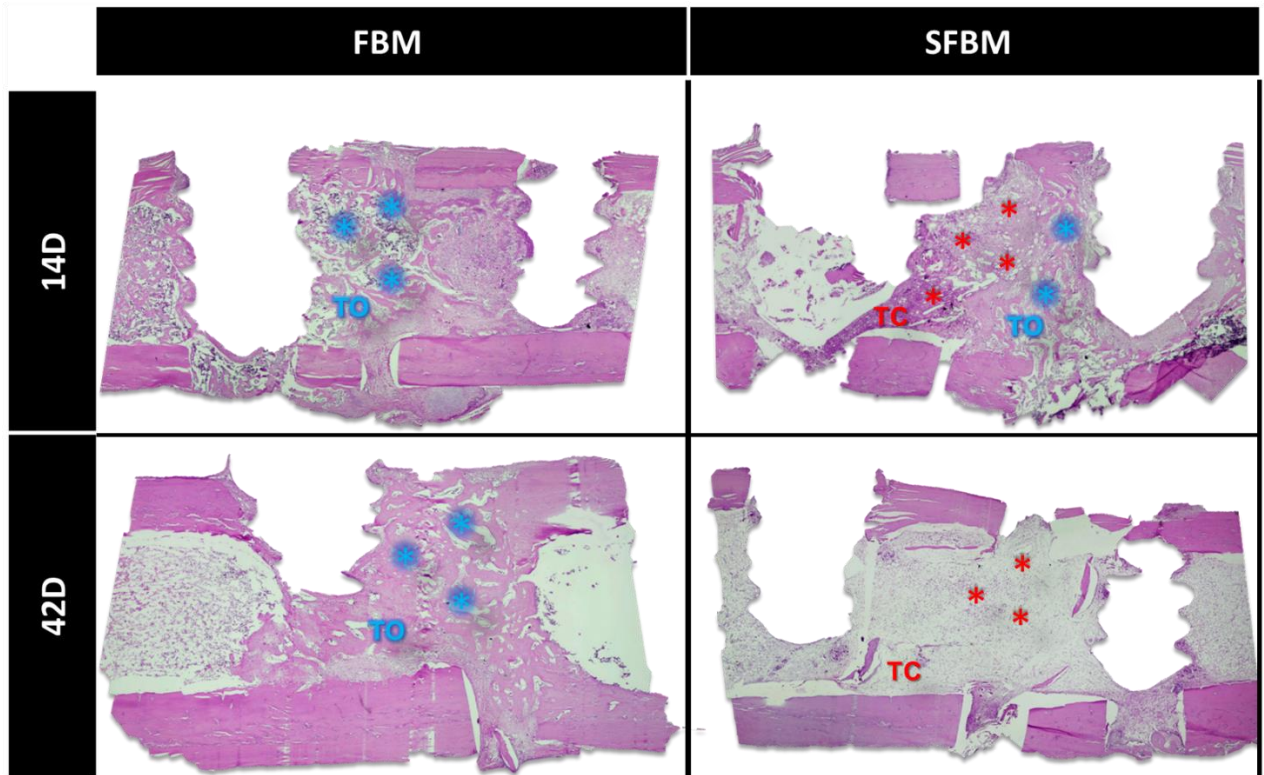
Diante dos resultados da análise histométrica, pode-se observar uma superioridade do grupo FBM, com relação a área de osso neoformado, quando comparado ao grupo SFBM ($p < 0,05$), resultado que corrobora com a contagem de osteócitos, onde também observou-se superioridade para o grupo FBM (Figuras 9, 10 e 11). Esses achados ficaram evidentes nas lâminas histológicas (Figura 10), em que desde aos 14 dias, o preenchimento de osso na região entre os parafusos de fixação das fraturas foi maior no grupo FBM, inclusive com trabéculas ósseas no primeiro período de análise. No período de 42 dias as diferenças entre os grupos ficaram mais expressivas, sendo que o grupo FBM mostrou maior formação de osso em todas as regiões do “gap” reparacional, não somente restrito as proximidades da fixação.

Figura 9 – Representação gráfica da Área de osso neoformado (AON), para os grupos FBM e SFBM. Símbolos: * e # representam a diferença estatística entre os grupos no mesmo período ($p < 0,05$).



