

**Programa de Mestrado Interdisciplinar em Interações Estruturais**  
**e**  
**Funcionais na Reabilitação**

EFEITOS DA TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO NO PROCESSO DE REPARO  
DE DEFEITOS ÓSSEOS PREENCHIDOS POR HIDROXIAPATITA- FOSFATO  
TRICÁLCICO (QalyBone BCP) ASSOCIADO AO BIOPOLÍMERO DE FIBRINA

**CARLOS HENRIQUE BERTONI REIS**

**Mestrando**

**PROFA. DRA. DANIELA VIEIRA BUCHAIM**

**Orientadora**

Marília  
2020



Associação de Ensino de Marília Ltda.

---

Campus Universitário - Fone:(014) 2105-4000 - Fax: (014) 2105-8691 - CEP: 17.525-902 - Marília - SP.

## CARLOS HENRIQUE BERTONI REIS

EFEITOS DA TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO NO PROCESSO DE REPARO DE DEFEITOS ÓSSEOS PREENCHIDOS POR HIDROXIAPATITA- FOSFATO TRICÁLCICO (QalyBone BCP) ASSOCIADO AO BIOPOLÍMERO DE FIBRINA

Dissertação apresentada a Universidade de Marília (UNIMAR) para obtenção do título de Mestre em Interações Estruturais e Funcionais na Reabilitação, do Programa Interdisciplinar em Interações Estruturais e Funcionais na Reabilitação.

**Orientadora: Profa. Dra. Daniela Vieira Buchaim**

**Coorientadora: Profa. Dra. Karina Torres Pomini Rocha**

Marília  
2020

Associação de Ensino de Marília Ltda.

---

Campus Universitário - Fone:(014) 2105-4000 - Fax: (014) 2105-8691 - CEP: 17.525-902 - Marília - SP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura: Carlos Henrique Bertoni Reis

Data:

Protocolo CEUA:  
011/2019

Reis, Carlos Henrique Bertoni

Efeitos da terapia por fotobiomodulação no processo de reparo de defeitos ósseos preenchidos por hidroxiapatita – fosfato tricálcico (QualyBone BCP) associado ao biopolímero de fibrina / Carlos Henrique Bertoni Reis. - Marília: UNIMAR, 2020.

71f.

Dissertação (Mestrado Interdisciplinar em Interações Estruturais e Funcionais na Reabilitação – Reabilitação do Sistema Estomatognático) – Universidade de Marília, Marília, 2020.

Orientação: Profa. Dra. Daniela Vieira Buchaim

1. Adesivo Tecidual de Fibrina    2. Biomateriais    3. Lasers  
4. Regeneração Óssea I. Reis, Carlos Henrique Bertoni

CDD – 617.643

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

CARLOS HENRIQUE BERTONI REIS

EFEITOS DA TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO NO PROCESSO DE REPARO DE DEFEITOS ÓSSEOS PREENCHIDOS POR HIDROXIAPATITA- FOSFATO TRICÁLCICO (QualyBone BCP) associado ao biopolímero de fibrina

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Interações Estruturais e Funcionais na Reabilitação da Universidade de Marília para obtenção do título de Mestre em Interações Estruturais e Funcionais na Reabilitação, na área de concentração Bases Estruturais e Funcionais da Reabilitação.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Vieira Buchaim

Aprovado em: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

---

Coordenação do Programa de Mestrado em Interações Estruturais e Funcionais na Reabilitação

Considerações

---

---

---

---

---

Associação de Ensino de Marília Ltda.



Associação de Ensino de Marília Ltda.

---

Campus Universitário - Fone:(014) 2105-4000 - Fax: (014) 2105-8691 - CEP: 17.525-902 - Marília - SP.

**DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho a toda a minha família, especialmente aos meus pais Décio e Silvia, meu pai minha inspiração enquanto Médico e pessoa, eles sempre acreditaram no meu potencial e contribuíram para essa conquista. Amo muito vocês.

Dedico também aos meus filhos Júlia e Henrique, que compreenderam os momentos de minha ausência. A minha esposa Márcia, com muito amor, carinho e gratidão, que sempre foi uma grande companheira e sempre me apoiou e me deu força para concluir o trabalho.



Associação de Ensino de Marília Ltda.

---

Campus Universitário - Fone:(014) 2105-4000 - Fax: (014) 2105-8691 - CEP: 17.525-902 - Marília - SP.





## **AGRADECIMENTOS**

Expresso minha gratidão a todos os professores do Programa da Pós-Graduação da Universidade de Marília por todo o apoio e ensinamentos durante o curso. Deixo aqui um agradecimento especial ao Coordenador, Doutor Rogério Buchaim pela amizade, empenho e dedicação com a Pós-Graduação.

A minha querida orientadora, Doutora Daniela V. Buchaim que tanto ajudou para que este trabalho fosse realizado com êxito, meu muito obrigado e o meu reconhecimento pela competência ímpar da minha orientadora, você tornou um sonho realidade; aqui eu me comprometo, a partir de todo conhecimento compartilhado por você e todos os excelentes docentes, durante esse trabalho, continuar fazendo diferença no caminhar da docência médica e quem sabe servir de exemplo para alguns, assim como vocês professores e doutores foram para mim nessa pós graduação

Agradeço ainda a minha coorientadora Profa. Dra. Karina Torres Pomini Rocha, por toda ajuda e colaboração.

Aos acadêmicos que ajudaram na execução da parte experimental deste trabalho, Abdul Latife Hamzé, Renata Maria de Camargo Eugênio, Giovanna de Souza Garcia, Camila Pereira de Jesus, Eder Mercadante e Isabella Vasconcelos Zattiti e todos os funcionários de Pós-Graduação da Universidade de Marília, a minha escola de hoje e sempre onde tudo começou.

Associação de Ensino de Marília Ltda.



Associação de Ensino de Marília Ltda.

---

Campus Universitário - Fone:(014) 2105-4000 - Fax: (014) 2105-8691 - CEP: 17.525-902 - Marília - SP.

**AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS**

Ao Dr. Márcio Mesquita Serva, Magnífico Reitor da Universidade de Marília;

A Profa. Regina Lúcia Ottaiano Losasso Serva, Magnífica Vice-reitora da Universidade de Marília;

A Profa. Dra. Fernanda Mesquita Serva, Digníssima Pró-reitora de Pesquisa, Pós-graduação e Ação Comunitária da Universidade de Marília;

Ao Sr. Marco Antonio Teixeira, Digníssimo Pró-reitor Administrativo da Universidade de Marília;

Ao Prof. José Roberto Marques de Castro, Digníssimo Pró-reitor de Graduação da Universidade de Marília;

A Dra. Márcia Mesquita Serva Reis, Diretora Superintendente do Hospital Beneficente UNIMAR;

A Profa. Dra. Maria Elizabeth da Silva Hernandes Correa, Diretora de Ensino e Pesquisa do Hospital Beneficente UNIMAR;

Ao Prof. Dr. José Pedro Trevisan Novaretti, Diretor Clínico do Hospital Beneficente UNIMAR;

Aos docentes do Programa de Mestrado em Interações Estruturais e Funcionais na Reabilitação;

As secretárias da Pós-graduação Thaís Helena Camprubi Brunetti e Andréa dos Santos Infante Hermínio;

Aos técnicos de laboratório da Universidade de Marília, em especial ao servidor técnico-administrativo Cirilo Francisco dos Santos Neto (Histologia);

A todos do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP/UNESP – Botucatu SP), em especial ao Prof. Dr. Benedito Barraviera e Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Júnior;

A empresa QualyLive pela doação do biomaterial, em especial a Rose e Yolete.

Meus sinceros agradecimentos a todos!

Associação de Ensino de Marília Ltda.

---



Associação de Ensino de Marília Ltda.

---

Campus Universitário - Fone:(014) 2105-4000 - Fax: (014) 2105-8691 - CEP: 17.525-902 - Marília - SP.

**EFEITOS DA TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO NO PROCESSO DE REPARO DE DEFEITOS ÓSSEOS PREENCHIDOS POR HIDROXIAPATITA-FOSFATO TRICÁLCICO (QUALYBONE BCP) ASSOCIADO AO BIOPOLÍMERO DE FIBRINA.****RESUMO**

Atualmente existem diversos métodos de tratamentos disponíveis envolvidos no processo de reparação óssea. Porém, a eficácia torna-se limitada diante de defeitos ósseos críticos. O objetivo da presente pesquisa foi avaliar se a terapia por fotobiomodulação, por meio do uso do laser de baixa potência, interfere no processo de reparo de defeitos ósseos preenchidos pelo biomaterial QualyBone BCP (QualyLive, Amadora, Portugal) associado ao biopolímero de fibrina. Foram utilizados 56 ratos que foram separados aleatoriamente em dois grupos: Grupo Biomaterial (GB; n=07); Grupo Biomaterial + Cevap (GBC; n=07); Grupo Biomaterial + Laser (GBL; n=07) e Grupo Biomaterial + Cevap + Laser (GBCL; n=07). Os ratos foram submetidos a uma osteotomia circular de 5mm de diâmetro no centro dos ossos parietais, preenchida com enxerto ósseo de hidroxiapatita fosfato tricálcico (QualyBone BCP, QualyLive) associado ao biopolímero de fibrina. Após os procedimentos cirúrgicos, os animais do grupo GBCL receberam a aplicação do laser GaAlAs (Gallium-Aluminum-Arsenide, Laserpulse Ibramed®, Amparo, SP, Brasil) de pulso contínuo, comprimento de onda de 830 nm, 30 mW de potência de saída, densidade de energia de 6 J/cm<sup>2</sup>, por 24 segundos/local, no pós-operatório imediato e 3 vezes na semana até os períodos de eutanásia, que foram 14 e 42 dias. Na análise histomorfológica, aos 42 dias, o grupo GBCL exibiu uma transição de maturação mais avançada, com áreas ósseas mais organizadas e maduras, formando lamelas concêntricas. Na comparação dos grupos nos dois períodos de experimentação, em relação ao percentual de formação de novo tecido ósseo, encontrou-se diferença estatística entre todos os grupos GB (5.42 ± 1.12), GBC (5.00 ± 0.94), GBL (12.65 ± 1.78), GBCL (12.65 ± 2.32) e GB (21.49 ± 4.74), GBC (21.77 ± 2.83), GBL (29.29 ± 2.93) e GBCL (31.38 ± 2.89); valores dos períodos de 14 e 42 dias, respectivamente. Em conclusão, a terapia por fotobiomodulação, por meio do uso do laser de baixa potência, interferiu positivamente no processo de reparo de defeitos ósseos preenchido com o biocomplexo formado pelo biopolímero de fibrina + biomaterial (QualyBone BCP).

Palavras-chaves: Regeneração Óssea; Lasers; Transplante Ósseo; Biomateriais, Adesivo Tecidual de Fibrina.

Associação de Ensino de Marília Ltda.



Associação de Ensino de Marília Ltda.

---

Campus Universitário - Fone:(014) 2105-4000 - Fax: (014) 2105-8691 - CEP: 17.525-902 - Marília - SP.

**EFFECTS OF THE PHOTOBIMODULATION THERAPY ON THE PROCESS OF BONE DEFECTS REPAIR FILLED WITH HYDROXYAPATITE TRICALCIUM PHOSPHATE (QUALYBONE BCP) ASSOCIATED WITH THE FIBRIN BIOPOLYMER.****ABSTRACT**

There are currently several treatment methods available that are involved in the bone repair process. However, the effectiveness becomes limited in the face of critical bone defects. The objective of this research was to evaluate whether photobiomodulation therapy, through the use of low-level laser, interferes in the process of repairing bone defects filled by the QualyBone biomaterial - BCP (QualyLive, Amadora, Portugal) associated with fibrin biopolymer. 56 rats were used, which were randomly separated into two groups: Biomaterial Group (GB; n = 07); Biomaterial + Cevap Group (GBC; n = 07); Biomaterial + Laser Group (GBL; n = 07) and Biomaterial + Cevap + Laser Group (GBCL; n = 07). The rats were submitted to a circular osteotomy of 5 mm in diameter in the center of the parietal bones, filled with bone graft of hydroxyapatite tricalcium phosphate (QualyBone BCP, QualyLive) associated with the fibrin biopolymer. After the surgical procedures, the animals of the GBCL group received the application of the continuous pulse GaAlAs (Gallium-Aluminum-Arsenide, Laserpulse Ibramed®, Amparo, SP, Brazil), 830 nm wavelength, 30 mW output power, energy density of 6 J / cm<sup>2</sup>, for 24 seconds / location, in the immediate postoperative period and 3 times a week until the euthanasia periods, which were 14 and 42 days. In the histomorphological analysis, at 42 days, the GBCL group exhibited a more advanced maturation transition, with more organized and mature bone areas, forming concentric lamellae. In the comparison of the groups in the two experimentation periods, in relation to the percentage of formation of new bone tissue, a statistical difference was found between all groups GB (5.42 ± 1.12), GBC (5.00 ± 0.94), GBL (12.65 ± 1.78), GBCL (12.65 ± 2.32) and GB (21.49 ± 4.74), GBC (21.77 ± 2.83), GBL (29.29 ± 2.93) and GBCL (31.38 ± 2.89); values for periods of 14 and 42 days, respectively. In conclusion, photobiomodulation therapy, through the use of low-level laser, positively interfered in the process of repairing bone defects filled with the biocomplex formed by the fibrin + biomaterial biopolymer (QualyBone BCP).

Keywords: Bone regeneration; Lasers; Bone Transplantation; Biomaterials, Fibrin Tissue Adhesive.



Associação de Ensino de Marília Ltda.

---

Campus Universitário - Fone:(014) 2105-4000 - Fax: (014) 2105-8691 - CEP: 17.525-902 - Marília - SP.



