RODNEY CAPP PALLOTTA

Avaliação do Efeito da Radiação Laser de Baixa
Potência e do Plasma Rico em Fibrina na Reparação
Óssea em Ratos

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências

SÃO PAULO
2014

RODNEY CAPP PALLOTTA

Avaliação do Efeito da Radiação Laser de
Baixa Potência e do Plasma Rico em Fibrina na
Reparação Óssea em Ratos

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências

Área de Concentração: Farmacologia
Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Álvaro
Brandão Lopes Martins

Versão Original

SÃO PAULO
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Pallotta, Rodney Capp.

Avaliação do efeito da radiação laser de baixa potência e do plasma rico em fibrina na reparação óssea em ratos. / Rodney Capp Pallotta. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Inflamação e reparo tecidual.

Versão do título para o inglês: The effect of low level laser therapy and platelet rich-fibrin on bone repair in rats.

1. Reparo ósseo 2. Laser de baixa potência 3. Plasma rico em fibrina
4. Defeito ósseo 5. Concentrado plaquetário 6. Inflamação óssea I.
Martins, Prof. Dr. Rodrigo Álvaro Brandão Lopes II. Universidade de
São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB080/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Rodney Capp Pallota.

Título da Tese: Avaliação do efeito da radiação laser de baixa potência e do plasma rico em fibrina na reparação óssea em ratos.

Orientador(a): Prof. Dr. Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **169** nas fls. **80** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Rodrigo Álvaro B.Lopes Martins, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Avaliação do efeito da radiação laser de baixa potência e do plasma rico em fibrina na recuperação óssea em ratos** do qual participou(aram) o(s) alunos **Rudney Capp Pallotta, Luciano Ramos, Rodrigo Labat, Vanessa Godoi, Rafael Paolo Rossi**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **16.03.10**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 17 de março de 2010.

Prof.Dr.WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa.Dra.PATRICIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP

Dedicatória

Dedico este trabalho as pessoas que me aturaram durante este tempo todo ao comentar o que fazia dentro do meu trabalho e como solucionar determinados problemas.

Agradecimentos

Sou eternamente grato as pessoas que colaboraram com a elaboração, execução e resolução deste trabalho.

Primeiramente grato aos meus pais, Raul Pallotta Filho e Maria José Capp Pallotta, por dar o dom do aprendizado, pensamento e curiosidade, pois estes sentimentos são fundamentais a vida. A minha filha, Jully, que mesmo sem entender nada, ouvia e não reclamava das apresentações repetitivas de minha tese.

Depois aos meu colegas de bancada, Rodrigo Labat, Patrícia Almeida Silva, Maria Carla Petrelis, Rafael Paolo Rossi, Vanessa Godoi, Shaiane Tomazonni, Simone Teixeira, Lúcio Frigo que por muitas e muitas vezes ficamos até altas horas da noite e madrugadas fazendo experimentos e passando o tempo a toa, mas sempre com idéias inovadoras.

Agradeço aos meus colegas de trabalho, Roger Pinto Antônio, Frederico Jacy Monteiro, Pedro Capp, pela correlação entre a parte teórica com a clínica, muitas vezes sendo observada.

Resumo

Pallotta, R.C. Avaliação do Efeito da Radiação Laser de Baixa Potência e do Plasma Rico em Fibrina na Reparação Óssea em Ratos. [Tese de Doutorado (em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas; Universidade de São Paulo; 2014.

O reparo ósseo é regulado por fases: inflamatória, proliferativa e remodelação, sendo importante para a qualidade do osso. Terapias têm sido estudadas para ajudar neste processo, como Plasma Rico em Fibrina (PRF) e terapia a laser (LBP). No entanto os estudos são controversos. O objetivo deste estudo foi analisar o impacto da LBP com ou sem PRF no reparo após o defeito ósseo crítico em tibia de ratos. Os animais foram divididos em grupos: hígido, defeito sem tratamento, defeito tratado com 3 doses de LBP, PRF sozinho e associado com LBP. A fim de analisar o processo de reparo, a tibia foi removida após 1,3,7,14,21,30 e 60 dias após o procedimento, sem qualquer tipo de tratamento para análise histológica e bioquímica do curso de temporal. Após determinação do tempo ideal, analisamos os diferentes tratamentos. Os resultados mostram que o tempo de curso do procedimento de defeito ósseo induz um aumento de IL - 1 β e de fosfatase alcalina, sem alterações no TNF- α e IL-10 e diminuição de IL-6. Tratamento LBP induziu a expressão de IL-10 e inibir IL-1 β , TNF- α , IL-6 e fosfatase alcalina. O tratamento associado reduziu a fosfatase alcalina, TNF- α , IL-6 e aumento de IL-10.

Conclui-se que o tratamento combinado não apresentara melhora significativa no reparo ósseo.

Palavras-Chave: Laser de Baixa Potência. Reparo ósseo. Inflamação. Plasma rico em Fibrina. Laserterapia.

Abstract

Pallotta, R.C. The Effect of Low Level Laser Therapy and Fibrin-Rich Plasma on Bone Repair in Rats. Doctor. [Thesis in (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

The bone repair is regulated by phases : inflammatory, proliferative and remodeling and is important for bone quality . Therapies have been studied to help in this process , as Platelet Rich Fibrin (PRF) and laser therapy (LLLT) . However the studies are controversial . The aim of this study was to analyze the impact of LLLT with or without PRF repair after the critical bone defects in tibias. The animals were divided into groups : healthy male without blemish treatment , defect treated with 3 doses of LBP , PRF alone and associated with LLLT. In order to analyze the repair process , the tibia was removed after 1,3,7,14,21,30 and 60 days after the procedure , without any kind of treatment for histological and biochemical analysis of the course of time . After determining the optimal time , we analyze the different treatments . The results show that the time course of the procedure of defect induces an increase of IL - 1 β and alkaline phosphatase, without changes in TNF- α and IL-10 and reduced IL-6. LBP treatment induced the expression of IL -10 and inhibiting IL-1 β , TNF- α , IL-6 and alkaline phosphatase. The combined treatment decreased the alkaline phosphatase , TNF- α , IL-6 and increased IL-10. We conclude that combined treatment had not produced significant improvement in bone repair.

Keywords: Low Level Laser Therapy. Bone Repair. Inflammation. Platelet Rich-Fibrin. Lasertherapy.

Sumário

1 Introdução.....	10
1.1 Epidemiologia das Fraturas e/ou Defeitos ósseos.....	10
1.2 Controle da Formação Óssea.....	10
1.3 Papel das principais Citocinas envolvidas no reparo ósseo.....	14
1.4 Defeitos e Fraturas ósseas	17
1.5 Terapias para reparo ósseo.....	18
1.5.1 Concentrado plaquetário.....	19
1.5.1.1 Histórico e técnicas.....	19
1.5.1.2 Parâmetros e classificação.....	19
1.5.2 Laserterapia	22
1.5.2.1 Características da luz LASER.....	22
1.5.3 O Laser e sua ação.....	23
1.5.3.1 Terapias Anti-inflamatórias.....	23
1.5.3.2 Ação da irradiação da Luz Laser sobre tecido ósseo.....	25
2 Hipótese	27
3 Objetivos	28
4 Material e Métodos.....	29
4.1 Animais.....	29
4.2 Confeção de defeito ósseo no osso tibial.....	29
4.2.1 Determinação do tempo de evolução da doença.....	29
4.2.2 Divisão dos grupos experimentais.....	30
4.2.3 Protocolo de tratamento	30
4.3 Confeção de concentrado plaquetário (PRF).....	31
4.4 Análises bioquímicas.....	31
4.4.1 Quantificação de IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10 do osso tibial pelo método de ELISA.	31
4.4.2 Quantificação de Fosfatase Alcalina no soro sanguíneo circulante pelo método de ELISA.....	32
4.5 Análise Histológica	33
5 Resultados.....	34
5.1 Análise dos parâmetros Bioquímicos durante o reparo ósseo	34
5.2 Análise de determinação do tempo de evolução do reparo ósseo	39
5.3 Análise Comparativa dos Níveis de Citocinas nos diferentes grupos tratados	49
5.4 Análise Histológica dos Cortes Histológicos entre os diferentes tratamentos realizados	56
6 Discussão	65
Referências *	75

1 Introdução

1.1 Epidemiologia das Fraturas e/ou Defeitos ósseos

Mais de 6,2 milhões de fraturas ósseas ocorrem nos Estados Unidos a cada ano, sendo que aproximadamente 10% evoluem para complicações na sua reparação óssea, por diversos motivos. Mesmo com a maioria das fraturas evoluindo para um reparo adequado, mais de 30 milhões de dias de trabalho são perdidos à cada ano devido a incapacidade do paciente em realizar suas atividades diárias, levando a uma enorme perda de produtividade e renda (1).

A intervenção por agentes externos para acelerar a reparação óssea torna-se interessante pela possibilidade de reabilitação destes pacientes para que estes possam retornar às suas atividades normais. Atingir este objetivo é a meta, no entanto é essencial expandir nossa compreensão sobre as etapas interdependentes de reparo das fraturas e de como elas contribuem para um osso biomecanicamente funcional (2).

1.2 Controle da Formação Óssea

O reparo ósseo é um processo que recapitula aspectos do desenvolvimento e crescimento do esqueleto, envolvendo diversos componentes extracelulares, celulares e fatores de crescimento. O reparo ósseo histologicamente é dividido em quatro fases, caracterizadas por eventos celulares e moleculares específicos baseados em décadas de observação do reparo ósseo em modelos animais e humanos, embora na prática é difícil a delimitação (1).

Os mecanismos envolvidos do reparo ósseo podem ser celulares através de fatores inflamatórios, vasculares, precursores osteocondrais e osteoclastos e moleculares através da presença de determinadas citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento pró-osteogênicos e fatores angiogênicos; responsáveis pelo recrutamento celular e por estimular a diferenciação e crescimento (1,2).

O modelo de reparação óssea em 04 estágios

1º Estágio: INFLAMAÇÃO

Após a fratura óssea há um rompimento da integridade tecidual, interrompendo a função vascular normal e distorcendo a arquitetura óssea, provocando reação inflamatória inespecífica. O extravasamento vascular dentro do leito acometido é composto de plaquetas degranuladas, macrófagos e outras células inflamatórias (granulócitos, linfócitos e monócitos) e cada componente é responsável pelas seguintes funções: combate de infecções, secreção de citocinas e fatores de crescimento. Outra característica histológica é a presença de trombo fibrocartilagenoso. (1,2)

A resposta celular coordena e envolve a secreção de diversas citocinas e fatores de crescimento, incluindo fator de transformação β (TGF- β), fator de crescimento de derivação plaquetária (PDGF), fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF-2), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF), interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6), proteína óssea morfogenética 2 (BMP-2) e fator de necrose tumoral α (TNF- α). Estes marcadores celulares são responsáveis pelo início da cascata do reparo ósseo (IL-1, IL-6 e TNF- α) e início da formação do calo ósseo (TGF- β , PDGF, BMP-2). (1,2)

2º Estágio: FORMAÇÃO DO CALO FIBROCARILAGINOSO

Devido o reparo ósseo possuir algum nível de instabilidade mecânica, a reparação é feita através da ossificação endocondral, ou seja formação óssea precedida de matriz cartilaginosa. (1,2)

As células dominantes da matriz são os condrócitos e fibroblastos, responsáveis pelo suporte mecânico da reparação óssea e a produção de calo ósseo semi-rígido, a princípio avascular q será substituído gradativamente por osso medular vascularizado. Os condrócitos provenientes de células progenitoras mesenquimais se proliferam e sintetizam tecido fibrocartilagenoso / granulomatoso, que depois é substituído por cartilagem. Esta cartilagem cresce e margina um centro fibrocartilagenoso unindo-se ao centro dos fragmentos fraturados e este estágio é

caracterizado morfológicamente pela presença de condrócitos hipertrofiados que mineralizam a matriz cartilaginosa antes da apoptose. (1,2)

Os principais sinalizadores celulares da condrogênese e começo da ossificação endocondral são o TGF- β 2 e 3. Já na proliferação celular durante a ossificação intramembranosa, seja na proliferação de fibroblastos ou na proliferação e diferenciação celular os responsáveis são BMP-5 e 6. Em relação ao crescimento vascular as angiopoietinas I e II são responsáveis pelos vasos maiores e irrigação acessória dos vasos já existentes e seu sinalizador é o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). (1,2)

3º Estágio: FORMAÇÃO DO CALO ÓSSEO PRIMÁRIO

Estágio com maior atividade osteogênica, ou seja, maior nível de atividade de osteoblasto e formação de matriz óssea mineralizada, caracterizando assim a formação óssea primária ou calo ósseo primário, este com formato irregular. A formação deste calo ósseo primário independe em alguns casos do suporte cartilaginoso, acontecendo simplesmente fenômeno de aposição e reabsorção óssea. (1,2)

O início de formação da matriz celular óssea depende da combinação dos proteínáceos e matriz extracelular mineralizada, medida pela presença de M-CSF e RANKL (ligante do receptor ativador de ligante NF- κ B), sintetizada por osteoblastos maduros, diferenciados à partir de osteoprogenitores na presença de fatores osteogênicos membros da família da BMP (proteína morfogenética) BMP-3, BMP-4, BMP-7 e BMP-8. (1,2)

Esta fase é caracterizada por ampla rede de vasos sanguíneos formados por diversos fatores de crescimento como VEGF e BMP-5 e 6, fundamentais na formação óssea responsáveis pelo aumento do aporte sanguíneo do local afetado e neoformação óssea pela diferenciação de osteoblasto. (1,2)

4º Estágio: REMODELAMENTO ÓSSEO

O estágio final do reparo ósseo é caracterizado por um remodelamento visando seu retorno ao formato ósseo original, atuando diretamente no calo ósseo secundário.

