



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

RAFAELA SANDRO STUQUE

**Terapia fotobiomoduladora no reparo ósseo de fraturas
em ratas com osteoporose experimentalmente induzida**

RAFAELA SANDRO STUQUE

**Terapia fotobiomoduladora no reparo ósseo de fraturas
em ratas com osteoporose experimentalmente induzida**

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

Orientador: Prof. Associado Leonardo Perez Faverani

**Araçatuba
2024**

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, “Meu amigo, meu pai, meu protetor”. Deus em todos estes anos foi meu abrigo, em todos os momentos Ele esteve lá, mesmo eu não vendo. Durante a minha graduação eu vi os milagres de Deus em minha vida, desde a área acadêmica até a financeira. Deus em sua infinita bondade me mostrou o quanto sou amada, me mostrou que não estou sozinha e que tenho um pai que me ama. Que minha vida seja uma expressão contínua de gratidão e louvor a você, meu amado Pai. Que eu possa reconhecer suas bênçãos em cada momento e compartilhar seu amor com todos ao meu redor.

Ao meu maior exemplo, **Minha Mãe, Lucinéia Sandro**, é difícil pensar na minha mãe e não me emocionar, minha gratidão será eterna a ela. Se estou terminando a minha faculdade é porque ela fez de tudo para me dar uma boa educação. Minha mãe é meu maior exemplo de mulher, guerreira, professora, amiga, trabalhadora, foi através da vida dela que aprendi a correr atrás dos meus sonhos. Na época mais difícil das nossas vidas, além de cuidar dos seus 2 filhos e trabalhar como faxineira de uma universidade, fazer faculdade de letras, ela ainda ficava até de madrugada estudando para passar em um concurso, mesmo sendo pequena, eu me lembro do esforço que ela fazia e o quão cansada ficava, porém sempre era grata e demonstrava felicidade, todos os dias ela me acordava com uma música chamada “Ouço Deus me chamar”, sempre que ouço esta música me emociono, pensando em tudo o que minha mãe passou e mesmo assim nunca deixou de ser esta Mãe incrível. Mesmo eu tendo 25 anos, ela não deixa de se preocupar comigo, muitas vezes eu não preciso nem falar e ela já sabe tudo o que está acontecendo, mesmo adulta ela nunca deixa de me dar conselhos e me cobrar dos estudos. Mãe, saiba que eu te amo muito, sou extremamente grata por ser sua filha, saiba que você é a melhor mãe do mundo, e que nunca vou conseguir te agradecer o tanto precisa.

Ao meu **noivo, Gabriel Cortez**, muito obrigada por você fazer parte da minha vida, você é meu porto seguro, com você eu vivo toda a minha graduação, compartilhou dos melhores e piores momentos. Hoje, eu sou extremamente feliz por ter você comigo, por saber que daqui a poucos meses seremos casados, por ter este homem incrível ao meu lado. Amor, obrigada por me lembrar do meu potencial, por sempre me ajudar, me incentivar. Obrigada por ser o meu companheiro de vida, por compartilhar os altos e baixos, os sorrisos e as lágrimas. Sua presença me conforta e me inspira a ser uma pessoa melhor a cada dia. Estou ansiosa para embarcar nesta jornada ao seu lado, construindo nossos sonhos, enfrentando desafios e celebrando cada conquista juntos. Você é o meu porto seguro, e eu não poderia pedir por alguém melhor para compartilhar minha vida.

Ao **meu irmão, “Marcos Henrique Sandro Stuque”** você é meu maior exemplo de homem, um pai incrível para o Arthur, um marido maravilhoso para a Karen. Tato, você assumiu o papel de pai na minha vida, sempre me protegeu, me aconselhou, cuidou de mim. Não consigo imaginar minha vida sem a nossa amizade, que mesmo estando distantes você faz tudo por mim e eu por você. Quando eu penso em um pai, eu penso em você, a forma como cuidou de mim quando era menor, e como cuida do Arthur, o mundo seria muito melhor se tivesse mais homens como você. Tato, eu te amo muito, se estou concluindo a minha faculdade é porque você me ajudou a chegar na onde estou, é porque tenho você ao meu lado, obrigada por tudo.

Ao **meu padrasto, Carlos Bonadia**, muito obrigada por tudo o que você faz por mim, mesmo não me conhecendo quando eu era pequena, você me acolheu como sua filha, você é literalmente o pai que nunca tive, saiba que é muito importante na minha vida e sou muito grata por tudo o que faz por nós, sei que minha mãe é feliz ao seu lado. Obrigada por me adotar como sua filha, eu te amo!

À **minha cunhada, Karen Stuque**, você para mim é a irmã que eu nunca tive, sua força e dedicação me inspiração a correr atrás dos meus sonhos, você é uma mãe incrível, sou muito grata por ter você ao meu lado, obrigada por sempre me ajudar quando eu peço, por estar tão presente na minha vida, amo você.

À **minha sogra, Edna Cortez**, quero expressar minha mais profunda gratidão a você. Desde o momento em que entrei para a sua família, tenho sido recebida com amor, generosidade e bondade inigualáveis. Sua presença em minha vida tem sido uma bênção inestimável, e quero que saiba o quanto aprecio tudo o que você faz. Obrigada por abrir os braços e o coração para mim desde o primeiro dia. Você é um exemplo inspirador de amor, generosidade e força, e sou profundamente grata por tê-la como minha sogra. Cada momento compartilhado ao seu lado é precioso para mim, e guardarei essas memórias com carinho para sempre, amo muito você.

À **minha dupla, Caio Secate**, Ao longo dos anos, compartilhamos não apenas aulas e trabalhos em grupo, mas também risadas, conversas profundas e momentos inesquecíveis. Sua amizade foi muito importante para os meus dias mais sombrios e deixou minha experiência na faculdade mais feliz. Sou grata por ter alguém como você ao meu lado durante esses anos. Enquanto nos preparamos para seguir caminhos separados após a faculdade, quero que saiba que nossa amizade é algo que guardarei para sempre em meu coração.

À **minha amiga, Paloma Queiroz**, Pa você é meu maior presente da faculdade, ter me aproximado de você deixou esses anos melhor, obrigada por

compartilhar os melhores e piores momentos da graduação comigo, por ser essa amiga incrível e nunca me abandonar nos momentos em que eu mais precisei. À medida que a faculdade está acabando e seguimos em direções diferentes, quero que saiba que nossa amizade é um tesouro que guardarei para sempre em meu coração. Espero que possamos continuar a compartilhar nossos sonhos, aventuras e momentos especiais, mesmo após nos formarmos. Obrigada por ser uma amiga tão incrível e por tornar esta jornada acadêmica uma experiência inesquecível. Que nossa amizade continue a crescer e florescer nos próximos capítulos de nossas vidas.

A **todos meus amigos**, Caio Daniel, Paloma Queiroz, Francieli Flores, Matheus F. Raggiante, Letícia Carpaneji, Renata, Beatriz Alexandreli, Mileni Buzo, Gustavo R., Izabela D, Olavo P, Douglas B., Marcos G., José Roberto, Maria Carolina, Odir Nunes, enfim, todos os amigos. Vocês foram muito mais do que simples colegas de classe; tornaram-se uma família para mim. Juntos, enfrentamos as dificuldades dos estudos, os prazos apertados e os momentos de estresse, mas também celebramos as vitórias, as realizações e os momentos de diversão. Cada um de vocês trouxe algo especial para nossa jornada acadêmica, e sou imensamente grato por ter tido a oportunidade de aprender e crescer ao lado de pessoas tão incríveis. O apoio mútuo, a camaradagem e a amizade que compartilhamos tornaram esta experiência verdadeiramente inesquecível. À medida que seguimos em direção aos nossos próximos capítulos, quero que saibam que levarei cada lembrança e cada amizade formada nesta faculdade comigo para onde quer que eu vá. Obrigada por fazerem parte da minha jornada na faculdade e por serem amigos tão incríveis.

Ao **meu orientador Prof. Associado Leonardo Perez Faverani**, obrigada por ser muito mais que um orientador, ser um amigo. Em set/2020, mandei um email para o Senhor contando a minha situação como aluna que tinha reprovado no primeiro ano, mas que gostaria de uma oportunidade de fazer iniciação científica, quando recebi a sua resposta eu fiquei muito emocionada, pois estava sem esperança, sabia que Deus estava cuidando de tudo e que Ele tinha um propósito. Hoje, eu entendo os planos de Deus, porque aprendi com o Professor a ser mais generosa, a pensar nos meus pacientes com carinho, aprendi que os professores podem se tornar nossos amigos e no departamento consegui refletir sobre o que Deus queria com a minha vida, mesmo tendo uma resposta que fugiu dos meus planos e acabou não me agradando muito, porém tive paz com o que Deus queria para mim. Admito que quando contei para o Senhor que não iria mais tentar o mestrado, estava com medo, pois não queria te decepcionar, porém a sua resposta foi muito melhor do que eu imaginei, e então eu tive a certeza do que precisava fazer.

Sou muito grata ao Senhor por tudo o que fez por mim durante esses 3 anos, obrigada por sempre me ajudar, apoiar, ensinar, obrigada por ser um professor tão bom. Saiba que mesmo não fazendo mestrado e continuar na faculdade, o Senhor pode contar comigo. Lembre-se de Confiar em Deus em todos os momentos, Ele está cuidado de todos os seus planos.

À **Dra. Stefany Barbosa**, Obrigada por ser esta pós graduanda tão incrível, quando te conheci no departamento, eu sabia que você seria um exemplo para mim. Pude ver a linda mulher que você estava se tornando, uma pesquisadora e dentista brilhante e assim de tudo, uma mulher segundo o coração de Deus. Saiba que sou muito feliz por ter me aproximado de você, me ensinou a ser mais dedicada, disciplinada, a fazer as coisas da Iniciação, aprendi a ter mais amor e zelo pelos pacientes, assim como você tem com a Dona flor. Saiba que você é muito importante para mim e que sempre lembrarei de tudo o que fez por mim. Obrigada por todos os ensinamentos, risadas e conversas que tivemos no departamento.

À **Profa. Associada Dra. Ana Paula Farnezi**, pensar na Senhora é lembrar da primeira aula de implantodontia quando você falou “Quando aquilo que fazemos parar de brilhar nossos olhos, é o momento de repensar”, não exatamente com essas palavras, mas foi neste sentido, foi naquele momento que comecei a refletir sobre o que eu realmente queria ser quando me formasse, então comecei a orar e pedir direcionamento para Deus. Hoje, sinceramente, eu sou muito grata a Senhora por ter aberto meus olhos e me feito refletir sobre minha carreira. Pensar na Senhora, também é lembrar da primeira aula de pré-operatório, assim como a Mileni falou “deu vontade de te aplaudir de pé pela excelente aula”. A senhora é uma professora incrível, tornou-se o meu exemplo de profissional, espero um dia poder pelo menos 1/3 do que a Senhora é, pois além de ser uma dentista excepcional, é uma professora incrível e uma mãe melhor ainda, posso dizer que a Malu tem sorte em ter a senhora como mãe. Obrigada por me ensinar tanto, por aceitar minha banca e por ser essa mulher incrível.

