

Tárik Ocon Braga Polo

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



Araçatuba – SP

2019

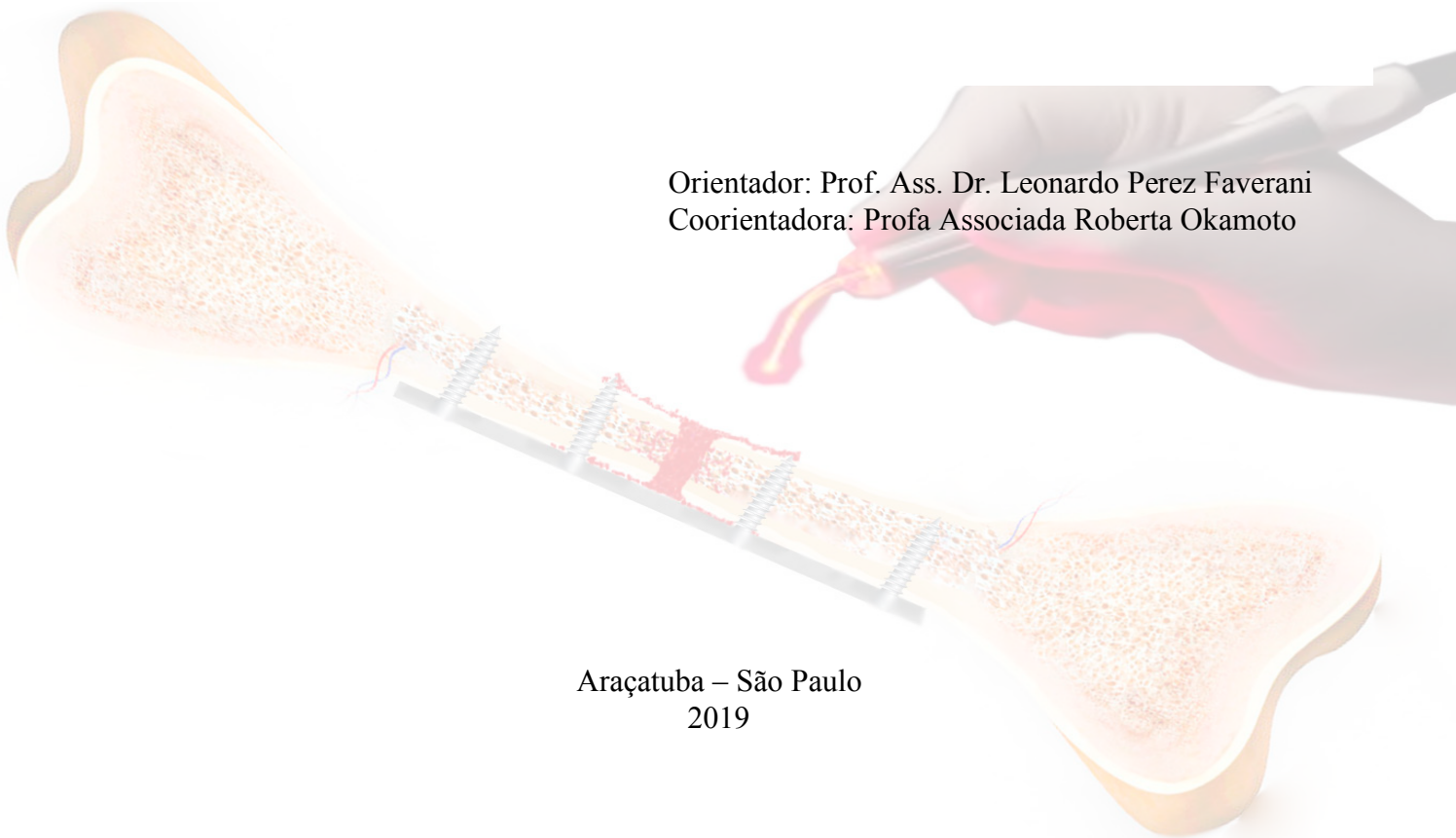
Tárik Ocon Braga Polo

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

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

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

Araçatuba – São Paulo
2019



Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

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

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

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

Black D7
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

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

Dedicatória

Dedicatória

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

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

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

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

Agradecimentos Especiais

Agradecimentos Especiais

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Agradecimentos

Agradecimentos

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

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

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

Epígrafe



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

(Sir. Isaac Newton)

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

Listas e Sumário

LISTA DE FIGURAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LISTA DE QUADROS

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

LISTA DE ABREVIATURAS

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

Sumário

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

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

Resumo

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

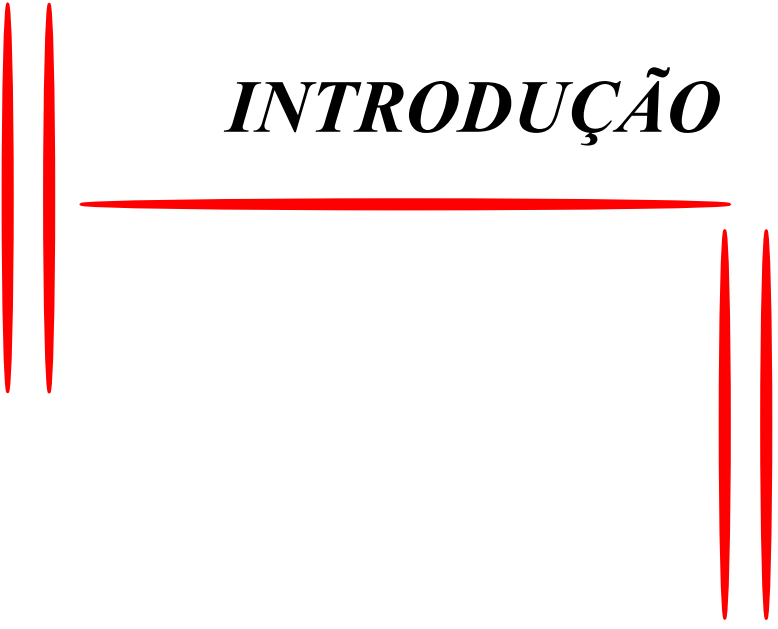
Palavras-chaves: Osteoporose, regeneração óssea e osteossíntese

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

Abstract

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

Key-words: Osteoporosis, bone regeneration and osteosynthesis



INTRODUÇÃO

1. Introdução

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

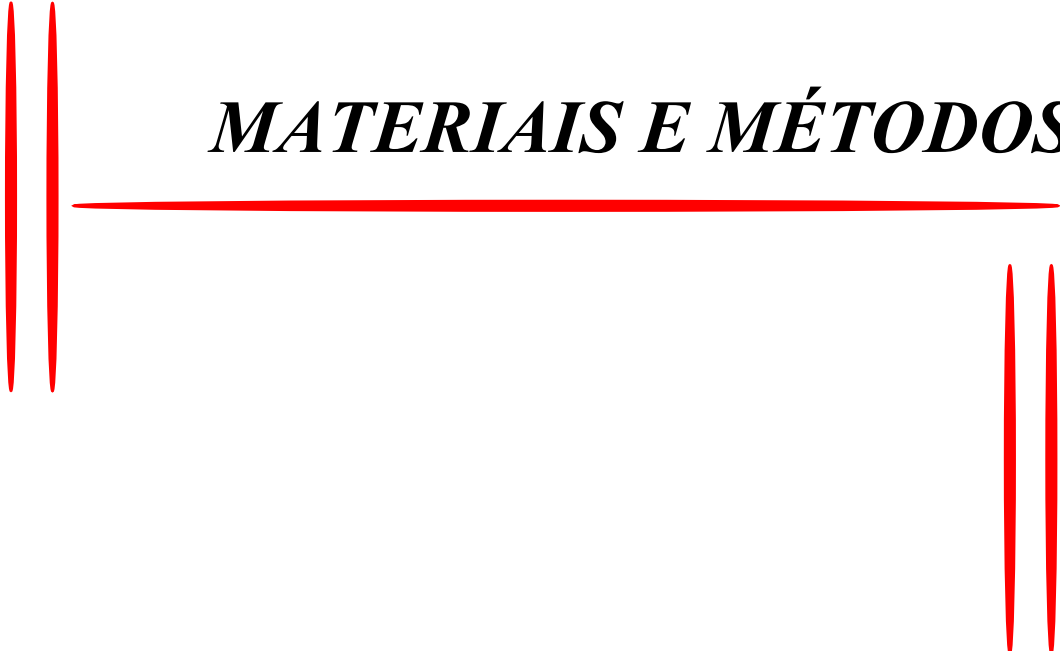
2. Objetivos

Objetivos Gerais: Avaliar a associação dos princípios da fotobiomodulação e bioatividade no reparo de fraturas ósseas em ratas ovariectomizadas.

Objetivos Específicos:

1) Avaliar o efeito bioestimulador de miniplacas com texturização de superfície por um método de oxidação por plasma eletrolítico em comparação a miniplacas convencionais, sem texturização de superfície, tanto em ratas saudáveis como em ratas osteoporóticas;

2) Avaliar o efeito fotobiomodulador pelo *laser* no reparo ósseo associado ou não ao potencial bioestimulador das miniplacas, com e sem texturização de superfície, tanto em ratas saudáveis como em ratas osteoporóticas.



MATERIAIS E MÉTODOS

4. Materiais e Métodos

Nesta proposta, miniplacas do sistema 1,5mm, com 4 furos, sem intermediários na sua extensão foram utilizadas para a fixação das fraturas em fêmur de ratas (Figura 1). As miniplacas foram fornecidas por empresas do setor (Engimplan Engenharia de Implantes, Rio Claro, SP, Brasil).

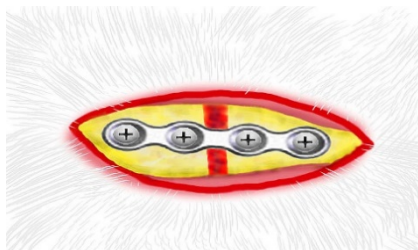


Figura 1 – Esquema da placa do Sistema 1,5mm com 4 furos, sem intermediários instalada fixando a fratura em fêmur de ratas.

4.1. Texturização de superfície através da oxidação por plasma eletrolítico

Após o fornecimento das miniplacas por parte da empresa do setor de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, metade dessas foram separadas aleatoriamente para a modificação da superfície topográfica por meio da técnica de oxidação por plasma eletrolítico.

As miniplacas de Ti foram tratadas em um reator, acionado por um sistema elétrico composto pelos seguintes componentes: fonte de alimentação alternada com tensão de saída variável, um transformador, um circuito de retificação, um disjuntor, um amperímetro e um voltímetro. Um osciloscópio foi utilizado para verificar a forma de onda após a retificação. O sistema de processamento é composto pelo porta-eletrodos e a cuba eletrolítica.

Através do sistema elétrico, os eletrodos foram alimentados com tensão DC de até 1000 V e corrente máxima de 1,5 A. Um variador de tensão AC, acoplado na fonte permite o ajuste no valor desejado de tensão. No decorrer do tratamento, a temperatura da solução eletrolítica foi medida com um termômetro portátil. Os parâmetros de oxidação são a densidade de corrente de 50 mA/cm² e tensão 250-400 V. O tempo de oxidação foi de 10 minutos e a temperatura durante a oxidação mantida a 15 +/- 2 °C.

A solução eletrolítica foi preparada dissolvendo Ca(NO₃)₂.4H₂O, NH₄H₂PO₄ (3,6 x 10⁴ M) em 1L de água destilada, com relação molar sendo 1,67, a fim de promover a incorporação de diferentes íons na superfície especificada, com deposição de cálcio e fósforo durante 10 minutos [49, 50].

4.2. Caracterização estrutural baseline

No período baseline, seis miniplacas sem a texturização de superfície modificada (MS) e seis com texturização de superfície com a oxidação por plasma eletrolítico (PEO), foram analisadas pela microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para caracterização da superfície das miniplacas. A espectroscopia de energia dispersiva (EDS) foi empregada para avaliar a composição química dos tratamentos de superfície. Análises químicas elementares em volumes pequenos (ordem de $1 \mu\text{m}^3$) foram realizadas por meio da técnica de EDS utilizando um espectrômetro. A observação do espectro inteiro de raios X de modo simultâneo, permitiu a análise qualitativa rápida (mapeamento) dos principais elementos constituintes das superfícies das miniplacas de Ti, possibilitando comparação da composição química das diferentes superfícies analisadas. O software Image J (National Institute of Health, EUA) foi usado para determinar o diâmetro médio dos poros e/ou compostos depositados para cada tipo de tratamento [51].