Inicialmente há conversão da matriz óssea irregular em osso, processo regulado pela reabsorção seguida de formação óssea; as células osteóides têm papel fundamental na proteólise de elementos osteóides antes deste evento. (1,2)

A célula principal envolvida no fenômeno de reabsorção da mineralização óssea é o osteoclasto que origina da diferenciação e fusão de células hematopoiéticas. Estes aderem na superfície mineralizada formando um espaço preenchido por ácido e proteinases, provocando sua desmineralização. Os produtos da degradação são removidos principalmente por macrófagos. Após a reabsorção da matriz, os osteoclastos tornam-se inativos e sofrem apoptose, estimulando a ativação de osteoblastos na superfície erosiva. (1,2)

1.3 Papel das principais Citocinas envolvidas no reparo ósseo

Neste processo, a presença de substâncias bioativas secretadas por osteoblastos são de fundamental importância para a indução, sobrevivência e manutenção do osteoclasto, sendo elas IL-1, IL-6 e o receptor ativador de ligante NF- κ B (RANKL) que coordenam o processo de formação e reabsorção óssea. A osteoprotegrina (OPG) e o TGF- β também participam deste processo. O primeiro antagoniza a diferenciação de osteoclasto e a redução do segundo é traduzido pela diminuição do estabelecimento da medula óssea. (1,2)

IL-1 β ;

Esta quando aumentada durante o processo inflamatório, modula a proliferação e diferenciação de células esqueléticas in vivo, e afeta o seu crescimento in vitro, e participa da interação entre elas, como por exemplo a proliferação de osteoblastos durante a fase aguda do reparo ósseo; ela inibe a proliferação e diferenciação de condroblastos.(6)

A interação celular descrita leva a proliferação e mineralização de pré-osteoblastos, tendo atividade osteoblastogênica; quando associado com a presença de TNF, eles convergem para o NF- κ B promovendo a aumento das concentrações de COX-2, sendo este essencial para a diferenciação de osteoblastos in vivo (6,7).

A ação desta citocina é bimodal, tendo altas concentrações na fase inicial, inflamatória, e durante o remodelamento. Por este dado ela pode regular a diferenciação de células tronco na diferenciação e formação da cartilagem no reparo da fratura (5,6,7).

TNF- α ;

Os osteoclastos são células multinucleadas formadas pela fusão de células mononucleadas (monócitos); assim que formadas a sua ativação é feita por duas vias de sinalização, a primeira pelo fator de estimulação de colonização de macrófagos (M-CSF), o qual sinaliza seu receptor c-Fms, e a segunda pela via do RANKL ativando seu receptor. Estudos com ratos knockout para M-CSF ou RANKL

não formam osteoclastos e possuem osteopetrose, logo esta citocina possui papel catabólico na inflamação e no reparo tecidual.(3,4,5)

Terapias anti-TNF foram aplicadas em diversos casos de doenças inflamatórias sérias, como artrite reumatóide, degeneração do disco intervertebral, dentre outros e pode promover a regeneração de doenças articulares. (4,5)

Durante o reparo ósseo, o TNF está envolvido na reparação subcondral e cartilaginosa, e quando bloqueado nos processos iniciais, até 2 semanas da confecção do defeito ósseo, levam a uma melhor reparação, se comparados com a inibição por períodos maiores, sendo prejudiciais, concluindo que inflamações intensas interferem na reparação tecidual, gerando efeitos adversos. A remodelação completa da cartilagem e osso subcondral é importante para reestabelecer as funções mecânicas e biológicas,

IL-6;

A inflamação é o componente chave para reparação tecidual e óssea, a leucocitose é parte deste fenômeno e integra a reparação, o infiltrado neutrófilico, particularmente, é aliado para estabelecer a condrogênese e ossificação endocondral. A IL-1 é liberada nos primeiros momentos do processo inflamatório, tendo papel proliferativo e catabólico, também estimula a expressão de IL-6 pelos osteoblastos, alterando a homeostase e reparo ósseo, quando presente produz de RANKL pelos osteoblastos, e em troca cataliza a formação de osteoclastos, e estudos demonstram níveis elevados durante o remodelamento do calo intramembranoso assim como o remodelamento ósseo secundário associado a ossificação endocondral. (2,4)

A IL-6 está associada a osteoclastogênese, enquanto o M-CSF e RANKL são quimiocinas que causam a proliferação e diferenciação final dos pré-osteoclastos, esta citocina tem papel dualístico na inibição direta dos precursores de osteoclastos e aumento direto do RANKL pelos osteoblastos, porém em animais knockouts observa-se redução de RANKL, mas não sua erradicação, tanto que estudos demonstram redução nos números de osteoclastos por volta de 2 semanas se comparados com ratos normais, gerando osso com maior rigidez durante o processo

de reparo, sugerindo menor remodelamento ósseo e maior período para atingir o osso intacto. (1,2,4,5)

IL-10;

Para o acontecimento do reparo ósseo é necessária a inflamação, porém quando intensa ela produz perda óssea, como em doenças como a artrite reumatóide e periodontite, e sua presença ativa mecanismos que a restringem e limitam a perda ou dano tecidual. (7,8)

O mecanismo de formação de osteoclastos é feito pela indução dos fatores inflamatórios, caso das citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF), pela indução do derramamento e ativação de receptores M-CSF, levando a um aumento de ligante RANK. (7)

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, atuando na supressão de citocinas inflamatórias, e no caso do reparo ósseo ela diminui potentemente a expressão de RANKL, este conhecido como regulador principal da osteoclastogênese. (6,7)

Figura 1 – Desenho esquemático do papel das citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10 no recrutamento, diferenciação e funcionamento de células durante o reparo ósseo. Atuação das principais citocinas, estimulando (+) ou inibindo (-) a via para recrutar células osteoprogenitoras e originar os osteócitos ou formar e diferenciar os osteoclastos. Observamos que a IL-1 e IL6 estimulam a migração de células osteoprogenitoras para formação de osteoblastos; e com ação dual, a IL-6 estimula a produção de ligante RANK, este atuando em conjunto com o M-CSF, com seus níveis aumentados na presença de TNF- α , estimula a formação e ativação de osteoclastos, em compensação, quando há altos níveis de IL-10, o processo é invertido, pois inibe a reabsorção óssea e aumenta a deposição de matriz extracelular.

1.4 Defeitos e Fraturas ósseas

Segundo estimativas do centro de controle e prevenção de doenças do governo dos EUA, em 2004 houve mais de 320.000 internações hospitalares por fratura de quadril, na maioria em idosos, um aumento de 3% se comparado ao período de 1996 à 2004. Em relação aos defeitos ósseos, estes geralmente estão

associados à deformidades congênitas e neste caso os numeros foram de 120.000 nascimentos com deformidades congênitas ósseas em 2002. (3,4)

As fraturas ósseas ocorrem por diversas razões como: traumas diretos, seja ele por arma de fogo ou acidentes, torções ou quedas. Essas fraturas causam diversos danos teciduais ao seu redor como: irritação nas terminações nervosas (dor), sangramentos, espasmos musculares e deformidades em alguns casos. (3,5)

Existem diversas formas de descrição de fraturas ósseas, sendo elas:

- Exposta ou não: quando existe o rompimento da integridade da pele, podendo haver comunicação do meio interno com o meio externo.
- Descrição do traço de fratura: se a fratura rompe por total a região cortical óssea ela é considerada completa, porém, se houver apenas o rompimento parcial, ela recebe o nome de galho verde; Quando existe uma fratura com presença de diversos pedaços, recebe o nome de cominuta e quando há mais de um local fraturado recebe o nome de fratura composta. (2,3,4,5,9,10)

1.5 Terapias para reparo ósseo

O tratamento das doenças ósseas é bem amplo e depende do diagnóstico e da extensão da lesão. Em casos de fraturas elas podem variar, desde tratamentos mais conservadores, como por exemplo a completa imobilização do osso afetado com utilização de diversos materiais tais como curativos de gesso ou contensores ou por intervenções cirúrgicas para ter acesso à fratura e colocação de biomateriais para sua correção.

Os defeitos ósseos provenientes de malformações congênitas ou de seqüelas cirúrgicas, como na remoção de tumores ou de traumas não corrigidos ou muito extensos, são corrigidos através de enxertia óssea, colocação de próteses biocompatíveis e mais recente através da engenharia tecidual, como por exemplo a utilização de substâncias indutoras de formação óssea (BMPs), tecidos sintéticos e concentrados plaquetários, como utilizado neste trabalho.

1.5.1 Concentrado plaquetário

1.5.1.1 Histórico e técnicas

Inicialmente, o concentrado plaquetário foi utilizado para tratamento e prevenção de hemorragia em casos severos de trombopenia e denominava-se plasma rico em plaquetas (PRP), com concentração de $0,5 \times 10^{11}$ de plaquetas por dL de sangue. Os produtos derivados do sangue foram primeiramente utilizados há aproximadamente 40 anos atrás para o fechamento de feridas e para estimular a cicatrização com o uso da cola de fibrina (11,12).

As plaquetas possuem altas quantidades de fatores de crescimento, PDGF, TGF- β e VEGF, sendo capazes de estimular a proliferação celular, angiogênese e remodelamento da matriz e o seu uso para melhorar a cicatrização em alguns casos apresenta um real benefício. Os concentrados são fornecidos comercialmente em diversos kits, protocolos e centrífugas específicas e em sua maioria são chamados de PRP.(11,12,13)

Para a confecção destes concentrados plaquetários, o sangue é recolhido com ou sem uso de anticoagulante, dependendo da forma em que será utilizado, sendo imediatamente centrifugado por uma ou diversas vezes e após isto ele fica disponível para aplicação na terapia desejada. A forma mais recente disponível de concentrado plaquetário é o plaqueta rica em fibrina (PRF) de Choukroun's. Neste caso, o sangue é coletado sem anticoagulante e imediatamente centrifugado, onde ocorre sua coagulação natural fornecendo um gel rico em fibrina e leucócitos, sem a necessidade de modificação bioquímica do sangue, ou seja sem anticoagulantes, trombina ou cloreto de cálcio, tendo a vantagem de não causar nenhum tipo de reação no organismo a ser implantado. (11, 14)

1.5.1.2 Parâmetros e classificação

Há diversos tipos de concentrados plaquetários com diversas características, por este fato é necessária a classificação de acordo com:

- Relação à preparação dos kits e centrifugações, como por exemplo a duração do procedimento, custo dos equipamentos e kits, tamanho da centrífuga e a ergonomia do kit e complexidade do procedimento;(15,16)
- Segundo com relação a concentração do que contém o concentrado, como o volume final, eficácia na coleta de plaquetas e leucócitos e sua preservação durante o processo; (15,16,17)
- Avaliação quanto a rede de fibrina, avaliando a concentração de fibrinogênio durante a preparação, sua polimerização e integridade no processo.(15,16)

