

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO - UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA -
PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS

TESE DE DOUTORADO

AÇÕES DA TERAPIA FOTODINÂMICA NA ORGANIZAÇÃO ÓSSEA
E NAS EXPRESSÕES DE T-BET EM LINFÓCITOS Th1 E DE iNOS EM
CÉLULAS OSTEÓBLÁSTICAS, QUANDO APLICADA EM DEFEITOS
FEMORAIS DE RATOS

Fabiano Luiz Dulce de Oliveira

2025



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA -
PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS**

**AÇÕES DA TERAPIA FOTODINÂMICA NA ORGANIZAÇÃO ÓSSEA
E NAS EXPRESSÕES DE T-BET EM LINFÓCITOS Th1 E DE iNOS EM
CÉLULAS OSTEABLÁSTICAS, QUANDO APLICADA EM DEFEITOS
FEMORAIS DE RATOS**

FABIANO LUIZ DULCE DE OLIVEIRA

Sob a Orientação da Professora
Dra. Ticiano do Nascimento França
e Co-orientação do Professor
Dr. Akinori Cardozo Nagato

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor**, no
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária - Patologia e
Ciências Clínicas, Área de Concentração
em Ciências Clínicas.

Seropédica, RJ
Dezembro de 2025

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Biblioteca
Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

O48a OLIVEIRA, FABIANO LUIZ DULCE DE, 1983-
AÇÕES DA TERAPIA FOTODINÂMICA NA ORGANIZAÇÃO ÓSSEA E
NAS EXPRESSÕES DE T-BET EM LINFÓCITOS Th1 E DE iNOS EM
CÉLULAS OSTEÓBLÁSTICAS, QUANDO APLICADA EM DEFEITOS
FEMORAIS DE RATOS / FABIANO LUIZ DULCE DE OLIVEIRA. -
SEROPÉDICA, 2025.
82 f.

Orientadora: TICIANA DO NASCIMENTO FRANÇA.
Coorientador: AKINORI CARDOZO NAGATO.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS, 2025.

1. OSTEIMUNOLOGIA. 2. INFLAMAÇÃO. 3. REPARO ÓSSEO.
I. FRANÇA, TICIANA DO NASCIMENTO, 1974-, orient. II.
NAGATO, AKINORI CARDOZO, -, coorient. III
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. PÓS
GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA - PATOLOGIA E
CIÊNCIAS CLÍNICAS. IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

FABIANO LUIZ DULCE DE OLIVEIRA

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas), Área de Concentração em Ciências Clínicas.

TESE APROVADA EM 16/12/2025

Akinori Cardozo Nagato. Dr. UFJF
(coorientador)

Vivian de Assunção Nogueira Carvalho. Dra. UFRRJ

Saulo Andrade Caldas. Dr. UFRRJ

Valiria Cerqueira Duarte. Dra. UFPA

Beatriz Julião Aarestrup. Dra. UFJF



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
SISTEMA INTEGRADO DE PATRIMÔNIO,
ADMINISTRAÇÃO E CONTRATOS

FOLHA DE ASSINATURAS

TERMO N° 31/2026 - PPGMV (12.28.01.00.00.00.51)

(N° do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

**(Assinado digitalmente em 27/01/2026
15:22)**

SAULO ANDRADE CALDAS
PROFESSOR DO MAGISTERIO
SUPERIOR DeptMCV
(12.28.01.00.00.00.53)
Matricula: ###290#2

(Assinado digitalmente em 27/01/2026 15:40)
VIVIAN DE ASSUNCAO NOGUEIRA CARVALHO

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DESP (12.28.01.00.00.00.52)
Matricula: ###061#5

**(Assinado digitalmente em 29/01/2026
12:11)**

BEATRIZ JULIAO VIEIRA AARESTRUP
ASSINANTE
EXTERNO CPF:
###.###.136-##

(Assinado digitalmente em 28/01/2026 09:01)
VALIRIA CERQUEIRA DUARTE

ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.707-##

(Assinado digitalmente em 27/01/2026 21:37)

AKINORI CARDOZO NAGATO
ASSINANTE
EXTERNO CPF:
###.###.627-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número: **31**, ano: **2026**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **27/01/2026** e o código de verificação: **24c8fca39f**

Dedico esta Tese:

* ao amigo e colega de trabalho, M.V. Especialista em Anestesiologia, Rodrigo Verdeiros de Almeida Magalhães (*In memorian*) - logo após sua partida, todo este trabalho se iniciou!

* à minha tia e madrinha, Maria do Carmo de Oliveira (*In memorian*), grande incentivadora e torcedora da minha carreira profissional.

AGRADECIMENTOS

Início agradecendo a Deus, pela saúde, pela sabedoria, pela minha família e pela minha profissão, que, em conjunto, me proporcionaram as condições necessárias para manter a disposição e a força de vontade de deixar Juiz de Fora (MG) e deslocar-me até Seropédica (RJ) em busca de aprendizado e crescimento pessoal e profissional, permitindo-me, acima de tudo, retornar para minha casa em segurança.

Agradeço profundamente à minha família - meu pai, Virgílio, minha mãe, Denize, minhas irmãs, Luciana e Renata, minha amada esposa, Maria Tereza, minha filha, Maria Clara (“Amor da vida”), meu cunhado, Bruno, meus sobrinhos, Antônio e Pedro, assim como minhas tias e meus sogros - pelo apoio incondicional aos meus objetivos profissionais, mesmo compreendendo que a distância e as frequentes viagens poderiam trazer apreensões e preocupações. Reconheço que, em diversos momentos, estive ausente em ocasiões familiares importantes em razão dessa trajetória, mas foi graças à compreensão, ao amor e ao incentivo de cada um de vocês que pude alcançar este objetivo. Agora, podemos enfim celebrarmos juntos esta conquista. Amo grandemente todos vocês!

Agradeço, de forma muito especial, à Professora Doutora Ticiano do Nascimento França, que me acolheu como orientado na segunda metade do curso. Professora, desde o início, a senhora me transmitiu segurança e confiança em um momento de incerteza, e sua simpatia, educação e paciência foram fundamentais para meu equilíbrio e crescimento acadêmico. Agradeço profundamente por ter me acolhido, orientado e guiado com sabedoria. Muito obrigado, de coração, por sua dedicação e por acreditar no meu potencial.

Um agradecimento mais que especial - mas mais do que especial mesmo! - vai para o amigo e coorientador, Professor Doutor Akinori Cardozo Nagato. Não sei nem por onde começar a te agradecer. Na verdade, só tenho a te agradecer! O mais difícil é não saber como retribuir à altura tudo o que você fez por mim. Sempre escutei você agradecendo ao seu orientador de uma forma que, confesso, às vezes me parecia exagerada, mas hoje, entendo perfeitamente o motivo de tanta gratidão. Minha admiração por você é enorme, e faço questão de deixá-la registrada aqui. Você gosta do que faz, e faz com o coração. Nossa amizade vem desde os tempos em que eu cursava o mestrado e você o doutorado, e eu jamais imaginaria que o destino nos uniria novamente nesta jornada. Agradeço por me receber, compreender minha situação e me apoiar em tudo o que precisei. Demorei um pouco para entender sua metodologia, mas confesso que hoje ela faz parte de mim e dificilmente deixarei de aplicá-la no meu futuro profissional. Certamente levarei comigo os ensinamentos e exemplos que tive - com privilégio - de aprender com você. Meu sincero agradecimento e um abraço enorme!

Finalizo esta etapa da minha vida profissional expressando minha sincera gratidão à amiga e Professora Doutora Anna Júlia Rodrigues Peixoto, que, há quatro anos, quando a conheci - ao ingressar como nova docente das disciplinas de Farmacologia e Anestesiologia Veterinária na Faculdade de Veterinária do Centro Universitário de Valença (UNIFAA) -, mesmo antes de termos criado um vínculo mais próximo, informou-me sobre o edital extraordinário publicado pelo Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), referente à seleção para o curso de doutorado. À época, confesso que já cogitava desistir de participar de novos processos seletivos, e Seropédica (RJ) parecia estar muito distante da minha realidade. Minha filha havia acabado de nascer, e a conciliação entre a rotina cirúrgica, a vida familiar e as atividades docentes pareciam um desafio quase impossível. Ainda assim, após refletir longamente, decidi buscar o edital. Restavam apenas 14 dias para definir um projeto e contactar um possível orientador(a). Ao analisar a lista de docentes disponíveis para orientação, encontrei a Professora Doutora Cássia Maria Molinaro Coelho, cuja linha de pesquisa se aproximava a uma das minhas áreas de interesse. Após

algumas conversas com a Professora Cássia, adaptei um projeto que já possuía às exigências do edital e..., felizmente, fui aprovado. Hoje, ao concluir este ciclo, registro meu mais profundo agradecimento à Professora Cássia, por ter acreditado no meu potencial, sendo essencial no início desta jornada. Professora, receba minha gratidão e meu reconhecimento por sua orientação, paciência e confiança.

Meus agradecimentos aos “Ruralinos” se estendem a todos os alunos de graduação aos quais tive a oportunidade e o privilégio de ministrar aulas, aos servidores da instituição, aos colegas de disciplina, aos diferentes coordenadores que contribuíram para o fortalecimento da pós-graduação, e à secretária Isabelle, pela constante atenção, disponibilidade e paciência - especialmente diante de algumas dificuldades impostas pela distância. Expresso, ainda, minha sincera gratidão aos excelentes professores do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas) - (PPGMV-UFRRJ) -, verdadeiras referências acadêmicas e profissionais, com os quais tive o prazer de conviver e aprender ao longo das disciplinas cursadas.

Embora estivesse regularmente matriculado no PPGMV-UFRRJ, desenvolvi minha pesquisa no Laboratório de Imunopatologia e Patologia Experimental do Centro de Bioterrorismo Regional (CBR) - antigo Centro de Biologia da Reprodução - pertencente à Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Expresso meus sinceros agradecimentos ao Professor Doutor Maycon de Moura Reboredo, que, ao assumir interinamente a direção do CBR, gentilmente me autorizou a dar continuidade à execução da minha pesquisa - iniciada durante o período do mestrado - neste laboratório. Estendo meus agradecimentos a todos os secretários, colegas, funcionários, alunos, estagiários e técnicos administrativos, que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigado pelo carinho e disponibilidade de todos vocês!

Agradeço aos colegas do grupo de estudo do “Laboratório de Biofísica, Morfofisiologia e Inflamação” - alunos dos cursos de medicina, fisioterapia, farmácia, medicina veterinária e enfermagem da UFJF. Confesso que acabei pegando um carinho grande por vocês. Continuem sempre firmes, vocês serão excelentes profissionais!! Agradecimento especial à Maisa e ao João que, não apenas me ajudaram nas coletas dos meus dados, mas também se disponibilizaram e puderam levar parte dos resultados desta tese em dois importantes eventos. Esse trabalho aqui também é de vocês!

Ainda dentro dos locais e profissionais da UFJF, gostaria de agradecer primeiramente ao Professor Doutor Vinícius Novaes Rocha que me recebeu e me direcionou para que eu pudesse realizar análises que somaram, e muito, aos resultados desta tese. Professor, sua contribuição foi imensa não apenas para o meu conhecimento particular, como também será para comunidade científica, após a publicação dos nossos resultados! Diretamente vinculado ao Professor Vinícius, gostaria de mencionar agradecimento aos técnicos Haroldo Lobo dos Santos Nascimento, do Laboratório de Histologia Veterinária, e Pedro Loureiro, do laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Ciências Exatas (ICE). Muito obrigado meus caros!

Agradeço ao Centro Universitário de Valença (UNIFAA) não apenas pelo incentivo moral - do qual a instituição apoia a educação continuada do seu corpo docente - mas também pelo apoio financeiro que tive durante parte desta trajetória, e ainda por compreender e aceitar as minhas ausências quando precisei cursar algumas disciplinas na UFRRJ. Tenho carinho enorme por ter me formado Médico Veterinário neste centro de ensino, e mais ainda por, há sete anos, fazer parte como colaborador do corpo docente do Curso de Medicina Veterinária, assim como por ser membro da equipe Policlínica Escola Veterinária.

Estendo meus agradecimentos a uma quarta Instituição. Poucos sabem, mas durante o doutorado também tive a oportunidade de participar das reuniões semanais do Laboratório de Fisiologia Experimental (LAFEX) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Assim, não poderia deixar de expressar minha sincera gratidão ao Professor Doutor Frank Bezerra da Silva,

que, por indicação do Professor Akinori, gentilmente me autorizou a participar - ainda que de forma remota - das reuniões semanais de seu grupo de pesquisa. Agradeço imensamente pela receptividade, oportunidade e aprendizado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

OLIVEIRA, Fabiano Luiz Dulce de. **Ações da Terapia Fotodinâmica na organização óssea e nas expressões de T-bet em linfócitos Th1 e de iNOS em células osteoblásticas, quando aplicada em defeitos femorais de ratos.** 2025. 82p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Patologia e Ciências Clínicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

O presente estudo investigou o uso da Terapia Fotodinâmica (PDT) nos contextos morfológico, inflamatório e imunológico durante o reparo ósseo em defeitos femorais realizados em ratos Wistar. Foram confeccionados dois defeitos diafisários equidistantes 1,16 cm um do outro, sendo todos aqueles distais, preenchidos por 10 µl do corante azul de metileno (AM) a 0,01%. Parte dos animais foi submetida à irradiação pela Laserterapia de Baixa Intensidade (LLLT) - ArGa, 660 nm, luz vermelha pulsátil, 40 mW e 2,3 J/cm² - por intervalos de tempo distintos (20 s e 90 s), durante a cirurgia e em dias alternados. As análises ocorreram aos sete e 14 dias. Os blocos foram clivados em 4 µm e 5 µm e as lâminas submetidas tanto à imuno-histoquímica para T-bet e iNOS, como à coloração por Hematoxilina e Eosina e *Picrosirius Red*. Nas áreas de neoformação foram avaliados o número de células totais, o colágeno total, a densidade de número de osteócitos e a maturação do tecido ósseo, além das expressões do fator de transcrição T-bet em linfócitos *T-helper 1* e da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em células da linhagem osteoblástica. Amostras de cada grupo também foram avaliadas através de microscopia eletrônica de varredura. Os resultados demonstraram que o grupo LLLT 90 (97,55±7,942; P<0,0005) apresentou redução na contagem total de células em relação ao grupo Defeito ósseo (165,4±12,70), quando avaliado aos sete dias de tratamento, enquanto o grupo LLLT 90 + AM se destacou ao promover redução no número de células totais em ambos os períodos avaliados (113,7±10,21; P<0,0227 / 66,84±7,820; P<0,0001, respectivamente); os defeitos ósseos preenchidos por AM (P<0,0002) e aqueles irradiados por 90 s (p<0,0202) tiveram aumento significativo do colágeno total, quando comparados ao grupo Defeito ósseo, no sétimo dia de avaliação; foi observada redução significativa no número de osteócitos nos grupos LLLT 20 (8,865±4,198; P<0,0001) e LLLT 90 + AM (13,79±0,3622; P<0,0315), quando comparado ao grupo sem tratamento (20,47±1,896), no sétimo dia. A análise de microscopia eletrônica revelou variações na morfologia do tecido neoformado, com áreas com variados graus de porosidade e organização tecidual. Quanto ao número de linfócitos que expressaram T-bet por área de neoformação óssea, o grupo LLLT 90 (9,656±1,482; P<0,0026) foi o único que expressou aumento significativo. Já os grupos LLLT 90 e LLLT 90 + AM tiveram aumento na expressão de iNOS no primeiro período avaliado, sendo esta mais evidente no segundo grupo. Os resultados sugerem que a PDT, com AM, é capaz de promover melhor organização do tecido ósseo ao aumentar a expressão de iNOS em áreas de neoformação óssea de defeitos induzidos no fêmur de ratos Wistar de maneira precoce, no entanto ela não interferiu na expressão do fator de transcrição T-bet.

Palavras-chave: osteoimunologia; inflamação; reparo ósseo.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Fabiano Luiz Dulce de. **Photodynamic Therapy effects on bone organization and T-bet expression in Th1 lymphocytes and iNOS expression in osteoblastic cells when applied to femoral defects in rats.** 2025. 82p. Thesis (Doctorate in Veterinary Medicine). Instituto de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Patologia e Ciências Clínicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

This study investigated the use of photodynamic therapy (PDT) in morphological, inflammatory and immunological contexts during bone repair in femoral defects in Wistar rats. Two equidistant diaphyseal defects, 1.16 cm apart and located distally, were created using 10 µl of 0.01% methylene blue (MB) dye. Some of the animals underwent irradiation with low-level laser therapy (LLLT) – ArGa, 660 nm, pulsed red light at 40 mW and 2.3 J/cm² – for different time intervals (20 and 90 seconds) during surgery and on alternate days. Analyses were performed at seven and 14 days. The blocks were cleaved into sections measuring 4 and 5 µm, and the slides were subjected to immunohistochemistry for T-bet and iNOS, as well as haematoxylin and eosin and picrosirius red staining. In areas of neoformation, we evaluated the total number of cells, total collagen, osteocyte density and bone tissue maturation, as well as the expression of the T-bet transcription factor in T-helper 1 lymphocytes and the inducible nitric oxide synthase (iNOS) enzyme in osteoblastic lineage cells. Samples from each group were also examined using scanning electron microscopy. The results demonstrated that the LLLT 90 group showed a reduction in total cell count (97.55 ± 7.942 ; $P < 0.0005$) compared to the Bone Defect group (165.4 ± 12.70) after seven days of treatment. Meanwhile, the LLLT 90 + AM group stood out by promoting a reduction in the total number of cells in both evaluated periods (113.7 ± 10.21 ; $P < 0.0227$ and 66.84 ± 7.820 ; $P < 0.0001$, respectively). Bone defects filled with AM ($P < 0.0002$) and defects irradiated for 90 seconds ($P < 0.0202$) exhibited a significant increase in total collagen compared to the Bone Defect group after seven days; A significant reduction in the number of osteocytes was observed in the LLLT 20 (8.865 ± 4.198 ; $p < 0.0001$) and LLLT 90 + AM (13.79 ± 0.3622 ; $p < 0.0315$) groups compared to the untreated group (20.47 ± 1.896) on day seven. Electron microscopy analysis revealed variations in the morphology of the newly formed tissue, with areas exhibiting varying degrees of porosity and tissue organization. Regarding the number of lymphocytes expressing T-bet per area of bone neoformation, only the LLLT 90 group (9.656 ± 1.482 ; $p < 0.0026$) showed a significant increase. The LLLT 90 and LLLT 90 + AM groups showed increased iNOS expression during the initial evaluation period, which was more evident in the latter group. These results suggest that photodynamic therapy (PDT) with AM can promote the better organization of bone tissue by increasing iNOS expression in areas of bone neoformation in early-induced defects in the femurs of Wistar rats. However, it does not interfere with the expression of the T-bet transcription factor.