**LISTA DE ILUSTRAÇÕES****FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Delineamento Experimental.....	26
<b>Figura 2.</b> Imagens microtomográfica reconstruídas bidimensionais (2D) .....	36
<b>Figura 3.</b> Vistas histológicas panorâmicas em 14 e 42 dias.....	37
<b>Figura 4.</b> Detalhes da evolução do processo de reparo ósseo dos defeitos cranianos aos 14 dias.....	38
<b>Figura 5.</b> Detalhes da evolução do processo de reparo ósseo dos defeitos cranianos aos 42 dias.....	39
<b>Figura 6.</b> Percentual de formação de novo osso no período de 14 dias.....	41
<b>Figura 7.</b> Percentual de biomaterial no período de 14 dias.....	42
<b>Figura 8.</b> Percentual de tecido conjuntivo no período de 14 dias.....	44
<b>Figura 9.</b> Percentual de formação de novo osso no período de 42 dias.....	45
<b>Figura 10.</b> Percentual de biomaterial no período de 42 dias.....	46
<b>Figura 11.</b> Percentual de tecido conjuntivo no período de 42 dias.....	48
<b>Figura 12.</b> Percentual de formação de novo osso nos períodos de 14 e 42 dias.....	49
<b>Figura 13.</b> Percentual de biomaterial nos períodos de 14 e 42 dias.....	50
<b>Figura 14.</b> Percentual de tecido conjuntivo nos períodos de 14 e 42 dias.....	51



Associação de Ensino de Marília Ltda.

---

Campus Universitário - Fone:(014) 2105-4000 - Fax: (014) 2105-8691 - CEP: 17.525-902 - Marília - SP.

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Parâmetros do Protocolo da Fotobiomodulação por laser de baixa potência.....	28
<b>Tabela 2.</b> Formação de novo osso no período de 14 dias.....	40
<b>Tabela 3.</b> Biomaterial no período de 14 dias.....	41
<b>Tabela 4.</b> Tecido conjuntivo no período de 14 dias.....	43
<b>Tabela 5.</b> Formação de novo osso no período de 42 dias.....	44
<b>Tabela 6.</b> Biomaterial no período de 42 dias.....	45
<b>Tabela 7.</b> Tecido conjuntivo no período de 42 dias.....	47
<b>Tabela 8.</b> Formação de novo osso no período de 14 e 42 dias.....	48
<b>Tabela 9.</b> Biomaterial no período de 14 e 42 dias.....	49
<b>Tabela 10.</b> Tecido conjuntivo no período de 14 e 42 dias.....	51



Associação de Ensino de Marília Ltda.

---

Campus Universitário - Fone:(014) 2105-4000 - Fax: (014) 2105-8691 - CEP: 17.525-902 - Marília - SP.

**SUMÁRIO**

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos Específicos .....	19
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
3.1 Delineamento experimental .....	23
3.2 Cirurgia experimental .....	23
3.3 Biomaterial.....	26
3.4 Biopolímero de Fibrina.....	27
3.5 Terapia por Fotobiomodulação com o uso do Laser de Baixa Potência.....	27
3.6 Procedimento cirúrgico para coleta dos tecidos.....	29
3.7 Microtomografia Computadorizada de Raios-X (micro-CT).....	29
3.8 Processamento histológico.....	30
3.9 Análise Histomorfométrica dos defeitos corados pela HE e Tricrômico de Masson.....	31
3.9.1 Análise estatística.....	32
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
4.1 Análise qualitativa das imagens microtomográfica bidimensionais.....	35
4.2 Análise Histomorfológica.....	36
4.3 Análise Histomorfométrica.....	40
4.3.1 Período de 14 dias.....	40
4.3.2 Período de 42 dias.....	44
4.3.3 Comparação dos Grupos nos dois períodos de experimentação (14x42 dias).....	48
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>67</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>73</b>



Associação de Ensino de Marília Ltda.

---

Campus Universitário - Fone:(014) 2105-4000 - Fax: (014) 2105-8691 - CEP: 17.525-902 - Marília - SP.



# ***INTRODUÇÃO***

Associação de Ensino de Marília Ltda.

---

Campus Universitário - Fone:(014) 2105-4000 - Fax: (014) 2105-8691 - CEP: 17.525-902 - Marília - SP.



Associação de Ensino de Marília Ltda.

---

Campus Universitário - Fone:(014) 2105-4000 - Fax: (014) 2105-8691 - CEP: 17.525-902 - Marília - SP.



## 1. INTRODUÇÃO

A Engenharia tecidual, atualmente, desenvolve pesquisas investigando diversos métodos de tratamentos disponíveis envolvidos no processo de regeneração óssea, tais como diferenciação de células tronco, xenoenxertos, utilização de membranas, associados a terapias alternativas, que buscam a redução do tempo de uma recuperação tecidual eficaz (DE MORAES et al., 2019; DE AZEVEDO E SOUSA MUNHOZ et al., 2020), visando a formação de um novo tecido com as características morfofuncionais idênticas ao tecido original, reforçando o potencial das pesquisas pré-clínicas. Porém, a efetividade torna-se limitada diante de defeitos ósseos críticos, sendo os efeitos colaterais desfavoráveis nesse processo (ABOU NEEL et al., 2014).

O enxerto ósseo é o segundo transplante de tecido mais realizado, seguido da transfusão sanguínea (WANG; YEUNG, 2017). O enxerto ósseo autólogo ainda é considerado o padrão-ouro, pois as propriedades necessárias e ideais na regeneração óssea em termos de osteocondução, osteoindução e osteogênese estão presentes e são combinadas (GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005; GIANNOUDIS; JONES; EINHORN, 2011), contudo sua disponibilidade limitada e a morbidade no local doador levaram ao desenvolvimento de procedimentos alternativos (RAI et al., 2015).

O emprego dos biomateriais nas áreas da medicina e odontologia vem assumindo uma importância cada vez maior, conforme a necessidade de reparar zonas com defeitos ou perdas ósseas, devido ao comprometimento da morfologia, função e reparação dos tecidos biológicos (TREVISIOL et al., 2007; BUCHAIM et al., 2013). Assim, um substituto ósseo ideal deve apresentar características importantes como liberação de fatores de crescimento que estimulem a neoformação óssea, promovendo um arcabouço para o crescimento tecidual interno.

O biomaterial QvalyBone BCP (Hidroxiapatita Fosfato Tricálcico, Amadora, Portugal) é uma cerâmica sintética, contendo 75% de hidroxiapatita e 25% fosfato tricálcico (B-TCP), que apresenta uma macroporosidade facilitando a proliferação de células ósseas e vascularização nos espaços vazios, além de uma excelente resistência mecânica, induzindo a regeneração e o crescimento ósseo, estimulando a proliferação e diferenciação dos osteoblastos. Além disso,

Associação de Ensino de Marília Ltda.



não existe risco imunológico e de infecções, é um material radiopaco e de fácil manipulação clínica, fato que permite a redução do tempo de cirurgia.

No campo da engenharia tecidual é necessária a utilização de um arcabouço biológico, *scaffold* que simule o defeito ósseo e que mantenha os mecanismos funcionais para a regeneração dos tecidos até que os mesmos apresentem essa capacidade. Assim, diversos biomateriais são utilizados para a confecção desses arcabouços biológicos, como cerâmicas de fosfato de cálcio, moléculas bioativas, polímeros naturais (colágenos, proteoglicanas, elastinas e hidroxiapatitas) e, entre eles, os adesivos de fibrina são utilizados em diferentes campos cirúrgicos como agentes hemostáticos e indutores de processo de cicatrização, sendo assim considerado *scaffold* por vários autores, em razão de servir como arcabouço e /ou ancoragem para fixação e crescimento celular (YAMADA et al., 2003).

Os princípios biológicos dos adesivos de fibrina mimetizam os últimos passos da cascata de coagulação, que ocorre normalmente no organismo, ou seja, o fibrinogênio interage com a trombina e libera uma fibrina monomérica, que na presença do fator XIII e do cálcio transforma esta fibrina em polimérica por meio de diversas pontes (WEISEL, 2005; BUCHAIM et al., 2019)

O biopolímero de fibrina derivado do veneno de serpente foi desenvolvido no Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP/UNESP, Botucatu, SP, Brasil). Apresenta fácil acesso e custo de produção baixo, visto que a tecnologia é totalmente nacional, além de não produzir reações adversas por não conter sangue humano, sendo muito utilizado como coadjuvante em inúmeros cenários clínicos. Esse biopolímero atua como um substrato para crescimento de células e mostra biocompatibilidade total, fato demonstrado por estudos em animais com resultados promissores, possibilitando a adequação da fórmula para adaptar o tempo de polimerização à técnica cirúrgica, bem como o controle do tempo de degradação do arcabouço (RAHAL et al., 2004; BARROS et al., 2009; IATECOLA et al., 2013)

Ainda nesse contexto, alternativas têm sido desenvolvidas e investigadas com o objetivo de minimizar o tempo de consolidação óssea e de diminuir a chance de possíveis complicações

Associação de Ensino de Marília Ltda.

---



advindas do processo deficiente de regeneração. Dentre elas, a terapia por fotobiomodulação ganhou destaque pelos seus efeitos satisfatórios no metabolismo e no reparo ósseo, devido a seu grande potencial osteogênico (BAYAT et al., 2018).

Os efeitos fotobioestimulatórios do laser estão diretamente relacionados com as respostas celulares que apresentam suas atividades aceleradas resultando em aumento da respiração mitocondrial e síntese de ATP, otimização na síntese de proteínas, na migração e proliferação de células, além de redução inflamatória, diminuição de edema, proporcionando um processo de cicatrização e regeneração óssea mais rápido e eficaz (AMAROLI et al., 2018).

Além disso, a terapia por fotobiomodulação constitui um método de tratamento não-invasivo e apresenta um custo relativamente baixo. No entanto, existem controvérsias em relação aos melhores parâmetros a serem utilizados para a obtenção de um resultado eficaz no processo de reparo ósseo extenso preenchido com biomateriais.

Diante das informações descritas e do conhecimento de estudos na literatura que buscam uma padronização dos protocolos e avaliação dos efeitos da terapia por fotobiomodulação no processo de reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico preenchidos com o QalyBone BCP (QalyLive, Amadora, Portugal) associado ao biopolímero de fibrina (CEVAP) como *scaffold*, o desenvolvimento deste trabalho justifica-se pela necessidade de estabelecer um protocolo experimental adequado no processo de regeneração óssea e que seja incorporado como avanço científico-tecnológico dentro da medicina translacional.





## ***OBJETIVOS***

Associação de Ensino de Marília Ltda.

---

Campus Universitário - Fone:(014) 2105-4000 - Fax: (014) 2105-8691 - CEP: 17.525-902 - Marília - SP.





## **2. OBJETIVOS**

### 2.1. Objetivo Geral

O objetivo desse trabalho foi avaliar se a terapia por fotobiomodulação, por meio do uso do laser de baixa potência, interfere no processo de reparo de defeitos ósseos preenchidos pelo biomaterial QalyBone BCP (QalyLive, Amadora, Portugal) associado ao biopolímero de fibrina (CEVAP).

### 2.2. Objetivos Específicos

- 1- Avaliar a atuação do QalyBone BCP no processo de reparo tecidual;
- 2- Avaliar a atuação do QalyBone BCP no processo de reparo tecidual associado a terapia por fotobiomodulação;
- 3- Avaliar o biopolímero de fibrina como sistema de armação (*scaffolds*) para o biomaterial;
- 4- Avaliar um protocolo da terapia por fotobiomodulação sobre o biocomplexo (biopolímero de fibrina + biomaterial).







# ***MATERIAIS E MÉTODOS***

Associação de Ensino de Marília Ltda.

---

Campus Universitário - Fone:(014) 2105-4000 - Fax: (014) 2105-8691 - CEP: 17.525-902 - Marília - SP.





### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Delineamento experimental**

Foram utilizados 56 ratos machos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, adultos (90 dias de idade), pesando aproximadamente 250 gramas (Figura 1 B1), fornecidos pelo Biotério Central da Universidade de Marília, aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade de Marília (Protocolo 011/2019).

No Biotério, os animais foram criados em gaiolas contendo 04 animais cada, uso de iluminação artificial comandada por “timer”, que controla o ciclo claro/escuro de 12 horas, exaustor e ar condicionado, que mantém a temperatura média de 22°C, confirmada por um termômetro de temperatura ambiente.

Os animais foram separados aleatoriamente em 4 grupos, e os períodos de eutanásia definidos para 14 e 42 dias (Figura 1 E):

- 1) Grupo Biomaterial (GB; n=07)
- 2) Grupo Biomaterial + Cevap (GBC; n=07)
- 3) Grupo Biomaterial + fotobiomodulação a Laser (GBL; n=07)
- 4) Grupo Biomaterial + Cevap + fotobiomodulação a Laser (GBCL; n=07)

#### **3.2. Cirurgia experimental**

Para a cirurgia experimental, os ratos foram submetidos à anestesia geral com injeção intramuscular de Cloridrato de Tiletamina e Cloridrato de Zolazepam (10 mg/kg - Telazol®; Fort Dodge Laboratories, USA) e os procedimentos foram acompanhados por um profissional da área de Medicina Veterinária.



---

## UNIVERSIDADE DE MARÍLIA

Em seguida, foi realizada a tricotomia, com auxílio de aparador de pelos (Philips® Multigroom QG3250, SP, Brasil) na região do osso frontal - parietal, compreendida entre os pavilhões auriculares externos e os animais pesados em balança (MicroNal® Equipamentos de Precisão, SP, Brasil). Cada animal foi identificado com furos nos pavilhões auriculares externos com auxílio de alicate perfurador Ainsworth® (Golgran, SP, Brasil).

A antissepsia da região tricotomizada, incluindo a pelagem em torno dessa área, foi realizada com solução tópica de Polivinil Pirrolidona Iodo PVPI (Povidine® Antisséptico, Vic Pharma Ind e Comércio Ltda, SP, Brasil) a 10%. O procedimento cirúrgico ocorreu de forma independente, sobre uma bancada coberta, em mesa de madeira revestida de cortiça com troca de material para cada indivíduo.

Os animais foram fixados à mesa operatória, sem trauma, e posicionados em decúbito ventral. Na sequência, foi realizada uma incisão em forma de meia lua de 4 cm com uma lâmina de bisturi de aço carbono nº 15 (Embramax, SP, Brasil) no tegumento e, cuidadosamente, o periósteo foi descolado com auxílio do sindesmótomo e rebatido juntamente com os demais tecidos, expondo a superfície externa dos ossos parietais (Figura 1 B2).

