

JOÃO MATHEUS FONSECA E SANTOS

**Análise do efeito da fotobiomodulação e do método de
texturização de superfície por oxidação com plasma
eletrolítico em miniplacas de fixação no reparo ósseo de
ratas osteoporóticas**

JOÃO MATHEUS FONSECA E SANTOS

**Análise do efeito da fotobiomodulação e do método de
texturização de superfície por oxidação com plasma
eletrolítico em miniplacas de fixação no reparo ósseo de
ratas osteoporóticas**

Trabalho de conclusão de curso apresentado a Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho – UNESP”, como parte dos requisitos para a graduação no curso de Odontologia.

Orientador: Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani

*A Maria Miguelina Fonseca, minha mãe,
e Jaime Bispo dos Santos, meu pai, as
pessoas que mais me apoiaram e estiveram
ao meu lado durante todo o período de
graduação e por toda a minha vida e a
quem devo toda minha gratidão, esta
conquista é tão de vocês, quanto minha.*

AGRADECIMENTOS

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

Ao **meu orientador Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani**, pessoa ímpar a qual tive oportunidade de conhecer e conviver ao longo desses anos de graduação, que me deu muitas oportunidades de iniciar na ciência e de crescimento profissional, e que tenho uma grande admiração pela sua competência como pesquisador, profissional e em tudo a que se propõe fazer, e também pelo ser humano que é, sempre cheio de generosidade e carinho com todos a sua volta. Agradeço imensamente por todas as oportunidades, saiba que o senhor é uma fonte de inspiração para mim, e de todos os seus orientados. Que Deus continue guiando sua brilhante trajetória professor!

À **Profa. Ass. Dra. Daniela Ponzoni**, professora da qual sempre tive muito carinho e admiração desde o momento que cursei a disciplina de Cirurgia, e também em todo período em que estive como monitor da disciplina, pois sempre demonstrou muita preocupação com o nosso aprendizado tanto teórico, quanto em clínico, sendo assim muito importante em nossa formação. Além disso, tenho a honra de contar com sua presença em minha banca avaliadora, obrigado por tudo professora!

À **Profa. Ass. Dra. Ana Paula Farnezi Bassi**, toda minha gratidão por todo o auxílio que me deu durante o tempo em que passei pela disciplina de Cirurgia, e também ao longo da monitoria, não medindo esforços para que pudesse me ajudar durante todos procedimentos cirúrgicos e sempre me dando oportunidade de aprender ainda mais, sou muito grato por tê-la como professora, e com certeza foi de grande importância para minha formação. Toda minha gratidão e carinho à você professora.

Ao **“Gu”, Dr. Gustavo Antônio Correa Momesso**, grande pessoa que tenho a honra de chamar de amigo, extremamente competente em tudo que propõe a realizar, tem grande importância na minha formação sempre compartilhando seu conhecimento acerca da Odontologia e também de ciência, e neste trabalho, e também tenho a honra de contar com a sua participação na minha banca. Desejo à você todo o sucesso do mundo, e sou muito grato pela nossa amizade.

Ao “**Tarikito**”, **Dr. Tárik Ocon Braga Polo**, uma das pessoas mais inteligentes que tive o prazer de conhecer durante essa jornada e ter sua amizade, e por quem tenho uma admiração enorme, pelo profissional que é, também uma enorme gratidão, pois este trabalho não seria possível sem a sua ajuda. Desejo a você todo o sucesso do mundo, em todas as áreas da sua vida!

À **todo o grupo de pesquisa**, orientado pelo professor Leonardo, que me permitiu conhecer pessoas muito talentosas e competentes, que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho, e de muitos outros que realizamos em todo esse período. À todos os pós-graduandos, William, Tiburtino, Anderson, Bárbara, Leonardo Delanora, deixo meu agradecimento por cada oportunidade que me deram de aprender um pouco com vocês e por compartilharem suas experiências. A todos os alunos de Iniciação Científica, dos quais compartilhei o trabalho durante esse período, Mônica, Cauê, Caio, Elô, Natália, Victor, Amanda, Marco Aurélio, Monique, Guilherme e Leonardo, obrigado por toda ajuda e companheirismo, desejo muito sucesso a vocês!

Aos grandes amigos **Carolina Naomi e Leonardo Perazza**, os quais fizeram parte e tem grande importância pra mim durante essa jornada, desde o nosso primeiro ano de faculdade. Agradeço a todo o companheirismo, amizade, caronas e risadas, que com certeza fizeram que o nosso caminho pela faculdade ficasse mais leve! Obrigado por tudo!

Aos meus irmãos de outras mães **Leonardo Quesadas e Michael Júnio** que sempre me apoiaram desde o início, quando ingressar nesta faculdade era apenas um sonho a ser realizado. Tenho um grande carinho, admiração e gratidão por vocês, por todo conselho, ombro amigo e momentos descontração que me proporcionaram até o hoje. Estendo esses agradecimentos a todas amigades que tive a oportunidade de ganhar durante esse período, todos tiveram uma participação especial na minha vida acadêmica. Obrigado a todos por toda a parceria!

À **Stéfany Barbosa** pessoa especial com quem tive a oportunidade de compartilhar muitas experiências positivas durante a graduação e iniciação científica, tenho muita admiração e respeito por você, obrigado por todo apoio, motivação e parceria ao longo desses anos, desejo a você muitas realizações e sucesso em sua trajetória!

À **todas as minhas duplas** que tive ao longo da graduação, com quem pude compartilhar as dificuldades e aos pouco construindo o conhecimento clínico

fundamental para minha formação. Stéfany Barbosa, Julia Pantaroto de Azevedo, João Paulo Soares Franciscon e Jéssica Silva Santana, minha eterna gratidão por toda parceria, paciência e amizade, desejo a vocês muitas conquistas, e muito sucesso profissional.

Ao **Cursinho D.A.C.A** projeto pelo qual tenho um imenso carinho e respeito, que foi fundamental para o meu ingresso na universidade, uma vez que participei previamente como aluno, e pude ver o grande comprometimento de todos que dele participam, e atualmente tem a honra de fazer parte deste projeto como monitor discente, podendo colaborar um pouco com esta ação, o que tem me permitindo uma gratificante experiência, além disso sou grato pela família que fiz nesse projeto, e com certeza é uma das experiências mais marcantes da minha graduação.

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

À **CNPq/PIBIC** pela concessão de minha primeira bolsa de iniciação científica no meu segundo ano (Processo: 160144/2017-5), impulsionando o meu interesse na ciência, já no início da graduação.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, pela concessão da minha bolsa de iniciação científica (Processo: 2018/11496-0) e também a concessão do auxílio (Processo: 2016/20297-6), financiamento fundamental para a minha manutenção enquanto graduando e também para o desenvolvimento deste trabalho, e em todos os trabalhos realizados pelo nosso grupo de pesquisa, e também pela concessão da minha bolsa vigente até o final da graduação (Processo: 2019/17072-0) .

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA** instituição da qual tenho muito orgulho de fazer parte, e carregarei em meu peito durante toda a minha vida profissional, que permitiu que eu trilhasse um caminho de muito aprendizado técnico-científico com uma excelente estrutura que fornece à todos os alunos, com laboratórios pré-clínicos e as clínicas multidisciplinares muito completas, que permitem a formação de grande profissionais, além de contar com um corpo docente de muita experiência, sempre dispostos a auxiliar o aprendizado e formação profissional de todos os alunos. Deixo a todos os mestres desta faculdade a instituição em si, meus votos de eterna gratidão e carinho!

“Seu trabalho vai preencher uma parte grande da sua vida e a única maneira de ficar realmente satisfeito é fazer o que você acredita ser um ótimo trabalho. E a única maneira de fazer um excelente trabalho é amar o que você faz.”

Steve Jobs

SANTOS, J. M. F. **Análise do efeito da fotobiomodulação e do método de texturização de superfície por oxidação com plasma eletrolítico em miniplacas de fixação no reparo ósseo de ratas osteoporóticas.** 2020. 54 f. Trabalho de conclusão de curso – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da fotobiomodulação e bioatividade no reparo ósseo de ratas ovariectomizadas submetidas à simulação de fraturas femorais. 32 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 preservado para a indução de osteoporose. As ratas foram submetidas à simulação de fratura em um dos 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 usinada (CONV). Mais dois subgrupos foram formados, sendo que metade das amostras para cada texturização de placa foi submetida à biomodulação por meio de laser de baixa intensidade (BLLLT) durante em 5 pontos/ 1 minuto cada, e a outra parte não houve aplicação de qualquer modulação (SB). A eutanásia de todos os animais foi realizada aos 60 dias de pós-operatório. Os grupos experimentais foram divididos em (SHAM/BLLLT, SHAM/SB, OVX/BLLLT, OVX/SB). Foi possível observar, por meio da análise histológica e histométrica, que a texturização por PEO nas miniplacas de titânio proporcionou efeito positivo no padrão reparacional dos animais com baixa densidade mineral óssea, onde os sub grupo OVX/SB apresentou menor valor médio em porcentagem de tecido ósseo formado em comparação aos demais grupos ($p < 0,05$). A otimização do reparo foi verificada em todos os grupos tratados com fotobiomodulação, onde apresentam maior dinamismo ósseo em comparação aos outros grupos com diferença estatística não tratados ($p < 0,05$). Dessa forma, mostra-se um potencial favorável na aplicação da texturização de superfície por PEO, e a fotobiomodulação, buscando melhores respostas reparacionais.

Palavras-chave: Fratura femoral. Fixação de fratura. Terapia a laser de baixa intensidade.