Keywords: osteoimmunology; inflammation; bone repair.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros e características do aparelho laser utilizado nos animais submetidos à PDT e à LLLT, após a confecção dos defeitos ósseos femorais.	37
---	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Principais fases do reparo de fratura apresentadas em três estágios biológicos principais (inflamatório, formação óssea endocondral e remodelamento) que se sobrepõem. Os tipos de células envolvidos em cada estágio, assim como o período de tempo de sua prevalência em cada estágio são indicados na figura. A escala de tempo da consolidação é equivalente à de uma fratura fechada do fêmur de um roedor e estabilizada com implante próprio (Fonte: EINHORN; GERSTENFELD, 2015). 25
- Figura 2.** Divisão dos grupos de acordo com os tratamentos realizados. A - defeitos ósseos monocorticais, equidistantes 1,16 cm um do outro, realizados na face cranial de fêmures direito de ratos Wistar. Todos os defeitos distais foram preenchido com azul de metileno durante o transoperatório; B - delineamento do período de aplicação do laser, durante a cirurgia e a cada 48h. Metade dos animais (n=4) foram eutanasiados no sétimo dia e a outra metade no décimo quarto dia; C - Grupos: Defeito ósseo - defeitos submetidos à simulação da irradiação pelo laser; Azul de metileno - defeitos preenchidos com 10µl de azul de metileno 0,01% e submetidos à simulação da irradiação laser; LLLT 20 - defeitos submetidos à irradiação laser por 20 s durante o trans e pós-operatório; LLLT 20 + AM - defeitos preenchidos com 10µl de azul de metileno 0,01% e submetidos à irradiação laser por 20 s durante o trans e pós-operatório; LLLT 90 - defeitos submetidos à irradiação laser por 90 s durante o trans e pós-operatório; LLLT 90 + AM - defeitos preenchidos com 10µl de azul de metileno 0,01% e submetidos à irradiação laser direta por 90 s durante o trans e pós-operatório. X (pontos de aplicação do laser no período pós-operatório). LLLT (*Low Level Laser Therapy*). AM (azul de metileno). (Fonte: Criado em BioRender.com e elaborado por Fabiano Luiz Dulce de Oliveira). 36
- Figura 3.** Métodos utilizados para obtenção e confecção das amostras histológicas. A - fêmur obtido após a eutanásia, contendo dois defeitos ósseos equidistantes em sua diáfise femoral cranial; B - fixação (formol de cálcio a 10%) e descalcificação (ácido nítrico a 5%); C e D - processo de clivagem (transversal e longitudinal) da amostra; E-I, etapas do processamento histológico; J - secção de tecido ósseo contendo defeitos proximal (α) e distal (β). Osso cortical *cis* (*) e *trans* (**). Medula óssea (***). Áreas de neoformação óssea utilizada para realizar as análises (retângulo amarelo). Locais de capturas das 10 fotomicrografias (círculos azuis). (Fonte: Criado em BioRender.com e elaborado por Fabiano Luiz Dulce de Oliveira).38
- Figura 4.** Sistema de teste de arcos cicloides e pontos de cruzeis (n=16) utilizado na contagem de células totais (*Adaptado de C.A. Mandarin de Lacerda - 2003). 39
- Figura 5.** Imagem do software ImageJ® utilizado para determinar a densidade de número de osteócitos. A) definição da área de neoformação óssea contornada manualmente utilizando a ferramenta “seleção à mão livre”; B) marcação puntiforme manual, utilizando a ferramenta “multiponto”, para determinar o número de osteócitos presentes na mesma área definida em “A”. As áreas foram medidas em µm² a partir de dez fotomicrografias por grupo. Micrografia óptica (400x, H&E). 40
- Figura 6.** Materiais utilizados no protocolo de aquisição de imagens por MEV. A - Aparelho de metalização Leica EM SCD 050 (Leica Microsystems, Bannockburn, IL, EUA); B - Microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 250, modelo 2010; resolução: 3 nm em alto vácuo com HV = 30 kV e um detector de elétrons secundários. Alto vácuo: P <10⁻⁴ mbar. Baixo vácuo: de 0,1 a 1,3 mbar. Tensão de aceleração: de 200 V a 30 kV. Detectores de elétrons secundários e retrodifundidos. 41
- Figura 7.** Número total de células (contagem realizada por estereologia através do sistema de teste de 16 pontos) presentes em defeitos realizados em fêmures de ratos Wistar (*Rattus*

norvegicus) e irradiados pela LLLT durante 90 s, em dias alternados, associada ou não ao AM, aos sete e aos quatorze dias. Grupos: Defeito ósseo - defeitos submetidos à simulação da irradiação laser; Azul de metileno - defeitos preenchidos com 10µl de azul de metileno 0,01% e submetidos à simulação da irradiação laser; LLLT 90 - defeitos submetidos à irradiação laser direta durante o trans e pós-operatório; LLLT 90 + AM - defeitos preenchidos com 10µl de azul de metileno 0,01% e submetidos à irradiação laser direta durante o trans e pós-operatório. Os gráficos apresentam média e desvio padrão. Foi utilizado *one-way* ANOVA seguido pelo teste *post hoc* de Student-Newman-Keuls. Para todos os casos, o nível de significância foi definido em 5%. *P<0,05 comparado ao grupo Defeito ósseo, aos sete dias; **P<0,01 comparado ao grupo Azul de metileno, aos sete dias; ***P<0,001 comparado ao grupo Defeito ósseo, aos sete dias; ****P<0,00001 comparado ao grupo LLLT 90 + AM, aos quatorze dias; α; β; γ P<0,00001, comparado aos grupos Defeito ósseo, Azul de metileno e LLLT 90, aos quatorze dias, respectivamente. n=04/ grupo. LLLT - *Low Level Laser Therapy*. 43

Figura 8. Análise histoquímica utilizando *Picrosirius Red* para avaliar as fibras de colágeno totais nas áreas de neoformação óssea de defeitos realizados em fêmures de ratos Wistar após LLLT associada ou não ao AM, sete e quatorze dias após o procedimento. Grupos: Defeito ósseo - defeitos submetidos à simulação da irradiação laser; Azul de metileno - defeitos preenchidos com 10µl de azul de metileno 0,01% e submetidos à simulação da irradiação laser; Grupo LLLT 90: defeitos submetidos à irradiação a laser por 90 segundos; LLLT 90 + MB: defeitos preenchidos com 10 µL de azul de metileno a 0,01% e submetidos à irradiação a laser direta por 90 segundos. LLLT (*Low Level Laser Therapy*). n=04/grupo Magnificação original: 400x / Escala da barra: 100 µm. 44

Figura 9. Detalhe das fibras colágeno em áreas de neoformação óssea de defeitos realizados em fêmures de ratos Wistar após LLLT associada ou não ao AM, sete e quatorze dias após o procedimento, utilizando lâminas coradas com *Picrosirius Red* sob luz polarizada (vermelho brilhante). Grupos: Defeito ósseo - defeitos submetidos à simulação da irradiação laser; Azul de metileno - defeitos preenchidos com 10µl de azul de metileno 0,01% e submetidos à simulação da irradiação laser; LLLT 90 - defeitos submetidos à irradiação laser; LLLT 90 + AM - defeitos preenchidos com 10µl de azul de metileno 0,01% e submetidos à irradiação laser. LLLT (*Low Level Laser Therapy*). n=04/grupo. Magnificação original: 400x / Escala da barra 100µm. 44

Figura 10. Quantidade total de colágeno por área de matriz óssea presente em defeitos ósseos realizados no fêmur de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) e tratados pela LLLT (luz vermelha pulsátil, 660nm, 40mW, aplicada por 90 s), associada ou não ao AM, aos sete (A) e quatorze (B) dias. Grupos: Defeito ósseo - defeitos submetidos à simulação da irradiação laser; Azul de metileno - defeitos preenchidos com 10µl de azul de metileno 0,01% e submetidos à simulação da irradiação laser; LLLT 90 - defeitos não preenchidos e submetidos à irradiação laser no trans e pós-operatórios; LLLT 90 + AM - defeitos preenchidos com 10µl de azul de metileno 0,01% e submetidos à irradiação laser no trans e pós-operatórios. Os gráficos apresentam média e desvio padrão. Foi utilizado *one-way* ANOVA seguido pelo teste *post hoc* de comparação múltipla de Dunnett. Para todos os casos, o nível de significância foi definido em 5%. **P<0,01 comparado ao grupo controle. n=04/grupo. LLLT (*Low Level Laser Therapy*). 45

Figura 11. Fotomicrografias óptica de áreas de neoformação óssea em defeitos ósseos femorais realizados em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos de 90 dias, após sete e quatorze dias do procedimento cirúrgico e tratados pela LLLT (irradiados por 20 s e 90 s, em dias alternados), associada ou não ao AM. Análises estereológicas foram utilizadas para avaliar a densidade de número de osteócitos (setas pretas) dos diferentes grupos e compará-las ao grupo Controle. A) Controle (osso íntegro maduro); B) Defeito ósseo (7d); C) Azul de

metileno (7d); D) LLLT 20 (7d); E) LLLT 20 + AM (7d); F) LLLT 90 (7d); G) LLLT 90 + AM (7d); H) Defeito ósseo (14d); I) Azul de metileno (14d); J) LLLT 20 (14d); K) LLLT 20 + AM (14d); L) LLLT 90 (14d); M) LLLT 90 + AM (14d). n=04/grupo. Magnificação original: 400x / Escala da barra: 100 μ m. 46

Figura 12. Número de osteócitos por área óssea neoformada (μ m² x 10⁶) comparado a de um osso maduro, no processo de reparo em defeitos realizados no fêmur direito de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos de 90 dias, após sete e quatorze dias do procedimento cirúrgico e tratados pela LLLT (irradiados por 20 s e 90 s, em dias alternados), associada ou não ao AM. Grupos: Defeito ósseo - defeitos submetidos à simulação da irradiação pelo laser; Azul de metileno - defeitos preenchidos com 10 μ l de azul de metileno 0,01% e submetidos à simulação da irradiação laser; LLLT 20 - defeitos submetidos à irradiação laser por 20 s durante o trans e pós-operatório; LLLT 20 + AM - defeitos preenchidos com 10 μ l de azul de metileno 0,01% e submetidos à irradiação laser por 20 s durante o trans e pós-operatório; LLLT 90 - defeitos submetidos à irradiação laser direta por 90 s durante o trans e pós-operatório; LLLT 90 + AM - defeitos preenchidos com 10 μ l de azul de metileno 0,01% e submetidos à irradiação laser direta por 90s durante o trans e pós-operatório. Os valores dos gráficos apresentam média e desvio padrão. Foi utilizado *one-way* ANOVA seguido pelo teste post hoc de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls. Para todos os casos, o nível de significância foi definido em 5%. ##### p<0,0001 comparado ao grupo Controle, aos sete dias; * p<0,01 comparado ao grupo Defeito Ósseo, aos sete dias; **** p<0,0001 comparado ao grupo Defeito Ósseo, aos sete dias; ^a p<0,01 comparado ao LLLT 20 aos sete dias; ^{$\beta\beta$} p<0,001 comparado ao grupo Defeito Ósseo aos sete dias; ^{$\beta\beta\beta$} p<0,0001 comparado ao grupo Defeito Ósseo aos sete dias; ^{$\beta\beta\beta\beta$} p<0,0001 comparado ao grupo Defeito Ósseo aos sete dias; ^{aaa} p<0,0001 comparado ao grupo controle, aos quatorze dias; ^{aaa} p<0,00 comparado ao grupo controle, aos quatorze dias. n=04/grupo. LLLT - *Low Level Laser Therapy*. 47

Figura 13. Imagens de microscopia eletrônica de varredura, em diferentes aumentos (120x, 1k, 3k e 5k) de fêmures de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos de 90 dias. A - Osso cortical maduro sem qualquer tipo de tratamento. Nota-se as lamelas ósseas organizadas paralelamente, entremeadas por lacunas (#####) contendo osteócitos (seta branca) e canais isolados contendo vasos sanguíneos (círculo amarelo); (B) áreas de reparo ósseo em defeitos experimentais realizados com broca de 2 mm de diâmetro, em períodos distintos (sete e 14 dias). Grupos: Defeito ósseo - defeitos submetidos à simulação da irradiação laser; Azul de metileno - defeitos preenchidos por 10 μ l de azul de metileno 0,01% e submetidos à simulação da irradiação laser; LLLT 20 - defeitos submetidos à irradiação laser, durante 20 s; LLLT 20 + AM - defeitos preenchidos por 10 μ l de azul de metileno 0,01% e submetidos à irradiação laser, durante 20 s; LLLT 90 - defeitos submetidos à irradiação laser, durante 90 s; LLLT 90 + AM - defeitos preenchidos por 10 μ l de azul de metileno 0,01% e submetidos à irradiação laser, durante 90 s. Diferentes formações são observadas em relação ao desenvolvimento ósseo neoformado (# - fibroso; ## - intermediário; ### - avançado) nos diferentes grupos tratados. LLLT (*Low Level Laser Therapy*); *(centro do defeito ósseo); retângulos (áreas delimitadas analisadas no maior aumento). n=04/grupo. 48

Figura 14. Análise imuno-histoquímica da expressão do fator de transcrição T-bet em linfócitos presentes nas áreas de reparo ósseo, em defeitos realizados no fêmur direito de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos de 90 dias, após sete dias do procedimento cirúrgico, tratados pela LLLT (aplicação de 90 s, em dias alternados), associada ou não ao AM. Após identificação dos linfócitos, aqueles que apresentaram marcação nuclear de coloração castanha-amarronzada (setas pretas), indicando positividade ao cromógeno diaminobenzidina 3,3' - DAB, foram quantificados; diferentemente daqueles que não apresentaram marcação (setas azuis). Grupos: Defeito ósseo - defeitos submetidos à

simulação da irradiação laser; Azul de metileno - defeitos preenchidos com 10µl de azul de metileno 0,01% e submetidos à simulação da irradiação laser; Grupo LLLT 90 - defeitos submetidos à irradiação laser; LLLT 90 + AM - defeitos preenchidos com 10µl de azul de metileno 0,01% e submetidos à irradiação laser. LLLT (*Low Level Laser Therapy*). n=04/ grupo. (Magnificação original: 1000x / Escala da barra 20µm).49

Figura 15. Resultados da expressão do fator de transcrição T-bet em linfócitos presentes nas áreas de reparo ósseo, em defeitos realizados no fêmur direito de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos de 90 dias, após sete dias do procedimento cirúrgico, tratados pela LLLT (aplicação de 90 s, em dias alternados), associada ou não AM. Grupos: Defeito ósseo - defeitos submetidos à simulação da irradiação laser; Azul de metileno - defeitos preenchidos com 10µl de azul de metileno 0,01% e submetidos à simulação da irradiação laser; Grupo LLLT 90 - defeitos submetidos à irradiação laser; LLLT 90 + AM - defeitos preenchidos com 10µl de azul de metileno 0,01% e submetidos à irradiação laser. São representados os valores das médias e desvios-padrão de cada grupo. Foi utilizado ANOVA unidirecional seguida pelo teste post hoc de Kruskal-Wallis. Em todos os casos, os níveis de significância foram definidos em 5%. **P<0,01 comparado ao grupo Defeito ósseo. LLLT (*Low Level Laser Therapy*). n=04/ grupo. 50

Figura 16. Análise imuno-histoquímica da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em células da linhagem osteoblástica presentes nas áreas de reparo ósseo, em defeitos realizados no fêmur direito de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos de 90 dias, após sete dias do procedimento cirúrgico, tratados pela LLLT (aplicação de 90 s, em dias alternados), associada ou não ao AM. Foram quantificados osteoblastos e osteócitos corados em marrom indicando positividade ao cromógeno diaminobenzidina 3,3' – DAB (seta preta). Grupos: Defeito ósseo - defeitos submetidos à simulação da irradiação laser; Azul de metileno - defeitos preenchidos com 10µl de azul de metileno 0,01% e submetidos à simulação da irradiação laser; Grupo LLLT 90 - defeitos submetidos à irradiação laser; LLLT 90 + AM - defeitos preenchidos com 10µl de azul de metileno 0,01% e submetidos à irradiação laser. LLLT (*Low Level Laser Therapy*). n=04/ grupo. Magnificação original: 400x / Escala da barra 100µm. 51

Figura 17. Expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em células da linhagem osteoblástica presentes nas áreas de reparo ósseo de defeitos realizados no fêmur direito de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos de 90 dias, após sete dias do procedimento cirúrgico e tratados pela LLLT (aplicação de 90 s, em dias alternados), associada ou não ao AM. A - Foram quantificados osteoblastos e osteócitos corados em marrom indicando positividade ao cromógeno diaminobenzidina 3,3' - DAB. Grupos: Defeito ósseo - defeitos submetidos à simulação da irradiação laser; Azul de metileno - defeitos preenchidos com 10µl de azul de metileno 0,01% e submetidos à simulação da irradiação laser; Grupo LLLT 90 - defeitos submetidos à irradiação laser; LLLT 90 + AM - defeitos preenchidos com 10µl de azul de metileno 0,01% e submetidos à irradiação laser. B - Os São representados os valores das médias e desvios-padrão de cada grupo. Foi utilizado ANOVA unidirecional seguida pelo teste post hoc de Kruskal-Wallis. Em todos os casos, os níveis de significância foram definidos em 5%. **P<0,01 comparado ao grupo Defeito ósseo. LLLT - Low Level Laser Therapy. n=04/grupo. 52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM	Azul de Metileno
ATF	Fatores de transcrição ativadores
ATP	Adenosina trifosfato
BMP	Proteínas morfogenéticas ósseas
CBR	Centro de Bioterismo Regional
CCL2	Ligante de quimiocina do motivo CC específico 2
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DAB	Diaminobenzidina
FGF	Fatores de crescimento de fibroblastos
GaAs	Arseneto de Gálio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IL	Interleucina
IFN- γ	Interferon gama
JNK	Cinase N-terminal c-Jun
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
LASER	Amplificação de luz por emissão estimulada de radiação
LED	Diodo emissor de luz
LLLT	Laserterapia de Baixa Intensidade
M-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos
MEC	Matriz extracelular
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mg / kg	Miligrama por quilo
mW	Milivolts
MSC	Células-tronco mesenquimais
M1	Macrófago polarizado do tipo 1
M2	Macrófago polarizado do tipo 2
NFATc1	Fator nuclear de células T ativadas, citoplasmático 1
NF- κ B	Fator nuclear kappa-B
nm	Nanômetro
Nv	Densidade numérica
OPG	Osteoprotegerina
OSTERIX	Fator de transcrição Sp7
PBS	Solução salina tamponada com fostato
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PGE2	Prostaglandina E2
PPGMV	Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
RANK	Ativador do receptor do fator nuclear κ B
RANKL	Ligante do ativador do receptor do fator nuclear κ B
Runx-2	Gene do fator de transcrição relacionado ao <i>Runt</i>
T-bet	Fator de transcrição T-bet
T CD4 ⁺	Linfócitos T <i>auxiliares</i>
PDT	Terapia Fotodinâmica
TGF- β	Fator de crescimento tumoral- β
Th1	Linfócitos T auxiliares 1
Th2	Linfócitos T auxiliares 2
Th17	Linfócitos T auxiliares 17

TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
Treg	Linfócito T regulatório
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
Wnt	Via de sinalização Wnt

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 O Tecido Ósseo	21
2.1.1 Componentes celulares	21
2.1.2 Aspectos gerais sobre a fisiopatologia óssea	23
2.1.2.1 Fase inflamatória	23
2.1.2.2 Fase angio-mesenquimal	24
2.1.2.3 Fase de reparo	24
2.1.2.4 Fase de remodelamento	25
2.2 Visão Geral Sobre as Fraturas	25
2.3 A Osteoimunologia e o Reparo do Tecido Ósseo	26
2.4 Óxido Nítrico	27
2.5 Modelos Experimentais de Lesão Óssea	29
2.6 Tipos de Lesão Óssea	29
2.7 O Fêmur Como Modelo de Lesão Óssea	29
2.8 O Modelo Wistar	30
2.9 Laserterapia de Baixa Intensidade	30
2.9.1 Mecanismo de ação	31
2.9.2 Ações da LLLT nos tecidos	31
2.10 Terapia Fotodinâmica	32
2.10.1 Mecanismo de ação	33
2.10.1.1 Mecanismo tipo I	33
2.10.1.2 Mecanismo tipo II	33
2.10.2 Fotossensibilizadores	33
2.10.2.1 Azul de metileno	33
2.10.3 A PDT no tecido ósseo	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Grupos Experimentais	35
3.2 Análises Histológicas, Histomorfométricas e Estereológicas	37
3.2.1 Contagem de células totais	38
3.2.2 Fibras colágenas	39
3.2.3 Densidade numérica de osteócitos	39
3.3 Imuno-Histoquímica	40
3.4 Captura das Imagens	41
3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura	41
3.6 Análise Estatística	42
4 RESULTADOS	43
5 DISCUSSÃO	53
6 CONCLUSÃO	60
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais	79
ANEXO B - Protocolo de coloração Picrosirius Red do Laboratório de Imunopatologia e Patologia Experimental do Centro de Bioterismo Regional da UFJF	80
ANEXO C - Protocolo de imuno-histoquímica do Laboratório de Imunopatologia e Patologia Experimental do Centro de Bioterismo Regional da UFJF	81

1 INTRODUÇÃO

A descontinuidade do tecido ósseo - seja por complicações de uma fratura primária, patológica ou reabsorções - é uma situação que envolve comumente as áreas da ortopedia e da odontologia. Por comungarem de situações semelhantes, diversos são os profissionais destas áreas que buscam por um método seguro e eficaz, capaz de favorecer a antecipação e melhorar a organização tecidual durante o processo de reparo ósseo, a fim de os auxiliarem na sequência do tratamento proposto junto a seus pacientes, o que aumenta, consequentemente, o sucesso terapêutico. Esta constante pesquisa por métodos alternativos é também impulsionada por limitações relacionadas ao método tido como “padrão-ouro” de auxílio a este processo - utilização do enxerto autólogo córtico-esponjoso - que apresenta: (1) dificuldade na coleta em pacientes idosos, por normalmente apresentarem sítios ósseos doadores rígidos; (2) coleta de volume limitado; (3) necessidade de nova abordagem trans cirúrgica - o que promove aumento do período anestésico, da dor pós-operatória, da morbidade, do período de internamento, de custos, além de maiores riscos a infecções (SCHMIDT, 2021); (4) além da variabilidade de sua eficácia devido a discrepância da concentração e composição das células osteoprogenitoras e imunológicas que o compõe (MURAYAMA *et al.*, 2024). Alternativas encontradas para contornar estas dificuldades ainda continuam a serem testadas através de diversos tipos de biomateriais. No entanto estes apresentam variabilidade quanto a custos, formas de obtenção e resultados em seus potenciais de osteointegração, oste condução e osteoindução (SEN; MICLAU, 2007; GILLMAN; JAYASURIYA, 2021), embora haja uma tendência na melhoria dos resultados quando novos materiais são testados (LI *et al.*, 2024). Independentemente do material analisado, vê-se constantemente a necessidade de compreensão da interação de cada agente na regulação da resposta imunológica, assim como seu envolvimento na eficácia de sua ação frente ao reparo do tecido ósseo.

Reconhecidamente utilizada em diversas áreas da saúde - como medicina, fisioterapia, odontologia e medicina veterinária - a Laserterapia de Baixa Intensidade ou “*Low Level Laser Therapy*” (LLLT) é um recurso terapêutico simples, barato e indolor, que apresenta efeitos positivos em diferentes tipos de tecido. No que diz respeito à sua ação no reparo do tecido ósseo, este método é capaz de atuar nos estágios iniciais do processo de reparo (BATISTA *et al.*, 2015; MARQUES *et al.*, 2015) promovendo o aumento no número de osteócitos (SCALIZE *et al.*, 2019), melhorando a cicatrização e a mineralização óssea (RIBEIRO *et al.*, 2022), favorecendo a consolidação de fraturas e lesões não consolidadas (SELLA *et al.*, 2015), tanto de maneira isolada quanto associada a outros métodos (AKYOL *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2022), beneficiando, inclusive, a osteointegração de implantes ao osso (OLIVEIRA *et al.*, 2020; FONSECA *et al.*, 2022).

Quando associada a um corante fotossensível de baixa toxicidade disponibilizado sobre um tecido biológico, os fótons de luz provenientes da LLLT dão origem a outra modalidade terapêutica, a Terapia Fotodinâmica ou “*Photodynamic Therapy*” (PDT) - classicamente utilizada no controle de microorganismos e de neoplasias (AGOSTINIS *et al.*, 2011; REDDY *et al.*, 2012; ROSA; DA SILVA, 2014; SELLERA *et al.*, 2014) - a qual foi utilizada no presente estudo, para investigar sua ação no reparo do tecido ósseo. Embora com dados ainda limitados, evidências recentes sugerem que uma vez utilizada neste tecido, a PDT, quando aplicada *in vitro*, é capaz de alterar a atividade anabólica de osteoblastos, ao promover aumento na atividade da fosfatase alcalina (ATES *et al.*, 2017) e melhorar a mineralização pelos osteoblastos existentes (ATES *et al.*, 2018). Além disso, quando aplicada em defeitos ósseos no fêmur de ratos Wistar, a PDT aumenta a área de neoformação óssea em defeitos induzidos

no fêmur de ratos Wistar, sendo, inclusive, capaz de promover aumento na percepção da radiopacidade, quando realizada no período trans operatório e seguida de sessões de LLLT em dias alternados (OLIVEIRA *et al.*, 2022).

O microambiente inflamatório associado a lesões ósseas traumáticas é o fator determinante na coordenação das células presentes nos sistemas ósseo e imunológico e está diretamente envolvido ao longo das fases do reparo ósseo, sendo a medula óssea o órgão central responsável por esta interação (ARRON; CHOI, 2000; ARBOLEYA; CASTAÑEDA, 2013). Apesar dos avanços na área da osteoimunologia, a avaliação dos efeitos de terapias moduladoras sobre a inflamação e a resposta imunológica durante o processo de reparo ósseo ainda não se encontra elucidada.

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo investigar se a utilização da LLLT, associada ao corante azul de metileno (AM), foi capaz de promover modificação das características estruturais da matriz óssea - como o número de células totais, o volume de colágeno, o número de osteócitos e o paralelismo trabecular - e das expressões do fator de transcrição T-bet em linfócitos T-*helper* 1 e da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em células da linhagem osteoblástica, em áreas de neoformação óssea após a indução de defeitos diafisários femorais em ratos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Tecido Ósseo

O tecido ósseo se caracteriza por apresentar material extracelular proteico impregnado por componentes inorgânicos que, juntos, formam uma matriz mineralizada. Além disso, ele também é composto por vasos sanguíneos que se intercomunicam no interior da matriz e que juntos a seus componentes celulares metabolicamente ativos, auxiliam na regulação da fisiologia local e sistêmica (ANDIA *et al.*, 2006; AARESTRUP, 2012; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2023). Sua matriz extracelular (MEC) é uma estrutura altamente organizada que atua ativamente na homeostase mineral e na regulação celular do microambiente esquelético. Ela é composta por dois componentes principais: a porção orgânica e a porção inorgânica (FLORENCIO-SILVA *et al.*, 2015).

A porção orgânica corresponde a 35% da MEC e é compreendida por pequena quantidade de proteoglicanos, glicoproteínas, proteínas colágenas, proteínas não colágenas e lipídeos (ANDRADE *et al.*, 2007). As proteínas não colágenas, são representadas por: osteonectina, osteocalcina, sialoproteína, osteopontina, osteoprotegerina, fosfatase alcalina óssea (FA-ó), proteínas da matriz dentinária 1 (DMP1) e proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) (MARTINEZ *et al.*, 2009; SUN *et al.*, 2015). Quanto as proteínas colágenas, os feixes de colágeno tipo I representam 90% deste constituinte, sendo uma molécula composta por três cadeias de aminoácidos entrelaçadas, para a qual a forma hidroxilada do aminoácido - hidroxiprolina - apresenta extensas ligações cruzadas escalonadas em um arranjo específico. Essa disposição permite que minerais possam ser depositados entre seus feixes, levando rigidez e elasticidade para o osso, permitindo resistência à fratura e maleabilidade ao tecido (RAGGATT; PARTRIDGE, 2010; ALFORD *et al.*, 2015). Além disso, o colágeno tipo I tem uma importante função durante o processo de reparo ósseo e é especialmente depositado nos tecidos de granulação por células fibroblásticas e osteoblásticas (VOLK *et al.*, 2014). As fibras colágenas são birrefringentes quando observadas no plano apropriado sob luz polarizada; lamelas alternadas polarizam-se quando visualizadas no mesmo plano. O padrão alternado de birrefringência demonstra a disposição paralela das camadas de colágeno, principalmente no osso lamelar (ZACHARY, 2018). Há evidências de que a presença de desta proteína durante o processo de reparo é responsável pela organização do osso trabecular primário e do osso maduro (KRUGER *et al.*, 2013).

De maneira complementar, a porção inorgânica representa 65% da MEC e é composta em sua maior parte por fosfato de cálcio organizado em cristais de hidroxiapatita - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ - além de outros íons em proporções menores, como: magnésio, bicarbonato, sódio, potássio, manganês, zinco, cobre e fluoreto. Todos estes componentes se associam quimicamente à porção orgânica permanecendo distribuídos entre os feixes de colágeno. A mineralização é resultado da deposição desses sais minerais, ocorrendo pela precipitação de hidroxiapatita em vesículas liberadas por osteoblastos entre as fibrilas de colágeno, sendo um processo essencial para rigidez e função mecânica, promovendo resistência à deformação (ANDIA *et al.*, 2006; ANDRADE *et al.*, 2007).

2.1.1 Componentes celulares

As células do tecido ósseo provêm de duas linhagens distintas: uma mesenquimal, que dá origem às células osteoblásticas, responsável pela osteogênese e composta por células-tronco mesenquimais (MSC's), osteoblastos e osteócitos; e outra hematopoiética, relacionada à

reabsorção do tecido ósseo mineralizado e representada pelos osteoclastos (LE *et al.*, 2018).

As MSC's constituem uma fração muito pequena - 0,001% a 0,01% - das células nucleadas presentes na medula óssea. Elas se diferenciam por sinais moleculares que ativam vias específicas de transcrição, a partir das quais poderão dar origem a outras linhagens celulares, como fibroblastos, adipócitos, condroblastos e mioblastos. A participação deste tipo celular no processo de reparo ósseo ocorre quando elas recebem estímulos provenientes do Fator de crescimento transformador beta (TGF- β), da Proteína morfogenética óssea (BMP) e de proteínas da família WNT, se diferenciando em células osteoblásticas precursoras - osteoprogenitoras - que, consequentemente, darão origem aos osteoblastos. Além deste potencial, as MSC's influenciam macrófagos e células T secretando fatores parácrinos e vesículas extracelulares, contribuindo assim para a formação óssea (MOTA *et al.*, 2008; ITO, 2011).

Os osteoblastos são células essenciais na formação e manutenção do tecido ósseo, pois sintetizam a parte orgânica da matriz extracelular e iniciam o processo de mineralização. Eles são encontrados nas superfícies ósseas ativamente envolvidas na formação óssea - como no periósteo, endósteo, trabéculas e canais intra-corticais. Morfologicamente, são células de formato cúbico ou cilíndrico, apresentando citoplasma abundante, retículo endoplasmático rugoso rico, aparelho de Golgi proeminente, com núcleo intensamente basofílico e redondo, além de numerosas mitocôndrias. Durante a fase ativa, estas células depositam o “osteóide”, - matriz orgânica não mineralizada composta por proteínas colágenas e não-colágenas, que posteriormente será mineralizada. Alguns osteoblastos inativos permanecem aderidos à superfície óssea - como células de revestimento, apresentando-se achatados e com citoplasma escasso - até serem estimulados por processos fisiológicos de remodelamento - como na homeostase óssea - ou patológicos - como na consolidação de fraturas; enquanto outros podem sofrer apoptose (LORENZO *et al.*, 2008; ZHAO *et al.*, 2022).

Outras características dos osteoblastos é sua participação na homeostase de cálcio por meio da secreção de fosfatase alcalina - marcador de atividade osteoblástica - e osteocalcina - proteína envolvida na regulação da mineralização. Além disso eles também participam, de forma indireta, da reabsorção óssea, sinalizando aos osteoclastos em resposta a estímulos mecânicos ou hormonais, em um sistema regulado por diversas vias moleculares como: WNT, Notch, Indian Hedgehog (IHH) e BMP (DAR *et al.*, 2018).

Os fatores transcricionais reguladores dos osteoblastos são: RUNX2, gene mestre da osteoblastogênese; OSTERIX, essencial para a maturação osteoblástica; e fatores de transcrição ativadores (ATF's), que atuam em diferentes etapas da diferenciação (NAKASHIMA *et al.*, 2002; FLORENCIO-SILVA *et al.*, 2015).

À medida em que vão produzindo osteóide, os osteoblastos afastam-se uns dos outros e acabam se envolvendo e se aprisionando no próprio material por eles produzidos, dando origem aos osteócitos. Estes representam a população celular mais numerosa do tecido ósseo, possuem maior longevidade e se caracterizam por serem células achatadas, com núcleo de cromatina condensada, pouco retículo endoplasmático rugoso e aparelho de Golgi discreto, denotando, equivocadamente, baixa atividade metabólica. Os osteócitos são essenciais para a manutenção da matriz óssea e homeostase mineral (ARBOLEYA; CASTAÑEDA, 2013; ZHAO *et al.*, 2022). Eles permanecem unidos por seus prolongamentos citoplasmáticos, formando uma rede de conexão fundamental para o metabolismo ósseo. Desta forma, podem desempenhar funções de mecanotransdução e manutenção viabilizando a troca de pequenas moléculas, íons e hormônios com outras células da mesma linhagem, assim também como com o sangue, sendo esta, uma marcante característica deste tipo celular (MOTA *et al.*, 2008; FLORENCIO-SILVA *et al.*, 2015). Além disso, os osteócitos também se encontram atrelados a outras funções, como: (a) no desempenho de respostas a estímulos pressóricos e sensoriais no osso, adaptando a matriz

a diferentes cargas mecânicas e contribuindo para o remodelamento ósseo local e sistêmico; (b) na regulação da atividade osteoblástica e osteoclástica, e; (c) na manutenção da viabilidade da matriz óssea e na resposta a estímulos regenerativos, coordenando o microambiente ósseo local (ANDIA *et al.*, 2006; ANDRADE *et al.*, 2007).

O quarto tipo celular envolvido no tecido ósseo - o osteoclasto - se origina de precursores da linhagem fagocitária mononuclear provenientes das células-tronco hematopoiéticas da medula óssea - que também dão origem aos macrófagos. Ao entrarem em contato com o tecido ósseo, seus precursores sofrem união - sincício - conferindo-lhes sua característica peculiar de serem, quando maduras, células gigantes multinucleadas. Seu citoplasma é acidófilo, rico em mitocôndrias, lisossomos e vesículas acidificadas, sendo responsáveis por realizarem a reabsorção da MEC mineralizada (ARBOLEYA; CASTAÑEDA, 2013; PONZETTI; RUCCI, 2019).

A osteoclastogênese é um processo regulado por fatores produzidos por osteoblastos, como o Fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) e o Ligante do receptor ativador NF- κ B (RANKL). O M-CSF estimula a sobrevivência e proliferação dos precursores osteoclásticos; enquanto o RANKL liga-se ao receptor ativador NF- κ B (RANK) na membrana dos precursores osteoclásticos, ativando vias intracelulares como: Fator nuclear kappa-B (NF- κ B), Fator nuclear de células T ativadas, citoplasmático 1 (NFATc1) e JNK, que induzem a maturação e ativação dos osteoclastos (TEITELBAUM; ROSS, 2003). No entanto, este processo pode ser regulado negativamente pela OPG - secretada pelos osteoblastos - que se liga ao RANKL impedindo sua interação com RANK, e consequentemente, inibindo a osteoclastogênese (ANDIA *et al.*, 2006).