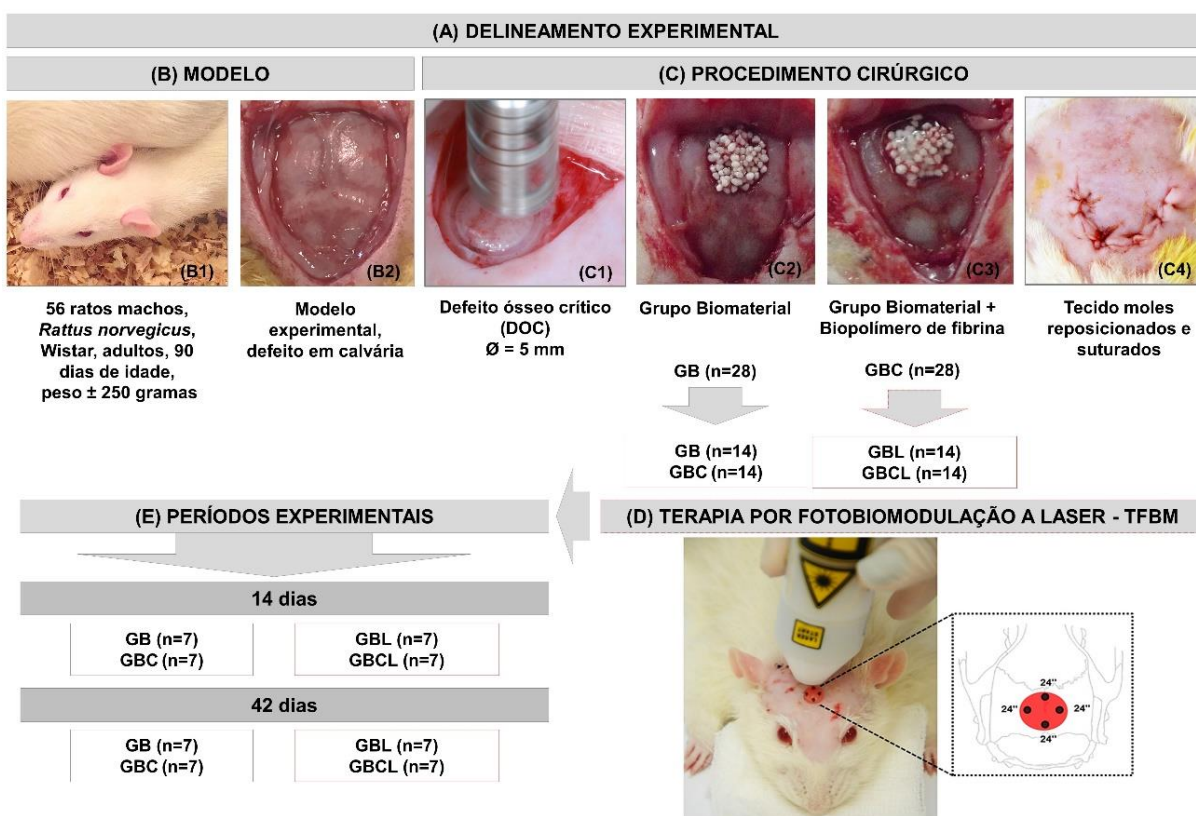
Foi realizada uma osteotomia circular de 5,0 mm de diâmetro no centro dos ossos parietais (Figura 1 C1), com o auxílio da broca trefina (Neodent®, PR, Brasil) adaptada ao contra-ângulo (Driller, SP, Brasil) acoplado em um micromotor elétrico (Driller BLM 600 baby, SP, Brasil), em baixa velocidade (1500 rpm), sob constante e abundante irrigação salina estéril (solução fisiológica 0,9%) para evitar a necrose óssea por ação térmica, obtendo assim, um fragmento ósseo arredondado, sem espículas, preservando a integridade da dura-máter e o cérebro.

Nos animais do Grupo GB, o defeito foi preenchido somente com o biomaterial (Figura 1 C2) QualyBone BCP (QualyLive, Amadora, Portugal) e, nos animais dos Grupos GBC e GBCL, os defeitos foram preenchidos com o biomaterial QualyBone BCP (QualyLive,



## UNIVERSIDADE DE MARÍLIA

Amadora, Portugal) associado ao biopolímero de fibrina (Figura 1 C3). O biomaterial foi pesado em balança analítica (MicroNal<sup>®</sup> Equipamentos de Precisão, SP, Brasil) para se obter um peso de aproximadamente 0,03 mg e inserido ao local do defeito sem exercer pressão sobre o cérebro. Os tecidos da área cirúrgica foram reposicionados (Figura 1 C4), cuidando para que o perióstio recubra as cavidades, e em seguida foi efetuada a sutura do tegumento (pontos simples) com fio de seda 4-0 (Ethicon, Johnson e Johnson Company, SP, Brasil). A região foi limpa cuidadosamente com gaze umedecida em antisséptico tóxico, Clorexidina 2% (Riohex<sup>®</sup> Farmacêutica Rioquímica Ltda, Brasil).



Associação de Ensino de Marília Ltda.

Campus Universitário - Fone:(014) 2105-4000 - Fax: (014) 2105-8691 - CEP: 17.525-902 - Marília - SP.



**Figura 1** – A) Delineamento experimental. B) Modelo animal e critérios de inclusão; B1) 56 ratos machos, *Rattus norvegicus*, Wistar, adultos, 90 dias de idade, peso aproximadamente  $\pm 250$  gramas; B2) Modelo experimental de defeito ósseo em calvária, exposição dos ossos parietais; C) Procedimento cirúrgico. C1) Confeção de defeito ósseo de 5 mm de diâmetro com broca trefina; C2) Defeito preenchido com biomaterial (GB); C3) Defeito preenchido com biomaterial e biopolímero de fibrina (GBC); C4) Tecido moles subrajacentes reposicionados e suturados. D) Ilustração da terapia por fotobiomodulação a laser no pós-imediato, seguido por 3 x na semana até o período de eutanásia correspondente dos grupos GBL e GBCL. E) Períodos experimentais 14 e 42 dias - 7 animais/grupo/período.

Os animais foram colocados na posição de decúbito lateral em gaiolas e expostos à luz incandescente para aquecimento e completa recuperação anestésica. Imediatamente após os procedimentos cirúrgicos, os animais receberam antibiótico em dose única Flotril® 2,5% (Schering-Plough, Rio de Janeiro, Brasil), na dose de 0,2 ml/kg e analgésico Dipirona Analgex V® (Agener União, São Paulo, Brasil) na dose de 0,06 ml/kg, em aplicações intramusculares. A aplicação do analgésico foi mantida por 3 dias, além da continuidade com o analgésico Paracetamol (Medicamento Genérico, Medley, SP, Brasil) na dose de 200 mg/Kg, 6 gotas/animal dissolvido na água disponível no bebedouro até o período da eutanásia.

Durante toda a experimentação, os animais foram monitorados com relação à expressão de dor, por meio de observação se o animal estava apático, deprimido, agressivo ou hiper excitado, principalmente devido a tais traços que são variáveis de seu comportamento habitual. Portanto, foi observado se ocorreram alterações no andar, na postura ou expressão facial. Além disso, foi averiguada a aparência, consumo de água e alimento, sintomas clínicos e comportamento (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2006).

### 3.3. Biomaterial

O biomaterial QuallyBone BCP (Hidroxiapatita Fosfato Tricálcico, QuallyLive Amadora, Portugal) é uma cerâmica sintética, contendo 75% de hidroxiapatita e 25% fosfato tricálcico (B-TCP), apresenta uma macroporosidade facilitando a proliferação de células ósseas e vascularização nos espaços vazios, além de uma excelente resistência mecânica, induzindo a

Associação de Ensino de Marília Ltda.

---



---

## UNIVERSIDADE DE MARÍLIA

regeneração e o crescimento ósseo, estimulando a proliferação e diferenciação dos osteoblastos. Além disso, não existe risco imunológico e de infecções, é um material radiopaco e permite a redução do tempo clínico de cirurgia.

### 3.4 Biopolímero de fibrina

O biopolímero de fibrina, derivado de veneno de serpente, foi gentilmente cedido pelo Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos da UNESP (CEVAP), cujos componentes e fórmula de aplicação constam das suas patentes (Números do registro: BR1020140114327 e BR1020140114360).

O biopolímero é composto por três soluções separadas e homogêneas antes de sua aplicação, totalizando 40 $\mu$ l. O primeiro componente é a fração 1 composta de trombina-like (10 $\mu$ l), adicionada ao diluente cloreto de cálcio (10 $\mu$ l) e, por último, a fração 2 constituída de fibrinogênio de sangue de búfalo (20 $\mu$ l).

Para aplicação em cada animal dos grupos GBC e GBCL os componentes do biopolímero foram depositados em eppendorf, de acordo com a proporção de cada componente. Para cada solução aplicada foi realizada a troca da ponteira da micropipeta.

### 3.5 Terapia por Fotobiomodulação com o uso do Laser de Baixa Potência

Os Grupos GBL e GBCL foram submetidos ao tratamento com laser GaAIAs (gallium-aluminum-arsenide). Para o tratamento, os animais foram imobilizados manualmente (contenção manual suave) para garantir a exposição da calvária, sendo desnecessário o uso de anestésico durante a aplicação.




---

**UNIVERSIDADE DE MARÍLIA**

O protocolo da fotobiomodulação por laser de baixa potência foi de pulso contínuo, com comprimento de onda ( $\lambda$ ) 830 nm, potência de saída 30 mW, densidade de energia 6,20J/cm<sup>2</sup>, por 24 seg/local aplicado em 4 pontos em forma de cruz sobre o sítio cirúrgico, área do feixe de 0,116 cm<sup>2</sup> e densidade de potência 0,2581W/cm<sup>2</sup> (Tabela 1). O emissor de laser foi mantido em contato com a pele do animal a 90°, perfazendo um total de aplicação de 96 segundos (figura 2). O tratamento teve início no pós-operatório imediato (Figura 1 D) e 3 vezes na semana até o período correspondente à eutanásia. As emissões do feixe de laser foram calibradas no próprio aparelho (Laserpulse®, IBRAMED). O protocolo foi o mesmo preconizado por (DE OLIVEIRA GONÇALVES et al., 2016).

**Tabela 1** - Parâmetros do Protocolo da Fotobiomodulação por laser de baixa potência.

<b>PARÂMETROS DO PROTOCOLO POR PONTO DE APLICAÇÃO</b>	
<b>Comprimento de onda</b>	<b>380nm</b>
<b>Potência de saída</b>	<b>30mW</b>
<b>Densidade de energia</b>	<b>6,20 J/cm<sup>2</sup></b>
<b>Área do feixe</b>	<b>0,116 cm<sup>2</sup></b>
<b>Densidade de potência</b>	<b>0,2586 W/cm<sup>2</sup></b>
<b>Tempo</b>	<b>24 seg/ponto</b>
<b>Pontos</b>	<b>4 pontos (cruz)</b>





### 3.6 Procedimento cirúrgico para coleta dos tecidos

Decorridos os períodos de 14 e 42 dias pós-cirúrgicos, 7 animais de cada grupo GB, GBC, GBL e GBCL, por período, foram pesados e submetidos à eutanásia. Após a realização de paramentação, a eutanásia foi realizada em ambiente silencioso e longe dos outros animais. Foi utilizado o Barbitúrico (Tiopental), dosagem ratos (150mg/kg) da seguinte forma: Tiopental Sódico 2,5%, por via intraperitoneal - IP, aplicado no quadrante abdominal inferior esquerdo do animal (associado com anestésico local, cloridrato de lidocaína na dosagem de 10 mg/kg).

Em seguida, a região do defeito de cada animal foi cuidadosamente removida com auxílio de uma broca carbide cirúrgica cônica odontológica, montada em peça de baixa rotação (Dabi Atlante<sup>®</sup>, SP, Brasil), preservando os tecidos moles suprapariosteais e fixadas em solução de formalina 10% em tampão fosfato pH 7,2 por uma semana e, posteriormente, destinada ao processamento histológico.

Após a confirmação da morte do animal, este foi acondicionado em saco branco de resíduo biológico, congelado e enviado para descarte.

### 3.7 Microtomografia Computadorizada de Raios-X (m-CT)

Após a fixação dos fragmentos ósseos, as peças foram submetidas a uma varredura de feixe de raios-X no microtomógrafo computadorizado SkyScan 1174v2 (Bruker-microCT, Kontich, Bélgica) da Faculdade de Odontologia de Bauru, FOB-USP. As fontes de feixe raios-X (Cone-Beam) foi operada a 50 kV, 800 uA, utilizando um filtro de Cu + Al. As peças foram acondicionadas em tubos, posicionadas e fixadas no porta-amostra apropriado para o equipamento, com cera utilidade, possibilitando a estabilização, a fim de prevenir qualquer tipo de movimentação durante o escaneamento. Em seguida, foram rotacionadas a 360°, com um



“*rotation step*” de 0,5, e resolução isotrópica de 19,6  $\mu\text{m}$ , gerando um tempo de aquisição de 41 minutos e 32 segundos por amostra.

As imagens de cada espécime foram analisadas e reconstituídas com o software específico 64Bits270013 (Bruker, Bélgica) e o Programa NRecon<sup>®</sup> (versão.1.6.8.0, SkyScan, 2011, Bruker-microCT) em cerca de 1000 a 1100 fatias de acordo com os parâmetros anatômicos adotados. Os softwares Data Viewer<sup>®</sup> versão 1.4.4 64 bit (medidas lineares dos eixos coronal, transaxial e sagital) e CTvox<sup>®</sup> versão 2.4.0 r868, Bruker Micro CT, foram utilizados para avisualização bidimensional e tridimensional respectivamente e, em seguida, as análises qualitativa e quantitativa do tecido ósseo neoformado.

### 3.8 Processamento histológico

Após a coleta, as peças foram lavadas em água corrente por 24 horas e submetidas à desmineralização em solução de EDTA, solução contendo 4,13% de tritiplex<sup>®</sup> III (Merck KGaA, Hessen, Alemanha) e 0,44% de hidróxido de sódio (Labsynth, SP, Brasil) com trocas semanais da solução por um período aproximado de 40 dias. Durante esses intervalos de troca do EDTA, foram realizadas análises radiográficas com filme periapical Insight adulto IP-21 F-Speed - Carestream<sup>®</sup> (Carestream Health, Nova York, Estados Unidos) para confirmar o processo de desmineralização. Após a completa desmineralização, as peças foram desidratadas em série crescente de álcool etílico, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina processada Histosec<sup>®</sup> (Merck, Hessen, Alemanha).