Diante deste processo de classificação, as diferenças entre: Plasma rico em plaquetas e pobre em leucócitos (P-PRP), Plasma rico em plaquetas e leucócitos (L-PRP), Plasma pobre em fibrina e pobre em leucócitos (P-PRF), Plasma rico em fibrina e pobre em leucócitos (L-PRF: Choukroun's) são feitas de acordo com a tabela abaixo, de acordo com a definição dos parâmetros elucidados abaixo: (15,16,17)

Tabela de Definição dos parâmetros

Parâmetros	Subparâmetros	Definição
Preparação do Kit e centrifugação	Tamanho e peso da centrífuga necessária para o método	<ul style="list-style-type: none"> • Pesada • Leve e compacta • Pesada mas potencialmente leve
	Duração do procedimento (da coleta ao uso)	<ul style="list-style-type: none"> • Rápido (-20min) • Longo (20-60min) • Muito Longo (+1h)
	Custo	<ul style="list-style-type: none"> • Muito barato (-€5) • Barato (€5-€50) • Caro (+€50)
	Ergonomia	<ul style="list-style-type: none"> • Muito simples (++) • Simples (+) • Complexo (-) • Muito complexo (--)
Plaquetas e leucócitos	Volume final (relacionado com a amostra inicial de sangue)	<ul style="list-style-type: none"> • Grande (+25%) • Pequeno (-25%) • Variável
	Eficiência da coleção de plaquetas e leucócitos	<ul style="list-style-type: none"> • Excelente (+80%) • Bom (40-80%) • Baixo (-40%) • Desconhecido algumas vezes • Sem leucócitos, devido a técnica
	Preservação dos Leucócitos e plaquetas	<ul style="list-style-type: none"> • Saudáveis • Danificados • Desconhecidos • Ativados, quando a centrifugação é induzida durante a centrifugação

Fibrina	Concentração de Fibrinogênio e densidade de fibrina	<ul style="list-style-type: none"> • Alta densidade • Baixa densidade
	Tipo de polimerização da fibrina	<ul style="list-style-type: none"> • Forte, principalmente trimolecular ou junção equilateral • Fraca, principalmente tetramolecular ou junção bilateral

Devido a todos estes parâmetros de classificação, o PRF é o melhor dentre todos, pois apresenta fácil manipulação, sendo necessária somente coleta da amostra SEM uso de anticoagulante, e única centrifugação, volume final alto, com altas quantidades de leucócitos e rede de fibrina íntegra e com forte ligação molecular, além de não provocar reações alérgicas devido ao acréscimo de substâncias químicas. (15,1,17,18)

1.5.2 Laserterapia

A palavra **Laser** origina-se do acrônimo (palavra formada pelas iniciais de outras palavras) de **L**ight **A**mplification by **S**timulated **E**mission of **R**adiation, ou Amplificação da luz por emissão estimulada de radiação. Deriva por analogia de outro acrônimo: **MASER**, ou Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation. O maser foi o princípio dos estudos que conduziram os pesquisadores à descoberta do laser (19).

1.5.2.1 Características da luz LASER

O decaimento espontâneo de um dos átomos para o estado fundamental começa a provocar a emissão estimulada dos demais átomos e conseqüente produção de luz. Somente a luz que se propaga ao longo do eixo principal do laser é que vai sofrer as várias reflexões no interior da cavidade ressonante, fazendo com

que haja emergência de um feixe de luz. As principais características desse feixe emergente são as seguintes: (20,21,22)

- A luz laser é monocromática - a energia carregada pelo fóton estimulante e pelo fóton emitido são as mesmas. Portanto, a luz laser é composta de apenas um comprimento de onda, enquanto uma fonte de luz incandescente é formada por vários comprimentos de onda.
- A intensidade do feixe laser pode ser extremamente grande, ao contrário das fontes de luz convencionais. Sua potência pode atingir ordens de tera watt (10^{12} W). Essas grandes intensidades ocorrem em lasers pulsados, onde a energia acumulada em longo tempo é emitida toda em um intervalo de tempo muito pequeno, da ordem de 10^{-12} s.
- Caráter direcional do feixe laser - o feixe resultante é constituído de ondas caminhando na mesma direção; ou seja, todo feixe propaga-se na mesma direção, havendo um mínimo de dispersão.
- Coerência - a radiação é espacialmente coerente se as ondas sucessivas da radiação estão em fase e temporalmente coerente se os trens de onda têm todos a mesma direção e o mesmo comprimento de onda (20,23,24).

1.5.3 O Laser e sua ação

1.5.3.1 Terapias Anti-inflamatórias

Embora o uso de laser nas mais diversas áreas da medicina, odontologia, fisioterapia venha crescendo vertiginosamente nas duas últimas décadas, o conhecimento básico de seu funcionamento ainda é muito deficiente pelos profissionais, principalmente aqueles que não foram especificamente treinados.

No Brasil, a introdução da tecnologia do laser foi bastante tardia em comparação com outros países, principalmente Europa e Estados Unidos. Os trabalhos pioneiros nesta área remontam à segunda metade da década de 80. (20,21)

O efeito de estimulação com Laser de Baixa Potência (LBP) depende do comprimento de onda, da dose e da intensidade da luz utilizada na irradiação (25)

A coerência é uma das propriedades da luz laser, como citada acima, mas ao penetrar no tecido, esta propriedade se perde nos primeiros extratos da pele. Isto ocorre devido à grande variedade de estruturas celulares que compõe a pele (26). Segundo esses autores, apesar da perda da coerência da radiação do LBP no interior dos tecidos, esta é absorvida pelas células gerando alterações no seu metabolismo tanto em tecidos superficiais como profundos (27,28).

Acredita-se que a ação do laser de baixa potência sobre o tecido está relacionado a possibilidade dele inibir o aparecimento de fatores quimiotáticos nos estágios iniciais da inflamação; de interferir com os efeitos dos mediadores químicos induzidos pela inflamação (26,27,28,29,30,31); inibir a síntese das prostaglandinas além de inibir o esfíncter pré-capilar, através de mediadores químicos. Estudos adicionais sobre o efeito anti-inflamatório do laser de baixa potência ainda se fazem bastante necessários. (32,33)

O uso de laser na prática clínica para o efeito anti-inflamatório em diferentes patologias baseia-se em um número já razoável de publicações de caráter científico. Nos últimos anos, inúmeros estudos clínicos aleatorizados, placebo-controle foram realizados, fazendo com que a Terapia Laser já seja considerada como alternativa terapêutica para várias doenças.

Recentemente, vimos acumulando experiência em trabalhos experimentais e clínicos com a aplicação do Laser da Baixa Potência em diferentes situações. (20-48). Durante este tempo, fomos capazes de caracterizar o efeito da Terapia com Laser de Baixa Potência na reação inflamatória de edema de pata, pleurisia e dermatite, hiperreatividade de vias aéreas em ratos e camundongos, e tendinite de Tendão de Aquiles em humanos. No entanto, é muito importante ressaltar que muito pouco se conhece a respeito do mecanismo de ação dos lasers infra-vermelhos. Neste sentido, os estudos experimentais com estes comprimentos de onda assumem grande relevância para o esclarecimento do mecanismo de ação da terapia. Atualmente os lasers de comprimento de onda na faixa do infra-vermelho são os mais utilizados em doenças inflamatórias articulares e músculo-esqueléticas, sem sombra de dúvida.

Tendo em vista os dados apresentados anteriormente, a importância da utilização de terapias não medicamentosas representa um fator altamente relevante para o Sistema de Saúde, especialmente em países subdesenvolvidos. No entanto,

o estabelecimento de parâmetros clínicos para a utilização desta técnica se faz ainda extremamente necessário. (37-39)

1.5.3.2 Ação da irradiação da Luz Laser sobre tecido ósseo

Os efeitos da luz laser sobre os tecidos começaram a ser descrita por Mester e cols em 1972, observando a acelerada reparação da ferida na pele. Posteriormente, foram realizados estudos sobre diversos modelos experimentais envolvendo outros tecidos, onde foi ratificado tal fato (42,43,44).

No mundo há diversos casos de traumas ósseos, estes causados por acidentes de origens diversas ou atos cirúrgicos, e patologias ósseas, dentre eles os tumores e cistos ósseos. O efeito causado pela fototerapia de aceleração da reparação óssea, pode representar um benefício em potencial, pois; Melhora o pós-operatório do paciente, Diminui o tempo de recuperação com sessões de reabilitação dos movimentos articulares; Gera menores perdas financeiras à economia, onde o indivíduo retorna ao trabalho e às atividades diárias em menor tempo (42,45-50).

Devido à propriedade de reparação tecidual acelerada, foram realizados estudos em diferentes modelos experimentais de laboratório e estudos clínicos, na tentativa de desvendar o mecanismo de ação e as alterações de sinalização celular nas áreas irradiadas pela luz laser (51,52).

Inúmeros trabalhos comprovam a reparação óssea acelerada, com a quantificação por cortes histológicos e observações clínicas, porém o mecanismo ação da fototerapia sobre a superfície óssea não foi bem esclarecido, apenas foi esclarecido em diversos estudos que a fototerapia não age sobre a osteossíntese óssea diretamente, e sim cria uma série de condições ambientais melhorando a reparação óssea, acelerando a proliferação e diferenciação celular (45-47). É importante ressaltar, que para a ocorrência da aceleração da proliferação e diferenciação celular são necessários o aumento de diversas substâncias bioativas, dentre elas os fatores de crescimento e citocinas, citados anteriormente (49,50).

Segundo estudos, a laserterapia agiria modulando diversos processos metabólicos aumentando o potencial regenerativo dos tecidos. Em trabalhos recentes, GERBI e cols, constataram histologicamente um menor período de integração entre o tecido ósseo e os biomateriais, BMPs e enxertos ósseos

liofilizados, em animais submetidos à irradiação à laser diariamente por quinze dias (49,52).

Este e outros trabalhos observaram este mesmo efeito in vivo e in vitro, porém, sugerem modulação de diversos fatores de crescimento, dentre eles o IGF, PDGF e BMPs; diversas citocinas, como IL-1 β e TNF- α , no período mais inicial da reparação óssea; além de fatores teciduais como aumento da deposição de colágeno tipo I e II (46-60).

2 Hipótese

Visto que o Plasma Rico em Plaquetas, assim como a radiação laser de baixa potência parecem acelerar o processo de reparação tecidual, pensamos que a associação das duas terapias pode resultar em uma ação sinérgica, potencializando a reparação óssea.

3 Objetivos

O presente trabalho visa investigar os efeitos da associação entre as terapias com plasma rico em fibrina e laser de baixa potência na reparação óssea, utilizando modelo experimental de defeito ósseo em tíbia de ratos.

4 Material e Métodos

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 150 e 200g (+/- 60 dias de vida), com livre acesso a água e ração, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada e ciclo claro/escuro de 12 horas.

4.2 Confecção de defeito ósseo no osso tibial

Os animais foram anestesiados com auxílio de ketamina (90 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) e fixados em mesa de cortiça.

À seguir Foi realizado incisão sobre a pele na parte postero-lateral da tíbia à direita, divulsão dos planos subcutâneos e musculares, acesso ao perióstio da tíbia na região proximal, confecção de furo 04 mm abaixo da articulação do joelho com auxílio de broca com 05 mm de comprimento e 1.3 mm de espessura. Após confecção de furo os animais foram ou não tratados, dependendo do grupo que pertence, para assim realizar a sutura por planos.

4.2.1 Determinação do tempo de evolução da doença

Após os animais serem submetidos à confecção de defeito ósseo, há necessidade de determinar os parâmetros de recuperação óssea por aspectos histológicos e bioquímicos.

De acordo com a literatura, a reparação óssea completa se dá em longos períodos, por este fato os animais submetidos à procedimento sem tratamento foram observados no período de: 1º, 3º, 7º, 14º, 21º, 30º e 60º dia após realização de procedimento, para determinação dos parâmetros bioquímicos e histológicos.

4.2.2 Divisão dos grupos experimentais

Após a determinação dos parâmetros bioquímicos e histológicos através do curso temporal da defeito ósseo, os animais foram divididos em grupos de 05 animais cada e submetidos imediatamente a diversos tratamentos, conforme especificado abaixo:

Grupo I – Íntegro: sem procedimento cirúrgico.

Nos demais grupos foi realizada a confecção do defeito ósseo e tratado conforme descrito abaixo:

Grupo II – Controle: sem tratamento.

Grupo III – PRF: tratado com PRF.