Ao **Dr. João Matheus Fonseca**, obrigada por ser este homem incrível, que teve paciência comigo e me ensinou as coisas da iniciação científica. Obrigada por toda ajuda, conselhos e risadas. Com você aprendi a ser mais comprometida e dedicada. Sua força mesmo em meio as adversidades da vida, me inspiraram, e pude ver o quão maravilhoso era o João Matheus, você é um exemplo para todos nós. Obrigada por tudo.

À **Profª. Associada Letícia Helena Theodoro**, obrigada por toda ajuda com nosso trabalho, sempre se dispor para nos ajudar, a Senhora foi fundamental para a elaboração da pesquisa. Obrigada por ser esta professora e pesquisadora incrível.

Ao **Prof. Associado Edilson Ervolino**, obrigada por toda ajuda no nosso trabalho e sempre dispor do seu laboratório. Obrigada por ser um professor incrível, que inspira seus alunos.

A **todo o grupo de pesquisa**, orientado pelo professor Leonardo, me permitiu conhecer pessoas muito talentosas e que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho, e de muitos outros que realizamos em todo esse período.

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

À **FINEP e ao MUBIO (01.12.0530.00- Finep/ProInfra (01/2011))**, pela disponibilização do aparelho e realização das análises de Microtomografia Computadorizada (Micro-CT), que foram feitas com tanta excelência na nossa pesquisa.

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

STUQUE, R. S. **Terapia fotobiomoduladora no reparo ósseo de fraturas em ratas com osteoporose experimentalmente induzida**. 2024. Trabalho de conclusão de curso – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2024.

RESUMO

O tecido ósseo pode ser lesado por uma série de mecanismos que comumente dão origem às fraturas. Para que haja a reparação óssea, é fundamental que haja boas condições para que este mecanismo complexo ocorra, entretanto, algumas condições sistêmicas podem influenciar negativamente este processo de reparo, como algumas processos inflamatórias crônicas e alterações na microarquitetura do tecido ósseo. Este trabalho de pesquisa objetivou avaliar o efeito fotobiomodulador (FBM) do laser de baixa potência na reparação de fraturas femorais em ratas osteoporóticas. Para isso, 18 ratas adultas, com 6 meses de idade, foram inicialmente submetidas à ovariectomia bilateral, para indução de osteoporose, sendo que após 90 dias, as ratas foram submetidas às fraturas femorais e fixação com placas e parafusos do sistema 1,5 mm. As ratas foram divididas aleatoriamente em FBM (n=9), aquelas que foram irradiadas no período trans-cirúrgico e pós-operatório com laser de baixa potência e SFBM (n=9), as que não foram irradiadas. Para o grupo FBM, foi utilizado um laser de baixa potência com comprimento de ondate 808 nm, área do spot de 0,0283 cm², potência de 100 mW aplicado por 60 segundos, energia de 6 J/ponto, densidade de energia de 212 J/cm², aplicação única e pontual em 5 pontos determinados ao redor de todo o “gap” reparacional, seguindo as aplicações uma vez ao dia, durante 8 dias de pós-operatório. Os animais foram eutanasiados aos 14 e 42 dias pós-operatórios, e as amostras foram encaminhadas para análises microtomográfica, histométrica e imuno-histoquímica. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA 2 fatores e pós-teste Holm-Sidak, quando $p < 0,05$. A análise microtomográfica não demonstrou diferenças entre os grupos analisados em nenhum período experimental ($p > 0,05$). A histometria evidenciou maior área de tecido ósseo neoformado para o grupo FBM em comparação ao grupo SFBM ($p < 0,05$), da mesma forma que para as imunomarcações para TGF-B e VEGF. corroborando com o resultado imuno-histoquímico em que se notou maior marcação de TGF-B e VEGF. Conclui-se que a terapia fotobiomoduladora, através da irradiação da luz infravermelha (808 nm) melhorou o reparo de fraturas em fêmures de ratas osteoporóticas e deve ser considerado em futuras pesquisas clínicas.

Palavras-chave: Laser, Osteoporose, Fratura femural;

Stuque, R. S. **Photobiomodulation therapy in bone repair of fractures in rats with experimentally induced osteoporosis**. 2024. Trabalho de conclusão de curso - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2024.

ABSTRACT

Bone tissue can be damaged by a series of mechanisms that commonly give rise to fractures. For bone repair to occur, it is essential that there are good conditions for this complex mechanism to occur, however, some systemic conditions can negatively influence this repair process, such as some chronic inflammatory conditions and changes in the microarchitecture of bone tissue. This research work aimed to evaluate the photobiomodulatory effect (FBM) of low-power laser in the repair of femoral fractures in osteoporotic rats. For this, 18 adult rats, aged 6 months, were initially subjected to bilateral ovariectomy, to induce osteoporosis, and after 90 days, the rats were subjected to femoral fractures and fixation with plates and screws from the 1.5 mm system. . The rats were randomly divided into FBM (n=9), those that were irradiated during the surgical period with a low-power laser, and SFBM (n=9), those that were not irradiated. For the FBM group, a low-power laser was used with a wavelength of 808 nm, spot area of 0.0283 cm², power of 100 mW applied for 60 seconds, energy of 6 J/point, energy density of 212 J/cm², single and punctual application at 5 determined points around the entire repair gap, following applications once a day, for 8 days post-surgery. The animals were euthanized at 14 and 42 days postoperatively, and the samples were sent for microtomographic, histometric and immunohistochemical analysis. Data were analyzed using the 2-way ANOVA test and Holm-Sidak post-test, when $p < 0.05$. The microtomographic analysis demonstrated no differences between the groups analyzed in any experimental period ($p > 0.05$). Histometry showed a greater area of newly formed bone tissue for the FBM group compared to the SFBM group ($p < 0.05$), in the same way as for immunostainings for TGF-B and VEGF. corroborating the immunohistochemical result in which greater TGF-B and VEGF staining was noted. It is concluded that photobiomodulatory therapy, through the irradiation of infrared light (808 nm), improved the repair of fractures in the femurs of osteoporotic rats and should be considered in future clinical research.

Keywords: Laser, Osteoporosis, Femoral fracture;

LISTA DE FIGURAS

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

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

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

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

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

Figura 6 — Valores médios de BV/TV, onde (* e #) representam a diferença estatisticamente significativa entre os tempos experimentais ($p < 0.05$).

Figura 7 — Valores médios de Tb.Th, Tb.N e Tb.SP, onde não houve diferença estatisticamente significativa.

Figura 8 — Representação tridimensional dos grupos FBM e SFBM, representados de forma sequencial de tempos experimentais.

Figura 9 — Representação gráfica da Área de osso neoformado (AON), para os grupos FBM e SFBM, onde (* e #) representam a diferença estatística entre os grupos ($p < 0.05$).

Figura 10 — Imagens representativas dos grupos experimentais, na região do “gap” reparacional, FBM e SFBM, objetiva de 4x.

Figura 11 — Gráfico e fotomicrografias representativas da contagem do número de osteócitos, onde (* e #) representam a diferença estatística entre os grupos experimentais. Objetiva de 100x

Figura 12 — Imagem representativa em uma objetiva de 10x, demonstrando maior volume de tecido ósseo neoformado na região do “gap”

reparacional para o grupo FBM quando comparado a SFBM, em ambos os tempos experimentais.

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

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

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

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

LISTA DE SIGLAS

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

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	3
RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS	17
3 METODOLOGIA.....	18
3.1.1 Animais.....	18
3.1.2 Cálculo amostral.....	18
3.1.3 Ovariectomia Bilateral.....	19
3.1.4 Fraturas femorais.....	20
3.1.5 Grupos experimentais.....	22
3.1.6 Terapia de Fotobiomodulação.....	22
3.1.7 Suspensão pela cauda	23
3.2 Métodos de análises.....	24
3.2.1 Microtomografia Computadorizada (Micro-Ct).....	25
3.2.2 Processamento laboratorial para tecidos descalcificados	25
3.2.3 Análise histológica.....	26
3.2.4 Análise Imuno-histoquímica.....	26
3.3 Análise estatística	27
4 RESULTADOS	27
4.1 Microtomografia Computadorizada (Micro-Ct).....	27
4.2 Análise histológica/histométrica	29
4.3 Análise imuno-histoquímica	33
5 DISCUSSÃO	35
6 CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38
ANEXOS	42

1 INTRODUÇÃO

A fratura óssea é perda de continuidade de um osso, e pode ser dividida em um ou mais fragmentos. Este é um problema de saúde pública que atinge grande parte da população, sendo mais frequente nos homens do que nas mulheres, devido a capacidade de se envolver em atividades de risco. As causas mais comuns de traumatismo são quedas, pancadas, acidentes automobilísticos, patologias e infecções (EINHORN; GERSTENFELD, 2014).

Em resposta a fratura, o tecido ósseo tem a capacidade de se reparar ou regenerar-se. A regeneração do tecido ósseo implica em uma série de eventos celulares e moleculares coordenados, onde as células osteoprogenitoras, osteoblastos e osteoclastos desempenham papéis essenciais, juntamente com a matriz extracelular. Esses elementos são essenciais para substituir o tecido lesionado por um novo tecido ósseo saudável, restaurando assim suas propriedades mecânicas e biológicas (BORRELLI et al., 2012; DATTA et al., 2008; SATHYENDRA; DAROWISH, 2013).

Esse é um processo complexo que envolve várias etapas. Após a fratura, ocorre um hematoma e inflamação inicial no local (EINHORN et al., 2014). Seguidos pela formação de um calo ósseo composto por tecido de cartilagem e osso novo. Ao longo do tempo, esse calo é convertido em osso duro e sólido por meio da consolidação óssea (SFEIR et al., 2005). Posteriormente, ocorre a remodelação, na qual o osso é reestruturado para se adaptar às demandas biomecânicas do corpo, com osteoclastos removendo o osso extra e osteoblastos depositando novo osso conforme necessário. Esse processo pode levar várias semanas a meses para ser concluído, dependendo da gravidade da fratura (GERSTENFELD et al., 2003; MARSELL; EINHORN, 2011).

Em um estudo sobre regeneração óssea foi comprovado a importância de uma boa cicatrização, visto que as consequências do reparo óssea inadequado podem ser significativas, levando a diversas complicações, como a não união ou má união da fratura (EINHORN et al., 2014). Esses problemas podem ocorrer em detrimento de diversos fatores como a diabetes mellitus, idade avançada, tabagismo, doenças vasculares, fraturas anteriores e doenças metabólicas e autoimunes.