4.3. Animais: Desenho experimental

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Para tanto, o projeto desta pesquisa foi enviado e aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP sob o protocolo nº 00287-2017. (Anexo I)

Para a análise da reparação de fraturas em fêmures, 64 ratas (*Rattus norvegicus albinus* Wistar), fêmeas, adultas (n=8 por grupo), com 6 meses de idade, com peso corporal variando de 250 a 300 gramas, de uma cepa mantida no Biotério do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA) – UNESP, as quais foram fornecidas pelo Biotério Central da mesma instituição. O número de animais por grupo foi determinado a partir do cálculo do Poder do Teste no website http://www.lee.dante.br/pesquisa/amostragem/qua_2_medias.html, que para o poder do teste na ordem de 0,8, necessitaria 8 animais por grupo.

Durante todo o experimento os animais foram mantidos em gaiolas, 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. Trinta e duas ratas foram aleatoriamente alocadas para serem submetidas ao procedimento de

ovariectomia bilateral (**OVX**) e a outra metade (n=32) ao procedimento cirúrgico fictício de ovariectomia, somente com exposição dos ovários, sem a remoção dos mesmos (**SHAM**).

4.3.1. 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 [52-55]. A obtenção de células epiteliais através do esfregaço, foram dispostas 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, as ratas foram submetidas à ovariectomia bilateral (grupo OVX) [56-60]. 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 e, a seguir foram imobilizadas sobre prancha cirúrgica em posição de decúbito lateral, realizada uma incisão de 1,5 cm com bisturi nos flancos, divulsão por planos do tecido subcutâneo e, em seguida, do peritônio afim de ter acesso à cavidade abdominal. Em seguida, os ovários e os chifres uterinos foram localizados e laqueados com fio de Poliglactina 910 4.0 (Vicryl[™] – Jhonson & Jhonson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos). Feito isso foi feita a remoção dos ovários. Finalizado, foi feita a sutura por planos com fio de Poliglactina 910 4.0 (Vicryl[™] – Jhonson & Jhonson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos). As ratas do grupo saudável (**SHAM**) passaram pelo mesmo procedimento, porém apenas foi realizada a exposição cirúrgica dos chifres uterinos e dos ovários sem suas respectivas laqueadura e remoção (Figura 2).

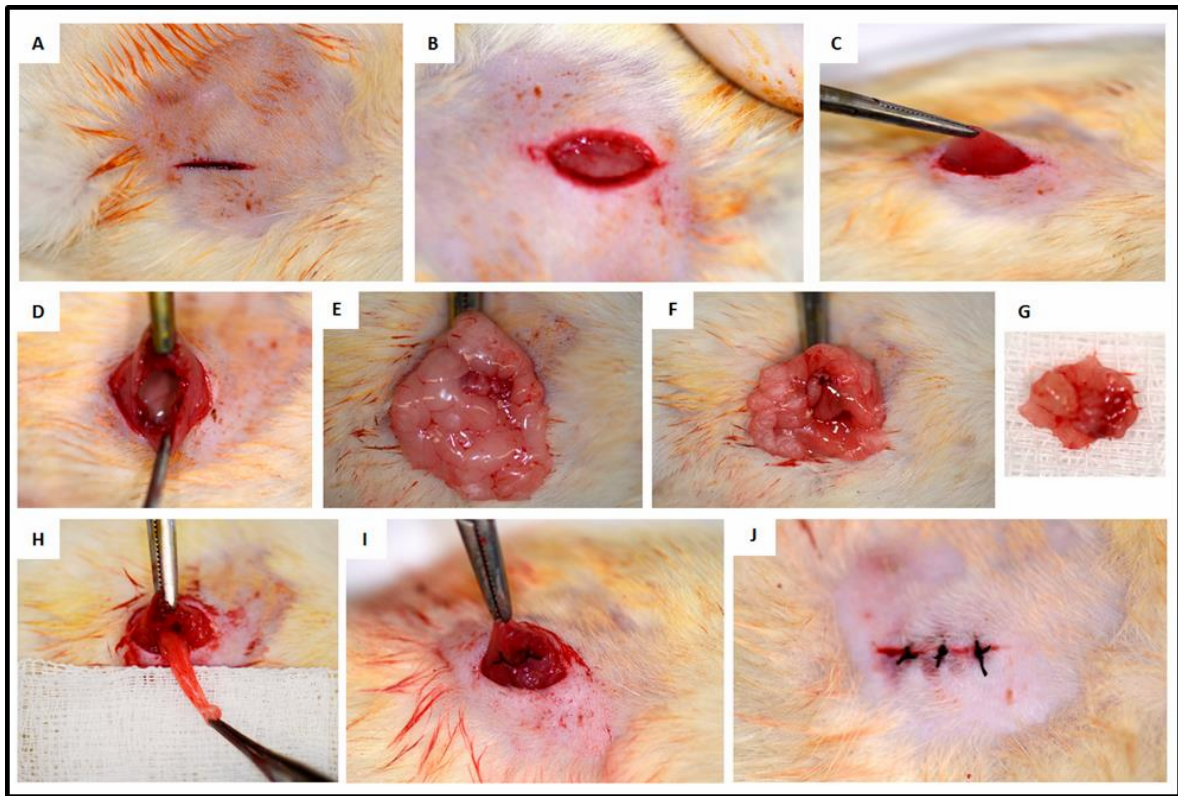


Figura 2 - Etapas cirúrgicas do procedimento cirúrgico de ovariectomia. (A) Incisão nos flancos das ratas. (B) Divulsão dos planos anatômicos subcutâneos. (C) Acesso ao peritônio. (D) Incisão do peritônio e acesso a cavidade abdominal. (E) Localização do ovário e chifre uterino. (F) Laqueadura do chifre uterino. (G) Ovário removido. (H) Reposição dos tecidos laqueados. (I) Sutura dos planos internos. (J) Sutura do plano superficial.

Estes animais continuaram no biotério sendo alimentadas com ração e água *ad libitum* durante todo o tempo experimental e foram mantidos em gaiolas que comportam até 4 animais. A temperatura do ambiente foi mantida 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 as ratas foram submetidas ao procedimento de osteotomia para simulação de fratura de fêmur. [13]

4.3.2. Simulação de fraturas femurais

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, Scandicaïne 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont, França) como anestesia local para hemostasia do campo operatório.

E após a sedação dos animais, foi realizada a tricotomia na porção lateral do fêmur direito ou 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. Para a eleição do lado correspondente ao fêmur operado e qual tipo de placa (CONV ou PEO) seria fixada no lado direito ou esquerdo, a randomização por sorteio foi realizada. Um envelope continha dois papéis, um com a palavra "direito" e o outro "esquerdo". Um outro envelope continha também dois papéis, um com a palavra "CONV" e o outro "PEO". Por fim, outro envelope continha dois papéis, um com a palavra "fotobiomodulação" e outro com "sem fotobiomodulação". Assim, no início da cirurgia, um pesquisador que estava fora do procedimento cirúrgico, realizou o sorteio, determinando para cada animal qual fêmur operado (direito ou esquerdo), qual a placa utilizada para fixação (CONV ou PEO) e qual animal seria irradiado ou não (CO ou *Laser*).

Dessa forma, com uma lâmina número 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) foi realizada uma incisão de 4 cm de comprimento 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 simulação da fratura, uma serra circular com cerca de 2 mm de espessura foi utilizada e assim, a osteotomia foi realizada na metáfise epifisária, distando 5 mm da cartilagem articular epifisária [16, 61, 62]. 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, em que ambas as superfícies da placa são usinadas (CONV) e, outra placa com as superfícies texturizadas por oxidação por plasma eletrolítico (PEO). A porção proximal da placa tiveram 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 distal da placa, mais dois parafusos (comprimento de 5 a 6 mm, determinado pelo profundímetro) foram parafusados para estabilização da fratura.

Durante todo o procedimento, tanto para a osteotomia e 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. 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 3)

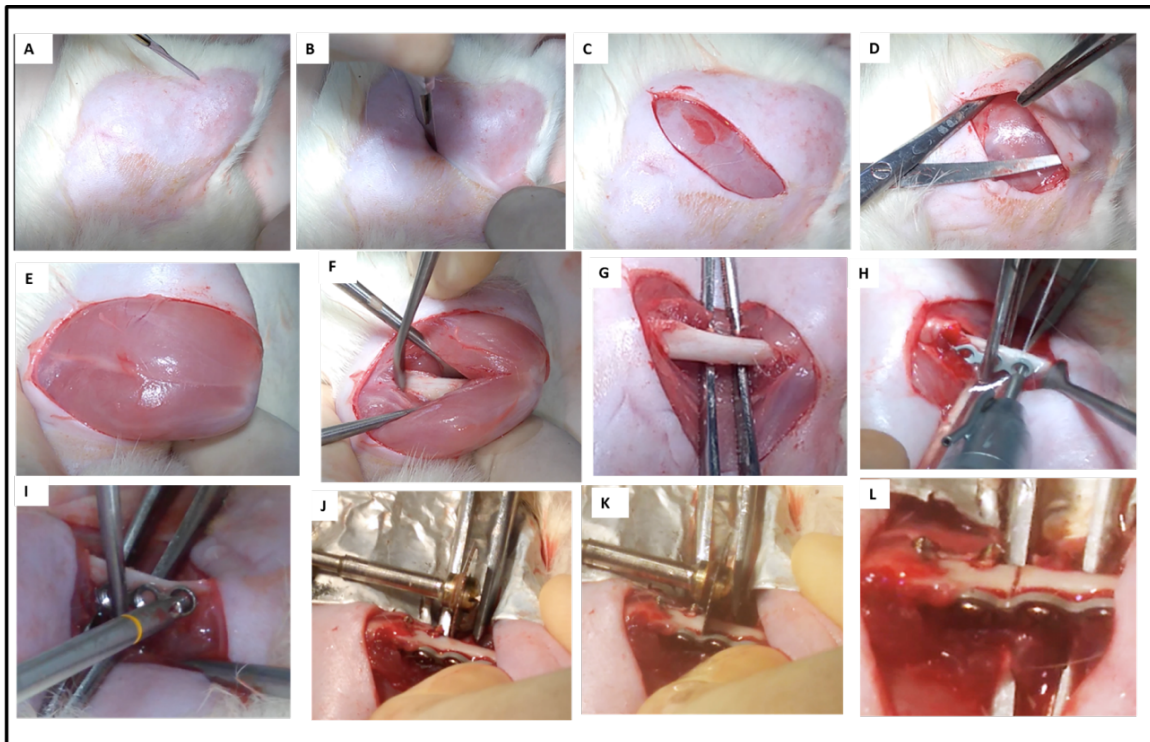


Figura 3 - Etapas do procedimento cirúrgico para simulação de fraturas femurais. (A) Região femural após tricotomia e antissepsia. (B) e (C) Incisão na porção lateral do fêmur. (D) Divulsão dos planos anatômicos. (E) Visualização dos músculos lateral e bíceps do fêmur. (F) Visualização do fêmur entre a musculatura. (G) Exposição do fêmur. (H) Fixação da miniplaca tratada por oxidação por plasma eletrolítico. (I) Fixação da miniplaca de superfície usinada. (J) e (K) simulação da fratura com disco circular. (L) Aspecto final da fratura.

Portanto, os grupos experimentais em função da indução da osteoporose e tipo da texturização de superfície foram determinados em SHAM/CO/CONV (ratas submetidas à cirurgia fictícia com com placa convencional e sem biomodulação); SHAM/*Laser*/CONV (ratas submetidas à cirurgia fictícia com com placa convencional sob efeito da fotobiomodulação por *laser*); SHAM/CO/PEO (ratas submetidas à cirurgia fictícia com placa texturizada por PEO e sem biomodulação); SHAM/*Laser*/PEO (ratas submetidas à cirurgia fictícia com com placa texturizada por PEO e sob efeito da terapia com fotobiomodulação); OVX/CO/CONV (ratas osteoporóticas com placa convencional e sem biomodulação); OVX/*Laser*/CONV (ratas osteoporóticas com placa convencional sob efeito da fotobiomodulação); OVX/CO/PEO (ratas osteoporóticas com placa texturizada por PEO e

sem bioestimulação); OVX/ laser/PEO (ratas osteoporóticas com placas texturizadas por PEO sob efeito da fotobiomodulação) (Figura 4).