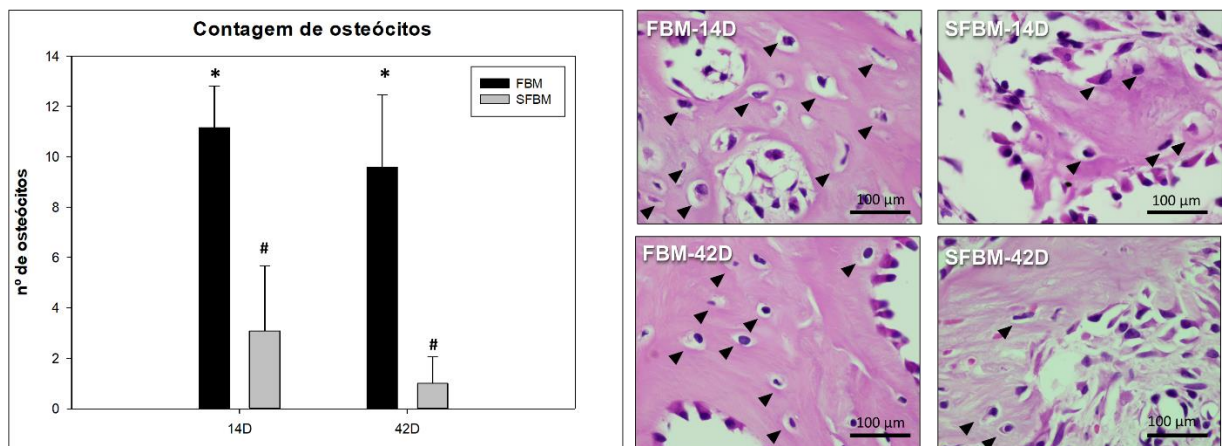
Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Figura 10 – Imagens representativas dos grupos experimentais, na região do “gap” reparacional, FBM e SFBM, objetiva de 4x (TO – Tecido ósseo; TC – Tecido conjuntivo).



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Figura 11 – Gráfico e fotomicrografias representativas da contagem do número de osteócitos. Símbolos: * e # representam a diferença estatística entre os grupos experimentais no mesmo período. Objetiva de 100x.

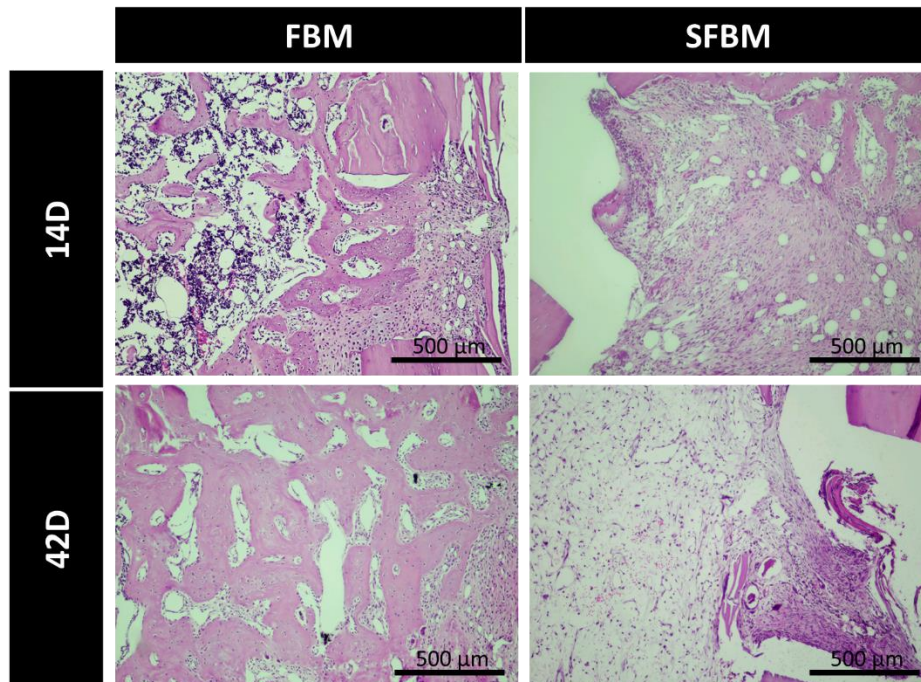


Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Qualitativamente, pode-se observar melhor qualidade e quantidade de tecido ósseo neoformado para o grupo FBM, em comparação ao grupo SFBM, em que este

apresentou extensas áreas de tecido conjuntivo, apresentando pouco preenchimento por tecido ósseo na região do “gap” reparacional (figura 12)

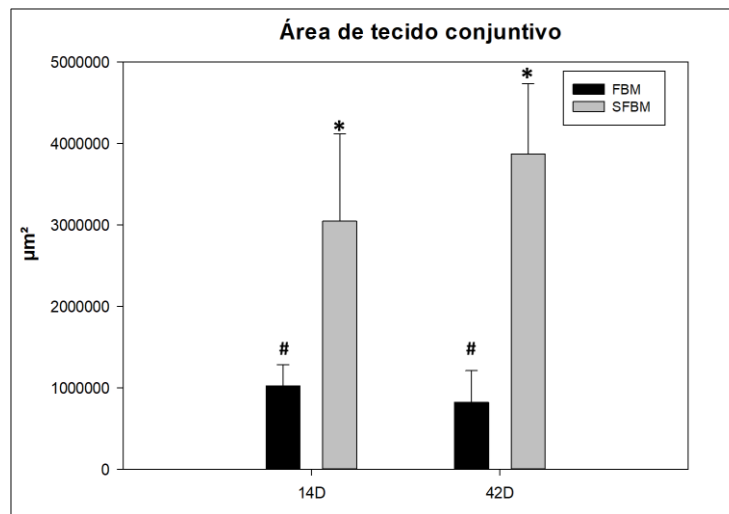
Figura 12 – Imagem representativa demonstrando maior volume de tecido ósseo neoformado na região do “gap” reparacional para o grupo FBM quando comparado a SFBM, em ambos os períodos experimentais. Aumento de 10X. Coloração HE. Barra: 500 μ m.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