Grupo IV – Laser 1J

Grupo V – Laser 3J

Grupo VI – Laser 6J

Grupo VII – PRF + Laser 1J

Grupo VIII – PRF + Laser 3J

Grupo IX – PRF + Laser 6J

4.2.3 Protocolo de tratamento

Foi utilizado o Laser Diodo de Baixa Intensidade Thera-laser (DMC®, - Brasil), com os seguintes parâmetros:

- comprimento de onda de 810nm

- potência de 100mW, ondas contínua.

Foram utilizadas energias de 1, 3 e 6 Joules.

O tratamento Laser foi realizado sobre a pele, durante sete dias consecutivos, começando no pós-operatório imediato. As irradiações foram realizadas no período da manhã.

Após o período definido de acordo com a curva temporal, os animais foram anestesiados com auxílio de Hidrato de cloral à 10% (0,2ml/100g), e sacrificados por descolamento cervical, para coleta de osso tibial direito.

4.3 Confeção de concentrado plaquetário (PRF)

A obtenção de PRF foi realizada pela primeira vez por Choukroun e colaboradores em 2005, com a vantagem de eliminar os riscos associados com o uso de trombina bovina, descritos acima. O PRF é obtido por uma sequência de preparações descritas abaixo:

Através de punção cardíaca foi coletado 500µl de sangue, transferido para eppendorf sem anticoagulante e colocado imediatamente em centrífuga (ANVLAB) com velocidade de 2.700rpm por 12 minutos. O produto resultante é constituído por três camadas, a superior constituída por plasma pobre em plaquetas, o meio formado por PRF e a inferior contendo células sanguíneas vermelhas.

Para a obtenção correta do PRF é necessário a rápida coleta sanguínea e sua imediata centrifugação antes da formação dos eventos de coagulação. O PRF é obtido em forma de membrana pela simples eliminação dos fluidos da amostra sanguínea.

4.4 Análises bioquímicas

4.4.1 *Quantificação de IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10 do osso tibial pelo método de ELISA.*

Após a remoção do osso tibial, realizou o congelamento rápido e a seguir a pulverização da amostra com auxílio de pulverizador. O material coletado foi posto em solução tampão (TRIS 50mM pH7,4 + inibidor PMSF 0,5M), e homogeneizado por 30 segundos com haste especial acoplada a homogeneizador.

Após formar homogenato, elas foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos. Em seguida o sobrenadante foi separado e armazenado à temperatura de -80 °C até sua utilização.

O método de quantificação utilizado foi o de “dual set”. As placas de ELISA foram tratadas para a colocação de anticorpo específico.

Em cada poço da placa foi adicionado 100 µl de solução contendo anticorpo de captura específico em diferentes concentrações para IL-1 β (14,4 µg), TNF- α , IL-6, e IL-10 ((72 µg) à 4 °C sob agitação por 12 horas. Após esse período colocou-se 100

μl de reagente diluente (Albumina sérica bovina à 1% diluída em solução PBS) sobre cada poço da placa, por um período de 01 hora sobre o agitador. Após 1 hora as placas foram lavadas e secas para formação de curva padrão e quantificação das amostras e em cada poço da placa foi adicionado 100 μl da amostra ou da curva padrão e permaneceram por 12 horas a temperatura de 4 °C sem agitação. Após este período foi realizada a detecção das citocinas através de aplicação de anticorpo específico em diferentes concentrações em cada poço da placa: IL-1β (6,3 μg), TNF-α (4,05 μg), IL-6 (7,2 μg), IL-10 (5,4 μg) por 02 horas.

Para iniciar a revelação da reação foi adicionado 100 μl de solução de estreptavidina-HRP à cada poço da placa, deixando os poços protegidos da luz e sob agitação durante 20 minutos; a seguir a placa foi lavada com solução específica e adicionado 100 μl de solução de substrato (H₂O₂ e Tetrametilbenzidina em proporções iguais) em cada poço da placa. A reação de revelação é interrompida com a adição de 50μl de solução de parada (ácido Sulfúrico 2N).

As leituras das placas foram realizadas em leitor de ELISA (Espectra Max plus 384, EUA) a 450 nm e corrigidas a 540 nm.

4.4.2 Quantificação de Fosfatase Alcalina no soro sanguíneo circulante pelo método de ELISA.

Antes da eutanásia dos animais, é coletado sangue com auxílio de seringa acoplada a agulha sem o uso de anticoagulante através da punção cardíaca nos ratos.

Após 10 minutos da coleta, o tubo contendo a amostra de sangue é então centrifugado a 5.000 rpm por 03 minutos para a separação do soro e parte vermelha do sangue; o soro é então colocado em novo tubo, e armazenando em freezer, à temperatura de -80 °C até sua utilização.

A reação para detecção dos níveis de fosfatase alcalina é confeccionada da seguinte maneira:

Primeiramente, é misturado solução tampão contendo Dietanolamida (DEA) contendo cloreto de magnésio com solução de substrato, que contém p-nitrofenil fosfato (p-NFF), na proporção 04:01, respectivamente. Este reagente é incubado por alguns minutos.

Enquanto ocorre a incubação, em placa de ELISA, coloca-se 2 µl da amostra em cada poço da placa; a este é adicionado 200 µl de reagente único, previamente incubado.

A absorbância é feita no comprimento de onda 405 nm a 37 °C, no período de 03 minutos e 20 segundos, iniciando a leitura 20 segundos após começo da reação, havendo outras leituras em 1, 2 e 3 minutos após a primeira leitura, o cálculo é feito pela absorbância de Fosfatase alcalina (U/l) a 405 nm = $\Delta A/\text{min} \times 5.460$. Determinar a diferença da média de Absorbância/min ($\Delta A/\text{min}$), subtraindo cada leitura da anterior e fazendo a média dos valores. Utilizar esta média para os cálculos.

4.5 Análise Histológica

Microscopia de luz (óptica)

As amostras do tecido foram fixadas em formol a 10% por um período de 72 horas. Posteriormente as amostras foram desidratadas e submetidas a uma série gradativa de banhos de álcool, começando com 50% e progredindo até o álcool absoluto 100% (SYNTH). Em seguida o tecido Foi diafanizado com Xilol por 4 horas (SYNTH) para impregnação (embebição) e inclusão em Paraplast ® das amostras. Em seguida, estas foram colocadas em recipientes de alumínio adequados, com Paraplast ® fundido por 4 horas. Após a impregnação, as amostras foram colocadas em um pequeno recipiente coberto com parafina fundida e deixadas para endurecer, formando um bloco contendo o tecido. Para a microtomia foram realizados cortes com 5 µm de espessura em micrótomo LEICA RM 2125 RT, e foram levados e colocados em banho-maria. Uma vez precedido o preparo das amostras os cortes foram colocados em lâminas para serem corados, com o corante Hematoxilina-Eosina (H.E.). Após a coloração os cortes foram montados em lâminas permanentes para posterior análise ao microscópio óptico e fotografadas através de sistema de microfotografia (Olympus System Microscope Model CX 41 – Olympus PM10SP Automatic Photomicrographic System).

5 Resultados

5.1 Análise dos parâmetros Bioquímicos durante o reparo ósseo

interleucina-1 (IL-1) durante o reparo ósseo. Curso temporal. (***) $p < 0,001$ vs dia 0).

É observado aumento dos níveis locais de Interleucina-1 até 21 dias de pós-operatório de indução do defeito ósseo, após esse período há redução em seus níveis por volta de 40 a 60 dias após a confecção do mesmo

Figura 3 – Quantificação dos níveis de Fator de Necrose Tumoral- α durante o reparo ósseo. Curso temporal.

É observado durante o reparo ósseo a presença de dois aumentos dos níveis do mesmo, um com 07 dias e outro com 40 dias após a indução de defeito ósseo, porém não sendo significativo.

Figura 4 - Quantificação dos níveis de interleucina-6 durante o reparo ósseo. Curso temporal.

Observa-se que os níveis de interleucina-6 nos primeiros 14 dias não se alteram, há uma tendência de diminuição com 21 dias depois da indução de defeito ósseo, após este período os níveis voltam a normalidade.

Figura 5 - Quantificação dos níveis de interleucina-10 durante o reparo ósseo. Curso temporal. (* $p < 0,05$ vs dia 0).

Durante o reparo ósseo, os níveis de interleucina-10 sofrem redução significativa com 21 e 60 dias após a indução do defeito ósseo, não sofrendo alterações em outros períodos.

Figura 6 - Quantificação dos níveis de Fosfatase Alcalina durante o reparo ósseo. Curso temporal. (* $p < 0,05$ vs dia 0)

Observa-se que 3 dias após a indução, há redução nos níveis, não significativo, depois seguem aumentam atingindo os maiores níveis com 14 dias, com 21 dias, os níveis voltam aos níveis iniciais e permanecem assim até 60 dias após a indução do defeito ósseo.

5.2 Análise de determinação do tempo de evolução do reparo ósseo

Análise Histológica com HE

Figura 7 – Fotomicrografia em campo aberto do corte transversal do osso Tibial hígido, coloração por H.E. (aumento de 400X).

Neste corte histológico observa-se a integridade da cortical óssea (número 1), presença de osteócitos (seta azul) e dividindo a parte cortical da medular (número 2) há a presença do endóstio.

Figura 8 – Fotomicrografia em campo aberto do corte transversal do osso Tibial após 1 dia da confecção do defeito ósseo monocortical, coloração por H.E. (aumento de 400X).

O corte histológico realizado após 24 horas do defeito ósseo demonstra a presença de células inflamatórias (setas vermelhas) na parte medular do osso (número 2).

Figura 9 – Fotomicrografia em campo aberto do corte transversal do osso Tibial após 2 dias da confecção do defeito ósseo monocortical, coloração por H.E. (aumento de 400X).

A fotomicrografia demonstra presença de células inflamatórias (setas vermelha), presentes na medula óssea (número 2), e começo da formação do endóstio (seta branca).

Figura 10 – Fotomicrografia em campo aberto do corte transversal do osso Tibial após 4 dias da confecção do defeito ósseo monocortical, coloração por H.E. (aumento de 400X).

Após 4 dias da confecção de defeito ósseo a fotomicrografia demonstra entre a medula (número 2) e a parte cortical (número 1) o começo da formação de trabécula óssea (setas preta).

Figura 11 – Fotomicrografia em campo aberto do corte transversal do osso Tibial após 7 dias da confecção do defeito ósseo monocortical, coloração por H.E. (aumento de 400X).

Observamos nestes cortes histológicos que após 7 dias da confecção do defeito ósseo, há presença de osteoclasto (seta azul), que reabsorve o osso presente e também observa-se o começo da formação de calo ósseo primário (seta preta) presente nos cortes (A) e (B).

Figura 12 – Fotomicrografia em campo aberto do corte transversal do osso Tibial após 14 dias da confecção do defeito ósseo monocortical, coloração por H.E. (aumento de 400X).

Após 14 dias da confecção é observado condroblastos em plena atividade (setas verde) e este faz deposição de matriz extracelular (seta preta) na formação da cortical óssea (número 1).

(A)

(B)

Figura 13 – Fotomicrografia em campo aberto do corte transversal do osso Tibial após 21 dias da confecção do defeito ósseo monocortical, coloração por H.E. (aumento de 400X).

Observamos neste corte histológico confeccionado após 21 dias da confecção do defeito ósseo, em (A), os condroblastos (seta verde) continuam produzindo cartilagem, porém em menor quantidade, e no corte histológico em (B) é observada que a cartilagem (seta amarela) está sendo substituída gradativamente por osso primário (seta preta) que futuramente irá formar a cortical.

Figura 14 – Fotomicrografia em campo aberto do corte transversal do osso Tibial após 30 dias da confecção do defeito ósseo monocortical, coloração por H.E. (aumento de 400X).

Neste corte realizado após 30 dias observamos neste corte histológico a continuação da substituição da cartilagem óssea (seta amarela) pelo tecido ósseo (seta preta) com a respectiva formação de tecido ósseo maduro, incluindo a presença de osteócitos, (círculo preto).

Figura 15 – Fotomicrografia em campo aberto do corte transversal do osso Tibial após 45 dias da confecção do defeito ósseo monocortical, coloração por H.E. (aumento de 400X).

Após 45 dias da confecção do defeito ósseo, a arquitetura óssea torna-se refeita pela nova formação dos canais vasculares (seta preta).

Figura 16 – Fotomicrografia em campo aberto do corte transversal do osso Tibial após 60 dias da confecção do defeito ósseo monocortical, coloração por H.E. (aumento de 400X).