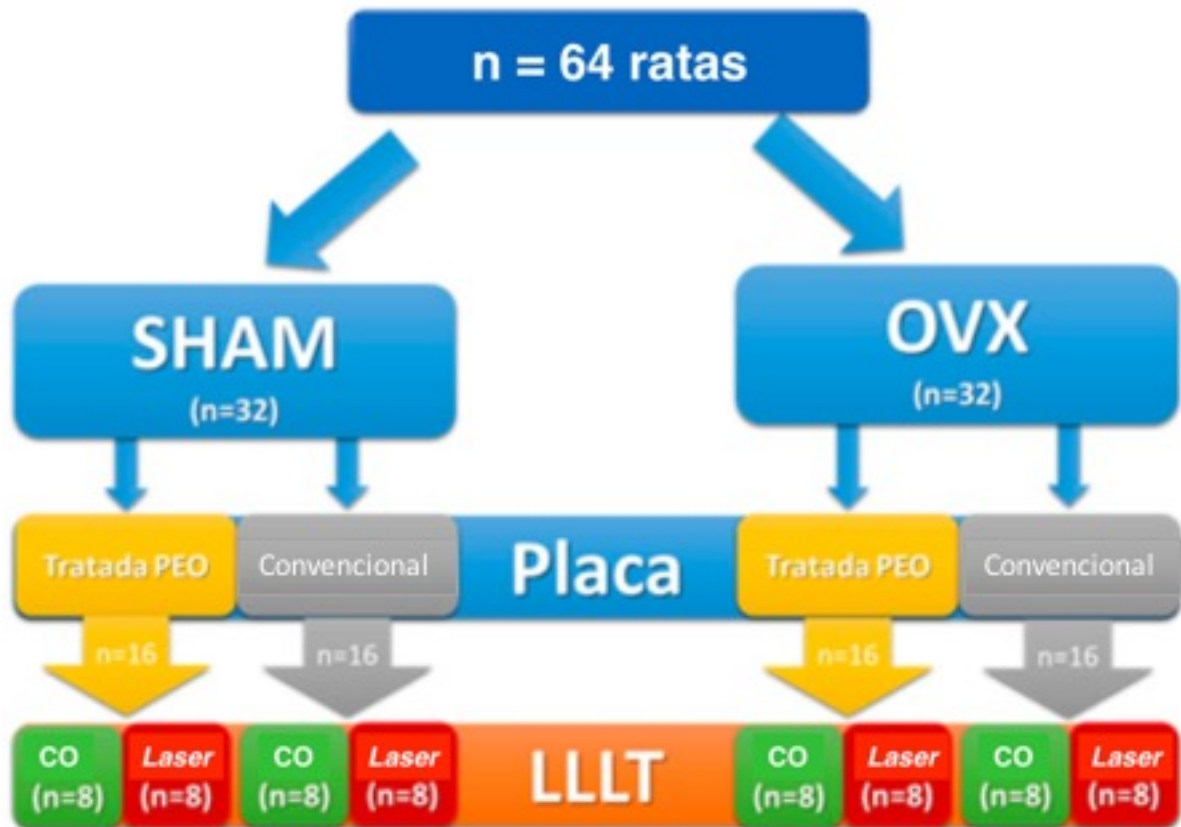


Figura 4 - Fluxograma representando a divisão dos grupos experimentais de acordo com deficiência sistêmica (OVX ou SHAM), tipo de miniplaca (CONV ou PEO) e fotobiomodulação = LLLT: (CO ou Laser).

Aos 14 e 42 dias de pós-operatório, foram administrados via intramuscular, na dose de 20 mg/kg de peso do animal, os fluorocromos calceína e vermelho de alizarina, respectivamente. Os fluorocromos injetados (calceína e alizarina) foram empregados para a análise por microscopia confocal a laser.

No pós-operatório imediato de cada procedimento invasivo (ovariectomia, simulação de fratura e infiltração de fluorocromo) foi administrado para analgesia, pela via intramuscular, dipirona sódica na dose de 250mg UI/kg e Pentabiótico na dose de 0,1 mg UI/kg como antibióticoterapia preventiva.

4.3.3. Biomodulação através da laserterapia de baixa intensidade (LLLT)

Os animais pertencentes a este grupo (SHAM/LASER/CONV, OVX/LASER/CONV, SHAM/LASER/PEO, OVX/LASER/PEO), ainda no ato cirúrgico, logo após a fixação das fraturas com miniplacas e parafusos, foram irradiados com laser de baixa intensidade de Arsênio-Gálio (As-Ga) da marca DMC, modelo IR (São Paulo, Brasil). Os animais receberão uma dose de laser na magnitude de 808 nm - 100 mW, 6J/cm², 180J/cm² durante 60 segundos por ponto / 5 pontos (Quadro 1). A aplicação foi pontual e perpendicular a metáfise femural, na região do "gap" confeccionado e fixado pela miniplaca e parafusos. (Figura 5) Em seguida, os tecidos foram fechados por planos anatômicos.

Quadro 1 – Protocolo de irradiação por laser de baixa intensidade

Parâmetros de Irradiação	Valores
Modo de Laser	Contínuo
Comprimento de onda	808 nm
Potência	100mW
Tamanho do ponto	0,0283cm ²
Densidade da potência	3,53W/cm ²
Energia	6J
Densidade de energia	180J/cm ²
Tempo	60 s
Número de pontos	5

* Parâmetros adaptados seguindo os critérios de aplicação segundo Briteño-Vázquez 2015.

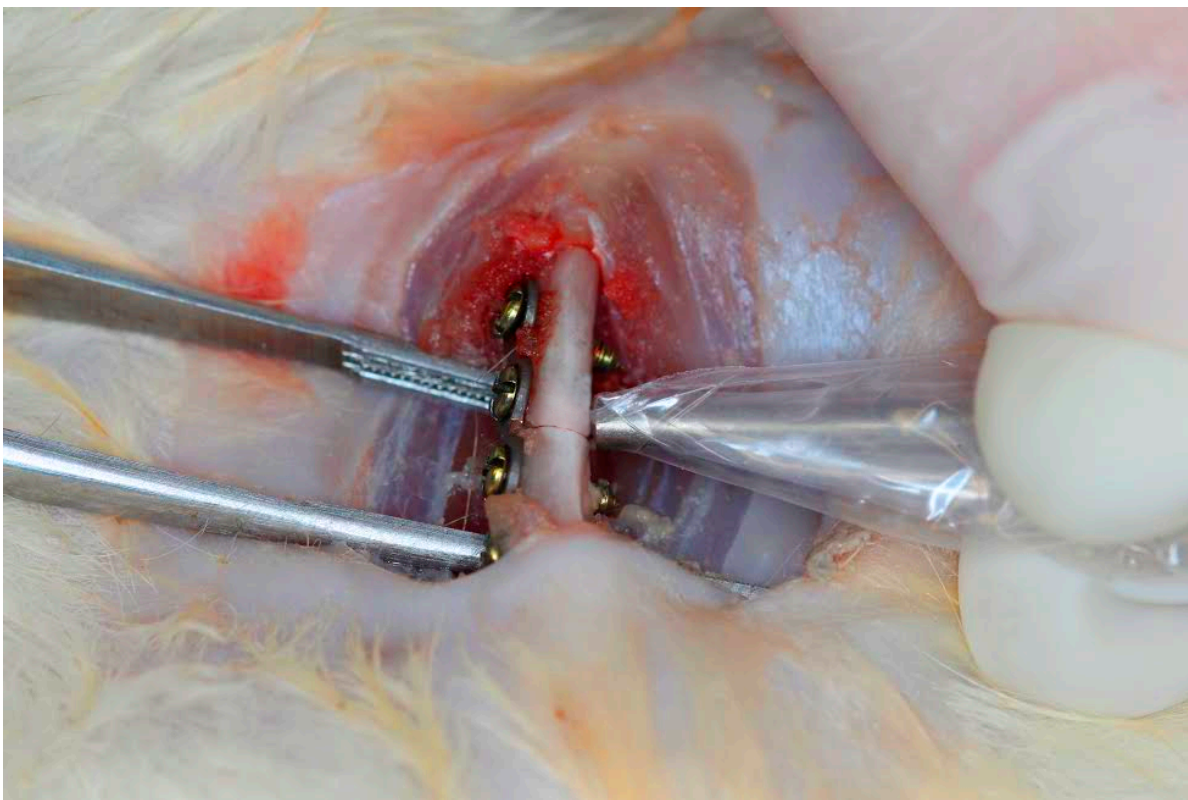


Figura 5 - Aplicação pontual e imediata na metáfise femural, na região do "gap" confeccionado e fixado pela miniplaca e parafusos.

4.4. Métodos de análises

Os animais foram submetidos à eutanásia aos 60 dias após a cirurgia para fixação das fraturas femurais, por sobredosagem anestésica (Associação de Tiopental Sódico, 150 mg/kg) pela via intraperitoneal, sendo as peças destinadas às análises para tecidos calcificados, tais como análise microtomográfica, histométrica e por microscopia confocal.

4.4.1. Microtomografia Computadorizada (Micro-Ct)

Para a análise tridimensional, após à eutanásia dos animais aos 60 dias de pós-operatório, as peças foram removidas, reduzidas, fixadas em formol a 10% por 24 horas, lavadas e armazenadas em álcool 70%, 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 μ m de espessura (50Kv e 500 μ), 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 (*threshold*). O *threshold* utilizado na análise foi de 25-90 tons de cinza, que possibilitou a obtenção do volume de osso formado na ROI referente ao tecido ósseo neoformado.

Portanto, seguindo os parâmetros volumétricos sugeridos pela Academia Americana de Pesquisa em Osso Mineralizado [63], 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).

4.4.2. Fases laboratoriais para tecidos calcificados

Após a realização do escaneamento das peças, estas retornaram para o prosseguimento do processamento laboratorial para inclusão em resina. Portanto, as peças passaram pela etapa de desidratação a partir da sequência crescente de álcoois 70, 80, 90, 95 e 100, gradativamente, com troca de solução a cada 3 dias. As peças em desidratação foram colocadas em agitador orbital (KLine CT – 150, Cientec – Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil) todos os dias durante 4 horas. Ao término da desidratação, as peças foram imersas em mistura de álcool 100 e resina fotopolimerizável Techno Vit® (Alemanha, Heraeus Kulzer GmbH Division Technik Philipp-Reis-Str. 8/13 D-61273 Wehrheim) em diferentes concentrações, até que se utilizasse apenas a resina como meio de imersão. As peças foram incluídas na resina Technovit, que foi fotopolimerizada e passaram pelo protocolo para processamento do Exakt (Cutting System, Apparatebau, GmbH, Hamburgo, Alemanha). O corte e o desgaste das peças foram realizados utilizando um sistema de corte e em politriz automática (Exakt Cutting System, Apparatebau, GmbH, Hamburgo, Alemanha) até a obtenção de secção de aproximadamente 120 µm de espessura.

4.4.3 Escaneamento por microscopia confocal a laser (análise da dinâmica óssea em reparação)

A partir da obtenção das lâminas, estas foram levadas para a análise em microscópico confocal a laser Leica CTR 4000 CS SPE (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha). As

imagens obtidas a partir de diferentes secções dos fêmures na região de interesse, foi semelhante como o realizado na análise por microtomografia (interface placa e o "gap" reparacional, criado pela osteotomia entre os dois cotos do fêmur fraturados). Depois da seleção da espessura, todos os cortes foram obtidos e operados por meio do z-stack, que permitirá obter o melhor ajuste de imagens que representará a secção de cada animal dos grupos experimentais. As imagens começaram desde o começo da fluorescência, o que representou na nossa metodologia, o início da calcificação (precipitação de cálcio na matriz orgânica). Estas imagens tiveram a dimensão de 1x1 mm² e corresponderam as secções óticas de 512 por 512 pixels. Secções de 2µm foram escaneadas por 2,5min. Assim, 28 cortes foram obtidos para cada 56µm de varredura. Os filtros de barreira utilizados foram o BP 530/30 nm e 590 LP, combinados com a ativação do "double dichroic" 488/568 nm, e o fotomultiplicador foi ajustado em 534 para calceína e 357 para alizarina. Os códigos 534 e 357 nm representaram os filtros que permitiram visualizar os fluorocromos. Eles estão localizados no microscópio e quando a luz da lâmpada de mercúrio passa por essas barreiras e alcança os cortes dos espécimes, é possível visualizar as cores dos fluorocromos. Um dos filtros possibilitam a visualização da calceína (filtro azul) e o outro filtro, a alizarina (filtro verde). As imagens obtidas por microscopia confocal foram reconstituídas através da pilha de software que está instalado para manipular o microscópio confocal (Leica CTR 4000 CS SPE, Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) [55, 64].