Posteriormente foram efetuados cortes coronais, semisseriados, considerando a região central do defeito com auxílio do micrótomo semiautomático Leica<sup>®</sup> RM2245 (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha). Foram feitos cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espessura (6 lâminas com 4 cortes cada) para coloração hematoxilina-eosina e tricrômico de Masson.



---

## UNIVERSIDADE DE MARÍLIA

Para a descrição histomorfológica das áreas do defeito ósseo, em todos os espécimes foi considerada toda extensão do defeito, para avaliar o padrão de reparo ósseo em todos os grupos.

Assim, foi possível analisar, em cada defeito, a presença de tecido de granulação, infiltrado inflamatório, a presença e a qualidade do osso imaturo ou maduro/lamelar e o grau de preenchimento do tecido neoformado. Para isso, foram avaliados 4 cortes semisseriados do leito cirúrgico de cada defeito em um microscópio de luz Olympus® (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) e as fotografias foram capturadas em objetivas 4x e 40x com a câmera digital acoplada, utilizando o software de captura de imagem com as especificações de tamanho de imagem 4080x3072 pixels e spot 30%. A análise quantitativa das imagens foi realizada no computador (Processador Pentium Core 2 Duo; Intel Corporation, Santa Clara, CA, USA) utilizando o software Image J® 1.50d (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA, Java 1.7\_67; 64-bit).

### 3.9 Análise Histomorfométrica dos defeitos

Para a descrição histomorfológica das áreas do defeito ósseo, em todos os espécimes, foi considerada toda extensão do defeito, para avaliar o padrão de reparo ósseo associado ao biocomplexo (biopolímero de fibrina + biomaterial) e a fotobiomodulação. Assim, foi possível analisar em cada defeito quantitativamente o percentual de formação de novo osso, de biomaterial e tecido conjuntivo. Para isso, foram avaliados 5 cortes semisseriados do leito cirúrgico de cada defeito em um microscópio de luz Olympus BX50 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) e as fotografias capturadas em objetivas 4x e 40x com a câmera digital acoplada (Olympus DP 71, Tokyo, Japan).

A análise quantitativa das imagens foi realizada no computador (Processador Pentium Core 2 Duo; Intel Corporation, Santa Clara, CA, USA) utilizando o Carl Zeiss AxioVision (Rel. 4.8.2 White Plains, NY, USA). Dos cortes semisseriados obtidos, dois cortes mais centrais do

Associação de Ensino de Marília Ltda.

---



defeito com distância entre eles de 300  $\mu\text{m}$  foram capturados. A área total do bloco ósseo removido ou área total do defeito ( $A_T$ ) e a área de formação de novo osso ( $A_{NO}$ ) de cada defeito serão determinadas. O percentual de tecido ósseo neoformado ( $P_{ON}$ ) foi calculado pela seguinte relação:  $PON = A_{NO} \times 100/A_T$ .

### 3.9.1 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) visando detectar possíveis diferenças entre os grupos. Os pressupostos da ANOVA, normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias foram verificados, respectivamente, pelos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, ambos a 5% de probabilidade. Posteriormente, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dentro de cada tratamento, a comparação da formação de novos ossos em função do período de tratamento (14 e 42 dias) foi avaliada por meio do teste t-Student a 5% de probabilidade. Todas as análises foram conduzidas no software R (R Core Team, 2019). R Core Team (2019). (R: A language and environment for statistical computing R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).



# ***RESULTADOS***

Associação de Ensino de Marília Ltda.

---

Campus Universitário - Fone:(014) 2105-4000 - Fax: (014) 2105-8691 - CEP: 17.525-902 - Marília - SP.

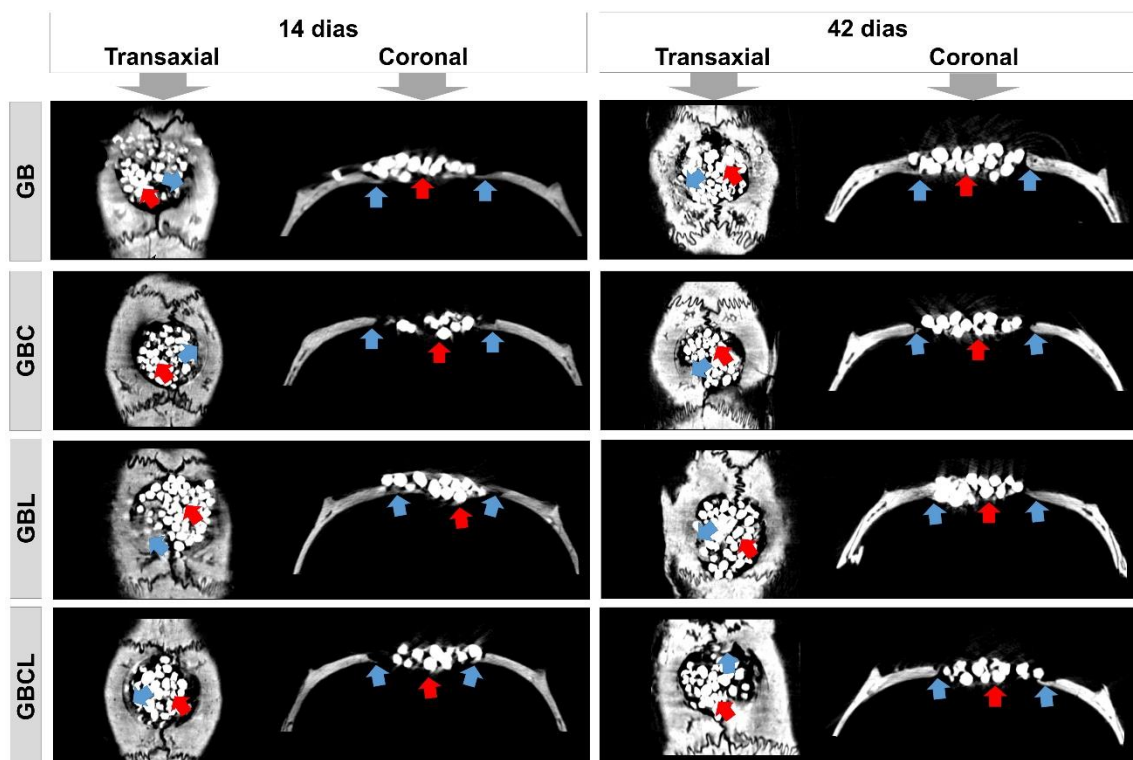




## 4. RESULTADOS

### 4.1 Análise qualitativa das imagens microtomográficas bidimensionais

Aos 14 dias, as imagens microtomográficas bidimensionais, transaxiais e coronais demonstraram, em todos os grupos experimentais, um padrão centrípeto de formação óssea, evidenciado pelo aumento da graduação da densidade do tecido ósseo na escala de cinza nas áreas periféricas do defeito ósseo. As partículas do biomaterial apresentaram-se entrelaçadas com trabéculas ósseas imaturas (Figura 2).



Associação de Ensino de Marília Ltda.

Campus Universitário - Fone:(014) 2105-4000 - Fax: (014) 2105-8691 - CEP: 17.525-902 - Marília - SP.



**Figura 2** - Imagens microtomográficas reconstruídas bidimensionais (2D) em secções transaxial e coronal de defeitos ósseos em calvária de ratos nos períodos de 14 e 42 dias, respectivamente. Defeito preenchido com biomaterial (GB), biomaterial mais biopolímero de fibrina heterólogo (GBC), biomaterial e bioestimulados a laser (GBL), biomaterial mais biopolímero de fibrina heterólogo e bioestimulados a laser (GBCL). Formação óssea (seta azul), partículas do biomaterial (seta vermelha).

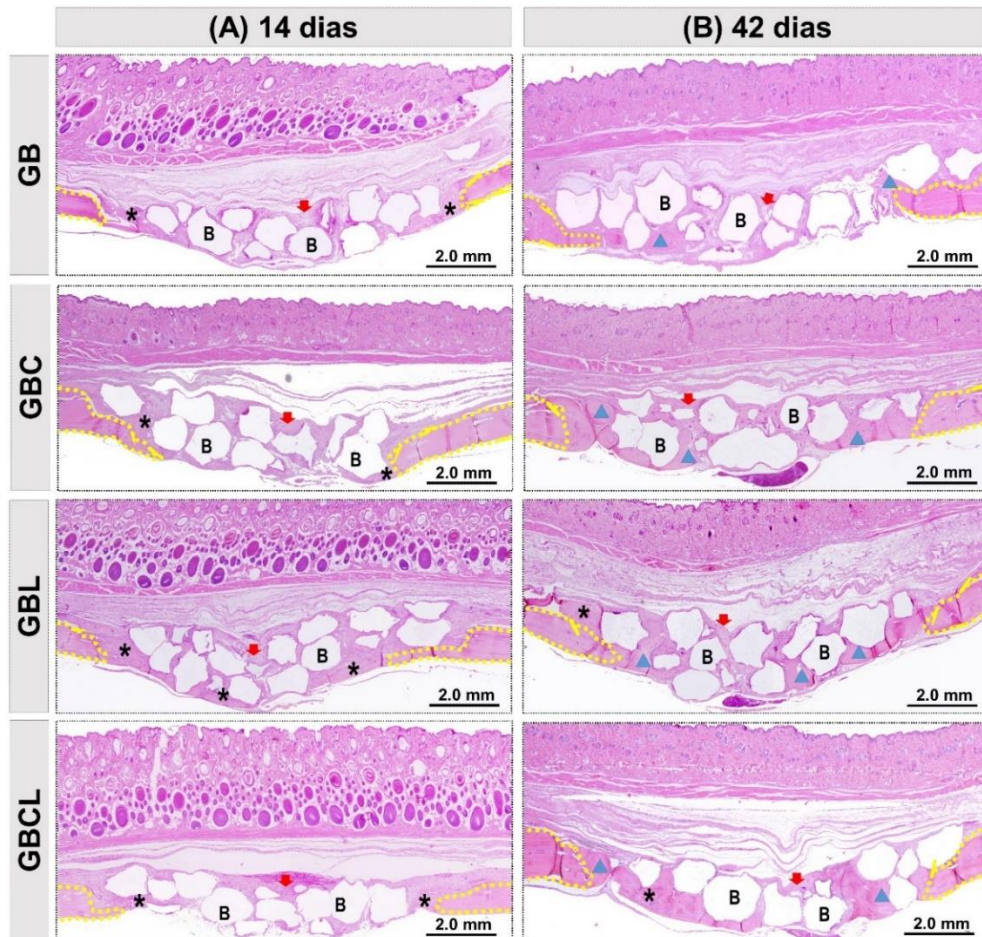
Em todos os grupos, aos 42 dias, notou-se aumento do crescimento ósseo, mas sem ocorrer fechamento completo do defeito, mantendo-se limitado às bordas cirúrgicas, e com áreas focais de tecido mineralizado nos grupos GBL e GBCL. Observaram-se regiões de remodelamento ósseo periféricamente, relativo à diferença na densidade tecidual. A área central da ferida permaneceu preenchida pelas partículas do biomaterial (Figura 2).

#### 4.2 Análise Histomorfológica

Todos os grupos experimentais exibiram características peculiares aos 14 dias, com a área do defeito interpolada por tecido conjuntivo reacional, densamente celularizado, permeado por células inflamatórias, arranjo aleatório das fibras colágenas delgadas e partículas do biomaterial (Figura 3 e 4).

Aos 42 dias, a altura do osso remanescente na região cirúrgica foi preservada em todos os defeitos ósseos. Na região central, observou-se discreta invaginação dos tecidos moles sobrejacentes nos grupos GB e GBL, diferentemente dos grupos GBC e GBCL (Figura 3).

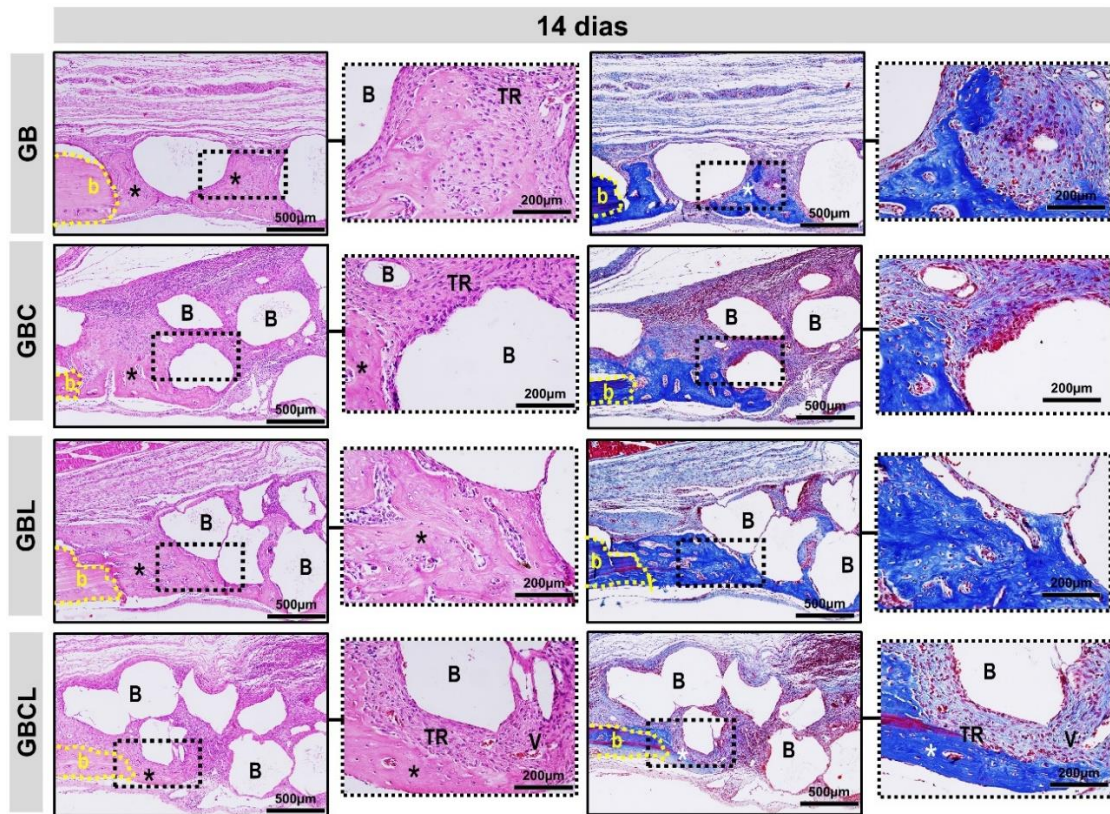




**Figura 3** - Vistas histológicas panorâmicas em 14 e 42 dias em defeitos cranianos preenchidos com biomaterial (GB), biomaterial mais biopolímero de fibrina heterólogo (GBC), biomaterial e bioestimulados a laser (GBL), biomaterial mais biopolímero de fibrina heterólogo e bioestimulados a laser (GBCL). **A)** Formação trabecular imatura (asterisco) ocorrendo na borda do defeito (linha tracejada) e sobrejacente a superfície da dura-máter. Partículas do biomaterial (B) permeando o tecido conjuntivo reacional (seta vermelha). **B)** Transição de maturação óssea para tecido mineralizado (triângulo), com áreas ósseas primárias (asterisco), partículas do biomaterial no tecido conjuntivo densamente fibroso (seta vermelha). (HE; ampliação original  $\times 4$ ; barra = 2 mm).