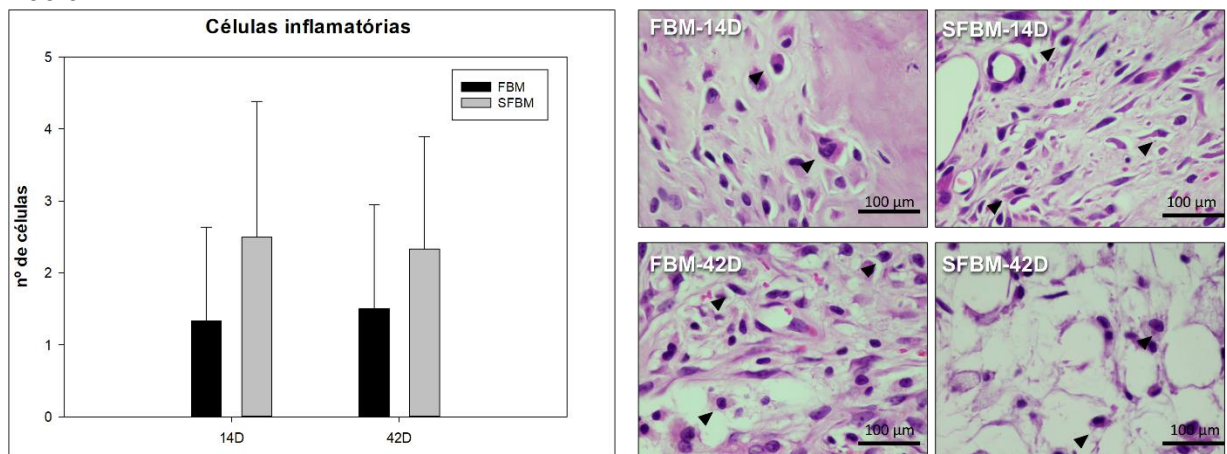
Com relação a área de tecido conjuntivo, observou-se maior volume para o grupo SFBM, quando comparado ao grupo FBM ($p < 0,05$). Já com relação ao perfil inflamatório não foi observado para nenhum dos grupos intenso infiltrado inflamatório na intimidade dos tecidos, assim como quantidade moderada de vasos sanguíneos. (Figuras 13, 14 e 15)

Figura 13 – Representação gráfica da Área de tecido conjuntivo (μm^2), para os grupos FBM e SFBM. Símbolos: * e # representam diferença estatística entre os grupos no mesmo período ($p < 0,05$).



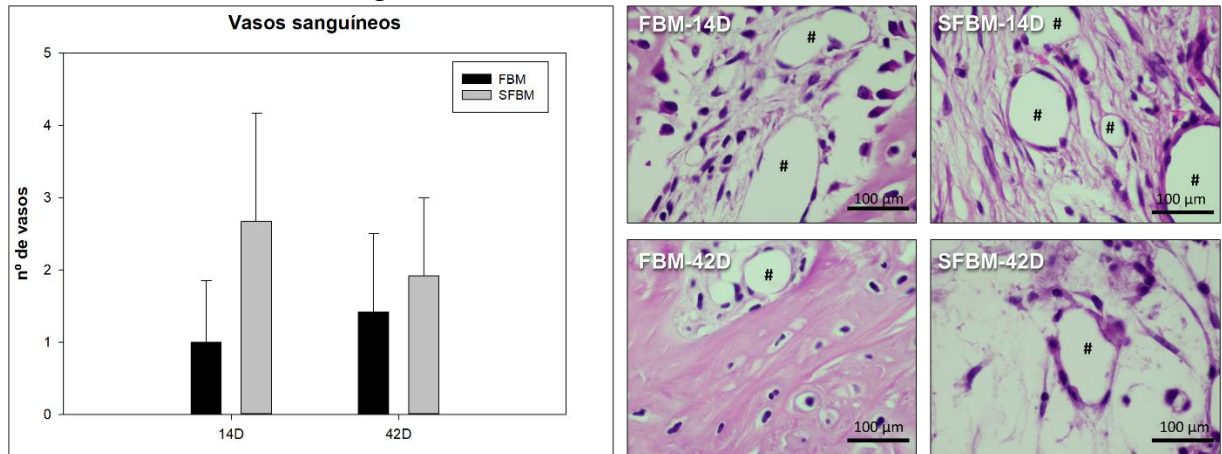
Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Figura 14 – Gráfico e fotomicrografias representativas da contagem de células inflamatórias (%) em cada grupo e períodos. Aumento de 100x. Coloração: HE. Barra: 100 μm .



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Figura 15 – Gráfico e fotomicrografias representativas da contagem de células inflamatória em cada grupo e períodos. Aumento de 100x. Coloração: HE. Barra: 100 um. Símbolo: # - vaso sanguíneo.