O osso do fêmur (região de interesse: "gap" reparacional) apresentou duas sobreposições de fluorocromos (calceína e alizarina), em que cada sobreposição representou uma sobreposição de cálcio que precipitou em cada um dos períodos, assim mostrando a conversão de osso velho para osso novo. Essas imagens foram salvas no formato TIFF e transportadas para o software ImageJ (Processing Software and Image Analysis, Ontario, Canada). Usando a ferramenta "color threshold", cada imagem foi padronizada de acordo com a tonalidade, saturação, e brilho a fim de revelar primariamente os fluorocromos. Primeiro, a calceína foi destacada, e a ferramenta "measure" foi usada para prover a área em µm². O mesmo procedimento foi realizado para a alizarina, obtendo dados da dinâmica do osso reparacional. O *turnover* ósseo, nessa abordagem metodológica, foi representado pela diferença entre osso velho (verde) e osso novo (vermelho). A partir das imagens sobrepostas (vermelho/verde), por meio da ferramenta "freehands" também do software Image J, foi mensurada a área em pixels² para quantificação mineral óssea.

Os fluorocromos são componentes químicos que tem a propriedade de se ligar ao cálcio no momento da precipitação na matriz orgânica. Assim sendo, as marcações pelos

fluorocromos representarão a quantidade da precipitação de cálcio, assim permitindo mensuração da neoformação óssea. Outro aspecto a ser considerado é o período em que os fluorocromos foram injetados, como o primeiro foi a calceína (verde), o osso marcado em fluorocromos verdes representará o osso velho. O segundo fluorocromo injetado foi a alizarina, portando, o osso marcado em fluorocromos vermelhos representará o osso novo. Considerando esses pontos é possível dizer que as diferentes cores representarão as diferentes idades dos ossos formados. A dinâmica do tecido ósseo é representada pelo *turnover* ósseo, que é observado através da renovação óssea representada pelos fluorocromos vermelhos. Quanto maior a prevalência de fluorescência vermelha, maior é a formação de osso novo, enquanto que a fluorescência verde representa o osso velho. Essa dinâmica permite observar as duas situações no mesmo corte, portanto, observar o que é novo do que é velho.

4.4.4. Histometria

As mesmas peças que foram montadas nas lâminas histológicas dos tecidos calcificados, após a análise em microscopia confocal foram lavadas em água deionizada e foram coradas com vermelho de alizarina e azul de Stevenel. A área de interesse, representada pela interface placa e o "gap" reparacional, criado pela osteotomia entre os dois cotos do fêmur fraturado, foi mensurada histometricamente por meio da análise da área de osso neoformado (NBF). Assim, após a fotomicrografia das lâminas histológicas e salvas em arquivo TIFF, essas foram transportadas para o programa computacional Image J (Processing Software and Image Analysis, Ontario, Canada), que por meio da ferramenta "free hands" foi utilizada para mensurar a área de osso neoformado em μm^2 . A região de interesse foi padronizada em três terços, sendo o primeiro terço representado pela região do "gap" reparacional em contato com a miniplaca para fixação da fratura; o terço médio, pela região intermediária e, o último terço, o mais próximo do osso cortical basal do fêmur.

4.4.5. Imunoensaio para dosagem de estrógeno

A concentração de estrógeno para as ratas que foram submetidas à ovariectomia bilateral (OVX) em comparação as que foram submetidas somente a cirurgia fictícia de ovariectomia (SHAM), foi determinado pelo método de ELISA - enzima imunoensaio, em plasma sanguíneo coletado. Nos Kits comerciais para dosagem dessas citocinas, os 96 poços foram recobertos e incubados com o anticorpo anti-estradiol durante 15-18h a 4°C. Após esse tempo de incubação, a placa foi lavada com PBS, contendo 0,5% de Tween 20 e incubada com solução bloqueadora (PBS contendo 1% de BSA), em temperatura ambiente. A placa, então, foi lavada e logo a seguir, incubada com os padrões e as amostras de plasma em

temperatura ambiente. Após este período, a placa foi lavada e incubada com anticorpo biotinilado à 25°C. A placa foi lavada, o conjugado Streptavidina-HRP foi adicionado e submetido à agitação (300 rpm) à 25°C. A placa foi lavada e incubada com a solução de substrato (Tetrametilbenzidina). O tampão “stop” foi adicionado para interromper a reação de coloração. A leitura foi realizada em espectrofotômetro ajustado para o comprimento de onda conforme as orientações do fabricante. (Figura 6)

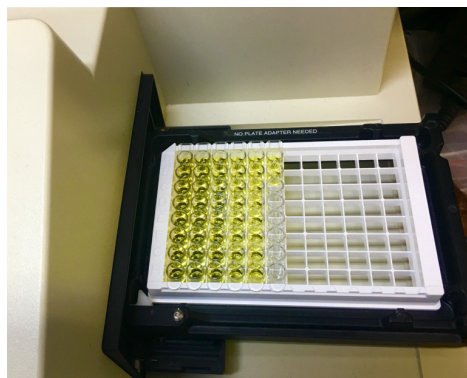


Figura 6 – Fotografia da placa posicionada para leitura no espectrofotômetro.

4.5. Análise estatística

Para cada parâmetro amostral dos resultados quantitativos, através da histometria (AON; área de fluorocromos: calceína/alizarina) e morfometria tridimensional pela microtomografia (BV/TV, Tb.Th, Tb.Sp e Tb.N), foi abordada a diferença entre os grupos experimentais o sistema de fixação (CONV e PEO) e a biomodulação (CO e *Laser*). Os dados foram inicialmente submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, o qual demonstrou que as interações dos dados eram homogêneos ($p > 0,05$). A comparação entre os grupos foi realizada separadamente no grupo SHAM e OVX. Portanto, para cada parâmetro, a análise de variância ANOVA 2 fatores foi realizada e o pós-teste de Tukey, quando as interações mostraram $p < 0,05$ de significância. O programa estatístico utilizado foi o SigmaPlot 2.0 (Exakt Graphs and Data Analysis, San Jose, California, USA).



RESULTADOS

5. Resultados

5.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

As fotomicrografias representativas obtidas após o escaneamento, das placas tratadas com PEO, em microscopia eletrônica de varredura (MEV), mostraram uma topografia de superfície homogênea com a presença de poros com geometria semelhante a “vulcão”, independente da magnitude do aumento avaliado (300 ou 2000x) (Figura 7).

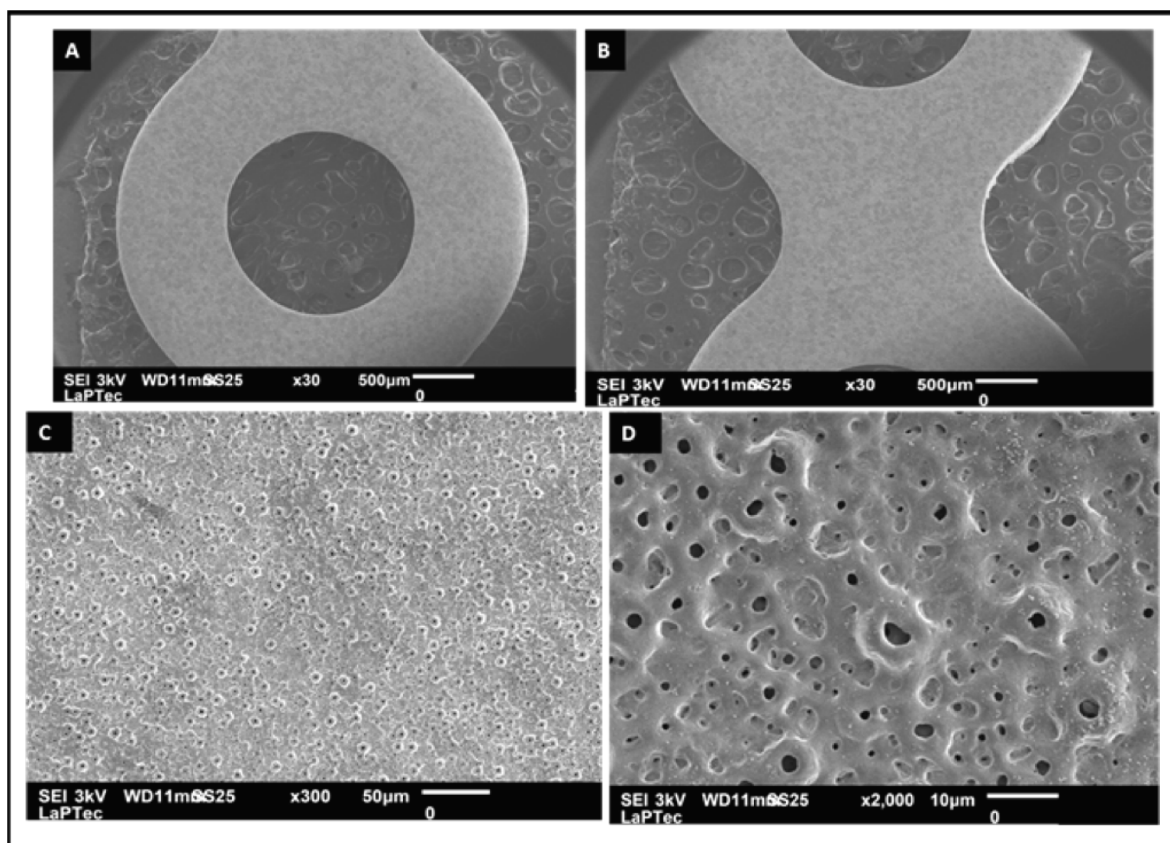


Figura 7 – Imagem representativa da microscopia eletrônica de varredura, nas magnitudes de 30x (A e B), 300x (C) e 2000x (D), das miniplacas com texturização por oxidação por plasma eletrolítico.

A partir da espectroscopia de energia dispersiva (EDS) a análise química elementar da topografia superficial das miniplacas mostrou picos de titânio em todas as amostras, bem como picos íons de cálcio e fosforo, com média aproximadamente 1,65 a 1,77% de cálcio e aproximadamente 5% de íons fósforo. O mapa de cores obtido a partir do EDS, demonstrou uma distribuição homogênea tanto dos constituintes da miniplaca de Ti como dos íons incorporados pelo método de texturização (cálcio e fósforo) em toda área escaneada (Figura 8).

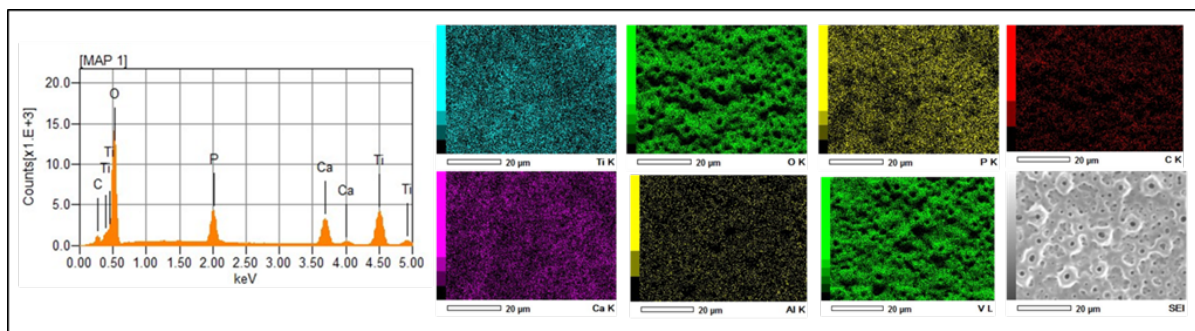


Figura 8 - Imagem representativa do mapeamento dos constituintes da miniplaca com a superfície texturizada por meio da oxidação por plasma eletrolítico (PEO), pela técnica de espectroscopia de energia dispersiva e mapa de cores referente à distribuição destes constituintes.