Uma doença metabólica crônica e progressiva é a osteoporose, uma condição insidiosa que afeta a integridade óssea, tornando-os frágeis e vulneráveis a fraturas.

Esta condição silenciosa muitas vezes passa despercebida até que ocorra uma fratura, geralmente nas áreas críticas como a coluna vertebral, quadril, fêmur e punho. Apesar de sua prevalência principalmente entre mulheres pós-menopausa, os homens também estão em risco, assim como aqueles de idade avançada. Essa doença resulta no comprometimento da formação óssea, o qual o equilíbrio entre os osteoclastos, que absorvem o tecido ósseo antigo, e os osteoblastos, que constroem o novo, é perturbado, levando a uma desproporção prejudicial. Como consequência, resulta em uma diminuição na densidade óssea e em uma microarquitetura comprometida, aumentando o risco de fraturas (AHIN K., ERGIN ON, BAYRAM S, AKGUL T., 2019).

Diante disso, os pesquisadores tem estudado terapias que auxiliam o processo de reparo do tecido ósseo, sendo a terapia fotobiomoduladora (FBM), sendo utilizada a luz para estimular processos biológicos e promover a cura em diferentes condições médicas. A FBM é uma abordagem terapêutica não medicamentosa, caracterizada por ser indolor, não invasiva e sem efeitos colaterais adversos conhecidos. Suas principais funções abrangem ação analgésica, anti-inflamatória e de regeneração tecidual. Ao transformar energia luminosa em energia química, essa terapia induz mudanças metabólicas, energéticas e funcionais nas células, promovendo assim a elevação da resistência e da vitalidade celular (FRARE JC, NICOLAU RA, 2008).

Os lasers podem ser classificados como: laser de baixa potência indicado para fins terapêuticos e laser de alta potência para procedimentos cirúrgicos. A interação do laser com os tecidos depende de vários fatores como comprimento de onda, potência, tipo de tecido e sua capacidade de absorção, frequência dos pulsos por segundo, duração dos pulsos, quantidade de energia aplicada e tempo de exposição, para cada caso exige um protocolo adequado, obtendo assim, resultados positivos (MELLO, 2001).

A FBM exerce seus efeitos benéficos no tecido através de diversos mecanismos, ao aplicar a luz sobre o tecido afetado, ela é absorvida pelas células e mitocôndrias, desencadeando uma série de reações bioquímicas e celulares. Essas incluem o aumento da produção de ATP, que é a fonte primária de energia celular, a modulação da atividade celular para promover a regeneração tecidual, a redução da inflamação por meio da regulação dos mediadores pró e anti-inflamatórios, e a promoção da cicatrização de feridas ao estimular a migração e a proliferação celular. Esses efeitos combinados resultam em uma terapia não invasiva e segura que oferece benefícios terapêuticos significativos, incluindo alívio da dor, redução da inflamação e aceleração da cicatrização de feridas (EDUARDO, CARLOS DE

PAULA, 2010).

Em fratura ósseas, o laser mais indicado é o de baixa potência com a aplicação de uma luz vermelha, com comprimento de onda na faixa de 600 a 700 nm, ou infravermelha, de 780 a 1100 nm, com o objetivo de otimizar a reparação tecidual, além de diminuir a intensidade do processo inflamatório e promover analgesia (GARCIA;THEODORO, 2020). Diante dos notáveis efeitos da FBM, vários estudos *in vitro*, *in vivo* e clínicos vem sendo realizados.

Em um estudo realizado por (SILVA, AP, 2009). , foi avaliado o efeito da radiação diodo de As-Ga –Al em osteoblastos derivados do osso obtido da sutura palatina de ratos Wistar submetidos à disfunção palatina e posterior radiação com laser e um grupo controle sem radiação, os resultados obtidos foi que o grupo com a radiação do laser teve uma atividade proliferativa acelerada em relação ao grupo controle (SILVA, AP., 2009).

Em outro estudo *in vivo*, realizado com ratas Wistar, foi comprovado que entre os grupos Irrradiados e não Irrradiados em relação à neoformação óssea, reabsorção óssea, resposta inflamatória e deposição de colágeno, evidenciou-se que os grupos tratados com Laser ou LED demonstraram melhores resultados histomorfométricos quando comparados com os grupos coágulo (SANTOS ACIOLE- 2014). Ainda, alguns estudos *in vivo* sugerem o grande potencial osteogênico, de forma que animais tratados com FBM apresentaram maior neoformação óssea e consequentemente melhor reparo ósseo em fraturas (MOSTAFAVINIA et al., 2015; SELLA et al., 2015).

Na literatura, não há um consenso estabelecido sobre os parâmetros ideais para a terapia de Fotobiomodulação (FBM). Existe uma considerável variabilidade em relação ao comprimento de onda, energia, frequência e número de aplicações observadas em diferentes estudos. Essa diversidade de abordagens reflete a complexidade do campo da fototerapia e a necessidade contínua de pesquisas para determinar os protocolos mais eficazes e seguros. Entretanto, já é estabelecido que a faixa de 760 — 850 nm de comprimento de onda apresenta melhor penetração e resposta tecidual, de forma que a sua utilização tenha melhor efeito nos tecidos (BAYAT et al., 2018).

Diante do desafio do atraso no processo de reparo ósseo e da necessidade de estabelecer parâmetros padronizados para a aplicação da Fotobiomodulação (FBM), torna-se relevante investigar seu potencial como terapia

coadjuvante na regeneração do tecido ósseo em fraturas, especialmente em modelos animais como ratas ovariectomizadas, sendo necessário mais estudos sobre o assunto.

2 OBJETIVOS

Avaliar o potencial da terapia de fotobiomodulação utilizando laser de diodo (808 nm) no reparo ósseo de fraturas femurais em ratas osteoporóticas.

A hipótese nula é de que a terapia de FBM utilizando laser em baixa intensidade não interferiria no processo de reparo do tecido ósseo.

3 METODOLOGIA

No presente estudo foram utilizadas placas do sistema 1,5mm com 4 furos, sem intermediário na sua extensão para a fixação das fraturas em fêmur de ratas. As miniplacas e parafusos foram fornecidas pela empresa Engimplan® (Engimplan - Materialise Company - Rio Claro, SP, Brasil).

3.1 Estudo *in vivo*

3.1.1 Animais

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

Para o trabalho foram selecionadas 24 ratas (*Rattus norvegicus albinus* Wistar), sendo realizado a fratura em fêmures, então o n=12 fêmures por grupo, as mesmas eram adultas, com 6 meses de idade, peso corporal variando de 250 a 300 gramas, de uma linhagem mantida no Biotério do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA) — UNESP, fornecidas pelo Biotério Central da instituição. 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, para a ração sólida.

3.1.2 Cálculo amostral

O número amostral por grupo foi realizada através do programa SigmaPlot 12.0 (Exakt Graphs and Data Analysis, San Jose, California, USA), por meio da função “Sample Size for Anova”, tendo como referência estudos prévios, os quais apresentassem desfecho primário e metodologia semelhantes. Com isso, o número amostral considerado foi o número de fêmures, utilizando diferença entre médias de 13,46, desvio padrão de 4,57 (BATISTA et al., 2015) e poder estatístico de 95%

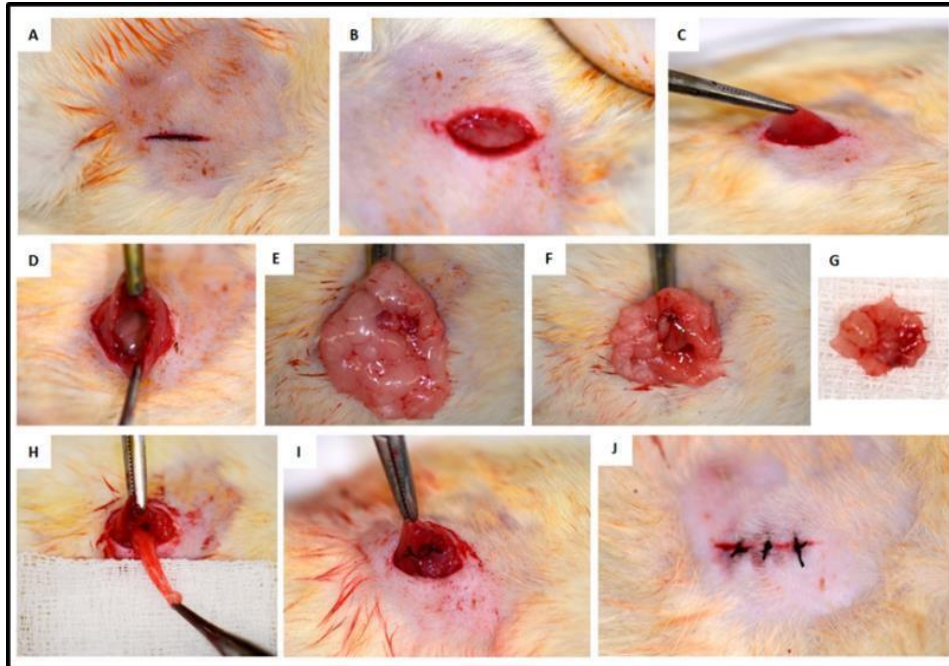
obtendo-se n=5 fêmures. Entretanto, visando o risco de perdas e complicações no desenvolvimento do projeto, foi adicionado um fêmur no número amostral, portanto, foi utilizado no mínimo n=12 por grupo (FBM e SFBM) e por período (14 e 42 dias), direcionando amostras para análises microtomográfica, histológica/histométrica e imuno-histoquímica, totalizando em 24 fêmures para FBM e 24 fêmures para SFBM.

3.1.3 Ovariectomia Bilateral

Após a ambientalização, que corresponde a 8 dias e a 2 ciclos estrais regulares (ciclo estrogênio), as ratas foram submetidas ao esfregaço vaginal, de acordo com técnica descrita em estudos prévios (DE OLIVEIRA et al., 2017; EVANS; LONG, 1922; FAVERANI et al., 2018; POLO et al., 2020; RAMALHO-FERREIRA et al., 2015a). Foi avaliada através do esfregaço, durante 8 dias, a regularidade do ciclo estral, dessa forma os animais que não tiveram a regularidade entre as fases estrais (proestro, estro, metaestro e diestro) foram desconsiderados do estudo.