SANTOS, J. M. F. **Analysis of the effect of biomodulation and the surface treatment method by electrolytic plasma oxidation in miniplates of fixation in bone repair of osteoporotic rats.** 2020. 54 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of photobiomodulation and bioactivity on bone repair in ovariectomized rats submitted to simulation of femoral fractures. 32 female Wistar rats (*Rattus norvegicus*), 6 months old, in which half of the animals were subjected to bilateral ovariectomy (OVX) and the other half under fictitious ovariectomy surgery (SHAM), and a period of 3 months was maintained for the induction of osteoporosis. The rats were submitted to a fracture simulation in one of the femurs and the fracture was fixed with a mini-plate and 1.5 mm system screws. Half of the samples had miniplates with surface texturing treated by oxidation with electrolytic plasma (PEO), which was in contact with the reparational gap, and the other half with conventional miniplates, with machined surface (CONV). Two other subgroups were formed, and half of the samples for each plate texturing was subjected to biomodulation by low intensity laser (BLLLT) during at 5 points / 1 minute each, and the other part no application of any modulation (SB). Euthanasia of all animals was performed 60 days after the operation. The experimental groups were divided into (SHAM / BLLLT, SHAM / SB, OVX / BLLLT, OVX / SB). through histological and histometric analysis, that texturing by PEO in titanium miniplates provided a positive effect on the repair pattern of animals with low bone mineral density, where the OVX/SB showed a lower mean value in percentage bone tissue formed compared to the other groups ($p < 0.05$). The optimization of the repair was observed in all groups treated with photobiomodulation, where they present greater bone dynamism compared to the other groups with statistical difference not treated ($p < 0.05$). Thus, there is a favorable potential in the application of surface texturing by PEO, and photobiomodulation, seeking better reparational responses.

Keywords: Femoral fractures. Fracture fixation. Low-level laser therapy.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Esquema da placa do Sistema 1,5 mm com 4 furos, sem intermediários instalada fixando a fratura em fêmur de ratas 18
- 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 21
- FIGURA 3 – Etapas cirúrgicas do procedimento cirúrgico de simulação de fraturas. (A – C) Incisão na região femoral das ratas. (D – G) Divulsão de planos anatômicos e exposição de diáfise femoral. (H) Fixação de miniplacas texturizadas por PEO. (I) Fixação de miniplas convencionais. (J - K) Simulação de fraturas femorais. (L) Simulação de fratura femoral e fixação realizadas 23
- FIGURA 4 – Fluxograma representativo do desenho experimental,videnciando os grupos experimentais e as amostras obtidas 24
- FIGURA 5 – Linha do tempo, apresentando as etapas realizadas até a eutanásia 25
- FIGURA 6 - Sequência 2D em orientação axial, sagital e coronal e determinação da área de interesse “ROI” de um espécime representativo dos grupos 27
- FIGURA 7 - Imagem representativa sobre área de interesse (ROI) a ser analisada denotando os três terços da região, no qual, o 1° terço representa a região de “gap” reparacional em contato com a miniplaca; o 2° terço representa a região intermediária e o último terço, a região mais próxima do osso cortical basal do fêmur 30
- FIGURA 8 – 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 32
- FIGURA 9 - 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 33
- FIGURA 10 – 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: 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. 37
- FIGURA 11 – 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 38

FIGURA 12 - 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. 39

FIGURA 13 – 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 40

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Representação gráfica da concentração de estrogênio plasmático, constatando hiposteroidismo no grupo OVX em comparação a SHAM ($P = 0,0003$). O * e # representam a diferença estatística que houve entre os grupos 33

GRÁFICO 2 – 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 ($p > 0,05$) 35

GRÁFICO 3 – 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 ($p < 0,05$). 35

GRÁFICO 4 – 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 ($p < 0,05$). 35

GRÁFICO 5 – 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 ($p < 0,05$). 36

GRÁFICO 6 – 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 ($p > 0,05$). 36

GRÁFICO 7 - 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 ($p < 0,05$). 37

GRÁFICO 8 – 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 ($p < 0,05$). 38

GRÁFICO 9 - 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 ($p < 0,05$). 40

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1 Texturização de superfície através da oxidação por plasma eletrolítico	18
3.2 Caracterização estrutural <i>baseline</i>	19
3.3 Animais: Desenho experimental.....	20
3.3.1 Ovariectomia Bilateral	20
3.3.2 Simulação de fraturas femurais.....	22
3.3.3 Biomodulação através da laserterapia de baixa intensidade (LLLT)	25
3.4 Métodos de análises	25
3.4.1 Imunoensaio para dosagem de estrógeno	26
3.4.2 Microtomografia Computadorizada (Micro-Ct).....	26
3.4.3 Fases laboratoriais para tecidos calcificados	27
3.4.4 Escaneamento por microscopia confocal a laser (análise da dinâmica óssea em reparação)	28
3.4.5 Histometria	30
3.5 Análise estatística	31
4 RESULTADOS	32
4.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS)	32
4.2 Imunoensaio para dosagem de estrógeno	33
4.3 Microtomografia Computadorizada (Micro-Ct).....	34
4.4 Escaneamento por microscopia confocal a laser (análise da dinâmica óssea em reparação)	36
4.5 Histometria (Stevenel Blue & Alizarin Red)	38
5 DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS.....	47
ANEXOS	52

1 INTRODUÇÃO

O metabolismo ósseo associado à demanda fisiológica na reparação de fraturas ósseas pode estar comprometido quando alguns fatores influenciam negativamente. Dentre estes fatores, o grau do impacto, direção, velocidade e magnitude da força incidida sobre o osso envolvido^{1,2}, são fundamentais para a agressividade do trauma. Estes incidem na dissipação de forças que podem causar destruição do tecido ósseo, causando fraturas complexas, até com a possibilidade de perdas de substância, criando defeitos que demandará de uma resposta fisiológica bastante complexa¹.

Atrelado a esta problemática estrutural do tecido ósseo, algumas situações colaboram para o atraso do reparo tecidual, tais como 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 osteoporose³⁻⁸. 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 as infecções e insucesso no tratamento^{9,10}.

No presente estudo foi simulada uma condição de redução da massa óssea, a osteoporose experimental em ratas adulto-jovens¹¹⁻¹³. Esta condição sistêmica tem sido reportada como uma das complicações mais debilitantes, em especial nas mulheres com menopausa, levando às fraturas espontâneas¹⁴. 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 "turnover ósseo" ou também denominada de dinâmica óssea¹⁵. No

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 femurais¹⁶.

Para a otimização do reparo ósseo nas situações críticas, um conceito bastante estudado é o de biomodulação. 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 o LLLT pode acelerar o reparo de defeitos ósseos¹⁹. Destes resultados, notou-se aumento da atividade osteoblástica^{20,21}.

Briteño-Vasequez *et al.*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 receberam a aplicação do 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 ósseo²⁵⁻²⁷.

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 osso²⁸⁻³⁰.

As principais técnicas para a incorporação destes elementos na superfície dos implantes de Ti são a anodização e o tratamento biomimético^{31,32}. Recentemente, um novo método para a texturização superficial dos implantes foi desenvolvido, ainda na fase de testes *in vitro*, descrito como oxidação por plasma eletrolítico (PEO), ou também denominado como deposição por faísca anódica^{33,34}. Este processo eletroquímico consiste na oxidação acompanhada por microdescargas na superfície do Ti ou suas ligas imersos em um eletrólito³⁴⁻³⁶.

Marques *et al.*^{37,38} publicaram dois estudos que avaliaram a PEO para a produção de texturização na superfície do TiCP 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 foi observado *in vivo* e *in vitro*, que com este método de texturização, houve a formação de microestrutura porosas na superfície do titânio que são distribuídas homogeneamente, o que pode ser benéfico para a formação de tecido ósseo, além há efetiva incorporação de substâncias presentes na solução eletrolítica durante a anodização, como cálcio, fósforo, zinco, manganês e silício^{39,40}.

As superfícies tratadas com PEO obtiveram uma melhor adesão celular devido à presença de células com morfologia fusiforme, enquanto as células da superfície não tratada apresentaram padrão mais arredondado, demonstrando adesão insuficiente, assim pode-se acelerar a formação e a remodelação óssea, encurtar o período de osseointegração e inclusive o tratamento com PEO reduziu a citotoxicidade e aumentou a viabilidade de células cultivadas diretamente nas superfícies^{41,42}. Diante destes resultados, os autores encorajam novos estudos para a avaliação deste processo de texturização para possibilitar o seu emprego no mercado dos implantes dentários.

Portanto, diante do nosso conhecimento, não existe até o momento a aplicação dos conceitos de biomodulação 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.

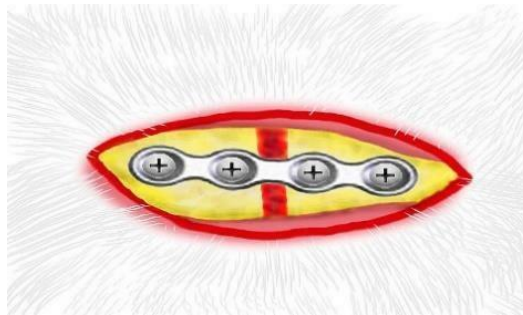
2 OBJETIVOS

O trabalho teve como objetivo avaliar a associação dos princípios de fotobiomodulação e bioatividade no reparo de fraturas ósseas, tanto em ratas saudáveis como em osteoporóticas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste trabalho, miniplacas do sistema 1.5mm, com 4 furos, sem intermediários na sua extensão, foram utilizadas para a fixação das fraturas em fêmur de ratas (Fig. 1). As miniplacas foram fornecidas por empresas do setor (Engimplan Engenharia de Implantes, Rio Claro, SP, Brasil), comercialmente disponíveis no mercado. Inicialmente, todo o processamento topográfico realizado nas miniplacas de titânio (Ti) foi apresentado neste trabalho, evidenciando as nuances entre as miniplacas convencionais e as texturizadas por PEO, para o teste de bioatividade das mesmas.

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



Fonte: Elaborada pelo autor

3.1 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 5 minutos e a temperatura durante a oxidação mantida a 15 +/- 2 °C⁴³.

A solução eletrolítica foi preparada dissolvendo Ca(NO₃)₂·4H₂O, NH₄H₂PO₄ (3,6 x 10⁻⁴ 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^{44,45,46}.

3.2 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 µm³) 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 tratamento⁴³.

3.3 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), o qual foi provado pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba sob o protocolo número 0027-2017 (Anexo A). Para a análise da reparação de fraturas em fêmures, 32 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, necessitaram 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. 16 ratas foram aleatoriamente alocadas para serem submetidas ao procedimento de ovariectomia bilateral (OVX) e a outra metade (n=16) ao procedimento cirúrgico fictício de ovariectomia, somente com a exposição dos ovários, sem a remoção dos mesmos (SHAM).