5.2. Imunoensaio para dosagem de estrógeno

Os resultados referentes à concentração de estrógeno plasmático avaliados através do método Elisa evidenciaram a condição de hipoestrogenismo nos animais que foram submetidos à ovariectomia bilateral para indução da osteoporose. É possível observar diminuição significativa na concentração de estradiol do grupo OVX em relação ao grupo SHAM ($P = 0,0003$), comprovando então que 90 dias após a ovariectomia, os animais apresentaram intenso hipoestrogenismo. (Figura 9)

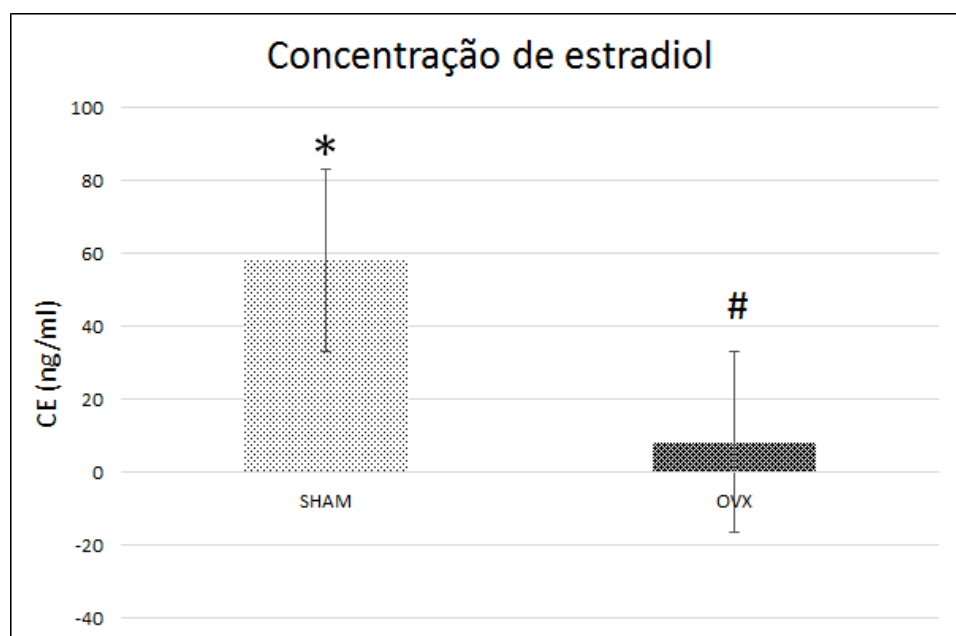


Figura 9- Representação gráfica da concentração de estrogênio plasmático, constatando hipoestrogenismo no grupo OVX em comparação a SHAM ($P = 0,0003$). O * e # representam a diferença estatística que houve entre os grupos.

5.3. Microtomografia Computadorizada (Micro-Ct)

Nas reconstruções tridimensionais foi possível visualizar no grupo (OVX CO CONV) a presença de “gap” não consolidado, no grupo (OVX LASER PEO) apresentando a formação de calosidade óssea fechando o “gap” e espaço medular. (Figura 10)

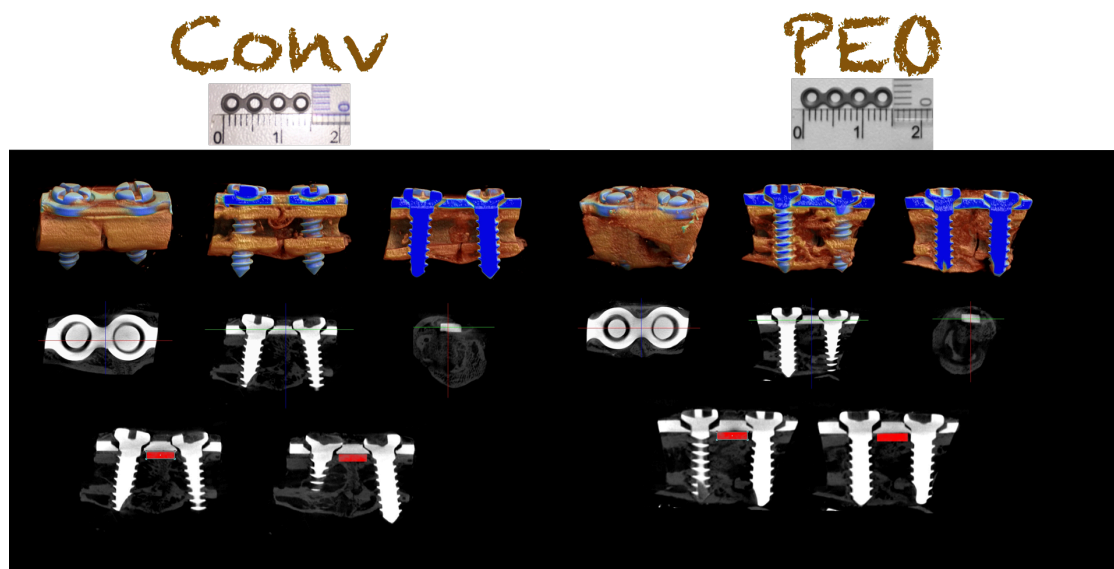


Figura 10 – Imagem de reconstrução 3D em três seções em orientação sagital, e sequência 2D em orientação axial, sagital e coronal e determinação da área de interesse “ROI” de um espécime representativo dos grupos (OVX LASER PEO) e (OVX CO CONV), demonstrando o padrão de avaliação microtomográfico adotado.

Os resultados referentes à microtomografia computadorizada evidenciaram que os animais saudáveis, independentemente da texturização de superfície da placa instalada (SHAM CONV e SHAM PEO), apresentaram valores bastante favoráveis à microarquitetura óssea durante o reparo da fratura femoral, com maiores valores para porcentagem de volume ósseo (BV.TV) e espessura trabecular (Tb.Th), em comparação aos animais osteoporóticos (OVX CONV e OVX PEO), além de menores valores de número de trabéculas (Tb.N) e espaço entre as trabéculas (Tb.Sp), comparado aos grupos osteoporóticos, exceto o grupo SHAM PEO que apresentou valores similares aos do grupo OVX PEO para o parâmetro Tb.Sp. Já com relação à comparação direta das placas texturizadas por PEO entre os animais osteoporóticos (OVX CONV x OVX PEO), foi possível observar valores bastante similares para todos os parâmetros, não apresentando diferenças significativas entre os grupos. Os dados microtomográficos forneceram resultados discretos, embora tenham demonstrado diminuição na comparação entre o grupo SHAM e OVX de um modo geral. Sendo aceitável a hipótese de que houve diminuição da totalidade de massa óssea para o grupo OVX especialmente

visualizada no parâmetro Po(tot). O resultado significativo da diminuição da porcentagem óssea ocorreu no grupo OVX em que não houve o tratamento por bioatividade da placa ou biomodulação por laser. Esse resultado significativo ocorreu também no parâmetro de número de trabéculas Tb.N no grupo OVX/CO/CONV em que não houve o tratamento por bioatividade da placa ou biomodulação por laser, mostrando uma tendência de que esse parâmetro juntamente com Tb.th foram responsáveis pelo resultado também em BVTv. Essa tendência demonstra atraso na maturação do osso trabecular analisado devido a menor espessura das trabéculas. É possível visualizar a manutenção da espessura trabecular dos grupos OVX tratados com laser. Todos os parâmetros demonstraram equilíbrio dos resultados dos grupos OVX LASER COM e OVX LASER PEO com seus respectivos grupos SHAM.(Figuras de 11 a 15)

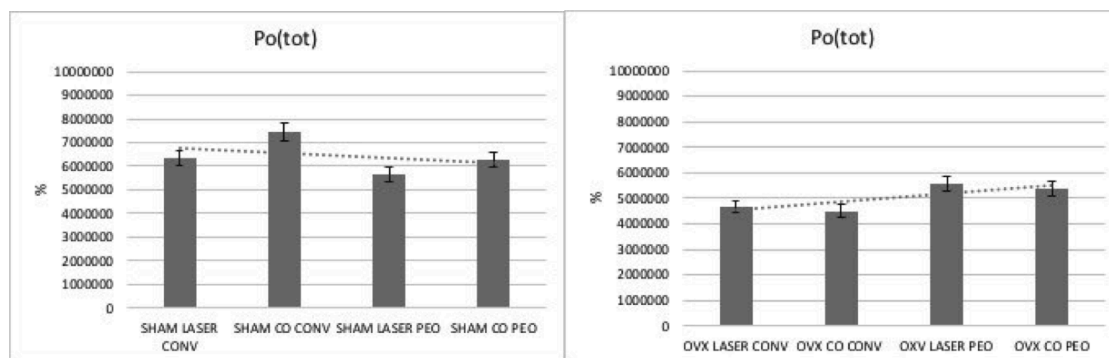


Figura 11 – Gráfico representativo dos valores médios e desvio padrão do parâmetro Po(Tot) da análise microtomográfica. (A) Grupos: SHAM LASER CONV, SHAM CO CONV, SHAM LASER PEO, SHAM CO PEO. (B) Grupos: OVX LASER CONV, OVX CO CONV, OVX LASER PEO, OVX CO PEO. Tanto nos grupos SHAM como OVX, a Po(Tot) foi similar nas comparações entre os grupos ($p>0,05$).

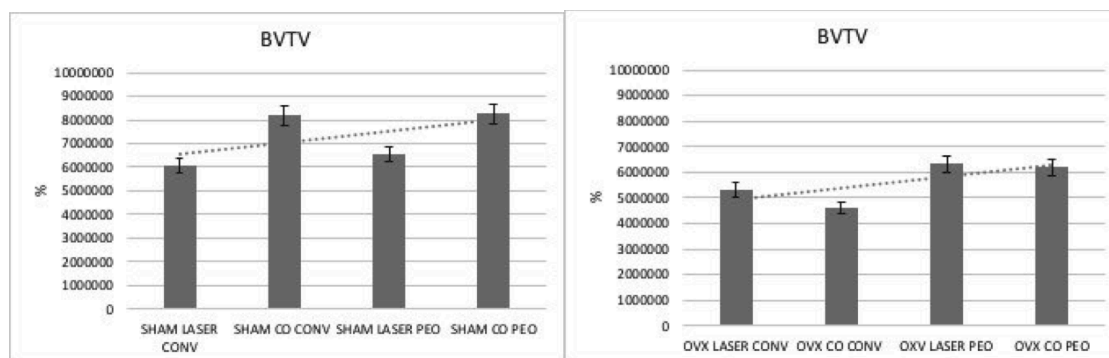


Figura 12 – Gráfico representativo dos valores médios e desvio padrão do parâmetro BVTv da análise microtomográfica. (A) Grupos: SHAM LASER CONV, SHAM CO CONV, SHAM LASER PEO, SHAM CO PEO: Todos os grupos foram similares ($p>0,05$). (B) Grupos: OVX

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

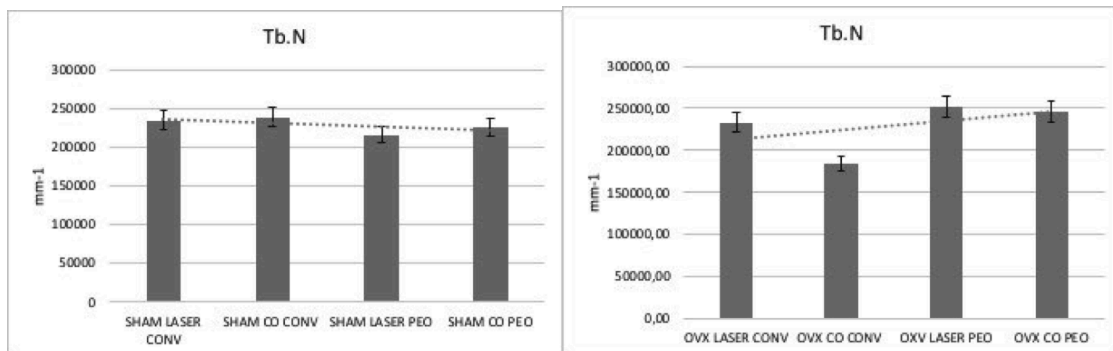


Figura 13 – Gráfico representativo dos valores médios e desvio padrão do parâmetro Tb.N da análise microtomográfica. (A) Grupos: SHAM LASER CONV, SHAM CO CONV, SHAM LASER PEO, SHAM CO PEO: Todos os grupos foram similares ($p > 0,05$). (B) Grupos: OVX LASER CONV, OVX CO CONV, OVX LASER PEO, OVX CO PEO.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