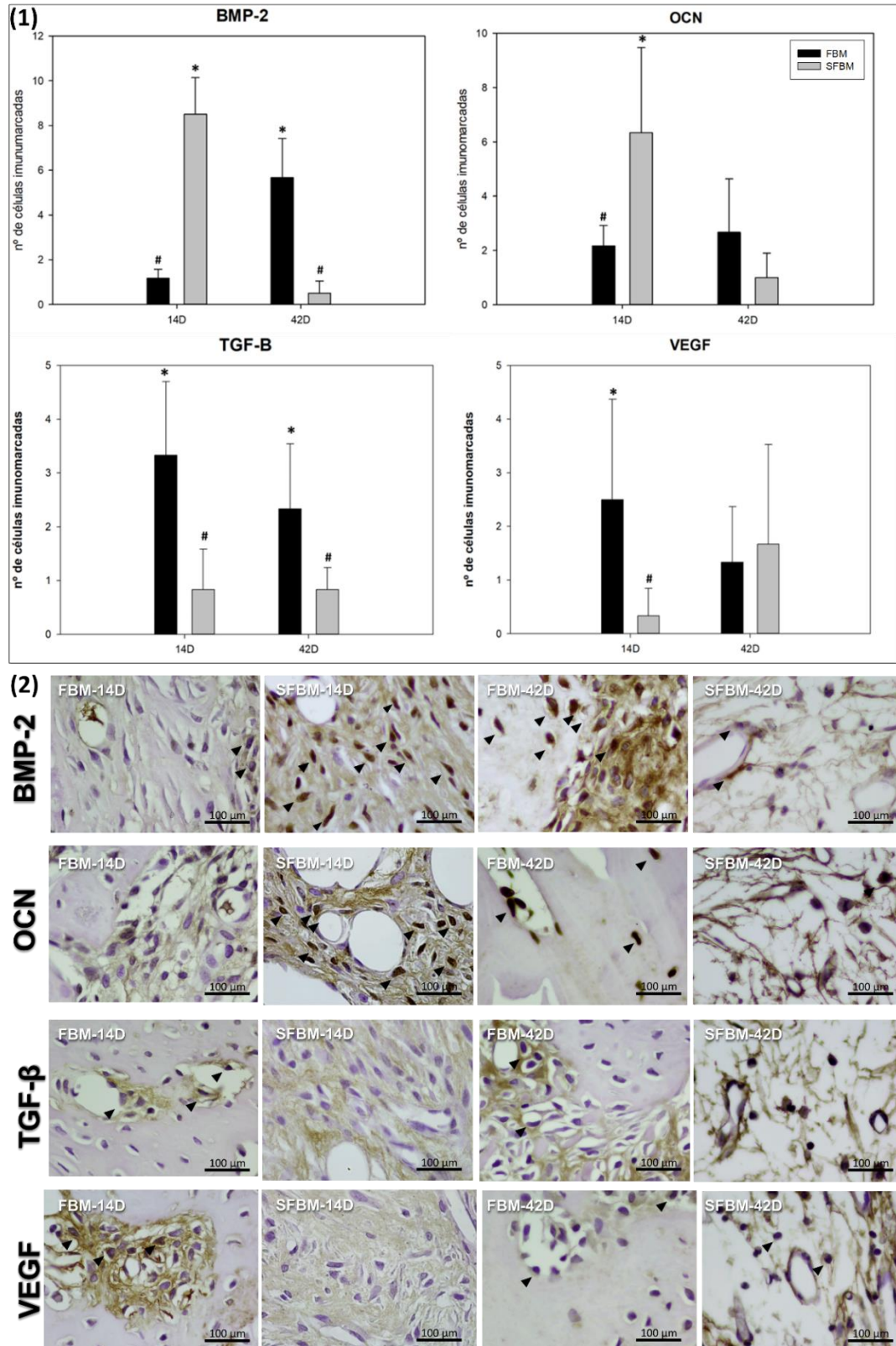


Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

4.3 Análise imuno-histoquímica

Através da análise imuno-histoquímica, pode-se observar maior imunomarcacão de anti-BMP-2 e OCN para o grupo SFBM, em comparacão ao grupo FBM, aos 14 dias ($p < 0,05$). Além disso, observou-se maior imunomarcacão de TGF- β e VEGF no grupo FBM, aos 14 e aos 42 dias de avaliacaão ($p < 0,05$).

Figura 16 – (1) Gráficos representativos da média e desvio padrão (%) do número de células imunomarcadas por BMP-2, OCN, TGF- β e VEGF. Simbolos; * e # - representando diferença estatística; (2) Fotomicrografias representativas das células imunomarcadas. Aumento de 100x. Contra-coloração; Hematoxilina de Harris. Barra: 100 μ m. Setas pretas: Células imunomarcadas.



5 DISCUSSÃO

Diante de condições sistêmicas do indivíduo que influenciem negativamente os processos metabólicos do organismo e também a microarquitetura do tecido ósseo, o reparo ósseo também estará afetado. Assim a incidência de complicações na reparação do tecido ósseo, principalmente no caso de fraturas, processo que exige uma maior demanda fisiológica dos tecidos, também poderá ser aumentada (ABD-ELAAL et al., 2015).