Posteriormente, as ratas foram submetidas à ovariectomia bilateral (CHEN et al., 2015, 2017; RAMALHO-FERREIRA et al., 2015). Primeiro, 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. Uma incisão de 1,5 cm em ambos os flancos foi realizada, seguida de abertura por planos do tecido subcutâneo e, em seguida, do peritônio a fim de ter acesso à cavidade abdominal. Os ovários e os chifres uterinos foram localizados e laqueados com fio de Poliglactina 910 4.0 (Vicryl™ — Johnson & Johnson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos). Feito isso, foi feita a remoção dos ovários (ovariectomia). A seguir, realizou-se a sutura por planos com fio de Poliglactina 910 4.0 (Vicryl™ — Johnson & Johnson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos) (Figura 1). Estas ratas continuaram no biotério, sendo alimentadas com ração e água ad libitum durante todo o tempo experimental e foram mantidas em gaiolas que comportaram até 4 animais. A temperatura do ambiente se manteve estável ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), com ciclo de luz controlado (12 horas claro e 12 horas escuro). Passados 90 dias da indução da osteoporose as ratas foram submetidas ao procedimento de osteotomia para a confecção de fratura de fêmur.

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



3.1.4 Fraturas femorais

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

Posteriormente, foi realizada a tricotomia na porção lateral do fêmur direito ou esquerdo e, anti-sepsia da região a ser incisada com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), associado à PVPI tópico. Foi realizado uma incisão de 4 cm de comprimento na porção lateral do fêmur e assim, expondo o polo lateral do côndilo do fêmur, entre o músculo lateral e o músculo bíceps do fêmur. Para a confecção da fratura, uma serra circular com cerca de 1,5 mm de espessura foi utilizada e assim, a osteotomia foi realizada na

metáfise epifisária, distando 5 mm da cartilagem articular epifisária (ALT et al., 2013; THORMANN et al., 2014). A partir deste momento, uma placa do sistema 1,5 mm com 4 furos, sem intermediário, foi fixada, sendo uma placa convencionalmente disponível pelo mercado. A porção mais proximal da placa tinha 2 furos para serem fixados, em que foram utilizados dois parafusos do mesmo sistema, com o comprimento de 6 a 8 mm, previamente determinado pelo profundímetro, após a perfuração bicortical com parafusos do sistema (1,5 mm). Na porção mais distal da placa, mais dois parafusos (comprimento de 5 a 6 mm, determinado pelo profundímetro) foram parafusados para estabilização da fratura (POLO et al., 2021).

A irrigação com solução salina fisiológica (Fisiológico®, Laboratórios Biosintética Ltda®, Ribeirão Preto, SP, Brasil) foi realizada abundantemente durante o procedimento cirúrgico, para evitar-se o aquecimento do tecido ósseo e assim, influenciar negativamente no reparo ósseo. Após isso, os tecidos foram suturados em planos empregando-se fio absorvível (Poligalactina 910 — Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com pontos contínuos no plano profundo, e com fio monofilamentar (Nylon 4.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos no plano mais externo (Figura 2). Todas as cirurgias foram realizadas pelo mesmo operador (ED).

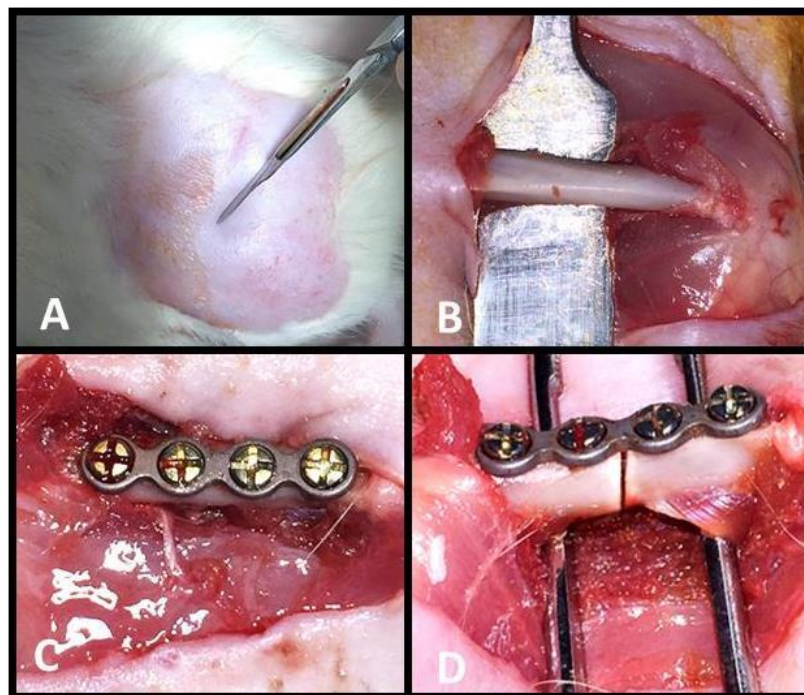


Figura 2 – Etapas cirúrgicas do procedimento cirúrgico de simulação de fratura femoral (A) Incisão na porção lateral do fêmur. (B) Exposição do fêmur. (C) Fixação prévia do fêmur com placas e parafusos do sistema 1.5 mm. (D) Osteotomia realizada para simulação de fratura femoral – aspecto final

3.1.5 Grupos experimentais

Para determinarmos os grupos experimentais foi realizado um sorteio, onde os animais foram divididos em dois grupo FBM (ratas osteoporóticas sob efeito da terapia com laser) e SFBM (ratas osteoporóticas sem fotobiomodulação), sendo assim, um envelope continha um papel com a sigla “FBM” e um outro com a sigla “SFBM”, para que, no início da cirurgia um pesquisador que está fora do procedimento cirúrgico realizasse o sorteio, e os animais foram separados aleatoriamente em seus grupos. A fotobiomodulação apresenta também efeito sistêmico, o que impossibilita a aleatorização dos fêmures, pois os animais sorteados para o grupo “FBM” devem ter os dois fêmures irradiados, evitando que houvesse alterações nos resultados.

Após a osteotomia, foram irradiados os fêmures do animais sortados para FBM, por meio do laser de diodo em baixa intensidade, ambos os fêmures passaram por esse processo, e o outro grupo não foi irradiado. No pós-operatório imediato, pela via intramuscular, foi administrada tramadol na dose de 1mg UI/kg para analgesia e, Pentabiótico na dose de 0,1 mg UI/kg como antibioticoterapia profilática.

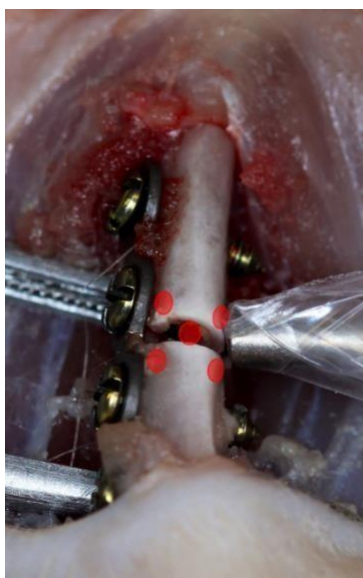
3.1.6 Terapia de Fotobiomodulação

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

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

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

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

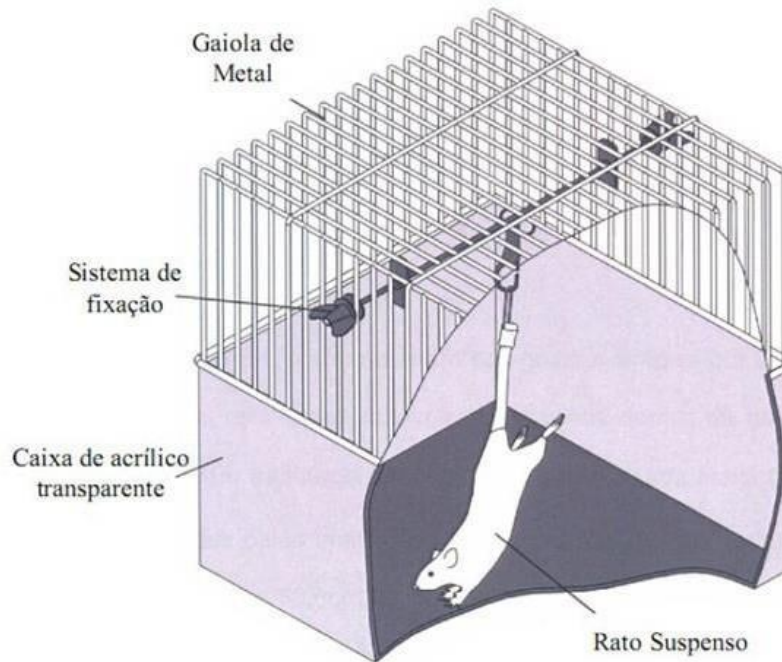


3.1.7 Suspensão pela cauda

Para garantir a imobilização das patas traseiras dos animais e evitar a fadiga das miniplacas ou a má consolidação das fraturas após as cirurgias, os animais foram suspensos pela cauda, enquanto ainda estavam sedados. Essa suspensão foi realizada utilizando uma adaptação da técnica proposta por MEIRA ET AL. (2010), que envolveu o uso de uma fita elástica adesiva (Kinesio Tape). Após posicionar a fita no animal, ela foi habilmente transformada em uma alça, permitindo sua fixação a uma presilha metálica conectada a uma barra de ferro ajustável em altura.

Para reforçar a bandagem, foram adicionados três pequenos pedaços de esparadrapo, fixados nas bordas e no centro da fita elástica adesiva presa à cauda do animal. Esse sistema de suspensão permitiu que os animais mantivessem liberdade de movimento nos membros torácicos, pois foram mantidos visualmente inclinados em aproximadamente 30 graus em relação ao assoalho da caixa. (PERES-UENO et al., 2017; VALADARES; SILVA; BATISTA VOLPON, 2004)(Figura 5).

Figura 5 – Imagem esquemática da suspensão pela cauda dos animais



3.2 Métodos de análises

Para as análises, os animais foram eutanasiados aos 14 (n=24 fêmeas) e 42 (n=24 fêmeas) dias após a cirurgia para fixação das fraturas femorais, por perfusão cardíaca. Os animais foram sedados pela mesma dosagem citada anteriormente, da combinação de quetamina e xilazina via intramuscular. A cavidade torácica foi acessada para a localização do átrio esquerdo, em que uma cânula foi inserida para recebimento contínuo de em média 500 mL de solução de formaldeído a 4%. Para o armazenamento dos fêmures, foram colocados em formol 10% para a fixação dos tecidos e posteriormente as peças foram destinadas às análises de microtomografia (tecidos mineralizados), histológica/histométrica e imunohistoquímica. Para realização das análises o pesquisador eleito foi calibrado previamente, para o adequado desenvolvimento das análises em questão, de forma a executar a análise microtomográfica, e também as análises histológica e imunohistoquímicas de maneira correta e sem qualquer viés.

3.2.1 Microtomografia Computadorizada (Micro-Ct)

Para a análise tridimensional, após a fixação em formol 10% por 48 horas, as peças foram armazenadas em álcool 70% e, primeiramente submetidas à análise por varredura de feixe de raios-X em um sistema de microtomografia digital computadorizada. As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) utilizando cortes de 5 μm de espessura (50Kv e 500 μ), com filtro de cobre e alumínio e passo de rotação de 0,3 mm. As imagens obtidas pela projeção dos raios-X nas amostras foram armazenadas e reconstituídas determinando a área de interesse pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0).