O corte histológico acima apresenta que depois de 60 dias da confecção do defeito ósseo monocortical, a arquitetura óssea é retomada com a formação de cortical óssea (número 1) e medular óssea (número 2).

5.3 Análise Comparativa dos Níveis de Citocinas nos diferentes grupos tratados (A)

(B)

(C)

Figura 17 – Análise por ELISA de IL-1 beta no local da realização de defeito ósseo após 14 dias de sobrevivência realizando diferentes tratamentos em (A) comparamos todos os grupos tratados frente ao lesão (* $p < 0,005$ vs lesão), em (B) comparamos os grupos tratados somente com a laserterapia com os grupos lesão e em (C) observamos o grupo tratado isoladamente com PRF e os que receberam o tratamento combinados com o PRF e laserterapia. (# $p < 0,05$ vs PRF).

Observa-se que os grupos tratados com Laserterapia de 1J e 6J após 14 dias de pós-operatório obtiveram redução significativa nos níveis se comparados ao

grupo lesão. Os grupos tratados em associação PRF+Laserterapia apresentam redução dos níveis de IL-1 comparados com os animais tratados somente com PRF.

Figura 18 – Análise por ELISA de TNF-alfa no local da realização de defeito ósseo após 14 dias de sobrevida realizando diferentes tratamentos em (A) comparamos todos os grupos tratados frente ao lesão (* $p < 0,005$ vs lesão), em (B) comparamos os grupos tratados somente com a laserterapia com o grupo lesão e em (C) observamos o grupo tratado isoladamente com PRF e os que receberam o tratamento combinados com o PRF e laserterapia. ($p < 0,05$ ## vs PRF, ** $p < 0,03$ vs Lesão).

Observa-se que os grupos tratados com Laserterapia nas energias de 3J e 6J obtiveram redução significativa nos níveis quando comparados ao grupo lesão. Quando comparamos os tratamentos combinados, observamos que o grupo tratado

com 6J+PRF obteve redução nos níveis de TNF-alfa quando comparados com o grupo tratado somente com PRF.

Figura 19 – Análise por ELISA de IL-6 no local da realização de defeito ósseo após 14 dias de sobrevida realizando diferentes tratamentos (* $p < 0,05$ vs Lesão).

Os níveis de IL-6 aumentaram nos grupos tratados com 1J, e com os tratamentos combinados de 3J+PRF e 6J+PRF, quando comparados com o grupo lesão, não observando diferença entre os outros grupos tratados.

Figura 20 – Análise por ELISA de IL-10 no local da realização de defeito ósseo após 14 dias de sobrevivência realizando diferentes tratamentos (A) comparamos todos os grupos tratados frente ao lesão (* $p < 0,005$ vs lesão), em (B) comparamos os grupos tratados somente com a laserterapia com o grupo lesão e em (C) observamos o grupo tratado isoladamente com PRF e os que receberam o tratamento combinados com o PRF e laserterapia. (* $p < 0,005$, vs grupo lesão e # $p < 0,005$ vs grupo hígido).

Observa-se que os grupos tratados com Laserterapia de 3J, 6J+PRF, obtiveram redução significativa nos níveis de IL-10 se comparados ao grupo lesão. O grupo tratado com 6J+PRF obteve redução também quando comparado com os animais tratados somente com PRF.

Figura 21 – Análise por ELISA de Fosfatase Alcalina (ALP) circulante após 14 dias de sobrevida realizando diferentes tratamentos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,03$; *** $p < 0,001$ vs Lesão).

Os níveis de ALP no soro circulante obtiveram redução em todos os grupos tratados quando comparados com o grupo Lesão, não observando diferença entre os diferentes tratamentos.

5.4 Análise Histológica dos Cortes Histológicos entre os diferentes tratamentos realizados

Figura 22 – Fotomicrografia em campo aberto do corte transversal do osso Tibial após 30 dias da confecção do defeito ósseo monocortical tratado com PRF, coloração por H.E (aumento 400X)

Neste corte histológico, o concentrado plaquetário provoca formação do endóstio (seta branca), este localizado entre a cortical óssea (número 1) e medular (número 2), observa-se o remodelamento ósseo (seta azul).

Figura 23 – Fotomicrografia em campo aberto do corte transversal do osso Tibial após 30 dias da confecção do defeito ósseo monocortical tratado com 1J, coloração por H.E (aumento 400X)

É observado na fotomicrografia, que o osso apresenta remodelação e substituição óssea do calo primário para o secundário (seta branca) e começo da formação dos canais vasculares (seta vermelha)

Figura 24 – Fotomicrografia em campo aberto do corte transversal do osso Tibial após 30 dias da confecção do defeito ósseo monocortical tratado com 3J, coloração por H.E (aumento 400X)

É observado na fotomicrografia, que o osso apresenta remodelação e substituição óssea do calo primário para o secundário (seta branca) e formação dos canais vasculares (seta vermelha)

Figura 25 – Fotomicrografia em campo aberto do corte transversal do osso Tibial após 30 dias da confecção do defeito ósseo monocortical tratado com 6J, coloração por H.E (aumento 400X)

No tratamento destes animais (6J), os animais apresentam na parte cortical (número 1), remodelação óssea (seta branca) com a presença de osteoclasto (seta amarela), este formado com células provenientes da medula óssea (número 2).

Figura 26 – Fotomicrografia em campo aberto do corte transversal do osso Tibial após 30 dias da confecção do defeito ósseo monocortical tratado com 1J+PRF, coloração por H.E (aumento 400X)

Observamos neste corte histológico na parte cortical (número 1), formação do sistema de havers (seta branca) e maturação do osso; quando observamos entre a parte medular (número 2) e a cortical, há a formação do endóstio (seta amarela).

Figura 27 – Fotomicrografia em campo aberto do corte transversal do osso Tibial após 30 dias da confecção do defeito ósseo monocortical tratado com 3J+PRF, coloração por H.E (aumento 400X)

O tratamento combinado com a energia de 3J apresenta no corte histológico acima, intensa reabsorção óssea (setas branca) e presença de osteoclastos (seta preta).

Figura 28 – Fotomicrografia em campo aberto do corte transversal do osso Tibial após 30 dias da confecção do defeito ósseo monocortical tratado com 6J+PRF, coloração por H.E (aumento 400X)

Neste campo histológico, há intensa formação óssea com respectiva maturação óssea, com a presença de osteócitos (seta branca), osteoblastos (seta preta) e cortical óssea

Tabelas de Resumo dos resultados:

Grupo	IL-1 β	TNF- α	IL-6	IL-10
Hígido	↓	=	=	=
Lesão	--	--	--	--
PRF	=	=	=	=
1J	↓	=	↑	↓
3J	=	↓↓	=	=
6J	↓	↓↓	=	=
1J+PRF	=	=	=	=
3J+PRF	=	=	↑	=
6J+PRF	=	↓↓	↑	↓

Tabela 1 – Resultados da comparação do grupo lesão contra os grupos tratados de diversas formas.

Grupo	IL-1 β	TNF- α	IL-6	IL-10
PRF	--	--	=	--
1J	↓	=	↑	=
3J	↓	↓↓	=	↓↓
6J	↓	↓↓	=	=

Tabela 2 – Comparação do resultado do tratamento isolado de PRF contra os grupos tratados somente Laserterapia Baixa intensidade em diversas dosagens de energia.

Grupo	IL-1 β	TNF- α	IL-6	IL-10
PRF	--	--	--	--
1J+PRF	↓	=	=	=
3J+PRF	↓	↓↓	=	=
6J+PRF	↓	↓↓	=	↓

Tabela 3 – Comparação do tratamento isolado de PRF contra o tratamento combinado de PRF+Laserterapia.

Grupo	IL-1 β	TNF- α	IL-6	IL-10
1J	=	=	=	=
3J	=	=	=	=
6J	=	=	=	--
1J+PRF	=	=	=	=
3J+PRF	=	=	=	=
6J+PRF	=	=	=	↓↓↓

Tabela 4 – Comparação dos resultados dos tratamentos isolados com a laserterapia de baixa potência em determinada energia, com a sua associação da mesma energia com uso do PRF.

6 Discussão

Alterações ósseas como fraturas e/ou reabsorções ósseas geralmente levam a um processo de recuperação longo e doloroso. Existe um grande interesse em buscar tratamentos que auxiliem a reparação óssea e promovam uma recuperação mais rápida do paciente às suas atividades diárias normais.

Na fratura e durante a reconstrução óssea os pacientes geralmente são internados afim de reestabelecer a correta função do osso lesionado e independentemente da parte do corpo afetada, este processo de reconstrução óssea pode durar vários dias de internação chegando à meses ou anos de recuperação da função óssea normal e em alguns casos são necessários mais de um procedimento para o correto reestabelecimento da integridade óssea (58-61).

Durante o processo para reestabelecimento da função óssea, diversos tratamentos complementares e auxiliares são realizados em diferentes etapas, sendo eles:

- No período trans-operatório, materiais de fixação interna, placas, parafusos e materiais sintéticos substituem o osso perdido dando suporte ósseo para a osteocondução/osteoformação como é o caso dos concentrados plaquetários;
- No período pós-operatório são indicados sessões de fisioterapia, uso de medicações sistêmicas dentre outros (62-67).

Neste primeiro caso, o PRF poderia ser utilizado por apresentar uma grande quantidade de plaquetas (cerca de 200 mil plaquetas por mL) e a presença de altas concentrações de fatores de crescimento como PDGF, TGF, IGF, VEGF, ECGF, que auxiliam no crescimento e diferenciação celular. Estes fatores de crescimento podem atuar em diversas células (Fibroblastos, osteoblastos e células do endotélio vascular), modificando a atividade celular, favorecendo o recrutamento de novas células, induzindo à apoptose, secretando citocinas e agindo na ativação celular. Esta terapia tem como vantagem a manutenção das plaquetas saudáveis e ativas e o custo extremamente reduzido, sem possibilidade de reação alérgica ao organismo (1,13,14). Há controvérsias quanto a sua eficácia em diversos tratamentos e a maioria dos trabalhos experimentais não comprovaram uma melhora significativa, ao contrário dos estudos clínicos que na maioria dos casos comprovam sua eficácia.

Por exemplo, no uso de concentrados plaquetários ainda não há um consenso, pois trabalhos experimentais in vivo com o uso de PRP (plasma rico em plaquetas) demonstraram que não existem alterações do enxerto ósseo, segundo análises histomorfométricas (68,69). Outras pesquisas relatam o tratamento com PRF como um bom coadjuvante. Estudos baseados em observações clínicas relatam melhora no reparo justificadas pela liberação de fatores de crescimento (70).

Alguns trabalhos demonstraram que o uso da Laserterapia poderia melhorar e/ou auxiliar o reparo ósseo em animais de pequeno porte (69), pelo aumento dos níveis de calcitonina (68). Porém não há um consenso com relação às propriedades mecânicas do reparo ósseo (67,68).

Um estudo mais aprofundado sobre o comportamento do PRF na região da lesão óssea ainda é necessário tendo em vista os resultados antagônicos entre estes estudos experimentais e clínicos. Diante deste fato, analisamos neste trabalho alguns resultados histológicos e bioquímicos durante a fase do reparo ósseo num curso temporal entre 24 horas até 90 dias e escolhemos o 14º dia após a lesão para comparação entre grupos tratados e não tratados.

Foi escolhido o 14º dia para parâmetros de comparação por ele apresentar bioquimicamente os maiores níveis das citocinas IL-1, IL-6 e IL-10 e da fosfatase alcalina durante o período analisado (figuras 12,14,15 e 16),

Conforme descrito anteriormente a reparação óssea é dividida em 4 fases, a fase inflamatória é observada na figura 3, correspondente as primeiras 24 horas onde há um intenso infiltrado inflamatório, isto devido a ruptura de vasos e cortical óssea, expondo a parte medular, estimulando a migração celular para remoção de restos teciduais e induzir a formação óssea, descrito na figura 4 através do endóstio, após 4 dias (figura 5) começa a segunda fase, a fase de formação óssea fibrocartilaginosa, pois observamos o começo da formação da trabécula óssea, esta por sua vez causa maior formação da cortical com 7 dias (figura 6), com deposição intensa de matriz extracelular com 14 dias (figura 7), que prolonga-se em menor quantidade com 21 dias (figura 8), entrando na terceira fase de formação de calo ósseo, pois se torna um tecido mais maduro com respectiva formação por completo do osso com 30 dias (figura 9), osso que já está sendo reabsorvido para a formação óssea secundária, com 45 dias (figura 10) é observado a retomada da arquitetura óssea, com a formação dos canais de Havers, refletindo a última fase do reparo

ósseo, fase de remodelamento, tanto que com 60 dias (figura 11), o osso está com a arquitetura óssea íntegra, igual a antes da realização do procedimento (figura 2), devido as alterações descritas, foi escolhido o período de 30 dias para comparação, pois nele há formação do osso por completo, restando apenas a retomada da arquitetura inicial.