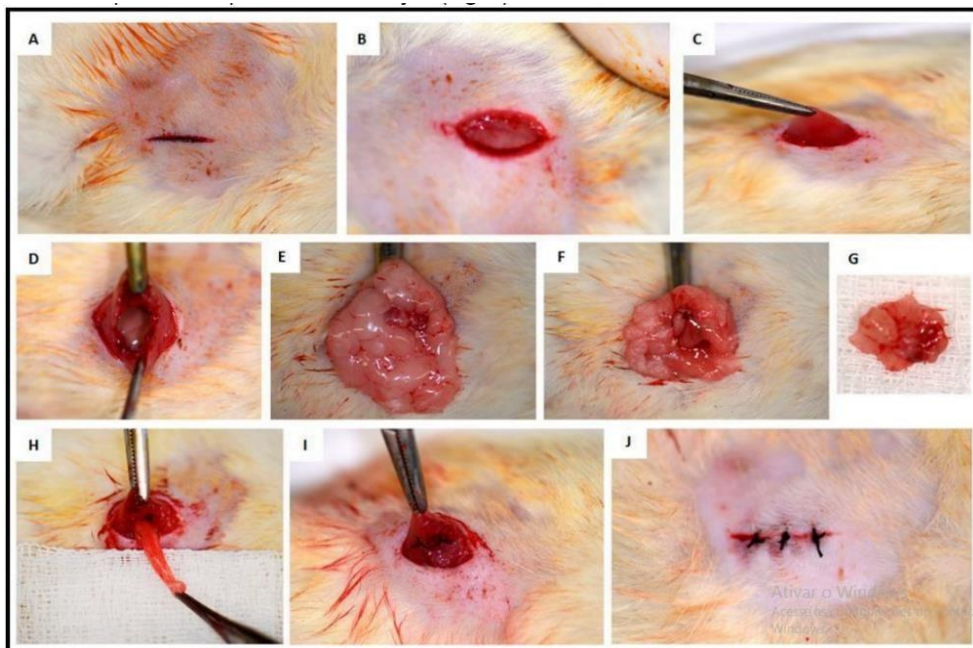
3.3.1 Ovariectomia Bilateral

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 prévios⁴⁷. 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)⁴⁸⁻⁵³. 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, para ser realizada uma incisão de 1,5 cm nos flancos, divulsão por planos do tecido subcutâneo e, em seguida, do peritônio a fim 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™ – Johnson & Johnson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos).

Feito isso, a remoção dos ovários foi realizada e a sutura por planos com fio de Poliglactina 910 4.0 (Vicryl™ – Johnson & Johnson, 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 (Fig. 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



Fonte: Elaborada pelo autor

Estes animais continuaram no biotério sendo alimentadas com ração e água ad libitum durante todo o tempo experimental e foram mantidos em gaiolas que comportaram até 4 animais. A temperatura do ambiente se manterá estável ($22 \pm 2^\circ$ 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 e fixação da mesma.

3.3.2 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 e para hemostasia do campo operatório. Após a sedação dos animais, foi realizada a tricotomia na porção lateral do fêmur direito e esquerdo, e, anti-sepsia da região a ser incisada com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), associado à PVPI tópico. 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, bilateralmente o osso do fêmur será exposto do polo lateral do côndilo do fêmur, entre o músculo lateral e o músculo bíceps do fêmur.

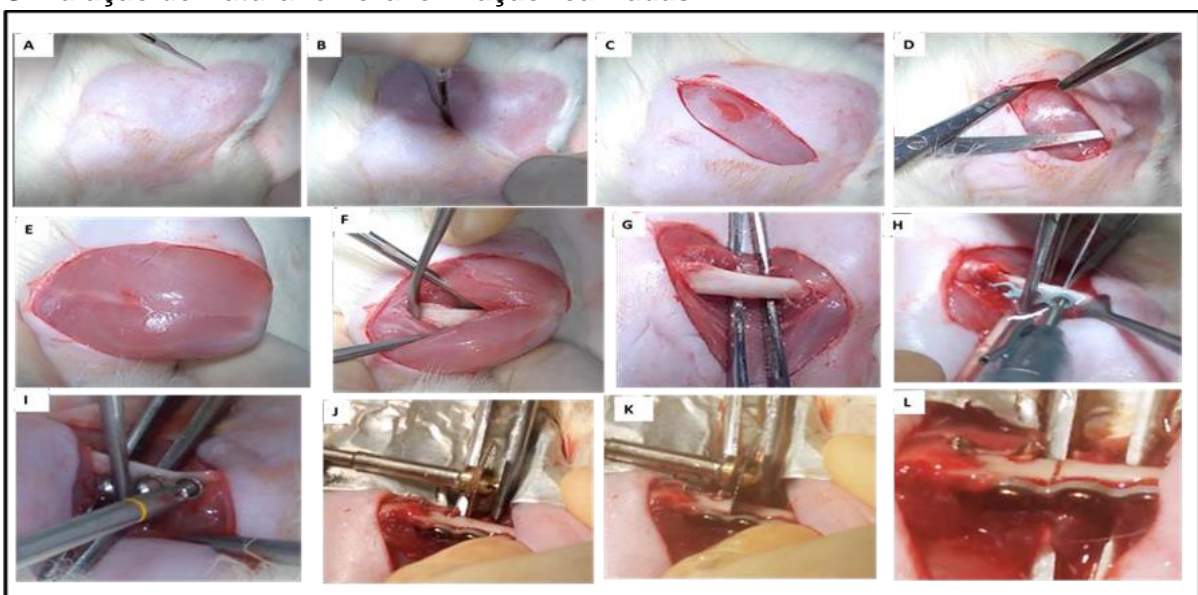
Para a simulação da fratura, um disco circular foi utilizado e assim, a osteotomia foi realizada na metáfise epifisária, distando 5 mm da cartilagem articular epifisária. A partir deste momento, uma placa do sistema 1,5 mm com 4 furos, sem intermediário, foi fixada bilateralmente, sendo uma placa convencionalmente disponível pelo mercado, em que ambas as superfícies da placa são usinadas (MS) e, outra placa com as superfícies texturizadas por oxidação por plasma eletrolítico (PEO). A eleição do lado de fixação para a placa MS ou PEO foi determinada por randomização por sorteio. Um envelope continha dois papéis, um com a palavra "MS" e o outro "PEO". Assim, no momento da fixação, um pesquisador que estava fora do

procedimento cirúrgico, realizou o sorteio, primeiramente o lado direito foi fixado e em seguida, o lado esquerdo.

Nos grupos determinados que foram submetidos a fotobiomodulação por meio de laser de baixa intensidade (BLLLT), ambos os fêmures passaram por este processo.

A porção proximal da placa tinha 2 furos para serem fixados, em que foram utilizados dois parafusos do mesmo sistema, com o comprimento de 4 a 6 mm, 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) 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 5.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos no plano mais externo (Figura 3).

FIGURA 3 – Etapas cirúrgicas do procedimento cirúrgico de simulação de fraturas. (A – C) Incisão na região femoral das ratas. (D – G) Divulsão de planos anatômicos e exposição de diáfise femoral. (H) Fixação de miniplacas texturizadas por PEO. (I) Fixação de miniplacas convencionais. (J - K) Simulação de fraturas femorais. (L) Simulação de fratura femoral e fixação realizadas

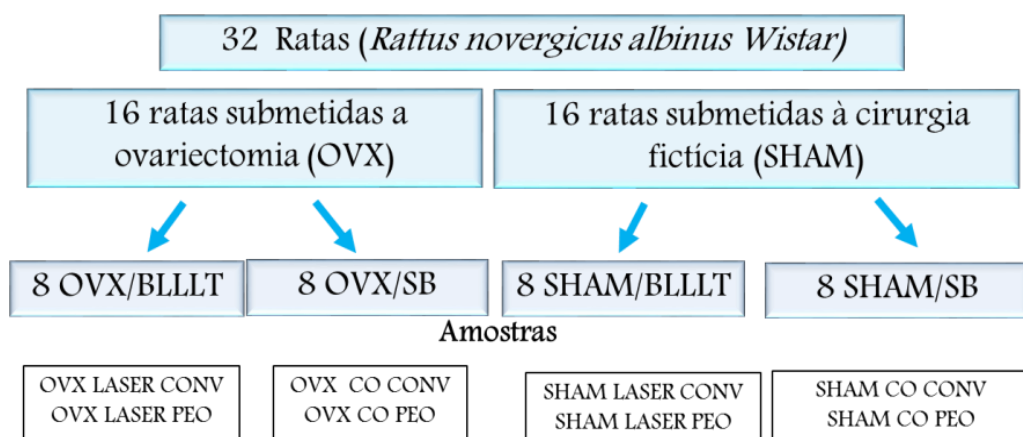


Fonte: Elaborada pelo autor

Portanto, os grupos experimentais em função da indução da osteoporose e tipo da texturização de superfície foram determinados em SHAM/BLLLT (ratas submetidas à cirurgia fictícia com placa convencional e placa texturizada por PEO sob efeito da terapia com laser de baixa intensidade); SHAM/SB (ratas submetidas à cirurgia fictícia com placa convencional e placa texturizada por PEO, sem biomodulação); OVX/BLLLT (ratas osteoporóticas com placa convencional e placa texturizada por PEO sob efeito da terapia com laser de baixa intensidade); OVX/SB (ratas osteoporóticas com placa convencional e placa texturizada por PEO, sem biomodulação). 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, como será explanado neste trabalho. No pós-operatório imediato, pela via intramuscular, dipirona SÓDICA na dose de 1mg UI/kg foi administrado para analgesia e, Pentabiótico na dose de 0,1 mg UI/kg como antibioticoterapia preventiva.

Todos os animais foram submetidos à eutanásia aos 60 dias após a cirurgia para fixação das fraturas femurais, por sobredosagem anestésica (Tiopental Sódico, 100 mg/kg) pela via intraperitoneal (Figuras 4 e 5).