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

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

3.2.2 Processamento laboratorial para tecidos descalcificados

Após eutasiados, as peças passaram pelo processo de desmineralização, onde os fêmures com as placas e parafusos, sofreram descalcificação em EDTA (10%) por aproximadamente 8 semanas. Com a descalcificação, as placas e parafusos foram removidos. Assim, as peças foram desidratadas numa sequência crescente de álcoois (70 a 100%). Posteriormente, foi realizado a diafanização com xilol foi realizada, para posterior inclusão em parafina para obtenção de corte com 5 μm de espessura e montados em lâminas histológicas, as quais foram analisadas pela análise histológica e histométrica.

3.2.3 Análise histológica

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

3.2.4 Análise Imuno-histoquímica

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

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

Os anticorpos primários foram diluídos em tampão fosfato solução salina com 0,1% de Triton X-100 (Sigma Chemical Co.) e colocados em câmara úmida por 24 h. As secções histológicas foram incubadas com anticorpo secundário por 2 h e posteriormente tratados com estreptavidina-peroxidase conjugado por 1 h (Universal Dako Kit marcado com estreptavidina-biotina; Dako Laboratories, Carpinteria, CA, EUA). A reação foi desenvolvida usando o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina tetracloridrato (cromogênio DAB kit; Dako Laboratories) e contra-corada com hematoxilina de Harris. Para o controle

negativo foram utilizadas amostras submetidas ao referido procedimento, mas sem os anticorpos primários (STATKIEVICZ et al., 2018).

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

3.3 Análise estatística

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

4 RESULTADOS

4.1 Microtomografia Computadorizada (Micro-Ct)

Na microtomografia computadorizada foi avaliado os parâmetros de quantidade e qualidade de tecido ósseo. A partir da porcentagem de volume ósseo (BV/TV), não observou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais ($p > 0,05$), mesmo tendo um maior volume para o grupo FBM aos 42 dias em comparação a SFBM (48,22% x 45,04%) (Figura 6). Observou-se apenas a diferença estatística intragrupos quando comparado 14 dias a 42 dias ($p < 0,05$).

Figura 6 – Valores médios de BV/TV, onde (* e #) representam a diferença estatisticamente significativa entre os tempos experimentais ($p < 0.05$).

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

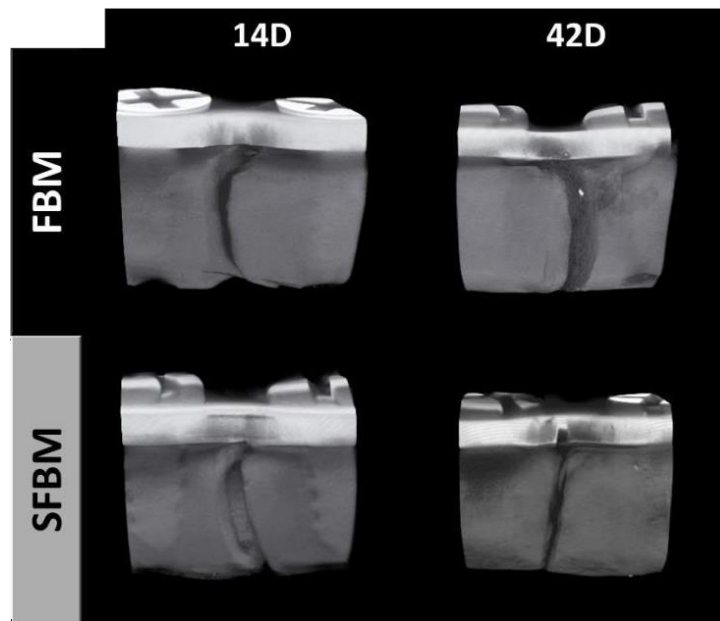
Nos demais parâmetros microtomográficos de Tb.Th, Tb.N e Tb.SP, não observou-se diferença estatística entre os grupos experimentais (Figura 7).

Figura 7 – Valores médios de Tb.Th, Tb.N e Tb.SP, onde não houve diferença estatisticamente significativa.

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

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

Figura 8 – Representação tridimensional dos grupos FBM e SFBM, representados de forma sequencial de tempos experimentais.



4.2 Análise histológica/histométrica

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

Figura 9 – Representação gráfica da Área de osso neoformado (AON), para os grupos FBM e SFBM, onde (* e #) representam a diferença estatística entre os grupos ($p < 0.05$).

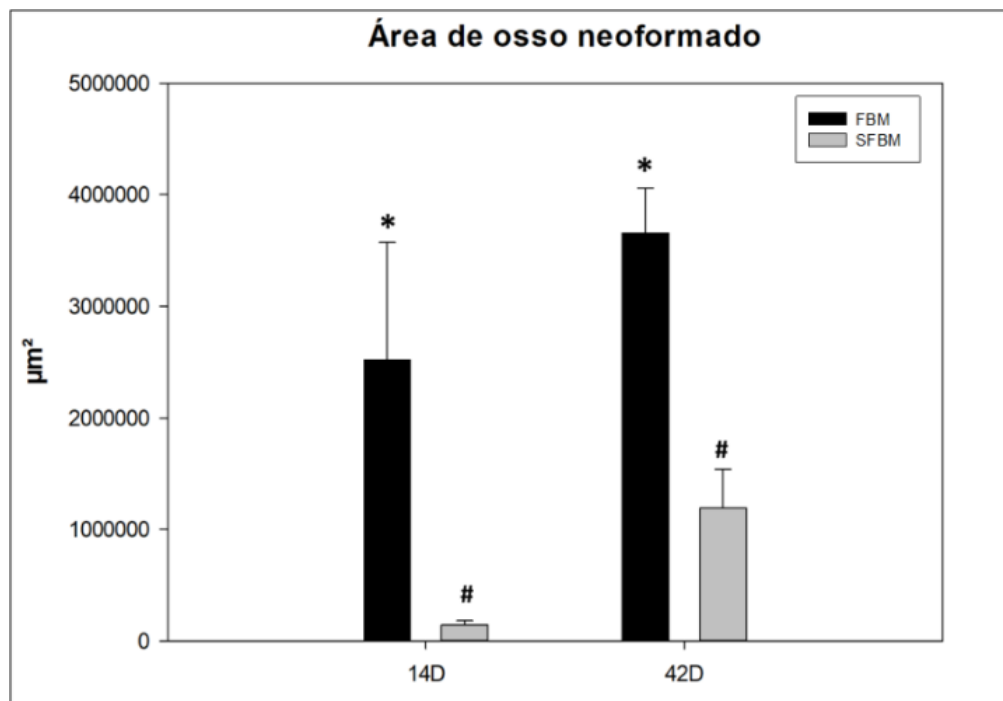


Figura 10 – Imagens representativas dos grupos experimentais, na região do “gap” reparacional, FBM e SFBM, objetiva de 4x.

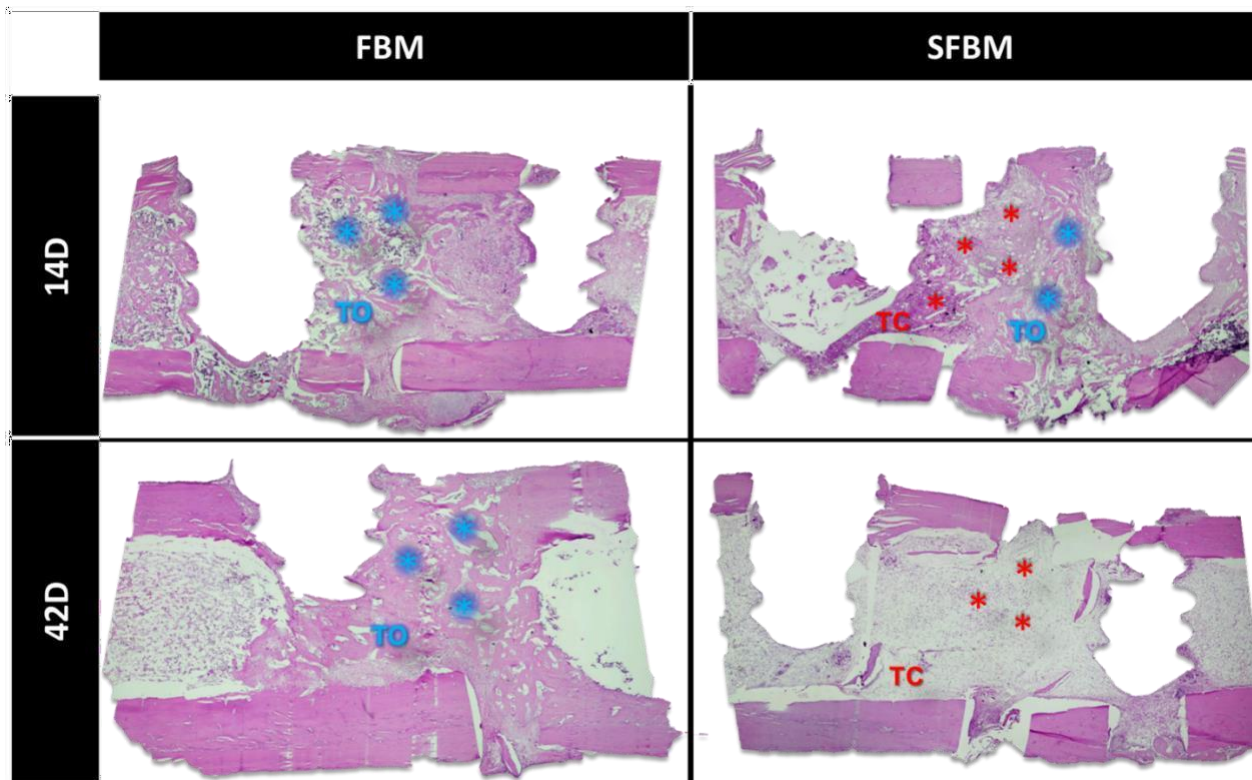
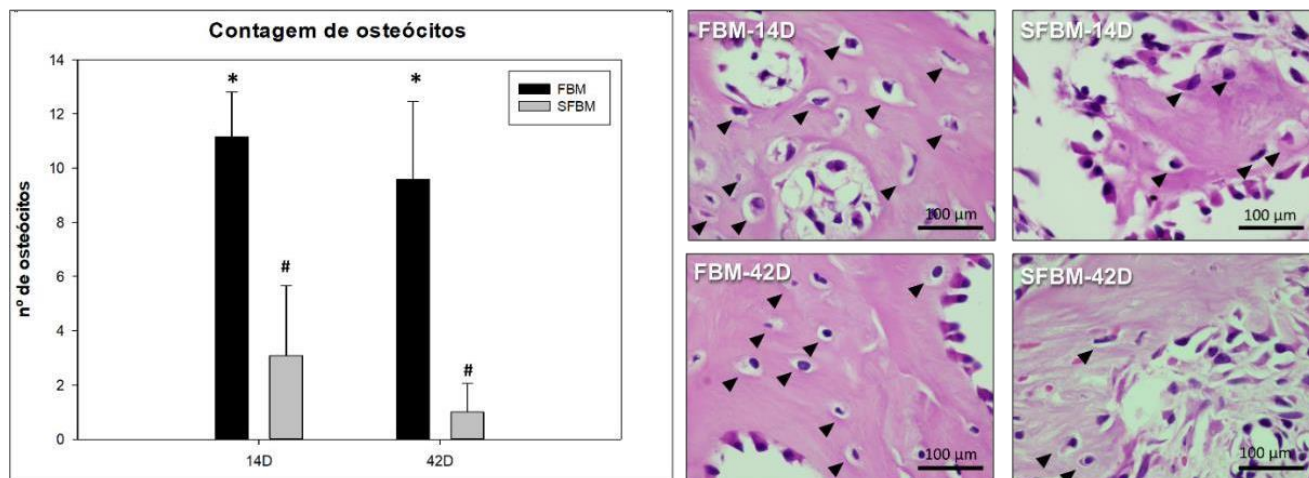
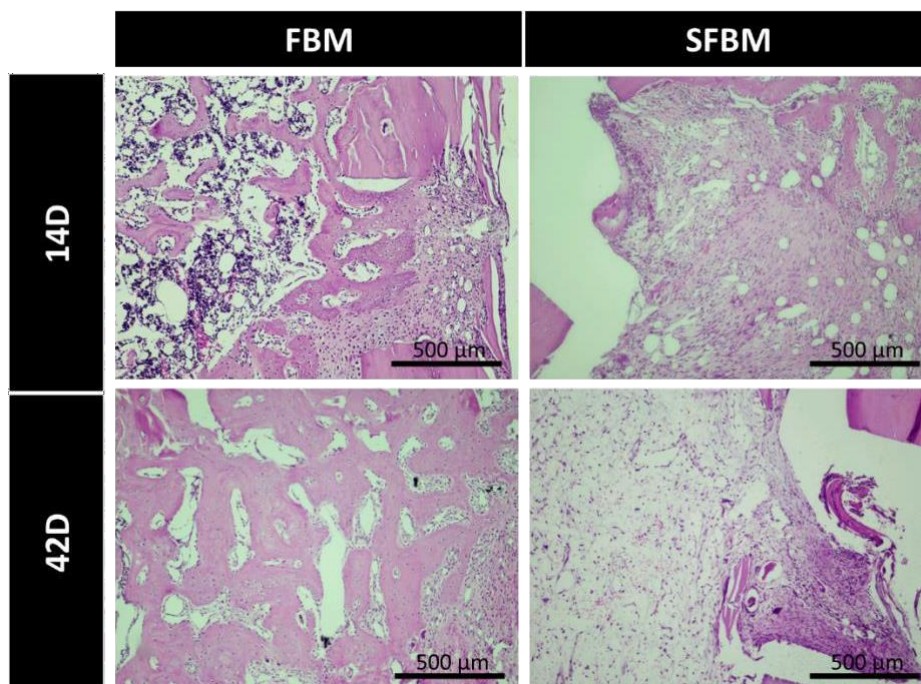