A literatura tem demonstrado a possibilidade da otimização do reparo, através de terapias de fotobiomodulação, como o emprego laser de baixa potência emitindo com luz vermelha (600 a 700nm) ou infravermelha (780 a 1100nm), que é capaz de promover o maior recrutamento de células mesenquimais indiferenciadas, assim como de células da linhagem osteoblástica, reduzir o infiltrado inflamatório local diminuindo assim a intensidade do processo inflamatório local, fornecendo um microambiente adequado para que o reparo dos tecidos (GARCIA; THEODORO, 2020; HAMBLIN; DEMIDOVA, 2006).

Sendo assim, com a presença de alterações sistêmicas como a osteoporose, que afeta diretamente a estrutura do tecido ósseo, a terapia de fotobiomodulação, pode auxiliar, como terapia coadjuvante, no tratamento de fraturas, visto que o reparo certamente seria dificultado diante desta condição (LIU et al., 2013). Diante dos resultados deste estudo, visto a superioridade no comportamento do reparo ósseo do grupo FBM, a hipótese nula foi rejeitada.

Com o modelo experimental empregado de indução de osteoporose pela ovariectomia de ratas, pode-se demonstrar no presente estudo as alterações significantes que ocorrem na arquitetura óssea destes animais, tendo em vista o baixo volume e qualidade de tecido ósseo apresentado em todos os grupos quando analisados os parâmetros microtomográficos, quando não é realizado nenhum tratamento sistêmico para a condição de osteoporose induzida nos animais.

Apesar disso, a análise histológica demonstrou de forma qualitativa, assim como quantitativamente que nos grupos FBM, em ambos os períodos experimentais avaliados, os animais apresentaram maior área de osso neoformado, e menor interposição de tecido conjuntivo, quando comparado ao grupo SFBM.

Aos 14 dias, observou-se grande vantagem para o grupo que recebeu a terapia fotobiomoduladora, de forma a demonstrar que o reparo foi acelerado em

comparação ao grupo SFBM, a partir dos 42 dias pode-se observar o preenchimento por tecido ósseo no “gap” reparacional quase em sua totalidade para o grupo FBM, enquanto no grupo não irradiado observa-se a interposição de grande quantidade de tecido conjuntivo.

Estes resultados podem ser associados com o que se obteve através da análise imuno-histoquímica, onde observou-se que no grupo SFBM houve maior imunomarcação de OCN e BMP-2, em comparação ao grupo FBM aos 14 dias, o que permite especular que o grupo irradiado apresentou de fato um reparo mais acelerado, uma vez que mesmo em um tempo precoce, já não apresenta a expressão significativa de marcadores que indicam a mineralização, e com o resultado histológico observa-se que este processo já ocorreu, enquanto o grupo SFBM ainda está no início do processo de calcificação (BRITEÑO-VÁZQUEZ et al., 2015; RAJAEI JAFARABADI et al., 2016; STATKIEVICZ et al., 2018).

Diante da condição sistêmica dos animais, isso é muito relevante, tendo em vista que o animal ovariectomizado, apresenta grande debilidade de sua estrutura óssea, o que certamente interfere diretamente no processo de reparo. Dessa forma a terapia de fotobiomodulação demonstrou ser uma importante aliada na otimização do reparo ósseo em tecidos de baixa qualidade ou com alterações significantes no seu metabolismo ósseo (CRONSHAW et al., 2020; GLÖSEL et al., 2010; MARCHINI; ETTINGER; HARTSHORN, 2019).

Com isso, também é importante ressaltar que a utilização de um adequado protocolo para terapias de fotobiomodulação é muito importante e tem sido um desafio para os estudos experimentais e clínicos em humanos, No presente estudo utilizou-se um protocolo já estabelecido previamente pelo nosso grupo de pesquisa utilizando o mesmo modelo experimental, e que apresentou resultados significativos com uma única aplicação intraoperatória em fraturas femorais (POLO et al., 2021). No entanto no presente estudo utilizamos 8 aplicações com intervalos de 24 horas para avaliar o efeito de múltiplas aplicações, pois outros estudos experimentais tem demonstrado que o número de aplicações pode afetar o reparo ósseo (STATKIEVICZ et al., 2018)

A literatura apresenta ainda poucos estudos, sobre a utilização da terapia fotobiomoduladora como terapia adjuvante no tratamento de fraturas (CHANG et al., 2014; CRONSHAW et al., 2020; MOSTAFAVINIA et al., 2018b; POLO et al., 2021; RAJAEI JAFARABADI et al., 2016), entretanto, tem-se que múltiplas aplicações pós-

operatórias, somadas a aplicação intra-operatória, foram capazes de potencializar o reparo ósseo em modelos experimentais, assim como observado neste estudo, onde o protocolo definido, foi aplicado intra-operatório, e nos 8 dias subsequentes a realização da osteotomia e fixação femoral dos animais, que apresentou melhores resultados comparado a estudos prévios realizados com apenas uma aplicação intra-operatória, demonstrando que a terapia fotobiomoduladora se apresentou eficaz em todo processo de osteogênese inicial (POLO et al., 2021),

Alado a isso observa-se maior imunomarcção de TGF- β no grupo FBM, que demonstra maior proliferao celular mesmo no tempo mais tardio de 42 dias para o grupo FBM, indicando que a terapia de Fotobiomodulaao pode ter favorecido este fenmeno, que auxiliou no preenchimento do “gap” reparacional (MOSTAFAVINIA et al., 2018; RAJAEI JAFARABADI et al., 2016; SELLA et al., 2015).