FIGURA 4 – Fluxograma representativo do desenho experimental,videnciando os grupos experimentais e as amostras obtidas



Fonte: Elaborada pelo autor

FIGURA 5 – Linha do tempo, apresentando as etapas realizadas até a eutanásia

Fonte: Elaborada pelo autor

3.3.3 Biomodulação através da laserterapia de baixa intensidade (LLLT)

Os animais pertencentes a este grupo (SHAM/BLLLT, OVX/BLLLT), ainda no ato cirúrgico, logo após a fixação das fraturas com miniplacas e parafusos, foram irradiados com laser de baixa intensidade de Arsênio-Gálio (Ar-Ga) da marca KLD, modelo IR (São Paulo, Brasil). Os animais receberam uma dose de laser na magnitude de 808 nm - 100 mW, 6J, 180J/cm² durante 60 segundos por ponto / 5 pontos (Quadro 1). A aplicação foi pontual na metáfise femoral, na região do "gap" confeccionado e fixado pelas miniplacas e parafusos. 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-Vázquez²²

3.4 Métodos de análises

Assim, todos os animais foram submetidos à eutanásia aos 60 dias após a cirurgia para fixação das fraturas femurais, por sobredosagem anestésica (Tiopental Sódico, 150 mg/kg) pela via intraperitoneal, sendo as peças destinadas às análises

para tecidos calcificados, por meio das análises microtomográfica, histométrica e por microscopia confocal.

3.4.1 Imunoensaio para dosagem de estrógeno

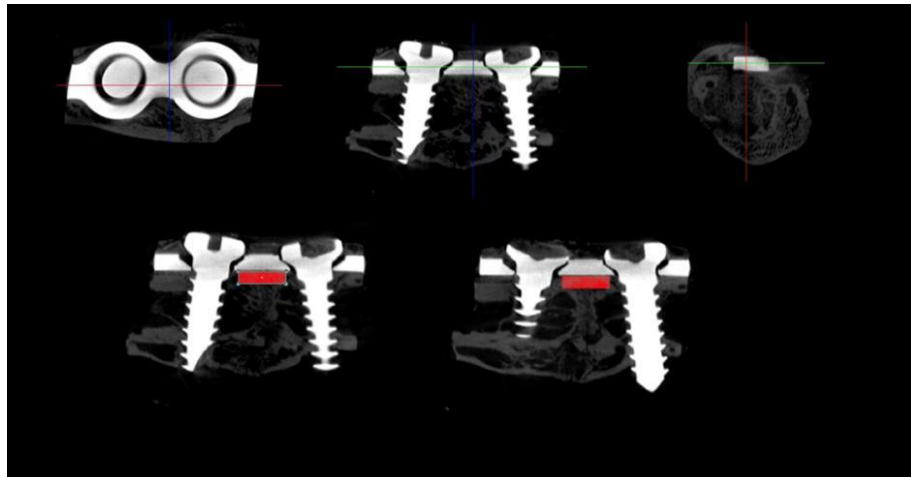
A concentração de estrógeno para as ratas que foram submetidas à ovariectomia bilateral (OVX) em comparação as que foram submetidas somente a cirurgia fictícia de ovariectomia (SHAM), foi determinado pelo método de ELISA - enzima imunoensaio. Nos Kits comerciais para dosagem dessas citocinas, os 96 poços 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 biotilado 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" será adicionado para interromper a reação de coloração. A leitura foi realizada em espectrofotômetro ajustado para o comprimento de onda conforme as orientações do fabricante.

3.4.2 Microtomografia Computadorizada (Micro-Ct)

Para a análise tridimensional, após a eutanásia dos animais aos 60 dias de pós-operatório, as peças foram removidas, reduzidas e armazenadas em álcool 70% e, primeiramente submetidas à análise por varredura de feixe de raios-X em um sistema de microtomografia digital computadorizada. As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) utilizando cortes de 5 µm de espessura (50Kv e 500µ), com filtro de Cobre e Alumínio e passo de rotação de 0.3 mm. As imagens obtidas pela projeção dos raios-X nas amostras foram armazenadas e reconstituídas determinando a área de interesse pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0).

No software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) as imagens foram reconstruídas para adequação do posicionamento padrão para todas as amostras, podendo ser observada em três planos (transversal, longitudinal e sagital). Em seguida, utilizando o software CTAnalyser – CTAn (2003- 11SkyScan, 2012 Bruker MicroCT Versão 1.12.4.0), foi definida uma área de interesse (ROI) delimitada pela interface placa e o "gap" reparacional, criado pela osteotomia entre os dois cotos do fêmur ou mandíbula fraturados. 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 possibilitará a obtenção do volume de osso formado na ROI referente ao tecido ósseo neoformado (Figura 6).

FIGURA 6 - Sequência 2D em orientação axial, sagital e coronal e determinação da área de interesse "ROI" de um espécime representativo dos grupos



Fonte: Elaborada pelo autor

Portanto, seguindo os parâmetros volumétricos sugeridos pela Academia Americana de Pesquisa em Osso Mineralizado⁵⁴, foram obtidos os parâmetros referentes à quantidade do tecido ósseo (BV= volume ósseo e 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).

3.4.3 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 serão 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 utilize 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 100 µm de espessura.

3.4.4 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 microscópio 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, será 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 representaram a secção de cada animal dos grupos experimentais. As imagens 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 a 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.

O osso do fêmur (região de interesse: "gap" reparacional) apresentou duas sobreposições de fluorocromos (calceína e alizarina), cada sobreposição representa 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 μm^2 . 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 "straight" também do software Image J, será mensurada a distância em μm entre o início da precipitação da calceína até o outro extremo da precipitação do vermelho de alizarina. Esse valor foi dividido por 28 (intervalo entre as aplicações dos fluorocromos: 14-42 dias) e, assim, foi obtido o valor da taxa de precipitação mineral por dia de análise.

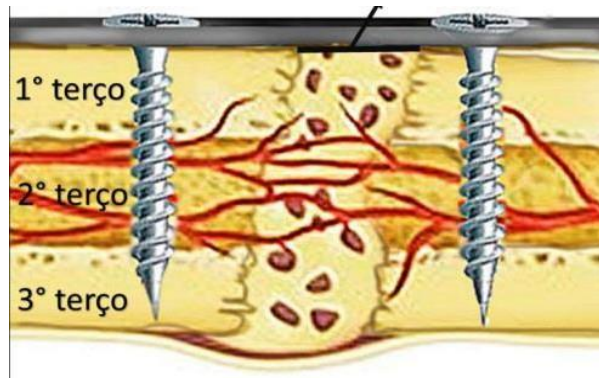
Os fluorocromos são componentes químicos que tem a propriedade de se ligar ao cálcio no momento da precipitação na matriz orgânica. Assim sendo, as marcações pelos fluorocromos representaram a quantidade da precipitação de cálcio, assim permitindo mensuração da neoformação óssea. Outro aspecto a ser considerado é o período em que os fluorocromos foram injetados, como o primeiro foi a calceína (verde), o osso marcado em fluorocromos verdes representa o osso velho. O segundo fluorocromo injetado foi a alizarina, portando, o osso marcado em fluorocromos vermelhos representa o osso novo. Considerando esses pontos é possível dizer que as diferentes cores representaram 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.

3.4.5 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 (AON). 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 um^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 (Figura 7).

FIGURA 7 - Imagem representativa sobre área de interesse (ROI) a ser analisada denotando os três terços da região, no qual, o 1° terço representa a região de "gap" reparacional em contato com a miniplaca; o 2° terço representa a região intermediária e o último terço, a região mais próxima do osso cortical basal do fêmur



Fonte: Elaborada pelo autor

3.5 Análise estatística

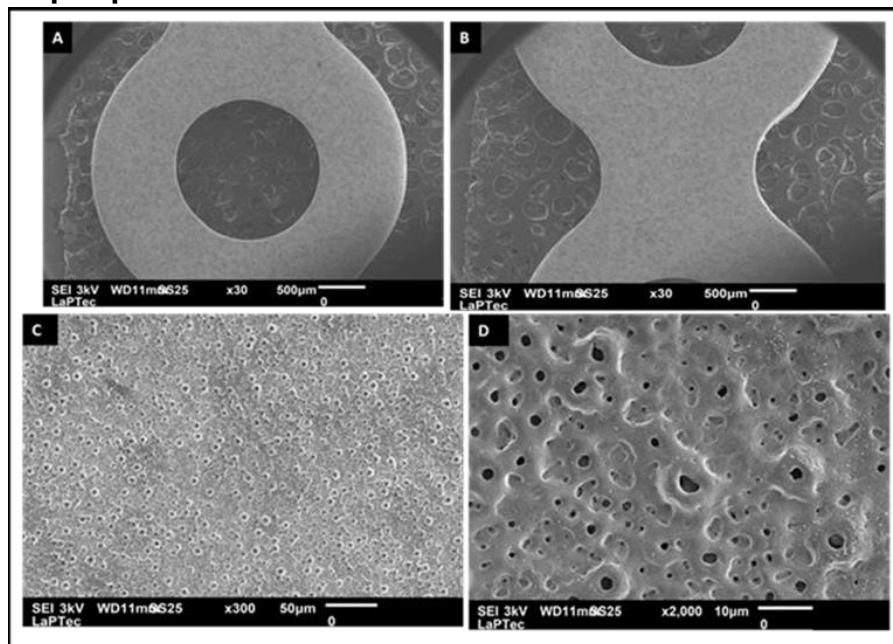
Para cada parâmetro amostral dos resultados quantitativos, através da histometria (AON; área de fluorocromos: calceína/alizarina) e morfometria tridimensional pela microtomografia (BV/TV, Tb.Th, Tb.Sp e Tb.N), foi abordada a diferença entre os grupos experimentais o sistema de fixação (CONV e PEO) e 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 12.0 (Exakt Graphs and Data Analysis, San Jose, California, USA).

4 RESULTADOS

4.1 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 8).