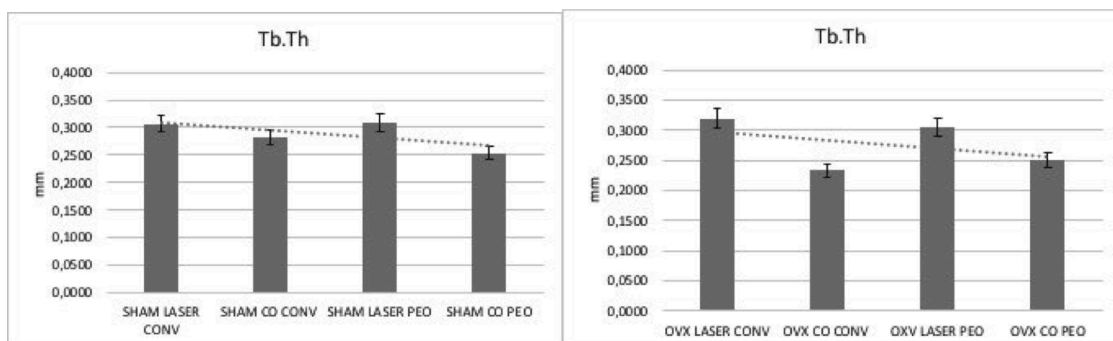


Figura 14 – Gráfico representativo dos valores médios e desvio padrão do parâmetro Tb.Th da análise microtomográfica. (A) Grupos: SHAM LASER CONV, SHAM CO CONV, SHAM LASER PEO, SHAM CO PEO: Todos os grupos foram similares ($p > 0,05$). (B) Grupos: OVX LASER CONV, OVX CO CONV, OVX LASER PEO, OVX CO PEO: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

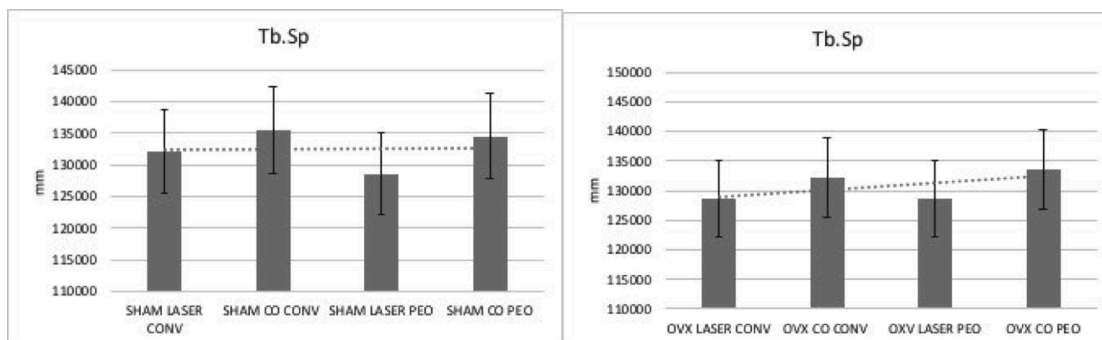


Figura 15 – Gráfico representativo dos valores médios e desvio padrão do parâmetro Tb.Sp da análise microtomográfica. (A) Grupos: SHAM LASER CONV, SHAM CO CONV, SHAM LASER PEO, SHAM CO PEO. (B) Grupos: OVX LASER CONV, OVX CO CONV, OVX LASER PEO, OVX CO PEO. Tanto nos grupos SHAM como OVX, a Tb.S foi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

5.4. Escaneamento por microscopia confocal a laser (análise da dinâmica óssea em reparação)

Os resultados da análise da área de precipitação dos fluorocromos demonstraram melhores padrões de mineralização quando foi utilizado a placa PEO (SHAM LASER PEO, SHAM CO PEO, OVX LASER PEO, OVX CO PEO), ainda nesse sentido, a mensuração demonstrou maiores resultados ($p<0,05$) na precipitação de vermelho de alizarina para os grupos onde foi realizado a aplicação do laser, mostrando que existe potencial favorável em sua aplicação em situações de osteopenia como é possível visualizar nas figuras de 16 a 19.

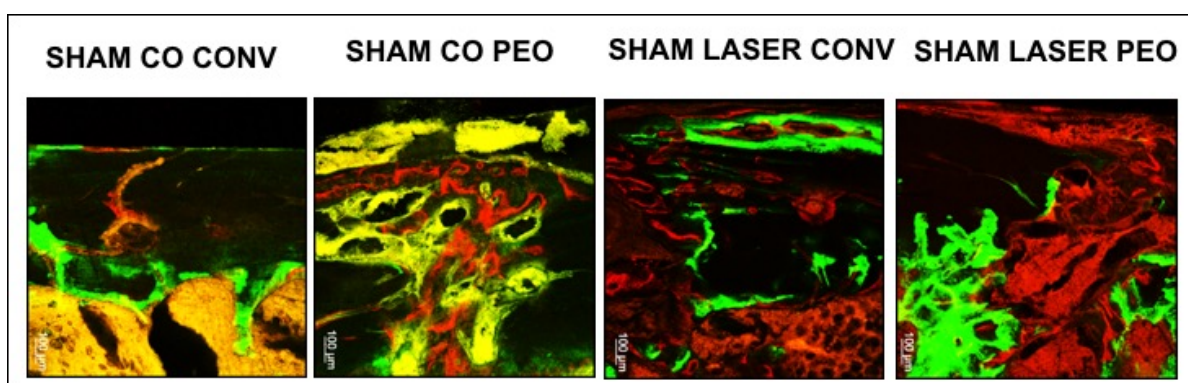


Figura 16 – Fotomicrografia (aumento de 100 μ m) da dinâmica do tecido ósseo por meio da precipitação de fluorocromos (calceína na cor verde e alizarina na cor vermelha), a coloração amarelada corresponde a sobreposição do vermelho sobre o verde, que foram analisados pela microscopia confocal a laser referente aos grupos: SHAM LASER CONV,

SHAM CO CONV, SHAM LASER PEO e SHAM CO PEO. Dinâmica do tecido ósseo por meio da precipitação de fluorocromos (calceína e alizarina) analisados pela microscopia confocal a laser referente aos grupos: SHAM LASER CONV, SHAM CO CONV, SHAM LASER PEO e SHAM CO PEO.

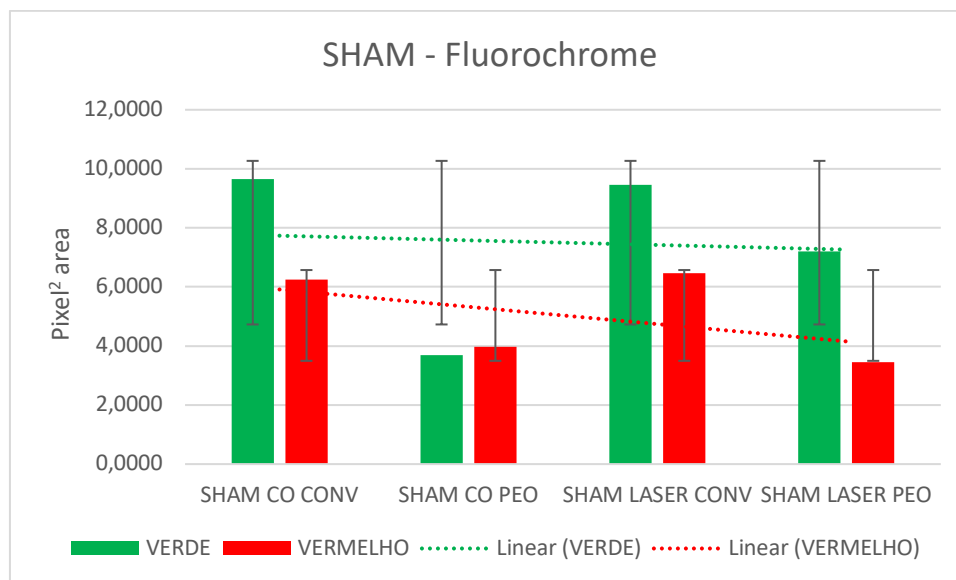


Figura 17 - O gráfico de barras mostra os valores médios e desvio padrão representativos dos grupos analisados em função das precipitações dos fluorocromos. O laser no grupo SHAM mostrou maior dinamismo do tecido ósseo, com maiores precipitações de calceína no grupo SHAM LASER PEO em comparação ao SHAM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

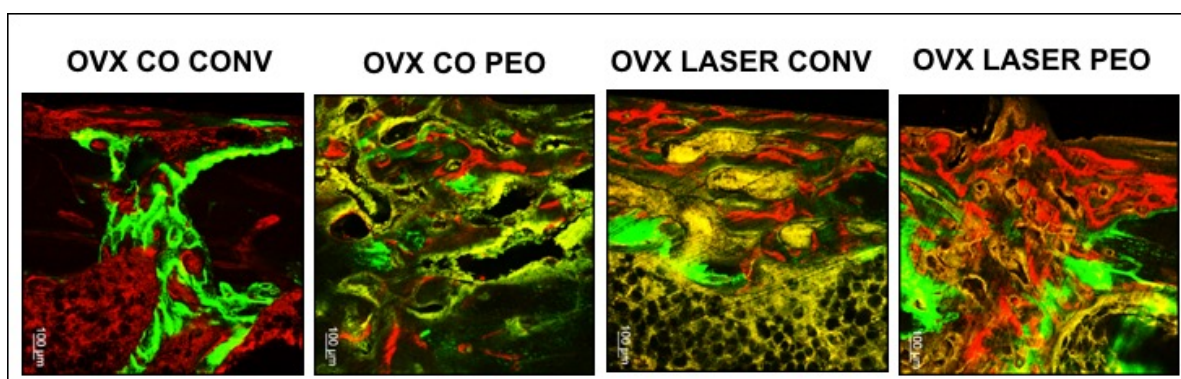


Figura 18 – Fotomicrografia (aumento de 100µm) da dinâmica do tecido ósseo por meio da precipitação de fluorocromos (calceína na cor verde e alizarina na cor vermelha) a coloração amarelada corresponde a sobreposição do vermelho sobre o verde, que foram analisados pela microscopia confocal a laser referente aos grupos: OVX LASER CONV, OVX CO CONV, OVX LASER PEO e OVX CO PEO. Dinâmica do tecido ósseo por meio da precipitação de fluorocromos (calceína e alizarina) analisados pela microscopia confocal a laser referente aos grupos: OVX LASER CONV, OVX CO CONV, OVX LASER PEO e OVX CO PEO

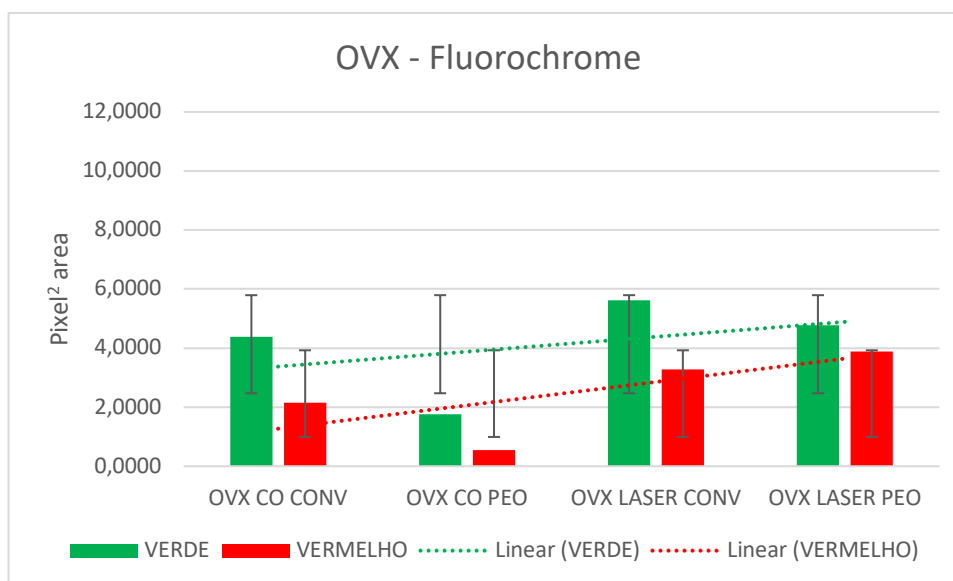


Figura 19 - O gráfico de barras mostra os valores médios e desvio padrão representativos dos grupos analisados em função das precipitações dos fluorocromos. O laser no grupo OVX também mostrou maior dinamismo do tecido ósseo, com maiores precipitações do vermelho de alizarina em comparação aos grupos sem a aplicação de laser ($p < 0,05$).