Figura 11 – Gráfico e fotomicrografias representativas da contagem do número de osteócitos, onde (* e #) representam a diferença estatística entre os grupos experimentais. Objetiva de 100x.



Pode-se observar melhor qualidade e quantidade de tecido ósseo neoformado para o grupo FBM, em comparação ao grupo SFBM, em que este apresentou extensas áreas de tecido conjuntivo, apresentando pouco preenchimento por tecido ósseo na região do “gap” reparacional (figura 12).

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



Com relação ao perfil inflamatório não foi observado para nenhum dos grupos intenso infiltrado inflamatório na intimidade dos tecidos, assim como quantidade moderada de vasos sanguíneos, porém para a área de tecido conjuntivo, observou-se maior volume para o grupo SFBM, quando comparado ao grupo FBM ($p < 0.05$). Já (Figuras 13, 14 e 15).

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

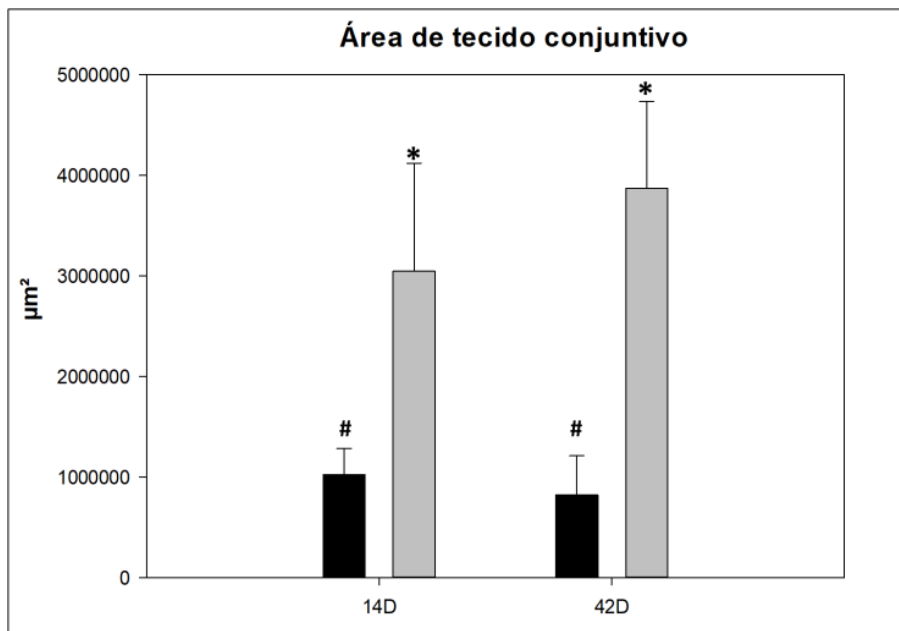


Figura 14 – Gráfico e fotomicrografias representativas da contagem de células inflamatórias. Objetiva de 100x.

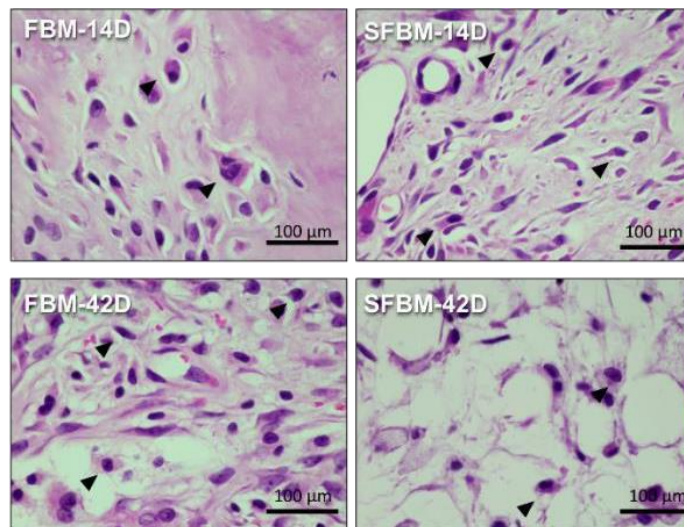
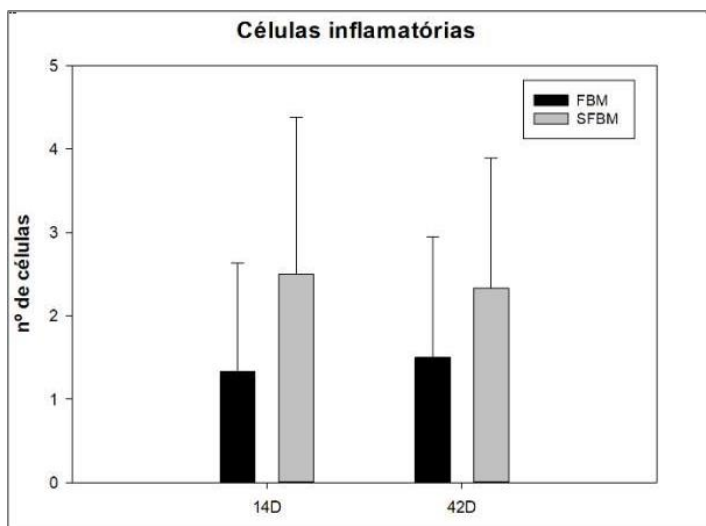
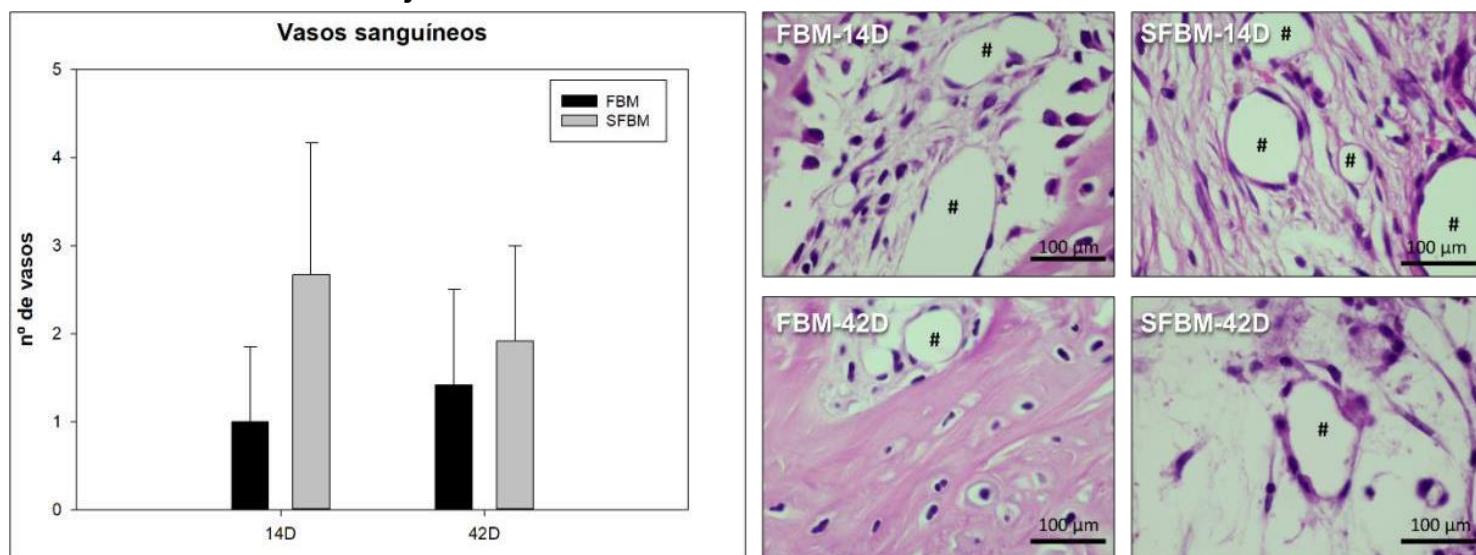