FIGURA 8 – 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

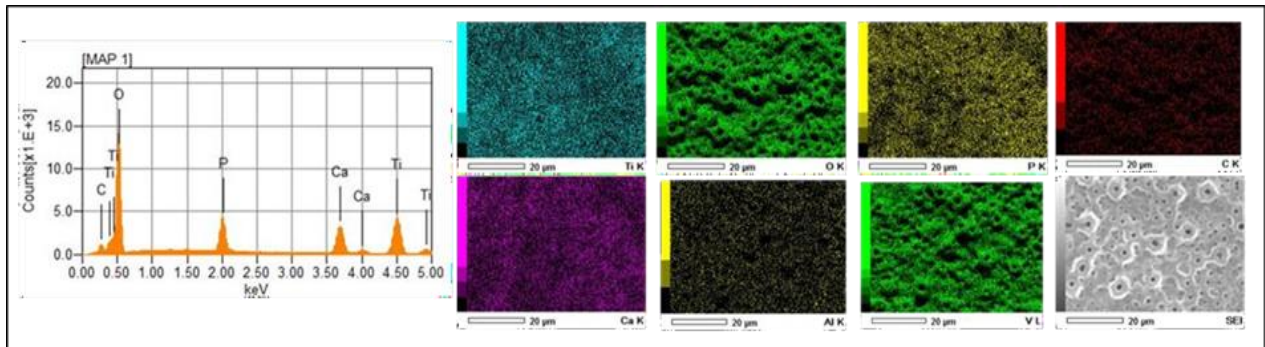


Fonte: Elaborada pelo autor

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 9).

FIGURA 9 - 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

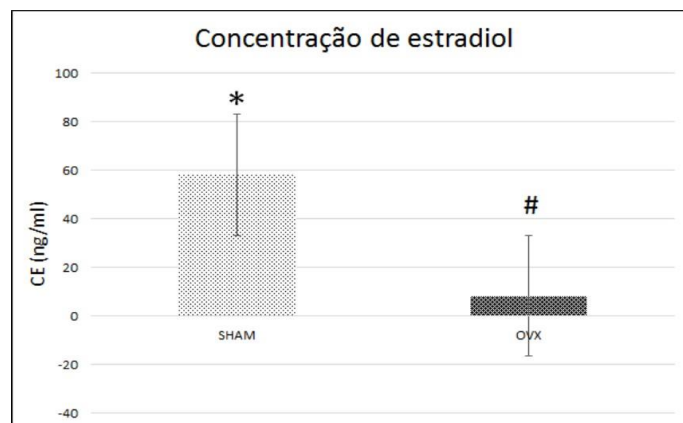


Fonte: Elaborada pelo autor

4.2 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 (Gráfico 1).

GRÁFICO 1 - Representação gráfica da concentração de estrógeno plasmático, constatando hipoestrogenismo no grupo OVX em comparação a SHAM ($p = 0,0003$). O * e # representam a diferença estatística que houve entre os grupos

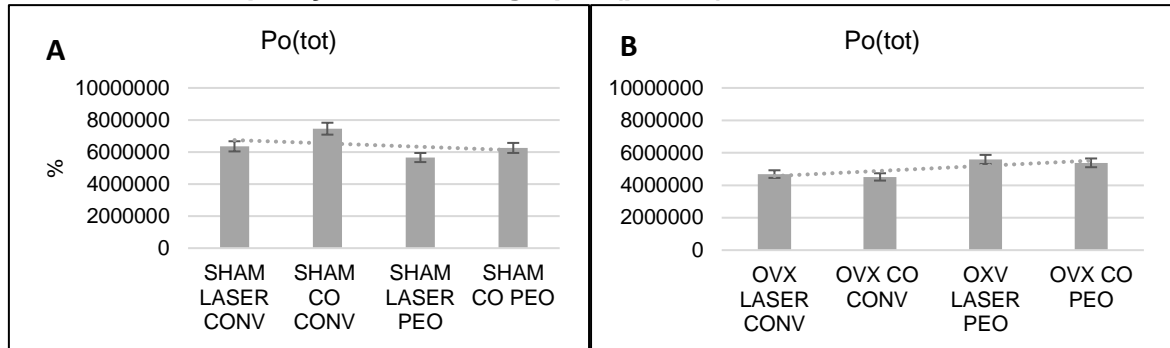


Fonte: Elaborada pelo autor

4.3 Microtomografia Computadorizada (Micro-Ct)

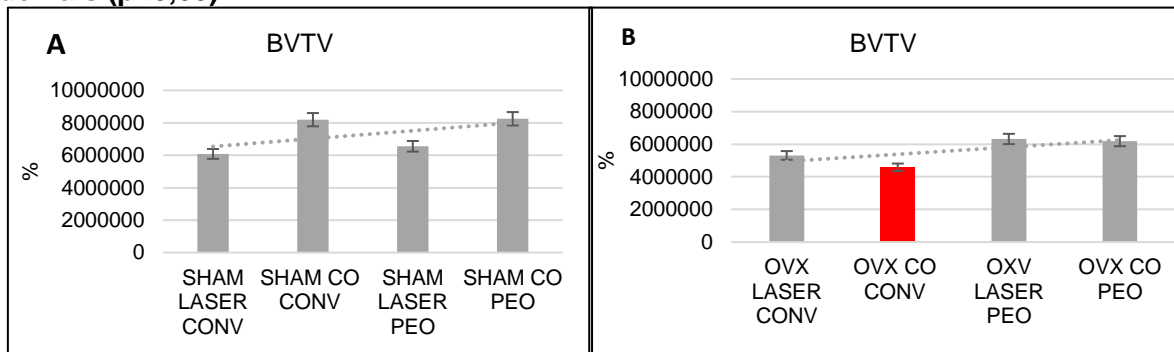
Os resultados referentes à microtomografia computadorizada evidenciaram que os animais saudáveis, independentemente da texturização de superfície da placa instalada (SHAM CONV e SHAM PEO), apresentaram valores bastante favoráveis à microarquitetura óssea durante o reparo da fratura femoral, com maiores 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 CONV e OVX LASER PEO com seus respectivos grupos SHAM.(Gráfico de 2 a 6)

GRÁFICO 2 – 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 ($p>0,05$).



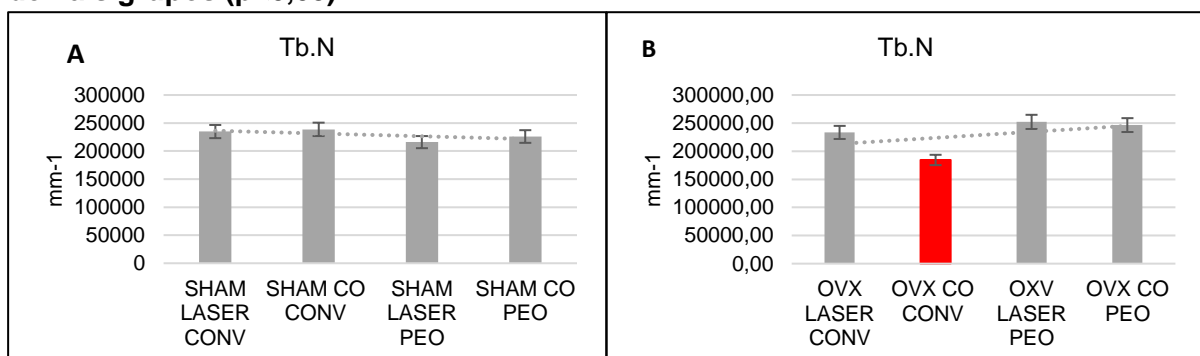
Fonte: Elaborado pelo autor

GRÁFICO 3 – Gráfico representativo dos valores médios e desvio padrão do parâmetro BTVV 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 ($p<0,05$).



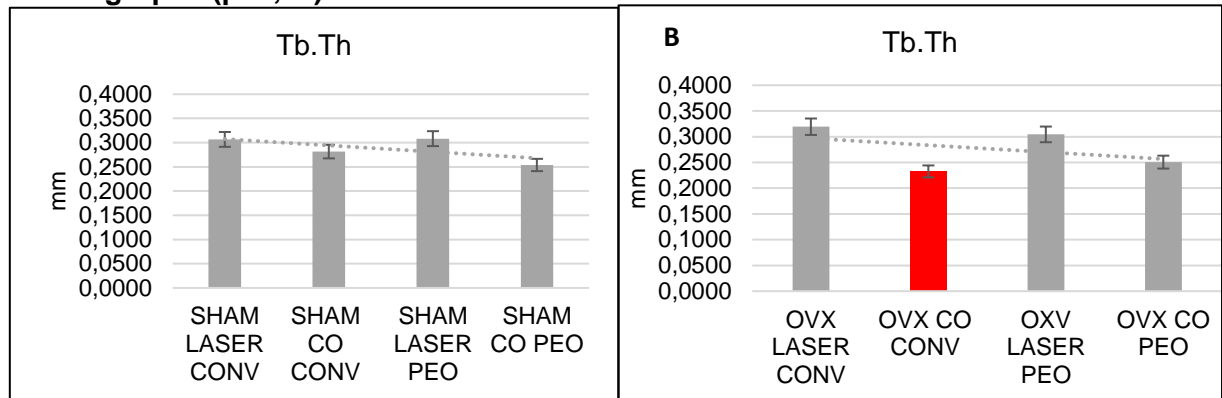
Fonte: Elaborado pelo autor

GRÁFICO 4 – 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 ($p<0,05$).



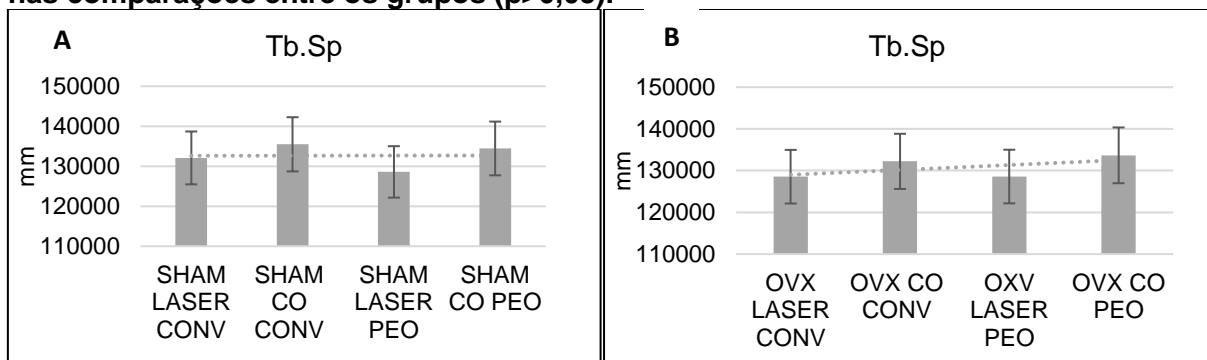
Fonte: Elaborado pelo autor

GRÁFICO 5 – 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 ($p<0,05$).