Embora, a aplicao mltipla da terapia se apresente com uma efetividade satisfatoria, pode-se notar que o reparo osseo atinge um platô, de forma que a irradiao dos tecido com laser de baixa potncia pode no interfeir de forma eficaz apôs determinado tempo. Tais dados podem ser explicados, pelo fato do laser atuar principalmente em áreas lesadas e também em áreas com tecido osseo alterado como o caso da osteoporose, uma vez que áreas em reparao recrutam células em intenso processo metabólico e consequentemente necessitam de um maior número de mitocôndrias em seu citoplasmas, estas que por sua vez são os principais fotorreceptores celulares (HAMBLIN; DEMIDOVA, 2006; SELLA et al., 2015).

É importante salientar também, as limitaoes deste estudo, diante do modelo experimental de osteotomia em fêmures de ratas ovariectomizada empregado. Esta problemática tem sido pouco abordada nos estudos experimentais, principalmente em relao a fadiga do sistema de fixao, pseudoartrose e consequentemente a infeao das fraturas, resultando na perda de amostras.

Estes efeitos indesejáveis foram observados em muitos animais antes da padronizao desta metodologia. Acredita-se que essas complicaes foram diminuídas devido ao modelo de suspenso das patas dos animais (MEIRA et al., [s.d.]; PERES-UENO et al., 2017) e também a monitorao diária dos animais e verificao dos aparatos suspensórios do animal, como a Knesio Tape, utilizada

para fixação da cauda dos animais. Estes procedimentos possibilitaram manter os animais de forma satisfatória até o momento das eutanásias.

Portanto, os resultados deste estudo *in vivo* demonstram que o protocolo estabelecido é promissor, uma vez que permitiu que houvesse a otimização do reparo ósseo em ratas ovariectomizadas, que apresentam uma queda significativa em sua densidade mineral óssea (RAMALHO-FERREIRA et al., 2017), ou seja, um tecido ósseo de baixa qualidade, evento esse que repercute diretamente no reparo do tecido ósseo.

Em conjunto a isso, sabe-se que a terapia de fotobiomodulação apresenta baixo custo, e promove também benefícios a longo prazo, sem causar ao organismo efeitos adicionais indesejáveis (CHANG et al., 2014), o que encoraja desenvolvimento futuro de estudos clínicos randomizados, que possibilitem o norteamento da aplicação clínica deste protocolo na reparação de fraturas.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que a terapia de fotobiomodulação com laser de baixa potencia empregada em múltiplas sessões nos parametros utilizados no presente estudo promoveu melhora do reparo ósseo, acelerando a neoformação do tecido ósseo em áreas de simulação de fraturas femorais em ratas com osteoporose experimentalmente induzida.

REFERÊNCIAS

- ABD-ELAAL, A. Z. et al. Evaluation of the effect of low-level diode laser therapy applied during the bone consolidation period following mandibular distraction osteogenesis in the human. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 44, n. 8, p. 989–997, 1 ago. 2015.
- ABRAMOVITCH-GOTTLIB, L. et al. Low level laser irradiation stimulates osteogenic phenotype of mesenchymal stem cells seeded on a three-dimensional biomatrix. **Lasers in medical science**, v. 20, n. 3–4, p. 138–146, dez. 2005.
- ALT, V. et al. A new metaphyseal bone defect model in osteoporotic rats to study biomaterials for the enhancement of bone healing in osteoporotic fractures. **Acta biomaterialia**, v. 9, n. 6, p. 7035–7042, 2013.
- AMAROLI, A. et al. The Effects of Photobiomodulation of 808 nm Diode Laser Therapy at Higher Fluence on the in Vitro Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells. **Frontiers in physiology**, v. 9, n. FEB, 23 fev. 2018.
- BATISTA, J. D. et al. Low-level laser therapy on bone repair: is there any effect outside the irradiated field? **Lasers in medical science**, v. 30, n. 5, p. 1569–1574, 22 jul. 2015.
- BAYAT, M. et al. Comparison of effects of LLLT and LIPUS on fracture healing in animal models and patients: A systematic review. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 132, p. 3–22, 1 jan. 2018.
- BENETTI, F. et al. In vivo analysis of the presence of heme oxygenase-1, transcription factor Jun-D and CD90+/CD73+/CD105+/CD45- cells in the pulp of bleached teeth. **International endodontic journal**, v. 52, n. 12, p. 1723–1737, 1 dez. 2019.
- BORRELLI, J. et al. Physiological challenges of bone repair. **Journal of orthopaedic trauma**, v. 26, n. 12, p. 708–711, dez. 2012.
- BOUXSEIN, M. L. et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 7, p. 1468–1486, jul. 2010.
- BRITEÑO-VÁZQUEZ, M. et al. Low power laser stimulation of the bone consolidation in tibial fractures of rats: a radiologic and histopathological analysis. **Lasers in medical science**, v. 30, n. 1, p. 333–338, 1 jan. 2015.
- CHANG, W. D. et al. Therapeutic outcomes of low-level laser therapy for closed bone fracture in the human wrist and hand. **Photomedicine and laser surgery**, v. 32, n. 4, p. 212–218, 1 abr. 2014.
- CHEN, J. et al. Gelatin microspheres containing calcitonin gene-related peptide or substance P repair bone defects in osteoporotic rabbits. **Biotechnology letters**, v. 39, n. 3, p. 465–472, 1 mar. 2017.