O crescimento ósseo descreveu o mesmo padrão em todos os defeitos, adjacentes às regiões periféricas com conformação trabecular irregular. O grupo GBCL apresentou acentuada resposta angiogênica, com evidentes brotos vasculares (Figura 4).

Associação de Ensino de Marília Ltda.



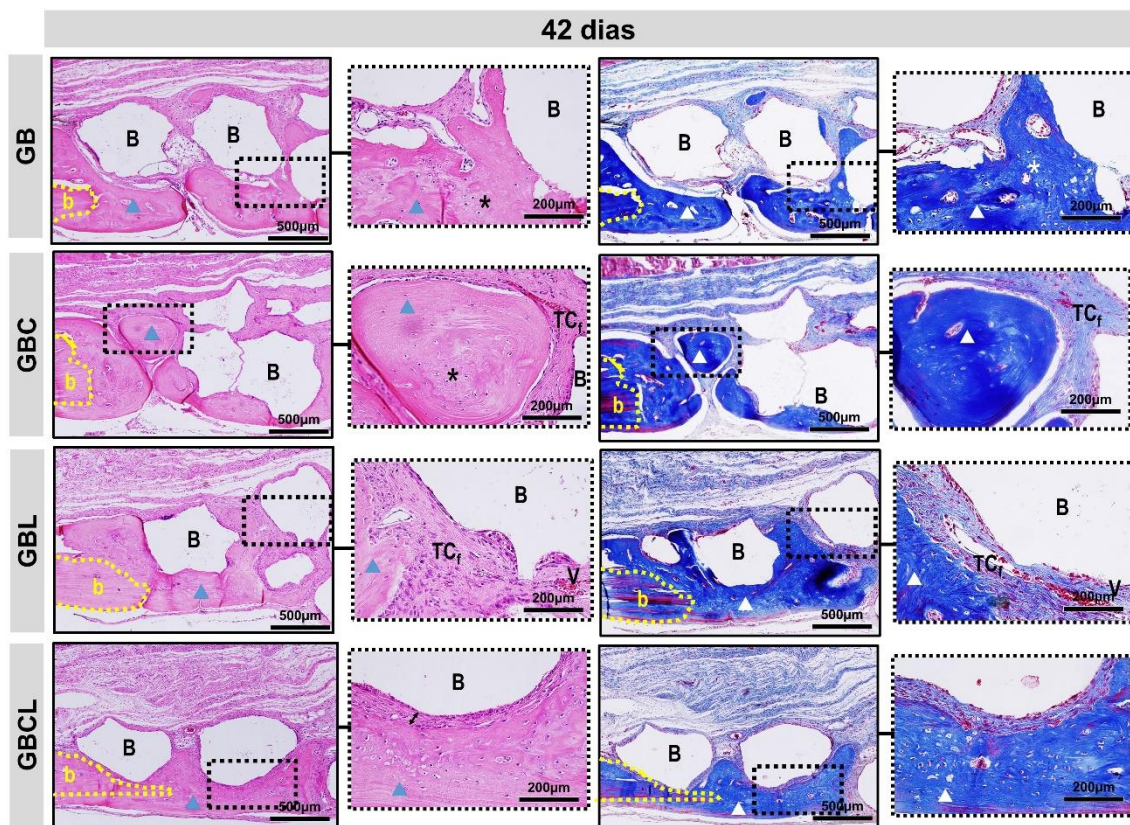
**Figura 4** - Detalhes da evolução do processo de reparo ósseo dos defeitos cranianos aos 14 dias preenchidos com biomaterial (GB), biomaterial mais biopolímero de fibrina heterólogo (GBC), biomaterial e bioestimulados a laser (GBL), biomaterial mais biopolímero de fibrina heterólogo e bioestimulados a laser (GBCL). Deposição de matriz osteóide (asterisco) a partir das bordas do defeito (b), partículas do biomaterial (B) entremeadas por tecido conjuntivo reacional densamente celularizado (TR), brotos vasculares (V). (HE e Tricrômico de Masson; ampliação original x 10; bar = 500 µm e Inserção, imagens ampliadas x 40; bar = 100 µm).

O novo tecido ósseo apresentou um crescimento contínuo, mas restrito às bordas dos defeitos, com áreas focais ósseas mineralizadas entre as partículas do biomaterial (Figura 3 e 5). O grupo GBCL exibiu uma transição de maturação mais avançada, com áreas ósseas mais organizadas e maduras, formando lamelas concêntricas, cercadas por regiões de trabéculas ósseas imaturas (Figura 5).

Associação de Ensino de Marília Ltda.



O interstício nesse período transpassou de densamente celularizado para fibroso, com células inflamatórias mais esparsas, mostrando-se em etapa de resolução do processo. As partículas do biomaterial permaneceram em todos os grupos, sendo circundadas por fibras colágenas com orientação definida e evidenciando uma interface de fibrosamento entre as partículas e o novo osso mineralizado (Figura 5). Não foram observadas células gigantes de corpo estranho, características proeminentes de formação de cápsulas fibróticas.



**Figura 5** - Detalhes da evolução do processo de reparo ósseo dos defeitos cranianos aos 42 dias preenchidos com biomaterial (GB), biomaterial mais biopolímero de fibrina heterólogo (GBC), biomaterial e bioestimulados a laser (GBL), biomaterial mais biopolímero de fibrina heterólogo e bioestimulados a laser (GBCL). Tecido lamelar maduro (triângulo) restrito à borda do defeito (b), e áreas de trabéculas ósseas imaturas (asterisco) no tecido conjuntivo fibroso (TCf). Partículas do biomaterial (B) circundadas por fibras colágenas mais espessas, com



interface de fibrosamento entre partículas e osso neoformado (seta dupla). (HE e Tricrômico de Masson; ampliação original x 10; bar = 500  $\mu\text{m}$  e Inserção, imagens ampliadas x 40; bar = 100  $\mu\text{m}$ ).

### 4.3 Análise Histomorfométrica

#### 4.3.1 Período de 14 dias

No período de 14 dias, quando se compara o percentual de formação de novo tecido ósseo, encontrou-se diferença estatística entre os grupos GB ( $5.42 \pm 1.12$ ) e GBC ( $5.00 \pm 0.94$ ) em relação a GBL ( $12.65 \pm 1.78$ ) e GBCL ( $12.65 \pm 2.32$ ) (Tabela 2, Figura 6).

**Tabela 2-** Formação de Novo Osso

	GB	GBC	GBL	GBCL
14 dias	$5.42 \pm 1.12$ A	$5.00 \pm 0.94$ A	$12.65 \pm 1.78$ B	$12.65 \pm 2.32$ B

Percentual de formação de novo osso (Média  $\pm$  Desvio Padrão) no período de 14 dias, nos grupos GB (Biomaterial), GBC (Biomaterial + Cevap), GBL (Biomaterial + fotobiomodulação a Laser) e GBCL (Biomaterial + Cevap + fotobiomodulação a Laser). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística (ANOVA, pós teste de Tukey a 5% de probabilidade).

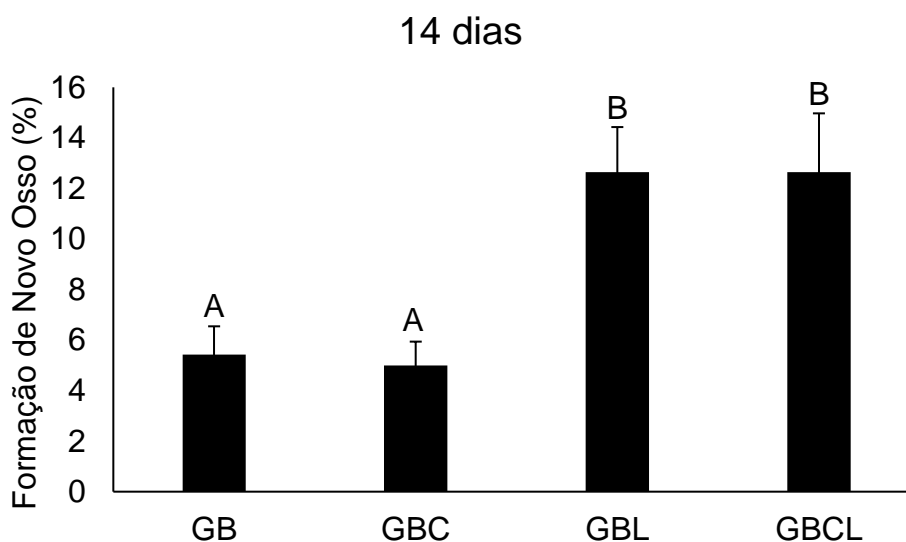


Figura 6 - Percentual de formação de novo osso (Média  $\pm$  Desvio Padrão) no período de 14 dias, nos grupos GB (Biomaterial), GBC (Biomaterial + Cevap), GBL (Biomaterial + fotobiomodulação a Laser) e GBCL (Biomaterial + Cevap + fotobiomodulação a Laser). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística (ANOVA, pós teste de Tukey a 5% de probabilidade).

Em relação ao percentual de Biomaterial, comparando-se todos os grupos experimentais, neste mesmo período, não foi observado diferença estatística entre eles: GB ( $41.66 \pm 6.02$ ), GBC ( $40.52 \pm 6.11$ ), GBL ( $38.88 \pm 2.39$ ) e GBCL ( $42.97 \pm 1.6$ ) (Tabela 3, Figura 7).

**Tabela 3 - Biomaterial**

	GB		GBC		GBL		GBCL	
14 dias	$41.66 \pm 6.02$	A	$40.52 \pm 6.11$	A	$38.88 \pm 2.39$	A	$42.97 \pm 1.6$	A



Percentual de Biomaterial (Média  $\pm$  Desvio Padrão) no período de 14 dias, nos grupos GB (Biomaterial), GBC (Biomaterial + Cevap), GBL (Biomaterial + fotobiomodulação a Laser) e GBCL (Biomaterial + Cevap + fotobiomodulação a Laser). Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença estatística (ANOVA, pós teste de Tukey a 5% de probabilidade).

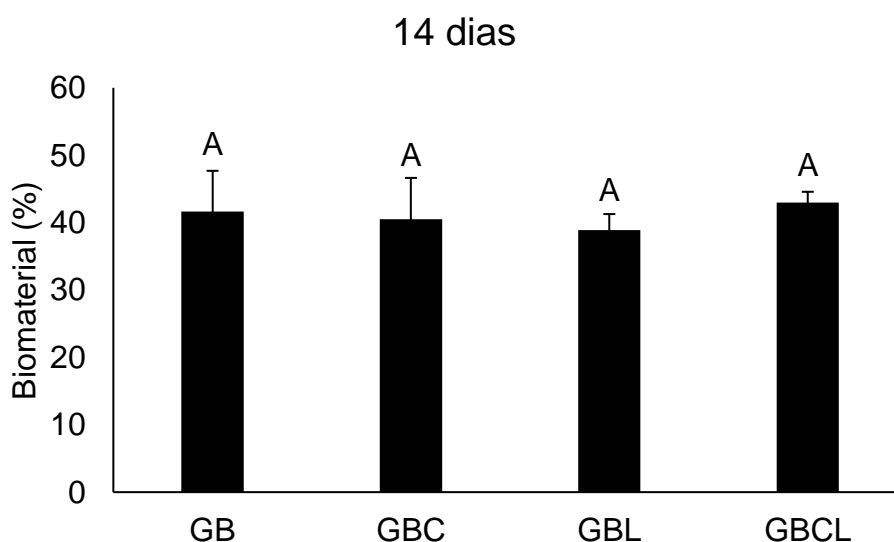


Figura 7 - Percentual de Biomaterial (Média  $\pm$  Desvio Padrão) no período de 14 dias, nos grupos GB (Biomaterial), GBC (Biomaterial + Cevap), GBL (Biomaterial + fotobiomodulação a Laser) e GBCL (Biomaterial + Cevap + fotobiomodulação a Laser). Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença estatística (ANOVA, pós teste de Tukey a 5% de probabilidade).



Ainda no período de 14 dias, quando se compara o percentual de tecido conjuntivo, encontrou-se diferença estatística entre os grupos GBC ( $54.33 \pm 6.38$ ) e GBCL ( $44.38 \pm 1.97$ ) (Tabela 4, Figura 8).

**Tabela 4** – Tecido conjuntivo

	GB	GBC	GBL	GBCL
14 dias	$52.68 \pm 5.57$ AB	$54.33 \pm 6.38$ A	$48.47 \pm 4.06$ AB	$44.38 \pm 1.97$ B

Percentual de tecido conjuntivo (Média  $\pm$  Desvio Padrão) no período de 14 dias, nos grupos GB (Biomaterial), GBC (Biomaterial + Cevap), GBL (Biomaterial + fotobiomodulação a Laser) e GBCL (Biomaterial + Cevap + fotobiomodulação a Laser). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística (ANOVA, pós teste de Tukey a 5% de probabilidade).