Fonte: Elaborado pelo autor

GRÁFICO 6 – 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 ($p>0,05$).



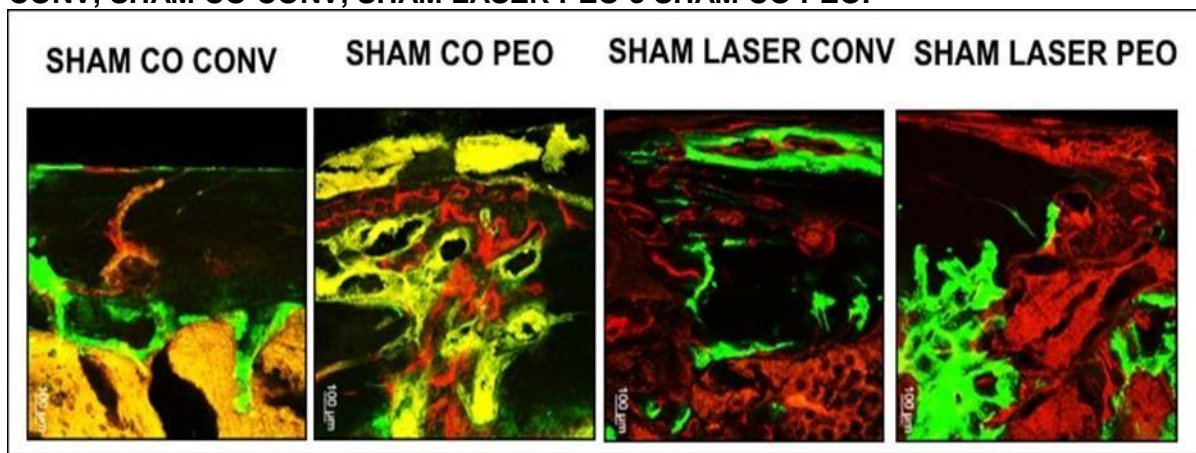
Fonte: Elaborado pelo autor

4.4 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,

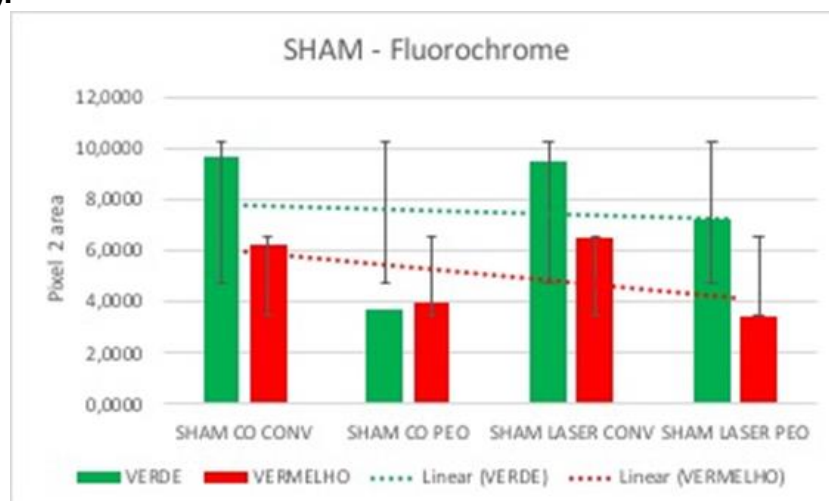
mostrando que existe potencial favorável em sua aplicação em situações de osteopenia como é possível visualizar nos gráficos 7 e 8.

FIGURA 10 – 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: 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.



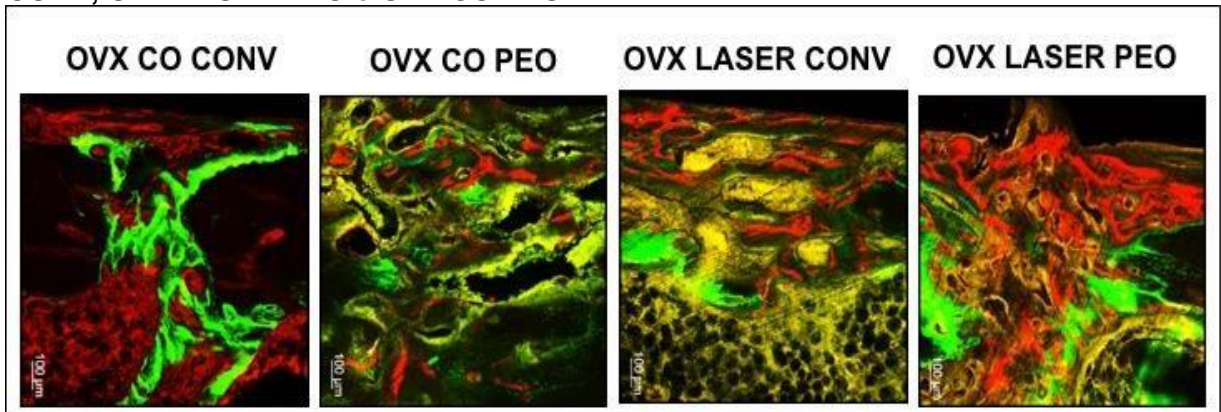
Fonte: Elaborada pelo autor

GRÁFICO 7 - 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 ($p < 0,05$).



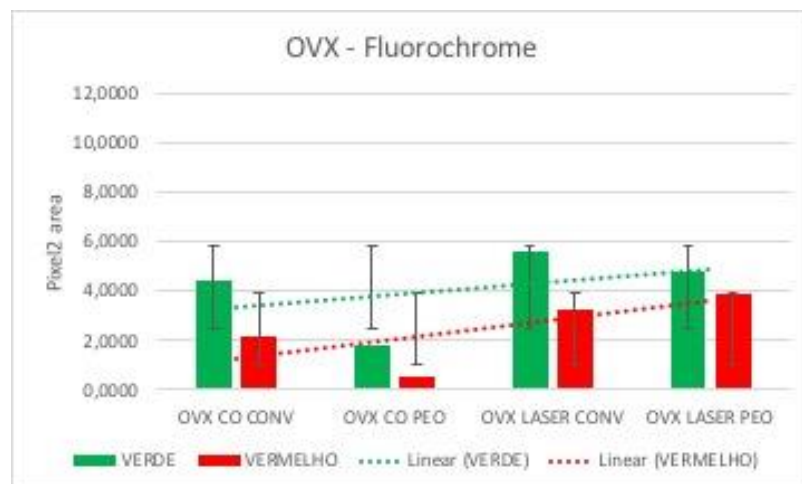
Fonte: Elaborado pelo autor

FIGURA 11 – 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: 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



Fonte: Elaborada pelo autor

GRÁFICO 8 – 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 ($p < 0,05$).



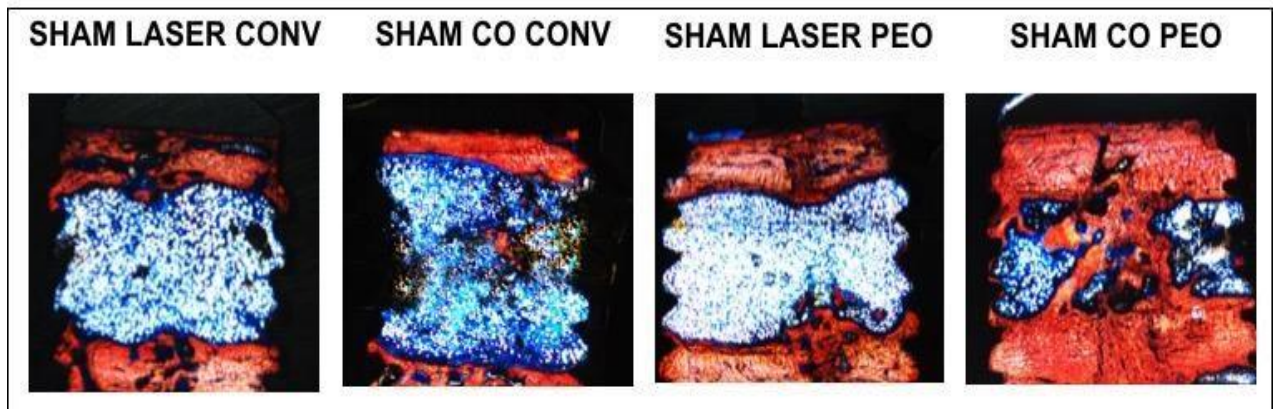
Fonte: Elaborado pelo autor

4.5 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

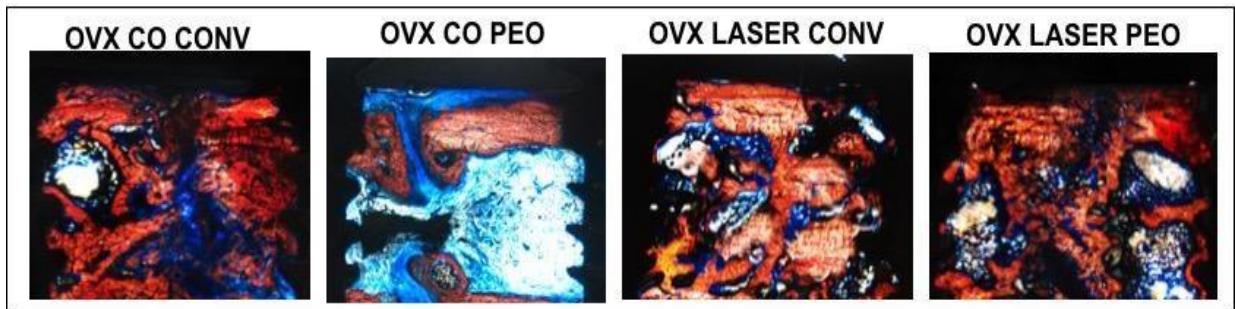
qualitativa das fotomicrografias obtidas, foi possível evidenciar que a superfície de tratamento através do PEO proporcionou um aspecto reparacional interessante nos animais saudáveis (SHAM PEO), com grande presença de tecido ósseo em (vermelho de alizarina) na maior porção do gap da fratura femoral 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 12 e 13)

FIGURA 12 - 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.