5.5. Histometria (Stevenel Blue & Alizarin Red)

Foram obtidas fotomicrografias através da objetiva (25x) das lâminas histológicas coradas com azul de Stevenel e vermelho de alizarina, após 60 dias de reparo ósseo, de todos os grupos experimentais. Dessa forma, através de uma análise qualitativa das fotomicrografias obtidas, foi possível evidenciar que a superfície de tratamento através do PEO proporcionou um aspecto reparacional interessante nos animais saudáveis (SHAM PEO), com grande presença de tecido ósseo em (vermelho de alizarina) na maior porção do *gap* da fratura femoral e poucos pontos com presença de tecido mole (azul de Stevenel), quando comparado com as placas de superfície convencional (SHAM CONV), que evidenciaram bom aspecto de neoformação óssea, no entanto com mais áreas de tecido adiposo presente. Já com relação aos animais caracterizados pela baixa qualidade óssea (OVX), foi possível observar que a placa de superfície convencional (OVX CONV) proporcionou reparo ósseo deficiente, com forte presença de tecido adiposo e pequenas áreas de neoformação óssea. Já a texturização por PEO (OVX PEO) demonstrou melhorar de maneira acentuada a neoformação óssea no *gap* reparacional, com relação ao grupo OVX CONV, demonstrando característica muito similar ao grupo SHAM CONV. (Figuras 20 e 21)

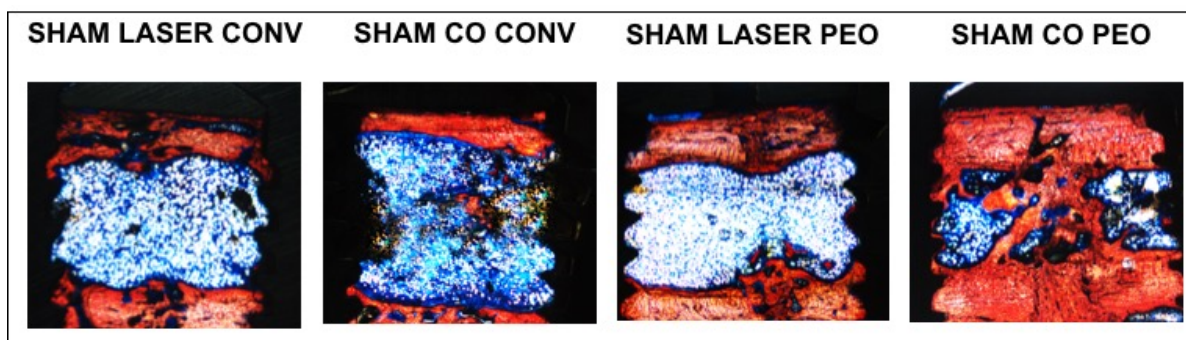


Figura 20 – Fotomicrografias das lâminas histológicas coradas com azul de Stevenel e vermelho de alizarina em um aumento de 25x, destacando-se maior presença de reparo ósseo no grupo SHAM PEO.

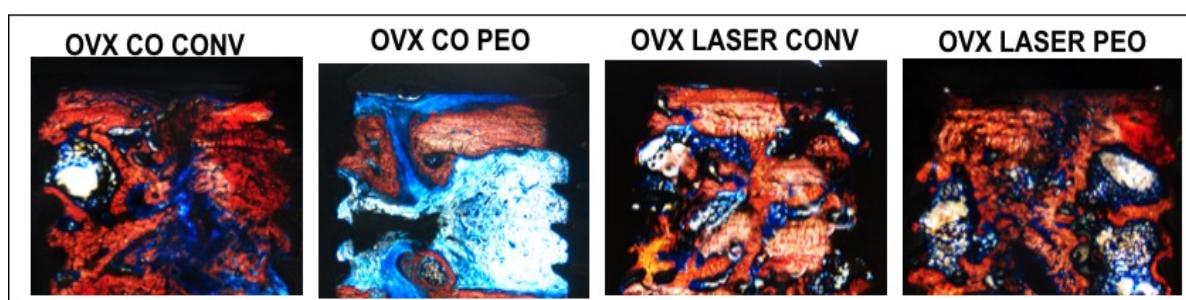


Figura 21 – Fotomicrografias das lâminas histológicas coradas com azul de Stevenel e vermelho de alizarina em um aumento de 25x, destacando-se maior presença de reparo ósseo no grupo OVX/LASER/PEO.

Com relação aos dados quantitativos obtidos por meio do cálculo histométrico, observou-se que, de fato, a texturização por PEO foi benéfica durante o reparo ósseo de fraturas femorais, principalmente em se tratando dos animais saudáveis (SHAM PEO) que apresentou a maior quantidade osso neoformado com diferenças significativas ($P < 0,05$) em relação grupo OVX CONV, que apresentou o pior resultado, com menor formação óssea. Os grupos SHAM CONV e OVX CONV demonstraram semelhança na quantidade de osso neoformado, evidenciando superioridade do grupo OVX PEO quando comparado ao grupo OVX CONV. (Figura 22)

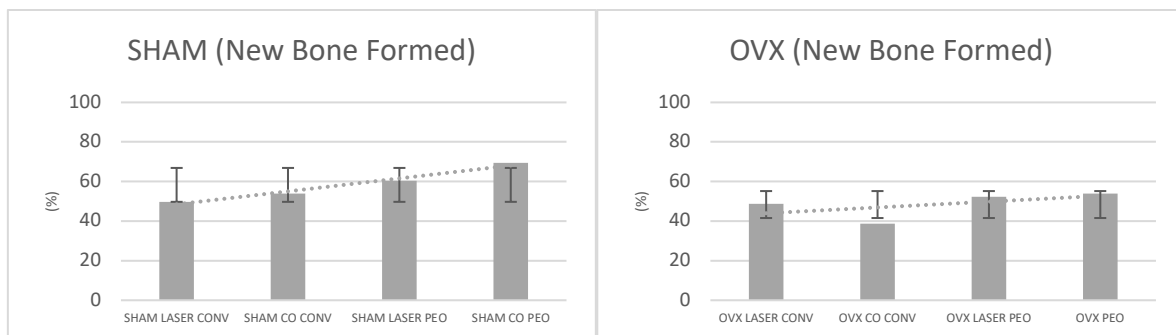
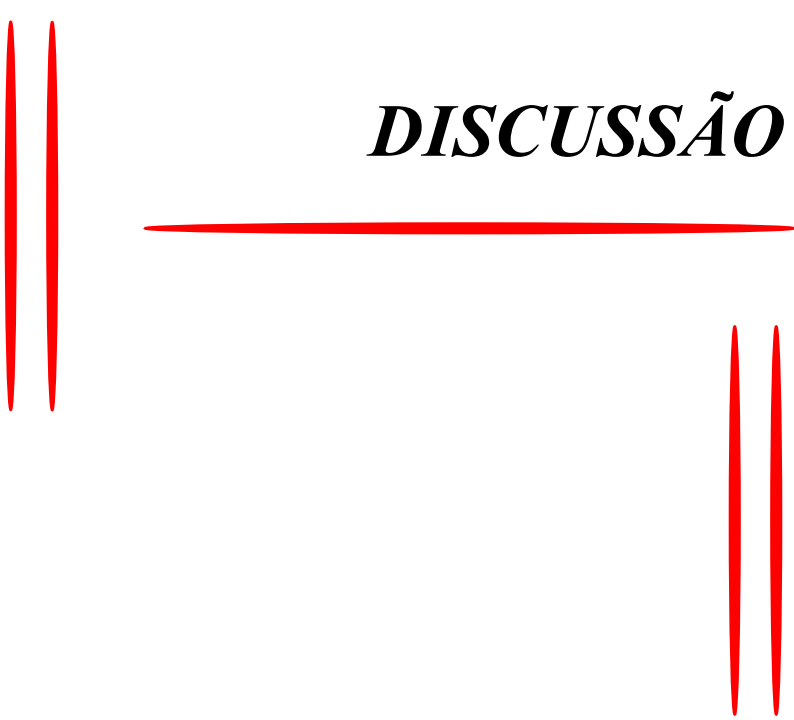


Figura 22 – . Os gráficos de barras mostram os valores médios e desvio padrão representativos dos grupos analisados em função das áreas de osso neoformado na região cortical óssea junto a placa. O grupo OVX/CO/CONV apresentou menor valor médio em porcentagem de tecido ósseo formado em comparação aos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



DISCUSSÃO

6. Discussão

O objetivo principal deste estudo pré-clínico inédito na combinação de fatores como biomodulação e bioatividade durante o reparo de fraturas femorais, em animais caracterizados pela baixa densidade mineral óssea (DMO) evidenciou que a texturização por PEO (bioatividade) proporcionou melhora importante durante o reparo ósseo das fraturas, principalmente no que diz respeito a maior área de neoformação óssea no “*gap*” reparacional. A biomodulação associada a placas convencionais também promoveu a otimização do reparo ósseo, entretanto quando associados os dois princípios (fotobiomodulação + Bioatividade) o *laser* não promoveu efeitos adicionais.

A oxidação por plasma eletrolítico apresenta-se como um método recentemente descrito na literatura utilizado para a texturização de superfícies de titânio, principalmente no âmbito da engenharia, para a construção de pontes em meios desfavoráveis, como em águas salgadas, devido ao seu menor potencial de corrosão quando comparados com outros tipos de texturização. Devido a essas características, o PEO está sendo investigado no âmbito biomédico, principalmente pela implantodontia e tem mostrado resultados bastante favoráveis, nos que diz respeito ao aumento da atividade osteoblástica, em estudos *in vitro*, no entanto, sem evidências atuais de estudos *in vivo* [50].

Este estudo demonstrou que a oxidação por Plasma Eletrolítico (PEO) é um meio alternativo eficiente para a criação de modificações superficiais e físico-químicas em placas de fixação para ossos de baixa densidade. A partir da análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV), durante o período de caracterização estrutural *baseline*, constatou-se que após a texturização por PEO, a superfície apresentava uma distribuição homogênea de poros em formato de vulcão. Com a espectroscopia de energia dispersiva (EDS) notou-se a impregnação satisfatória de íons cálcio e fosfato, validando o modelo experimental utilizado no estudo.

Hartjen e colaboradores (2018) acreditam que as propriedades do PEO melhorem a capacidade de adesão, com consequente maior viabilidade celular. Além disso, a presença de íons cálcio e fosfato parece gerar um efeito osteocondutor, aumentando a atratividade para células da linhagem osteoblástica. A propriedade osteocondutora pode ainda estar associada com a capacidade deste tipo de superfície em interagir melhor com a proteína BMP-2, um dos fatores de crescimento liberado pelos osteoblastos [65-68].

Para a caracterização do modelo experimental de baixa densidade mineral óssea, foi realizada a cirurgia de remoção dos ovários bilaterais (ovariectomia) para que, após 90 dias,

estivesse instalada a condição de osteoporose nos animais. Os resultados obtidos através da imunoensaio para dosagem de estrógeno evidenciaram diminuição significativa do estradiol plasmático nos animais ovariectomizados, comparado aos animais SHAM. Apesar de não ter sido avaliado quantitativamente a densidade mineral óssea dos animais, está bem estabelecido na literatura que o hipuestrogenismo severo leva a perda da densidade mineral óssea e, conseqüentemente, à condição de osteoporose [69].

Além disso, este modelo foi adotado, uma vez que é sabido que, além da perda de densidade mineral óssea e, conseqüente, aumento da fragilidade óssea, a osteoporose também interfere de maneira significativa no remodelamento ósseo, levando a possíveis atrasos durante o reparo tecidual [70]. Estudos pré-clínicos demonstraram que animais ovariectomizados submetidos à simulação de fratura femoral e fixação interna com placas de titânio convencionais apresentaram aspecto de atraso no reparo tecidual, quando comparados aos animais saudáveis[16]. Além disso, estudo realizado por Campenfeldt e colaboradores (2018), evidenciou que pacientes com baixa densidade mineral óssea apresentaram mais falhas na fixação de fraturas femorais comparado a pacientes com densidade mineral óssea adequada[71].

A otimização desse reparo foi verificada em todos os grupos tratados com fotobiomodulação: SHAM LASER CONV, SHAM LASER PEO, OVX LASER CONV e OVX LASER PEO por meio da aplicação da laser terapia no momento da fixação óssea cirúrgica, corroborando com resultados de Briteño-Vasequez et al. (2015) que mostraram também superioridade nos parâmetros radiológicos e histológicos para os grupos que receberam fotobiomodulação por laser [22].