2.1.2 Aspectos gerais sobre a fisiopatologia óssea

O reparo do tecido ósseo é reconhecido como um processo genuinamente regenerativo, pois seu resultado final resulta em uma área lesionada completamente restabelecida (FAZZALARI, 2011). Este processo encontra-se mais bem definido em camundongos e ratos - nos quais nos baseamos - devido à ampla utilização destes em experimentos relacionados ao tema. Sabe-se que o intervalo de tempo médio suficiente para que haja completa consolidação de uma fratura fechada do fêmur desses animais é em torno de 28 dias (CLAES *et al.*, 2012, EINHORN; GERSTENFELD, 2015).

Dois mecanismos distintos poderão ocorrer neste processo: (1) uma renovação direta - ossificação primária ou intramembranosa - onde células da linhagem mesenquimal são recrutadas, ativadas e promovem a deposição de matriz óssea com mínima formação de calo ósseo, sendo este tipo de consolidação característico de situações nas quais as extremidades fraturadas são alinhadas e rigidamente fixadas com implantes, impedindo movimentação relativa entre os fragmentos, consequentemente, inibindo a agudização da resposta inflamatória; e, um outro mecanismo (2), mais complexo que ocorre de forma indireta, com diferentes fases sucessivas (Figura 1) - ossificação secundária ou endocondral - na qual a participação de células imunes desempenha papel crucial no andamento deste processo (LOI *et al.*, 2016), e falhas na regulação inflamatória podem comprometer a consolidação, vejamos:

2.1.2.1 Fase inflamatória

Após a ocorrência de uma fratura, vasos sanguíneos adjacentes ao osso são rompidos, desencadeando um processo inflamatório agudo local - com vasodilatação e exsudação de plasma - que persiste durante os primeiros sete dias após o trauma (KOLAR *et al.*, 2010; MARSELL; EINHORN, 2011; CLAES, 2012). A partir daí diversos fatores pró-inflamatórios

e de crescimento, incluindo o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucinas, como IL-1, IL-6, IL-11 e IL-18 são liberados (RUNDLE *et al.*, 2006; FAZZALARI, 2011). Concomitantemente, o fibrinogênio é convertido em fibrina pelas plaquetas, favorecendo a formação de um coágulo - marcado por um ambiente hipóxico e de pH baixo - funcionando como um arcabouço (*scaffold*) para a migração de células inflamatórias e citocinas pró-inflamatórias. Os neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas, seguidas por macrófagos - de maior longevidade e participação no processo - que são recrutados pelos próprios neutrófilos ao secretarem quimiocinas - CCL2 e IL-6. Ambos atuam como agentes fagocitários de micro detritos e patógenos presentes na área lesada (SCHETT, 2011). Além disso, estes componentes também promovem a atração e a diferenciação de células T virgens que, a depender do meio em que se encontram, influenciam diretamente as etapas seguintes.

2.1.2.2 Fase angio-mesenquimal

Sendo classificada por alguns autores como uma subdivisão da fase anterior (WANG *et al.*, 2013), nesta etapa, há uma marcante expressão de fatores de crescimento, tais como: fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), os quais desempenham papel fundamental na indução da angiogênese e na transformação da matriz cartilaginosa avascular em tecido ósseo vascularizado. Especificamente, o VEGF - expresso por células endoteliais, macrófagos e condrócitos hipertróficos - estimula a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existente, promovendo a revascularização do foco de fratura, além de favorecer a proliferação celular e a agregação de células-tronco endoteliais (YUN *et al.*, 2010). A angiogênese contribui para o início da restauração dos níveis normais de oxigênio na área lesionada, facilita a chegada de mais células fagocitárias e assegura o suprimento local de mediadores inflamatórios (MOUNTZIARIS; MIKOS, 2008; DIMITRIOU *et al.*, 2011).

2.1.2.3 Fase de reparo

Iniciada entre sete e 10 dias após a fratura, esta fase caracteriza-se pela proliferação e diferenciação de MSC em condroblastos, inicialmente, e osteoblastos, posteriormente (MOUNTZIARIS; MIKOS, 2008; DIMITRIOU *et al.*, 2011). A formação do tecido cartilaginoso - ossificação endocondral - ocorre em regiões com baixo suprimento sanguíneo, onde a tensão mecânica reduz a angiogênese e a baixa oxigenação favorece a proliferação e diferenciação de condroblastos (CLAES *et al.*, 2002). Após 10 a 14 dias, os condroblastos entram em fase de hipertrofia, secretam cálcio e sofrem apoptose (EINHORN, 2005; PHILLIPS, 2005). A cartilagem inicial por eles produzida reduz a movimentação interfragmentária permitindo a invasão da cartilagem por vasos sanguíneos (CLAES *et al.*, 2002; MELNYK *et al.*, 2008). Tal invasão promove o recrutamento de macrófagos e MSC, que, posteriormente se diferenciam em osteoclastos e em osteoblastos, respectivamente, preenchendo as lacunas vazias (EINHORN, 2005). A região fraturada ainda apresenta baixa resistência mecânica (CLAES *et al.*, 2011), entretanto, paralelamente, se inicia o reparo ósseo no canal medular, o que indica que a consolidação eficaz está se iniciando (CLAES *et al.*, 2002). Ao final dessa etapa, a cartilagem é completamente substituída por tecido ósseo calcificado (MOUNTZIARIS; MIKOS, 2008; FAYAZ *et al.*, 2011).

2.1.2.4 Fase de remodelamento

A fase de remodelamento ósseo marca o estágio final do processo de consolidação de fraturas, sendo caracterizada pela substituição do osso imaturo neoformado, por osso lamelar bem-organizado, por meio da atividade coordenada de osteoblastos e osteoclastos (MARSELL; EINHORN, 2011). À medida que a remodelamento avança, o tecido cortical é gradualmente reorganizado por meio da formação de ósteons, em um mecanismo que se assemelha à consolidação óssea primária (GERSTENFELD *et al.*, 2003; RUNDLE *et al.*, 2006). O número de vasos sanguíneos reduz-se progressivamente, retornando a padrões semelhantes aos do tecido ósseo não lesado (MELNYK *et al.*, 2008).

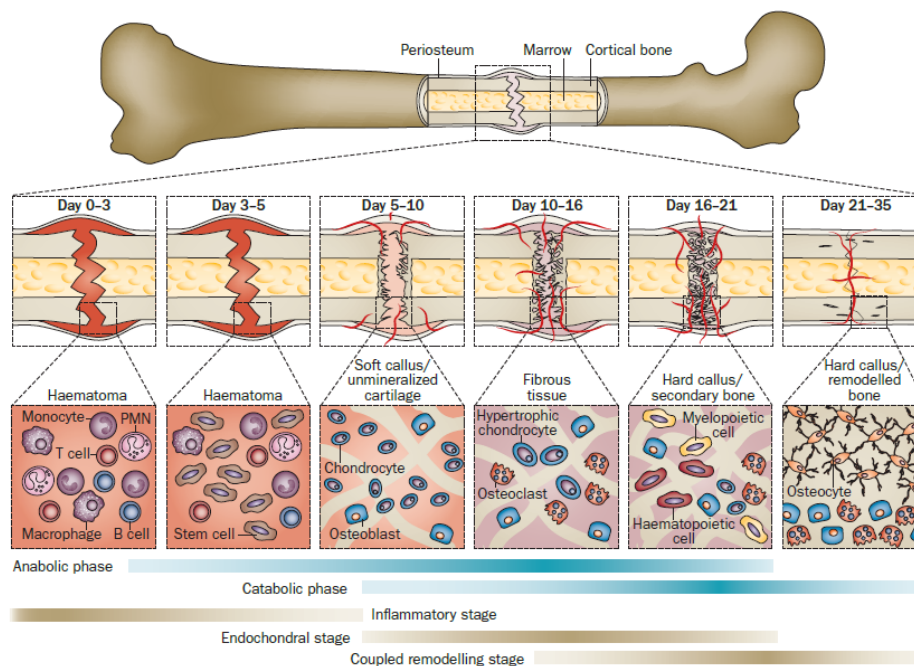


Figura 1. Principais fases do reparo de fratura apresentadas em três estágios biológicos principais (inflamatório, formação óssea endocondral e remodelamento) que se sobrepõem. Os tipos de células envolvidos em cada estágio, assim como o período de tempo de sua prevalência em cada estágio são indicados na figura. A escala de tempo da consolidação é equivalente à de uma fratura fechada do fêmur de um roedor e estabilizada com implante próprio (Fonte: EINHORN; GERSTENFELD, 2015).

2.2 Visão Geral Sobre as Fraturas

Fratura é a descontinuidade parcial ou total do tecido ósseo, causada por uma força superior àquela a que o osso é capaz de suportar. São consideradas como causas comuns de fraturas, os traumas de alto impacto - como quedas e acidentes automobilísticos - e os de baixo impacto, causados de maneira patológica em consequência a doenças que promovem o enfraquecimento dos ossos, como osteoporose, doença periodontal e neoplasias, que, inclusive, podem ocorrer de maneira espontânea (JOHNSON; HOULTON; VANNINI, 2005; PIERMATTEI; FLO; BRINKER, 2016).

Em relação a custos, as fraturas ósseas representam um evidente problema de saúde pública em todo o mundo, promovendo consideráveis gastos econômicos (COURT-BROWN; CAESAR, 2006; POLINDER *et al.*, 2016). Em uma meta-análise realizada com 113 estudos, o

custo combinado para tratamento hospitalar de uma fratura de fêmur, por exemplo, foi estimado em US\$ 10.075, e os custos totais de saúde e assistência social para este tipo de fratura, após 12 meses, totalizaram uma média global de US\$ 43.669 (WILLIAMSON *et al.*, 2017).

Em questões individuais, de uma maneira geral, a ocorrência de uma fratura leva à ausência do indivíduo ao trabalho, a diminuição ou incapacidade de produção, à queda na qualidade de vida, à perda de saúde e a altos custos com assistência médica (PIKE *et al.*, 2010; TATANGELO *et al.*, 2019; BORGSTRÖM *et al.*, 2020).

Segundo um estudo realizado em 2019, organizado pela *Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors*, no que se refere a incidência, prevalência e anos de incapacidade causados por fraturas, globalmente, houve 178 milhões de novas fraturas, 455 milhões de casos prevalentes e 25,8 milhões de casos de incapacidade individual, o que representa um aumento de 33,4%, 70,1% e 65,3%, desde 1990, respectivamente.

2.3 A Osteoimunologia e o Reparo do Tecido Ósseo

A osteoimunologia, termo primeiramente descrito por Arron e Choi (2000), consolidou-se como um campo da saúde, essencial para compreender os mecanismos que correlacionam os sistemas ósseo e imunológico, colocando a medula óssea como papel central da osteogênese e osteoclastogênese, tanto fisiológica quanto patologicamente, do início ao fim do reparo ósseo (ARRON; CHOI, 2000; ARBOLEYA; CASTAÑEDA, 2013). Evidências demonstram que o microambiente inflamatório durante as lesões traumáticas aguda e crônica apresenta papel fundamental na coordenação das células imunes junto às células do tecido ósseo local, promovendo influência direta na diferenciação osteoblástica e osteoclástica, o que, por sua vez, formam células atuantes na homeostase óssea. Assim, a resposta inflamatória não deve ser entendida apenas como um evento precursor, mas como um componente ativo e regulador do processo regenerativo. Destaca-se na literatura que tanto a imunidade inata quanto a adaptativa são capazes de regular, de forma integrada o curso do processo de reparo ósseo e, terapias regenerativas incluindo biomateriais e células-tronco mesenquimais, podem promover ações diferentes neste processo (SCHINDELER *et al.*, 2008; LIENAU *et al.*, 2009; SCHMIDT-BLEEK *et al.*, 2012; BAHT *et al.*, 2018).

As células T CD4⁺ virgens são capazes de se diferenciarem em subtipos funcionais, conforme estímulos do microambiente inflamatório que se encontram, em células T auxiliares (Th1, Th2, Th17 e Treg) juntamente com diversas outras células do sistema imunológico - como células B, células dendríticas e macrófagos - participando ativamente da regulação da homeostase óssea.

As células Th17 são potentes indutoras da osteoclastogênese - via IL-17, que estimula a expressão de RANKL e intensifica a inflamação local (ADAMOPOULOS *et al.*, 2010) - apresentando seu papel amplamente reconhecido em doenças como artrite reumatóide e osteoporose (NOONAN *et al.*, 2010; WALSH *et al.*, 2018). As células Th2 e Treg inibem a diferenciação e a função de osteoclastos ao promoverem a secreção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-5 e IL-13 / TGF- β , IL-4 e IL-10, respectivamente. Além disso, Treg também expressam CTLA-4, que interfere negativamente na ativação de precursores osteoclásticos (KIM *et al.*, 2007; LUO *et al.*, 2011; WING *et al.*, 2011).

Por outro lado, o real envolvimento das células Th1 na reabsorção e no processo de reparo do tecido ósseo, ainda não apresenta uma definição clara. Este tipo celular caracteriza-se por apresentar "T-bet" como o seu fator de transcrição "mestre", o qual promove a diferenciação das células T virgens. As células Th1, por sua vez são responsáveis por produzirem IFN- γ que, a depender do contexto, pode apresentar papel duplo sobre a atividade

dos osteoclastos e dos osteoblastos, influenciando diretamente no remodelamento ósseo (WEITZMANN; PACIFICI, 2006), seja inibindo (HARRINGTON *et al.*, 2006; WALSH *et al.*, 2018) ou promovendo (TAKAYANAGI, 2007; MURAYAMA *et al.*, 2024) a osteoclastogênese. No entanto, alguns autores dizem que este tipo celular atua concomitantemente às células Th2 na inibição da osteoclastogênese, via IFN- γ e IL-4, respectivamente (HARRINGTON *et al.*, 2006; WALSH *et al.*, 2018). Outros trabalhos citam que resposta Th1 promove um perfil pró-inflamatório que intensifica a atividade dos macrófagos M1 e favorece a osteoclastogênese, contribuindo para maior reabsorção óssea e possível atraso na mineralização do tecido recém-formado (MURAYAMA *et al.*, 2024). Por outro lado, a polarização Th2 atua como um contrapeso funcional ao padrão Th1, favorecendo um microambiente anti-inflamatório não apenas por reduzir a atividade osteoclástica como também estimular a diferenciação osteoblástica e o anabolismo ósseo (LI *et al.*, 2024). Esse efeito torna-se particularmente evidente em estudos que investigam biomateriais e elementos bioativos capazes de modular a polarização de linfócitos T. Um exemplo é a dopagem de manganês em nanofibras de hidroxiapatita, que demonstrou reduzir a polarização Th1, aumentar a resposta Th2 e, conseqüentemente, elevar a secreção de IL-4 e diminuir IFN- γ , favorecendo a osteogênese e a regeneração de defeitos ósseos mandibulares em modelos animais. Desta forma, o predomínio da inflamação pode ser prejudicial quando prolongado, reforçando a importância do equilíbrio entre Th1 e Th2 para um reparo eficiente.

Assim, a complexa orquestração envolvida na polarização das células T emerge como um ponto central de interesse para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas capazes de equilibrar os subconjuntos pró e anti-inflamatórios, representando uma via promissora para promover um reparo ósseo mais abrangente e eficaz, principalmente diante das incertezas da atuação dos linfócitos do tipo Th1 no reparo do tecido ósseo.

2.4 Óxido Nítrico

O Óxido nítrico (do inglês, *Nitric Oxide* - NO) é um radical livre encontrado em estado gasoso no organismo, que contribui na regulação de diversos processos fisiológicos, como: (1) vasodilatação; (2) angiogênese; (3) agregação plaquetária; (4) regulação imunológica; (5) reparo tecidual; (6) neurotransmissão; (7) antimicrobianos; (8) antitumorais; (9) e ações oxidantes contraditórias (MONCADA *et al.*, 1991; MONCADA; HIGGS, 1993; VANT HOF; RALSTON, 2001; BRYAN *et al.*, 2009; CARDNELL; MIKKELSEN, 2011; ESQUIVEL-SOLIS *et al.*, 2013; HALDAR; STAMLER, 2013; NASCIMENTO *et al.*, 2020). Ele é gerado principalmente a partir da catalização de enzimas óxido nítrico sintases (do inglês, *Nitric Oxide Synthases* - NOS) sob a reação ocorrida entre o nitrogênio terminal do aminoácido L-arginina e o oxigênio molecular (O₂), gerando, também, um coproduto denominado L-citrulina. Outra via fisiológica de produção do NO é a partir de nitrito (NO₂⁻) presente no ambiente ácido do estômago. Além disso, compostos farmacológicos como nitratos orgânicos - como a nitroglicerina - e nitroprussiato de sódio, ambos utilizados clinicamente como vasodilatadores, também podem gerá-lo (BENJAMIN *et al.*, 1994; FEELISCH; STAMLER, 1996; BALDIK *et al.*, 2005).

São consideradas isoformas de NOS: a óxido nítrico sintase neuronal (do inglês, *neuronal NOS* - nNOS), a óxido nítrico sintase endotelial (do inglês, *endotelial NOS* - eNOS) e a óxido nítrico sintase induzível (do inglês, *inducible NOS* - iNOS) (ROBINSON *et al.*, 1994; BALDIK *et al.*, 2005; AHMAD *et al.*, 2020). As duas primeiras são expressas constitutivamente em baixos níveis em seus respectivos tecidos, sendo suas atividades reguladas diretamente por alterações na concentração de Ca²⁺ intracelular livre (FEELISCH;

STAMLER, 1996). No entanto, enquanto a eNOS é também expressa de maneira constitutiva no osso (MACPHERSON *et al.*, 1999), há incertezas na expressão da nNOS neste tecido (HELFRICH *et al.*, 1997). Já a iNOS é expressa em respostas a estímulos inflamatórios, neste e em outros órgãos por citocinas pró-inflamatórias expressas por macrófagos e neutrófilos, tais como interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF), assim como por citocinas do perfil celular Th1, como IFN- γ (LIN *et al.*, 1996; VANT HOF; RALSTON, 2001; WIMALAWANSA, 2010; DAS *et al.*, 2015; NASCIMENTO *et al.*, 2020), ou ainda por situações de hipóxia e estresse oxidativo (BOGDAN, 2001). Estes potenciais indutores estão presentes tanto em locais de lesão quanto de cicatrização ósseas (AHMAD *et al.*, 2020), reforçando o envolvimento desta enzima como parte do processo inflamatório que precede o reparo do tecido ósseo.

Por apresentar meia-vida na ordem de segundos - ao reagir rapidamente com O₂, originando metabólitos estáveis, como o nitrato (NO₃⁻) e o NO₂⁻ - as medições diretas de NO são consideradas difíceis de serem realizadas. Desta forma, sua medição ocorre de maneira indireta, através: (1) da reação de Griess - na qual a quantidade de NO₃⁻ e NO₂⁻ acumulada são avaliadas; (2) da conversão de L-arginina radiomarcada em L-citrulina (avaliação realizada em ensaio *in vitro*); e, (3) da quantificação individual de suas isoformas (FEELISCH; STAMLER, 1996; DIWAN *et al.*, 2000; BASSO; HEERSCH, 2006).

A complexa atuação do NO está relacionada à sua concentração, à isoforma enzimática envolvida na sua síntese, assim como ao microambiente no qual ele é submetido, ou seja, ao contexto fisiopatológico. Desta forma, esta molécula integra ações divergentes, podendo favorecer o reparo ósseo ou, em condições específicas, contribuir para a instalação de lesões celulares que favorecem à reabsorção (MONCADA; HIGGS, 1993; SAURA *et al.*, 2010; FÖRSTERMANN; SESSA, 2012).

Evidências demonstram que níveis basais de NO modulam positivamente a diferenciação de osteoblastos e a expressão de proteínas da matriz óssea - como osteocalcina - além de contribuir para a manutenção da sobrevivência dos osteócitos. Além disso, sabe-se que concentrações reduzidas de NO podem inibir a atividade reabsorptiva dos osteoclastos contribuindo para o equilíbrio do processo de remodelação óssea (HENRIQUES; SARAIVA; FERREIRA, 2021; RIBEIRO; BARROS; SANTOS, 2021).

Por outro lado, altas concentrações de NO - especialmente mediada por iNOS em situações de inflamação prolongada, trauma intensos ou infecções - está diretamente relacionada à formação de espécies reativas de nitrogênio (RNS), dentre as quais o peroxinitrito (ONOO⁻) - formado a partir da reação do NO com ânion superóxido (O₂⁻) - é o principal representante. Este por sua vez, apresenta um alto potencial de reação, podendo desencadear danos oxidativos a lipídeos, proteínas e DNA, culminando em disfunção celular e morte por necrose ou apoptose (NATHAN; XIE, 1994; FÖRSTERMANN; SESSA, 2012; DODSON *et al.*, 2013; ROCHA *et al.*, 2014). No tecido ósseo, esse ambiente oxidativo contribui para a inibição da atividade osteoblástica, redução da sobrevivência dos osteócitos e estímulo à reabsorção osteoclástica, resultando em atraso da reparação óssea ou, em casos extremos, falha da consolidação (HENRIQUES; SARAIVA; FERREIRA, 2021).

Assim, a atuação do NO no reparo ósseo caracteriza-se por um equilíbrio delicado entre efeitos benéficos e deletérios. Enquanto sua produção fisiológica promove angiogênese, vasodilatação e suporte metabólico e funcional às células ósseas, sua superprodução, associada à inflamação exacerbada, intensifica o estresse oxidativo e perturba a dinâmica celular e estrutural do processo regenerativo. A compreensão desses mecanismos é fundamental para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas que visem modular a produção de NO, potencializando seus efeitos benéficos e minimizando os danos decorrentes das RNS no contexto da regeneração óssea.

2.5 Modelos Experimentais de Lesão Óssea

Uma grande variedade de modelos experimentais tem sido utilizada para investigar o curso do reparo ósseo, no entanto diversas são as variáveis que influenciam diretamente os diferentes modelos, desde aquelas relacionadas diretamente à espécie animal, passando pelo tipo de defeito confeccionado e método de estabilização utilizado, chegando até o período e às formas de avaliação. Modelos que permitem a avaliação de múltiplas amostras em um único indivíduo fornecem controle para a variação entre os animais, limita o número de animais necessários e favorecem tempo e despesas (MUSCHLER *et al.*, 2010; FAYAZ *et al.*, 2011; AMINI *et al.*, 2012; INOUE *et al.*, 2013; RECHENBERG, 2015; ALIDADI *et al.*, 2017; BRASSOLATTI *et al.*, 2018; GHOLIPOUR *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2018; QU *et al.*, 2019; UENO *et al.*, 2020; YILMAZ *et al.*, 2020; CALIOGNA *et al.*, 2021; HIXON; MILLER, 2022; BERNI *et al.*, 2023).

2.6 Tipos de Lesão Óssea

Quando induzidos experimentalmente, há uma tentativa de se padronizar e classificar os métodos empregados para a confecção dos defeitos ósseos (SUN *et al.*, 2022), no entanto, estes são muito variados (ISLAM *et al.*, 2022) e podem interferir de forma significativa nos resultados das pesquisas experimentais.

Na classificação utilizada por Gao *et al.* (2023), as lesões ósseas realizadas experimentalmente se subdividem em modelos de fraturas traumáticas (fechadas e abertas), osteoporóticas, de não união óssea, com fixação e defeitos ósseos. De uma maneira geral, os defeitos ósseos são divididos em: calvários; segmentares de ossos longos; corticais parciais; e em osso esponjoso (BIGHAM-SADEGH; ORYAN, 2015). Defeitos segmentares são elaborados através de uma lâmina linear acoplada a uma serra oscilatória, apresentando como desvantagem necessitarem de materiais específicos - e algumas vezes onerosos - além de adequada fixação. Já os defeitos cilíndricos são criados a partir de um motor - de baixa ou alta rotação - associado a uma broca de diâmetros variados. Estes tipos de defeitos apresentam como vantagens: (1) serem de baixo custo; (2) não necessitarem de implantes para estabilização; (3) permitirem a padronização da geometria dos defeitos; (4) não apresentarem riscos de complicações - como fraturas e sangramento excessivo -; além de (5) poderem ser reproduzidos em diversos locais anatômicos (BROMER *et al.*, 2022). Por estas vantagens, este tipo de modelo se encontra em diversos estudos, servindo de base em modelos translacionais que avaliam e comparam estratégias de reparo ósseo, além de ser amplamente utilizado na avaliação de biomateriais e fatores bioativos (ASTM, 2014).

2.7 O Fêmur como Modelo de Lesão Óssea

O fêmur apresenta-se como uma estrutura muito bem vascularizada, com suprimento sanguíneo provenientes de vasos nutritivos principais, vasos metafisários e epifisários e vasos periosteais (HORNER *et al.*, 2010). Logo, pensando nos princípios da consolidação óssea, basta haver uma boa estabilização local (CLAES, *et al.*, 2012) para que este processo ocorra de maneira equilibrada e sem complicações neste osso.

Os defeitos ósseos sobre a cortical óssea da diáfise femoral são comumente utilizados nos estudos que envolvem maior carga mecânica pois esse osso é mais resistente quando comparado à calvária (GAO *et al.*, 2023). O fêmur é de fácil acesso cirúrgico e mecanicamente

está livre da distribuição de carga compensatória entre ossos adjacentes, como ocorre entre o rádio e a ulna, e a tíbia e a fíbula, por exemplo (BIGHAM-SADEGH; ORYAN, 2015; MCGOVERN *et al.*, 2018). Além do mais, os defeitos ósseos sobre as diáfises femorais exibem menos complicações por não acometerem as epífises, o que resultaria em maior instabilidade mecânica e maior complexidade das estruturas anatômicas envolvidas (SUN *et al.*, 2022).

2.8 O Modelo Wistar

Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) são os roedores mais comumente utilizados em pesquisas pré-clínicas que envolvem reparo ósseo porque: (a) apresentam facilidade de reprodutibilidade em laboratório em um curto período de tempo; (b) possuem ampla disponibilidade de reagentes para ensaios de histoquímica (SUN *et al.*, 2022), biologia molecular, imuno-histoquímica e estresse e dano oxidativo (CASTRO *et al.*, 2020; CAMILLI *et al.*, 2024); (c) são menos onerosos do ponto de vista dos cuidados e manejo, quando comparado aos animais de médio e grande porte (NUNAMAKER, 1998; RECHENBERG, 2015; SPARKS *et al.*, 2020); (d) podem ser utilizadas linhagens homogêneas ou heterogêneas (MANASSERO *et al.*, 2016; BRESCHI *et al.*, 2017; HUANG *et al.*, 2022); (e) apresentam semelhança com humanos, em relação às características anátomo-fisiológica, biomecânica e respostas inflamatória (CLAES *et al.*, 2012) e imune (KANCZLER *et al.*, 2010; SROUJI *et al.*, 2011; UENO *et al.*, 2020); e, sobretudo (f) exibem um metabolismo mais acelerado e rápido tempo de cicatrização (GAO *et al.*, 2023), além de tolerarem bem as cirurgias e serem eticamente aceitos (HORNER *et al.*, 2010; BIGHAM-SADEGH; ORYAN, 2015; RECHENBERG, 2015; WANCKET, 2015; GAO *et al.*, 2023).

Especificamente, os ossos desta espécie animal - calvária, fêmur e tíbia - têm sido utilizados como *background* para eventuais testes de biomateriais, implantes, e estudos que investigam os efeitos terapêuticos que visam acelerar o processo de reparo (JAGER *et al.*, 2005; MILES *et al.*, 2011; GREWAL *et al.*, 2014; HARADA *et al.*, 2014; SATO *et al.*, 2014; SONG *et al.*, 2014; BRASSOLATTI *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2022; BERNI *et al.*, 2023).

2.9 Laserterapia de Baixa Intensidade

A LLLT também conhecida pelo termo “fotobiomodulação”, é um recurso terapêutico que utiliza a luz para trazer benefícios aos tecidos, tendo efeitos já estabelecidos no tratamento de uma série de condições patológicas em diversos substratos, sendo capaz de reduzir a inflamação e a dor aguda, favorecendo, consequentemente, estímulos para o processo de reparação tecidual (FEITOSA *et al.*, 2007; NASCIMENTO *et al.*, 2010).

Esta terapia foi descoberta há mais de 50 anos, em 1967, por Endre Mester, na Hungria. Após repetidas aplicações do laser de rubi de baixa potência em camundongos sem pelos, ele surpreendentemente observou que os pelos dos animais começaram a crescer mais rápido na área da pele irradiada em comparação com a pele não irradiada (MESTER; MESTER, 2017). Posteriormente, Tiina Karu, na Rússia, começou a desvendar os mecanismos moleculares e celulares da LLLT (KARU, 2007) e observou que a LLLT utiliza diferentes comprimentos de onda, tanto do espectro vermelho (620-700 nm) - visível - como do infravermelho (700- 1440 nm) - não visível (AVRAM *et al.*, 2009), sendo a faixa compreendida entre 600 nm e 900 nm identificada como aquela que contém comprimentos de onda mais apropriados para esta modalidade terapêutica (RAYEGANI *et al.*, 2010). A origem dos dispositivos que entregam a luz laser é obtida a partir de diversos tipos de elementos físicos, como: HeNe 632,8 nm; GaAlAs

650 ou 805nm; GaAs 904 nm (NASCIMENTO *et al.*, 2010).

Há pelo menos duas décadas o uso da LLLT encontra-se em ascensão, principalmente devido à ampla disponibilidade e acessibilidade de dispositivos com robustos níveis de potência óptica, somados à demanda por tratamentos não farmacológicos, seguros e eficazes, que praticamente não apresentam efeitos colaterais - quando comparado à grande maioria dos tratamentos médicos convencionais (FREITAS; HAMBLIN, 2016).

2.9.1 Mecanismo de ação

Para que a luz visível tenha efeito sobre um sistema biológico vivo, seus fótons emitidos devem ser absorvidos por fotorreceptores ou cromóforos moleculares com o espectro de absorção dos elétrons semelhantes. Desta forma as propriedades ópticas do tecido, tais quais a absorção e a dispersão da luz, dependentes principalmente do comprimento de onda, poderão promover suas ações (HAMBLIN; DEMIDOVA, 2006).

Os lasers utilizados na fotobioestimulação não produzem calor e não destroem o tecido-alvo, como observado nos lasers cirúrgicos. Embora os mecanismos bioquímicos exatos desta terapia ainda não sejam totalmente conhecidos, os principais fatores que sustentam os efeitos terapêuticos do laser são: o efeito primário (1), que corresponde à energia fotônica que se encontra dentro da janela óptica de absorção (660-1200 nm) pela citocromo C oxidase (CCO), presente na membrana interna da mitocôndria, resultando em cascatas celulares e moleculares; o efeito secundário (2), que refere-se às alterações promovidas na adenosina trifosfato (ATP), no NO e nas ROS, dependentes da dosagem aplicada assim como dos estados redox da célula; o efeito terciário (3), que está relacionado aos efeitos bioquímicos subsequentes diretamente relacionados ao contexto e ao tipo celular, capaz de controlar a transcrição gênica e, subsequentemente, a proliferação celular, a migração, a apoptose e a inflamação, e; o efeito quaternário (4), que está associado aos tecidos que não absorveram a energia fotônica de forma direta (efeitos distantes e sistêmicos), mas ainda podem ser beneficiados pelas secreções provenientes das células que absorveram a luz (FREITAS; HAMBLIN, 2016; HOCHMAN, 2018). Consequentemente a célula é entregue com mais energia, sendo capaz de aumentar seu estímulo metabólico e mitótico, apresentando maior potencial de reparo celular (KNEEBONE, 2006; RAYEGANI *et al.* 2010).

2.9.2 Ações da LLLT nos tecidos

Evidências científicas apontam que a LLLT atua diretamente no processo inflamatório. Quando utilizado em enxertos cutâneos, o laser é capaz de promover a reabsorção de exsudatos, aumentar o número de fibroblastos e a viabilidade dos enxertos, além de favorecer a síntese e o remodelamento de colágeno (FEITOSA *et al.*, 2007). Na avaliação da cicatrização de feridas cutâneas experimentalmente induzidas em ratos, a LLLT promove efeito imunomodulador na expressão de TGF-2 e induz a apoptose de células epiteliais e fibroblastos durante o processo de reparo tecidual, favorecendo a transição da fase inflamatória para a fase proliferativa (ROCHA JÚNIOR, *et al.*, 2009). Em feridas cutâneas de camundongos diabéticos, ela é capaz de modular negativamente a expressão da enzima ciclooxygenase 2 (ROCHA, *et al.* (2012). Em modelo experimental de reação de hipersensibilidade tratados pela LLLT, foi observada considerável redução na densidade do infiltrado inflamatório, acompanhada por redução significativa nos níveis de TNF- α , INF- γ e IL-10 (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Uma vez utilizada em modelo experimental de doença pulmonar obstrutiva crônica induzida pela fumaça de cigarro, a LLLT pode promover a redução de células totais, células inflamatórias (macrófagos, neutrófilos e linfócitos), IFN- γ , IL-6, colágeno, muco, índice de broncoconstrição e distensão

alveolar, além de aumentar IL-10 (BRITO *et al.*, 2024). Utilizando análises genéticas, Safavi *et al.* (2008) demonstraram que a LLLT é capaz inibir significativamente a expressão de IL-1 e IFN- γ , enquanto a expressão de PDGF e TGF- β foi significativamente aumentada, sendo estes resultados suficientes para os autores sugerirem que LLLT diminui a inflamação e acelera o processo de cicatrização de feridas, alterando a expressão de genes responsáveis pela produção de citocinas inflamatórias.

Nas últimas décadas pesquisas *in vitro* e *in vivo* demonstram como a fotobioestimulação afeta a histofisiologia e o metabolismo do tecido ósseo, promovendo melhora no processo de reparo (JAWAD *et al.*, 2013; VÁZQUEZ *et al.*, 2015). Na osteogênese, a LLLT atua estimulando o aumento no número de osteoblastos - acompanhado por maior expressão de fosfatase alcalina - o que intensifica a síntese de matriz óssea e resulta em melhor organização das trabéculas e dos canais de Havers. Consequentemente, há melhora das propriedades mecânicas do calo ósseo, que passa a apresentar menor volume e maior resistência (FEITOSA *et al.*, 2007; HUGHES, 2011; MOTA *et al.*, 2013). Além disso, a LLLT é capaz de estimular a produção e a deposição de colágeno por fibroblastos e osteoblastos (SAMOILOVA *et al.*, 2008; BOSSINI *et al.*, 2012; TIM *et al.*, 2016) favorecendo, consequentemente, à formação e a organização do reparo ósseo (CHEN *et al.*, 2009). Estudos também demonstram que esta terapia também é capaz de promover aumento na vascularização do tecido ósseo ao favorecer a osteogênese (BAI *et al.*, 2021).

De uma maneira geral, embora com diversos benefícios comprovadamente demonstrados, tanto em estudos *in vitro* como *in vivo*, associados ou não a outros métodos, observa-se a ausência na padronização dos protocolos da LLLT no processo de reparo do tecido ósseo. Além disso, poucos estudos demonstram ou descrevem os benefícios da fotobiomodulação nas vias imunológicas durante as fases iniciais do processo de reparo ósseo, demonstrando haver a necessidade de maiores investigações deste recurso terapêutico nesta interação.

2.10 Terapia Fotodinâmica

A PDT é um recurso de ação ampla, utilizado no controle de microorganismos (fungos e bactérias) (MALIK *et al.*, 2010; KHARKWAL *et al.*, 2011; SPERANDIO *et al.*, 2013), no tratamento de alguns tipos de neoplasias, no favorecimento à cicatrização de feridas (SELLERA, *et al.*, 2014; SAMPAIO; LOPES 2016) e que vem sendo recentemente estudada no tecido ósseo (ATES *et al.*, 2017; ATES *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2022).

São características positivas desta terapia o fato de: (1) não ser invasiva; (2) não depender de equipamentos e infraestrutura sofisticados; (3) apresentar seletividade e precisão; (4) possibilitar a utilização concomitante de outros protocolos terapêuticos; (5) não apresentar efeitos genotóxicos ou mutagênicos; (6) melhorar a qualidade de vida e prolongar a sobrevida; (7) permitir sessões repetidas; (8) apresentar efeitos colaterais moderados; (9) resultar em bons resultados terapêuticos e estéticos; (10) oferecer preservação de órgãos (MALIK *et al.*, 2010; KWIATKOWSKI, *et al.*, 2018).

A PDT depende da presença simultânea de: (1) um fotossensibilizador (FS) não tóxico; (2) uma fonte de luz visível, com comprimento de onda apropriado para excitar o FS; e, (3) oxigênio molecular presente no tecido. A associação destes três elementos é capaz de promover uma reação fotoquímica não térmica com efeitos biológicos - local ou sistêmico - na qual são geradas ROS que causam efeitos tóxicos nas células do tecido alvo (KONOPKA; GOSLINSKI, 2007; WITHROW; MACEWEN'S, 2007; MALIK *et al.*, 2010; SELLERA *et al.*, 2014; ROSA *et al.*, 2015; ONISZCZUK *et al.*, 2016; DOS SANTOS, 2020).

2.10.1 Mecanismo de ação

Após a administração no paciente - por via intravenosa, oral ou tópica, a depender do tipo de agente - o FS é irradiado por fótons de luz que irão promover a conversão do seu estado de energia fundamental (singleto - S^0) para o estado excitado (singleto - S^1). Este estado, por sua vez apresenta vida curta e perde energia através da emissão de luz fluorescente ou conversão interna de calor. No entanto, ele também poderá passar por “cruzamento intersistêmico”, no qual parte da energia poderá promover sua conversão para outro estado excitado (triplete - T^1) - de vida relativamente mais longa (KONOPKA; GOSLINSKI, 2007; ROBERTSON *et al.*, 2009; CALIN; COMAN, 2011; REDDY *et al.*, 2012; SELLERA *et al.*, 2014). A partir deste estágio inicial, dar-se-á sequência aos mecanismos, que poderão reagir direta ou indiretamente com moléculas de oxigênio em estado fundamental.

2.10.1.1 Mecanismo tipo I

Uma vez no estado excitado (triplete - T^1), o FS poderá transferir energia para biomoléculas ou membrana celular do substrato (ex. tecidos neoplásicos) presentes em seu entorno, transferindo um próton (hidrogênio) ou um elétron para formar radicais ânion ou cátion, respectivamente. Estes (radicais livres) reagem rapidamente com moléculas de oxigênio em estado energético fundamental presentes no tecido, promovendo a formação de ROS, capazes de danificar o tecido alvo. A primeira e mais comum forma é o ânion superóxido (O_2^-), que, posteriormente, irá promover a geração de outras formas de ERO, como radicais hidroxila (OH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), no interior das células. A cascata de reações iniciada leva ao estresse oxidativo, resultando na destruição celular (KONOPKA; GOSLINSKI, 2007; ROBERTSON *et al.*, 2009; ONISZCZUK *et al.*, 2016; KWIATKOWSKIA *et al.*, 2018).

2.10.1.2 Mecanismo tipo II

A partir do estado excitado (triplete - T^1) energia também pode ser transferida diretamente para a molécula de oxigênio ($FS \rightarrow O_2$) em seu estado energético fundamental (estado triplete) - a transferência direta de energia entre moléculas é possível porque elas têm mesmos *spins*. Dessa forma, são geradas partículas de oxigênio excitadas - oxigênio singleto (1O_2) - que são caracterizadas por apresentarem propriedades altamente oxidantes (SELLERA *et al.*, 2014; ONISZCZUK *et al.*, 2016; KWIATKOWSKIA *et al.*, 2018).

2.10.2 Fotossensibilizadores

Cada FS apresenta sensibilidade a um determinado comprimento de onda e pico de ativação - tipicamente dentro do espectro visível do vermelho. Desta forma, diversos tipos de FS utilizados na PDT apresentam variações em suas bandas de absorção de luz. A grande variedade de FS indica que o aquele ideal para a PDT ainda não foi identificado. No entanto, sabe-se que, um alto coeficiente de absorção, uma alta fotoestabilidade, uma afinidade por se acumular preferencialmente em células de rápida multiplicação, além de um longo estado triplete de energia, são características que estão diretamente envolvidas (ISRAEL *et al.* 2014).

2.10.2.1 Azul de metileno

O AM é um produto químico heterocíclico aromático utilizado para a coloração de várias estruturas em 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 3 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). Quando utilizado como FS, apresenta características favoráveis à PDT, por possuir absorbância máxima a um comprimento de onda de 660nm, sendo capaz de gerar altas concentrações de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) quando utilizado no controle de microorganismos e neoplasias (KIKUCHI *et al.*, 2015). Além disso, ele também se caracteriza por: (1) ser um produto de baixo custo, (2) ser de fácil aplicação e (3) que não apresenta efeitos tóxicos ou deletérios detectáveis clinicamente (ISRAEL *et al.*, 2014), embora haja controvérsias quanto a sua utilização na espécie felina (COSTA *et al.*, 2016). Quando comparado a outros tipos de FS, o AM tem se destacado por não apresentar interferência com a oximetria de pulso (SHIRAH *et al.*; 2011), podendo ser utilizado de maneira isolada ou combinada (RAMAMURTHY, 2014). Sua utilização como agente fotossensibilizador no tecido ósseo já foi demonstrada anteriormente tanto em análises em culturas de células como em estudo pré-clínico (ATES *et al.*, 2017; ATES *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2022).

2.10.3 A PDT no tecido ósseo

Baseado em seu reconhecido mecanismo de ação, assim como nos princípios de sua utilização clássica - controle microbiológico -, o uso da PDT no tecido ósseo se iniciou através de situações em que afecções ósseas apresentavam o fator “infecção” envolvido: seja na sua eficácia em inativar biofilmes de *Staphylococcus aureus* em amostras de osso compacto e esponjoso (ROSA *et al.*, 2015); no tratamento não cirúrgico da periodontite (ALMEIDA *et al.* 2008; KIKUCHI *et al.* 2015; THEODORO *et al.*, 2017); ou no tratamento e prevenção da osteoradionecrose infeccionada (MAGALHÃES *et al.*, 2020).

No que diz respeito ao uso desta terapia no processo de reparo ósseo, as informações na literatura mundial são escassas, no entanto, embora de maneira lenta, resultados favoráveis a este processo vem sendo apresentados. Quando estudado em células osteoblásticas humanas, dois diferentes tipos de FS já foram analisados, o AM (ATES *et al.* 2017) e o verde de indocianina (ATES *et al.* 2018). No primeiro estudo, os autores observaram que, embora a proliferação celular não tenha parecido ser afetada, a atividade osteoanabólica é alterada. Os grupos tratados pela terapia ($\text{MB} + 2 \text{ J/cm}^2$) apresentaram aumento significativo da atividade de fosfatase alcalina aos sete e 14 dias de tratamento, assim como de colágeno tipo I no 14º dia, apesar de a mineralização ter diminuído significativamente. Já no segundo estudo, a PDT não alterou a viabilidade celular, mas também aumentou a atividade da fosfatase alcalina e melhorou a mineralização dos osteoblastos existentes.

Oliveira *et al.* (2022) realizaram a avaliação da associação da PDT com azul de metileno à LLLT no processo de reparo ósseo em defeitos ósseos femorais de ratos Wistar e observaram que, aos sete dias de tratamento, ambas as terapias promoveram antecipação no processo de consolidação em relação aos demais grupos, e, quando avaliado no 14º dia, não houve diferença estatística entre os grupos LLLT e LLLT+PDT, embora ambos os grupos tivessem apresentado diferenças quando comparados ao grupo controle e ao grupo azul de metileno. Neste mesmo estudo, os autores também observaram que a radiopacidade do tecido ósseo aumentou estatisticamente no grupo em que as terapias se somavam.

Neste sentido, novas avaliações relacionadas ao tema se fazem prudentes, uma vez que o uso da PDT com AM no tecido ósseo, apresenta benefícios ainda pouco investigados no processo de reparo ósseo, principalmente quando relacionado aos eventos inflamatórios e imunológicos das fases iniciais.

.3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido nos Laboratórios de Imunopatologia e Patologia Experimental do Centro de Bioterismo Regional (CBR) e no Biofísica, Morfofisiologia e Inflamação do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), ambos localizados na Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), sendo este aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da referida instituição, sob o parecer nº 09/2015 (ANEXO A). Parte da metodologia aqui listada - delineamento experimental, cirurgia, tratamento, eutanásia dos animais, coleta e emblocamento das amostras - foi realizada durante meu trabalho de mestrado. Já a contagem de células, as análises histomorfométricas e estereológicas, as avaliações imuno-histoquímicas, a coloração especial para colágeno e a microscopia eletrônica de varredura foram realizadas no doutorado.

3.1 Grupos Experimentais

Um total de 24 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) (N=24) - machos de 90 dias e pesando entre 250 g e 300 g - foram tomados para a realização do presente estudo. Previamente ao procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos individualmente em mini-isoladores - medindo 501 (C) × 264 (A) × 341 mm (L) - forrados com aparas de madeira, em prateleiras ventiladas, a uma temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, sob um ciclo controlado de 12 horas de luz, com ração peletizada estéril e água filtrada à vontade.

Os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina 10% (100 mg/kg) e cloridrato de xilazina 2% (10 mg/kg) aplicados intraperitonealmente e em seguida submetidos a procedimento cirúrgico para a confecção de dois defeitos ósseos diafisários, monocorticais de 2 mm de diâmetro cada um, equidistantes 1,16 cm entre eles, na face cranial dos seus respectivos fêmures direito. Com o auxílio de uma ponteira e uma micropipeta, todos os defeitos distais, de todos os animais, foram preenchidos pelo corante azul de metileno, (CHIMIO LUX® Azul de metileno 0,01% - DMC EQUIPAMENTOS, São Carlos - SP) (Figura 2-A). Em seguida parte dos defeitos foram submetidos ou não à irradiação pela LLLT (Tabela 1), sendo aplicada diretamente sobre os defeitos ósseos durante a cirurgia (uma única vez) e continuada em sessões (de maneira puntiforme, ao longo de cinco pontos equidistantes no maior eixo do fêmur, tomando-se como referência anatômica o trocanter maior, proximalmente, e a patela, distalmente) a cada 48 horas, sendo oito animais (n=08) submetidos à simulação pela LLLT, oito à irradiação por 20 s (n=08) e oito à irradiação por 90 s (n=08). Após a cirurgia, todos os animais receberam duas doses diárias (a cada 12 horas por via subcutânea) de cloridrato de tramadol (5 mg/kg) durante quatro dias consecutivos. Metade dos animais (n=04) de cada protocolo de tratamento realizado foram eutanasiados no sétimo dia de avaliação (totalizando quatro sessões) e a outra metade no décimo quarto dia (totalizando sete sessões) (Figura 2-B).

Ao todo foram confeccionados 48 defeitos a partir dos quais, seis grupos distintos foram determinados de acordo com os tratamentos realizados (Figura 2-C), como demonstrado a seguir:

- Defeito ósseo: defeitos submetidos à simulação do laser com o aparelho desligado (n=8);
- Azul de metileno: defeitos preenchidos com 10 µl de azul de metileno 0,01% e submetidos à simulação do laser com o aparelho desligado (n=8);
- LLLT 20: defeitos irradiados pela laserterapia durante 20 s (n=8);

- LLLT 20 + AM: defeitos preenchidos com 10 µl de azul de metileno 0,01% e irradiados pela laserterapia durante 20 s (n=8);
- LLLT 90: defeitos irradiados pela laserterapia durante 90 s (n=8);
- LLLT 90 + AM: defeitos preenchidos com 10 µl de azul de metileno 0,01%, e irradiados pela laserterapia durante 90 s (n=8).

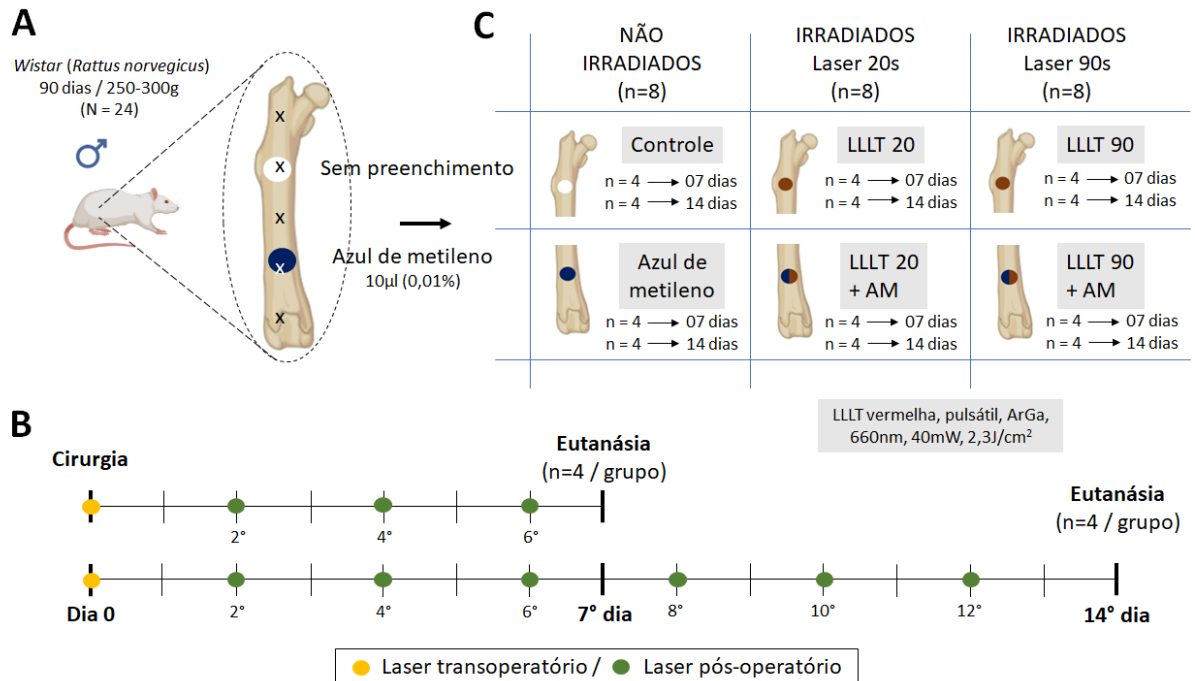


Figura 2: Divisão dos grupos de acordo com os tratamentos realizados. A - defeitos ósseos monocorticais, equidistantes 1,16 cm um do outro, realizados na face cranial de fêmures direito de ratos Wistar. Todos os defeitos distais foram preenchido com azul de metileno durante o transoperatório; B - delineamento do período de aplicação do laser, durante a cirurgia e a cada 48h. Metade dos animais (n=4) foram eutanasiados no sétimo dia e a outra metade no décimo quarto dia; C - Grupos: Defeito ósseo - defeitos submetidos à simulação da irradiação pelo laser; Azul de metileno - defeitos preenchidos com 10µl de azul de metileno 0,01% e submetidos à simulação da irradiação laser; LLLT 20 - defeitos submetidos à irradiação laser por 20 s durante o trans e pós-operatório; LLLT 20 + AM - defeitos preenchidos com 10µl de azul de metileno 0,01% e submetidos à irradiação laser por 20 s durante o trans e pós-operatório; LLLT 90 - defeitos submetidos à irradiação laser por 90 s durante o trans e pós-operatório; LLLT 90 + AM - defeitos preenchidos com 10µl de azul de metileno 0,01% e submetidos à irradiação laser direta por 90 s durante o trans e pós-operatório. X (pontos de aplicação do laser no período pós-operatório). LLLT (*Low Level Laser Therapy*). AM (azul de metileno). (Fonte: Criado em BioRender.com e elaborado por Fabiano Luiz Dulce de Oliveira)

Tabela 1 - Parâmetros e características do aparelho laser utilizado nos animais submetidos à PDT e à LLLT, após a confecção dos defeitos ósseos femorais

Parâmetros	Características do aparelho
Modelo	Semicondutores de Arsênio e Gálio Twin Laser® - Empresa MM Optics, São Carlos - SP
Energia de saída	40 mW
Comprimento de onda	660 nm (vermelho)
Densidade de energia (fluência)	2,3 J / cm ²
Área do feixe	0,04 cm ²
Densidade de potência (irradiância)	1.000 mW/cm ²
Energia por ponto	0,092 J
Tipo de feixe	Pontual
Modo de emissão	Pulsátil
Forma de aplicação	Diretamente sobre o defeito (cirurgia); Percutânea (5 pontos ao longo do fêmur)
Duração da irradiação	20 s / 90 s por ponto aplicado
Tempo total de cada aplicação	20 s / 90 s (cirurgia); 100 s / 450 s (dias alternados)
Duração do tratamento	Trans cirúrgico (única aplicação); A cada 48 h durante 7 e 14 dias (total de 4 e 7 sessões, respectivamente)

GaAs = Arseneto de Gálio; mW = miliwatts; nm = nanômetros; J = joules; J / cm² = joules por centímetro quadrado.

3.2 Análises Histológicas, Histomorfométricas e Estereológicas

Após a eutanásia, os fêmures foram obtidos por desarticulação das articulações proximal e distal (Figura 3A) e depositados em um recipiente contendo formol de cálcio a 10% por pelo menos 24 horas para fixação, seguida pelo processo de descalcificação em solução de ácido nítrico a 5% por 72 horas (Figura 3B); após esta etapa, a clivagem foi realizada através de cortes transversais nas regiões metafisárias (Figura 3C) e longitudinal da diáfise (Figura 3D); gradualmente as amostras foram desidratadas em álcool (70, 80, 90, 100%), clarificadas em xilol (100%) (Figura 3E) e incluídas em parafina - tomando-se adequada atenção na identificação das porções proximal e distal do osso (Figura 3F); a microtomia foi realizada tanto em cortes de 4 µm (imuno-histoquímica) quanto de 5 µm (histoquímica) (Figura 3G e 3H); e o material obtido foi depositado em lâminas histológicas de vidro (padronizando-se os defeitos ósseos proximais como aqueles mantidos próximo ao local de identificação das lâminas) (Figura 3H); posteriormente as lâminas foram coradas pelas colorações hematoxilina e eosina (H&E) e Picrosirius Red (Figura 3I).

A partir das regiões de transição córtico-medular, entre as bordas de cada defeito ósseo, um total de 10 fotomicrografias - cinco na primeira fileira e cinco na fileira inferior (Figura 3J) - foram capturadas para, em seguida, serem avaliadas.

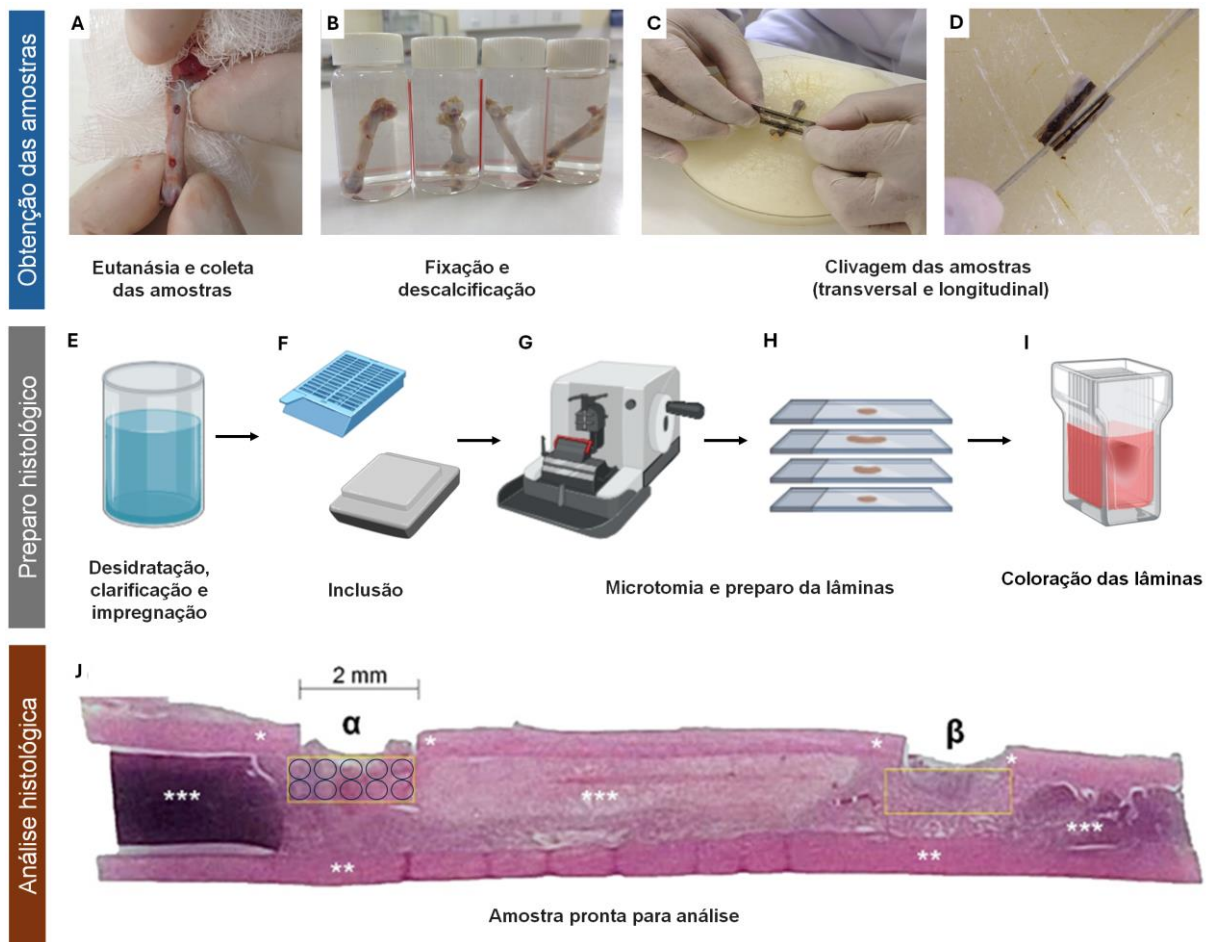


Figura 3: Métodos utilizados para obtenção e confecção das amostras histológicas. A - fêmur obtido após a eutanásia, contendo dois defeitos ósseos equidistantes em sua diáfise femoral cranial; B - fixação (formol de cálcio a 10%) e descalcificação (ácido nítrico a 5%); C e D - processo de clivagem (transversal e longitudinal) da amostra; E-I, etapas do processamento histológico; J - secção de tecido ósseo contendo defeitos proximal (α) e distal (β). Osso cortical *cis* (*) e *trans* (**). Medula óssea (***). Áreas de neoformação óssea utilizada para realizar as análises (retângulo amarelo). Locais de capturas das 10 fotomicrografias (círculos azuis). (Fonte: Criado em BioRender.com e elaborado por Fabiano Luiz Dulce de Oliveira)

3.2.1 Contagem de células totais

A contagem do número de células totais - inflamatórias ou ósseas - presentes na região dos defeitos ósseos, de todos os grupos avaliados, foi realizada a partir das lâminas coradas por H&E. Utilizando-se de morfometria e estereologia - como preconizado por Mandarin de Lacerda (2003) - um *template* transparente contendo um sistema teste de 16 pontos (Figura 4) - representados por uma “+” cada ponto e distribuídos em quatro linhas contendo quatro pontos em cada linha, equidistantes 3,9 cm na vertical e 5,2 cm na horizontal, cada ponto - foi posicionado em cima de cada imagem capturada - com área total de 38.763,339 micrômetros quadrados, cada imagem - a fim de analisar quantas células presentes nas imagens, coincidiam com estes pontos. Um total de 384 contagens foram realizadas, sendo distribuídas e divididas à metade, de acordo com o período em que foram obtidas as amostras (7 e 14 dias). Ao término destas contagens, os resultados foram distribuídos e submetidos a análises estatísticas.

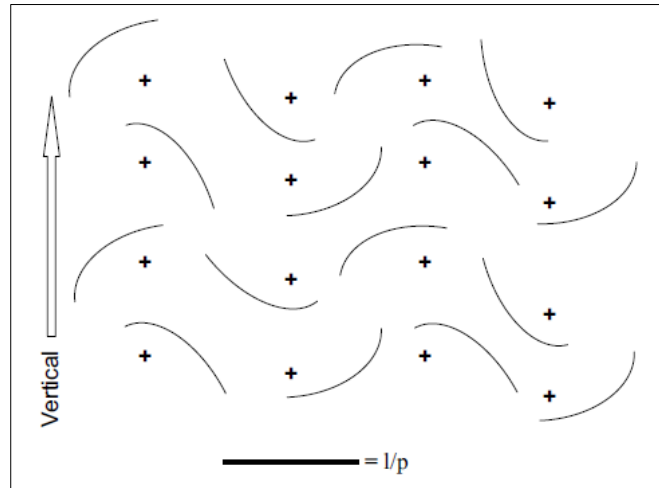


Figura 4: Sistema de teste de arcos cicloides e pontos de cruzes (n=16) utilizado na contagem de células totais (*Adaptado de C.A. Mandarin de Lacerda - 2003).

3.2.2 Fibras colágenas

Nas análises que envolveram o *Picrosirius Red*, uma definição de cores específicas de *pixels* - de acordo com cada coloração - foi selecionada para promover a marcação da área de neoformação óssea desejada, em cada imagem capturada. Em seguida, toda a área que não continha neoformação óssea - denominada “branca” - foi contabilizada para, posteriormente, ser descontada da área total de cada figura, a fim de se obter o valor real da área de interesse.

O colágeno total presente nas áreas de neoformação óssea foi analisado através de microscopia de luz, sendo a especificidade das fibras colágenas presentes nas áreas de neoformação óssea avaliada a partir da birrefringência da luz polarizada, visualizada por microscopia de campo escuro, onde aquelas mais espessas e fortemente birrefringentes apresentavam coloração em tons de laranja a vermelho, indicando o colágeno mais anisotrópico (GARAVELLO-FREITAS et al, 2003).

3.2.3 Densidade numérica de osteócitos

A avaliação da densidade numérica de osteócitos, de todos os grupos, foi realizada a partir de fotomicrografias das lâminas coradas por H&E. As regiões contendo áreas de neoformação óssea foram delineadas e contabilizadas (Figura 5-A) utilizando o software ImageJ® (1.54g Java1.8.0_345 64-bit), através da opção *freehand selection*. Em seguida, através da opção *multi-point* as lacunas ósseas que se encontravam preenchidas necessariamente por osteócitos foram contadas nas mesmas áreas delimitadas (Figura 5-B). A partir destes dados, tomou-se por convenção que a densidade do número de osteócitos (N_v) foi determinada pela razão entre o número total de osteócitos em relação à área total de neoformação óssea.

A nível de comparação, aos grupos somou-se um sétimo grupo, contendo análises realizadas sobre a cortical óssea íntegra, sem defeito; ou seja, osso saudável e maduro (Controle).

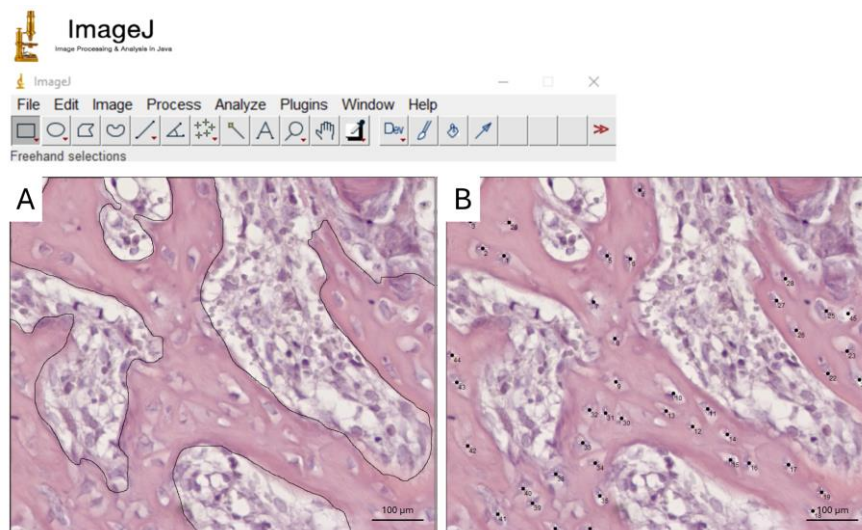


Figura 5: Imagem do software ImageJ® utilizado para determinar a densidade de número de osteócitos. A) definição da área de neoformação óssea contornada manualmente utilizando a ferramenta “seleção à mão livre”; B) marcação puntiforme manual, utilizando a ferramenta “multiponto”, para determinar o número de osteócitos presentes na mesma área definida em “A”. As áreas foram medidas em μm^2 a partir de dez fotomicrografias por grupo. Micrografia óptica (400x, H&E).

3.3 Imuno-Histoquímica

Após o processamento das lâminas em cortes de 4 μm , o método do complexo avidina-biotina peroxidase foi utilizado para avaliar tanto a expressão de T-bet em linfócitos T *helper*-1 como de iNOS em células da linhagem osteoblástica, ambos presentes nas áreas de neoformação óssea dos defeitos realizados nos fêmures. O tecido foi inicialmente aquecido em estufa (60°) - *overnight* - por 13 horas. Em seguida a este processo, o mesmo foi desparafinado em xilol (três banhos de 5' cada), hidratado em álcool 100%; 90%, 80%, 70% (3' cada) e lavado em água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com H_2O_2 30% em metanol por 60'. Foi realizada recuperação antigênica em banho-maria (95°) com solução salina tamponada com fostato (PBS): 40'. O tecido foi resfriado por 20' (temperatura ambiente). O *Background sniper* foi adicionado (4 gotas) e incubado durante 15' (temperatura ambiente). As amostras foram incubadas em uma solução de anticorpo primário (policlonal de coelho anti-T-bet e anti-iNOS, diluído 1:100 - Santa Cruz, CA), durante 1h em câmara escura úmida (OBS: o controle negativo não foi submetido à aplicação do anticorpo primário, mas sim à solução de PBS). Em seguida o *Link Universal Tekkie* foi adicionado (4 gotas) e encubado por 20'. Seguido de adição de *Trek Avidin -HRP label* - streptavidina 10' (temperatura ambiente - câmara escura úmida). Foram adicionadas às amostras *Betazoid DAB Chromogen* (1 gota - DAB) e após contracoloração com Hematoxilina o tecido foi desidratado em álcool: 3x - álcool 100%, diafanizado em xilol e as lâminas foram montadas em Entelan. Em cada secção do tecido ósseo avaliado, a densidade de imunocoloração positiva (por T-bet e iNOS) foi medida pela tonalidade de tons de marrom através da densidade de reação cromógeno-histoquímica (mm^2). A densidade de imunocoloração foi corrigida pela densidade do tecido ósseo neoformado.

Em seguida as amostras foram submetidas a avaliação em microscopia de luz. As análises da expressão de T-bet e iNOS foram realizadas em objetiva de 100x e 40x, respectivamente.

3.4 Captura das Imagens

Todas as análises deste estudo foram realizadas utilizando-se o microscópio Zeiss AxioCam CHF5 (Hallbergmoos, Alemanha) assim como o programa de captura de imagens ZEN Lite for Windows (*Blue Edition*) - 2012, localizados no Laboratório de Imunopatologia e Patologia Experimental do CBR da UFJF. Os cortes histológicos foram digitalizados em toda sua extensão (AxioCam acoplada a microscópio Zeiss, Alemanha) em aumento de 400x para histomorfometria semiautomática e estereologia das áreas de neoformação óssea (Software Zen 2.3 Blue Edition, Zeiss, Alemanha, 2012). Os resultados foram expressos em μm^2 (média/grupo) e utilizados na avaliação da área total do colágeno presente no tecido ósseo neoformado, na contagem de células totais e na densidade do número de osteócitos por área.

3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram utilizadas lâminas em cortes de 5 μm , não coradas escolhidas aleatoriamente, a partir dos diferentes grupos. O material foi encaminhado ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Ciências Exatas - ICE, da UFJF.

Antes de serem posicionadas no interior do microscópio, as amostras foram submetidas ao processo de metalização, utilizando-se, para isso, o aparelho Metalizador Leica EM SCD 050 (Leica Microsystems, Bannockburn, IL, USA) (Figura 6-A). Nesta etapa, as amostras são revestidas por uma fina camada de ouro para melhor conduzir os elétrons do microscópio sobre o material a ser analisado, facilitando seus escoamentos para a terra, evitando que a amostra fique carregada, contribuindo para melhor formação da imagem. Para isso foi utilizado um tempo de metalização de 70 segundos associado a uma corrente de 60 mA, o que fornecia uma camada de ouro equivalente a 35 nm. Posteriormente, uma vez metalizadas, as lâminas foram posicionadas aos pares sobre um porta amostra (“stub”) e aderidas por uma fita dupla face de carbono colante (Nemtape®). Em seguida, as amostras foram posicionadas e analisadas no microscópio modelo Quanta 250 (Fabricante FEI, resolução de 3 nm em alto vácuo, com HV = 30 kV) (Figura 6-B) utilizando-se como opção o detector de elétrons secundários - o qual dá melhor qualidade às imagens de maior aumento - e 20 kV em alto vácuo.

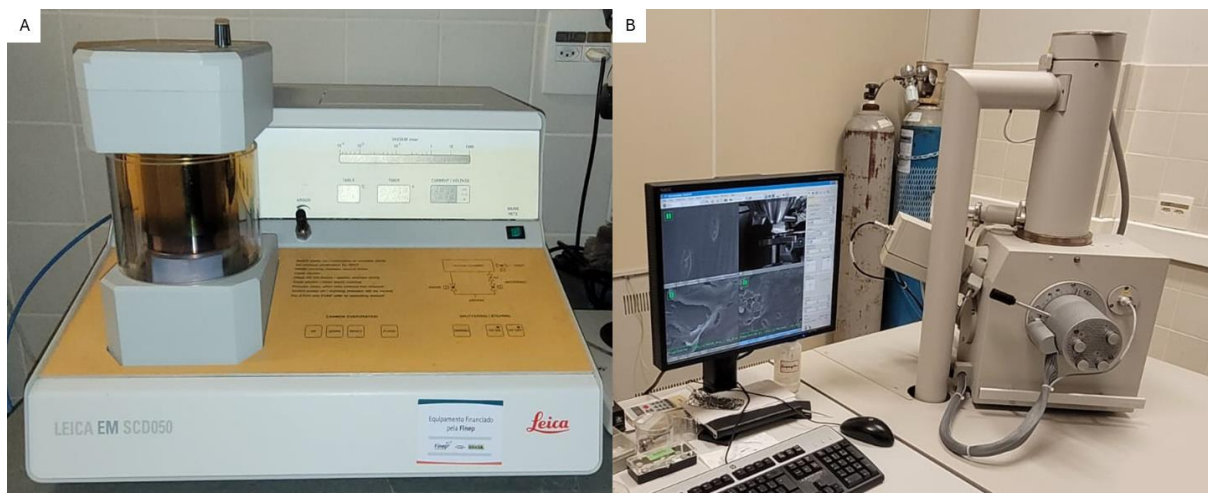


Figura 6. Materiais utilizados no protocolo de aquisição de imagens por MEV. A - Aparelho de metalização Leica EM SCD 050 (Leica Microsystems, Bannockburn, IL, EUA); B - Microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 250, modelo 2010; resolução: 3 nm em alto vácuo com HV = 30 kV e um detector de elétrons secundários. Alto

vácuo: $P < 10^{-4}$ mbar. Baixo vácuo: de 0,1 a 1,3 mbar. Tensão de aceleração: de 200 V a 30 kV. Detectores de elétrons secundários e retrodifundidos.

3.6 Análise Estatística

Os dados brutos foram organizados em uma planilha no Microsoft Excel[®]. Os dados paramétricos foram expressos em média aritmética e desvio padrão. A normalidade das amostras foi verificada pelo teste de D'Agostino & Pearson. Para os dados contínuos, foi utilizado análise de variância de um fator (One-way ANOVA) na comparação das médias dos grupos, seguido pelo Student-Newman-Keuls post hoc teste. Para dados não-contínuos, foi utilizado o Kruskal-Wallis test seguido pelo teste post hoc de Dunn. Em todos os casos, o intervalo de confiança foi fixado em 95% ($P < 0,05$). As análises foram realizadas no *software* GraphPad Prism Versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego).

4 RESULTADOS

A PDT induz a redução do número de células totais

No que diz respeito ao número de células totais presentes nas áreas de neoformação óssea, o grupo LLLT 90 ($97,55 \pm 7,942$; $P < 0,0005$) foi capaz de promover a redução nesta contagem celular quando comparado ao grupo Defeito ósseo ($165,4 \pm 12,70$), aos sete dias de tratamento. Já o grupo LLLT 90 + AM demonstrou capacidade em reduzir a contagem das células em ambos os períodos avaliados ($113,7 \pm 10,21$; $P < 0,0227$ / $66,84 \pm 7,820$; $P < 0,0001$, respectivamente). Diferentemente, o grupo azul de metileno não apresentou diminuição no número de células, permanecendo os valores semelhantes ao do grupo sem qualquer tipo de terapia em ambos os períodos avaliados (Figura 7).