Fonte: Elaborada pelo autor

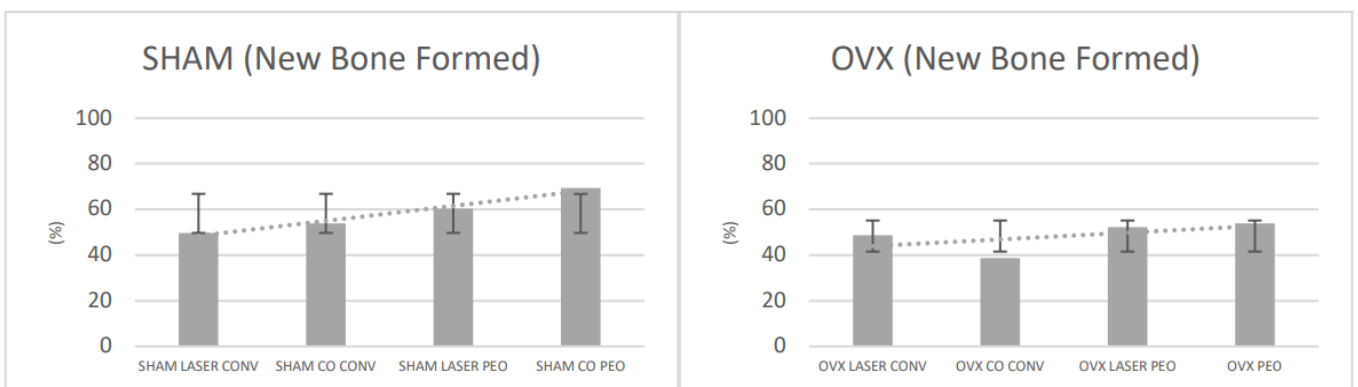
FIGURA 13 – Fotomicrografias das lâminas histológicas coradas com azul de Stevenel e vermelho de alizarina em um aumento de 25x, destacando-se maior presença de reparo ósseo no grupo OVX/LASER/PEO



Fonte: Elaborada pelo autor

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. (Gráfico 9).

GRÁFICO 9 - 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 ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborado pelo autor.

5 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, no que diz respeito ao aumento da atividade osteoblástica, em estudos in vitro, no entanto, sem evidências atuais de estudos in vivo⁴⁶.

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 acreditam que as propriedades do PEO melhorem a capacidade de adesão, com conseqüente 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 osteoblastos⁵⁶⁻⁵⁹. Além disso essa superfície oferece muitos sítios de ligação a proteínas séricas como a albumina, fibronectina e fibrinogênio favorecendo assim a interação com a hidroxiapatita⁵⁹, estudos demonstram que devido a estas características as superfícies texturizadas por PEO, se mostram promissoras para o uso em âmbito odontológico e também médico³⁵⁻³⁷.

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 imunoenensaio 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 hipoestrogenismo severo leva a perda da densidade mineral óssea e, conseqüentemente, à condição de osteoporose⁶⁰.

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 tecidual⁶¹. 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 saudáveis¹⁶. Além disso, estudo realizado por Campenfeldt e colaboradores⁶², evidenciou que pacientes com baixa densidade mineral óssea apresentaram mais falhas na fixação de fraturas femorais comparado a pacientes com densidade mineral óssea adequada.

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.*²² que mostraram também superioridade nos parâmetros radiológicos e histológicos para os grupos que receberam fotobiomodulação por laser.

No entanto, Kazem Shakouri *et al.*⁶³ 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. 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 osteoindutora do PEO^{40,64} 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 rapidamente⁵⁸.

Do que se tem de comprovação clínica em relação a fotobiomodulação aplicado em fraturas ósseas, Jana Neto *et al.*⁶⁵, 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, 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 explanar as variáveis do estudo.

6 CONCLUSÃO

Diante das limitações deste estudo in vivo, foi possível concluir que a fotobiomodulação pela irradiação com laser (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.

REFERÊNCIAS

- 1 GÓMEZ-BARRENA, E. *et al.* Bone fracture healing: cell therapy in delayed unions and nonunions. **Bone**, v. 70, p. 93-101, Jan. 2015.
- 2 TOROYAN, T.; PEDEN, M. M.; IAYCH, K. WHO launches second global status report on road safety. **Inj. Prev.**, v. 19, n. 2, p. 150, Apr. 2013.
- 3 CLAES, L.; RECKNAGEL, S.; IGNATIUS, A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. **Nat. Rev. Rheumatol.**, v. 8, n. 3, p. 133-143, Jan. 31 2012.
- 4 CHOU, S. H.; MANTZOROS, C. Bone metabolism in anorexia nervosa and hypothalamic amenorrhea. **Metabolism**, v. 80, p. 91-104, Mar. 2018.
- 5 MORELLI, V. *et al.* Risk of new vertebral fractures in patients with adrenal incidentaloma with and without subclinical hypercortisolism: a multicenter longitudinal study. **J. Bone Miner. Res.**, v. 26, n. 8, p. 1816-1821, Aug. 2011.
- 6 MOGHADDAM, A. *et al.* Cigarette smoking influences the clinical and occupational outcome of patients with tibial shaft fractures. **Injury**, v. 42, n. 12, p. 1435-1442, Dec. 2011.
- 7 GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Factors affecting wound healing. **J. Dent. Res.**, v. 89, n. 3, p. 219-29, Mar. 2010.
- 8 RUGGIERO, S. L. *et al.* American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw: 2014 update. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 72, n. 10, p. 1938-1956, Oct. 2014.
- 9 KANNEGAARD, P. N. *et al.* Excess mortality in men compared with women following a hip fracture. National analysis of comedications, comorbidity and survival. **Age Ageing**, v. 39, n. 2, p. 203-209, Mar. 2010.
- 10 THORNGREN, K. G. *et al.* Influence of age, sex, fracture type and pre-fracture living on rehabilitation pattern after hip fracture in the elderly. **Disabil. Rehabil.**, v. 27, n. 18-19, p. 1091-1097, 2005.
- 11 TEÓFILO, J. M. *et al.* Comparison between two experimental protocols to promote osteoporosis in the maxilla and proximal tibia of female rats. **Pesqui. Odontol. Bras.**, v. 17, n. 4, p. 302-306, 2003.
- 12 TEÓFILO, J. M.; BRENTGANI, L. G.; LAMANO-CARVALHO, T. L. Bone healing in osteoporotic female rats following intra-alveolar grafting of bioactive glass. **Arch. Oral. Biol.**, v. 49, n. 9, p. 755-762, Sep. 2004.
- 13 GLÖSEL, B. *et al.* Review of dental implant rat research models simulating osteoporosis or diabetes. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 25, n. 3, p. 516-524, 2010.

- 14 COMPSTON, J. Osteoporosis: social and economic impact. **Radiol. Clin. North Am.**, v. 48, n. 3, p. 477-482, May 2010.
- 15 LERNER, U. H. Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. **J. Dent. Res.**, v. 85, n. 7, p. 584-595, Jul. 2006.
- 16 THORMANN, U. *et al.* Differences of bone healing in metaphyseal defect fractures between osteoporotic and physiological bone in rats. **Injury**, v. 45, n. 3, p. 487-493, Mar. 2014.
- 17 SCHINDL, A. *et al.* Low-intensity laser therapy: a review. **J. Investig. Med.**, v. 48, n. 5, p. 312-326, Sep. 2000.
- 18 KARU, T. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. **IEEE J. Quant. Elect.**, v. 23, n. 10, p. 1703-1717, 1987.
- 19 PINHEIRO, A. L. *et al.* Bone repair following bone grafting hydroxyapatite guided bone regeneration and infra-red laser photobiomodulation: a histological study in a rodent model. **Lasers Med. Sci.**, v. 24, n. 2, p. 234-240, Mar. 2009.
- 20 NASCIMENTO, S. B. *et al.* Effect of low-level laser therapy and calcitonin on bone repair in castrated rats: a densitometric study. **Photomed. Laser Surg.**, v. 28, n. 1, p. 45-49, Feb. 2010.
- 21 LOPES, C. B. *et al.* Infrared laser photobiomodulation (λ 830 nm) on bone tissue around dental implants: a Raman spectroscopy and scanning electronic microscopy study in rabbits. **Photomed. Laser Surg.**, v. 25, n. 2, p. 96-101, Apr. 2007.
- 22 BRITENO-VÁZQUEZ, M. *et al.* Low power laser stimulation of the bone consolidation in tibial fractures of rats: a radiologic and histopathological analysis. **Lasers Med. Sci.**, v. 30, n. 1, p. 333-338, Jan. 2015.
- 23 LEGEROS, R. Z.; CRAIG, R. G. Strategies to affect bone remodeling: osteointegration. **J. Bone Miner. Res.**, v. 8, suppl. 2, p. S583-S596, Dec. 1993.
- 24 KASEMO, B. Biocompatibility of titanium implants: surface science aspects. **J. Prosthet. Dent.**, v. 49, n. 6, p. 832-837, Jun. 1983.
- 25 MENDONÇA, G. *et al.* Advancing dental implant surface technology--from micron- to nanotopography. **Biomaterials**, v. 29, n. 28, p. 3822-3835, Oct. 2008.
- 26 LE GUÉHENNEC, L. *et al.* Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. **Dent. Mater.**, v. 23, n. 7, p. 844-854, Jul. 2007.
- 27 CALVO-GUIRADO, J. L. *et al.* Influence of surface treatment on osseointegration of dental implants: histological, histomorphometric and radiological analysis in vivo. **Clin. Oral Investig.**, v. 19, n. 2, p. 509-517, Mar. 2015.