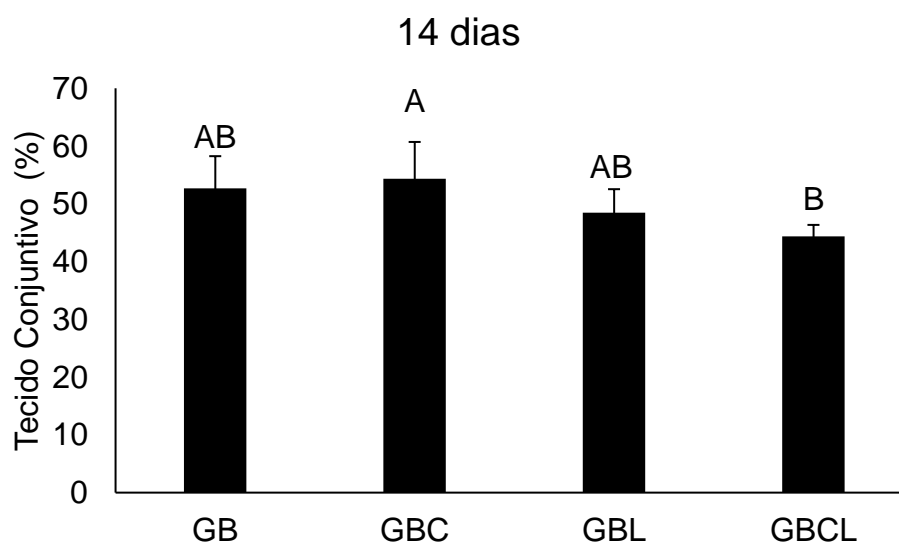




Figura 8 - Percentual de tecido conjuntivo (Média  $\pm$  Desvio Padrão) no período de 14 dias, nos grupos GB (Biomaterial), GBC (Biomaterial + Cevap), GBL (Biomaterial + fotobiomodulação a Laser) e GBCL (Biomaterial + Cevap + fotobiomodulação a Laser). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística (ANOVA, pós teste de Tukey a 5% de probabilidade).

#### 4.3.2 Período de 42 dias

No período de 42 dias, quando se compara o percentual de formação de novo tecido ósseo, encontrou-se diferença estatística entre os grupos GB ( $21.49 \pm 4.74$ ) e GBC ( $21.77 \pm 2.83$ ) em relação a GBL ( $29.29 \pm 2.93$ ) e GBCL ( $31.38 \pm 2.89$ ) (Tabela 5, Figura 9).

Tabela 5- Formação de Novo Osso

	GB	GBC	GBL	GBCL
42 dias	$21.49 \pm 4.74$ A	$21.77 \pm 2.83$ A	$29.29 \pm 2.93$ B	$31.38 \pm 2.89$ B

Percentual de formação de novo osso (Média  $\pm$  Desvio Padrão) no período de 42 dias, nos grupos GB (Biomaterial), GBC (Biomaterial + Cevap), GBL (Biomaterial + fotobiomodulação a Laser) e GBCL (Biomaterial + Cevap + fotobiomodulação a Laser). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística (ANOVA, pós teste de Tukey a 5% de probabilidade).



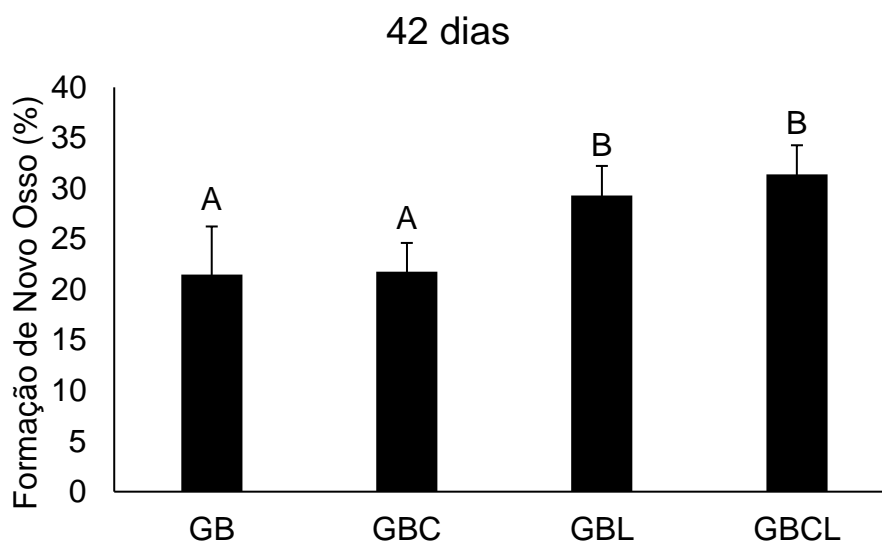


Figura 9 - Percentual de formação de novo osso (Média  $\pm$  Desvio Padrão) no período de 42 dias, nos grupos GB (Biomaterial), GBC (Biomaterial + Cevap), GBL (Biomaterial + fotobiomodulação a Laser) e GBCL (Biomaterial + Cevap + fotobiomodulação a Laser). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística (ANOVA, pós teste de Tukey a 5% de probabilidade).

Em relação ao percentual de Biomaterial, comparando-se os grupos GB, GBC, GBL E GBCL, neste mesmo período, não foi observado diferença estatística entre os todos os grupos GB ( $34.48 \pm 6.07$ ), GBC ( $36.83 \pm 3.87$ ), GBL ( $35.24 \pm 1.55$ ) e GBCL ( $36.57 \pm 3.7$ ) (Tabela 6, Figura 10).

Tabela 6 - Biomaterial

	GB		GBC		GBL		GBCL	
42 dias	$34.48 \pm 6.07$	A	$36.83 \pm 3.87$	A	$35.24 \pm 1.55$	A	$36.57 \pm 3.7$	A



Percentual de Biomaterial (Média  $\pm$  Desvio Padrão) no período de 42 dias, nos grupos GB (Biomaterial), GBC (Biomaterial + Cevap), GBL (Biomaterial + fotobiomodulação a Laser) e GBCL (Biomaterial + Cevap + fotobiomodulação a Laser). Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença estatística (ANOVA, pós teste de Tukey a 5% de probabilidade).

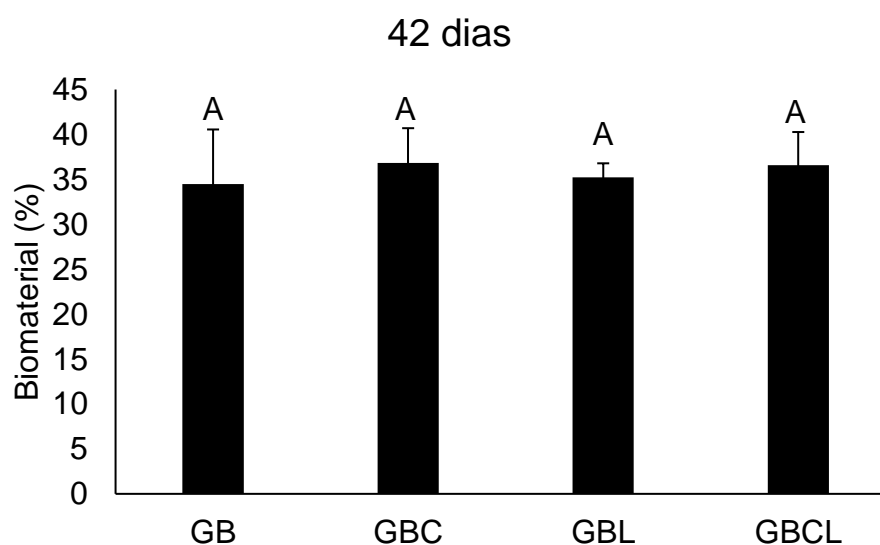


Figura 10 - Percentual de Biomaterial (Média  $\pm$  Desvio Padrão) no período de 42 dias, nos grupos GB (Biomaterial), GBC (Biomaterial + Cevap), GBL (Biomaterial + fotobiomodulação a Laser) e GBCL (Biomaterial + Cevap + fotobiomodulação a Laser). Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença estatística (ANOVA, pós teste de Tukey a 5% de probabilidade).



Ainda no período de 42 dias, quando se compara o percentual de tecido conjuntivo, foi observado diferença estatística entre o grupo GBCL ( $32.05 \pm 5.45$ ) e os grupos GB ( $43.9 \pm 5.7$ ) e GBC ( $41.39 \pm 5.72$ ) (Tabela 7, Figura 11).

Tabela 7- Tecido Conjuntivo

	GB	GBC	GBL	GBCL
42 dias	$43.9 \pm 5.7$ A	$41.39 \pm 5.72$ A	$35.47 \pm 3.07$ AB	$32.05 \pm 5.45$ B

Percentual de tecido conjuntivo (Média  $\pm$  Desvio Padrão) no período de 42 dias, nos grupos GB (Biomaterial), GBC (Biomaterial + Cevap), GBL (Biomaterial + fotobiomodulação a Laser) e GBCL (Biomaterial + Cevap + fotobiomodulação a Laser). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística (ANOVA, pós teste de Tukey a 5% de probabilidade).

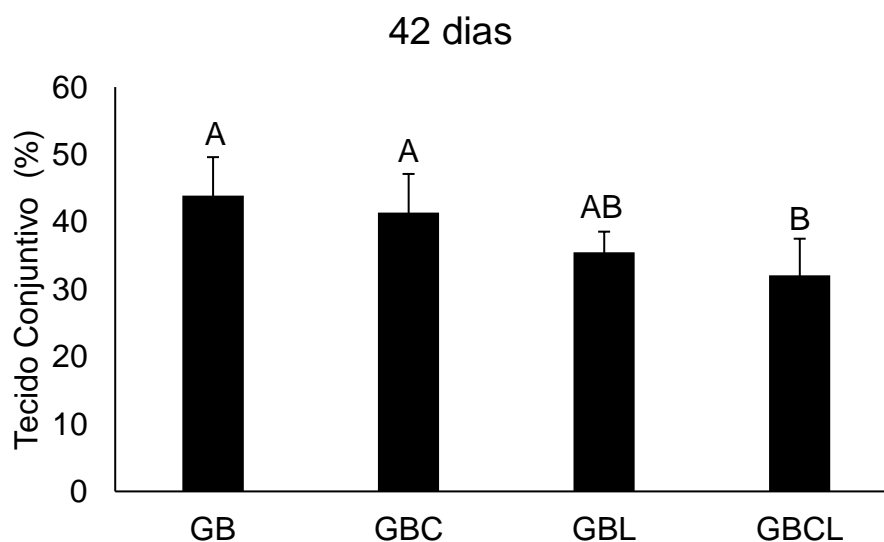




Figura 11 - Percentual de tecido conjuntivo (Média  $\pm$  Desvio Padrão) no período de 42 dias, nos grupos GB (Biomaterial), GBC (Biomaterial + Cevap), GBL (Biomaterial + fotobiomodulação a Laser) e GBCL (Biomaterial + Cevap + fotobiomodulação a Laser). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística (ANOVA, pós teste de Tukey a 5% de probabilidade).

#### 4.3.3 Comparação dos Grupos nos dois períodos de experimentação (14x42 dias)

Em relação ao percentual de formação de novo tecido ósseo, comparando os dois períodos de experimentação, encontrou-se diferença estatística entre todos os grupos GB ( $5.42 \pm 1.12$ ), GBC ( $5.00 \pm 0.94$ ), GBL ( $12.65 \pm 1.78$ ), GBCL ( $12.65 \pm 2.32$ ) e GB ( $21.49 \pm 4.74$ ), GBC ( $21.77 \pm 2.83$ ), GBL ( $29.29 \pm 2.93$ ) e GBCL ( $31.38 \pm 2.89$ ); valores dos períodos de 14 e 42 dias, respectivamente. (Tabela 8, Figura 12).

Tabela 8 - Formação de Novo Osso

	GB	GBC	GBL	GBCL
14 dias	$5.42 \pm 1.12$ A	$5.00 \pm 0.94$ A	$12.65 \pm 1.78$ A	$12.65 \pm 2.32$ A
42 dias	$21.49 \pm 4.74$ B	$21.77 \pm 2.83$ B	$29.29 \pm 2.93$ B	$31.38 \pm 2.89$ B

Percentual de formação de novo osso (Média  $\pm$  Desvio Padrão) nos períodos de 14 e 42 dias, nos grupos GB (Biomaterial), GBC (Biomaterial + Cevap), GBL (Biomaterial + fotobiomodulação a Laser) e GBCL (Biomaterial + Cevap + fotobiomodulação a Laser). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística (ANOVA, pós teste de Tukey a 5% de probabilidade).

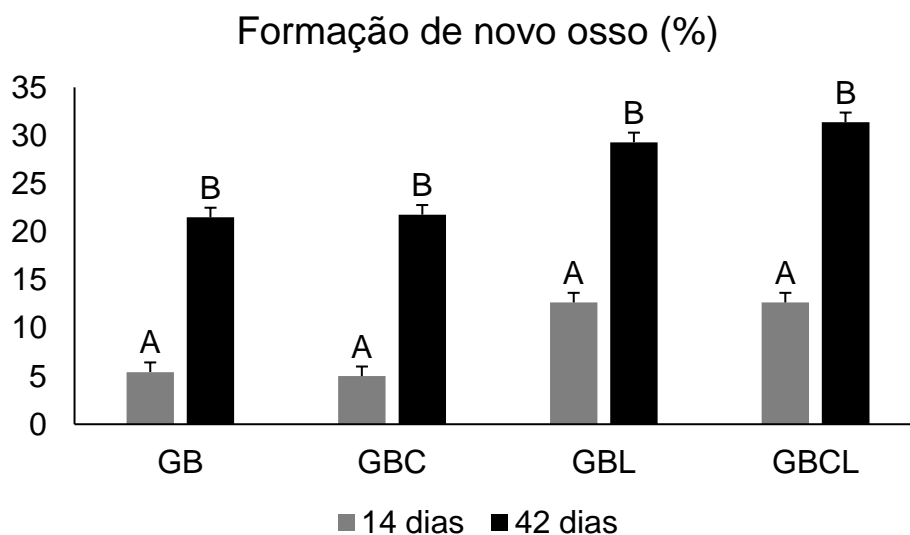


Figura 12 - Percentual de formação de novo osso (Média  $\pm$  Desvio Padrão) nos períodos de 14 e 42 dias, nos grupos GB (Biomaterial), GBC (Biomaterial + Cevap), GBL (Biomaterial + fotobiomodulação a Laser) e GBCL (Biomaterial + Cevap + fotobiomodulação a Laser). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística (ANOVA, pós teste de Tukey a 5% de probabilidade).