Um dos parâmetros analisados foi a Interleucina 1β onde seus níveis apresentaram um aumento progressivo até o 21º dia no período pós-operatório. Este aumento poderia indicar um processo inflamatório agudo, também observado nos cortes histológicos entre o 1º ao 21º dia (figuras 3 à 8) onde deve haver um recrutamento celular e a remoção dos restos teciduais. Após o 14º dia da lesão foi possível identificar uma atividade osteogênica, com recrutamento de células que formam o calo ósseo (figura 7 e 8). Após o 21º dia da lesão os níveis de IL- 1β reduzem significativamente chegando próximo do nível basal no 40º ao 60º dia onde é possível observar a formação de calo ósseo secundário e sua reabsorção (figuras 9 a 11).

Conforme já descrito previamente, a IL- 1β pode estimular o crescimento de células ósseas *in vitro* e participa das interações entre elas, promovendo a proliferação e mineralização de osteoblastos como também inibindo a proliferação e diferenciação de condrócitos (71, 72).

Neste trabalho foi observado que os grupos tratados com laser nas energias de 1J e 6J apresentaram redução dos níveis de IL- 1β quando comparados ao grupo lesionado e esta redução pode significar uma inibição do recrutamento das células pré-osteoblásticas, sugerindo um estágio avançado da formação do calo ósseo (figuras 18 e 20). Esta redução dos níveis de IL- 1β em animais tratados com laserterapia já foi observada em outros modelos experimentais agudos, como na tendinite induzida por collagenase e na inflamação pulmonar, porém em diferentes parâmetros de irradiação ($7\text{J}/\text{cm}^2$, 660nm à 780nm) (67,68) ou em trabalhos clínicos onde pacientes foram submetidos a tratamento convencional de periodontite crônica e comparados com outros pacientes onde utilizou-se a terapia fotodinâmica associada ao laser de baixa potência ($4\text{J}/\text{cm}^2$ e 940nm) (73,74).

Em nosso trabalho os grupos com tratamento combinado (PRF + Laser) apresentaram uma redução de IL- 1β quando comparados ao grupo tratado apenas com PRF, corroborando com o descrito na literatura (75).

Outras citocinas pró-inflamatórias importantes na determinação da atividade de reparação óssea são o TNF- α e a IL-6 que são indicadores de osteoclastogênese. Os osteoclastos são células multinucleadas formadas pela fusão de progenitores mononucleares da linhagem dos monócitos e macrófagos, derivados da unidade formadoras de macrófagos e granulócitos sendo também dependentes da sinalização intracelular do RANK, seu ligante (RANKL) e c-Fms.

O TNF- α aumenta o recrutamento nas células precursoras pela promoção da morte celular e estimulação da produção de RANKL, este ultimo secretado pelos linfócitos T e células endoteliais (75, 76, 77).

Neste trabalho não observamos alterações significativas dos níveis de TNF- α durante o reparo ósseo, porém observamos uma tendência de aumento à partir do 7° até o 40° dia apos a lesão e esta tendência pode ter relação com o início do processo inflamatório onde podemos observar um aumento da morte celular e do estímulo de recrutamento de células ósseas na fase inicial (figuras 2 a 8) e a ativação dos osteoclastos na fase de remodelamento de calo ósseo secundário (figuras 8 a 10) numa fase mais tardia. (78,79)

Os grupos lesionados e irradiados com 3J e 6J e o grupo PRF + Laser 6J apresentaram uma redução nos níveis de TNF- α apos o 14° dia e esta redução pode indicar uma redução no recrutamento celular para formação de osteoclastos (figuras 19, 20 e 23). Como comentado anteriormente, o PRF é constituído também por fatores de crescimento, tais como VEGF e PDGF, citocinas pró-inflamatórias, IL-1, IL-6 e TNF- α , e anti-inflamatória ou regenerativa como é o caso da IL-4 (78). Em nosso trabalho não observamos alteração dos níveis dos animais tratados pode indicar que sua liberação é lenta ou que sua interferência é pequena (figura 25).

O PRF possui uma ação prolongada e pode alterar a concentração de determinadas citocinas, como o TNF- α (77, 79), ocasionando o aumento gradual de outras substâncias presentes. A laserterapia, quando aplicada em processos inflamatórios, consegue reduzir a expressão gênica e protéica de TNF- α , tanto no processo agudo quanto no crônico, independente do tecido afetado (73,80). Porém, alguns parâmetros de energias podem não alterar o curso do processo inflamatório, nem tem função anti-inflamatória (81) como foi o caso do grupo 1J.

A osteoclastogênese é induzida pela presença de IL-6, produzida por osteoblastos, células hematopoiéticas e células relacionadas no espessamento do

calo ósseo e atua diretamente na inibição das células precursoras de osteoclastos, acelerando a diferenciação, maturação e ativação dos mesmos pelo aumento indireto na produção de ligante RANK (RANKL) presente na célula mononuclear precursora de osteoclasto (82). Neste trabalho não observamos alterações dos níveis de IL-6 durante o processo de reparo ósseo, porém houve uma tendência de redução de IL-6 no 21º dia após a lesão. O aumento desta citocina poderia indicar diminuição na formação óssea em comparação à sua reabsorção (figura 1). Os grupos 1J, 3J+PRF e 6J+PRF, apresentaram aumento da quantidade de IL-6. O Laser parece ter uma ação modulatória do processo inflamatório e mudanças nos parâmetros de energia poderiam alterar a resposta celular. Assim determinadas energias podem reduzir o processo inflamatório e outras energias podem aumentar a reabsorção óssea, retardando o processo de reparo tecidual. Isso pode ser melhor explicado pela existência de uma osteoclastogênese para remodelamento ósseo e readequação do formato ósseo original (83,-89), como podemos observar nos cortes histológicos das figuras 15, 19 e 20. No entanto seria necessário analisarmos outros mediadores inflamatórios como a enzima COX-2 para verificar se existe alguma relação com a indução da lesão e o reparo ósseo ligado ao processo inflamatório (90).

A presença de RANKL, membro da superfamília da citocina TNF, ligado ao seu receptor é fator chave para a osteoclastogênese. A IL-10 é um potente regulador na inibição na formação de osteoclastos *in vitro*, por sua atuação direta nos precursores e geradores via inibição de RANKL mediado pela expressão de NF-κB p50 e fosforilação de JNK (81, 82). A atividade dos osteoclastos encontram-se reduzidas no 21º e 60º dia (figuras 6 à 8), durante o reparo ósseo, indicando que até o 21º dia há maior formação óssea, formação de calo ósseo primário e secundário, e tardiamente no 60º dia, após o remodelamento ósseo há formação óssea para readequação no formato ósseo. Nos animais tratados com 3J, 6J+PRF no 14º dia, os níveis de IL-10 estão reduzidos indicando a maior formação de osteoclastos, fato observado apenas no 21º dia dos animais sem tratamento, sugerindo uma aceleração do processo de reparo tecidual pois indica aumento na formação óssea, demonstradas na figuras 15 e 27.

A atividade óssea, deposição e reabsorção óssea, pode ser mensurada pela deposição de hidroxapatita na matriz extracelular, assim chamada de

biomineralização, a fosfatase alcalina tem papel fundamental neste processo, pois hidroliza o pirofosfato e fornece fosfato inorgânico (83). Nos primeiros dias após a confecção do defeito ósseo, ocorre uma tendência a queda na deposição óssea, por volta do 3º dia, nos dias subsequentes há um aumento significativo nos níveis de fosfatase alcalina, atingindo as maiores concentrações no 14º dia, que voltam ao basal após 07 dias como observado nas figura 16, não havendo tanta formação óssea e sim a formação óssea (figuras 4 a 9) e assim permanecem até o 60º dia, refletindo o metabolismo do reparo ósseo, onde em uma primeira instância (fase inflamatória) há intenso infiltrado inflamatório com respectiva necrose celular e não formação óssea, que é revertida nos 14 dias subsequentes, pois há intensa deposição de hidroxiapatita. A partir do 21º dia, os níveis retornam aos níveis fisiológicos, necessários apenas para a manutenção óssea. Todos os grupos tratados apresentaram queda nos níveis de fosfatase alcalina, atingindo níveis basais e entre eles não houve diferença, isto sugere que todos os grupos estão com menor deposição de osso local, seja por retardar ou acelerar o reparo ósseo. A terapia com laser de baixa potencia foi descrita anteriormente como estimulador da produção de fosfatase alcalina por osteoblastos até o 7º dia de pós-operatório, e com energia pulsada os níveis permanecem aumentados até o 20º dia (84, 85), já os grupos tratados com concentrado plaquetário (PRF) reduziram os níveis de fosfatase alcalina pois em sua constituição possuem fatores de crescimento e fibronectina, essenciais para a regeneração tecidual (91, 92).

As alterações bioquímicas causadas por diversos tratamentos, nos sugerem que a laserterapia atua inibindo o recrutamento de células osteoprogenitoras em sua diferenciação e proliferação, aumentando a ativação de osteoclastos, diminuindo a deposição de matriz extracelular, indicando começo de remodelamento ósseo, conforme alteração histológica. Já o PRF diminuiu a atividade da Fosfatase Alcalina mas não alterou outros parâmetros; das terapias associadas quando comparadas somente com o PRF. O laser realizou os efeitos descritos, porém de forma menos significativa. (figura 26).

Alterações morfológicas foram observadas após alteração de parâmetros bioquímicos e em nosso caso, com 30 dias após a indução.

Com 30 dias de pós-operatório, os diferentes tratamentos provocaram alterações não somente na parte bioquímica, como também na parte morfológica;

os tratados com PRF apresentaram formação do endosteo e reabsorção óssea, indicando que há formação óssea mais intensa do que a reabsorção, pois o endóstio está em formação, indicando que os mesmos estão em fase de formação óssea, apesar da presença de diversos mediadores inflamatórios em sua constituição, contrariando trabalhos que demonstram o efeito clínico de melhora.

Os animais que recebem a laserterapia em na doses de 1J e 3J, apresentam canais de Havers, e reabsorção óssea intensa, conforme descrito, portanto eles encontram-se na fase de remodelamento ósseo, diferentemente dos animais tratados com 6J, estes apresentam intensa remodelação óssea e formação óssea, com a presença de osteoclastos, indicando estar em uma fase de formação óssea, igual fase do PRF. Tal fato observado no trabalho pode ser atribuído a energia aplicada, pois o efeito do laser é biomodulador, ou seja, dependendo da energia ou ele estimula ou inibe determinadas substâncias, explica-se a partir daí a necessidade de realizar estudos para explicar a dose ideal para cada caso.

Os tratamentos combinados, o PRF quando associado a 1J e 6J apresenta formação óssea intensa, porém no caso da energia de 6J, há a presença de reabsorção óssea, e osso mais imaturo, com a menor presença de osteócitos se comparados com tratados com 1J, já o tratamento de 3J apresenta intensa formação de trabéculas ósseas e respectiva formação óssea com a presença de osteoblastos, e praticamente não apresenta osso formado, com pouca ou nenhuma quantidade de cortical óssea e osteócitos, isto pode ser explicado em nosso trabalho pela não melhora dos parâmetros bioquímicos das principais citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF), e não alterar a atividade de citocinas anti-inflamatória (IL-10), somente diminuindo a quantidade de fosfatase alcalina, que é responsável pela deposição de cálcio dentro do osso afetado, provocando um retardo na deposição do mesmo dentro do osso, porém isto teria de ser confirmado com a análise em um período mais longo.

Os grupos tratados somente com laser foi observado uma maior deposição óssea da parte cortical.

Ao analisar todos os dados até o presente momento, sugere-se que o PRF aplicado isolado no local não alterou o curso morfofuncional de reparo, sendo alterado na presença do laser isolado, onde aparentemente há uma aceleração no processo de reparo ósseo. Quando aplicados em conjunto os dados se assemelham

aos quando somente o laser é aplicado, levando a conclusão que não há tratamento sinérgico.