- 28 QUEIROZ, T. *et al.* Commercially pure titanium implants with surfaces modified by laser beam with and without chemical deposition of apatite. Biomechanical and topographical analysis in rabbits. **Clin. Oral Imp. Res.**, v. 24, n. 8, p. 896-903, 2013.
- 29 SOUZA, F. A. *et al.* 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. **J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.**, v. 101, n. 1, p. 76-84, Jan. 2013.
- 30 LUO, W. *et al.* Effect of zinc doped calcium phosphate coating on bone formation and the underlying biological mechanism. **Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi**, v. 32, n. 6, p. 1359-1363, Dec. 2015.
- 31 FERREIRA RIBEIRO, C. *et al.* Initial oral biofilm formation on titanium implants with different surface treatments: an in vivo study. **Arch. Oral Biol.**, v. 69, p. 33-39, Sep. 2016.
- 32 MENDES, M. W. *et al.* A new titanium based alloy Ti-27Nb-13Zr produced by powder metallurgy with biomimetic coating for use as a biomaterial. **Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.**, v. 63, p. 671-677, Jun. 2016.
- 33 KRZĄKAŁA, A.; KAZEK-KĘSIK, A.; SIMKA, W. Application of plasma electrolytic oxidation to bioactive surface formation on titanium and its alloys. **RSC Adv.**, v. 3, n. 43, p. 19725, 2013.
- 34 LAURINDO, C. A. *et al.* Incorporation of Ca and P on anodized titanium surface: Effect of high current density. **Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.**, v. 37, p. 223-231, Apr. 2014.
- 35 YEROKHIN, A. L. *et al.* Plasma electrolysis for surface engineering. **Surf. Coat. Technol.**, v. 122, n. 2, p. 73-93, 1999..
- 36 WALSH, F. *et al.* Plasma electrolytic oxidation (PEO) for production of anodised coatings on lightweight metal (Al, Mg, Ti) alloys. **Transact. Instit. Metal Finish.**, v. 87, p. 122-135, 2009.
- 37 MARQUES IDA, S. *et al.* Incorporation of Ca, P, and Si on bioactive coatings produced by plasma electrolytic oxidation: The role of electrolyte concentration and treatment duration. **Biointerphases**, v. 10, n. 4, p. 041002, Dec 2015.
- 38 MARQUES, I. D. *et al.* Electrochemical behavior of bioactive coatings on cp-Ti surface for dental application. **Corros Sci.**, v. 100, p. 133-146, Nov. 2015.
- 39 HE, J. *et al.* 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**, v. 33, n. 2, p. 298–310, 2018.
- 40 TANASE, C. E. *et al.* Cell response to plasma electrolytic oxidation surface-modified low-modulus β -type titanium alloys. **Colloids Surf B Biointerf.**, v. 176, p. 176-184, 2019.

- 41 ECHEVERRY-RENDÓN, M. *et al.* Modification of titanium alloys surface properties by plasma electrolytic oxidation (PEO) and influence on biological response. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v. 28, n. 11, p. 169, Sep. 2017.
- 42 HARTJEN, P. *et al.* Plasma electrolytic oxidation of titanium implant surfaces: microgroove-structures improve cellular adhesion and viability. **In Vivo**, v. 32, n. 2, p. 241-247, 2018.
- 43 PARK, S. Y.; CHOE, D. H. Bone-like apatite formation on the plasma electrolytic oxidation-treated Ti-6Al-4V alloy in solution containing Si and Mg ions. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, v. 18, n. 2, p. 1439-1441, Feb. 2018.
- 44 COMUNIAN, C. R. *et al.* Photobiomodulation with LED and laser in repair of mandibular socket rabbit: clinical evaluation, histological, and histomorphometric. **Oral Maxillofac. Surg.**, v. 21, n. 2, p. 201-206, Jun. 2017.
- 45 KANG, J. I.; SON, M. K.; CHOE, H. C. Hydroxyapatite coatings containing Mn and Si on the oxidized Ti-6Al-4V alloy for dental applications. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, v. 18, n. 2, p. 833-836, Feb. 2018.
- 46 LARA RODRIGUEZ, L. *et al.* Plasma electrolytic oxidation coatings on γ TiAl alloy for potential biomedical applications. **J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.**, v. 102, n. 5, p. 988-1001, Jul. 2014.
- 47 EVANS, H. M.; LONG, J. A. Characteristic effects upon growth, oestrus and ovulation induced by the intraperitoneal administration of fresh anterior hypophyseal substance. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 8, n. 3, p. 38-39, Mar. 1922.
- 48 LUVIZUTO, E. R. *et al.* Osteocalcin immunolabeling during the alveolar healing process in ovariectomized rats treated with estrogen or raloxifene. **Bone**, v. 46, n. 4, p. 1021-1029, Apr. 2010.
- 49 LUVIZUTO, E. R. *et al.* 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.**, v. 55, n. 1, p. 52-59, Jan. 2010.
- 50 RAMALHO-FERREIRA, G. *et al.* Alveolar bone dynamics in osteoporotic rats treated with raloxifene or alendronate: confocal microscopy analysis. **J. Biomed. Opt.**, v. 20, n. 3, p. 038003, Mar. 2015.
- 51 CHEN, J. *et al.* Gelatin microspheres containing calcitonin gene-related peptide or substance P repair bone defects in osteoporotic rabbits. **Biotechnol. Lett.**, v. 39, n. 3, p. 465-472, Mar. 2017.
- 52 CHEN, X. *et al.* Effect of bone mineral density on rotator cuff tear: an osteoporotic rabbit model. **PLoS One**, v. 10, n. 10, p. e0139384, 2015.
- 53 LUVIZUTO, E. R. *et al.* Raloxifene therapy inhibits osteoclastogenesis during the alveolar healing process in rats. **Arch. Oral Biol.**, v. 56, n. 10, p. 984-990, Oct. 2011.

- 54 BOUXSEIN, M. L. *et al.* Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **J. Bone Miner. Res.**, v. 25, n. 7, p. 1468-1486, Jul. 2010.
- 55 RAMALHO-FERREIRA, G. *et al.* Alveolar bone dynamics in osteoporotic rats treated with raloxifene or alendronate: confocal microscopy analysis. **J. Biomed. Opt.**, v. 20, n. 3, p. 038003, Mar. 2015.
- 56 HARTJEN, P. *et al.* Plasma electrolytic oxidation of titanium implant surfaces: microgroove-structures improve cellular adhesion and viability. **In Vivo**, v. 32, n. 2, p. 241-247, 2018.
- 57 ECHEVERRY-RENDÓN, M. *et al.* Modification of titanium alloys surface properties by plasma electrolytic oxidation (PEO) and influence on biological response. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v. 28, n. 11, p. 169, Sep. 2017.
- 58 HE, J. *et al.* 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**, v. 33, n. 2, p. 298–310, 2018.
- 59 NUNE, K. C. *et al.* 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**, v. 107, n. 1, p. 49-60, Jan. 2019.
- 60 SZELIGA, A.; MACIEJEWSKA-JESKE, M.; MĘCZEKALSKI, B. Bone health and evaluation of bone mineral density in patients with premature ovarian insufficiency. **Prz Menopauzalny**, v. 17, n. 3, p. 112-116, Sep. 2018.
- 61 CHEN, C. H. *et al.* An osteopenic/osteoporotic phenotype delays alveolar bone repair. **Bone**, v. 112, p. 212-219, Jul. 2018.
- 62 CAMPENFELDT, P. *et al.* 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**, v. 49, n. 11, p. 2042-2046, Nov. 2018.
- 63 KAZEM SHAKOURI, S. *et al.* Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process. **Lasers Med. Sci.**, v. 25, n. 1, p. 73-77, Jan. 2010.
- 64 ECHEVERRY-RENDÓN, M. *et al.* Modification of titanium alloys surface properties by plasma electrolytic oxidation (PEO) and influence on biological response. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v. 28, n. 11, p. 169, Sep. 2017. I
- 65 JANA NETO, F. C. *et al.* Effects of photobiomodulation in the treatment of fractures: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. **Lasers Med. Sci.**, v. 35, n. 3, p. 513-522, Apr. 2020.

ANEXOS

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.

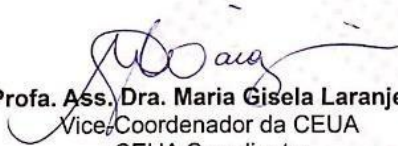
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Março de 2019.

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

ANEXO B - Comprovante envio do artigo para publicação no periódico “JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY & PHOTOBIOLOGY, B”

Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology

Is an anodizing coating associated to the photobiomodulation able to optimize bone healing in ovariectomized animal model?

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Full length article
Keywords:	Oxide coating; Anodic films; Laser; Fractures, Bone.
Corresponding Author:	Leonardo P Faverani, DDS, MSc, PhD Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho Faculdade de Odontologia de Aracatuba Campus de Aracatuba Aracatuba, São Paulo BRAZIL
First Author:	Tárik OB Polo, DDS, MSc, PhD
Order of Authors:	Tárik OB Polo, DDS, MSc, PhD Gustavo AC Momesso, DDS, MSc, PhD student William PP Silva, DDS, MSc, PhD student Anderson Maikon de Souza Santos, MSc Student João MF Santos, Undergraduated Nilson C Cruz, PhD Valentim AR Barão, DDS, MSc, PhD Valdir G Garcia, DDS, MSc, PhD Letícia Helena Theodoro, DDS, MSc, PhD Leonardo P Faverani, DDS, MSc, PhD
Abstract:	This in vivo study investigated whether the bioactivity of anodizing coating, produced by plasma electrolytic oxidation (PEO), on mini-plate in femur fracture could be improved with the association of photobiomodulation (PBM). From the 20 ovariectomized Wistar rats, 8 were used for model characterization, and the remaining 12 were divided into four groups according to the use of PBM therapy by diode laser (808 nm; power: 100 mW; energy: 6.0 J; energy density: 212 J/cm ² ; power density of 3.5 W/cm ²) and the type of mini-plate surface (commercially pure titanium mini-plate [cpTi] and PEO-treated mini-plate) as follow: cpTi; PEO; cpTi/PBM; and PEO/PBM. After 60 days of surgery, fracture healing underwent microstructural, bone turnover, histometric, and histologic adjacent muscle analysis. Animals of groups with PEO and PBM showed greater fracture healing than cpTi group under histometric and microstructural analysis (P < 0.05); however, bone turnover was just improved in PBM's groups (P < 0.05). There is no difference between cpTi and PEO without PBM (P > 0.05). Adjacent muscle analysis showed no metallic particles or muscle alterations in all groups. PEO and PBM are effective strategies for bone repair in fractures, however their association does not provide additional advantages.