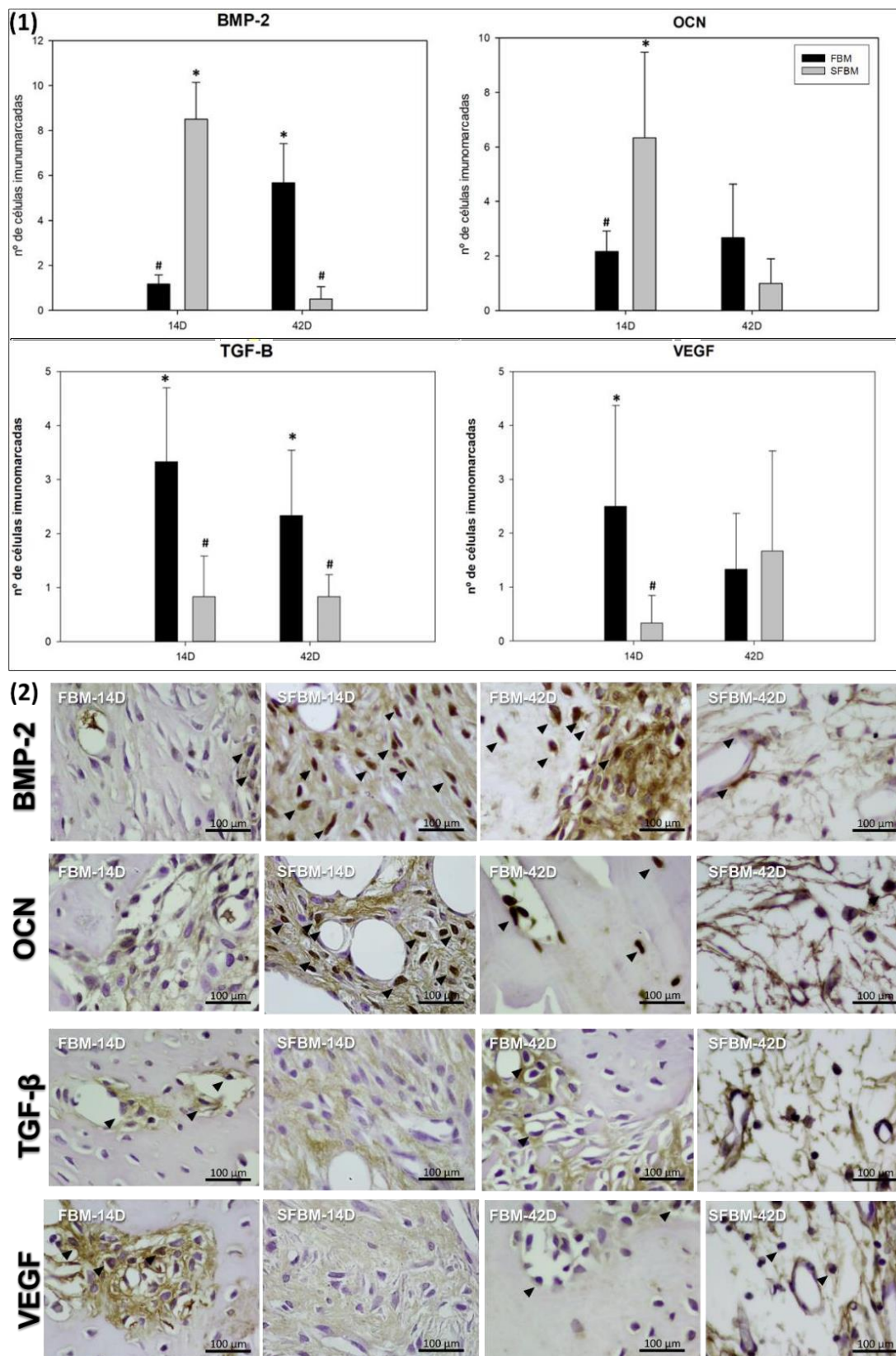
Figura 15 – Gráfico e fotomicrografias representativas da contagem de células inflamatória. Objetiva de 100x.



4.3 Análise imuno-histoquímica

Através da análise imuno-histoquímica, pode-se observar maior imunomarcção anti-BMP-2 para o grupo SFBM, em comparação ao grupo FBM, aos 14 dias, assim como o que ocorreu com a OCN ($p < 0.05$). Além disso, através na análise da expressão de TGF- β e VEGF observou-se maior imunomarcção para o grupo FBM, aos 14 dias e também aos 42 dias.

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



5 DISCUSSÃO

Frente as alterações sistêmicas como a osteoporose, que impactam na estrutura óssea, em situações de fraturas, onde há uma demanda metabólica aumentada para a reparação adequada, ocorre um aumento na ocorrência de complicações durante o reparo do tecido ósseo (ABD-ELAAL et al., 2015).

Por meio da terapia fotobiomoduladora, há uma otimização do reparo, segundo a literatura, o qual a partir da utilização do laser em baixa potência com luz vermelha (600 a 700nm) ou infravermelha (780 a 1100nm), essa terapia promove o maior recrutamento de células mesenquimais indiferenciadas, assim como células da linhagem osteoblástica, reduz o infiltrado inflamatório local diminuindo assim a intensidade do processo inflamatório local, o que fornece um microambiente adequado para que haja o reparo tecidual (GARCIA; THEODORO, 2020; HAMBLIN; DEMIDOVA, 2006).

Logo, em pacientes com osteoporose, a terapia fotobiomoduladora, pode auxiliar como uma terapia adjuvante no tratamento de fraturas, visto que o reparo certamente seria dificultado diante desta condição (LIU et al., 2013). Com os resultados deste estudo, a hipótese nula foi rejeitada, devido a superioridade no comportamento do reparo ósseo do grupo FBM em detrimento do SFBM. Com o modelo experimental exposto neste trabalho, ratas ovariectomizadas, demonstram o quão alterado pode estar a arquitetura óssea destes animais, tendo em vista o baixo volume e qualidade de tecido ósseo apresentado em todos os grupos quando analisados os parâmetros microtomográficos, tendo em visto que não foi realizado nenhum tratamento sistêmico para a condição induzida nos animais.

A análise histológica apresentou qualitativamente, assim como quantitativamente que os grupos FBM, em ambos os tempos experimentais apresentaram uma maior área de osso neoformado, e menor interposição de tecido conjuntivo, quando comparado ao grupo SFBM.

Aos 14 dias, observou-se grande vantagem para o grupo que recebeu a terapia fotobiomoduladora, de forma a demonstrar que o reparo foi acelerado em comparação ao grupo SFBM, e aos 42 dias pode-se observar o preenchimento por tecido ósseo no “gap” reparacional quase em sua totalidade para o grupo FBM, enquanto no grupo não irradiado observa-se a interposição de grande quantidade de tecido conjuntivo. Estes resultados são confirmados com o que se obteve através da análise imunohistoquímica, onde observou-se que o grupo SFBM apresentou maior imunomarcagem

de OCN e BMP-2, em comparação ao grupo FBM aos 14 dias, o que permite especular que o grupo irradiado apresentou de fato um reparo mais acelerado, uma vez que mesmo em um tempo precoce, já não apresenta a expressão significativa de marcadores que indicam a mineralização, e com o resultado histológico observa-se que este processo já ocorreu, enquanto o grupo SFBM ainda está no início do processo de calcificação.

Tendo em vista que o animal ovariectomizado, apresenta grande debilidade de sua estrutura óssea, o que certamente interfere diretamente no processo de reparo. A terapia fotobiomoduladora se demonstrou uma importante aliada na otimização do reparo ósseo em tecidos de baixa qualidade (CRONSHAW et al., 2020; GLÖSEL et al., 2010; MARCHINI; ETTINGER; HARTSHORN, 2019).

Também é importante ressaltar que a utilização de um adequado protocolo para terapia, para que a mesma possa ter a efetividade adequada. Este estudo utilizou o protocolo já estabelecido previamente, e que apresentou resultados significativos com uma única aplicação intraoperatória em fraturas femorais (POLO et al., 2021).

A literatura apresenta ainda poucos estudos, sobre a utilização da terapia fotobiomoduladora como terapia adjuvante no tratamento de fraturas, entretanto, tem-se que múltiplas aplicações pós-operatórias, somadas a aplicação intra-operatória, foram capazes de potencializar o reparo ósseo em modelos experimentais, assim como observado neste estudo, onde o protocolo definido, foi aplicado intra-operatório, e nos 8 dias subsequentes a realização da osteotomia e fixação femoral dos animais, que apresentou melhores resultados comparado a estudos prévios realizados com apenas uma aplicação intra-operatória, demonstrando que a terapia fotobiomoduladora se apresentou eficaz em todo processo de osteogênese inicial (POLO et al., 2021), aliado a isso observa-se uma maior imunomarcagem de TGF- β que demonstra maior proliferação celular mesmo no tempo mais tardio de 42 dias para o grupo FBM, indicando que a terapia fotobiomoduladora pode ter favorecido este fenômeno, que auxiliou no preenchimento do “gap” reparacional (MOSTAFAVINIA et al., 2018; RAJAEI JAFARABADI et al., 2016; SELLA et al., 2015).

Apesar de a terapia fotobiomoduladora ser eficaz quando aplicada repetidamente, observa-se que o processo de reparo ósseo eventualmente estagna, resultando em um ponto em que o laser não exerce mais sua influência de forma tão efetiva. Isso pode ser explicado pelo fato de que o laser tem maior impacto em áreas danificadas e em regiões com alterações no tecido ósseo, como na osteoporose. Em áreas em processo de reparação, as células estão em um estado metabólico mais intenso, exigindo uma maior

presença de mitocôndrias em seus citoplasmas, que são os principais alvos da fototerapia (HAMBLIN; DEMIDOVA, 2006; SELLA et al., 2015).

É relevante ressaltar as limitações deste estudo, especialmente no que diz respeito ao modelo experimental de osteotomia em fêmures de ratas ovariectomizadas. Uma questão pouco abordada em estudos semelhantes é a possibilidade de fadiga do sistema de fixação, desenvolvimento de pseudoartrose e, conseqüentemente, infecção das fraturas, resultando na perda de amostras. Antes da padronização da metodologia atual, esse padrão de complicações foi observado em muitos animais. No entanto, graças à implementação do modelo de suspensão, essas complicações foram reduzidas significativamente (MEIRA et al., 2009; PERES-UENO et al., 2017) e também a monitoração diária dos animais e verificação dos aparatos suspensórios do animal, como a Knesio Tape, utilizada para fixação da cauda dos animais, com isso foi possível manter o modelo experimental de forma satisfatória até o momento das eutanásias.