CHEN, X. et al. Effect of Bone Mineral Density on Rotator Cuff Tear: An Osteoporotic Rabbit Model. **PloS one**, v. 10, n. 10, 14 out. 2015.

CINTRA, L. T. A. et al. Evaluation of an experimental rat model for comparative studies of bleaching agents. **Journal of applied oral science : revista FOB**, v. 24, n. 2, p. 171–80, 1 abr. 2016.

CLAES, L.; RECKNAGEL, S.; IGNATIUS, A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. **Nature reviews. Rheumatology**, v. 8, n. 3, p. 133–143, mar. 2012.

CRONSHAW, M. et al. Photobiomodulation Dose Parameters in Dentistry: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Dentistry journal**, v. 8, n. 4, 1 dez. 2020.

DATTA, H. K. et al. The cell biology of bone metabolism. **Journal of clinical pathology**, v. 61, n. 5, p. 577–587, maio 2008.

DE OLIVEIRA, D. et al. Short term sodium alendronate administration improves the peri-implant bone quality in osteoporotic animals. **Journal of applied oral science : revista FOB**, v. 25, n. 1, p. 42–52, 1 jan. 2017.

EVANS, H. M.; LONG, J. A. Characteristic Effects upon Growth, Oestrus and Ovulation Induced by the Intraperitoneal Administration of Fresh Anterior Hypophyseal Substance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 8, n. 3, p. 38–39, mar. 1922.

FAVERANI, L. P. et al. Raloxifene but not alendronate can compensate the impaired osseointegration in osteoporotic rats. **Clinical oral investigations**, v. 22, n. 1, p. 255–265, 1 jan. 2018.

GIANNOUDIS, P. et al. Fracture healing in osteoporotic fractures: Is it really different?. A basic science perspective. **Injury**, v. 38, n. SUPPL. 1, mar. 2007.

GLÖSEL, B. et al. Review of Dental Implant Rat Research Models Simulating Osteoporosis or Diabetes. **The International journal of oral & maxillofacial implants**, v. 25, p. 516–524, jan. 2010.

HAMBLIN, M. R.; DEMIDOVA, T. N. Mechanisms of low level light therapy. **Mechanisms for Low-Light Therapy**, v. 6140, p. 614001, 9 fev. 2006.

ISLAM, A. A. S. et al. Healing of fractures in osteoporotic rat mandible shown by the expression of bone morphogenetic protein-2 and tumour necrosis factor-alpha. **The British journal of oral & maxillofacial surgery**, v. 43, n. 5, p. 383–391, out. 2005.

JIAO, H.; XIAO, E.; GRAVES, D. T. Diabetes and Its Effect on Bone and Fracture Healing. **Current osteoporosis reports**, v. 13, n. 5, p. 327–335, 7 out. 2015.

LIU, Y. et al. Osteoporosis influences osteogenic but not angiogenic response during bone defect healing in a rat model. **Injury**, v. 44, n. 7, p. 923–929, jul. 2013.

MARCHINI, L.; ETTINGER, R.; HARTSHORN, J. Personalized Dental Caries Management for Frail Older Adults and Persons with Special Needs. **Dental clinics of North America**, v. 63, n. 4, p. 631–651, 1 out. 2019.

MEIRA, P. S. et al. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA DO REPARO ÓSSEO EM TÍBIAS OSTEOTOMIZADAS DE RATOS (*Rattus norvegicus albinus*), SUBMETIDAS A TRATAMENTO COM ULTRASSOM, FRENTE À PRESENÇA E AUSÊNCIA DE CARGA. [s.d.].

MOSTAFAVINIA, A. et al. Effect of Pulsed Wave Low-Level Laser Therapy on Tibial Complete Osteotomy Model of Fracture Healing With an Intramedullary Fixation. **Iranian Red Crescent medical journal**, v. 17, n. 12, p. 12, 1 dez. 2015.

MOSTAFAVINIA, A. et al. Evaluation of the Effects of Photobiomodulation on Partial Osteotomy in Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats. **Photomedicine and laser surgery**, v. 36, n. 8, p. 406–414, 1 ago. 2018a.

MOSTAFAVINIA, A. et al. Evaluation of the Effects of Photobiomodulation on Partial Osteotomy in Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats. **Photomedicine and laser surgery**, v. 36, n. 8, p. 406–414, 1 ago. 2018b.

PERCIE DU SERT, N. et al. The ARRIVE guidelines 2.0: updated guidelines for reporting animal research. **BMJ open science**, v. 4, n. 1, 24 fev. 2020.

PERES-UENO, M. J. et al. Model of hindlimb unloading in adult female rats: Characterizing bone physicochemical, microstructural, and biomechanical properties. **PLoS ONE**, v. 12, n. 12, 1 dez. 2017.

POLO, T. O. B. et al. Plasma Electrolytic Oxidation as a Feasible Surface Treatment for Biomedical Applications: an in vivo study. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.

POLO, T. O. B. et al. Is an anodizing coating associated to the photobiomodulation able to optimize bone healing in ovariectomized animal model? **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 217, 1 abr. 2021.

RAJAEI JAFARABADI, M. et al. The effects of photobiomodulation and low-amplitude high-frequency vibration on bone healing process: a comparative study. **Lasers in medical science**, v. 31, n. 9, p. 1827–1836, 1 dez. 2016.

RAMALHO-FERREIRA, G. et al. Alveolar bone dynamics in osteoporotic rats treated with raloxifene or alendronate: confocal microscopy analysis. **Journal of biomedical optics**, v. 20, n. 3, p. 038003, 26 mar. 2015a.

RAMALHO-FERREIRA, G. et al. Alveolar bone dynamics in osteoporotic rats treated with raloxifene or alendronate: confocal microscopy analysis. **Journal of biomedical optics**, v. 20, n. 3, p. 038003, 26 mar. 2015b.

RAMALHO-FERREIRA, G. et al. Effect of antiresorptive drugs in the alveolar bone healing. A histometric and immunohistochemical study in ovariectomized rats. **Clinical oral investigations**, v. 21, n. 5, p. 1485–1494, 1 jun. 2017.

SATHYENDRA, V.; DAROWISH, M. Basic science of bone healing. **Hand clinics**, v. 29, n. 4, p. 473–481, nov. 2013.

SELLA, V. R. G. et al. Effect of low-level laser therapy on bone repair: a randomized controlled experimental study. **Lasers in medical science**, v. 30, n. 3, p. 1061–1068, 1 abr. 2015.

STATKIEVICZ, C. et al. Photomodulation multiple sessions as a promising preventive therapy for medication-related osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in rats. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 184, p. 7–17, 1 jul. 2018.

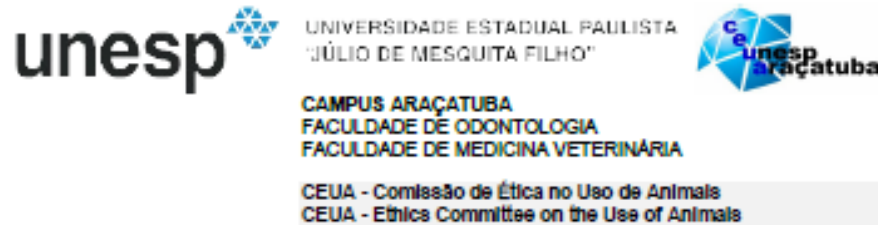
THORMANN, U. et al. Differences of bone healing in metaphyseal defect fractures between osteoporotic and physiological bone in rats. **Injury**, v. 45, n. 3, p. 487–493, mar. 2014.

THORNGREN, K. G. et al. Influence of age, sex, fracture type and pre-fracture living on rehabilitation pattern after hip fracture in the elderly. **Disability and rehabilitation**, v. 27, n. 18–19, p. 1091–1097, 30 set. 2005.

VALADARES, A.; SILVA, D. A.; BATISTA VOLPON, J. Modelo de suspensão pela cauda e seu efeito em algumas propriedades mecânicas do osso do rato. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 12, n. 1, p. 22–31, mar. 2004.

ANEXOS

ANEXO A - Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Efeito da fotobiomodulação na reparação de fraturas femorais: um estudo translacional do in vivo ao clínico randomizado", Processo FOA nº 0462-2021, sob responsabilidade de Leonardo Perez Faverani apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 30 de Julho de 2021.

VALIDADE DESTES CERTIFICADO: 31 de Agosto de 2023.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 30 de Setembro de 2023.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Effect of photobiomodulation on femoral fracture repair: a translational study from in vivo to randomized clinic", Protocol FOA nº 0462-2021, under the supervision of Leonardo Perez Faverani presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on July 30, 2021.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: August 31, 2023.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: September 30, 2023.



Prof. Associado João Carlos Callera
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Aracatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Aracatuba
Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
Fone (16) 3636-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br

ANEXO B – Periódico alvo para publicação

Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology



Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology

Supports open access

11.7	6.814
CiteScore	Impact Factor

<https://www.elsevier.com/journals/journal-of-photochemistry-and-photobiology-b-biology/1011-1344/guide-for-authors>