No entanto, Kazem Shakouri, et al (2010) mostram que a *laser* terapia de baixa intensidade em animais pode facilitar a reparação de fraturas nos estágios iniciais, no entanto, com propriedades biomecânicas fracas. Por isso, recomendaram o uso deste tipo de terapia com laser para humanos apenas em casos de má formação óssea, como em fraturas não unidas e devido às fracas propriedades biomecânicas, e sugerem que mais pesquisas deveriam ser realizadas[72]. Neste contexto, a *laser* terapia nas fraturas associado ao princípio de bioatividade, como no presente estudo por meio do PEO, poderia estar bem recomendado, ainda mais quando outras comorbidades sistêmicas estão presentes ou fatores locais que comprometam o metabolismo ósseo reparacional. Análises adicionais da biomecânica do complexo placa/osso reparacional deverão ser realizadas para a verificação de suas propriedades em função dessas terapias.

Neste estudo foi possível observar, por meio da análise histológica e histométrica, que a texturização por PEO nas placas de titânio proporcionou efeito positivo no padrão reparacional dos animais com baixa densidade mineral óssea, uma vez que foi possível observar maior presença de tecido ósseo e poucas regiões com tecido adiposo no *gap* reparacional, comparado aos animais OVX que receberam placas de titânio convencionais, os quais apresentaram neoformação óssea atrasada com bastante presença de tecido adiposo. Além disso, foi possível observar, também, que o grupo OVX PEO apresentou maior área de neoformação óssea comparado ao grupo OVX CONV mostrando seu melhor desempenho em condições críticas, embora o padrão de neoformação óssea tenha apresentado melhor organização e fechamento do *gap* para os grupos tratados com laser (OVX LASER PEO). O padrão reparacional dos animais osteoporóticos que receberam placas texturizadas por PEO (OVX PEO) é bem similar ao dos animais saudáveis, que receberam placas convencionais (SHAM CONV), ou seja, o uso da texturização por PEO levou a reparação óssea de fraturas femorais em situação de densidade mineral óssea reduzida a padrões próximos do que se encontra nos animais com densidade óssea normal e com a placa sem texturização (CONV) como é comercializado atualmente.

É importante salientar que o modelo de osteoporose simulada no presente estudo por meio da realização de ovariectomia bilateral representou um modelo crítico no reparo ósseo interfragmentário. Sistemicamente, este fenômeno ocorreu pela redução significativa dos níveis de estradiol em comparação aos animais SHAM. As compensações do reparo ósseo aconteceram somente em função dos princípios de bioatividade e biomodulação, sem qualquer influência de medicamentos ou reposição hormonal.

Já com relação aos parâmetros microtomográficos avaliados, foi possível observar que os animais saudáveis (SHAM) apresentaram padrões de microarquitetura óssea positivos, independentemente da texturização de superfície utilizada. Já com relação aos grupos osteoporóticos, foi possível observar que a texturização de superfície por PEO não foi diferente de modo significativo melhorando o padrão reparacional quando comparado às placas de titânio convencionais. É importante ressaltar que os animais induzidos à condição de osteoporose não foram tratados sistemicamente, com algum tipo de medicamento e, portanto, não é possível reverter totalmente a situação de deterioração da microarquitetura óssea e esse não é o objetivo da texturização de superfície e/ou *laser* terapia.

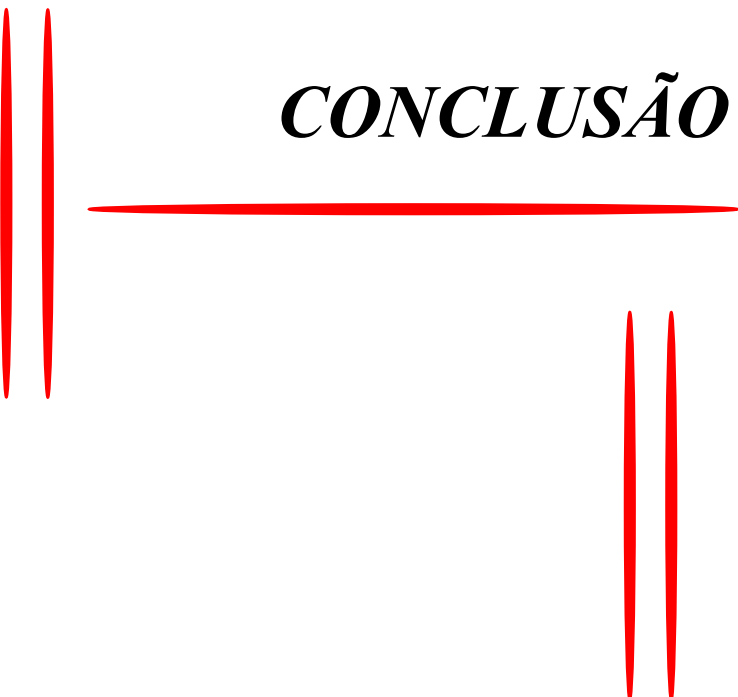
Sendo assim, apesar da texturização por PEO não ter melhorado os parâmetros estruturais em ossos de baixa densidade, por não ter efeito sistêmico, como demonstrado pela microtomografia computadorizada, a propriedade osteoindutor do PEO [65-67] parece ter

proporcionado o recrutamento e a sinalização de células pré-osteoblásticas e osteoblásticas, fundamentais no reparo ósseo, o qual a placa convencional não é capaz de realizar. Esse comportamento fez com que o reparo da fratura femoral fosse acelerado quando comparado à placa convencional. Clinicamente isso apresenta ser uma grande vantagem, uma vez que boa parte das falhas de fixação em pacientes com baixa DMO, deve-se a incapacidade do tecido recuperar-se rapidamente [67].

Do que se tem de comprovação clínica em relação a fotobiomodulação aplicado em fraturas ósseas, Neto et. al, 2019 em uma revisão sistemática comprovou em estudos em humanos que esse princípio apresentou poucos efeitos adicionais para o parâmetro reparo ósseo, em que as respostas mais significativas foram observadas para os parâmetros dor e retorno das funções habituais [73], contudo essa revisão recente conta apenas com dois artigos selecionados, implicando na necessidade de mais estudos para se permitir maiores comparações dentre os resultados apresentados na literatura.

De certa forma, como já discutido anteriormente, a fotobiomodulação apresenta efeitos adicionais quando existe uma alteração do metabolismo ósseo. Fato bem observado na otimização e melhora do reparo no grupo OVX/LASER/CONV em comparação aos grupos SHAM.

Apesar das limitações deste estudo pré-clínico, os resultados obtidos são bastante encorajadores para a utilização da texturização por PEO nas placas para a osteossíntese de fraturas ósseas e a *laser* terapia, na região maxilofacial ou nas aplicações ortopédicas, em pacientes que apresentam qualquer tipo de alteração sistêmica que leve a redução da DMO não excluindo a indicação de tratamento por terapias de suporte sistêmico de acordo com o caráter específico de cada alteração. Visto que as condições adversas para reconstruções ósseas tem se tornado cada vez mais recorrentes na rotina cirúrgica e novos métodos e materiais devem ser desenvolvidos e aprimorados com o objetivo de criar condições para melhorar o reparo biológico. Nesse contexto, o PEO assim como a *fotobiomodulação* estão sendo estudados e vem a somar condições favoráveis e a princípio, sem contraindicação para seu uso. No entanto, mais estudos devem ser realizados com intuito de avaliar os parâmetros de viabilidade celular e resistência mecânica para corroborar e melhor explicar as variáveis do estudo.



CONCLUSÃO

7. Conclusão

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

8. Referências

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

applications, Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials 102(5) (2014) 988-1001.

[52] H.M. Evans, J.A. Long, Characteristic Effects upon Growth, Oestrus and Ovulation Induced by the Intraperitoneal Administration of Fresh Anterior Hypophyseal Substance, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 8(3) (1922) 38-9.

[53] E.R. Luvizuto, S.M. Dias, T.P. Queiroz, T. Okamoto, I.R. Garcia, Jr., R. Okamoto, R.C. Dornelles, Osteocalcin immunolabeling during the alveolar healing process in ovariectomized rats treated with estrogen or raloxifene, Bone 46(4) (2010) 1021-9.

[54] E.R. Luvizuto, T.P. Queiroz, S.M. Dias, T. Okamoto, R.C. Dornelles, I.R. Garcia, Jr., R. Okamoto, Histomorphometric analysis and immunolocalization of RANKL and OPG during the alveolar healing process in female ovariectomized rats treated with oestrogen or raloxifene, Arch Oral Biol 55(1) (2010) 52-9.

[55] G. Ramalho-Ferreira, L.P. Faverani, G.A. Grossi-Oliveira, T. Okamoto, R. Okamoto, Alveolar bone dynamics in osteoporotic rats treated with raloxifene or alendronate: confocal microscopy analysis, Journal of biomedical optics 20(3) (2015) 038003.

[56] J. Chen, W. Liu, J. Zhao, C. Sun, J. Chen, K. Hu, L. Zhang, Y. Ding, Gelatin microspheres containing calcitonin gene-related peptide or substance P repair bone defects in osteoporotic rabbits, Biotechnology letters, 2016.

[57] X. Chen, H. Giambini, E. Ben-Abraham, K.N. An, A. Nassr, C. Zhao, Effect of Bone Mineral Density on Rotator Cuff Tear: An Osteoporotic Rabbit Model, PLoS One 10(10) (2015) e0139384.

[58] E.R. Luvizuto, T.P. Queiroz, S.M.D. Dias, T. Okamoto, R.C.M. Dornelles, I.R. Garcia, R. Okamoto, Histomorphometric analysis and immunolocalization of RANKL and OPG during the alveolar healing process in female ovariectomized rats treated with oestrogen or raloxifene, archives of oral biology 55(1) (2010) 52-59.

[59] E.R. Luvizuto, S.S. Dias, T. Okamoto, R.C. Dornelles, R. Okamoto, Raloxifene therapy inhibits osteoclastogenesis during the alveolar healing process in rats, Arch Oral Biol 56(10) (2011) 984-90.

[60] G. Ramalho-Ferreira, L.P. Faverani, G.A. Momesso, E.R. Luvizuto, I. de Oliveira Puttini, R. Okamoto, Effect of antiresorptive drugs in the alveolar bone healing. A histometric and immunohistochemical study in ovariectomized rats, Clin Oral Investig (2016).

[61] Y. Liu, L. Cao, S. Ray, U. Thormann, J. Hillengass, S. Delorme, R. Schnettler, V. Alt, T. Bauerle, Osteoporosis influences osteogenic but not angiogenic response during bone defect healing in a rat model, Injury, 2013.

[62] V. Alt, U. Thormann, S. Ray, D. Zahner, L. Dürselen, K. Lips, T. El Khassawna, C. Heiss, A. Riedrich, G. Schlewitz, A. Ignatius, M. Kampschulte, H. von Dewitz, S.

Heinemann, R. Schnettler, A. Langheinrich, A new metaphyseal bone defect model in osteoporotic rats to study biomaterials for the enhancement of bone healing in osteoporotic fractures, Acta Biomater 9(6) (2013) 7035-42.

[63] M.L. Bouxsein, S.K. Boyd, B.A. Christiansen, R.E. Guldberg, K.J. Jepsen, R. Müller, Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography, J Bone Miner Res 25(7) (2010) 1468-86.

[64] V. Papalexiou, A.B. Novaes, M.F. Grisi, S.S. Souza, M. Taba, J.K. Kajiwarra, Influence of implant microstructure on the dynamics of bone healing around immediate implants placed into periodontally infected sites. A confocal laser scanning microscopic study, Clin Oral Implants Res 15(1) (2004) 44-53.

[65] P. Hartjen, A. Hoffmann, A. Henningsen, M. Barbeck, A. Kopp, L. Kluwe, C. Precht, O. Quatela, R. Gaudin, M. Heiland, R.E. Friedrich, C. Knipfer, D. Grubeanu, R. Smeets, O. Jung, Plasma Electrolytic Oxidation of Titanium Implant Surfaces: Microgroove-Structures Improve Cellular Adhesion and Viability, In Vivo 32(2) (2018) 241-247.

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

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



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



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

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

CERTIFICADO

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

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 01 de Abril de 2017.

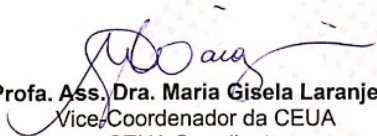
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Março de 2019.

CERTIFICATE

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

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: April 01, 2017.

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


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

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

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

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