Em referência ao percentual de Biomaterial, comparando-se os dois períodos, não foi observado diferença estatística no grupo GBC ( $36.83 \pm 3.87$ ) (Tabela 9, Figura 13).

Tabela 9 - Biomaterial

	GB	GBC	GBL	GBCL
14 dias	41.66 $\pm$ 6.02 A	40.52 $\pm$ 6.11 A	38.88 $\pm$ 2.39 A	42.97 $\pm$ 1.6 A
42 dias	34.48 $\pm$ 6.07 B	36.83 $\pm$ 3.87 A	35.24 $\pm$ 1.55 B	36.57 $\pm$ 3.7 B

Percentual do biomaterial (Média  $\pm$  Desvio Padrão) nos períodos de 14 e 42 dias, nos grupos GB (Biomaterial), GBC (Biomaterial + Cevap), GBL (Biomaterial + fotobiomodulação a



Laser) e GBCL (Biomaterial + Cevap + fotobiomodulação a Laser). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística (ANOVA, pós teste de Tukey a 5% de probabilidade).

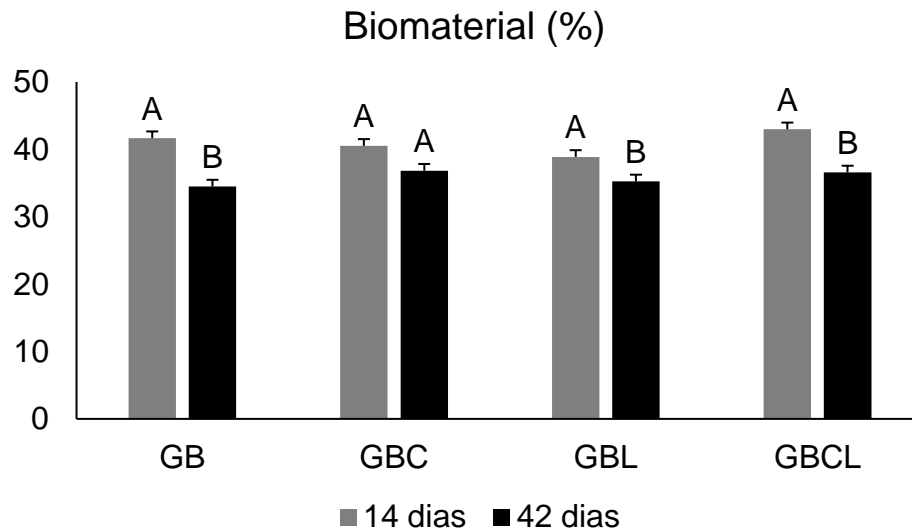


Figura 13 - Percentual de Biomaterial (Média  $\pm$  Desvio Padrão) nos períodos de 14 e 42 dias, nos grupos GB (Biomaterial), GBC (Biomaterial + Cevap), GBL (Biomaterial + fotobiomodulação a Laser) e GBCL (Biomaterial + Cevap + fotobiomodulação a Laser). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística (ANOVA, pós teste de Tukey a 5% de probabilidade).

Em relação ao percentual de tecido conjuntivo, comparando os dois períodos de experimentação, encontrou-se diferença estatística entre todos os grupos GB ( $52.68 \pm 5.57$ ), GBC ( $54.33 \pm 6.38$ ), GBL ( $48.47 \pm 4.06$ ), GBCL ( $44.38 \pm 1.97$ ) e GB ( $43.9 \pm 5.7$ ), GBC ( $41.39 \pm 5.72$ ), GBL ( $35.47 \pm 3.07$ ) e GBCL ( $32.05 \pm 5.45$ ); valores dos períodos de 14 e 42 dias, respectivamente. (Tabela 10, Figura 14).



Tabela 10 - Tecido Conjuntivo

	GB	GBC	GBL	GBCL
14 dias	52.68 ± 5.57 A	54.33 ± 6.38 A	48.47 ± 4.06 A	44.38 ± 1.97 A
42 dias	43.9 ± 5.7 B	41.39 ± 5.72 B	35.47 ± 3.07 B	32.05 ± 5.45 B

Percentual de tecido conjuntivo (Média ± Desvio Padrão) nos períodos de 14 e 42 dias, nos grupos GB (Biomaterial), GBC (Biomaterial + Cevap), GBL (Biomaterial + fotobiomodulação a Laser) e GBCL (Biomaterial + Cevap + fotobiomodulação a Laser). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística (ANOVA, pós teste de Tukey a 5% de probabilidade).

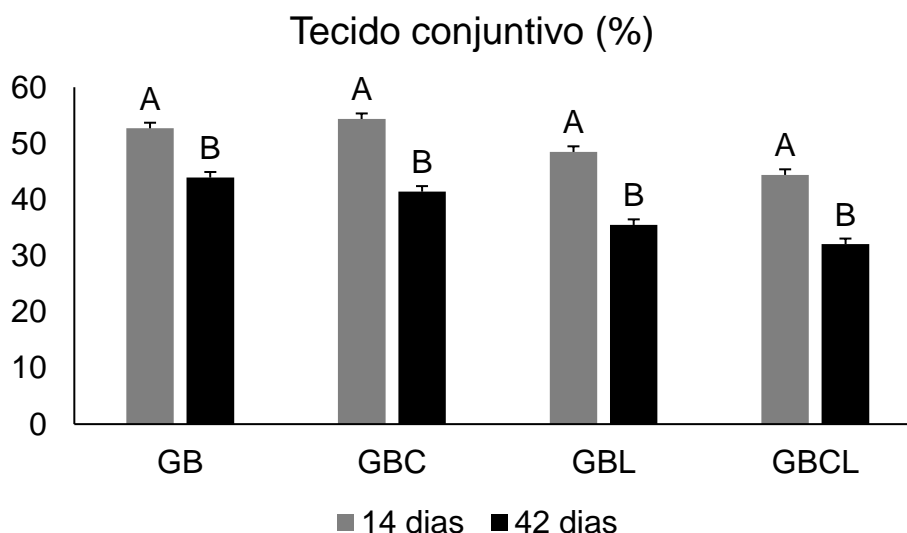


Figura 14 - Percentual de tecido conjuntivo (Média ± Desvio Padrão) nos períodos de 14 e 42 dias, nos grupos GB (Biomaterial), GBC (Biomaterial + Cevap), GBL (Biomaterial + fotobiomodulação a Laser) e GBCL (Biomaterial + Cevap + fotobiomodulação a Laser). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística (ANOVA, pós teste de Tukey a 5% de probabilidade).



---

UNIVERSIDADE DE MARÍLIA

Associação de Ensino de Marília Ltda.

---

Campus Universitário - Fone:(014) 2105-4000 - Fax: (014) 2105-8691 - CEP: 17.525-902 - Marília - SP.





# ***DISCUSSÃO***

Associação de Ensino de Marília Ltda.

---

Campus Universitário - Fone:(014) 2105-4000 - Fax: (014) 2105-8691 - CEP: 17.525-902 - Marília - SP.





## 5. DISCUSSÃO

A Bioengenharia atualmente investiga diversos métodos de tratamentos disponíveis envolvidos no processo de reparo ósseo, como a cerâmica utilizada neste trabalho, bem como a associação com terapias coadjuvantes, dentre elas, o biopolímero de fibrina e a fotobiomodulação a laser, visando a regeneração do tecido com características morfofuncionais nativas e, conseqüentemente, um progresso tecnológico das pesquisas pré-clínicas nas cirurgias reconstrutivas (FERNANDEZ DE GRADO et al., 2018). Os resultados obtidos apontaram efeitos positivos frente à combinação dos métodos de tratamento no processo de regeneração óssea.

A preferência dos ratos machos foi devido à influência que exercem os hormônios sexuais no tecido ósseo. Apesar da participação do androgênio, estrogênio e seus respectivos receptores no crescimento e manutenção óssea, tem sido atribuída uma ação inibidora no periósteo do osso em formação relacionada ao estrogênio nas mulheres (VENKEN et al., 2008; OURY, 2012).

O tamanho da amostra é baseado na literatura científica, na qual o número de animais é compatível com a necessidade de resultados confiáveis do ponto de vista de significância estatística, como também em questões bioéticas (PINHEIRO et al., 2003), respeitando o princípio dos 3R's Princípios de Russell-Burch (1959), redução, substituição e refinamento no uso de animais para experimentação.

Em síntese, nessa discussão, apresentaremos os principais resultados observados nas análises realizadas, ressaltando os dados importantes, bem como as limitações e perspectivas de novos projetos.

Partindo da análise qualitativa por meio das imagens microtomográficas bidimensionais, transaxiais e coronais (micro-CT), todos os grupos experimentais, aos 14 dias de experimentação, demonstraram uma neoformação óssea centrípeta, com entrelaçamento das trabéculas ósseas com o biomaterial, confirmando sua porosidade que facilita a proliferação



---

## UNIVERSIDADE DE MARÍLIA

celular, bem como sua radiopacidade. Quando comparado aos 42 dias, verificou-se um aumento do crescimento ósseo nos grupos GBL e GBCL, também nas bordas do defeito. Esses dados concordam com demais pesquisas que utilizaram metodologia semelhante (MARQUES et al., 2015; POMINI et al., 2019) onde foi observado, também aos 42 dias, um tecido ósseo neoformado com melhor organização, nos grupos bioestimulados.

Visando aprofundar as análises para confrontamento com os dados coletados na literatura, foram realizadas também as análises histomorfológica e histomorfométrica do percentual de formação de novo tecido ósseo, de biomaterial e também de tecido conjuntivo.

Histomorfologicamente, no período de 14 dias, nas peças coradas com hematoxilina eosina (HE) e/ou Tricrômico de Masson, notou-se em todos os grupos experimentais particularidades como formação óssea imatura a partir das bordas do defeito, com uma combinação aleatória de partículas do biomaterial com delgadas fibras colágenas. O grupo GBCL demonstrou destaque quanto à presença de brotos vasculares, fato que pode ser atribuído aos efeitos da fotobiomodulação a laser sobre a microcirculação encontrados em pesquisas prévias associadas ao biopolímero de fibrina que estimula o crescimento de fatores angiogênicos (ABD-ELAAL et al., 2015; DE OLIVEIRA GONÇALVES et al., 2016; FELDMAN; OSBORNE, 2018).

Já no período de 42 dias, ficou evidente na evolução do processo de reparo ósseo, um progresso do novo tecido ósseo junto às bordas do defeito, com células inflamatórias espalhadas em tecido densamente fibroso. O grupo GBCL exibiu um grau de maturação óssea mais desenvolvido, com as partículas do biomaterial circundadas por fibras colágenas organizadas e definidas, estando esses resultados condizentes com outros estudos prévios (RIDER et al., 2018; DE OLIVEIRA ROSSO et al., 2020), demonstrando a biocompatibilidade do biocomplexo biomaterial e biopolímero, associado aos efeitos bioquímicos, bioelétricos e bioestimulatórios da terapia por fotobiomodulação a laser, acelerando também o processo de reparo ósseo (BUCHAIM et al., 2016; GERBI et al., 2018).

Associação de Ensino de Marília Ltda.



---

## UNIVERSIDADE DE MARÍLIA

Em referência à análise histomorfométrica, em que foi considerado o percentual de formação de novo osso, biomaterial e tecido conjuntivo em ambos os períodos de experimentação 14 e 42 dias, foi observado no percentual de novo osso diferença significativa entre os grupos GB ( $5.42 \pm 1.12$ ) e GBC ( $5.00 \pm 0.94$ ) em relação a GBL ( $12.65 \pm 1.78$ ) e GBCL ( $12.65 \pm 2.32$ ) no período de 14 dias, confirmando que dentro do processo de regeneração óssea, a busca por alternativas coadjuvantes não invasivas tem sido incessante, como já exposto anteriormente e o uso da fotobiomodulação a laser, de acordo com pesquisas preexistentes (DE FREITAS; HAMBLIN, 2016; JONASSON et al., 2017), afirmam que as células quando bioestimuladas regulam citocinas inflamatórias, permitindo que o tecido ósseo recomponha sua homeostase, restabelecendo sua forma e função.

A respeito do percentual do biomaterial, não houve diferença estatística entre todos os grupos experimentais: GB ( $41.66 \pm 6.02$ ), GBC ( $40.52 \pm 6.11$ ), GBL ( $38.88 \pm 2.39$ ) e GBCL ( $42.97 \pm 1.6$ ) aos 14 dias de experimento, demonstrando e consentindo com a literatura que a terapia por fotobiomodulação a laser não apresenta interferência na reabsorção do biomaterial, devido as suas propriedades fisiológicas, constatando que, após a sua implantação, ocorre aglomeração de células osteoclásticas e macrófagos ao redor das partículas, com intensa síntese de ácidos na tentativa de degradá-las e devido ao pH ácido ambiente, ocorre a quebra da hidroxiapatita proveniente da matriz óssea bovina, liberando íons cálcio (GUARNIERI et al., 2018).

Ainda no período de 14 dias, quando se compara o percentual de tecido conjuntivo, encontrou-se diferença estatística entre os grupos GBC ( $54.33 \pm 6.38$ ) e GBCL ( $44.38 \pm 1.97$ ), comprovando e pactuando com estudos prévios que a combinação entre os sistemas de armação multifuncional promovidos pelo biopolímero de fibrina (CUNHA et al., 2015; MACHADO et al., 2015) juntamente com o biomaterial que apresenta macroporosidades facilitando a proliferação celular, e a terapia por fotobiomodulação, promoveram uma diminuição do percentual de tecido conjuntivo e, conseqüentemente maior percentual de formação de novo

Associação de Ensino de Marília Ltda.