Figura 29 – Atuação das principais citocinas, estimulando (+) ou inibindo (-) a via para recrutar células osteoprogenitoras e originar os osteócitos ou formar e diferenciar os osteoclastos. Observamos que a IL-1 e IL6 estimulam a migração de células osteoprogenitoras para formação de osteoblastos; e com ação dual, a IL-6 estimula a produção de ligante RANK, este atuando em conjunto com o M-CSF, com seus níveis aumentados na presença de TNF- α , estimula a formação e ativação de osteoclastos, em compensação, quando há altos níveis de IL-10, o processo é invertido, pois inibe a reabsorção óssea e aumenta a deposição de matriz extracelular. A laserterapia, em sua melhor dose (3J), pois ela inibe citocinas pró-inflamatórias; IL-1, TNF- α ; e anti-inflamatórias; IL-10; não alterando a secreção de IL-6, é indicativo que o osso está na quarta fase de reparo ósseo.

Figura 30 – Desenho esquemático demonstra a associação de íon fosfato (PO_4^{2-}) com íon Cálcio (Ca^{2+}) para a formação de Cristais de hidroxiapatita (CaPO_4), constituinte da matriz extracelular óssea, esta mediado pela presença de Fosfatase Alcalina (ALK). O efeito da Laserterapia de Baixa potencia (LLLT) atua diminuindo a quantidade de ALK e matriz extracelular.

Referências *

- 1: Fávaro-Pipi E, Bossini P, de Oliveira P, Ribeiro JU, Tim C, Parizotto NA, Alves JM, Ribeiro DA, Selistre de Araújo HS, Renno AC. Low-intensity pulsed ultrasound produced an increase of osteogenic genes expression during the process of bone healing in rats. *Ultrasound Med Biol*. 2010 Dec;36(12):2057-64. Epub 2010 Oct 15.
- 2: Hadjiargyrou M, Lombardo F, Zhao S, Ahrens W, Joo J, Ahn H, Jurman M, White DW, Rubin CT. Transcriptional profiling of bone regeneration. Insight into the molecular complexity of wound repair. *J Biol Chem*. 2002 Aug 16;277(33):30177-82. Epub 2002 Jun 7.
- 3: Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol*. 2008 Oct;19(5):459-66. Epub 2008 Jul 25.
- 4: Ai-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J Dent Res*. 2008 Feb;87(2):107-18.
- 5: Nikolidakis D, Jansen JA. The biology of platelet-rich plasma and its application in oral surgery: literature review. *Tissue Eng Part B Rev*. 2008.
- 6: Hengartner NE, Fiedler J, Ignatius A, Brenner RE. IL-1 β inhibits human osteoblast migration. *Mol Med*. 2013 Apr 30;19:36-42.
- 7: Cohen SL(1), Moore AM, Ward WE. Interleukin-10 knockout mouse: a model for studying bone metabolism during intestinal inflammation. *Inflamm Bowel Dis*. 2004 Sep;10(5):557-63
- 8: Ivashkiv LB, Zhao B, Park-Min KH, Takami M. Feedback inhibition of osteoclastogenesis during inflammation by IL-10, M-CSF receptor shedding, and induction of IRF8. *Ann N Y Acad Sci*. 2011 Nov;1237:88-94.. Review.
- 9: Guo X, Wang XF. Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. *Cell Res*. 2009 Jan;19(1):71-88.
- 10: Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol*. 2005 Dec;6(12):1191-7.
- 11: Hu Z, Peel SA, Ho SK, Sándor GK, Clokie CM. Platelet-rich plasma induces mRNA expression of VEGF and PDGF in rat bone marrow stromal cell differentiation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009 Jan;107(1):43-8. Epub 2008 Aug 28.

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal sample references. [updated 2011 jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

- 12: Ferraz FH, Schellini SA, Schellini RC, Pellizon CH, Hirai FE, Padovani CR. BMP implant associated with platelet-rich plasma in orbit fracture repair. *Curr Eye Res.* 2008 Mar;33(3):293-301.
- 13: Pereira AC, Fernandes RG, Carvalho YR, Balducci I, Faig-Leite H. Bone healing in drill hole defects in spontaneously hypertensive male and female rats' femurs. A histological and histometric study. *Arq Bras Cardiol.* 2007 Jan;88(1):104-9.
- 14: Plachokova AS, van den Dolder J, Stoelinga PJ, Jansen JA. Early effect of platelet-rich plasma on bone healing in combination with an osteoconductive material in rat cranial defects. *Clin Oral Implants Res.* 2007 Apr;18(2):244-51.
- 15: Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* 2009 Mar;27(3):158-67.
- 16: Sunitha Raja V, Munirathnam Naidu E. Platelet-rich fibrin: evolution of a second-generation platelet concentrate. *Indian J Dent Res.* 2008 Jan-Mar;19(1):42-6.
- 17: Lee SJ. Cytokine delivery and tissue engineering. *Yonsei Med J.* 2000 Dec;41(6):704-19.
- 18: Bertolotti R L. Alternative casting alloys for today's crown and bridge restorations. Part II: metal-ceramic restorations. *CDA J.* 1983 Sep;11(9):63-9.
- 19: De Castro E Silva Júnior O, Zucoloto S, Menegazzo L A, Granato R G, Arcassa L G, Bagnato V S. Laser enhancement in hepatic regeneration for partially hepatectomized rats. *Lasers Surg Med.* 2001;29(1):73-7.
- 20; Karu T I. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser irradiation *Dokl Akad Nauk SSSR.* 1986;291(5):1245-9.
- 21; Schaffer M, Bonel H, Sroka R, Schaffer P M, Busch M, Reiser M, Dühmke E. Effects of 780 nm diode laser irradiation on blood microcirculation: preliminary findings on time-dependent T1-weighted contrast-enhanced magnetic resonance imaging (MRI). *J Photochem Photobiol B.* 2000 Jan;54(1):55-60.
- 22; Kiyoizumi T. Low level diode laser treatment for hematomas under grafted skin and its photobiological mechanisms. *Keio J Med.* 1988 Dec;37(4):415-28.
- 23; Hazeki O, Tamura M. Near infrared quadruple wavelength spectrophotometry of the rat head. *Adv Exp Med Biol.* 1989;248:63-9.
- 24; Svaasand LO. Biostimulation with low-intensity lasers--physics or metaphysics? *Nord Med.* 1990;105(3):72-5. Inst for fysikalsk elektronikk, Norges Tekniske Høgskole, Universiteti Trondheim.
- 25; Basford J R, Sheffield C G, Cieslak K R. Laser therapy: a randomized, controlled trial of the effects of low intensity Nd:YAG laser irradiation on lateral epicondylitis. *Arch Phys Med Rehabil.* 2000 Nov;81(11):1504-10.

- 26; Honmura A, Ishii A, Yanase M, Obata J, Haruki E. Analgesic effect of Ga-Al-As diode laser irradiation on hyperalgesia in carrageenin-induced inflammation. *Lasers Surg Med.* 1993;13(4):463-9.
- 27; Bliddal H, Hellesen C, Ditlevsen P, Asselberghs J, Lyager L. Soft-laser therapy of rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 1987;16(4):225-8.
- 28; Brosseau L, Welch V, Wells G, Tugwell P, de Bie R, Gam A, Harman K, Shea B, Morin M. Low level laser therapy for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: a metaanalysis. *J Rheumatol.* 2000 Aug;27(8):1961-9.
- 29; Campana V, Moya M, Gavotto A, Juri H, Palma J A. Effects of diclofenac sodium and He:Ne laser irradiation on plasmatc fibrinogen levels in inflammatory processes. *J Clin Laser Med Surg.* 1998 Dec;16(6):317-20.
- 30; Mizutani K, Musya Y, Wakae K, Kobayashi T, Tobe M, Taira K, Harada T. A clinical study on serum prostaglandin E2 with low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg.* 2004 Dec;22(6):537-9.
- 31; Santos JJ, Amiranoff F, Baton SD, Gremillet L, Koenig M, Martinolli E, Rabec Le Gloahec M, Rousseaux C, Batani D, Bernardinello A, Greison G, Hall T. Fast electron transport in ultraintense laser pulse interaction with solid targets by rear-side self-radiation diagnostics. *Phys Rev Lett.* 2002 Jul 8;89(2).
- 32; Albertini R, Aimbire F S, Correa F I, Ribeiro W, Cogo J C, Antunes E, Teixeira S A, De Nucci G, Castro-Faria-Neto H C, Zângaro R A, Lopes-Martins R A. Effects of different protocol doses of low power gallium-aluminum-arsenate (Ga-Al-As) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced rat paw oedema. *J Photochem Photobiol B.* 2004 May 27;74(2-3):101-7.
- 33; Lopes-Martins R A, Albertini R, Martins P S, Bjordal J M, Faria Neto H C. Spontaneous effects of low-level laser therapy (650 nm) in acute inflammatory mouse pleurisy induced by carrageenan. *Photomed Laser Surg.* 2005 Aug;23(4):377-81.
- 34; Aimbire F, Albertine R, De Magalhães R G, Lopes-Martins R A, Castro-Faria-Neto H C, Zângaro R A, Chavantes M C, PACHECO MT. Effect of LLLT Ga-Al-As (685 nm) on LPS-induced inflammation of the airway and lung in the rat. *Lasers Med Sci.* 2005;20(1):11-20.
- 35; Aimbire F, Albertini R, Pacheco M T, Castro-Faria-Neto H C, Leonardo P S, Iversen V V, Lopes-Martins R A, Bjordal J M. Low-level laser therapy induces dose-dependent reduction of TNFalpha levels in acute inflammation. *Photomed Laser Surg.* 2006 Feb;24(1):33-7.
- 36; Aimbire F, Lopes-Martins R A, Albertini R, Pacheco M T, Castro-Faria-Neto H C, Martins P S, Bjordal J M. Effect of low-level laser therapy on hemorrhagic lesions induced by immune complex in rat lungs. *Photomed Laser Surg.* 2007 Apr;25(2):112-7.

- 37; Bjordal J M, Johnson M I, Iversen V V, Aimbire F, Lopes-Martins R A. Photoradiation in acute pain: a systematic review of possible mechanisms of action and clinical effects in randomized placebo-controlled trials. *Photomed Laser Surg.* 2006 Apr;24(2):158-68.
- 38; Bjordal J M, Johnson M I, Lopes-Martins R A, Bogen B, Chow R, Ljunggren A E. Short-term efficacy of physical interventions in osteoarthritic knee pain. A systematic review and meta-analysis of randomised placebo-controlled trials. *BMC Musculoskelet Disord.* 2007 Jun 22;8:51. Review.
- 39; Bjordal J M, Klovning A, Lopes-Martins R A, Roland P D, Joensen J, Slørdal L. Overviews and systematic reviews on low back pain. *Ann Intern Med.* 2008 May 20;148(10):789-90; author reply 791-2.
- 40; Bjordal J M, Lopes-Martins R A, Iversen V V. A randomised, placebo controlled trial of low level laser therapy for activated Achilles tendinitis with microdialysis measurement of peritendinous prostaglandin E2 concentrations. *Br J Sports Med.* 2006 Jan;40(1):76-80; discussion 76-80.
- 41; Bjordal J M, Lopes-Martins R A, Iversen V V. A randomised, placebo controlled trial of low level laser therapy for activated Achilles tendinitis with microdialysis measurement of peritendinous prostaglandin E2 concentrations. *Br J Sports Med.* 2006 Jan;40(1):76-80; discussion 76-80.
- 42; Bjordal J M, Lopes-Martins R A, Joensen J, Couppe C, Ljunggren A E, Stergioulas A, Johnson M I. A systematic review with procedural assessments and meta-analysis of low level laser therapy in lateral elbow tendinopathy (tennis elbow). *BMC Musculoskelet Disord.* 2008 May 29;9:75.
- 43; Correa F, Lopes Martins R A, Correa J C, Iversen V V, Joenson J, Bjordal J M. Low-level laser therapy (GaAs $\lambda = 904$ nm) reduces inflammatory cell migration in mice with lipopolysaccharide-induced peritonitis. *Photomed Laser Surg.* 2007 Aug;25(4):245-9.
- 44; Leal Junior E C, Lopes-Martins R A, Vanin A A, Baroni B M, Grosselli D, De Marchi T, Iversen V V, Bjordal J M. Effect of 830 nm low-level laser therapy in exercise-induced skeletal muscle fatigue in humans. *Lasers Med Sci.* 2008 Jul 23.
- 45; Stergioulas A. Low-power laser treatment in patients with frozen shoulder: preliminary results. *Photomed Laser Surg.* 2008 Apr;26(2):99-105.
- 46; Lopes-Martins R A, Albertini R, Lopes-Martins P S, De Carvalho F A, Neto H C, Iversen V V, Bjordal J M. Steroid receptor antagonist mifepristone inhibits the anti-inflammatory effects of photoradiation. *Photomed Laser Surg.* 2006 Apr;24(2):197-201.
- 47; Pinheiro AL, Limeira Júnior Fde A, Gerbi ME, Ramalho LM, Marzola C, Ponzi EA. Effect of low level laser therapy on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone. *Braz Dent J.* 2003;14(3):177-81. Epub 2004 Mar 29. PubMed