Assim, os resultados deste estudo in vivo indicam que o protocolo estabelecido é promissor, pois possibilitou a melhoria do processo de reparo ósseo em ratas ovariectomizadas, as quais frequentemente apresentam uma diminuição significativa em sua densidade mineral óssea (RAMALHO-FERREIRA et al., 2017), ou seja, um tecido ósseo de baixa qualidade, evento esse que repercute diretamente no reparo do tecido ósseo. Em conjunto a isso, sabe-se que a terapia fotobiomoduladora apresenta baixa custo, e também benefícios a longo prazo, sem causar ao organismo efeitos adicionais indesejáveis (CHANG et al., 2014), o que encoraja desenvolvimento futuro de estudos clínicos randomizados, que possibilitem o norteamento da aplicação clínica deste protocolo na reparação de fraturas.

6 CONCLUSÃO

Diante desse cenário, pode-se concluir que a terapia fotobiomoduladora em múltiplas sessões mostrou-se eficaz na melhoria do processo de reparo ósseo, inclusive acelerando a neoformação do tecido ósseo, no tratamento de fraturas femorais em ratas com osteoporose experimentalmente induzida.

REFERÊNCIAS

- ABD-ELAAL, A. Z. et al. Evaluation of the effect of low-level diode laser therapy applied during the bone consolidation period following mandibular distraction osteogenesis in the human. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 44, n. 8, p. 989–997, 1 ago. 2015.
- ABRAMOVITCH-GOTTLIB, L. et al. Low level laser irradiation stimulates osteogenic phenotype of mesenchymal stem cells seeded on a three-dimensional biomatrix. **Lasers in medical science**, v. 20, n. 3–4, p. 138–146, dez. 2005.
- AHIN K., ERGIN ON., BARYRAM S., AKGUL T. Atypical femoral fractures related to bisphosphonate use: a comprehensive review of 19 patients. **Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.** 2019;25(6):603-10.
- ALT, V. et al. A new metaphyseal bone defect model in osteoporotic rats to study biomaterials for the enhancement of bone healing in osteoporotic fractures. **Acta biomaterialia**, v. 9, n. 6, p. 7035–7042, 2013.
- AMAROLI, A. et al. The Effects of Photobiomodulation of 808 nm Diode Laser Therapy at Higher Fluence on the in Vitro Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells. **Frontiers in physiology**, v. 9, n. FEB, 23 fev. 2018.
- BATISTA, J. D. et al. Low-level laser therapy on bone repair: is there any effect outside the irradiated field? **Lasers in medical science**, v. 30, n. 5, p. 1569–1574, 22 jul. 2015.
- BAYAT, M. et al. Comparison of effects of LLLT and LIPUS on fracture healing in animal models and patients: A systematic review. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 132, p. 3–22, 1 jan. 2018.
- BENETTI, F. et al. In vivo analysis of the presence of heme oxygenase-1, transcription factor Jun-D and CD90+/CD73+/CD105+/CD45- cells in the pulp of bleached teeth. **International endodontic journal**, v. 52, n. 12, p. 1723–1737, 1 dez. 2019.
- BORRELLI, J. et al. Physiological challenges of bone repair. **Journal of orthopaedic trauma**, v. 26, n. 12, p. 708–711, dez. 2012.
- BOUXSEIN, M. L. et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 7, p. 1468–1486, jul. 2010.
- BRITEÑO-VÁZQUEZ, M. et al. Low power laser stimulation of the bone consolidation in tibial fractures of rats: a radiologic and histopathological analysis. **Lasers in medical science**, v. 30, n. 1, p. 333–338, 1 jan. 2015.
- CHANG, W. D. et al. Therapeutic outcomes of low-level laser therapy for closed bone fracture in the human wrist and hand. **Photomedicine and laser surgery**, v. 32, n. 4, p. 212–218, 1 abr. 2014.
- CHEN, J. et al. Gelatin microspheres containing calcitonin gene-related peptide or substance P repair bone defects in osteoporotic rabbits. **Biotechnology letters**, v. 39, n. 3, p. 465–472, 1 mar. 2017.

- CHEN, X. et al. Effect of Bone Mineral Density on Rotator Cuff Tear: An Osteoporotic Rabbit Model. **PloS one**, v. 10, n. 10, 14 out. 2015.
- CINTRA, L. T. A. et al. Evaluation of an experimental rat model for comparative studies of bleaching agents. **Journal of applied oral science : revista FOB**, v. 24, n. 2, p. 171–80, 1 abr. 2016.
- CLAES, L.; RECKNAGEL, S.; IGNATIUS, A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. **Nature reviews. Rheumatology**, v. 8, n. 3, p. 133–143, mar. 2012.
- CRONSHAW, M. et al. Photobiomodulation Dose Parameters in Dentistry: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Dentistry journal**, v. 8, n. 4, 1 dez. 2020.
- DATTA, H. K. et al. The cell biology of bone metabolism. **Journal of clinical pathology**, v. 61, n. 5, p. 577–587, maio 2008.
- DE OLIVEIRA, D. et al. Short term sodium alendronate administration improves the peri-implant bone quality in osteoporotic animals. **Journal of applied oral science : revista FOB**, v. 25, n. 1, p. 42–52, 1 jan. 2017.
- EDUARDO, CARLOS DE PAULA. **Laser na odontologia**. Série 3. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
- EINHORN, T. A.; GERSTENFELD, L. C. Fracture healing: mechanisms and interventions. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 11, n. 1, p. 45–54, 30 set. 2014
- EVANS, H. M.; LONG, J. A. Characteristic Effects upon Growth, Oestrus and Ovulation Induced by the Intraperitoneal Administration of Fresh Anterior Hypophyseal Substance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 8, n. 3, p. 38–39, mar. 1922.
- GARCIA, V. G.; THEODORO, L. H. **Lasers na odontologia: uma visão clínica baseada em evidências Científicas**. São Paulo: Ed. Santos, 2020.
- GERSTENFELD, L. C.; CHO, T.J.; KON, T.; et al. Impaired fracture healing in the absence of TNF-alpha signaling: the role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption. **Journal of Bone and Mineral Research**, Boston, v.18, n. 9, p. 1584-92, 2003.
- FAVERANI, L. P. et al. Raloxifene but not alendronate can compensate the impaired osseointegration in osteoporotic rats. **Clinical oral investigations**, v. 22, n. 1, p. 255– 265, 1 jan. 2018.
- FRARE JC., NICOLAU RA,. Clinical analysis of the effect of laser photobiomodulation (GaAs — 904 nm) on temporomandibular joint dysfunction. **Rev Bras Fisioter**. 2008;12(1):37-42.
- GIANNOUDIS, P. et al. Fracture healing in osteoporotic fractures: Is it really different?. A basic science perspective. **Injury**, v. 38, n. SUPPL. 1, mar. 2007.
- GLÖSEL, B. et al. Review of Dental Implant Rat Research Models Simulating Osteoporosis or Diabetes. **The International journal of oral & maxillofacial implants**, v. 25, p. 516–524, jan. 2010.
- HAMBLIN, M. R.; DEMIDOVA, T. N. Mechanisms of low level light therapy.

Mechanisms for Low-Light Therapy, v. 6140, p. 614001, 9 fev. 2006.

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

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

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

LOPES, C. B.; PINHEIRO, A. L. B.; SATHAIAH, S.; et al. Infrared laser photobiomodulation (830nm) on bone tissue around dental implants: A raman spectroscopy and Scanning Eletronic Microscopy study in rabbits. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 25, n. 2, p. 96-101, 2007

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

MARSELL, R.; EINHORN, T.A. The biology of fracture healing. **Injury**, v. 42, n.6, p. 551-5, 2011.

MEIRA, P. S. et al. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA DO REPARO ÓSSEO EM TÍBIAS OSTEOTOMIZADAS DE RATOS (*Rattus novergicus albinus*), SUBMETIDAS A TRATAMENTO COM ULTRASSOM, FRENTE À PRESENÇA E AUSÊNCIA DE CARGA, 2009.

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

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

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

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

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

PINHEIRO, A. L. B.; SOARES, L. G. P.; BARBOSA, A. F. S. et al. Does LED phototherapy influence the repair of bone defects grafted with MTA, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration? A description of the repair process on rodents. **Lasers in Medical Science**, v. 27, n. 5, p. 1013-24, 2012^a.

PINHEIRO, A. L. B.; SANTOS, N. R. S.; OLIVEIRA, P. C.; et al. The efficacy of the use of IR laser phototherapy associated to biphasic ceramic graft and guided bone

regeneration on surgical fractures treated with miniplates: a Raman spectral study on rabbits. *Lasers in Medical Science*, v. 28, n. 2, p. 513–518, 2013.

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

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

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

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

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

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

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

SANTOS ACIOLE, JOUBER MATEUS. Avaliação da Fotobiomodulação Laser/LED em defeito ósseo no fêmur de ratas osteoporóticas: estudo histológico, histomorfométrico e por espectroscopia Raman em modelo animal. **Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba e Universidade Federal da Bahia**, 2014.

SFEIR, C. Fracture Repair. **Bone regeneration and repair**. Lieberman JR, Friedlaender GE, editors. Totowa, 2005.

SILVA, ANA PAULA. Estudo in vitro dos efeitos do laser de baixa potência nas células osteoblásticas derivadas da sutura palatina de ratos após expansão rápida da maxila. Ribeirão Preto, 2009

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

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

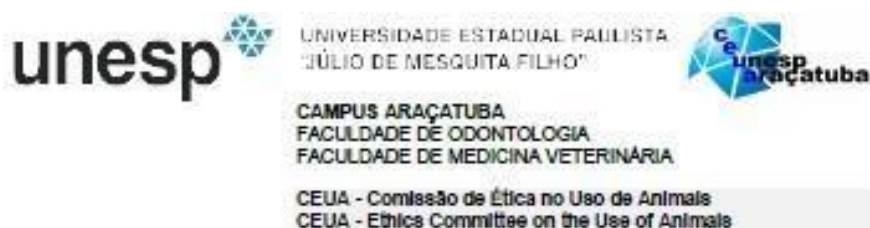
THORMANN, U. et al. Differences of bone healing in metaphyseal defect fractures between osteoporotic and physiological bone in rats. **Injury**, v. 45, n. 3, p. 487–493, mar. 2014.

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

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

ANEXOS

ANEXO A - Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Anim



CERTIFICADO

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

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 31 de Agosto de 2023.

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

CERTIFICATE

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

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: August 31, 2023.

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

Prof. Associado João Carlos Callera
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator