

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE  
NÚCLEO DE PESQUISA EM IMUNOPATOLOGIA E IMUNOLOGIA CLÍNICA  
CENTRO DE BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO - CBR

**Fabiano Luiz Dulce de Oliveira**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM AZUL DE  
METILENO, E LASER DE BAIXA INTENSIDADE, EM DIFERENTES  
INTERVALOS DE TEMPO, NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS ÓSSEAS  
CIRÚRGICAS EM RATOS *Wistar* – ANÁLISE RADIOGRÁFICA E  
HISTOPATOLÓGICA**

**FABIANO LUIZ DULCE DE OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM AZUL DE METILENO, E LASER DE BAIXA INTENSIDADE, EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO, NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS ÓSSEAS CIRÚRGICAS EM RATOS *WISTAR* – ANÁLISE RADIOGRÁFICA E HISTOPATOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre. Área de Concentração: Saúde Brasileira.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Beatriz Julião Vieira Aarestrup**

**Coorientador: Prof. Dr. Fernando Monteiro Aarestrup**

Juiz de Fora

2018

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Oliveira, Fabiano Luiz Dulce de.

Avaliação dos efeitos da terapia fotodinâmica com azul de metileno, e laser de baixa intensidade, em diferentes intervalos de tempo, na cicatrização de feridas ósseas cirúrgicas em ratos wistar – análise radiográfica e histopatológica / Fabiano Luiz Dulce de Oliveira. -- 2018.

107 f. : il.

Orientadora: Beatriz Julião Vieira Aarestrup

Coorientador: Fernando Monteiro Aarestrup

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2018.

1. LLLT. 2. Azul de metileno. 3. Terapia Fotodinâmica. 4. Cicatrização. I. Aarestrup, Beatriz Julião Vieira , orient. II. Aarestrup, Fernando Monteiro , coorient. III. Título.

**FABIANO LUIZ DULCE DE OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM AZUL DE METILENO, E LASER DE BAIXA INTENSIDADE, EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO, NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS ÓSSEAS CIRÚRGICAS EM RATOS *Wistar* – ANÁLISE RADIOGRÁFICA E HISTOPATOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre. Área de Concentração: Saúde Brasileira.

Aprovada em 18 de janeiro de 2018

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Inês da Cruz Campos  
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

---

Prof. Dr. Henrique Duque de Miranda Chaves Netto  
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

---

Prof. Dr. Rodrigo Guerra de Oliveira  
Faculdade de Ciência Médicas e da Saúde - SUPREMA

Dedico esta dissertação de mestrado ao Médico Veterinário Alexandre Pereira de Faria, meu orientador da vida profissional. Esta é apenas uma pequena forma de agradecimento a toda grandiosidade de conhecimento e profissionalismo que pode me ensinar. Serei eternamente grato.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus pela saúde e pelos sentidos, fundamentais para o início, meio e fim de mais uma etapa, de uma longa caminhada, que se encerra na minha carreira profissional e pessoal.

Agradeço também à minha família que sempre me apoiou nas minhas decisões, em especial à minha esposa Maria Tereza, pelo apoio, carinho e principalmente pela compreensão diária, em que muitas vezes deixei de dá-la adequada atenção para me dedicar a esta pesquisa.

Não posso me esquecer do amigo Leonardo Toshio Oshio que, não apenas me mostrou o caminho certo, como também colaborou, e muito, de maneira ética e profissional, para que este sonho pudesse se tornar realidade.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Beatriz Julião Vieira Aarestrup que, já no primeiro contato que tivemos, abriu espaço e me acolheu como seu orientado. Os ensinamentos, a dedicação, as broncas e a amizade, foram, são e sempre serão fundamentais para a minha formação como mestre.

Ao Prof. Dr. Fernando Monteiro Aarestrup que, além de coorientador e um exemplo a ser seguido, me ensinou a ter calma para superar os desafios do dia-dia.

Agradeço aos colegas do Núcleo de Pesquisa em Imunopatologia e Imunologia Clínica pelo aprendizado semanal, pela postura profissional e pelo comportamento pessoal, em especial ao amigo Prof. Dr. Akinori Cardozo Nagato.

À todos os professores, funcionários, técnicos e alunos do Centro de Biologia da Reprodução – CBR, em especial às Professoras Dr<sup>a</sup>. Vera Maria

Peters e Dr<sup>a</sup>. Martha Guerra, fundadoras e diretoras deste excelente centro de pesquisa no qual pude desenvolver minha pesquisa.

Assim como há 10 anos, quando na minha colação de grau fui o responsável em agradecer aos animais, venho novamente agradecer àqueles que contribuíram para o meu treinamento, aprendizado e, acima de tudo, pela a realização do meu experimento e conquista deste título.

Djenanne, Jéssica, Pedro, Bruno, “Jessiquinha”, Vinícius e Carol por me auxiliarem diretamente durante o meu trabalho experimental. Aqui vai o meu muito obrigado!

O meu agradecimento às Redes da FAPEMIG por disponibilizar equipamentos dos quais eu pude usufruir durante todo o período em que estive na pós-graduação.

Agradeço também aos componentes da Banca Examinadora: Dr<sup>a</sup>. Maria Inês da Cruz Campos, Dr. Henrique Duque de Miranda Chaves Netto, Dr. Rodrigo Guerra de Oliveira, primeiramente pelo aceite em participar, e em segundo lugar pelas considerações realizadas.

Enfim, o meu obrigado à Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF.

## RESUMO

A Laserterapia de Baixa Potência (Low Level Laser Therapy – LLLT) apresenta-se como uma terapia não invasiva reconhecida por acelerar processos reparativos tanto de tecidos moles quanto de tecidos duros devido aos seus efeitos biomoduladores nas células e nos tecidos. Quando há associação de uma fonte de luz de comprimento de onda conhecido a um corante fotossensível de baixa toxicidade, temos a, também conhecida, Terapia Fotodinâmica (Photodynamic Therapy - PDT) que, ainda pouco se sabe sobre sua ação no processo de consolidação óssea. O objetivo deste trabalho foi avaliar o processo de reparo ósseo em ratos submetidos à LLLT associada ou não ao azul de metileno a 0,01%, utilizando-se para isso a avaliação radiográfica e histológica. Defeitos ósseos foram realizados e distribuídos em quatro grupos: não tratados (Grupo controle); preenchidos por azul de metileno e não tratados (Grupo azul de metileno); tratados com laser 660nm (Grupo LLLT); preenchidos por azul de metileno e tratados com laser 660nm (Grupo LLLT + PDT). As radiografias foram realizadas nos dias 0, 7 e 14. Metade dos animais, irradiados ou não, foram eutanasiados após sete dias e a outra metade após 14 dias, sendo os fêmures removidos para análise histológica. Os resultados sugerem que, radiograficamente não houve consolidação óssea em nenhum dos grupos tratados, porém os defeitos ósseos do grupo LLLT + PDT apresentaram maior grau de radiopacidade; histologicamente houve maior aumento da área de neoformação óssea nos grupos LLLT e LLLT + PDT, com destaque para este último em ambos os períodos avaliados. Podemos desta forma, concluir que além da associação da PDT à LLLT ter sido eficaz, a combinação das duas técnicas promoveu indução da osteogênese de maneira precoce.

**Palavras-chave:** LLLT; Azul de metileno; Terapia Fotodinâmica; Cicatrização

## ABSTRACT

Low Level Laser Therapy (LLLT) is a recognized noninvasive therapy for accelerating repair processes of both soft and hard tissues due to their biomodulating effects on cells and tissues. When there is an association of a light source of known wavelength with a low toxicity photosensitive dye, we also have the known Photodynamic Therapy (PDT), which is still little known about its action in the process of bone healing. The objective of this work was to evaluate the bone repair process in rats submitted to LLLT, associated or not with 0.01% methylene blue, using radiographic and histological evaluation. Bone defects were performed and distributed in five groups: untreated (control group); filled with methylene blue and untreated (methylene blue group); treated with laser 660nm (LLLT Group); filled with methylene blue and treated with laser 660nm (LLLT + PDT Group). Radiographs were performed on days 0, 7 and 14. Half of the animals, irradiated or not, were euthanized after seven days and the other half after 14 days, and the femurs were removed for histological analysis. The results suggest that radiographically there was no bone consolidation in any of the treated groups, but the bone defects of the LLLT + PDT group presented a higher degree of radiopacity; histologically, there was a greater increase in the area of bone neoformation in the LLLT and LLLT + PDT groups, especially in the two evaluated periods. We can therefore conclude that besides the association of PDT with LLLT was effective, the combination of the two techniques promoted the induction of osteogenesis in an early manner.

**Keywords:** LLLT; Methylene Blue; Photodynamic Therapy; Healing

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Delineamento experimental
- Figura 2 Transoperatório do procedimento experimental realizado no fêmur direito de rato *Wistar*. A: Membro tricotomizado em campo operatório; B: Musculatura afastada demonstrando os defeitos ósseos confeccionados com o auxílio de uma broca odontológica de 2mm na face cranial do fêmur direito; C: Realização da Terapia Fotodinâmica no defeito ósseo distal.
- Figura 3 Representação esquemática da divisão dos grupos experimentais.
- Figura 4 Aplicação do laser, por via transcutânea, de maneira puntiforme, no fêmur direito de rato *Wistar*. A: Simulação do laser em um dos animais que não foram tratados; B: Aplicação do laser em um dos animais tratados.
- Figura 5 Avaliação radiográfica realizada durante o experimento. A: Barra metálica utilizada como parâmetro de radiopacidade dos defeitos; B: Procedimento radiográfico com distanciamento padrão; C: Posicionamento do animal para a realização da incidência crânio-caudal; D: Posicionamento do animal para a realização da incidência médio-lateral; Avaliação radiográfica dos defeitos ósseos com graduação da radiopacidade (1- ausente; 2- leve/discreta; 3- moderada e 4- avançada) da barra de alumínio.

Figura 6 Processamento histológico de uma das amostras (fêmur direito de rato *Wistar*) do experimento. A: Clivagem transversal das epífises; B: Clivagem longitudinal passando no centro de ambos os defeitos ósseos; C: Amostras incluídas em resina plástica (bloco).

Figura 7 Análise microscópica dos defeitos ósseos. A: Câmera (AxioCam Vision) acoplada ao microscópio AxioStar Zeiss AxioCam CHF5 B: Histomorfometria semi-automática da área de neoformação óssea. Imagem capturada do Software Zen 2.3 Blue Edition, Zeiss, Alemanha, 2012.

Figura 8 Imagens radiográficas (projeções médio-lateral e crânio-caudal) do fêmur de ratos *Wistar* utilizados no experimento, com seus respectivos defeitos ósseos. D7: sétimo dia de pós-operatório; D14: décimo quarto dia de pós operatório.

Figura 9 Análise histopatológica (H&E) de defeitos ósseos experimentais realizados no fêmur direito de ratos *Wistar* dos diferentes grupos experimentais. A: defeitos ósseos do grupo controle aos sete dias; B: defeitos ósseos do grupo controle aos quatorze dias; C: defeitos ósseos do grupo azul de metileno aos sete dias; D: defeitos ósseos do grupo azul de metileno aos quatorze dias; E: defeitos ósseos do grupo LLLT aos sete dias; F: defeitos ósseos do grupo LLLT aos quatorze dias; G: defeitos ósseos do grupo LLLT + PDT aos sete dias; H: defeitos ósseos do grupo LLLT + PDT aos quatorze dias. (5µm de espessura). INF – infiltrado inflamatório; MO – medula óssea; GRAN – tecido de granulação;

P – perióstio; OT – osso trabecular; OL – osso lamelar.

Figura 10 Análise histomorfométrica da área de neoformação óssea em defeitos ósseos em fêmur de ratos *Wistar*. Comparação entre as amostras de mesmo grupo nos intervalos propostos. Resultados expressos em média  $\pm$  SD; nível de significância foi de 5% (\* $p < 0,05$ ).

Figura 11 Análise histomorfométrica da área de neoformação óssea em defeitos em fêmur de ratos *Wistar*. Comparação entre os grupos nos intervalos propostos. Resultados expressos em média  $\pm$  SD; nível de significância foi de 5% (\* $p < 0,05$ ).

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Frequência de distribuição do número de amostras (defeito ósseo) do grupo azul de metileno que apresentaram diferença de radiopacidade em relação ao grupo controle
- Tabela 2 Frequência de distribuição do número de amostras (defeito ósseo) do grupo LLLT que apresentaram diferença de radiopacidade em relação ao grupo controle
- Tabela 3 Frequência de distribuição do número de amostras (defeito ósseo) do grupo LLLT + PDT que apresentaram diferença de radiopacidade em relação ao grupo controle

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALA	Ácido 5-aminolevulínico
AM	Azul de Metileno
AsGa	Arseneto de Gálio
ATP	Adenosina Trifosfato
BMP	Proteína Morfogenética do Osso
BMU	Unidade Básica Multicelular
BSP	Sialoproteína Óssea
CBR	Centro de Biologia da Reprodução
CCE	Carcinoma de Células Escamosas
CCO	Citocromo C Oxidase
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CG	Complexo de Golgi
Cl	Cloro
cm	Centímetros
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX	Ciclooxigenase
DCI	Denominação Comum Internacional
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblastos
FS	Fotossensibilizador
GaAIs	Arseniato de Gálio e Alumínio
G I	Grupo Controle
G II	Grupo Azul de metileno

G III	Grupo LLLT
G IV	Grupo LLLT + PDT
HE	Hematoxilina e Eosina
HeNe	Hélio e Neon
IGF	Fator de Crescimento de Insulina
IL	Interleucinas
i-NOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
INF- $\gamma$	Interferon - $\gamma$
J	Joules
J/cm <sup>2</sup>	Joules por centímetro quadrado
K	Potássio
kVp	Kilovoltage peak
LED	Ligth Emitting Diode
LLLT	Low Level Laser Therapy
mA	Miliampère
MCTI	Ministério da Ciência Tecnologia e Inovação
mg/kg	Miligrama por quilo
mm	Milímetros
MSC	Células-tronco Mesenquimais
M-CSF	Fator Estimulador da Colônia de Monócitos
mW	Milliwatts
Na	Sódio
NAALT	North American Association for Laser Therapy
nm	Nanômetros
ODF	Fator de Diferenciação dos Osteoclastos

OCN	Osteocalcina
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PDT	Photodynamic Therapy
pH	Potencial Hidrogeniônico
PO	Proteína óssea
RANK	Ligante do receptor ativador do fator nuclear $\kappa$ - $\beta$
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso
RNA	Ácido ribonucléico
ROS	Espécie de Oxigênio Reativo
RPM	Rotações por minuto
Runx2	Runt-related transcription factor 2
s	Segundos
TENS	Transcutaneous electrical nerve stimulation
TGF- $\beta$	Fator Transformador de Crescimento - $\beta$
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral - $\alpha$
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
W	Watts
W/cm <sup>2</sup>	Watts por centímetro quadrado
V	Volts
VEGF	Vascular endothelial growth factor
$\mu$ m <sup>2</sup>	Micrômetros quadrados

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	22
	2.1 Aspectos histofisiológicos do tecido ósseo .....	22
	2.2 Elementos do tecido ósseo .....	23
	2.2.1 Células Ósseas .....	23
	2.2.2 Matriz Extracelular .....	26
	2.3 Reparo e consolidação das fraturas .....	29
	2.4 Terapias Complementares .....	35
	2.4.1 Laserterapia de Baixa Intensidade .....	35
	2.4.2 Terapia Fotodinâmica .....	43
<b>3</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	53
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	54
	4.1 Geral .....	54
	4.2 Específicos .....	54
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	55
	5.1 Aspectos Éticos .....	55
	5.2 Animais .....	55
	5.3 Delineamento experimental .....	56
	5.4 Métodos .....	57

5.4.1	Confecção dos defeitos ósseos .....	57
5.4.2	Grupos experimentais .....	59
5.4.3	Protocolos de tratamento .....	60
5.4.3.1	Laserterapia .....	60
5.4.3.2	Terapia Fotodinâmica .....	61
5.5	Avaliação radiográfica .....	62
5.6	Eutanásia .....	63
5.7	Processamento e Avaliação histológica .....	64
5.8	Análise estatística .....	66
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>67</b>
6.1	Análise Radiográfica .....	67
6.2	Análise Histopatológica .....	71
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>77</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>95</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>96</b>
	ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS .....	105
	ANEXO B - TÉCNICA DE PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO .....	106
	ANEXO C - PROTOCOLO DE COLORAÇÃO HISTOLÓGICA .....	108

## 1 INTRODUÇÃO

Na rotina cirúrgica ortopédica, frequentemente nos deparamos com situações de descontinuidade óssea seja em consequência de fraturas causadas por impactos de alta energia, distúrbios metabólicos, “gaps” resultantes de osteotomias, neoplasias, infecções, além de complicações do próprio processo de consolidação óssea que, por vezes, geram consequências conhecidas como “união retardada” e “não união” (HARWOOD, FERGUSON, 2015).

O trauma é a condição médica mais cara após as condições cardíacas, custando aos Estados Unidos US\$ 56 bilhões a cada ano. Destes, US\$ 21 bilhões são utilizados para o tratamento de fraturas. Das cerca de 7,9 milhões de fraturas que ocorrem anualmente nos Estados Unidos, aproximadamente 5-10% atrasam a consolidação. Além disso, dessas 600.000 fraturas em processo de consolidação retardada, cerca de 100.000 progridem para não união (BUZA, EIHORN, 2016). Além das razões financeiras relativas ao gasto direto com procedimentos ortopédicos, o paciente, muitas vezes economicamente ativo, deixa de comparecer ao trabalho e, conseqüentemente, de produzir. Logo, há pressa na reabilitação destes pacientes, tanto por questões produtivas, quanto individual e fisiológica do bem estar do próprio paciente (BARBOSA *et al.*, 2013).

A necessidade de hospitalização por período variável, tratamentos cirúrgicos, cuidados intensivos no pós-operatório e programas de reabilitação por longos períodos faz com que o paciente acometido por fraturas gere um alto custo econômico aos cofres públicos (SOARES *et al.*, 2014).

Em uma avaliação mundial sobre fraturas de fêmur nos Estados Unidos, Soares *et al.* (2014) observaram registros de 0,8 caso/mil pessoas com idade  $\geq$  60 anos/ano, com gastos anuais aproximados de 10 bilhões de dólares.

Além das razões financeiras relativas ao gasto direto com procedimentos ortopédicos, há custos sociais. O paciente, muitas vezes economicamente ativo, deixa de comparecer ao trabalho e, conseqüentemente, de produzir. Logo, há pressa na reabilitação destes pacientes, tanto por questões produtivas, quanto individual e fisiológica do bem estar do próprio paciente (BARBOSA, *et al.*, 2013; SOARES *et al.*, 2014).

Na medicina veterinária, especificamente na clínica de pequenos animais (cães e gatos), não há dados que representem os custos, porém essas complicações são comumente vistas na rotina clínica. Sabe-se que as afecções ortopédicas correspondem, aproximadamente, a um terço dos atendimentos na rotina da clínica-cirúrgica veterinária, com destaque para as fraturas de ossos longos que correspondem a 45% de todos os tipos de fraturas (LUCAS *et al.*, 2001). De um total de 1200 cães com suspeita de doença ortopédica de origem traumática no sistema locomotor, 955 (79,58%) apresentaram fraturas apendiculares (LIBARDONI, 2015).

Para haver sucesso no processo de consolidação óssea, as fraturas devem ser reduzidas e estabilizadas de maneira satisfatória, sendo o período pós-operatório crucial no sucesso do procedimento. O ser humano possui a ciência de se manter em repouso, enquanto que o paciente veterinário, por não apresentar esta consciência, muitas vezes contribui para complicações do procedimento cirúrgico (GRIFFON, 2005; FOSSUM, 2013).

No que diz respeito aos métodos alternativos para estimulação do reparo ósseo, tanto a literatura humana quanto a veterinária apresentam inúmeras pesquisas experimentais e clínicas. Métodos foram desenvolvidos e ainda vem sendo aprimorados, para acelerar o processo de consolidação de fraturas, e como opção para o tratamento de “uniões retardadas” ou “não-uniões” (HARWOOD, FERGUSON, 2015). Dentre eles podem ser citadas metodologias por preenchimento local (biológicos ou sintéticos) ou metodologias físicas (por estimulação externa através da via transcutânea). Os primeiros podem ser representados por: cimento de aluminato de cálcio (PURICELLI *et al.*, 2010; SEBBEN *et al.*, 2012; BURGUER *et al.*, 2013), hidroxiapatita (DUARTE *et al.*, 2007; MARCONDES *et al.*, 2016), vidro bioativo (FILHO *et al.*, 2011); enxertos ósseos autógenos (PURICELLI *et al.*, 2010), plasma rico em plaquetas (SEBBEN *et al.*, 2012), células-tronco autólogas (OLIVEIRA *et al.*, 2010), dentre outros. O ultrassom pulsado de baixa intensidade (FARKASH *et al.*, 2015; LEIGHTON *et al.*, 2017), a terapia extracorpórea com ondas de shock (KIEVES *et al.*, 2015) e a laserterapia de baixa intensidade (AURÉGAN *et al.*, 2013), são exemplos de terapias por estimulação física. A grande maioria de todas essas modalidades terapêuticas promove um aumento no recrutamento de células ósseas, estimulando, desta forma, o reparo esquelético.

A Laserterapia de Baixa Intensidade (Low Level Laser Therapy – LLLT) apresenta resultados conhecidos favoráveis ao processo de consolidação óssea, sejam eles comprovados por análises *in vitro* (JAWAD *et al.*, 2013), análises histológicas, através do aumento na proliferação de fibroblastos, matriz óssea e neoformação de vasos sanguíneos (BOSSINI *et al.*, 2012; VÁSQUEZ *et al.*, 2015) ou análises densiométricas (BARBOSA *et al.*, 2013;

BARBOSA *et al.*, 2014). Sabe-se que a terapia inibe o processo inflamatório (POPPI *et al.*, 2011) e acelera a deposição e a organização de ossos recém-formados e ativa fatores osteogênicos (TIM *et al.*, 2014), atuando, principalmente nos estágios iniciais do processo de regeneração óssea (MERLI *et al.*, 2012; BATISTA *et al.*, 2015).

A Terapia Fotodinâmica (Photodynamic Therapy - PDT) se caracteriza por utilizar uma fonte de luz associada a um corante fotossensível de baixa toxicidade que apresenta seletividade por alguns tecidos ou células. Ao absorver a energia proveniente da luz, o fotossensibilizador produz substâncias altamente reativas, que causam alterações e danos celulares (KAIRALLA, 2006). O azul de metileno é um corante capaz de absorver a luz na região entre 620-660nm, espectro que permite maior penetração nos tecidos, promovendo maior ação do composto em tecidos mais profundos (MIRANDA, 2015). Normalmente, a PDT é utilizada no controle de fungos (SOUZA *et al.*, 2006; SENA, 2013), bactérias (PRATES *et al.*, 2006; KIKUCHI *et al.*, 2015) e neoplasias (NORTH, BANKS, 2009; WITHROW, MACEWEN'S, 2007).

Apesar dos inúmeros casos experimentais de métodos alternativos, nenhum, ainda, é conhecido como “padrão-ouro” para acelerar o processo de regeneração óssea. Dessa forma, este trabalho tem por objetivo, verificar os efeitos da associação da PDT, com azul de metileno a 0,01% e da LLLT no processo de consolidação de defeitos ósseos experimentais em fêmur de ratos *Wistar*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos histofisiológicos do tecido ósseo

O osso é um tecido conjuntivo especial, constituído por cristais inorgânicos (65% a 70%) e material orgânico (30% a 35%), sendo este último, predominantemente colágeno (90%) (ANDRADE *et al.*, 2007; AARESTRUP, 2012).

O metabolismo deste tecido recebe importante influência do sistema endócrino e do sistema imunológico e possui como funções a coordenação dos movimentos fornecendo suporte, sustentação e estabilidade através da inserção de tendões e ligamentos, hematopoiese, equilíbrio de íons, reserva mineral, proteção estrutural de órgãos vitais, como aqueles contidos na calota craniana e região torácica (ANDIA *et al.*, 2006; ANDRADE *et al.*, 2007; AARESTRUP, 2012).

Microscopicamente, o tecido ósseo é classificado como primário, trançado ou imaturo, com disposição irregular, fibras colágenas desorganizadas e proporcionalmente menos cristais de hidroxapatita; e secundário, maduro ou lamelar, com fibras colágenas dispostas em lamelas paralelas ou concêntricas em torno dos Canais de Havers, constituindo unidades funcionais denominadas Ósteons ou Sistemas Haversianos. Macroscopicamente, tais elementos formam o osso compacto ou o osso esponjoso (ANDIA *et al.*, 2006). O osso trançado é o primeiro osso a ser formado no desenvolvimento do esqueleto, na fase chamada de modelamento; gradualmente, à medida que o tecido se renova, é substituído por osso lamelar,

que passa a constituir todo o esqueleto. Em organismos adultos, o osso trançado só volta a surgir nas áreas de neoformação óssea, como em consolidações de fraturas ou tumores produtores de tecido (AARESTRUP, 2012).

## **2.2 Elementos do tecido ósseo**

### **2.2.1 Células Ósseas**

As células do tecido ósseo provêm da célula indiferenciada do mesênquima embrionário que se diferencia em células osteoprogenitoras por estímulos de fatores de crescimento transformadores e das proteínas morfogenéticas osteoindutoras-2 (BMP-2) (ANDRADE *et al.*, 2007; MOTA *et al.*, 2008; AARESTRUP, 2012). A partir de expressões genéticas específicas esta célula origina os osteoblastos, sendo o Runx2 um gene mestre para esta diferenciação (FLORENCIO-SILVA *et al.*, 2015).

Após formação do tecido, as células osteoprogenitoras permanecem na medula óssea, no endóstio e no perióstio e quando estimuladas entram em mitose e diferenciam-se em novos osteoblastos durante o processo de consolidação de fraturas, ou em condições patológicas, como hiperplasias ósseas reacionais ou neoplasias (ANDRADE *et al.*, 2007).

Funcionalmente, osteoblastos sintetizam e controlam a mineralização dos componentes da matriz orgânica através da secreção de proteínas colágenas e não-colágenas, proteoglicanos da matriz óssea, metaloproteinases (reguladoras dos fatores de crescimento) e citocinas (produtoras do fator

estimulador de colônia 1; e reguladoras do desenvolvimento dos osteoclastos à diferenciação de várias células hematopoiéticas) (ANDRADE *et al.*, 2007). Após a síntese, o material orgânico, denominado osteóide, sofre impregnação por íons atraídos do sangue (MOTA *et al.*, 2008; AARESTRUP, 2012). Estas células amadurecem dando origem aos osteócitos, em estágio final de diferenciação, que permanecem aprisionadas dentro da matriz mineralizada além de persistirem no perióstio celular como células ósseas de revestimento (ANDRADE *et al.*, 2007).

O osteócito possui pobre atividade metabólica, porém é indispensável para a manutenção da homeostase óssea e para a remoção de catabólitos teciduais; sua identificação em áreas de neoformação óssea é um dos indícios microscópicos de viabilidade óssea em áreas de consolidação. (ANDIA *et al.*, 2006; ANDRADE *et al.*, 2007; AARESTRUP, 2012; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2013).

Os osteócitos são células estreladas com prolongamentos citoplasmáticos que servem para a irrigação dos osteoblastos, além de mobilizar cálcio e outros íons da matriz óssea e os transportar através dos canalículos para os osteoblastos (ANDRADE *et al.*, 2007). Das lacunas partem canalículos, dentro dos quais os prolongamentos citoplasmáticos dos osteócitos percorrem inúmeros canalículos que permitem a intercomunicação entre estas células, osteoblastos e células de revestimento ósseo do endóstio e perióstio, estabelecendo junções (tipo gap) entre estas células, bem como com o sangue (MOTA *et al.*, 2008; AARESTRUP, 2012; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2013). Isto permite aos osteócitos mais profundos responder às modificações sistêmicas, bem como às modificações na superfície óssea de

origens diversas incluindo estímulos bioquímicos e físicos (ANDIA *et al.*, 2006). Os prolongamentos citoplasmáticos, ainda, promovem captação e manutenção iônica, mobilizando cálcio e outros íons da matriz óssea; permitem o fluxo de pequenas moléculas, como hormônios, além de servirem para a irrigação e transporte aos osteoblastos, através dos canalículos (ANDRADE *et al.*, 2007; MOTA *et al.*, 2008; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2013). Este processo é conhecido como a função mecânico sensitiva dos osteócitos (FLORENCIO-SILVA *et al.*, 2015).

Os osteoclastos são células gigantes, multinucleadas de formato irregular que fazem parte do sistema fagocitário mononuclear e realizam reabsorção de tecido ósseo para que este seja renovado (ANDIA *et al.*, 2006; ANDRADE *et al.*, 2007; AARESTRUP, 2012; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2013; FLORENCIO-SILVA *et al.*, 2015). Sua função não é especificamente fagocitária, visto que, na fagocitose, após digestão, a partícula é eliminada, enquanto na reabsorção há reaproveitamento metabólico. Os osteoclastos realizam reabsorção tanto da matriz orgânica, via enzimas digestivas (produção de colagenases e catepsinas), quanto da porção mineral, via produção de ácidos (pH próximo a 3,5) sintetizados pela própria célula, com reaproveitamento das unidades “quebradas”, promovendo escavações na superfície óssea (ANDIA *et al.*, 2006; MOTA *et al.*, 2008; AARESTRUP, 2012).

Os fatores reguladores da função dos osteoclastos são: Fator Estimulador da Colônia de Monócitos (M-CSF), Fator de Diferenciação dos Osteoclastos (ODF), IL, vitamina D3, Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), partículas ósseas mineralizadas contendo osteocalcina e RANK ligante (ANDRADE *et al.*, 2007; FLORENCIO-SILVA *et al.*, 2015). O M-CSF e o

RANKL, juntos, promovem a ativação dos fatores de transcrição e expressão gênica nos osteoclastos. Quando o receptor de M-CSF se liga ao osteoclasto precursor, há estímulo de proliferação e inibição da apoptose dos osteoclastos. Da mesma forma, quando o receptor de RANK se liga ao osteoclasto precursor, induz a formação de osteoclastos (FLORENCIO-SILVA *et al.*, 2015).

Segundo Andia *et al.* (2006) durante o processo de apoptose dos osteoblastos, os osteoclastos são atraídos para o local de ocorrência e imediatamente reconhecem e internalizam os osteoblastos e/ou osteócitos em apoptose. A mesma autora complementa sugerindo que o TGF- $\beta$  e o estrógeno parecem promover a apoptose, enquanto o paratormônio e a IL-1 podem agir como supressores de apoptose, prolongando a atividade osteoclástica.

### **2.2.2 Matriz Extracelular**

A matriz óssea, também conhecida como matriz extracelular apresenta-se como uma complexa e organizada estrutura que fornece suporte mecânico essencial e participa no processo de homeostase óssea. Ela pode liberar várias moléculas que interferem diretamente na atividade das células ósseas, com considerável participação na remodelação óssea (FLORENCIO-SILVA *et al.*, 2015).

Dentre as principais proteínas presentes na estrutura da matriz orgânica estão o colágeno tipo I, a osteocalcina, a osteopontina, as proteoglicanas e as fosfoproteínas. Estes componentes interagem entre si e organizam-se fornecendo um arcabouço que permite a deposição de minerais (ANDIA *et al.*, 2006; ANDRADE *et al.*, 2007; MOTA *et al.*, 2008).

A matriz é dividida em parte orgânica e inorgânica. A primeira é responsável pela resistência à fratura e tensão, ou seja, confere dureza ao tecido; enquanto que a segunda representa a resistência à deformação (ANDIA *et al.*, 2006; AARESTRUP, 2012).

A porção orgânica do osso corresponde a 35% do material extracelular e é composta por proteínas colágenas e não-colágenas, além de proteoglicanos. Dentre as proteínas colágenas, o colágeno tipo I representa 90%, sendo este, servindo de base para a fase mineralizada (ANDRADE *et al.*, 2007; AARESTRUP, 2012).

Quanto às proteínas não-colágenas, podemos citar:

a) Osteocalcina – está presente nos osteoblastos, na matriz mineralizada e no cimento acelular. É responsável por atrair íons cálcio e fósforo para a impregnação no osteóide, promovendo, desta forma, a mineralização óssea e regulação do crescimento dos cristais. Sua expressão é controlada pela forma ativa da vitamina D (ANDRADE *et al.*, 2007; AARESTRUP, 2012);

b) Osteopontina – encontrada na superfície da matriz está envolvida na organização tecidual, interrompendo a síntese após a mineralização do osteóide (AARESTRUP, 2012);

c) Osteonectina – considerada a proteína não-colágena mais abundante do tecido ósseo, é responsável pela adesão dos osteoblastos à interface óssea, sendo sua participação mediada pelo cálcio (ANDRADE *et al.*, 2007; AARESTRUP, 2012);

d) Sialoproteína – é encontrada restritamente na matriz óssea mineralizada, mas não no osteóide. Quando em associação com a osteocalcina

e fibrilas colágenas criam uma alta concentração de cálcio, levando a precipitação deste mineral. Além disso, promove reabsorção óssea, indiretamente, por aumentar a adesão dos osteoclastos na matriz óssea (ANDRADE *et al.*, 2007).

e) Osteoprotegerina – é também chamada de protetora óssea (PO) ou fator de inibição da osteoclastogênese. Logo, tem por função inibir a formação de novos osteoclastos. A molécula da família TNF, RANK-L e seus receptores RANK funcionam como chave para a modelação óssea e são essenciais para o desenvolvimento e ativação dos osteoclastos. O processo de reabsorção óssea se dá através da ligação do RANK com o RANK-L, que resulta na osteoclastogênese de células progenitoras e na ativação dos osteoclastos maduros. A osteoprotegerina funciona como um receptor do RANK-L, e compete com o RANK para se ligar ao RANK-L. Trata-se de um efeito inibidor da ativação e maturação dos osteoclastos. Ou seja, todos os fatores que inibem ou estimulam a reabsorção óssea via osteoclastos, agem via RANK-L, RANK e/ou osteoprotegerina (ANDRADE *et al.*, 2007).

Florencio-Silva *et al.* (2015) acrescentaram a presença de pequenos proteoglicanos ricos em leucinas incluindo decorinas, biglicanos, lumicanos, osteoaderinas e proteínas séricas. Andia *et al.* (2006) complementaram sugerindo que as proteínas derivadas do sangue e dos fluidos teciduais estão concentradas no osso devido à sua afinidade com os cristais minerais, sendo estas representadas pela albumina,  $\alpha$ 2HS-glicoproteína e imunoglobulinas.

Quanto aos componentes inorgânicos, estes representam 65% da matriz e são compostos por fosfato de cálcio (na forma de cristais de hidroxiapatita), magnésio, bicarbonato, sódio e potássio. Eles se ligam à parte orgânica sendo

distribuídos entre os feixes de colágeno, fornecendo resistência ao tecido ósseo (ANDIA *et al.*, 2006; AARESTRUP, 2012; FLORENCIO-SILVA *et al.*, 2015).

### **2.3 Reparo e consolidação das fraturas**

Fratura é uma interrupção na continuidade do osso que foi submetido a um estresse maior do que aquele em que ele é capaz de suportar. Neste caso, as estruturas adjacentes também são afetadas, ocasionando edema de tecidos moles, hemorragia muscular, possibilidade de luxações articulares, ruptura de tendões, secção de nervos e lesão de vasos sanguíneos (SMELTZER *et al.*, 2009).

Para um correto processo de consolidação óssea, as fraturas devem ser reduzidas, alinhadas e estabilizadas de maneira satisfatória (PORTH, 2002). A partir daí inicia-se o processo inflamatório, que, seguindo uma série de ações celulares e hormonais, culmina com o restabelecimento da continuidade óssea.

O reparo ósseo é um processo biológico que ocorre após a destruição de tecido ósseo e cartilaginoso, e que tem por finalidade restaurar a continuidade tecidual e restabelecer a função perdida. Este processo varia de acordo com fatores biológicos (local da fratura, tipo ósseo, respostas celulares, suprimento sanguíneo e grau de lesão do tecido mole adjacente) e mecânicos (estabilidade dos fragmentos após fixação) que influenciam diretamente na sequência dos eventos celulares (FOSSUM, 2013).

Todos os processos fisiológicos que ocorrem dentro do osso (no que diz respeito ao reparo de uma fratura) dependem de suprimento sanguíneo

adequado. Qualquer prejuízo circulatório pode retardar a cicatrização (FOSSUM, 2013). Se a vascularização adequada estiver presente, o padrão de reparação da fratura é ditado pelo ambiente biomecânico. De fato, os ossos só podem ser produzidos após a restauração da estabilidade mecânica. Isso pode ser alcançado por um processo natural de cicatrização ou por osteossíntese, com estabilização parcial ou completa dos fragmentos da fratura (GRIFFON, 2005)

Imediatamente após uma fratura, o hematoma parece acionar moléculas que possuem a capacidade de acionar cascatas inflamatórias celulares para que ocorra a cicatrização. Células inflamatórias secretam citocinas (IL-1 e IL-6) importantes na regulação dos eventos iniciais da cicatrização das fraturas. Moléculas como o fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) e o fator de crescimento derivado de plaquetas, constituem reguladores importantes de proliferação e diferenciação celulares. Essas, além de outras moléculas, parecem estar envolvidas na quimiotaxia e na angiogênese. A medula óssea sofre reorganização de componentes celulares que se transformam em células osteoblásticas e começam a formar tecido ósseo. O trajeto final da formação óssea depende do ambiente mecânico da fratura (FOSSUM, 2013).

Ocorre formação óssea intramembranosa precoce sob o perióstio a uma certa distância do local de fratura em uma área de estabilidade relativa, formando o calo ósseo de ligação inicial. No início, os intervalos da fratura são ligados por tecidos que podem suportar movimento (hematoma e tecido de granulação); esses tecidos são substituídos, sequencialmente, por aqueles que aumentam a rigidez óssea (tecido conjuntivo fibroso, fibrocartilagem e osso lamelar), culminando na mineralização fibrocartilaginosa. Essa mineralização

começa nas superfícies de fragmentos e continua em direção ao centro do intervalo, formando tecido ósseo trabecular e trançado. Ocorre reabsorção local do tecido ósseo inicial, seguida de vascularização das cavidades de reabsorção e substituição por osso lamelar. A formação e a reabsorção contínuas de osso lamelar em locais de fratura resultam em remodelação do calo ósseo em osso cortical (FOSSUM, 2013).

Ocorre cicatrização óssea direta (formação sem estágio intermediário) quando dispositivos de fixação mantêm absoluta estabilidade de fragmentos. A formação óssea que ocorre em pequenos intervalos na linha de fratura após fixação rígida é chamada de cicatrização intervalar. No início, esses intervalos são preenchidos por uma rede de tecido fibroso, mas em torno de 8 semanas ele começa a se remodelar. Inicia-se a reconstrução longitudinal com remodelação haversiana. Esta começa com reabsorção osteoclástica de tecido ósseo e formação de cavidades de reabsorção que penetram em sentido longitudinal através das extremidades dos fragmentos e do tecido ósseo recém-formado nos intervalos de uma fratura. Os osteoclastos são seguidos por alças vasculares, células mesenquimatosas e precursores osteoblásticos. Os osteoblastos revestem as cavidades de reabsorção e secretam osteóide, que é mineralizado em tecido ósseo. Esse tecido ósseo lamelar distribui-se ao longo do eixo longitudinal de um osso, através das extremidades e dos intervalos da fratura e resulta em forte união dos fragmentos ósseos (FOSSUM, 2013).

A cicatrização de fraturas instáveis é caracterizada pela formação de um calo intermediário antes da formação óssea. Este tipo de cicatrização é referido como cicatrização indireta ou secundária. Ela ocorre em fraturas com

ambiente mecânico instável, que resultam de movimento dos ossos adjacentes (FOSSUM, 2013). É arbitrariamente dividida em três fases: inflamação, reparo e remodelação. Esta passagem, através de diferentes estágios, promove aumento de rigidez e força que, eventualmente, leva a uma biomecânica ambiental que permite formação e união óssea. A quantidade de calo produzido depende da estabilidade da fratura, e aumenta com maior instabilidade (GRIFFON, 2005)

A fase inflamatória inicia-se imediatamente após a interrupção inicial do osso e dos tecidos e persiste até quando a formação de cartilagem ou osso é iniciada. Esta fase, portanto, dura de 3 a 4 dias e, pode ser, potencialmente mais longa, dependendo da quantidade de força que causou a fratura. Clinicamente, o fim do estágio inflamatório coincide com a diminuição da dor e do inchaço (GRIFFON, 2005)

As fraturas inevitavelmente causam uma ruptura dos vasos medulares com posterior extravasamento de sangue. Embora a contração e a trombose dos vasos interrompidos minimizam a perda de sangue, há uma interrupção do fluxo sanguíneo que leva à isquemia e necrose do osso, caracterizada histologicamente pela presença de lacunas vazias. Um coágulo rico em fibrinas forma-se no local da fratura, iniciando uma cicatrização espontânea da fratura. Há evidências de que o hematoma estabelece o estágio inicial para a fase de reparo, liberando fatores crescimento, estimulando a angiogênese e a formação óssea (GRIFFON, 2005).

As propriedades angiogênicas do hematoma de uma fratura parecem ser mediadas por via vascular pelo Factor de Crescimento Endotelial (VEGF). Acidez local e citocinas contidas no exsudado acumulado na área lesada,

complementa esse efeito. De fato, mediadores inflamatórios, tais como prostaglandinas  $E_1$  e  $E_2$ , podem estimular a angiogênese, e também podem ser responsáveis por sinalizar a reabsorção óssea precoce pelos osteoclastos e a proliferação de células osteoprogenitoras. Finalmente, os mastócitos contendo substâncias vasoativas abundantes durante esta fase, contribuem para a formação de novos vasos. Em poucas horas, um sangue extraósseo, de suprimento transitório, emerge de tecidos moles circundantes, revascularizando o local da fratura hipóxica. Fagócitos mononucleares entregues por estes novos vasos auxiliam na remoção do osso necrótico e na construção do calo (GRIFFON, 2005).

A fase de reparo ocorre, dentro de poucos dias. O crescimento capilar, em conjunto com células mononucleares, começa a transformação de um hematoma em tecido de granulação. Esta fase inicial do reparo coincide com um ligeiro aumento na força mecânica (GRIFFON, 2005).

Células mesenquimais dentro do periósteo, do endósteo, da medula óssea e dos tecidos moles adjacentes começam a se proliferar durante a fase inflamatória e se diferenciam em condrócitos durante a fase de reparação. Quimiotaxia, proliferação, coordenação e diferenciação destas células-tronco em condrócitos ou osteoblastos são orquestrados por inúmeros fatores de crescimento, dentre os quais TGF- $\beta$  e as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) desempenham um papel importante. Apesar de o tempo exato dessa fase de indução não estar clara, ela pode ser iniciada durante a fase inflamatória e é crucial para a formação ordenada e maturação de tecidos dentro do intervalo de fratura. O periósteo que envolve o local da fratura engrossa antes de sofrer uma transformação condrogênica, produzindo um

calo externo inteiramente vascularizado por vasos extraósseos. Forma-se um calo interno ou medular na camada celular endosteal que está confinado ao canal medular e recebe o seu fornecimento de sangue derivado das arteriolas medulares. A presença de uma camada de fibrocartilagem no canal medular interrompe temporariamente o fluxo de sangue medular em toda a falha de fratura. Ambos os calos externo e internos unem-se e passam a constituir o "calo de ponte" (GRIFFON, 2005).

A produção de um calo externo proeminente é uma evidência comum em instabilidade de fraturas bem vascularizadas. Essas estruturas contribuem muito para a restauração da força e rigidez dentro do foco da fratura, permitindo assim a formação de osso compactado (GRIFFON, 2005).

No final da fase de reparação, a união óssea é alcançada, mas a estrutura do local da fratura difere daquela do osso original. O tempo necessário para alcançar a união varia muito de acordo com configuração e localização da fratura, o estado dos tecidos moles adjacentes, bem como com as características do paciente (espécie, idade, estado de saúde, lesões concomitantes, doenças). No final da fase de reparação, o osso lesionado recupera força e rigidez suficiente para permitir exercícios de baixo impacto (GRIFFON, 2005).

## 2.4 Terapias Complementares

### 2.4.1 Laserterapia de Baixa Intensidade

A palavra LASER é uma sigla para “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation” (RAYEGANI *et al.*, 2010; CALIN, COMAN, 2011; HUGHES, 2011). Um laser produz fótons de luz com características físicas específicas, a saber:

monocromaticidade - significa que todas as ondas eletromagnéticas do laser apresentam o mesmo comprimento de onda, conseqüentemente, a mesma cor;

- coerência - refere-se a que todos os fótons de luz do laser oscilam na mesma fase;
- direcionalidade - apresenta-se como consequência da característica anterior, resultando em um elemento altamente direcional;
- intensidade - representa a capacidade de o laser possuir elevada intensidade de energia numa pequena área (RAYEGANI *et al.*, 2010; CALIN, COMAN, 2011).

A primeira lei da fotobiologia afirma que, para a luz visível ter efeito sobre um sistema biológico vivo, os fótons por ela emitidos devem ser absorvidos por fotorreceptores ou cromóforos moleculares com o espectro de absorção dos elétrons semelhantes ao dos fótons. A segunda consideração importante envolve as propriedades ópticas do tecido. Tanto a absorção quanto a dispersão da luz no tecido são dependentes do comprimento de onda e dos principais cromóforos dos tecidos (HAMBLIN, DEMIDOVA, 2006).

A LLLT tem sido utilizada desde 1960, por apresentar efeitos terapêuticos no tratamento de uma série de condições patológicas em diversos tecidos (tecido nervoso, tecido muscular, tecido cartilaginoso, entre outros), no intuito de reduzir a inflamação aguda, diminuir a dor e estimular processos de reparação tecidual (FEITOSA *et al.*, 2007; NASCIMENTO *et al.*, 2010).

A terapia laser utiliza diferentes comprimentos de onda do espectro vermelho (visível) assim como do infravermelho (não visível), como por exemplo: HeNe 632,8 nm; GaAlAs 650 ou 805nm; AsGa 904 nm (NASCIMENTO *et al.*, 2010). A faixa de comprimento de onda compreendida entre 600nm e 900nm foi identificada como sendo a que contém comprimentos de onda apropriados para o laserterapia (RAYEGANI *et al.*, 2010).

As características de monocromaticidade e coerência são responsáveis pela penetração do feixe de luz nos tecidos, sem afetar as células normais. Além destas, o comprimento de onda e a fonte de energia da luz também participam desta particularidade (RAYEGANI *et al.*, 2010).

Os lasers de baixa intensidade não produzem calor e não é destrutivo ao tecido-alvo, como observado nos lasers cirúrgicos. Seu mecanismo de ação é a fotoestimulação ou fotobiomodulação, processo no qual a exposição à luz desencadeia reações químicas levando a mudanças no estado de oxidação/redução das mitocôndrias com aumento da síntese de ATP, no ciclo de Krebs; há, ainda, ativação da bomba de sódio/potássio que altera a permeabilidade da membrana celular ao cálcio. Desta forma, a célula é fornecida com mais energia, apresentando condição ideal para desempenhar seu papel no processo de reestabilização (LI *et al.*, 2009; RAYEGANI *et al.*, 2010). Deste modo, há estímulo mitótico, aumento metabólico e

potencialização da regeneração celular. Ainda, a biomodulação gerada pelo laser tem características anti-inflamatórias com redução do edema, controle de formação de tecido fibroso, estímulo da função nervosa e da produção de óxido nítrico; destaca-se, imunologicamente, a ação na diminuição da formação de bradicinina, histamina e acetilcolina, além de estimular a produção de endorfinas (KNEEBONE, 2006). Foi observado também, que o laser promove a reabsorção de exsudatos, a síntese e remodelação de colágeno, o aumento do número de fibroblastos e o aumento da viabilidade dos enxertos (FEITOSA *et al.*, 2007). Rocha, *et al.* (2012) comprovaram, experimentalmente, através da indução de feridas cutâneas em camundongos diabéticos, que a laserterapia é capaz de modular negativamente a expressão da enzima ciclooxigenase 2, o que contribui para o controle da resposta inflamatória.

Segundo Rayegani *et al.* (2010), em sua revisão, os efeitos da LLLT podem ser classificados em efeitos de curto e longo prazo. Os efeitos de curto prazo incluem a produção de beta-endorfina e cortisol, que permitem ao corpo combater o estresse associado ao processo da doença. Eles representam 5 a 10% dos casos, durante ou após o tratamento inicial, mas não são tão importantes como aqueles de longo prazo ou cumulativo. Nestes, a atividade mitocondrial é estimulada. Há aumento na produção de DNA e ATP resultando num melhor metabolismo celular. A neurotransmissão é facilitada devido aos níveis elevados de serotonina e acetilcolina. Macrófagos, fibroblastos e outras funções celulares são moduladas com a melhora da angiogênese e liberação de citocina. O potencial de membrana celular é regulado, principalmente na transferência dos íons Na, Cl e K. Além disso, o laser estimula a resposta imunológica, melhora a drenagem linfática e aumenta a produção do hormônio

de crescimento. Calin e Coman (2011) citam que alguns transtornos dos tecidos moles como feridas cutâneas, entorses, disfunções músculo-esqueléticas, neuropatias e lesões de esportes, na medicina veterinária, podem ser tratados através da LLLT. Quanto a doenças de tecidos duros, os mesmos autores citam o tratamento de distúrbios da coluna vertebral, articulações e fraturas.

Assim, muitos efeitos terapêuticos obtidos por meio da LLLT, porém destaca-se que seus resultados dependem de parâmetros como tempo, comprimento de onda, densidade de potência, e pulso, este último parametro muitas vezes referido como "dose" e expresso como energia (J) ou densidade de energia (J / cm<sup>2</sup>) (CHANG *et al.*, 2014).

Já se é sabido que há um intervalo de sobredosagem em que a LLLT pode inibir a recuperação da célula e, consequentemente, a resolução da patologia a ser tratada (RAYEGANI *et al.*, 2010).

Nas últimas décadas, tem havido uma tendência de se considerar a LLLT como uma modalidade de terapias físicas eficaz na regeneração óssea. Pesquisas *in vitro* e *in vivo* têm sido desenvolvidas no intuito de melhorar a reparação óssea e melhor compreender como esta irradiação afeta a histofisiologia e o metabolismo ósseo (LI *et al.*, 2009; BOSSINI *et al.*, 2012; JAWAD *et al.*, 2013; VÁZQUEZ *et al.*, 2015). Segundo Nascimento *et al.* (2010), os resultados indicam que as propriedades fotofísicas e fotoquímicas de alguns comprimentos de onda são os principais responsáveis pela resposta do tecido.

Hughes (2011) observa que a LLLT pode ser utilizada para o tratamento crônico de desordens articulares, pois aumenta a biossíntese de cartilagem,

estimula a microcirculação e reduz a inflamação; nas consolidações ósseas, estimula a proliferação osteoblástica, a neoformação da matriz extracelular por estimular a deposição de colágeno e confere boa organização das trabéculas ósseas; o autor cita, ainda, que a aplicação de laser cria um calo menor, porém mais forte.

De acordo com Feitosa *et al.* (2007), o laser é um recurso que vem demonstrando efeitos positivos na proliferação de células ósseas e no processo de consolidação de fraturas em animais. Segundo os mesmos autores, a LLLT é capaz de produzir um aumento na proliferação de osteoblastos, aumento na síntese de DNA, aumento das concentrações de fosfatase alcalina, aumento da velocidade de reorganização da estrutura trabecular e de canais haversianos.

Na osteogênese, a LLLT atua no sentido de melhorar as propriedades mecânicas do calo ósseo através do aumento do número de osteoblastos e fibroblastos, estimulando, assim, a síntese da matriz óssea (MOTA *et al.*, 2013).

Em estudos de fraturas em modelos animais, a LLLT parece promover uma série de modificações metabólicas e estruturais no local, como por exemplo, o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, a maior formação de tecido de granulação, a estimulação de fibroblastos, a maior deposição de colágeno, o aumento na síntese de ATP e a estimulação de células ósseas. Essas modificações são responsáveis por um aumento da osteogênese, bem como pela aceleração no processo de reparo ósseo (FEITOSA *et al.*, 2007).

Objetivando investigar os efeitos da LLLT em ratos com osteoporose, Bossini *et al.* (2012), procuraram realizar avaliações da deposição de colágeno

no local da fratura por meio da análise histopatológica, além de propriedades biomecânicas e imuno-histoquímica. Em ambos os grupos tratados com laser, houve um aumento na quantidade de osso recém formado, evidenciado pelo tecido de granulação não presente no grupo controle. Além disso, a análise demonstrou que os animais irradiados apresentaram maior deposição e melhor organização das fibras de colágeno. Pode ser citado ainda, que houve imunorreatividade positiva nos grupos tratados, no entanto, nenhuma diferença foi demonstrada na análise biomecânica. Logo, os autores concluíram que houve estimulação do osso recém formado, pelo aumento da vascularização, por angiogênese.

Mota *et al.* (2013) citaram que, no tecido ósseo, a LLLT representa um tratamento promissor capaz de induzir a osteogênese e estimular a consolidação da fratura. Ela atua melhorando as propriedades mecânicas do calo ósseo, aumentando o número de osteoblastos e fibroblastos, estimulando, assim, a síntese da matriz óssea.

Pretel *et al.* (2007) avaliaram a reparação óssea em defeitos ósseos confeccionados na mandíbula de ratos *Holtzman* após estimulação única direta com laserterapia infravermelha (laser GaAlAs de 830nm, 35mW, 1,4J energia e fluência de  $178\text{J}/\text{cm}^2$ ). Como resultados, os autores observaram uma resposta avançada do tecido, com diminuição do processo inflamatório e formação de matriz óssea no 15° e 45° dias no grupo irradiado, porém não houve diferenças entre os grupos no 60° dia. Isto indica que a LLLT apresentou um efeito bioestimulador na remodelação óssea, modulando a resposta inflamatória e antecipando a resolução do processo.

Tendo por objetivo avaliar e comparar o efeito histológico da LLLT no reparo de defeitos ósseos produzidos no fêmur de ratos, Adel *et al.* (2011) utilizaram 60 animais machos em dois grupos iguais, sendo o grupo A tratado com laser infravermelho em um comprimento de onda de 904nm, e o grupo B não tratado. O primeiro grupo recebeu tratamento por sete sessões de cinco minutos cada. Ambos os grupos foram subdivididos conforme o dia da eutanásia (15, 30 e 45 dias). De acordo com este estudo, os autores concluíram que a LLLT foi eficaz na promoção da cicatrização óssea, promovendo aumento na formação do osso.

Mota *et al.* (2013) justificaram seu experimento por não encontrarem na literatura nenhum protocolo de aplicação específico para a utilização LLLT nos diferentes tipos de células. Para isso os autores utilizaram ratos *Wistar* machos como modelo, para avaliarem a atividade terapêutica do laser sobre o processo de reparação aguda e crônica de lesões ósseas. Neste trabalho, eles concluíram que este método de tratamento favoreceu os mecanismos fisiopatológicos de consolidação óssea, principalmente quando utilizado na fase aguda do ferimento. Bioquimicamente, encontraram aumento significativo nos níveis de fosfatase alcalina e, mecanicamente, um aumento na rigidez do osso irradiado.

De acordo com Hughes (2011), a LLLT apresenta efeitos anti-inflamatórios semelhantes ao de agentes farmacológicos, como celecoxib e meloxicam. Ele acrescenta que a dor é adicionalmente controlada devido à redução do estresse oxidativo, aumento da angiogênese, aumento da síntese de colágeno e reparo esquelético. Esta redução da dor pode ser de longa

duração. E por fim, o autor ainda cita que o laser é capaz de inibir a transmissão na junção neuromuscular.

Utilizando-se de 50 pacientes humanos divididos em dois grupos, tratados e não tratados, Chang *et al.* (2014) avaliaram o uso da LLLT (830nm) em fraturas ósseas fechadas de pulsos e mãos que não receberam tratamento cirúrgico, obtendo como resultado diminuição da dor e aumento no processo de consolidação óssea. Estes efeitos melhoraram a capacidade funcional da mão e a força do pulso, beneficiando a recuperação dos pacientes.

A LLLT vem sendo estudada em animais sadios e animais doentes induzidos experimentalmente com efeitos positivos. A hipótese de que a irradiação laser atuante no tecido ósseo de ratos diabéticos pode aumentar a massa óssea e as propriedades biomecânicas, foi um estímulo para que Patrocínio-Silva *et al.* (2014) avaliassem, *in vivo*, os efeitos da LLLT na formação óssea, na imunoexpressão de fatores osteogênicos, parâmetros densiométricos e propriedades mecânicas em ratos diabéticos. Bossini *et al.* (2012) na expectativa de que a LLLT pode acelerar o metabolismo de ossos osteoporóticos, induziram a osteoporose em ratas *Wistar* através da ovariectomia e, após 2 meses, realizaram defeitos ósseos de 2mm de diâmetro na tíbia das fêmeas. Como protocolo terapêutico, os autores utilizaram, a cada 48 horas, o laser 830nm durante 17s e 34s, obtendo tratamentos de  $60\text{J}/\text{cm}^2$  e  $120\text{J}/\text{cm}^2$ . No 14º dia a análise histológica revelou que em ambos os grupos tratados apresentaram aumento na quantidade de osso neoformado e tecido de granulação, com diferença estatística em relação ao grupo controle, porém ausente entre eles. Sugere-se que os resultados positivos encontrados no

presente trabalho, com o uso das terapias combinadas, possam ser repetidos em animais com deficiência do metabolismo ósseo.

A investigação da hipótese de que a LLLT induz o estresse oxidativo e estimula a geração de marcadores pró-inflamatórios vem sendo estudada através da avaliação de mediadores inflamatórios (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ ) e da expressão gênica (COX-1, COX-2, iNOS, eNOS), com resultados positivos para tratamentos realizados com laser de 660nm, 1J-35,7 J/cm<sup>2</sup> utilizados por curto período de tempo (10 segundos) (PETRELLIS *et al.*, 2017). Dessa forma, novos avanços estão sendo dados para entender melhor o mecanismo de ação da LLLT e, indiretamente, melhorar o emprego da terapia fotodinâmica.

#### **2.4.2 Terapia Fotodinâmica**

A PDT depende da presença simultânea de um fotossensibilizador (FS), de luz visível e de oxigênio molecular para causar uma reação fotoquímica com efeitos biológicos (WITHROW, MACEWEN'S, 2007). A reação fotoquímica é “não térmica” e deve envolver um FS não tóxico, de luz visível e de comprimento de onda apropriado para excitar o FS (estado tripleto) e oxigênio molecular. O estado tripleto reativo faz com que o FS gere espécies reativas de oxigênio, tais como oxigênio singleto e dismutase (SELLERA *et al.*, 2014; ROSA *et al.*, 2015).

Esta terapia remonta às tentativas de antigos egípcios em tratar doenças de pele com compostos absorvíveis pela luz. Documentos datados com seis mil anos de idade relatam que os antigos egípcios aplicavam substâncias vegetais para produzir fotorreações nos tecidos (SELLERA *et al.*, 2014).

Em 1900, relatou-se a primeira descrição científica de tratamento fotodinâmico, realizado por um estudante de medicina, Oscar Raab, e por seu professor, Herman Von Tappeiner, em Munique. Esses pesquisadores investigavam o efeito do corante de acridina sobre culturas de paramécios e observaram que a interação desse corante com a luz foi letal para os protozoários. Durante uma tempestade e exposição a muitos raios, houve alteração das condições luminosas do ambiente no momento dos experimentos, direcionando os autores a postularem que o efeito observado fosse causado pela transferência da energia da luz para a substância química acridina. A ação fotodinâmica foi comprovada quando se observou que a luz e o corante, isoladamente, não apresentaram qualquer efeito sobre os protozoários (SELLERA *et al.*, 2014).

Em 1901, Niels Finsen publicou o primeiro livro voltado para o tratamento de doenças através da luz, intitulado "Phototherapy" e, dois anos após, em 1903, o mesmo pesquisador foi premiado com o Prêmio Nobel na área de Medicina, pelo uso da eosina e da luz no tratamento de *Lupus vulgaris*. No mesmo ano, Hereon Henrian Von Tappeiner descobriu que a presença do oxigênio era necessária para o desenvolvimento da resposta das reações mediadas pela luz. Assim foi criado o termo "Terapia Fotodinâmica", conhecido até os dias atuais, para descrever essa terapia oxigênio-dependente (SELLERA *et al.*, 2014).

As primeiras fontes de luz empregadas na PDT foram lâmpadas convencionais, com luz não coerente, policromática, e forte componente térmico, resultando no aumento de temperatura da área irradiada. O

desenvolvimento do laser possibilitou o emprego de uma fonte de luz de baixa intensidade, capaz de estimular a reação fotodinâmica (SELLERA *et al.*, 2014).

Recentemente, o LED (Ligth Emitting Diode) tem sido utilizado para tratar carcinoma de células escamosas superficiais (CCE) em gatos, representando o primeiro relato na veterinária de um dispositivo não-laser aplicável clinicamente. Ele é um dispositivo de lâmpada filtrada, capaz de se aproximar da faixa de saída espectral (SELLERA *et al.*, 2014). A eficácia da PDT *in vitro* usando o LED verificou ser equivalente a de um laser (WITHROW, MACEWEN'S, 2007).

No mecanismo de ação da PDT, há absorção da luz por citocromos e porfirinas encontrados nas membranas celulares e mitocôndrias das células. Estes passam do estado fundamental para o estado excitado singleto. Uma vez absorvendo moléculas, o estado excitado pode ser devolvido para o estado fundamental por transições radioativas ou ainda, por intercâmbio de energia, passar para o estado excitado tripleto. Moléculas no estado excitado tripleto transmitem sua energia de excitação para o oxigênio molecular (que está no seu estado tripleto fundamental), que passa para o seu estado mais baixo, o singleto excitado. O oxigênio singleto faz parte dos radicais livres e é uma das formas mais ativas no metabolismo celular (CALIN, COMAN, 2011).

A produção de oxigênio singleto leva à formação de gradientes através das membranas celulares e mitocondrial. Estes gradientes alteram a permeabilidade das membranas para diferentes íons e a permeabilidade da membrana mitocondrial, o que leva a alterações metabólicas na célula. Estas, a nível celular, promovem o desenvolvimento dos processos para o tratamento

de doenças, tanto de tecidos moles quanto de tecidos duros (CALIN, COMAN, 2011).

A quantidade de luz usada na PDT é consideravelmente menor em relação àquela utilizada nos lasers cirúrgicos, indicando que os tecidos não sofrem aquecimento local, conseqüentemente as proteínas não sofrem indução de estresse pelo calor (NORTH, BANKS, 2009).

A dose de luz, também conhecida como fluência ou densidade de energia, é expressa em Joules por centímetro quadrado ( $J/cm^2$ ). A densidade de potência refere-se à taxa de entrega de fótons, e é expressa em watts por centímetro quadrado ( $W/cm^2$ ). Ela é limitada pela potência máxima de saída da fonte de luz e depende da área de superfície a ser tratada. A potência necessária na PDT é calculada multiplicando-se a área da superfície a ser tratada pelo poder da densidade. Fixando-se a potência e a dose de energia, o tempo de tratamento torna-se prolongado, quando se aumenta a área de tratamento. O tempo de tratamento é calculado a partir da fórmula:  $J = W \div S$ , na qual “J” representa a energia em Joules; “W”, a potência em watts; e “S” o tempo em segundos. Portanto, o tempo de tratamento no segundo =  $W/cm^2 \div J/cm^2$  (WITHROW, MACEWEN'S, 2007).

Densidades de alta potência (maiores que  $125mW/cm^2$ ), pode promover o aquecimento dos tecidos, tornando-se impossível uma correta avaliação dos efeitos da PDT. Baixas densidades de energia resultam em controle local do tumor e eficiente morte tumoral, porém há a necessidade de um longo período de irradiação (WITHROW, MACEWEN'S, 2007).

A escolha do FS é que determina qual o comprimento de onda da luz será necessário para o tratamento, pois cada droga tem um determinado

comprimento de onda e pico de ativação, tipicamente dentro do espectro visível do vermelho. O comprimento de onda da luz é diretamente proporcional à penetração no tecido, sendo a luz com comprimentos de onda maiores que 630nm transmitida facilmente através dos tecidos (WITHROW, MACEWEN'S, 2007).

Os principais FS que têm sido testados são: o cloro meso-tetra-(M-hidroxifenil), a acridina, as cianinas, os derivados da porfirina (ex: Photofrin), o 5-ácido aminolevulínico (ALA), as benzofenotiazinas (ex: Azul de Toluidina e Azul de metileno - AM), os fitoterápicos (ex: Azuleno), as ftalocianinas e o triarilmetano (NORTH, BANKS, 2009; CALIN, COMAN, 2011; SELLERA *et al.*, 2014). O grande número de fotossensibilizantes sob consideração é uma indicação de que o FS ideal ainda não foi identificado (WITHROW, MACEWEN'S, 2007).

Destaca-se aqui o azul de metileno (AM), um produto químico heterocíclico aromático utilizado para a coloração de várias estruturas e em numerosos métodos de tratamento nos mais diferentes campos, tais como biologia, química e medicina. À temperatura ambiente, ele aparece como um pó sólido, inodoro, verde escuro que se transforma em uma solução azul quando dissolvido em água. A forma hidratada apresenta três moléculas de água para uma molécula de AM. Sua denominação internacional (DCI) é Cloreto de Metiltionina. Quando utilizado por via endovenosa, tem por característica tingir vasos sanguíneos arteriais e capilares (KLEPSYTE, SAMALAVICIUS, 2012). Ele é um corante FS que apresenta características favoráveis para o uso na PDT, por possuir absorbância máxima a um comprimento de onda de 660nm (KIKUCHI *et al.*, 2015), ser capaz de gerar

altas concentrações de oxigênio singleto, induzir a formação de radicais livres que levam a danos nas biomoléculas das células, além de ser um produto de baixo custo, de fácil aplicação, e que não apresenta efeitos tóxicos ou deletérios detectáveis clinicamente (ISRAEL *et al.*, 2014).

Quando comparado a outros corantes, o AM tem se destacado por apresentar menos reações alérgicas ou anafiláticas e não apresentar interferência com a oximetria de pulso (SHIRAH *et al.*, 2011), podendo ser utilizado de maneira isolada ou combinada (RAMAMURTHY *et al.*, 2014).

Israel *et al.* (2014) afirmaram que o composto fotossensível se acumula preferencialmente em células de rápida multiplicação. Deste modo, suas principais indicações clínicas na Medicina Veterinária são a sua utilização para o efetivo tratamento de Carcinoma de Células Escamosas (CCE), Carcinomas de Células Transicionais, Neoplasias Intranasais (WITHROW, MACEWEN'S, 2007) e Sarcomas de tecidos moles (ISRAEL *et al.*; 2014), além de tratar infecções bacterianas e fúngicas (SENA, 2013). Alguns autores destacam sua utilização no tratamento de ferimentos cutâneos contaminados (SAMPAIO, LOPES, 2016). É sabido que o AM apresenta respostas favoráveis contra o crescimento antimicrobiano em células ósseas, tanto de osso compacto quanto em osso esponjoso (ROSA *et al.*, 2015a).

Muitos resultados *in vitro* e *in vivo* demonstram os efeitos benéficos da utilização da PDT, porém ainda há uma variabilidade nos resultados desta técnica na prática clínica. No entanto, a maioria das avaliações concluem que a inclusão desta terapia como um tratamento não cirúrgico parece ser clinicamente útil (KIKUCHI *et al.*, 2015).

Um estudo *in vitro*, utilizando-se da PDT com AM e laser de 660nm em biofilmes de *Staphylococcus aureus* experimentalmente induzidos em osso bovino, demonstrou que aqueles grupos tratados com PDT, foram mais eficazes em reduzir o número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC), com diferença significativa, quando comparado ao grupo controle e ao grupo laser; sendo esta resposta maior para um intervalo de tempo de irradiação maior. Além disso, naquele grupo em que fora utilizado o FS isoladamente para controlar a infecção não se obteve sucesso em reduzir o número UFC quando comparado ao grupo controle e ao grupo laser (ROSA *et al.*, 2015b).

Inúmeros patógenos (bactérias, fungos e vírus) revelaram-se susceptíveis *in vitro*, o que torna a sua aplicação *in vivo* uma opção terapêutica a ser explorada (SELLERA *et al.*, 2014).

Em sua revisão de literatura a respeito do uso da PDT no tratamento não cirúrgico da periodontite, Kikuchi *et al.* (2015) observaram que o uso do AM como FS, mostrou-se capaz de eliminar culturas bacterianas de *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

Baseados em pesquisas anteriores, as quais dizem que a PDT é efetiva contra células procariotas e eucariotas, Peli *et al.* (2011) realizaram um experimento utilizando formas amastigota de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (causadora da leishmaniose cutânea) para induzir lesões ulcerativas na pata de hamsters. Os autores utilizaram diferentes soluções de AM para tratar as lesões. Eles observaram que as lesões do grupo controle (não tratado pela PDT) apresentaram aumento contínuo, demonstrando que o AM utilizado de maneira isolada, não foi capaz de prevenir o desenvolvimento

de lesões. Por outro lado, ao final do tratamento (12 semanas), 40% e 50% das lesões nos animais dos grupos A e B, respectivamente, foram completamente curadas. Isto demonstra os efeitos benéficos da PDT.

Sperandio (2009) em seu estudo experimental, utilizou-se de um punch de 6mm para induzir feridas cutâneas únicas no dorso de 100 ratas Wistar. Após o procedimento, os animais foram divididos em 4 grupos: sem tratamento (controle); aqueles tratados com apenas AM; aqueles tratados com LLLT; e aqueles tratados com AM associado ao laser (PDT). Como resultado, os autores encontraram diferença na reparação das feridas entre os grupos laser e PDT, sendo que no primeiro a resolução da ferida foi mais acelerada.

Sena (2013) utilizou a PDT para tratar, experimentalmente, candidíase em camundongos Balb/C. Após indução da infecção com *Candida albicans*, através da inoculação do fungo na vagina das fêmeas, a pesquisadora aguardou 5 dias e submeteu os animais à aplicação tópica vaginal de AM e irradiação com laser de 660nm. Após este experimento, a autora concluiu que o AM e o laser, quando utilizados isoladamente, não apresentaram efeito antifúngico; o AM não apresentou efeito anti-inflamatório; houve efeito fungicida do AM e do laser, associados (PDT), principalmente quando utilizados 48 horas após o término do tratamento.

Após induzir lesões orais no intuito de provocar periodontite em ratos Wistar, Almeida *et al.* (2008) dividiram os animais em quatro grupos: aqueles sem nenhum tratamento; aqueles tratados com solução de AM; os tratados com laserterapia; e os tratados por PDT. Estatisticamente, os autores concluíram que ao sétimo dia, os animais tratados pela PDT apresentaram menor perda óssea quando comparados aos demais grupos; e que, no décimo

quinto dia, os grupos tratados com AM apresentaram menor perda óssea em relação aos demais grupos.

Utilizando-se do AM com o intuito de inibir a formação de fibrose peridural, comum após laminectomias lombares, Farrokhi *et al.* (2011), realizaram laminectomia (L5-L6) experimental em ratos *Sprague-Dawley* e concluíram que a aplicação do AM no local da intervenção cirúrgica, em doses baixas do corante (0,5% e 1%), foram capazes de prevenir a complicação relatada.

Sampaio e Lopes (2016) recomendam o uso da PDT para animais idosos, imunodeprimidos e portadores de problemas renais ou hepáticos. Citam ainda que esta técnica pode ser utilizada repetidas vezes sem dano contralateral, por não causar resistência microbiana.

A utilização da PDT no tratamento de feridas tem se mostrado muito promissora. Feridas tratadas exclusivamente com PDT apresentaram cicatrização mais rápida, quando comparadas ao tratamento usual (SELLERA, *et al.*, 2014). No que diz respeito à aceleração na reparação tecidual, Sampaio e Lopes (2016) relataram o uso da laserterapia associada à PDT em uma cadela sem raça definida, de 10 anos de idade, portadora de ferida contaminada extensa, na região do flanco direito. Os autores afirmaram que não fora administrada nenhuma medicação oral, sistêmica ou tópica durante o tratamento. Ao final de 44 dias, os autores observaram o completo fechamento da ferida. Desta maneira, eles concluíram que a PDT foi eficaz, acelerando o processo de cicatrização da ferida. Além disso, diminuiu o prurido regional, dor e inflamação local.

Sellera *et al.* (2014) admitiram que possa haver um efeito sinérgico entre os efeitos da luz e o FS, além do efeito antimicrobiano determinado pela PDT, principalmente por diminuir a carga microbiana.

De acordo com Sampaio e Lopes (2016), o intervalo de tempo de 5 minutos entre a aplicação do FS e o início da irradiação, foi o suficiente para a concentração do corante AM atingir seu máximo no tecido lesado, e acelerar o tempo de cicatrização de ferida extensa.

Pacheco e Silvia e Gonçalves (2007) relataram o uso eficaz da PDT no tratamento de infecção recidivante dos sacos para-anais em um cão poodle de 7 anos de idade. Para isso, apenas duas sessões com intervalos de 48 horas foram suficientes para resolução do quadro.

Com reconhecido uso na terapia antimicrobiana (SENA, 2013; ROSA *et al.*, 2015) e de algumas neoplasias (WITHROW, MACEWEN'S, 2007; NORTH, BANKS, 2009), de certa forma, há uma tendência da utilização da PDT em processos inflamatórios e na cicatrização de tecidos moles (SPERANDIO, 2009; SAMPAIO, LOPES, 2016; ROSA *et al.*, 2017) e, mais recentemente, na investigação de sua utilização no controle de perda óssea e na regulação do metabolismo ósseo (THEODORO *et al.*, 2017), demonstrando que há necessidade de continuidade na investigação desta terapia no processo de consolidação óssea.

### **3 HIPÓTESE**

A associação entre laserterapia de baixa intensidade e a terapia fotodinâmica favorece a cicatrização óssea em defeitos ósseos induzidos experimentalmente no fêmur de ratos *Wistar*.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Geral

- Verificar os efeitos da associação da terapia fotodinâmica com azul de metileno a 0,01% e laserterapia de baixa intensidade no processo de consolidação de defeitos ósseos experimentais em fêmur de ratos *Wistar*.

### 4.2 Específicos

- Comparar, radiograficamente, a área de consolidação de defeitos ósseos entre as amostras do experimento;
- Analisar, histopatologicamente, os efeitos da aplicação do azul de metileno, isolado e associado à laserterapia de baixa intensidade, na área de consolidação dos defeitos ósseos.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Aspectos éticos

O presente estudo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF sob o número de protocolo 09/2015 (ANEXO A) e foi executado conforme os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) vinculado ao Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI).

### 5.2 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar (Rattus norvegicus)* (N = 16), machos, com 90 dias de vida e peso entre 250 e 300g. Os mesmos foram obtidos e alojados no Biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Instituição cadastrada no CONCEA. O biotério é provido de iluminação mista – luz natural e lâmpadas fluorescentes – sendo as últimas controladas automaticamente para acenderem às 6 horas e apagarem às 18 horas. Os animais foram mantidos em estantes climatizadas, em gaiolas individuais, providas de camas de maravalha selecionada, mamadeira para água e cocho para ração do tipo peletizada. Os animais foram alimentados com ração e água *ad libitum*.

### 5.3 Delineamento experimental

Em um total de 16 animais utilizados no experimento, foram confeccionados dois defeitos ósseos no fêmur direito de cada animal, gerando um total de 32 defeitos. Todos os defeitos inferiores, de todos os animais, foram preenchidos por 10µl do corante azul de metileno. Metade dos defeitos ósseos (defeitos inferiores) foi irradiada pelo laser durante o procedimento cirúrgico, de forma a caracterizar a terapia fotodinâmica (uma única vez). As sessões de laserterapia se iniciaram 48 horas após o procedimento cirúrgico e persistiram a cada 48 horas, até o dia em que os animais foram eutanasiados. Metade dos animais foi eutanasiada aos sete dias de experimento, e a outra metade aos quatorze. As radiografias foram realizadas nos dias 0, após o procedimento cirúrgico, dias 7 e 14, antes da eutanásia dos animais. Um total de três sessões de laserterapia foram realizadas naqueles animais que foram eutanasiados no sétimo dia, e um total de seis sessões naqueles animais que foram eutanasiados no décimo quarto dia (figura 1).

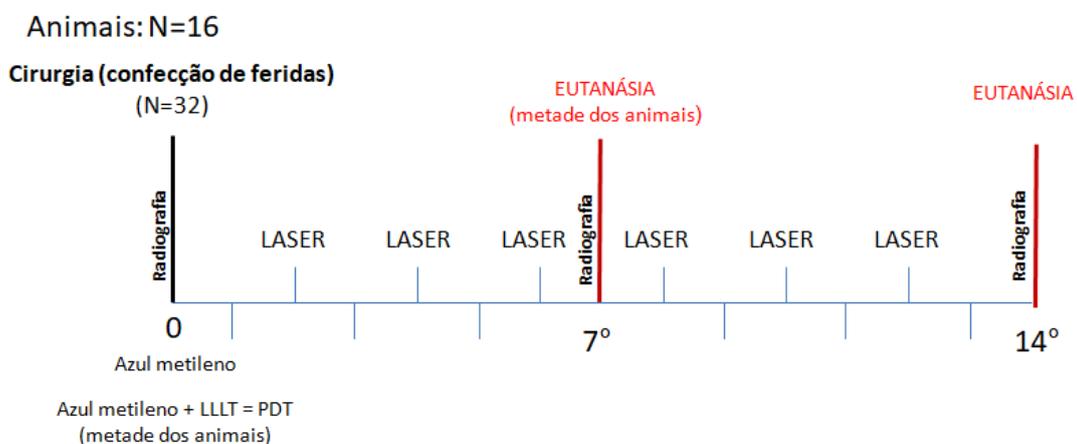


Figura 1 - Delineamento experimental.

## 5.4 Métodos

### 5.4.1 Confeção do defeito ósseo

Após pesagem, os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina 10% (100mg/kg) e cloridrato de xilazina 2% (10mg/kg) aplicados intraperitonealmente. Em seguida, os animais tiveram a perna direita tricotomizada e preparada assepticamente com álcool 70° para intervenção cirúrgica. O animal foi posicionado em decúbito lateral esquerdo, sendo a perna direita, a ser trabalhada, mantida para cima, paralela à mesa. Confirmada a ausência de reflexos interdigitais e utilizando-se uma lâmina de bisturi nº15, a pele, na face lateral do fêmur, foi incidida longitudinalmente por cerca de 1,5cm de extensão. Visualizada a fáscia lata, os músculos bíceps femoral e vasto lateral foram afastados até que a diáfise femoral pudesse ser acessada.

Neste momento um analgésico opióide, fentanil (0,03mg/kg), foi aplicado intraperitonealmente.

Após a exposição do corpo do fêmur e, auxiliado por um micromotor (Micro retífica Giramatic, 3,6V de voltagem, 1200W de potência e 10.000 RPM da Conthey Comércio e Indústria Ltda São Paulo – SP e modelo D1-13233) com uma broca odontológica de 2mm, dois defeitos ósseos circulares foram realizados, originando defeito com área total de 200.000  $\mu\text{m}^2$ .

Foram confeccionados dois defeitos cirúrgicos na face cranial do fêmur, um na porção proximal do osso (cerca de 10mm da epífise proximal) e o segundo, distalmente ao primeiro (cerca de 10mm abaixo do primeiro). Apenas uma cortical fora perfurada, de maneira que o canal medular pudesse ser

visualizado, tomando-se especial cuidado para não atingir a cortical oposta, diminuindo-se, assim, o risco de ocorrer fratura do fêmur no pós-operatório. Solução fisiológica fora utilizada no momento da confecção do defeito ósseo, no intuito de se evitar aumento da temperatura, e consequente necrose na periferia do defeito. Musculatura e tecido subcutâneo foram suturados em padrão contínuo simples com fio multifilamentar absorvível (Poliglactina 910 4-0), e a pele em padrão simples separado com fio monofilamentar não absorvível (Nylon 4-0).

As lesões e os tratamentos posteriores foram realizados pelo mesmo cirurgião de maneira a se estabelecer um padrão da técnica.

A figura 2 mostra a realização das feridas ósseas na face cranial do fêmur direito de um dos animais do experimento.

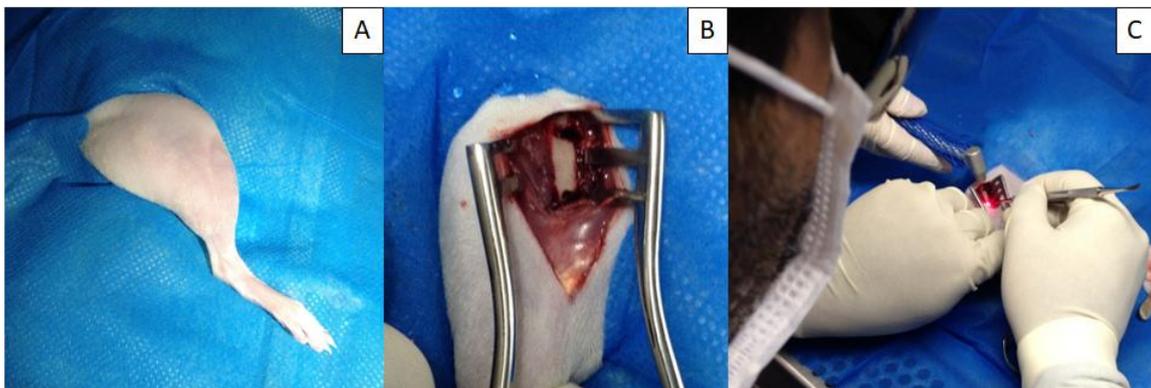


Figura 2 - Transoperatório do procedimento experimental realizado no fêmur direito de rato *Wistar*. A: Membro tricotomizado em campo operatório; B: Musculatura afastada demonstrando os defeitos ósseos confeccionados com o auxílio de uma broca odontológica de 2mm na face cranial do fêmur direito; C: Realização da Terapia Fotodinâmica no defeito ósseo distal. FONTE: Arquivo pessoal.

Após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, no mesmo biotério de origem onde foram monitorados durante o pós-operatório por uma equipe treinada, até que pudessem deambular.

Os cuidados pós-operatórios imediatos envolveram analgesia, manutenção da temperatura corporal, avaliação da frequência cardíaca e da frequência respiratória. Diariamente, foram observadas ingestão de água, ingestão de ração, vocalização, variação do peso corporal, presença ou ausência de secreção ocular (cromodacriorréia), piloereção, postura dos animais e deambulação.

Para analgesia, foi utilizado o analgésico tramadol (5mg/kg) a cada 12 horas, via subcutânea, durante quatro dias consecutivos.

A limpeza da ferida cirúrgica foi realizada diariamente com solução fisiológica.

#### **5.4.2 Grupos experimentais**

Foram confeccionados um total de 32 defeitos ósseos. Os grupos foram estabelecidos de acordo com o tratamento de cada lesão, conforme esquematizado abaixo e a figura 3.

Grupo controle (GI): não receberam tratamento e foram apenas submetidas ao contato com o aparelho de irradiação laser desligado. (n=8);

Grupo Azul de metileno (GII): lesões preenchidas com 10µl de azul de metileno 0,01% (n=8);

Grupo LLLT (GIII): lesões tratadas com laserterapia no pós-operatório (n=8);

Grupo LLLT + PDT (GIV): lesões preenchidas com 10µl de azul de metileno 0,01% e irradiadas durante o transoperatório, seguidas de tratamento com laserterapia no pós-operatório (n=8).

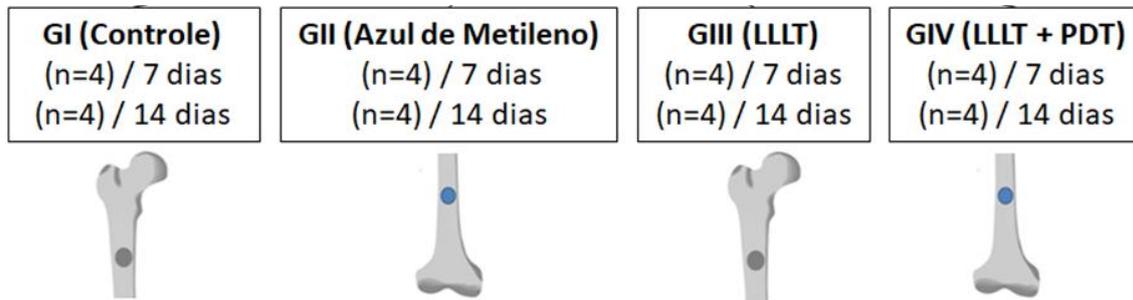


Figura 3 - Representação esquemática da divisão dos grupos experimentais.

### 5.4.3 Protocolos de tratamento

#### 5.4.3.1 Laserterapia

Para a aplicação do laser os animais foram contidos manualmente e a irradiação foi realizada por via transcutânea, puntiforme, com ponteira em ângulo de 90° em relação à superfície da pele, ao longo de cinco pontos no eixo longitudinal do fêmur (Figura 4).

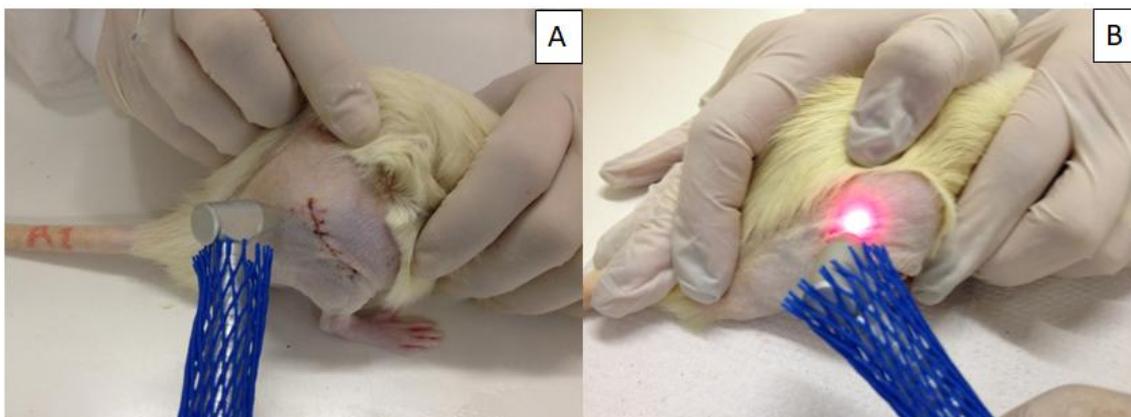


Figura 4 - Aplicação do laser, por via transcutânea, de maneira puntiforme, no fêmur direito de rato *Wistar*. A: Simulação do laser em um dos animais que não foram tratados; B: Aplicação do laser em um dos animais tratados. FONTE: Arquivo pessoal.

A laserterapia foi realizada com o aparelho de laser modelo TWIN LASER® com emissão de luz vermelha, pulsátil, com semicondutores de Arsênio e Gálio, comprimento de onda de 660nm, potência de pico de 40mW, com aplicação através de fibra óptica (MM OPTICS LTDA de São Carlos – SP). O tempo de aplicação do laser em cada ponto tratado foi de 90 segundos, totalizando uma dose de  $2,3\text{J}/\text{cm}^2$  em cada ponto irradiado, tanto no transoperatório (GIV) quanto no pós-operatório (GIII e GIV).

Os animais receberam a primeira sessão da laserterapia após 48 horas da confecção do defeito ósseo, seguindo desta maneira, até o dia anterior ao dia da eutanásia.

#### **5.4.3.2 Terapia Fotodinâmica**

Com o auxílio de uma ponteira e uma micropipeta, todos os animais receberam 10 microlitros do corante no defeito ósseo inferior. Utilizou-se para isso o CHIMIOLUX® Azul de Metileno 0,01% (DMC Importação e Exportação de Equipamentos LTDA de São Carlos – SP).

A PDT foi realizada imediatamente após a confecção do defeito e preenchimento pelo corante, uma única vez, durante o transoperatório, naqueles defeitos do GIV, não sendo mais realizada posteriormente por se tratar de lesão óssea interna.

## 5.5 Avaliação radiográfica

As tomadas radiográficas do fêmur dos animais foram realizadas no dia da confecção do defeito ósseo, em seu pós-operatório imediato, no 7° e no 14° dias de pós-cirúrgico, previamente ao momento da eutanásia. Foi utilizado o aparelho de raio-X SPECTRO 70X Eletronic Classe I – Tipo B – Comum, de operação intermitente (DABI ATLANTE Indústrias Médico Odontológicas Ltda, São Paulo, SP, Brasil). As radiografias foram obtidas por meio de película odontológica oclusal DENTUS E-Speed Intra-Oral X-Ray Film 3x4 / Size 2 / 150 x 1 (AGFA). A revelação dos filmes ocorreu de maneira manual e, para isso, foram utilizados revelador e fixador EXSIL MX (Silpachem Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda).

Uma barra de alumínio contendo 8 degraus (medindo 0,5mm de altura por 0,6mm de largura cada degrau) (Figura 5-A) (NASCIMENTO *et al.*, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2012), foi confeccionada para servir de parâmetro de graduação da radiodensidade dos defeitos ósseos nos dias 7 e 14. Para o procedimento radiográfico, a distância foco-filme foi de 40cm e a incidência do feixe de raio-x foi de 70kVp, 8mA e 1s (Figura 5-B). Foram realizados dois planos radiográficos, incidência crânio-caudal e incidência médio-lateral (Figuras 5-C e 5-D) de acordo com o preconizado pela literatura veterinária (COULSON e LEWIS, 2002; KEALY, MCALLISTER e GRAHAM, 2012), sendo realizadas por um mesmo operador que, também realizou a revelação.

Foi atribuída aos quatro primeiros degraus da barra, de modo crescente, de acordo com os níveis de radiodensidade sendo, para isso, considerada a

seguinte numeração: 1 - ausente; 2 - leve/discreta; 3 - moderada e; 4 - avançada.

Para a análise estatística da radiodensidade dos defeitos ósseos, foram considerados como radiopaco os valores que apresentaram alguma radiodensidade (2, 3 e 4), enquanto que aquele que não apresentou nenhuma radiodensidade (1) foi considerado como radioluscente (Figura 5-E). A partir da frequência de distribuição das amostras, utilizou-se o Teste do Chi-quadrado, com um intervalo de confiança de 95%.

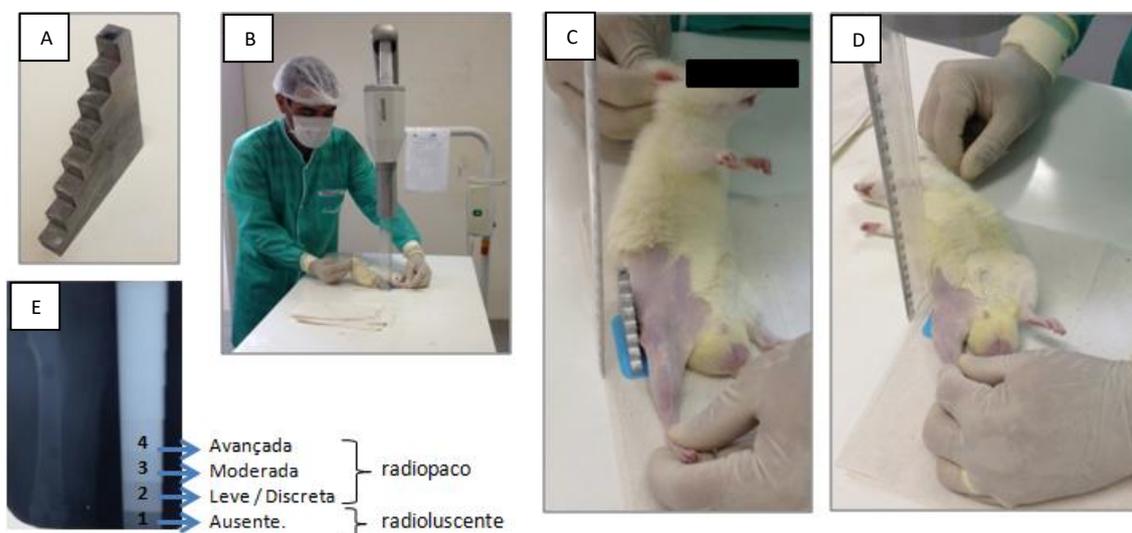


Figura 5 – Avaliação radiográfica realizada durante o experimento. A: Barra metálica utilizada como parâmetro de radiopacidade dos defeitos; B: Procedimento radiográfico com distanciamento padrão; C: Posicionamento do animal para a realização da incidência crânio-caudal; D: Posicionamento do animal para a realização da incidência médio-lateral; Avaliação radiográfica dos defeitos ósseos com graduação da radiopacidade (1- ausente; 2- leve/discreta; 3- moderada e 4- avançada) da barra de alumínio. FONTE: Arquivo pessoal.

## 5.6 Eutanásia

A eutanásia ocorreu em dois tempos, correspondentes aos dias 7 e 14 do experimento. Metade dos animais (n=4) de cada grupo foram eutanasiados no 7º dia do procedimento cirúrgico, e a outra metade (n=4) no 14º dia de tratamento, através de sobredose anestésica com cloridrato de ketamina 10%

(200mg/kg) e cloridrato de xilazina 2% (20mg/kg), associada à exsanguinação e ruptura do diafragma - Todos os procedimentos estão de acordo com as Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA - Em seguida, o fêmur direito de cada animal, foi coletado, por dissecação e fixado para processamento histológico.

### **5.7 Processamento e avaliação histológica**

Após a eutanásia, realizou-se a obtenção da peça cirúrgica (fêmur direito de cada animal), que foi fixada em formol de cálcio a 10% por no mínimo 24 horas. Após fixação, os mesmos foram submetidos ao processamento histológico iniciado pela descalcificação em solução de ácido nítrico a 5% durante 72 horas. Seguido este período, pode-se realizar a clivagem da amostra, através do descarte das epífises ósseas (Figura 6-A), além de um corte longitudinal que dividiu ambos os defeitos ao meio (Figura 6-B) para que pudessem ser posicionados e incluídos em resina plástica (Figura 6-C). Tomando-se o devido cuidado com o posicionamento das amostras de acordo com a confecção das perfurações proximal e distal, os blocos foram cortados em micrótomo a 5µm. Após o processamento histológico de rotina (ANEXO B), as lâminas foram confeccionadas para realização de coloração por Hematoxilina e Eosina (H&E) (ANEXO C).



Figura 6 - Processamento histológico de uma das amostras (fêmur direito de rato *Wistar*) do experimento. A: Clivagem transversal das epífises; B: Clivagem longitudinal passando no centro de ambos os defeitos ósseos; C: Amostras incluídas em resina plástica (bloco). FONTE: Arquivo pessoal.

Para análise microscópica dos cortes foi utilizada uma câmera (AxioCam Vision) acoplada ao microscópio AxioStar Zeiss AxioCam CHF5 (Hallbergmoos, Alemanha), localizado no laboratório de Imunopatologia e Patologia Clínica Experimental do CBR da UFJF. Os cortes histológicos foram digitalizados em toda sua extensão em aumento de 100x para histomorfometria semiautomática (seleção manual com determinação de valores por análise computadorizada) das áreas de neoformação óssea através de um programa específico (Software Zen 2.3 Blue Edition, Zeiss, Alemanha, 2012) (Figura 7). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{m}^2$  (média/grupo).

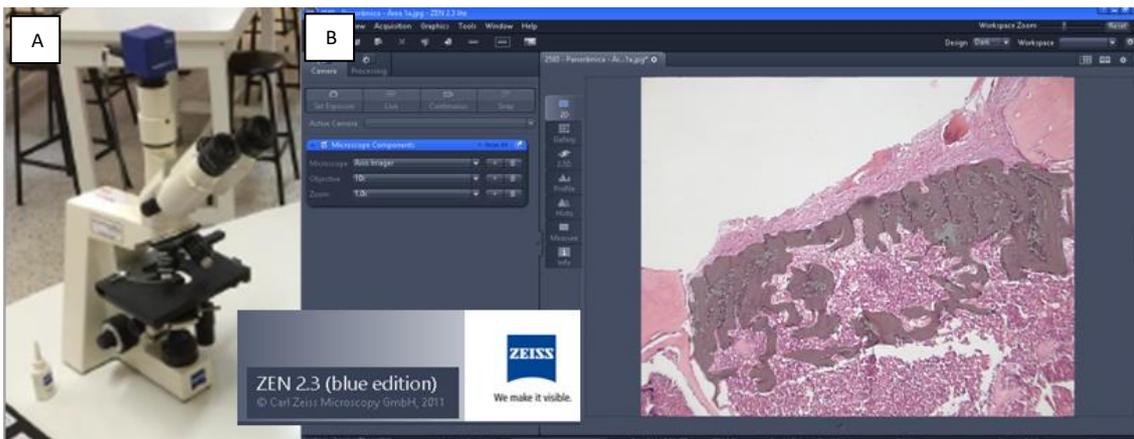


Figura 7 – Análise microscópica dos defeitos ósseos. A: Câmera (AxioCam Vision) acoplada ao microscópio AxioStar Zeiss AxioCam CHF5 B: Histomorfometria semi-automática da área de neoformação óssea. Imagem capturada do Software Zen 2.3 Blue Edition, Zeiss, Alemanha, 2012.

Para análise histológica descritiva foram observados: presença de inflamação; presença, amadurecimento e organização do tecido de granulação; presença, amadurecimento e celularidade de membrana osteogênica; atividade de deposição de osteóide; presença de osso trabecular; presença de osso com início de formação lamelar e presença de osso maduro com sistemas haversianos.

## 5.8 Análise estatística

Para cada área de neoformação óssea os valores das médias com seus respectivos desvios padrão foram calculados. A comparação entre as médias foi realizada pelo Teste de Mann Whitney, através do programa GraphPad Prism Versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego). O nível de significância foi fixado em 5% ( $p < 0,05$ ).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Análise Radiográfica

A análise descritiva das radiografias foi realizada, independentemente por dois avaliadores, e revelou que em nenhum dos defeitos ósseos, dos diferentes grupos, houve completa consolidação óssea nos períodos avaliados. Porém, durante a análise radiográfica realizada ao negatoscópio e, utilizando-se de uma lupa, foi possível observar variações na densidade e radiopacidade dos defeitos ósseos dos diferentes grupos (Figura 8).

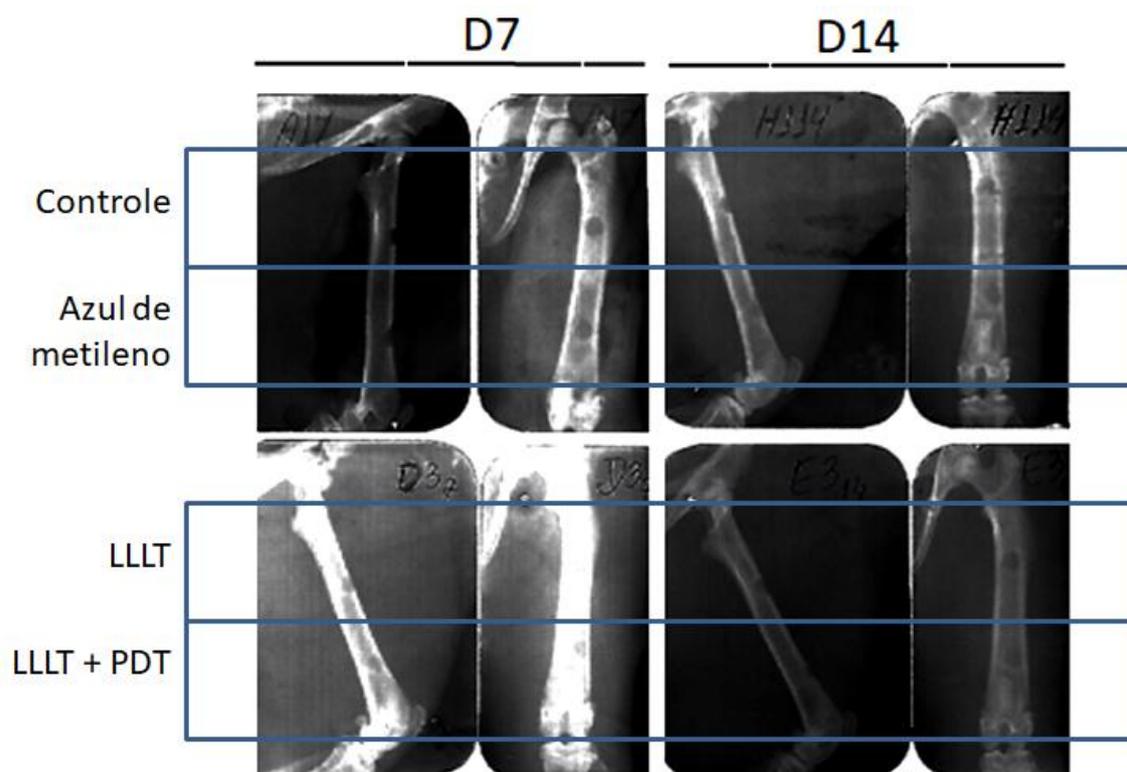


Figura 8 - Imagens radiográficas (projeções médio-lateral e crânio-caudal) do fêmur de ratos *Wistar* utilizados no experimento, com seus respectivos defeitos ósseos. D7: sétimo dia de pós-operatório; D14: décimo quarto dia de pós operatório. FONTE: Arquivo pessoal.

O grau de radiopacidade dos defeitos ósseos entre aqueles que foram tratados pela LLLT e aqueles que foram submetidos à PDT no intervalo de tempo de sete dias, não demonstraram alterações. Entretanto, ao analisarmos a mesma característica no intervalo de tempo de 14 dias, encontramos diferença significativa entre os grupos GI e o GII ( $p=0,0467$ ), GI e o GIII ( $p=0,0285$ ) e GI e GIV ( $p=0,0285$ ), como pode ser visto nas tabelas 1, 2 e 3.

**Tabela 1.** Frequência de distribuição do número de amostras (defeito ósseo) do grupo azul de metileno que apresentaram diferença de radiopacidade em relação ao grupo controle

	Radioluscente	Radiopaco	
GI	4	0	4
GII	0	4	4
	4	4	8

	Radioluscente	Radiopaco
GI	2	2
GII	2	2

Qui( $\chi^2$ )	p=0,00467773
-----------------	--------------

**Nota:** GI - grupo controle; GII - grupo azul de metileno. Para análise estatística foi utilizado o Teste do Chi-Quadrado ( $\chi^2$ ); Intervalo de confiança igual a 95%.

**Tabela 2.** Frequência de distribuição do número de amostras (defeito ósseo) do grupo LLLT que apresentaram diferença de radiopacidade em relação ao grupo controle

	Radioluscente	Radiopaco	
GI	4	0	4
GIII	1	3	4
	5	3	8
	Radioluscente	Radiopaco	
GI	2,5	1,5	
GIII	2,5	1,5	
	Qui( $\chi^2$ )	p=0,0285	

**Nota:** GI - grupo controle; GIII - grupo LLLT. Para análise estatística foi utilizado o Teste do Chi-Quadrado ( $\chi^2$ ); Intervalo de confiança igual a 95%.

**Tabela 3.** Frequência de distribuição do número de amostras (defeito ósseo) do grupo LLLT + PDT que apresentaram diferença de radiopacidade em relação ao grupo controle

	Radioluscente	Radiopaco	
GI	4	0	4
GIV	1	3	4
	5	3	8
-----			
	Radioluscente	Radiopaco	
GI	2,5	1,5	
GIV	2,5	1,5	
Qui( $\chi^2$ )		p=0,0285	

**Nota:** GI - grupo controle; GII - grupo LLLT + PDT. Para análise estatística foi utilizado o Teste do Chi-Quadrado ( $\chi^2$ ); Intervalo de confiança igual a 95%.

## 6.2 Análise Histopatológica

A avaliação histopatológica foi realizada por 3 patologistas. A análise das amostras ósseas coradas por H&E, de todos os grupos, revelou a presença de neoformação óssea com grau variado de amadurecimento e qualidade.

As amostras provenientes do grupo controle, que não receberam tratamento, exibiram área da lesão ainda inflamada aos 7 dias após a cirurgia, com exsudato inflamatório misto; 25% das amostras (n=1) exibiu discreta área de membrana osteogênica em apenas uma das bordas com início de formação de centros de ossificação (figura 9-A). No dia 14 foi observado ainda a presença de infiltrado inflamatório, entremeado à tecido de granulação (figura 9-B).

Nos cortes provenientes dos defeitos que receberam preenchimento por azul de metileno 0,01% logo após a confecção da ferida, em ambos os períodos avaliados foi observada formação de osso entre as bordas da lesão. Porém, aos sete dias de avaliação, observou-se, ainda, a presença infiltrado inflamatório e tecido de granulação (figura 9-C) em proporções diferentes àquelas observadas ao 14 dias do grupo controle; já aos 14 dias, o osso apresentou-se organizado em lamelas e observou-se uma reorganização da medula óssea subjacente à perfuração (figura 9-D).

As lesões tratadas com laserterapia, no dia 7 se encontravam preenchidas por tecido ósseo imaturo em profundidade, mantendo a superfície externa recoberta por periósteo maduro (figura 9-E); no dia 14, houve completo fechamento do defeito por osso lamelar (figura 9-F).

As amostras dos defeitos do grupo LLLT + PDT exibiram, no dia 7, membrana osteogênica de intensa celularidade com áreas já maduras de osso trabecular especialmente nas bordas laterais da lesão (figura 9-G); no dia 14 a ferida estava fechada com união completa das bordas, porém ainda com osso imaturo, trabecular, diferentemente daqueles defeitos do grupo LLLT aos 14 dias (figura 9-H).

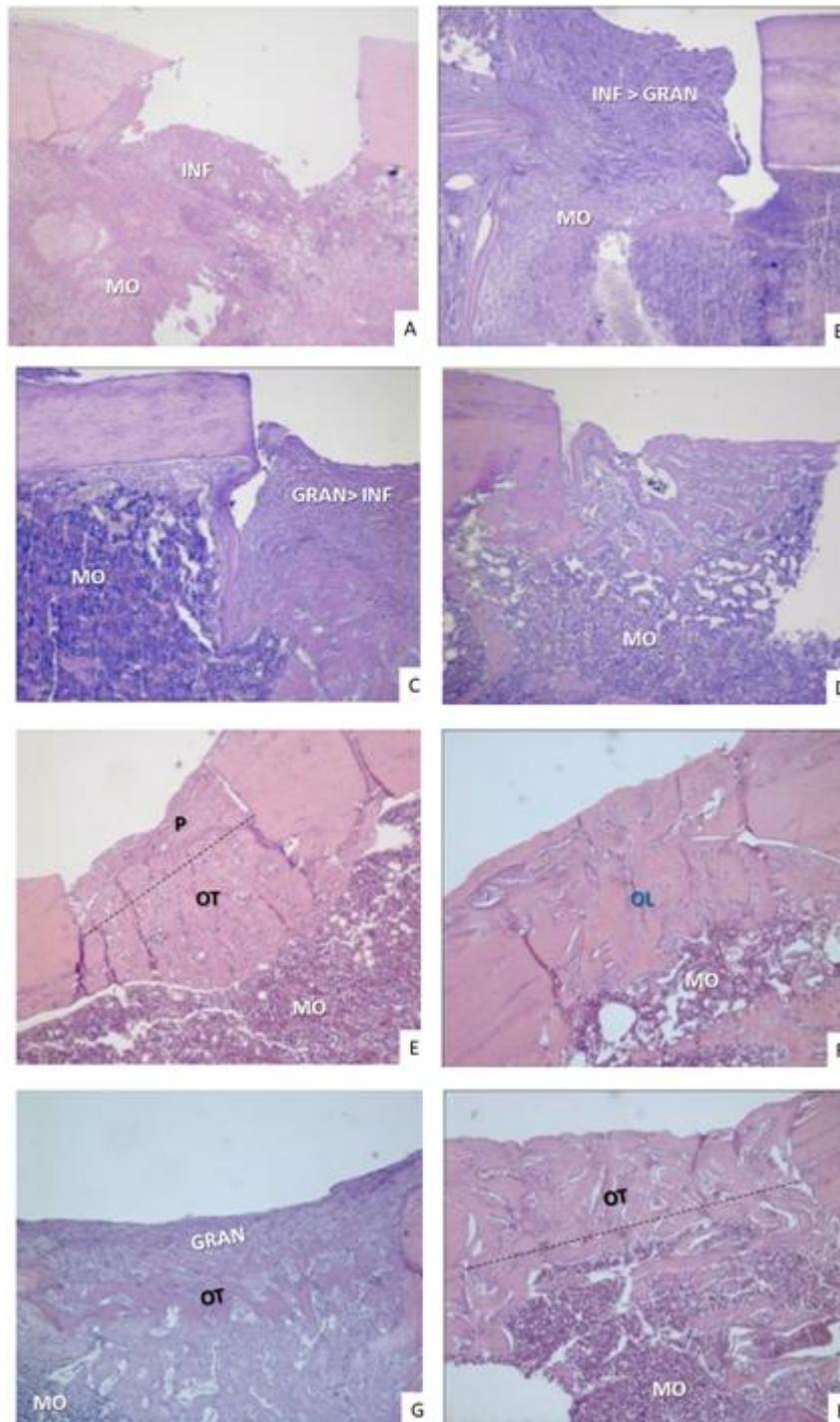


Figura 9 - Análise histopatológica (H&E) de defeitos ósseos experimentais realizados no fêmur direito de ratos *Wistar* dos diferentes grupos experimentais. A: defeitos ósseos do grupo controle aos sete dias; B: defeitos ósseos do grupo controle aos quatorze dias; C: defeitos ósseos do grupo azul de metileno aos sete dias; D: defeitos ósseos do grupo azul de metileno aos quatorze dias; E: defeitos ósseos do grupo LLLT aos sete dias; F: defeitos ósseos do grupo LLLT aos quatorze dias; G: defeitos ósseos do grupo LLLT + PDT aos sete dias; H: defeitos ósseos do grupo LLLT + PDT aos quatorze dias. (5 $\mu$ m de espessura). INF – infiltrado inflamatório; MO – medula óssea; GRAN – tecido de granulação; P – perióstio; OT – osso trabecular; OL – osso lamelar. (FONTE: Arquivo pessoal).

Os resultados da morfometria das áreas de osteogênese demonstraram que, apesar da neoformação óssea ter aumentado em todos os grupos do experimento entre o sétimo (GI:  $4,192\pm 4,366$ ; GII:  $8,024\pm 9,580$ ; GIII:  $1,74\pm 4,088$ ; GIV:  $20,30\pm 6,574$ ) e o décimo quarto dia (GI:  $15,74\pm 7,782$ ; GII:  $18,93\pm 10,51$ ; GIII:  $37,83\pm 9,448$ ; GIV:  $33,71\pm 5,695$ ), apenas o grupo que recebeu as terapias combinadas apresentou diferença estatística significativa ( $p=0,0286$ ).

As figuras 10 e 11 representam os resultados das análises histomorfométricas realizadas em cada grupo ao longo dos dois períodos avaliados, assim como entre os grupos, respectivamente.

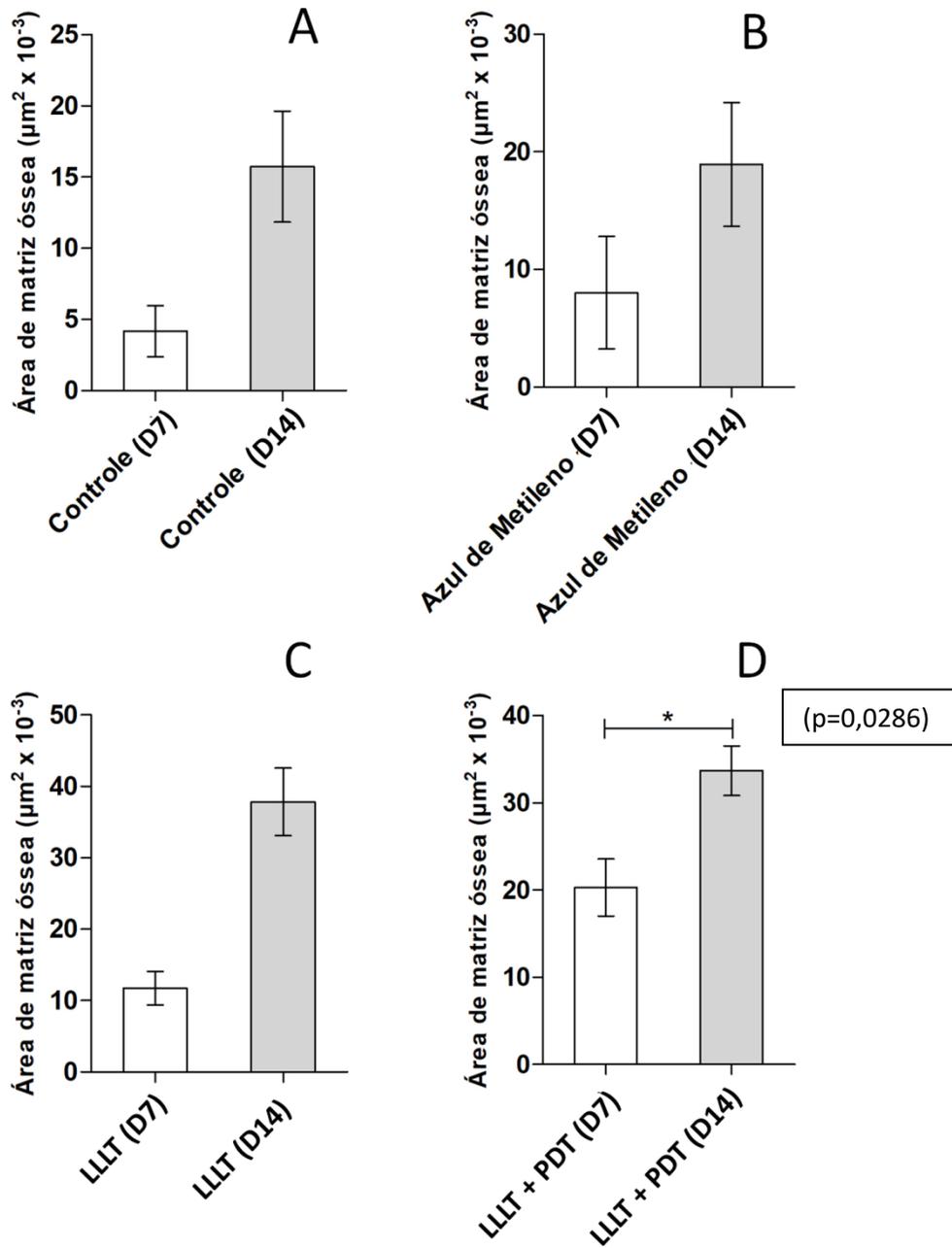


Figura 10 - Análise histomorfométrica da área de neoformação óssea em defeitos ósseos em fêmur de ratos *Wistar*. Comparação entre as amostras de mesmo grupo nos intervalos propostos. Resultados expressos em média  $\pm$  SD; nível de significância foi de 5% (\* $p < 0,05$ ).

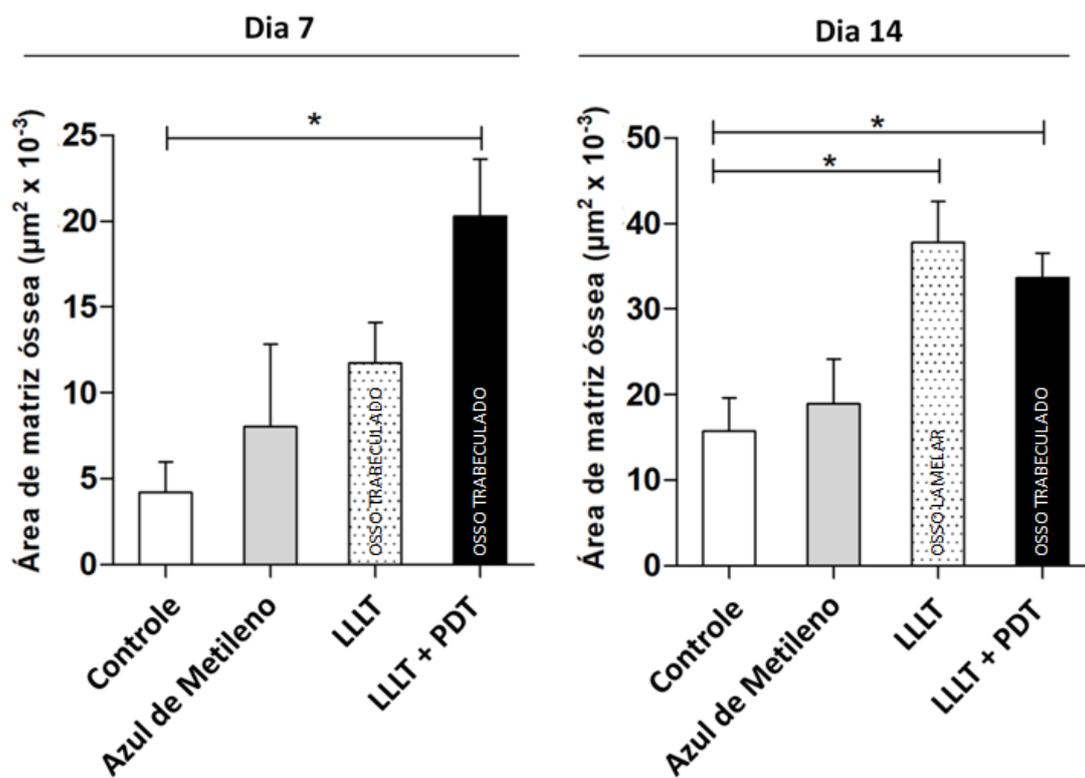


Figura 11 – Análise histomorfométrica da área de neoformação óssea em defeitos em fêmur de ratos *Wistar*. Comparação entre os grupos nos intervalos propostos. Resultados expressos em média  $\pm$  SD; nível de significância foi de 5% (\* $p < 0,05$ ).

## 7 DISCUSSÃO

Nossos resultados revelam que houve diferença significativa quanto a área de neoformação óssea, aos sete dias de tratamento, entre o grupo controle GI e o grupo LLLT + PDT (GIV) ( $p = 0,0247$ ), assim como, aos 14 dias, entre o grupo controle GI e os grupos LLLT (GIII) ( $p=0,0286$ ) e LLLT + PDT (GIV) ( $p=0,0286$ ). Logo se pode dizer que a terapia combinada mostrou-se eficaz quando utilizada em ambos os períodos avaliados. Porém, é possível observar que entre os grupos que apresentaram maior área de neoformação óssea (G III e G IV), não houve diferença significativa.

Para avaliar a atividade terapêutica da LLLT tanto na fase aguda quanto na fase crônica do reparo ósseo, Mota *et al.* (2013) utilizaram de ratos *Wistar* e realizaram defeitos ósseos de 2mm na tíbia dos animais. Para o tratamento, foi utilizado o laser 670nm por 4min e 33s, iniciado após 24 horas (agudo) e 5 dias (crônico), sendo realizado a cada 48 horas. Após realizarem a eutanásia dos animais no 9° e 17° dias, os autores concluíram que a terapia favoreceu ao processo de consolidação óssea daqueles animais que iniciaram o tratamento na fase aguda, propondo que o laser estimula a proliferação e diferenciação das células mesenquimais osteoprogenitoras ainda imaturas. Diferentemente, aos 7 dias de avaliação, o grupo irradiado com laser isoladamente (GIII) não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle (GI) no que diz respeito à área de neoformação óssea; porém, aos 14 dias, o GIII demonstrou maior área de neoformação óssea em relação ao GI. O fato de se ter antecipado o período da análise histológica em dois dias de avaliação pode justificar a diferença encontrada entre os trabalhos.

Com o objetivo de investigar o efeito histológico da LLLT no reparo ósseo e com o intuito de promover uma recuperação no pós-operatório com mais conforto, além de acelerar o processo de cicatrização, Adel *et al.* (2011) realizaram defeitos ósseos no fêmur de ratos *Wistar*, e os trataram com laser GaAs 904nm. Este foi aplicado de maneira transcutânea em quatro pontos ao redor da fratura, durante 5 minutos cada sessão, a cada 48 horas, totalizando 6 sessões. Como resultado, os autores encontraram diferença significativa entre os grupos tratados e não tratados aos 15 dias de avaliação ( $p < 0,007$ ), no que diz respeito à área de neoformação óssea; baseados na hipótese de que a LLLT aplicada uma única vez, pode favorecer o reparo ósseo, Pretel *et al.* (2007) propuseram um estudo em mandíbulas de ratos *Holtzman*, realizando defeitos ósseos retangulares e tratando-os com laser GaAlAs de 830nm, durante 40 segundos. Após 15 dias, parte dos animais do grupo controle e do grupo tratado foram eutanasiados e foram observados presença de tecido conectivo desorganizado com presença de tecido necrótico e células degenerativas no grupo controle; enquanto que no grupo tratado, houve preenchimento do defeito ósseo com tecido conectivo denso e grande número de fibroblastos. Além disso os autores encontraram diferença significativa entre os grupos no que diz respeito à diminuição da inflamação no grupo irradiado ( $p < 0,0109$ ); aumento da área de formação óssea ( $p < 0,0143$ ); e maior organização da matriz óssea ( $p < 0,0027$ ). Ambos os trabalhos comprovam que, assim como o laser vermelho utilizado no presente trabalho, o laser infravermelho também apresenta resultados positivos no processo de reparo ósseo.

A utilização do laser aos sete dias de tratamento apresentou-se equivalente à área de neoformação óssea do grupo controle aos 14 dias de tratamento. No que diz respeito à antecipação e equivalência de períodos diferentes, resultados encontrados por Pretel *et al.* (2007) e Adel *et al.* (2011), sugerem que o uso da LLLT aos 15 dias de tratamento foi equivalente à formação de matriz óssea aos 45 dias e 30 dias do grupo controle, respectivamente.

O uso do azul de metileno 0,01% utilizado de maneira isolada (GII) sugere induzir a um aumento da osteogênese quando comparado ao grupo controle (GI) para ambos os períodos analisados. O uso do corante no grupo LLLT + PDT (GIV) pode ter influenciado também o aumento da neoformação óssea tanto aos sete como aos 14 dias de avaliação. Análise mais específica quanto ao mecanismo de ação do fotossensibilizador no metabolismo ósseo deve ser avaliada com a realização de estudos mais aprofundados.

Resultados importantes do uso da LLLT no processo de consolidação óssea já foram comprovados anteriormente ao se utilizar tanto o laser vermelho (visível) quanto o infravermelho (não visível) (POPPI *et al.*, 2011; BOSSINI *et al.*, 2012; BARBOSA *et al.*, 2014; BRITENÑO-VAZQUEZ *et al.*, 2015). No entanto, para a realização da PDT, apenas o comprimento de onda visível é utilizado (PRATES *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2006; SENA, 2013; KIKUCHI *et al.*, 2015; MIRANDA, 2015). No presente trabalho foi possível conseguir resultados significativos da PDT no processo de consolidação óssea, tanto de maneira precoce, quanto tardia.

Temos como um dos principais resultados do nosso trabalho, a modulação precoce do processo de consolidação óssea. Aquelas amostras do

grupo tratado com as terapias combinadas exibiu precocemente, no dia sete, osso trabeculado unindo as bordas da ferida cirúrgica e organização medular e periosteal, porém, o osso não sofreu remodelamento lamelar na semana consecutiva. Já naquele grupo com defeitos ósseos tratados apenas pela laserterapia, aos sete dias, apesar de não ter havido diferença estatística significativa, houve o preenchimento do defeito ósseo por osso do tipo trabecular e, aos 14 dias, um desenvolvimento deste para osso do tipo lamelar. Os presentes resultados demonstram avaliações histológicas qualitativa, porém não revelam o que estes resultados representam quando estes são levados de maneira clínica, deixando inconclusivo qual representa a melhor opção, ou seja, o surgimento e a formação precoce de um osso do tipo trabecular (quando induzido pelas terapias combinadas) ou de um osso do tipo lamelar de maneira tardia (quando induzido somente pela LLLT). Desta forma, análises complementares (como por exemplo análises físicas de testes de carga) são necessárias para complementar esta informações.

Dentre os grupos que foram irradiados com LLLT no pós-operatório (GIII, GIV), apenas o grupo que recebeu as terapias combinadas foi irradiado durante o procedimento cirúrgico. Todos foram submetidos à laserterapia após 48 horas da confecção do defeito ósseo, totalizando três sessões de laser para aqueles animais eutanasiados ao sétimo dia e seis sessões para aqueles eutanasiados aos décimo quarto dia. De forma semelhante, no experimento realizado por Barbosa *et al.* (2013), a LLLT foi aplicada imediatamente após a osteotomia e repetida a cada 48 horas durante três semanas, sendo que aqueles animais eutanasiados no sétimo dia do experimento receberam três

sessões de laser, aqueles eutanasiados no 14°, seis sessões, e os que foram eutanasiados no 21°, nove sessões.

O uso da LLLT em células osteoblásticas já apresenta uso conhecido (ATES, CAN, GÜLSOY, 2017). Quanto à PDT, estudos relacionados à parte óssea estão voltados indiretamente a análises do periodonto (ALMEIDA *et al.*, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2008), para infecções ósseas, como nas osteomielites (BISLAND *et al.*, 2005), e para células de origem neoplásicas, como aquelas presentes nos osteossarcomas (MATSUBARA *et al.*, 2008; GUAN *et al.*, 2014). O presente estudo não partiu de análises anteriores *in vitro*, mas sim *in vivo*, de avaliações terapêuticas clínicas favoráveis à cicatrização de tecidos moles e ferimentos cutâneos (SELLERA *et al.*, 2014)

O exame radiográfico digital é uma importante ferramenta de análise clínica para tecidos mineralizados, e alguns estudos indicam que esta técnica pode oferecer quantificação e variações locais de imagens no reparo ósseo. A técnica de densidade óptica é capaz de mensurar o *status* de mineralização óssea do fêmur de ratos *Wistar* (BARBOSA *et al.*, 2013). A avaliação radiográfica dos defeitos ósseos não demonstrou características de radiopacidade óssea semelhante àquela do osso íntegro, ou seja, não houve completa consolidação óssea em nenhuma das lesões confeccionadas. Logo, os defeitos apresentaram níveis de radiopacidade distintos e que foram comparados com níveis de graduação de uma barra de metal semelhante àqueles realizados por Nascimento *et al.* (2010) e Ribeiro *et al.* (2012), assim também como através de uma escala de graduação (Escala de Montoya), semelhante àquela realizada por Briteño-Vázquez *et al.* (2015). A principal diferença do presente estudo para os anteriores, é que neste, a análise ocorreu

diretamente ao negatoscópio enquanto que nos demais, os autores a realizaram através de programas de softwares.

Ainda, para todos os grupos analisados, a radiografia foi utilizada como método de avaliação da densidade óssea, através de tomadas radiográficas após o procedimento cirúrgico (dia 0), aos sete e quatorze dias. Tais radiografias foram realizadas com as amostras ósseas ainda em posição anatômica, o que se assemelha àquela realizada na rotina clínica, na qual há sobreposição de tecidos moles. Briteño-Vázquez *et al.* (2015), realizaram esta análise de maneira semelhante, porém a realizaram apenas uma única vez após 10 dias do procedimento cirúrgico.

Barbosa *et al.* (2013) avaliaram, por meio da radiografia, a densidade óssea do fêmur de ratos *Wistar* como amostra isolada, após retirada do corpo do animal. Para isso, os autores realizaram tratamento com LLLT com aparelhos de diferentes comprimentos de onda (660nm – vermelho; 830nm - infravermelho). Como resultados, os autores afirmaram terem encontrado, aos sete dias de tratamento, um aumento na densidade de 3,4% e 5,8%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle; aos 14 dias, apenas o grupo tratado com laser infravermelho apresentou diferença estatística (3%). Diferentemente, os resultados encontrados no presente trabalho, demonstraram que, aos sete dias de tratamento com laser no espectro vermelho, não houve diferença significativa com o grupo controle; porém, aos 14 dias houve maior média na área de neoformação óssea ( $p=0,0286$ ) naqueles defeitos pertencentes ao GIII. Podem ser questionados como variações e diferenças nos resultados encontrados em ambos os trabalhos, o número de amostras, o fato das amostras não estarem sobrepostas por tecido

mole, assim como a análise radiográfica realizada através de um programa de computador, naquele trabalho.

Por outro lado, Briteño-Vázquez *et al.* (2015) obtiveram excelente resposta no defeito ósseo que realizaram na crista da tíbia de ratos *Wistar*, padronizando o tratamento diário com laser 850nm. Como resultado, eles observaram a formação de consolidação do defeito ósseo realizado, tanto radiograficamente como histologicamente, porém neste experimento os autores realizaram um defeito ósseo de 0,062mm de diâmetro, confeccionado com auxílio de um pino de Kirschner.

Para a avaliação radiográfica, tanto o aparelho como as medidas padrões foram semelhantes àquelas utilizadas por Barbosa *et al.* (2013). A única diferença é que os autores utilizaram de imagens radiográficas digitalizadas com captura das imagens através de sensor digital no momento do procedimento radiográfico. Como resultado, eles puderam realizar a avaliação radiográfica através de um software de computador que pode avaliar a densidade óptica no local do defeito ósseo através das diferentes escalas de cinza geradas por um histograma. Diferentemente, Patrocínio-Silva *et al.* (2014) realizaram análises do fêmur de ratos *Wistar*, utilizando um densitômetro com um software específico para pequenos animais, para mensurar o conteúdo mineral ósseo, bem como a densidade mineral óssea.

A literatura cita, em diversos trabalhos, a complementação de estudos de consolidação óssea através de outros tipos de análises histológicas que não apenas a hematoxilina e eosina, mas também através do uso do Tricrômio de Mallory (MOTA *et al.*, 2013) ou Pricosirius (BOSSINI *et al.*, 2012). Cita ainda, análises bioquímicas, através da avaliação da Fosfatase Alcalina (MOTA *et al.*,

2013); ensaios biomecânicos, através do teste de carga (BOSSINI *et al.*, 2012; SON *et al.*, 2012; MOTA *et al.*, 2013; PATROCÍNIO-SILVA *et al.*, 2014; TIM *et al.*, 2014); e análises imuno-histoquímicas, com o intuito de se avaliar o mecanismo de ação da LLLT (BOSSINI *et al.*, 2012; PATROCÍNIO-SILVA *et al.*, 2014) ou a imunexpressão de fatores osteogênicos (TIM *et al.*, 2014; MARQUES *et al.*, 2015; SELLA *et al.*, 2015). Há ainda, quem utilize da imunofluorescência e caracterização dos glicosaminoglicanos (MERLI *et al.*, 2012). Desta forma, a ausência destas análises no presente trabalho podem ser complementadas através do estímulo de estudos futuros que complementem as informações e resultados aqui expostos.

Apesar de a literatura demonstrar os efeitos benéficos da LLLT no processo de consolidação óssea, seja através de análises radiográficas (SON *et al.*, 2012; BARBOSA *et al.*, 2013) ou histológicas (TIM *et al.*, 2014; MARQUES *et al.*, 2015), justificamos o uso apenas destas duas análises, pois não se conhecem estes tipos de avaliações para o uso isolado do AM, da fototerapia dinâmica ou da associação de ambas as terapias no processo de consolidação óssea. Estudos voltados para análises destes são encontrados de maneira indireta, quando Farrokhi *et al.* (2011) avaliaram o uso do AM no processo de formação de fibrose após laminectomia; ou quando a PDT foi avaliada no processo de perda óssea na doença periodontal experimentalmente induzida (ALMEIDA *et al.*, 2008).

Os efeitos positivos da LLLT na estimulação do tecido ósseo ainda não se encontram totalmente esclarecidos. É sabido que o laser infravermelho apresenta melhor capacidade de penetração no tecido, atingindo o tecido ósseo de maneira mais eficiente que o laser vermelho, produzindo melhores

resultados (POPPI *et al.*, 2011). Barbosa *et al.* (2013) afirmam que o efeito positivo do LLLT no reparo ósseo é dependente do tempo e comprimento de onda.

Com o objetivo de avaliar o efeito da LLLT na formação de tecido ósseo, Tim *et al.* (2014) realizaram análises histológicas, imuno-histoquímicas e biomecânicas de defeitos ósseos de 3mm de diâmetro realizados na tíbia de ratos *Wistar*. Para o tratamento, foi utilizado o laser 830nm, durante 34s, totalizando um carga energética de 120 J/cm<sup>2</sup>. As análises histopatológicas demonstraram que, aos 15 dias após o tratamento realizado, não foi encontrado infiltrado inflamatório, mas sim melhor organização tecidual. Logo, os autores sugerem que a LLLT aumentou o processo de cicatrização óssea por acelerar o desenvolvimento de neoformação óssea. Para avaliar o processo de reparo ósseo em ratos submetidos à LLLT, tanto de comprimento de onda vermelho (660nm) quanto infravermelho (830nm), Barbosa *et al.* (2013) utilizaram a densitometria ótica e encontraram aumento significativo no grau de mineralização em ambos os grupos tratados com laser aos 7 dias de avaliação; aos 14 dias, apenas o laser infravermelho mostrou maior densidade óssea. Para isso os autores padronizaram o tamanho do defeito ósseo em 2.8mm, no fêmur direito, por um período de 40s, a cada 48 horas. Tim *et al.* (2015) resolveram avaliar as mudanças morfológicas produzidas por esta terapia nos estágios iniciais da cicatrização óssea, assim como estudar as vias que estimulam a expressão dos genes relacionados à proliferação e diferenciação das células ósseas. Para isso os autores realizaram um defeito ósseo de 3mm de diâmetro na tíbia de ratos *Wistar*, com irradiações em um único ponto, utilizando para isso do laser de 830nm durante 94 segundos,

variando o número de sessões em 1, 2, 3, 5 e 7 vezes. Como resultado histopatológico da área de neoformação óssea, os autores encontraram diferença estatística significativa ( $p < 0,001$ ) a partir do terceiro dia de tratamento, e concluíram que a LLLT aumenta a cicatrização óssea por produzir aumento significativo na expressão dos genes osteogênicos. No intuito de investigar o efeito da LLLT (808nm) na cicatrização de fraturas de tíbia realizadas em ratos *Sprague-Dawley*, Son *et al.* (2012) realizaram análises histopatológicas e radiológicas, e encontraram maior desenvolvimento de formação óssea no grupo LLLT, sugerindo que o efeito do laser acelera o processo de cicatrização óssea, principalmente no estágio inicial, equivalente a 7 dias de avaliação. Estudo recente buscou propor e comparar um novo tipo de protocolo para a prática da LLLT na consolidação óssea. De acordo com a forma tradicional que a literatura apresenta, a aplicação do laser ocorre por via transcutânea a cada 48 horas. Em sua proposta de tratamento, Marques *et al.* (2015) realizaram defeitos ósseos de 8mm na calvária de ratos *Wistar*. A aplicação do laser foi realizada apenas em três dias não consecutivos: durante o transoperatório, após 48 horas e após 120 horas. Ambos os tratamentos foram realizados com laser de 830nm. Após 15 dias, os autores concluíram, através da análise histológica, que o protocolo proposto promoveu maior neoformação de tecido ósseo que o grupo controle, porém não houve diferença significativa em relação ao protocolo tradicional. Como resultado os autores concluíram que é possível reduzir o número de sessões, o que, trazendo para a área clínica, reduz o número de visitas clínicas e os custos do tratamento. Nossos resultados foram de que a LLLT utilizada de maneira isolada (GIII) apresentou efeitos significativos apenas aos 14 dias de tratamento, enquanto

que o uso das terapias combinadas (GIV) foi eficaz tanto aos sete quanto aos 14 dias. Os resultados devem levar em consideração que o tipo de laser utilizado no presente trabalho foi o vermelho.

O protocolo de indução de defeitos ósseos em modelos animais já é conhecido na literatura, sendo diversos os modelos para avaliação da consolidação óssea de maneira experimental. Há variações no diâmetro do defeito, no osso escolhido, no formato e no número de defeitos realizados no osso. Ainda há variações em relação à espécie animal, assim como no número de membros submetidos ao procedimento cirúrgico. Todas estas variações irão depender das análises a serem realizadas. Logo, podem ser citados defeitos com diâmetro de 0,062mm, 2mm, 2,8mm, 3mm e 8mm (BRITENO-VÁZQUEZ *et al.*, 2015; MOTA *et al.*, 2013; BARBOSA *et al.*, 2013; TIM *et al.*, 2015; MARQUES *et al.*, 2015); retangulares, esféricos ou sem contatos diretos, caracterizando falhas ósseas (PRETEL *et al.* 2007; MOTA *et al.*, 2013; SELLA *et al.*, 2015). Defeitos realizados na tíbia, no fêmur, na mandíbula ou calota craniana (PRETEL *et al.* 2007; ADEL, *et al.*, 2011; BOSSINI *et al.*, 2012; MARQUES *et al.*, 2015) de ratos (*Wistar*, *Holtzman* e *Sprague-Dawley*) (PRETEL *et al.* 2007; SON *et al.* 2012; BARBOSA *et al.*, 2013) ou coelhos (BURGUER *et al.*, 2013). Os ratos *Wistar* machos com cerca de 8 a 12 semanas, pesando entre 250 e 350 gramas são os modelos animais mais encontrados na literatura. O número de defeitos ósseos nos diferentes ossos longos deve ser avaliado de forma crítica. Há relatos de até 3 defeitos ósseos no fêmur de ratos para avaliações do processo de consolidação óssea (FILHO, *et al.*, 2011). Para o desenvolvimento de análises biomecânicas, geralmente ambos os membros do modelo animal são submetidos à procedimentos

cirúrgicos e tratados, sendo que, após a eutanásia, um deles é submetido à avaliações histológicas e o outro à análises mecânica (MOTA *et al.*, 2013; TIM *et al.*, 2014). Porém, há quem utilize um dos membros do próprio animal para servir de controle (MERLI *et al.*, 2012).

Sella *et al.* (2015) realizaram a confecção de um defeito ósseo diferentemente daqueles normalmente gerados como estudo da cicatrização óssea experimental. A intenção dos autores era elaborar um defeito para analisar o processo de não-união óssea. Para isso eles fixaram uma mini placa ao longo da diáfise femoral e posteriormente realizaram uma ostectomia completa de 2mm no terço médio do osso. Utilizaram tanto análises histológicas como análises imuno-histoquímicas. Diminuição do infiltrado inflamatório, aumento na formação periosteal, formação de intensa matriz óssea trabecular e aumento na expressão de proteínas da matriz óssea, ao oitavo dia de avaliação, foram seus principais resultados. Logo, os autores concluíram que a LLLT (808nm) pode ser indicada como terapia adjunta na prática clínica para o tratamento e reparação de não uniões. Nós padronizamos o diâmetro do nosso defeito ósseo em 2mm para que pudesse ser avaliado ao microscópio, com o auxílio da objetiva de 10, todo o campo do defeito ósseo de maneira panorâmica, assim como para que fosse possível realizar dois defeitos em um mesmo fêmur e não correr o risco de fratura do osso no período pós-operatório. Além disso o defeito foi realizado apenas em uma única cortical óssea, também com o intuito de evitar quebra do osso. Puricelli *et al.* (2010), Filho *et al.* (2011) e Burguer *et al.* (2013) realizaram um número maior de defeitos ósseos no fêmur dos animais utilizados em seus experimentos e não relataram qualquer complicação quanto à fratura no pós-operatório.

Quanto aos pontos de irradiação, não há um senso comum. De acordo com a literatura consultada, há quem os faça em apenas um único ponto (BARBOSA *et al.*, 2013; BATISTA *et al.*, 2015; TIM *et al.*, 2015) em dois pontos (SELLA *et al.*, 2015), em três pontos (MERLI *et al.*, 2012), ou quatro pontos (PATROCÍNIO-SILVA *et al.*, 2014; MARQUES *et al.*, 2015), independentemente do diâmetro confeccionado. No presente trabalho, os animais que não foram irradiados, foram submetidos ao mesmo estresse da manipulação que aqueles animais que foram irradiados, porém com o aparelho desligado. Independentemente do grupo, a irradiação, ou a simulação, ocorreu em cinco pontos distintos ao longo do eixo longitudinal do fêmur, com o intuito, principalmente, de abranger a área composta pelos dois defeitos realizados.

Diversos trabalhos realizaram as análises de maneira variada quanto ao tempo de tratamento, sacrifício dos animais e análises das amostras, variando este período de 7 até 56 dias de acompanhamento. (SON *et al.*, 2012; MARQUES *et al.*, 2015; TIM *et al.*, 2015).

Nós realizamos a análise morfométrica através da contagem de 14 campos consecutivos, em duas camadas, realizados na borda inferior (porção medular) do defeito ósseo confeccionado. Nesta avaliação realizamos a marcação da área neoformada e a soma foi expressa em micrômetros quadrados. Posteriormente, realizamos a média dos grupos para que pudessem ser comparadas estatisticamente. De maneira similar, Tim *et al.* (2015) determinaram cinco regiões de interesse de imagens digitalizadas dos defeitos ósseos realizados na tíbia de ratos *Wistar*, para realizar a análise morfométrica da quantidade de osso neoformado após a utilização da LLLT. Dentro destas regiões, foram analisadas áreas da borda superior, da borda

direita, da borda esquerda, região inferior e região central. A área de neoformação óssea também foi determinada em micrômetros quadrados após a soma das áreas anteriormente citadas. Para realizar as análises histológicas em seu experimento, Sella *et al.* (2015) realizaram a avaliação de cinco quadrantes de cada amostra (quatro quadrante periféricos e um central). Além disso, eles realizaram uma escala de 0 a 4 para avaliarem a presença de infiltrado inflamatório, a formação de matriz óssea trabecular e a neoformação óssea.

Marques *et al.* (2015) citaram o preenchimento dos defeitos ósseos por coágulos sanguíneo e tecido de granulação como sendo o primeiro evento de cicatrização óssea encontrado aos 7 dias do seu experimento, em todos os três grupos avaliados. Os autores citaram, ainda, que no mesmo período avaliado, não observaram necrose tecidual ou qualquer outro efeito indesejável em nenhum dos grupos experimentais. Com exceção do grupo controle que não apresentou nenhum desenvolvimento ósseo no mesmo período avaliado, os demais grupos (GII, GIII e GIV), diferentemente daqueles autores, apresentaram desenvolvimento de tecido ósseo aos 7 dias de avaliação. A presença do azul de metileno, utilizado diretamente nos defeitos ósseos, tratados ou não pela LLLT (grupos GII e GIV, respectivamente) não foi prejudicial ao tecido e não promoveu qualquer tipo de alteração indesejável no processo de consolidação óssea. Ao contrário disso, podemos dizer que o único grupo que apresentou diferença estatística significativa quanto à formação de tecido ósseo, aos 7 dias iniciais de avaliação, foi aquele que sofreu ação das terapias combinadas. À avaliação do grupo tratado pelo LLLT, aos sete dias, foi observado a presença de tecido de granulação com variações

de membrana osteogênica intensamente celular, além de partes preenchidas por tecido ósseo imaturo em profundidade. Isto corrobora os achados de Tim *et al.* (2015) que, ao sétimo dia de avaliação de defeitos ósseos realizados na tíbia de ratos *Wistar*, e tratados com LLLT 830nm durante 94 segundos, observaram ausência de células inflamatórias e preenchimento de tecido ósseo neoformado, porém, ainda, com a presença de tecido de granulação. Não foram observadas a presença de necrose ou qualquer outro tipo de dano na periferia dos defeitos realizados que pudessem prejudicar a análise histopatológica, tanto macro quanto microscopicamente. O uso de irrigação copiosa, com solução salina estéril durante o procedimento cirúrgico, para confecção dos defeitos é uma das formas utilizadas para se evitar prejuízo às amostras experimentais (PRETEL *et al.*, 2007; MARQUES *et al.*, 2015; SELLA *et al.*, 2015).

De acordo com a literatura, dentre as principais características histopatológicas analisadas no tecido ósseo estão: presença de coágulo sanguíneo, infiltrado inflamatório, formação de tecido de granulação, organização tecidual óssea, crescimento periosteal, formação de matriz óssea trabecular, neoformação óssea (SELLA *et al.*, 2015; TIM *et al.*, 2015)

Diversos são os parâmetros a serem analisados e utilizados nos experimentos que se utilizam da LLLT no processo de consolidação óssea, sejam eles de maneira experimental ou de maneira clínica (PETER, JENKINS, JAMES, 2011). Na maioria dos trabalhos, estes dados são realizados com base em trabalhos realizados anteriormente e que apresentaram efeitos favoráveis ou positivos. Nós escolhemos o intervalo de tempo de 90 segundos baseado na média de intervalo de tempo máxima encontrada em trabalhos

experimentais realizados anteriormente, independentemente de resultados positivos ou não. Além disso, no intuito de dar prosseguimento à trabalhos anteriores realizados pelo nosso núcleo de pesquisa, utilizamos o mesmo aparelho já disponível em nosso laboratório.

Os defeitos ósseos do grupo LLLT + PDT receberam uma irradiação a mais em relação ao outro grupo que recebeu a LLLT (GIII), durante o transoperatório, necessariamente para caracterizar PDT. Tal grupo apresentou efeitos positivos tanto no primeiro quanto no segundo dia de análise. Porém, nós não acreditamos que uma única aplicação a mais foi suficientemente responsável pelo destaque morfométrico que este grupo apresentou. Além disso, acreditamos que o uso do corante foi suficientemente responsável por esta ação, pois, mesmo não apresentando diferenças significativas tanto aos sete quanto aos 14 dias, os defeitos que foram preenchidos pelo corante, mas que não foram irradiados (GII) apresentaram características distintas daquelas do grupo controle. Como são escassos os trabalhos relacionados ao uso da PDT no reparo ósseo, sugerimos novas investigações, com um número de sessões equiparadas.

Diversos são os estudos que demonstraram os efeitos benéficos da LLLT no reparo ósseo, seja ela na banda de 660nm (vermelho) quanto na banda de 830 (infravermelho), quando aplicados de maneira local. Sabendo-se disso, Batista *et al.* (2015) procuraram avaliar o efeito da LLLT no reparo ósseo fora do local irradiado; ou seja, os autores buscaram avaliar se há efeito sistêmico da LLLT no reparo ósseo. Para isso os autores realizaram defeito ósseo de 2.3mm no fêmur esquerdo de ratos *Wistar* e trataram os animais com laser infravermelho (830nm) tanto no local do defeito, quanto no membro

contralateral, que não foram submetidos à cirurgia, ambos de maneira puntiforme, transcutânea, durante 2 minutos. O número de sessões variou (4, 8 e 11) de acordo com a avaliação a ser realizada (animais eutanasiados aos 7, 15 e 21 dias, respectivamente). Ao final do experimento, os autores concluíram que há efeito local positivo do laser no estágio inicial do processo de cicatrização óssea, porém o efeito não foi observado quando aplicado de maneira distante.

Durante o processo de reparo ósseo das amostras analisadas, neoformação óssea foi observada se estendendo através do canal medular até a cortical oposta no grupo LLLT + PDT, semelhante àquilo encontrado por Batista *et al.* (2015) que as observaram em todos os grupos de seu experimento e, além disso, encontraram tecido ósseo do tipo primário com arranjo trabecular, preenchido por células, vasos sanguíneos e fibras colágenas.

Diversas são as análises da LLLT na cicatrização óssea, seja de maneira isolada ou associada a outras terapias (FEITOSA, TOMA, RENNÓ, 2007; NASCIMENTO *et al.*, 2010; PURICELLI *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2012; FRANCO, *et al.*, 2013). O fato de associar o AM está relacionado à características e princípios básicos da PDT (CALIN, COMAN, 2011; SELLERA *et al.*, 2014). Quando utilizado em ferimentos externos de pele, o AM pode ser utilizado diariamente ou com intervalo de 48 horas (BATISTA *et al.*, 2015), porém para lesões ósseas internas, até o presente momento, o seu uso pode ser apenas no momento do transoperatório. A resposta das terapias, isoladas ou combinadas, no processo de cicatrização de feridas cutâneas, naturalmente são diferentes das respostas no tecido ósseo por estes tecidos apresentarem

características distintas. Porém, no tecido mole, especificamente na pele, diferentes são as respostas encontradas. Com a proposta de avaliar a reparação tecidual em feridas cirúrgicas após terem sido irradiadas com LLLT ou PDT utilizando do AM 0,01%, Sperandio (2009) utilizou ratas *Wistar* em seu experimento. O autor, assim como na atual pesquisa, dividiu os grupos em grupos controle, corante, LLLT e PDT, e realizou apenas uma única irradiação. Para a aplicação do laser no grupo PDT, foi aguardado um intervalo de 5 minutos. Os resultados encontrados pelo autor foram que o grupo que recebeu apenas a LLLT mostrou processo de cicatrização mais acelerado, enquanto que o grupo que recebeu a PDT não apresentou aceleração da reparação tecidual. Diferentemente, Sampaio e Lopes (2016) e Rosa *et al.* (2017) realizaram estudos clínicos com a fototerapia dinâmica e obtiveram bons resultados quanto à cicatrização de feridas cutâneas.

Briteño-Vázquez *et al.* (2015) após o procedimento cirúrgico realizado, administraram antibióticos e anti-inflamatórios nos animais durante o período de 5 dias. Diferentemente, o presente trabalho não utilizou destas drogas, partindo do princípio de que a laserterapia de baixa potência apresenta efeitos anti-inflamatórios (KNEEBONE, 2006; ROCHA, *et al.*, 2012) e a terapia fotodinâmica apresenta efeitos antimicrobianos (SELLERA, *et al.*, 2014; ROSA *et al.*, 2015). Não foi observado qualquer tipo de processo inflamatório ou infeccioso, macro e microscopicamente, em nenhum dos animais utilizados no presente estudo.

## **8 CONCLUSÃO**

A associação da terapia laser de baixa intensidade e da terapia fotodinâmica com azul de metileno a 0,01% favoreceu a osteogênese em ambos os intervalos avaliados, sendo que no sétimo dia os efeitos das técnicas combinadas sugerem indução precoce de neoformação óssea quando comparada a laserterapia isolada e aos controles.

## 9 REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, B.J. **Histologia Essencial**. 1ªed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 2012. 457p.
- ADEL, S.M.; AYAD, K.E.; SHAHEEN, A.A. Effect of level laser therapy on bone histomorphometry in rats. **Life Science Journal**. v.08, n.02, p.372-378. 2011.
- ALMEIDA, J.M.; THEODORO, L.H.; BOSCO, A.F.; NAGATA, M.J.H.; OSHIWA, M.; GARCIA, V.G. Influence or Photodynamic Therapy on the Development of Ligature-Induced Periodontitis in Rats. **Journal of Periodontology** v.78, n.03, p.566-575. 2007.
- ALMEIDA, J.M.; THEODORO, L.H.; BOSCO, A.F.; NAGATA, M.J.H.; OSHIWA, M.; GARCIA, V.G. *In vivo* effect of photodynamic therapy on periodontal bone loss in dental furcation. **Journal of Periodontology**. v.79, n.6. 2008.
- ANDIA, D.C.; CERRI, P.S.; SPOLIDORIO, L.C. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. **Revista de Odontologia da UNESP**. v.35, n.2, p.191-198. 2006.
- ANDRADE, A.D.; MARINHO, C.F.; BARCELOS, M.; ZORZAL, M.B.; CONZ, M.B.; VIDIGAL JR, G.M. Biologia óssea: uma revisão da literatura. **Revista Implantnews**. v.4, n.6, p.659-662. 2007.
- AURÉGAN, J.C.; COYLE, R.M.; DANOFF, J.R.; BURKY, R.E.; AKELINA, Y.; ROSENWASSER, M.P. The rat model of femur fracture for bone and mineral research. **Bone Joint Research**. v.02, p.149-154. 2013.
- ATES, G.B.; CAN, A.A.; GÜLSOY, M. Investigation of photobiomodulation potentiality by 635 and 809nm lasers on human osteoblasts. **Laser in Medical Science**. v.32, n.591-599. 2017.
- BARBOSA, D.; SOUZA, R.A.; XAVIER, M.; SILVA, F.F.; ARISAWA, E.A.L.; VILLAVERDE, A.G.J.B. Effects of low-level laser therapy (LLLT) on bone repair in rats: optical densitometry analysis. **Laser in Medicine Science**. v.28, p.651-656. 2013.
- BARBOSA, D.; VILLAVERDE, A.G.J.B.; L. ARISAWA, E.A.; SOUZA, R.A. Laser Therapy in Bone Repair in Rats: Analysis of Bone Optical Density. **Acta Ortopédica Brasileira**. v.22, n.02, p.71-74. 2014.
- BATISTA, J.D.; NETO, S.S.; DECHICHI, P.; ROCHA, F.S.; PAGNONCELLI, R.M. Low-level laser therapy on bone repair: is there any effect outside the irradiated field? **Laser in Medicine Science**. v.30, p.1569-1574. 2015

BISLAND, S.K.; CHIEN, C.; WILSON, C.B.; BURCH, S. Pre-clinical *in vitro* and *in vivo* studies to examine the potential use of photodynamic therapy in the treatment of osteomyelitis. **Photochemical and Photobiological Science**. v.05, p.31-38. 2006.

BOSSINI, P.S.; RENNÓ, A.C.M.; RIBEIRO, D.A.; FANGGEL, R.; RIBEIRO, A.C.; LAHOZ, M.A.; PARIZOTTO, N.A. Low level laser therapy (830nm) improves bone repair in osteoporotic rats: similar outcomes at two dosages. **Experimental Gerontology**. v.47, p.136-142. 2012.

BRITEÑO-VÁZQUEZ, M.; SANTILLÁN-DIAZ, G.; GONZÁLEZ-PEREZ, M.; GALLEGU-IZQUIERDO, T.; PECOS-MARTIN, D.; PLAZA-MANZANO, G.; ROMERO-FRANCO, N. Low Power laser stimulation of the bone consolidation in tibial fractures of rats: a radiologic and histopathological analysis. **Laser in Medical Science**. v.30, p.333-338. 2015.

BURGER, C.P.; MORAIES, P.C.; MANISCALCO, C.L.; BORGES, P.A.; BATISTA, P.A.C.S.; CANOLA, J.C.; MEIRELLES, A.E.W.B.; SABINO, M.G.; ROSSETTO, H. Cimento de aluminato de cálcio: uso em defeitos ósseos induzidos em fêmur de coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.65, n.3, p.757-762. 2013.

BUZA, J.A.; EINHORN, T. Bone healing in 2016. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism 2016**. v.13, n.02, p.101-105. 2016.

CALIN, M.A.; COMAN, T. The laser in veterinary medicine. **Turkey Journal Veterinary Animal Science**. v.35, n.5, p.351-357. 2011.

CHANG, W.D.; WU, J.H.; WANG, H.J.; JIANG, J.A. Therapeutic Outcomes of Low-Level Laser Therapy for Closed Bone Fracture in the Human Wrist and Hand. **Photomedicine and Laser Surgery**. v.32, n.04, p.212-218. 2014.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CONCEA. **Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA**. Brasília. 2013. 54 p.

COULSON, A.; LEWIS, N. **An Atlas of Interpretative Radiographic Anatomy of the Dog & Cat**. Blackwell Science Ltd. 2002. 586p.

DASH, S.K., PANIGRAHI, R., PALO, N. PRIYADARSHI, A. BISWAL, M. Fragility hip fractures in elderly patients in Bhubaneswar, India (2012-2014): a prospective multicenter study of 1031 elderly patients. **Geriatric Orthopaedic Surgery e Rehabilitation**. v.6, n.1, p.11-15. 2014.

DUARTE, T.S.; BORGES, A.P.B.; LAVOR, M.S.L.; FILGUEIRAS, R.; TSIOMIS, A.C.; FÓFANO, G.; ODENTHAL, M.E.; PONTES, K.C.S. Osteointegração da hidroxiapatita sintética no processo alveolar da mandíbula de cães: aspectos clínicos e radiográficos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.59, n.01, p.114-118. 2007.

FARKASH, U.; BAIN, O.; GAM, A.; NYSKA, M.; SAGIV, P. Low-intensity pulsed ultrasound for treating delayed union scaphoid fractures: case series. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**. v.10, n.72, p.1-7. 2015.

FARROKHI, M.R.; VASEI, M.; FAREGHBAL, S.; FARROKHI, N. The effect of methylene blue on peridural fibrosis formation after laminectomy in rats: a experimental novel study. **The Spine Journal**. v.11, p.147-152. 2011.

FEITOSA, S.M.; TOMA, R.L.; RENNO, A.P.M. Os efeitos osteogênicos do ultrassom e do laser terapêutico de baixa intensidade no processo de consolidação de fraturas: uma revisão bibliográfica. **Fisioterapia Especialidades**. v.1, n.1, p.44-49. 2007.

FILHO, L.A.B.; PRIMO, B.T.; GASSEN, H.T.; FONTANELLA, V.R.C.; SILVA JR, A.N. Evaluation of optical density of bone defects fill with calcium phosphate cement and bioactive glass in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v.26, n.1. 2011.

FLORENCIO-SILVA, R.; SASSO, G.R.S.; SASSO-CERRI, E.; SIMÕES, M.J.; CERRI, P.S. Biology of Bone Tissue: Structure, Function and Factors That Influence Bone Cells. **Biomed Research International**. vol. 2015, Article ID 421746, 17 pages, 2015. doi:10.1155/2015/421746

FOSSUM, T.W. **Small Animal Surgery**. 4<sup>th</sup> Edition. Elsevier. 2013. 1775p.

FRANCO, G.R.; LARAIA, I.O.; MACIEL, A.A.W.; MIGUEL, N.M.; DOS SANTOS, G.R.; FABREGA-CARVALHO, C.A.; PINTO, C.A.L.; PETTIAN, M.S.; CUNHA, M.R. Effects of chronic passive smoking on the regeneration of rat femoral defects filled with hydroxyapatite and stimulated by laser therapy. **Injury - International Journal of the Care of the Injured**. v.44, p.908-913. 2013.

GRIFFON, D.J. Fracture healing. In: JOHNSON, A.L.; HOULTON, J.E.F.; VANNINI, R. **AO Principles of Fracture Management in the Dog and Cat**. Thieme. 2005. 546p.

GUAN, J.; LAI, X.; WANG, X.; LEUNG, A.W.; ZHANG, H.; XU, C. Photodynamic action of methylene blue in osteosarcoma cells *in vitro*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v.11, p.13-19. 2014.

HAMBLIN, M.R.; DEMIDOVA, T. Mechanisms of Low Level Light Therapy. **Proceeding of SPIE**. v.6140. 2006.

HARWOOD, P.J.; FERGUSON, D.O. An update on fracture healing and non-union. **Orthopaedics and Trauma**. v.29, n.04, p.228-242. 2015.

HUGHES, L.E. What you should know before you buy a therapeutic laser. 2011.

ISRAEL, C.B.; SANTOS, D.F.; MAUÉS, T.; QUEIRZ, G.B.; COSTA, F.B.; NASCIMENTO, J.S.; BRUNO, S.F.; FERREIRA, M.L.G. Uso da terapia fotodinâmica empregando azul de metileno a 2% como agente

fotossensibilizante para o controle de crescimento tumoral em calopsita (*Nymphicus hollandicus*) portador de sarcoma. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**. v.21, n.2, p.86-89. abr/jun. 2014.

JAWAD, M.M.; HUSEIN, A.; AZLINA, A.; ALAM, M.K.; HASSAN, R.; SHAARI, R. Effect of 940nm low-level laser therapy on osteogenesis *in vitro*. **Journal Biomed Optics**. v.18, n.12, p.1-6. 2013.

JUNQUEIRA, L.C.U. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12° Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 556p.

KAIRALLA, E.C. **Estudo da Redução Microbiana Intracanal Utilizando Laser de Baixa Potência associado a Fotossensibilizador e Laser de Alta Potência**. 2006. 56 f. (Dissertação de Mestrado em Odontologia). IPEN – Autarquia Associada à Universidade de São Paulo. São Paulo, São Paulo, 2006.

KEALY, J.K.; MCALLISTER, H.; GRAHAM, J.P. **Radiografia e Ultrassonografia do Cão e do Gato**. 5° edição. Saunders Elsevier. 2012. 548p.

KIEVES, N.R.; MACKAY, C.S.; ADDUCCI, K.; RAO, S.; GOH, C.; PALMER, R.H.; DUERR, F.M. High energy focused shock wave therapy accelerates bone healing. A Blinded, prospective, randomized canine clinical trial. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**. V.06, p.01-08. 2015.

KIKUCHI, T.; MOGI, M.; OKABE, I.; OKADA, K.; GOTO, H.; SASAKI, Y.; FUJIMURA, T.; FUKUDA, M.; MITANI, A. Adjunctive application antimicrobial photodynamic therapy in nonsurgical periodontal treatment: a review of literature. **International Journal of Molecular Science**. v.16, p.24111-24126. Oct. 2015.

KLEPSYTE, E.; SAMALAVICIUS, N.E. Injection of methylene blue solution into inferior mesenteric artery of resected rectal specimens for rectal cancer as a method for increasing the lymph node harvest. **Techniques in Coloproctology**. v.16, p.207-2011. 2012.

KNEEBONE, W.J. Practical Applications of Low Level Laser Therapy – a brief review of some of the basic concepts of low level laser therapy, clinical indications for its use, and treatment options when applying therapeutic lasers to patients in pain. **Practical Pain Management**. Nov/Dec. 2006.

LEIGHTON, R.; WATSON, T.; GIANNOUDIS, P.; PAPAKOSTIDIS, C.; HARRISON, A.; STEEN, R.G. Healing of fracture nonunions treated with low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS): a systematic review and meta-analysis. **Injury**. v.48, p.1339-1347. 2017.

LIBARDONI, R.N. **Doenças Ortopédicas de Etiologia Traumática do Sistema Locomotor de Cães: 1200 casos (2004-2013)**. 2015. 48 f. (Dissertação de Mestrado em Cirurgia e Clínica Veterinária) Universidade

Federal de Santa Maria. Centro de Ciências Rurais. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Santa Maria, Rio Grande do Sul. 2015.

LI, Q.; ZHOU, Y.; QU, Z.; ZHANG, T. Stimulatory effect of low-level GaAlAs (808nm) on bone defect created surgically in rabbit fêmur. **Proceeding of SPIE**. v.782, p.01-08. 2009.

LUCAS, S.S.; ALIEVI, M.M.; CONY, A.V.; CHOSSLER, J.E.W. Fraturas distais de fêmur em cães e gatos - Revisão de 55 casos. **Revista da FZVA**. v,8, n.01, p.75-83. 2001.

MARCONDES, G.M.; NÓBREGA, F.S.; CORRÊA, L.; ARANA-CHAVEZ, V.E.; PLEPIS, A.M.G.; MARTINS, V.C.A.; ZOPPPA, A.L.V. Avaliação da integração biológica entre compósito de quitosana, colágeno e hidroxiapatita e tecido ósseo ovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.68, n.06, p.1531-1538. 2016.

MARQUES, L.; HOLGADO, L.A.; FRANCISCHONE, L.A.; XIMENEZ, J.P.B.; OKAMOTO, R.; KINOSHITA, A. New LLLT protocol to speed up the bone healing process – histometric and immunohistochemical analysis in rat calvarial bone defect. **Laser in Medical Science**. v.30, p.1225-1230. 2015.

MATSUBARA, T.; KUSUZAKI, K.; MATSUMINE, A.; SATONAKA, H.; SHINTANI, K.; NAKAMURA, T.; UCHIDA, A. Methylene Blue in Place of Acridini Orange as a Photosensitizer in Photodynamic Therapy of Osteosarcoma. **In Vivo**. v.22, n. 297-304. 2008.

MERLI, L.A.S.; MEDEIROS, V.P.; TOMA, L.; REGINATO, R.D.; KATCHBURIAN, E.; NADER, H.B.; FALOPPA, F. The Low Level Laser Therapy Effect on the Remodeling of Bone Extracellular Matrix. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v.88, p.1293-1301. 2012.

MIRANDA, A.F.S. **Avaliação dos Efeitos da Terapia Fotodinâmica Utilizando Compostos Fenotiazínicos Sobre o Melanoma *In Vitro***. 2015. 45 f. (Dissertação de Mestrado em Biotecnologia e Medicina Investigativa). Fundação Oswaldo Cruz – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Salvador, Bahia, 2015.

MOTA, N.L.; CASTRO JÚNIOR, A.F.; CASTRO, B.K.; SILVEIRA NETO, L.L.; AARESTRUP, B.J.V. Embriologia e histofisiologia do tecido ósseo: revisão de literatura e bases histofisiológicas das principais doenças metabólicas. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**. v.27, n.1/2, p.27-32. 2008.

MOTA, F.C.D.; BELO, M.A.A.; BELETTI, M.E.; OKUBO, R.; PRADO, E.J.R.; CASALE, R.V.P. Low-power laser therapy for repairing acute and chronic-phase bone lesions. **Research Veterinary Science**. v.94, p.105-110. 2013.

NASCIMENTO, S.B.; CARDOSO, C.A.; RIBEIRO, T.P.; ALMEIRA, J.D.; ALBERTINI, R.; MUNIN, E.; ARISAWA, E.A.L. Effect of low-level therapy and

calcitonin on bone repair in castrated rats: a densitometric study. **Photomedicine and Laser Surgery**. v.28, n.1, p.45-49, 2010.

NORTH, S.; BANKS, T. **Introduction to Small Animal Oncology**. Saunders Elsevier. 287p. 2009.

OLIVEIRA, G.K.; RAISER, A.G.; OLSSON, D.; SALBEGO, F.Z.; MARTINS, D.B.; DEZENGRINE, R.; SANTOS JÚNIOR, E.B.; RAPPETI, J.; TRINDADE, L.B.; TOGNOLI, G.K.; PIPPI, N.L.; SAUSEN, L. Células-tronco mononucleares autólogas e proteína óssea morfogenética na cicatrização de defeitos tibiais experimentalmente induzidos em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.62, n.01, p.72-79. 2010.

OLIVEIRA, P.; FERNANDES, K.R.; SPERANDIO, E.F.; PASTOR, F.A.C.; NONAKA, K.O.; PARIZOTTO, N.A.; RENNO, A.C. Comparação dos efeitos do laser de baixa potência e do ultrassom de baixa intensidade associado ao biossilicato no processo de reparo ósseo em tíbias de ratos. **Revista Brasileira de Ortopedia**. v.47, n.01, p.102-107. 2012.

PACHECO E SILVA, A.P.; GONÇALVES, B.A.L. **A utilização da terapia fotodinâmica no tratamento de inflamação e infecção dos sacos anais de um cão: relato de caso**. 2007. 13 f. Trabalho de conclusão de curso. Betim, 2007.

PATROCÍNIO-SILVA, T.L.; SOUZA, A.M.F.; GOULART, R.L.; PEGORARI, C.F.; OLIVEIRA, J.R.; FERNANDES, K.; MAGRI, A.; PEREIRA, R.M.R.; ARAKI, D.R.; NAGAOKA, M.R.; PARIZOTTO, N.A.; RENNO, A.C.M. The effects of low-level laser irradiation on bone tissue in diabetic rats. **Laser in Medical Science**. v.29, n.1357-1364. 2014.

PELOI, L.S.; BIONDO, C.E.G.; KIMURA, E.; POLITI, M.J.; LONARDONI, M.V.C.; ARISTIDES, S.M.A.; DOREA, R.C.C.; HIOKA, N.; SILVEIRA, T.G.V. Photodynamic therapy for American cutaneous leishmaniasis: The efficacy of methylene blue in hamsters experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Experimental Parasitology**. v.128. p.353-356. 2011.

PETER, A.; JENKINS, M.B.A.; JAMES, D.; CARROLL, A.M.; INSTO, F.R.S.M. How to report low-level laser therapy (LLLT) / photomedicine dose and beam parameters in clinical and laboratory studies. **Photomedicine and Laser Surgery**. v.29, n.12, p.785-787, 2011.

PETRELLIS, M.C.; FRIGO, L.; MARCOS, R.L.; PALLOTTA, R.C.; CARVALHO, M.H.C.; MUSCARÁ, M.N.; MARIA, D.A.; LOPES-MARTINS, R.A.B. Laser photobiomodulation of pro-inflammatory mediators on Walker Tumor 256 induced rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**. v.177, p.69-75. 2017.

POPPI, R.R.; SILVA, A.L.; NACER, R.S.; VIEIRA, R.P.; OLIVIERA, V.F.; JÚNIOR, N.S.F.; CARVALHO, P.T.C. Evaluation of the osteogenic effect of low-level laser therapy (808nm and 660nm) on bone defects induced in the femurs of female rats submitted to ovariectomy. **Laser in Medicine Science**. v.26, p.515-522. 2011.

PORTH, C.M. **Alterações na Função Esquelética: Traumatismo e Infecção**. Fisiopatologia. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.1288-1300.

PRATES, R.A.; YAMADA JR, A.M.; SUZUKI, L.C. HASHINOMOTO, C.E.; CAI, S.; SOARES, S.G.; GOMES, L.; RIBEIRO, M.S. Bactericidal effect of malachite Green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**.v.86, p.1-7. 2006.

PRETEL, H.; LIZARELLI, R.F.Z.; RAMALHO, L.T.O. Effect of low-level laser therapy on bone repair. Histological Study in Rats. **Laser in Surgery and Medicine**. v.39, p.788-796. 2007.

PURICELLI, E.; CORSETTI, A.; PONZONI, D.; MARTINS, G.L.; LEITE, M.G.; SANTOS, A. Characterization of bone repair in rat fêmur after treatment with calcium phosphate cements and autogenous bone graft. **Head and Face Medicine**. v.6, n.10. 2010.

RAMAMURTHY, R.; SEENIVASAGAM, R.K.; SHANMUGAM, S.; PALANIVELU, K. A prospective study on sentinel lymph node biopsy in early oral cancers using methylene blue dye alone. **Indian Journal Oncology**. v.05, n.03, p.178-183. 2014.

RAYEGANI, S.M.; BAYAAT, M.; SEDIGHIPOUR, L.; SAMADI, B. Low Intensity Laser Therapy. **Journal of Lasers in Medical Sciences**. v.1, n.1, p.31-34. 2010.

RIBEIRO, T.P.; NASCIMENTO, S.B.; CARDOSO, C.A.; HAGE, R.; ALMEIDA, J.D.; ARISAWA, E.A.L. Low-Level Laser Therapy and Calcitonin in Bone Repair: Densitometric Analysis. **International Journal of Photoenergy**. p. 01-05. 2012. DOI:1155/2012/829587

ROCHA, C.L.J.V.; JÚNIOR, A.M.R.; AARESTRUP, B.J.V.; AARESTRUP, F.M. Inibição da expressão de ciclooxygenase 2 em feridas cutâneas de camundongos NOD submetidos à terapia a laser de baixa intensidade. **Jornal Vascular Brasileiro**. v.11, n.13, p.175-181. 2012.

ROSA, L.P.; SILVA, F.C.; NADER, S.A.; MEIRA, G.A.; VIANA, M.S. Antimicrobial photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* biofilms in bone specimens using methylene blue, toluidine blue ortho and malachite green: an *in vitro* study. **Archives Oral Biology**. v.60, n.05, p.675-680. 2015.

\_\_\_\_\_ Effectiveness of antimicrobial photodynamic therapy using a 660nm laser and methylene blue dye for inactivating *Staphylococcus aureus* biofilms in compact and cancellous bones: an *in vitro* study. **Photodiagnosis Photodynamic Therapy**. v.12, n.02, p.276-281. Jan. 2015.

ROSA, L.P.; DA SILVA, F.C.; VIEIRA, R.L.; TANAJURA, B.R.; GUSMÃO, A.G.S.; OLIVEIRA, J.M.; DOS SANTOS, N.A.C.; BAGNATO, V.S. Application of photodynamic therapy, laser therapy, and a cellulose membrane for calcaneal pressure ulcer treatment in a diabetic patient: case report. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v.19, p.235-238. 2017.

SAMPAIO, A.B.A.; LOPES, L.A. Associação entre fototerapia e terapia fotodinâmica no tratamento de ferida cutânea em cão. **Revista Científica de Medicina Veterinária – MEDVEP**. v.14, n.44, p.74-79. 2016.

SEBBEN, A.D.; HOFF, G.; KLEIN, C.P.; FREITAS, T.A.; ASSAD, C.; SANTOS, L.A.; SILVA, J.B. Estudo comparativo do uso isolado de plasma rico em plaquetas e combinado com cimento de alfa-fosfato tricálcico no reparo ósseo em ratos. **Revista Brasileira de Ortopedia**. v.47, n.4, p.505-512. 2012.

SELLA, V.R.G.; BOMFIM, F.R.C.; MACHADO, P.C.D.; MORSOLETO, M.J.M.S.; CHOEFI, M.; PLAPLER, H. Effect of low-level laser therapy on bone repair: a randomized controlled experimental study. **Laser in Medical Science**. v.30, p.1061-1068. 2015.

SELLERA, F.P.; CARGANO, R.G.; POGLIANI, F.C. Terapia fotodinâmica: revisão de literatura. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária**. São Paulo. v.12, n.1, p.6-13, 2014.

SENA, R.M.M. **Efeitos da terapia fotodinâmica mediada por laser de emissão vermelha e azul de metileno em vaginite induzida por “Candida albicans”**. 2013. 88 f. Tese (Doutorado em ciências na área de Tecnologia Nuclear – Materiais). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – Autarquia Associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

SHIRAH, G.R.; BOUTON, M.E.; KOMENAKA, I.K. Occurrence of prolonged infection site mass with methylene blue but not isosulfan blue after the sentinel node procedure. **Archives of Surgery**. v.46, n.02, p.137-141. 2011.

SMELTZER, S.C.; BARE, B.G.; BRUNNER & SUDDARTH. **Tratado de enfermagem médico-cirúrgica**. 11<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

SOARES, D.S.; DE MELLO, L.M.; DA SILVA, A.S.; MARTINEZ, E.Z.; NUNES, A.A. Fraturas de fêmur em idosos no Brasil: análise espaço-temporal de 2008 a 2012. **Caderno da Saúde Pública**. v.30, n.12, p.2669-2678. 2014.

SON, J.; KIM, Y.B.; GE, Z.; CHOI, S.H.; KIM, G. Bone Healing Effects of Diode Laser (808 nm) on a Rat Tibial Fracture Model. **In Vivo**. v.26, p.703-710. 2012.

SOUZA, S.C.; JUNQUEIRA, J.C.; BALDUCCI, I.; KOGA-ITO, C.Y.; MUNIN, E.; JORGE, A.O.C. Photosensitization of different *Candida* species by low level laser light. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. v.83, p.34-38. 2006.

SPERANDIO, F.F. **Avaliação da reparação tecidual de excisões realizadas em dorso de ratas submetidas à terapia foto-dinâmica com a utilização de corante de azul de metileno.** 2009. 139 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

THEODORO, L.H.; LONGO, M.; NOVAES, V.C.N.; MIESSI, D.M.J.; FERRO-ALVES, M.L.; ERVOLINO, E.; ALMEIDA, J.M.; GARCIA, V.G. Low-level laser and antimicrobial photodynamic therapy on experimental periodontitis in rats submitted to chemotherapy by 5-fluorouracil. *Support Care Cancer*. v.25, p.3261-3271. 2017.

TIM, C.R.; BOSSINI, P.S.; KIDO, H.W.; MALAVAZI, I.; KRESS, M.R.V.Z.; CARAZZOLLE, M.F.; PARIZOTTO, N.A.; RENNÓ, A.C. Effects of low-level laser therapy on the expression of osteogenic genes during the initial stages of bone healing in rats: a *microarray* analysis. *Laser in Medical Science*. 2015. 30: 2325. [https://DOI 10.1007/s10103-015-1807-5](https://doi.org/10.1007/s10103-015-1807-5)

TIM, C.R.; PINTO, K.N.Z.; ROSSI, B.R.O.; FERNANDES, K.; MATSUMOTO, M.A.; PARIZOTTO, N.A.; RENNÓ, A.C.M. Low-level laser therapy enhances the expression of osteogenic factors during bone repair in rats. *Laser in Medicine Science*. v.29, p.147-156. 2014.

VÁZQUEZ, M.B.; DÍAZ, G.S.; PÉREZ, M.G.; IZQUIERDO, T.G.; MARTÍN, D.P.; MANZANO, G.P.; FRANCO, N.R. Low power laser stimulation of the bone consolidation in tibial fractures of rats: a radiologic and histopathological analysis. *Lasers Med Sci*. v.30, p.333-338. 2015.

WITHROW and MACEWEN'S. **Small Animal Clinical Oncology.** Saunders Elsevier. 2007. 846p.

## ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

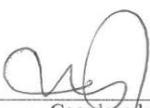
### CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº. 09/2015 – CEUA sobre “AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM AZUL DE METILENO 0,01% E LASER DE BAIXA INTENSIDADE EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO, NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CIRÚRGICAS ÓSSEAS EM RATOS WISTAR - ANÁLISE RADIOGRÁFICA E HISTOPATOLÓGICA – ESTUDO PRÉVIO” projeto de pesquisa sob a responsabilidade de BEATRIZ JULIÃO VIEIRA AARESTRUP com a colaboração de FABIANO LUIZ DULCE DE OLIVEIRA, ROBERTO SOTTO-MAIOR FORTES DE OLIVEIRA E CAROLINA DE LOURDES JULIÃO VIEIRA ROCHA está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 05/05/2015. Para o desenvolvimento da pesquisa serão liberados 6 ratos Wistar (6 machos) de 12 semanas de idade conforme solicitado e que serão utilizados no período de 15/06/2015 a 15/06/2016.

### CERTIFICATE

We certify that the protocol nº. 09/2015 - CEUA about “AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM AZUL DE METILENO 0,01% E LASER DE BAIXA INTENSIDADE EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO, NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CIRÚRGICAS ÓSSEAS EM RATOS WISTAR- ANÁLISE RADIOGRÁFICA E HISTOPATOLÓGICA – ESTUDO PRÉVIO” under responsibility of BEATRIZ JULIÃO VIEIRA AARESTRUP and collaboration of FABIANO LUIZ DULCE DE OLIVEIRA, ROBERTO SOTTO-MAIOR FORTES DE OLIVEIRA and CAROLINA DE LOURDES JULIÃO VIEIRA ROCHA - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 05/05/2015. For the development of this research 6 Wistar rats (6 males) of 12 weeks of age, will be delivered as requested in the period of 15/06/2015 to 15/06/2016.

Juiz de Fora, 06 de Maio de 2015

  
\_\_\_\_\_  
Coordenadora  
CEUA

  
\_\_\_\_\_  
Vice-coordenadora  
CEUA

## ANEXO B – Protocolo de processamento histológico realizado no laboratório de histologia do Centro de Biologia da Reprodução

 <p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA</p>	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP)	 <p>Centro de Biologia da Reprodução</p>	
ASSUNTO: POP – INCLUSÃO EM PARAFINA			
CÓDIGO: HISTO - 02	VERSÃO: 01	EMISSÃO: 11/08/2015	N° DE PÁGINAS: 02
Tempo médio: 340min → 7 h			

1. **Objetivo:** Descrever o procedimento operacional padrão para INCLUSÃO EM PARAFINA

2. **Responsabilidades:** técnico do laboratório - Laetitia Alves Cinsa

3. **Alcance:** alunos de iniciação científica, alunos da Pós-graduação, Técnicos de Laboratório e estagiários do Centro de Biologia da Reprodução.

4. **Distribuição:** Laboratório 2.

5. **Materiais Utilizados: (conferir lista de material e de reagentes no dia anterior ao do procedimento)**

- Frascos contendo as peças.
- EPI (luvas de procedimento cirúrgico, luva de borracha, touca, mascara)
- Estufa a 60°;
- Capela de exaustão;
- Inclusora;
- Formas metálicas para inclusão;
- Anel histológico;
- Parafinas I,II,III;
- Água destilada;
- Álcool 70%;
- Álcool 80%;
- Álcool 90%;
- Álcool 100%;
- Xilol;
- Papel toalha
- Backer de boca menor
- Pinça
- Parafina (preencher a máquina inclusora)

6. **Procedimento:**

6.1 **Hidratação:**

6.1.1 Descartar o fixador no recipiente adequado para descartes;

6.1.2 Banho de água destilada → 10'

6.2. **Desidratação: (Anexo → I)**

6.2.1 Banho de Álcool 70% → 30'

6.2.2 Banho de Álcool 80% → 30'

6.2.3 Banho de Álcool 90% → 30'

6.2.4 Banho de Álcool 100% I → 30'

6.2.5 Banho de Álcool 100% II → 30'

6.2.6 Banho de Álcool 100% III → 30'

**6.3 Diafanização: (Anexo → II)**

6.3.1 Banho de Xilol I → 20'

6.3.2 Banho de Xilol II → 20'

6.3.3 Banho de Xilol III → 20'

**6.4 Penetração ou impregnação da parafina (ATENÇÃO: PROCEDIMENTO FEITO DENTRO DA ESTUFA)**

6.4.1 Banho de parafina I → 20'

6.4.2 Banho de parafina II → 20'

6.4.3 Banho de parafina III → 20'

**6.5 Inclusão, modelagem ou formação de bloco:**

6.5.1 Na inclusora encher uma forma com parafina fundida;

6.5.2 Pegar um frasco contendo a peça na estufa;

6.5.3 Posicionar a peça na forma;

6.5.4 Retirar a identificação do frasco;

6.5.5 Colocar o anel histológico;

6.5.6 Levar para a base fria menor;

6.5.7 Preencher com parafina fundida;

6.5.8 Levar a forma para a placa fria grande e esperar.

**7. Anexo**

7.1 Anexo I

7.1.1 O tempo é marcado após o preenchimento, com o reagente, do primeiro frasco;

7.1.2 **Desidratação:** Agitar constantemente o recipiente para permitir a mistura da água, depositada no fundo, com o álcool,

7.1.3 Álcool 100% (I, II, III): reaproveita-los para limpeza dos frascos após passagem pelo xilol.

7.2 Anexo II

7.2.1 Procedimento feito na capela de exaustão com uso de luvas de borracha;

7.2.2 Diafanização: NÃO agitar o recipiente que contém a peça para que o diafanizador fique separado do álcool que vai saindo da peça;

7.2.3 O xilol é descartado em um recipiente apropriado que fica dentro da capela;

**8. Observações e considerações:**

8.1. Ligar a máquina inclusora (HEAT);

8.2. Conferir volume de parafina na máquina inclusora e nos recipientes de parafina I, II, III;

8.3. Colocar parafinas I, II, III na estufa sem a tampa;

8.4. Separar anel histológico e etiquetas de identificação dos frascos.

## ANEXO C – Protocolo de processamento coloração realizado no laboratório de histologia do Centro de Biologia da Reprodução

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP)	
ASSUNTO: POP – COLORAÇÃO HISTOLÓGICA PELA TÉCNICA DE HEMATOXILINA E CROMOTROPE 2R		
CÓDIGO: HISTO - 02	VERSÃO: 03	EMISSÃO: 28/07/2016
		Nº DE PÁGINAS: 01

- Objetivo:** consiste na coloração de cortes histológicos de material obtidos de biópsia / necropsia de peças contidas em parafina.
- Responsabilidades:** técnico do laboratório - Laetitia Alves Cinsa
- Alcance:** alunos de iniciação científica, alunos da Pós-graduação, Técnicos de Laboratório e estagiários do Centro de Biologia da Reprodução.
- Distribuição:** Laboratório de histologia
- Materiais Utilizados:**
  - Lâmina contendo material histológico.
  - Corantes: hematoxilina de Herris e cromotrope 2r
  - Bateria de coloração (com xilol e álcool – conferir aspect e volume)
  - Laminulas
  - Cuba e borel de vidro
  - Entellan

SEQUÊNCIAS			
ETAPA	ESTÁGIO	AGENTE / observação	DURAÇÃO
1	Desparafinização	Estufa 60°C	30 min
2	Desparafinização	Xilol I	5 min
3	Desparafinização	Xilol II	5 min
4	Desparafinização	Xilol III	5 min
5	Hidratar	Álcool Etílico 100% I	5 min
6	Hidratar	Álcool Etílico 100% II	5 min
7	Hidratar	Álcool Etílico 100% III	5 min
8	<b>HEMATOXILINA</b>	Corante básico	5 min
9	Lavagem	Água corrente = VIRAGEM	20 min
10	Desidratação	Álcool Etílico 100% I	5 min
11	Desidratação	Álcool Etílico 100% II	5 min
12	Desidratação	Álcool Etílico 100% III	5 min
13	<b>CROMOTROPE 2R</b>	Coloração ácida	2 min
14	Lavagem	Álcool Etílico 100% I - Passar uma lâmina por vez no borrel	~3 passagens
15	Lavagem	Álcool Etílico 100% II - Passar uma lâmina por vez no borrel	~3 passagens
16	Lavagem	Álcool Etílico 100% III - Passar uma lâmina por vez no borrel	~3 passagens
17	Diafanização	Xilol I	5 min
18	Diafanização	Xilol II	5 min
19	Diafanização	Xilol III	5 min
20	Montagem	Material: lamínulas e entellan	-----
RESULTADO		Tons de roxo azulado: núcleo e o nucléolo	basofílico
		Tons de rosa avermelhado: citoplasma e componentes extracelulares	acidofílicas