---

## UNIVERSIDADE DE MARÍLIA

osso, com organização das fibras colágenas, acelerando o processo de deposição da matriz óssea (POMINI et al., 2019).

Entretanto, aos 42 dias de experimento, considerando os mesmos parâmetros, percentual de formação de novo osso, biomaterial e tecido conjuntivo, verificou-se que houve diferença estatística, no percentual de novo osso, entre os grupos GB (21.49  $\pm$ 4.74) e GBC (21.77  $\pm$ 2.83) em relação a GBL (29.29  $\pm$ 2.93) e GBCL (31.38  $\pm$ 2.89), fato que comprova que os efeitos da fotobiomodulação a laser viabilizaram em maior velocidade a deposição de matriz óssea mineralizada no defeito, certificando com pesquisas prévias que os lasers infravermelhos (DE OLIVEIRA GONÇALVES et al., 2016; DE MIRANDA et al., 2019), devido a profundidade de penetração nos tecidos, aumentam a atividade osteoblástica, estimulando à deposição de cálcio e fósforo. Além disso, os estudos indicam que a bioestimulação deve ocorrer com densidades de energia entre 0.05 e 10 J/cm<sup>2</sup>, sendo que a densidade de energia utilizada na presente pesquisa foi 6,20J/cm<sup>2</sup>, dentro da janela terapêutica e já testada anteriormente, enquanto que doses acima de 10 J/cm<sup>2</sup> possuem efeitos bioinibitórios (KHARKWAL et al., 2011; ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2012).

Assim como no período de 14 dias de experimentação, em relação ao percentual de biomaterial, porém aos 42 dias, também não houve diferença estatística entre todos os grupos experimentais: GB (34.48  $\pm$ 6.07), GBC (36.83  $\pm$ 3.87), GBL (35.24  $\pm$ 1.55) e GBCL (36.57  $\pm$  3.7). Já em relação ao percentual de tecido conjuntivo, no mesmo período de 42 dias de experimentação, foi observado diferença estatística entre o grupo GBCL (32.05  $\pm$ 5.45) e os grupos GB (43.9  $\pm$ 5.7) e GBC (41.39  $\pm$  5.72), sustentando e em conformidade com dados pregressos a atuação positiva da bioestimulação nas reações químicas e síntese do colágeno, em associação às propriedades bioativas do biomaterial e ao sistema de armação biológica do biopolímero de fibrina (IATECOLA et al., 2013; POMINI et al., 2019).

Quando comparados os grupos experimentais nos dois períodos de análise (14x42 dias), com relação ao percentual do biomaterial, não foi constatada diferença estatística, ocorrendo

Associação de Ensino de Marília Ltda.



---

## UNIVERSIDADE DE MARÍLIA

pequena variação na densidade volumétrica das partículas da matriz óssea, fato já discutido anteriormente quando realizada a comparação dos períodos experimentais (GUARNIERI et al., 2018). No entanto, com relação ao percentual de formação de novo tecido ósseo e percentual de tecido conjuntivo, verificou-se diferença estatística entre todos os grupos experimentais, como demonstrado nas tabelas (8 e 10), confirmando um maior percentual de formação de novo osso no período de 42 dias (DE OLIVEIRA ROSSO et al., 2020; GROSSI-OLIVEIRA et al., 2020), pois aos 14 dias o processo de maturação óssea está em período inicial, porém ativo. Aos 42 dias, esse processo de deposição e maturação da matriz óssea encontra-se mais evidente, com microambiente organizado.

No campo da engenharia tecidual e da medicina regenerativa, as pesquisas experimentais apresentam metodologias próprias e limitações quanto às suas necessidades para que possam alcançar os melhores resultados. Neste estudo, podemos apontar como limitações a não realização das análises de imunohistoquímica, ferramenta que identifica componentes específicos de um tecido. Para estudos prospectivos, permanecendo na área de regeneração óssea, visto que defeitos ósseos de grandes dimensões são alvos de estudos desafiadores, sugere-se a associação do biocomplexo formado pelo biomaterial e biopolímero de fibrina, com terapias complementares inovadoras não invasivas como, por exemplo, as plantas medicinais (BARBALHO et al., 2019), que têm sido objeto de estudo por apresentarem componentes eficazes na promoção da regeneração óssea.







## ***CONCLUSÃO***

Associação de Ensino de Marília Ltda.

---

Campus Universitário - Fone:(014) 2105-4000 - Fax: (014) 2105-8691 - CEP: 17.525-902 - Marília - SP.





## **6. CONCLUSÃO**

Em conclusão, este estudo demonstrou que a terapia por fotobiomodulação, por meio do uso do laser de baixa potência, interferiu positivamente no processo de reparo de defeitos ósseos preenchidos com o biocomplexo formado pelo biopolímero de fibrina + biomaterial (QalyBone BCP), acelerando o restabelecimento da lesão óssea, por meio de seus efeitos bioquímicos e bioestimulatórios.





## ***REFERÊNCIAS***

Associação de Ensino de Marília Ltda.

---

Campus Universitário - Fone:(014) 2105-4000 - Fax: (014) 2105-8691 - CEP: 17.525-902 - Marília - SP.




**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, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijom.2015.04.010>>.
- ABOU NEEL, E. A. et al. Tissue engineering in dentistry. **Journal of Dentistry**, v. 42, n. 8, p. 915–928, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jdent.2014.05.008>>.
- ALGHAMDI, K. M.; KUMAR, A.; MOUSSA, N. A. Low-level laser therapy: A useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. **Lasers in Medical Science**, v. 27, n. 1, p. 237–249, 2012.
- 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, p. 1–11, 2018.
- ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. de. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. [s.l: s.n.]
- BARBALHO, S. M. et al. The potential role of medicinal plants in bone regeneration. **Alternative Therapies in Health and Medicine**, v. 25, n. 4, p. 32–39, 2019.
- BARROS, L. C. et al. A new fibrin sealant from crotalus durissus terrificus venom: Applications in medicine. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews**, v. 12, n. 8, p. 553–571, 2009.
- BAYAT, M. et al. Comparison of effects of LLLT and LIPUS on fracture healing in animal models and patients : A systematic review. v. 132, 2018.
- BUCHAIM, D. et al. Unique hetetologous fibrin biopolymer with hemostatic, adhesive, sealant, scaffold and drug delivery properties – a systematic review. **J. Venom. Anim. Toxins incl Trop. Dis.**, v. 26, n. June 2019, p. 1–15, 2019.
- BUCHAIM, D. V. et al. The new heterologous fibrin sealant in combination with low-level laser therapy (LLLT) in the repair of the buccal branch of the facial nerve. **Lasers in Medical**

Associação de Ensino de Marília Ltda.



**Science**, v. 31, n. 5, 2016.

BUCHAIM, R. L. et al. The action of demineralized bovine bone matrix on bone neoformation in rats submitted to experimental alcoholism. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 3, 2013.

CUNHA, M. et al. Hydroxyapatite and a New Fibrin Sealant Derived from Snake Venom as Scaffold to Treatment of Cranial Defects in Rats. **Materials Research**, v. 18, n. 1, p. 196–203, 2015.

DE AZEVEDO E SOUSA MUNHOZ, M. et al. Elastin-derived scaffolding associated or not with bone morphogenetic protein (BMP) or hydroxyapatite (HA) in the repair process of metaphyseal bone defects. **PLoS ONE**, v. 15, n. 4, p. 1–21, 2020.

DE FREITAS, L. F.; HAMBLIN, M. R. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. **IEEE Journal on Selected Topics in Quantum Electronics**, v. 22, n. 3, p. 1–37, 2016.

DE MIRANDA, J. et al. Histologic Evaluation of Early Bone Regeneration Treated with Simvastatin Associated with Low-Level Laser Therapy. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 34, n. 3, p. 658–664, 2019.

DE MORAES, R. et al. Suitability of the use of an elastin matrix combined with bone morphogenetic protein for the repair of cranial defects. **American journal of translational research**, v. 11, n. 8, p. 5261–5271, 2019.

DE OLIVEIRA GONÇALVES, J. et al. Effects of low-level laser therapy on autogenous bone graft stabilized with a new heterologous fibrin sealant. **J Photochem Photobiol B.**, v. 162, p. 663–668, 2016.

DE OLIVEIRA ROSSO, M. P. et al. Photobiomodulation therapy associated with heterologous fibrin biopolymer and bovine bone matrix helps to reconstruct long bones. **Biomolecules**, v. 10, n. 3, p. 1–17, 2020.

FELDMAN, D. S.; OSBORNE, S. Fibrin as a tissue adhesive and scaffold with an angiogenic agent (FGF-1) to enhance burn graft healing in vivo and clinically. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 9, n. 4, 2018.

Associação de Ensino de Marília Ltda.

---





FERNANDEZ DE GRADO, G. et al. Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management. **J Tissue Eng.**, v. 9, 2018.

GERBI, M. E. M. D. M. et al. Photobiomodulation Therapy in Bone Repair Associated with Bone Morphogenetic Proteins and Guided Bone Regeneration: A Histomorphometric Study. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 36, n. 11, p. 581–588, 2018.

GIANNOUDIS, P. V.; DINOPOULOS, H.; TSIRIDIS, E. Bone substitutes: an update. **Injury**, v. 36 Suppl 3, p. 20–27, 2005.

GIANNOUDIS, P. V.; JONES, E.; EINHORN, T. A. Fracture healing and bone repair. **Injury**, v. 42, n. 6, p. 549–550, 2011.

GROSSI-OLIVEIRA, G. et al. Comparative Evaluation of Bone Repair with Four Different Bone Substitutes in Critical Size Defects. **International Journal of Biomaterials**, v. 2020, 2020.

GUARNIERI, R. et al. Histologic and histomorphometric analysis of bone regeneration with bovine grafting material after 24 months of healing. A case report. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 9, n. 3, 2018.

IATECOLA, A. et al. Use of a new fibrin sealant and laser irradiation in the repair of skull defects in rats. **Brazilian Dental Journal**, v. 24, n. 5, p. 456–461, 2013.

JONASSON, T. H. et al. Effects of low-level laser therapy and platelet concentrate on bone repair: Histological, histomorphometric, immunohistochemical, and radiographic study. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 45, n. 11, p. 1846–1853, 2017.

KHARKWAL, G. B. et al. Photodynamic therapy for infections: Clinical applications. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 43, n. 7, p. 755–767, 2011.

MACHADO, E. G. et al. A new heterologous fibrin sealant as scaffold to recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) and natural latex proteins for the repair of tibial bone defects. **Acta Histochem.**, v. 117, n. 3, p. 288–296, 2015.

MARQUES, L. et al. New LLLT protocol to speed up the bone healing process—histometric and immunohistochemical analysis in rat calvarial bone defect. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 4, p. 1225–1230, 2015.

Associação de Ensino de Marília Ltda.

---



OURY, F. A crosstalk between bone and gonads. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1260, n. 1, p. 1–7, 2012.

PINHEIRO, A. et al. Effect of low level laser therapy on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone. **Brazilian dental journal**, v. 14, n. 3, p. 177–181, 2003.

POMINI, K. T. et al. Fibrin sealant derived from human plasma as a scaffold for bone grafts associated with photobiomodulation therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 7, 2019.

RAHAL, S. C. et al. Effect of fibrin glue derived from snake venom on the viability of autogenous split-thickness skin graft. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, p. 161–172, 2004.

RAI, R. et al. Tissue Engineering: Step Ahead in Maxillofacial Reconstruction. **Journal of international oral health : JIOH**, v. 7, n. 9, p. 138–42, 2015.

RIDER, P. et al. Bioprinting of tissue engineering scaffolds. **Journal of Tissue Engineering**, v. 9, 2018.

TREVISIOL, C. H. et al. Impaired osteoinduction in a rat model for chronic alcohol abuse. **Bone**, v. 41, n. 2, p. 175–180, 2007.

VENKEN, K. et al. Sex hormones, their receptors and bone health. **Osteoporosis International**, v. 19, n. 11, p. 1517–1525, 2008.

WANG, W.; YEUNG, K. W. K. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. **Bioact Mater.**, v. 2, n. 4, p. 224–247, 2017.

WEISEL, J. W. FIBRINOGEN AND FIBRIN A bstract Fibrinogen is a large , complex , fibrous glycoprotein with three pairs of I . I ntroduction Fibrinogen is a fi brous protein that was fi rst classi fi ed with keratin , ° repeat in wide-angle X-ray. **Advances in Protein Chemistry**, v. 70, n. 04, p. 247–299, 2005.

YAMADA, Y. et al. Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 31, n. 1, p. 27–33, 2003.

Associação de Ensino de Marília Ltda.

---

Campus Universitário - Fone:(014) 2105-4000 - Fax: (014) 2105-8691 - CEP: 17.525-902 - Marília - SP.



***ANEXO***

Associação de Ensino de Marília Ltda.

---

Campus Universitário - Fone:(014) 2105-4000 - Fax: (014) 2105-8691 - CEP: 17.525-902 - Marília - SP.





UNIVERSIDADE DE MARÍLIA



CEUA – Comitê de Ética em uso Animal

**CERTIFICADO**

CIAEP-01.0218.2014

Certificamos que o projeto intitulado “EFEITOS DA TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO NO PROCESSO DE REPARO DE DEFEITOS ÓSSEOS PREENCHIDOS POR HIDROXIAPATITA-FOSFATO TRICÁLCICO (QUALY BONE BCP) ASSOCIADO AO BIOPOLÍMERO DE FIBRINA” (Protocolo 011/2019) que envolve produção, manutenção e /ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto no 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado pelo COMITÊ DE ÉTICA EM USO ANIMAL (CEUA) DA UNIVERSIDADE DE MARÍLIA.

Vigência do projeto	Junho a dezembro de 2020
Espécie/linhagem	Ratos Wistar
Número de animais	56
Peso / Idade	250g
Sexo	Machos

Marília, 03 de junho 2019,



**Prof. Dra. Sandra Maria Barbalho**  
Vice Coordenadora do CEUA

Av. Higyno Muzzi Filho, 1001 - Campus Universitário - Marília - SP CEP: 17.525-902  
Fone (14) 2105-4087 – www.unimar.com.br