- 48; Matsumoto MA, Ferino RV, Monteleone GF, Ribeiro DA. Low-level laser therapy modulates cyclo-oxygenase-2 expression during bone repair in rats. *Lasers Med Sci.* 2009 Mar;24(2):195-201. Epub 2008 Feb 29.
- 49; Torres CS, dos Santos JN, Monteiro JS, Amorim PG, Pinheiro AL. Does the use of laser photobiomodulation, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration improve the outcome of autologous bone grafts? An in vivo study in a rodent model. *Photomed Laser Surg.* 2008 Aug;26(4):371-7.
- 50; Stein E, Koehn J, Sutter W, Wendtlandt G, Wanschitz F, Thurnher D, Baghestanian M, Turhani D. Initial effects of low-level laser therapy on growth and differentiation of human osteoblast-like cells. *Wien Klin Wochenschr.* 2008;120(3-4):112-7.
- 51; Pinheiro AL, Martinez Gerbi ME, Carneiro Ponzi EA, Pedreira Ramalho LM, Marques AM, Carvalho CM, Santos Rde C, Oliveira PC, N6ia M. Infrared laser light further improves bone healing when associated with bone morphogenetic proteins and guided bone regeneration: an in vivo study in a rodent model. *Photomed Laser Surg.* 2008 Apr;26(2):167-74.
- 52; Kazem Shakouri S, Soleimanpour J, Salekzamani Y, Oskuie MR. Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process. *Lasers Med Sci.* 2009 Apr 28.
- 53; Ribeiro DA, Matsumoto MA. Low-level laser therapy improves bone repair in rats treated with anti-inflammatory drugs. *J Oral Rehabil.* 2008 Dec;35(12):925-33.
- 54; Blaya DS, Guimarães MB, Pozza DH, Weber JB, de Oliveira MG. Histologic study of the effect of laser therapy on bone repair. *J Contemp Dent Pract.* 2008 Sep 1;9(6):41-8.
- 55; Khadra M, R6nold HJ, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE, Haanaes HR. Low-level laser therapy stimulates bone-implant interaction: an experimental study in rabbits. *Clin Oral Implants Res.* 2004 Jun;15(3):325-32.
- 56; Nissan J, Assif D, Gross MD, Yaffe A, Binderman I. Effect of low intensity laser irradiation on surgically created bony defects in rats. *J Oral Rehabil.* 2006 Aug;33(8):619-924.
- 57; Renno AC, McDonnell PA, Parizotto NA, Laakso EL. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro. *Photomed Laser Surg.* 2007 Aug;25(4):275-80.
- 58; Cross MB, Osbahr DC, Nam D, Reinhardt KR, Bostrom MP, Dines JS. An analysis of the hip and knee reconstruction section of the orthopaedic in-training examination. *Orthopedics.* 2011 Sep 9;34(9):e550-5.
- 59; Zapata U, Halvachs EK, Dechow PC, Elsalanty ME, Opperman LA. Architecture and Microstructure of Cortical Bone in Reconstructed Canine Mandibles After Bone Transport Distraction Osteogenesis. *Calcif Tissue Int.* 2011 Sep 17.

- 60: Wolford LM, Dhameja A. Planning for Combined TMJ Arthroplasty and Orthognathic Surgery. *Atlas Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2011 Sep;19(2):243-70.
- 61: Rustemeyer J, Gregersen J. Quality of Life in orthognathic surgery patients: Post-surgical improvements in aesthetics and self-confidence. *J Craniomaxillofac Surg.* 2011 Aug 22.
- 62: Salgado CL, Sanchez EM, Zavaglia CA, Almeida AB, Granja PL. Injectable Biodegradable Polycaprolactone-Sebacic Acid Gels for Bone Tissue Engineering. *Tissue Eng Part A.* 2011 Sep 15.
- 63: Zimmermann CE, Gierloff M, Hedderich J, Aßil Y, Wiltfang J, Terheyden H. Biocompatibility of bone graft substitutes: effects on survival and proliferation of porcine multilineage stem cells in vitro. *Folia Morphol (Warsz).* 2011 Aug;70(3):154-60.
- 64: Simonpieri A, Del Corso M, Vervelle A, Jimbo R, Inchingolo F, Sammartino G, Dohan Ehrenfest DM. Current Knowledge and Perspectives for the Use of Platelet-Rich Plasma (PRP) and Platelet-Rich Fibrin (PRF) in Oral and Maxillofacial Surgery. Part 2: Bone Graft, Implant and Reconstructive Surgery. *Curr Pharm Biotechnol.* 2011 Jul 8.
- 65: Louis PJ. Bone grafting the mandible. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2011 May;23(2):209-27.
- 66: Nascimento SB, Cardoso CA, Ribeiro TP, Almeida JD, Albertini R, Munin E, Arisawa EA. Effect of low-level laser therapy and calcitonin on bone repair in castrated rats: a densitometric study. *Photomed Laser Surg.* 2010 Feb;28(1):45-9.
- 67: Kazem Shakouri S, Soleimanpour J, Salekzamani Y, Oskuie MR. Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process. *Lasers Med Sci.* 2010 Jan;25(1):73-7. Epub 2009 Apr 28.
- 68: Bashardoust Tajali S, Macdermid JC, Houghton P, Grewal R. Effects of low power laser irradiation on bone healing in animals: a meta-analysis. *J Orthop Surg Res.* 2010 Jan 4.
- 69: Zhang Y, Tangl S, Huber CD, Lin Y, Qiu L, Rausch-Fan X. Effects of Choukroun's platelet-rich fibrin on bone regeneration in combination with deproteinized bovine bone mineral in maxillary sinus augmentation: A histological and histomorphometric study. *J Craniomaxillofac Surg.* 2011 Jun 9.
- 70: Olmedo ML, Landry PS, Sadasivan KK, Albright JA, Meek WD, Routh R, Marino AA. Regulation of osteoblast levels during bone healing. *J Orthop Trauma.* 1999 Jun-Jul;13(5):356-62.

- 71: Aimbire F, Ligeiro de Oliveira AP, Albertini R, CorrêaTM JC, Ladeira de Campos CB, Lyon JP, Silva JA Jr, Costa MS. Low level laser therapy (LLLT) decreases pulmonary microvascular leakage, neutrophil influx and IL-1beta levels in airway and lung from rat subjected to LPS-induced inflammation. *Inflammation*. 2008 Jun;31(3):189-97.
- 72: Pires D, Xavier M, Araújo T, Silva JA Jr, Aimbire F, Albertini R. Low-level laser therapy (LLLT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of anti- and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat. *Lasers Med Sci*. 2011 Jan;26(1):85-94. PMID: 20737183.
- 73: Lui J, Corbet EF, Jin L. Combined photodynamic and low-level laser therapies as an adjunct to nonsurgical treatment of chronic periodontitis. *J Periodontal Res*. 2011 Feb;46(1):89-96. doi: 10.1111/j.
- 74: Lange J, Sapozhnikova A, Lu C, Hu D, Li X, Miclau T 3rd, Marcucio RS. Action of IL-1beta during fracture healing. *J Orthop Res*. 2010 Jun;28(6):778-84.
- 75: Boyce BF, Li P, Yao Z, Zhang Q, Badell IR, Schwarz EM, O'Keefe RJ, Xing L. TNF-alpha and pathologic bone resorption. *Keio J Med*. 2005 Sep;54(3):127-31. Review.
- 76: Mountziaris PM, Mikos AG. Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*. 2008 Jun;14(2):179-86. Review.
- 77: Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Gogly B. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006 Mar;101(3):e51-5.
- 78: Shaiegan M, Pourfatollah AA, Namiri M, Babaei G. Generation of IL-8 and TNF-alpha in platelet concentrates during storage. *Arch Iran Med*. 2006 Jan;9(1):61-4.
- 79: Mesquita-Ferrari RA, Martins MD, Silva JA Jr, da Silva TD, Piovesan RF, Pavesi VC, Bussadori SK, Fernandes KP. Effects of low-level laser therapy on expression of TNF- α and TGF- β in skeletal muscle during the repair process. *Lasers Med Sci*. 2011 May;26(3):335-40.
- 80: Safavi SM, Kazemi B, Esmaeili M, Fallah A, Modarresi A, Mir M. Effects of low-level He-Ne laser irradiation on the gene expression of IL-1beta, TNF alpha, IFN-gamma, TGF-beta, bFGF, and PDGF in rat's gingiva. *Lasers Med Sci*. 2008 Jul;23(3):331-5.
- 81: Wallace A, Cooney TE, Englund R, Lubahn JD. Effects of interleukin-6 ablation on fracture healing in mice. *J Orthop Res*. 2011 Sep;29(9):1437-42. doi: 10.1002/jor.21367. Epub 2011 Mar 28.

- 82: Simunović-Soskić M, Pezelj-Ribarica S, Brumini G, Glazar I, Grzifá R, Miletić I. Salivary levels of TNF-alpha and IL-6 in patients with denture stomatitis before and after laser phototherapy. *Photomed Laser Surg*. 2010 Apr;28(2):189-93.
- 83: Pallotta RC, Bjordal JM, Frigo L, Leal Junior EC, Teixeira S, Marcos RL, Ramos L, de Moura Messias F, Lopes-Martins RA. Infrared (810-nm) low-level laser therapy on rat experimental knee inflammation. *Lasers Med Sci*. 2011 Apr 12.
- 84: Hak DJ, Schulz KS, Khoie B, Hazelwood SJ. The effect of Cox-2 specific inhibition on direct fracture healing in the rabbit tibia. *J Orthop Sci*. 2011 Jan;16(1):93-8. Epub 2011 Jan 25. PubMed PMID: 21264481.
- 85: Mohamed SG, Sugiyama E, Shinoda K, Taki H, Hounoki H, Abdel-Aziz HO, Maruyama M, Kobayashi M, Ogawa H, Miyahara T. Interleukin-10 inhibits RANKL-mediated expression of NFATc1 in part via suppression of c-Fos and c-Jun in RAW264.7 cells and mouse bone marrow cells. *Bone*. 2007 Oct;41(4):592-602.
- 86: Cohen SL, Moore AM, Ward WE. Interleukin-10 knockout mouse: a model for studying bone metabolism during intestinal inflammation. *Inflamm Bowel Dis*. 2004 Sep;10(5):557-63.
- 87: Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nihon Med Sch*. 2010 Feb;77(1):4-12. Review.
- 88: da Silva AP, Petri AD, Crippa GE, Stuaní AS, Stuaní AS, Rosa AL, Stuaní MB. Effect of low-level laser therapy after rapid maxillary expansion on proliferation and differentiation of osteoblastic cells. *Lasers Med Sci*. 2011 Aug 13.
- 89: Saracino S, Mozzati M, Martinasso G, Pol R, Canuto RA, Muzio G. Superpulsed laser irradiation increases osteoblast activity via modulation of bone morphogenetic factors. *Lasers Surg Med*. 2009 Apr;41(4):298-304.
- 90: Zhang S, Mao T, Chen F. Influence of platelet-rich plasma on ectopic bone formation of bone marrow stromal cells in porous coral. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2011 Sep;40(9):961-5. Epub 2011 May 18.
- 91: Mooren RE, Hendriks EJ, van den Beucken JJ, Merckx MA, Meijer GJ, Jansen JA, Stoelinga PJ. The effect of platelet-rich plasma in vitro on primary cells: rat osteoblast-like cells and human endothelial cells. *Tissue Eng Part A*. 2010 Oct;16(10):3159-72.