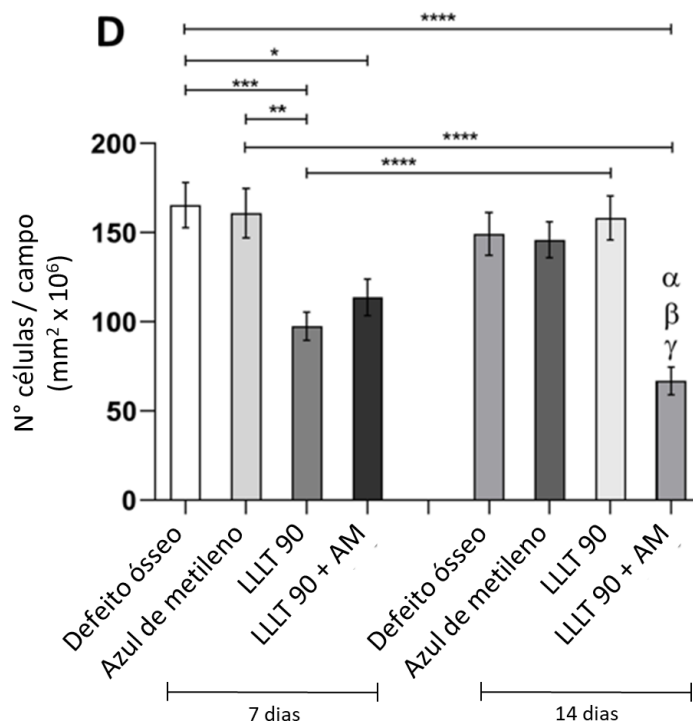


Figura 7. Número total de células (contagem realizada por estereologia através do sistema de teste de 16 pontos) presentes em defeitos realizados em fêmures de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) e irradiados pela LLLT durante 90 s, em dias alternados, associada ou não ao AM, aos sete e aos quatorze dias. Grupos: Defeito ósseo - defeitos submetidos à simulação da irradiação laser; Azul de metileno - defeitos preenchidos com 10µl de azul de metileno 0,01% e submetidos à simulação da irradiação laser; LLLT 90 - defeitos submetidos à irradiação laser direta durante o trans e pós-operatório; LLLT 90 + AM - defeitos preenchidos com 10µl de azul de metileno 0,01% e submetidos à irradiação laser direta durante o trans e pós-operatório. Os gráficos apresentam média e desvio padrão. Foi utilizado *one-way* ANOVA seguido pelo teste *post hoc* de Student-Newman-Keuls. Para todos os casos, o nível de significância foi definido em 5%. * $P < 0,05$ comparado ao grupo Defeito ósseo, aos sete dias; ** $P < 0,01$ comparado ao grupo Azul de metileno, aos sete dias; *** $P < 0,001$ comparado ao grupo Defeito ósseo, aos sete dias; **** $P < 0,00001$ comparado ao grupo LLLT 90 + AM, aos quatorze dias; α ; β ; γ $P < 0,00001$, comparado aos grupos Defeito ósseo, Azul de metileno e LLLT 90, aos quatorze dias, respectivamente. $n=04$ /grupo. LLLT - Low Level Laser Therapy.

A PDT não induz a redução de colágeno total

As fibras colágenas ligadas ao corante, assim como marcadas em vermelho brilhante e em forte contraste com o restante do tecido que permaneceu escuro, podem ser visualizadas nas figuras 8 e 9, respectivamente.

As análises referentes à quantidade total de colágeno por área de neoformação óssea ($\mu\text{m}^2 \times 10^3$), tanto nos defeitos ósseos preenchidos por azul de metileno ($P < 0,0002$) como naqueles tratados pela LLLT 90 de maneira isolada ($P < 0,0202$), apresentaram aumento quando comparados ao grupo Defeito ósseo no sétimo dia de avaliação. O grupo LLLT 90 + AM, embora tenha apresentado uma ampla distribuição de colágeno por área de matriz óssea, não apresentou diferença quando comparado ao grupo lesionado sem qualquer tipo de tratamento. Com relação ao período de análise mais avançado (14º dia), não foram observadas diferenças entre os grupos (Figura 10A e 10B).

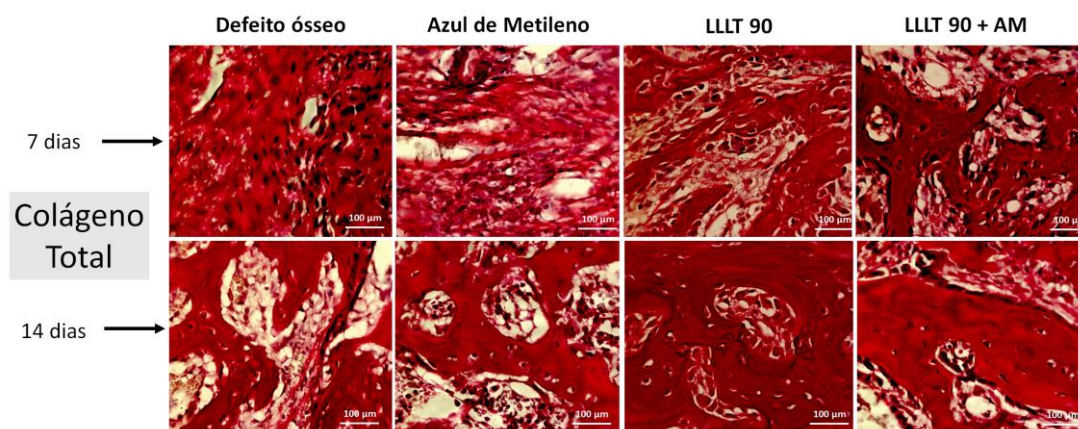


Figura 8. Análise histoquímica utilizando *Picrosirius Red* para avaliar as fibras de colágeno totais nas áreas de neoformação óssea de defeitos realizados em fêmures de ratos Wistar após LLLT associada ou não ao AM, sete e quatorze dias após o procedimento. Grupos: Defeito ósseo - defeitos submetidos à simulação da irradiação laser; Azul de metileno - defeitos preenchidos com 10µl de azul de metileno 0,01% e submetidos à simulação da irradiação laser; Grupo LLLT 90: defeitos submetidos à irradiação a laser por 90 segundos; LLLT 90 + MB: defeitos preenchidos com 10 µL de azul de metileno a 0,01% e submetidos à irradiação a laser direta por 90 segundos. LLLT (*Low Level Laser Therapy*). n=04/grupo Magnificação original: 400x / Escala da barra: 100 µm.

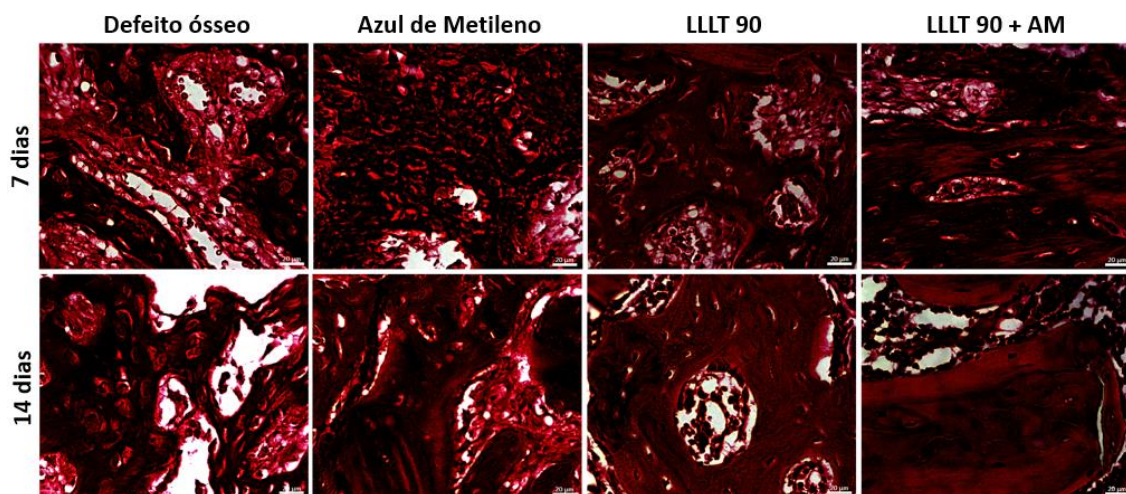


Figura 9. Detalhe das fibras colágeno em áreas de neoformação óssea de defeitos realizados em fêmures de ratos Wistar após LLLT associada ou não ao AM, sete e quatorze dias após o procedimento, utilizando lâminas coradas

com *Picrosirius Red* sob luz polarizada (vermelho brilhante). Grupos: Defeito ósseo - defeitos submetidos à simulação da irradiação laser; Azul de metileno - defeitos preenchidos com 10µl de azul de metileno 0,01% e submetidos à simulação da irradiação laser; LLLT 90 - defeitos submetidos à irradiação laser; LLLT 90 + AM - defeitos preenchidos com 10µl de azul de metileno 0,01% e submetidos à irradiação laser. LLLT (*Low Level Laser Therapy*). n=04/grupo. Magnificação original: 400x / Escala da barra 100µm.

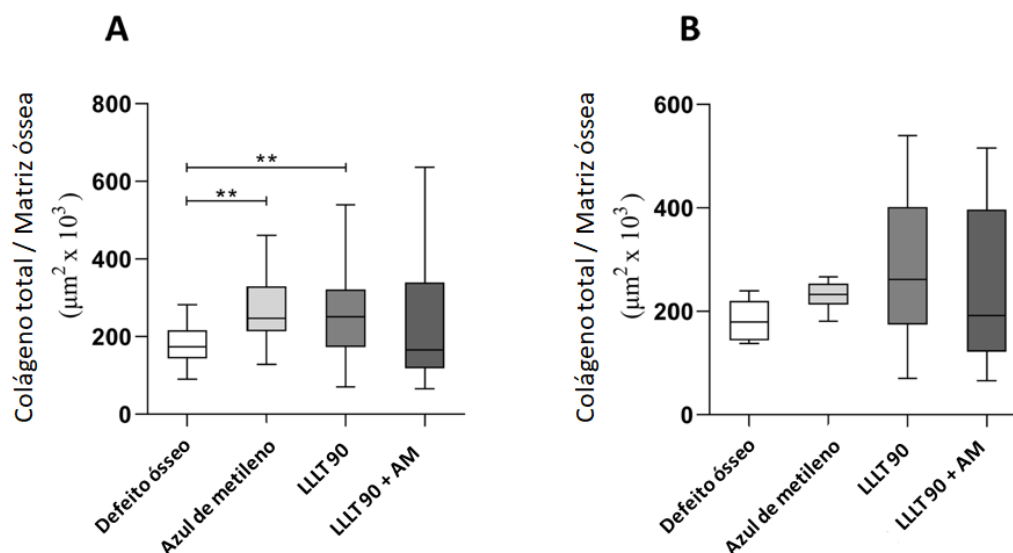


Figura 10. Quantidade total de colágeno por área de matriz óssea presente em defeitos ósseos realizados no fêmur de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) e tratados pela LLLT (luz vermelha pulsátil, 660nm, 40mW, aplicada por 90 s), associada ou não ao AM, aos sete (A) e quatorze (B) dias. Grupos: Defeito ósseo - defeitos submetidos à simulação da irradiação laser; Azul de metileno - defeitos preenchidos com 10µl de azul de metileno 0,01% e submetidos à simulação da irradiação laser; LLLT 90 - defeitos não preenchidos e submetidos à irradiação laser no trans e pós-operatórios; LLLT 90 + AM - defeitos preenchidos com 10µl de azul de metileno 0,01% e submetidos à irradiação laser no trans e pós-operatórios. Os gráficos apresentam média e desvio padrão. Foi utilizado *one-way ANOVA* seguido pelo teste *post hoc* de comparação múltipla de Dunnett. Para todos os casos, o nível de significância foi definido em 5%. **P<0,01 comparado ao grupo controle. n=04/grupo. LLLT (*Low Level Laser Therapy*).

A PDT induz a redução do número de osteócitos por área neoformada

As análises histológicas que geraram os resultados apresentados quanto à diferença do número de osteócitos por área neoformada entre os grupos, estão representados na figura 11.

Quando realizada a comparação do número de osteócitos por área neoformada entre os grupos Controle e Defeito ósseo, observou-se que esta relação apresentou valor significativamente menor no osso saudável ($2.522 \pm 0,1803$) quando comparada ao defeito sem qualquer tipo de tratamento ($20,47 \pm 1.896$), em ambos os períodos analisados (Figura 12). Ao direcionarmos as observações para o primeiro período avaliado, as análises revelaram redução significativa nos grupos LLLT 20 ($8,865 \pm 4,198$; $P < 0,0001$) e LLLT 90 + AM ($13,79 \pm 0,3622$; $P < 0,0315$), quando comparados ao grupo Defeito ósseo. Diferença também ocorreu entre os grupos irradiados pelo laser de maneira isolada, onde número de osteócitos por área neoformada no grupo LLLT 20 foi menor quando comparada ao LLLT 90 (Figura 12). Quando analisado o segundo período do estudo, os valores demonstraram médias semelhantes entre os grupos, embora com uma certa tendência na diminuição da densidade de número de osteócitos em ambos os grupos irradiados pelo laser, durante 90 s (Figura 12).

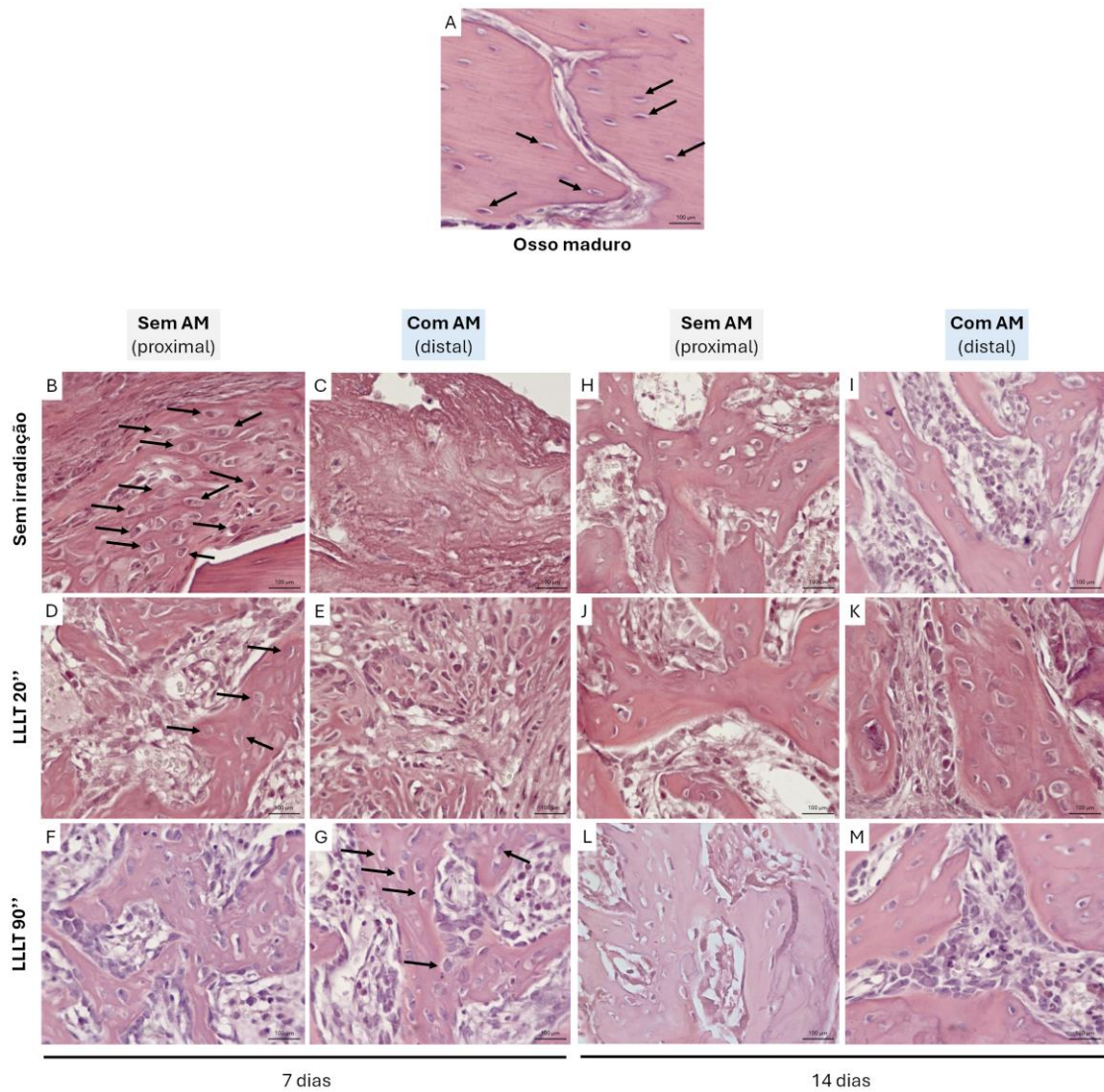


Figura 11. Fotomicrografias óptica de áreas de neoformação óssea em defeitos ósseos femorais realizados em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos de 90 dias, após sete e quatorze dias do procedimento cirúrgico e tratados pela LLLT (irradiados por 20 s e 90 s, em dias alternados), associada ou não ao AM. Análises estereológicas foram utilizadas para avaliar a densidade de número de osteócitos (setas pretas) dos diferentes grupos e compará-las ao grupo Controle. A) Controle (osso íntegro maduro); B) Defeito ósseo (7d); C) Azul de metileno (7d); D) LLLT 20 (7d); E) LLLT 20 + AM (7d); F) LLLT 90 (7d); G) LLLT 90 + AM (7d); H) Defeito ósseo (14d); I) Azul de metileno (14d); J) LLLT 20 (14d); K) LLLT 20 + AM (14d); L) LLLT 90 (14d); M) LLLT 90 + AM (14d). n=04/grupo. Magnificação original: 400x / Escala da barra: 100 μ m.

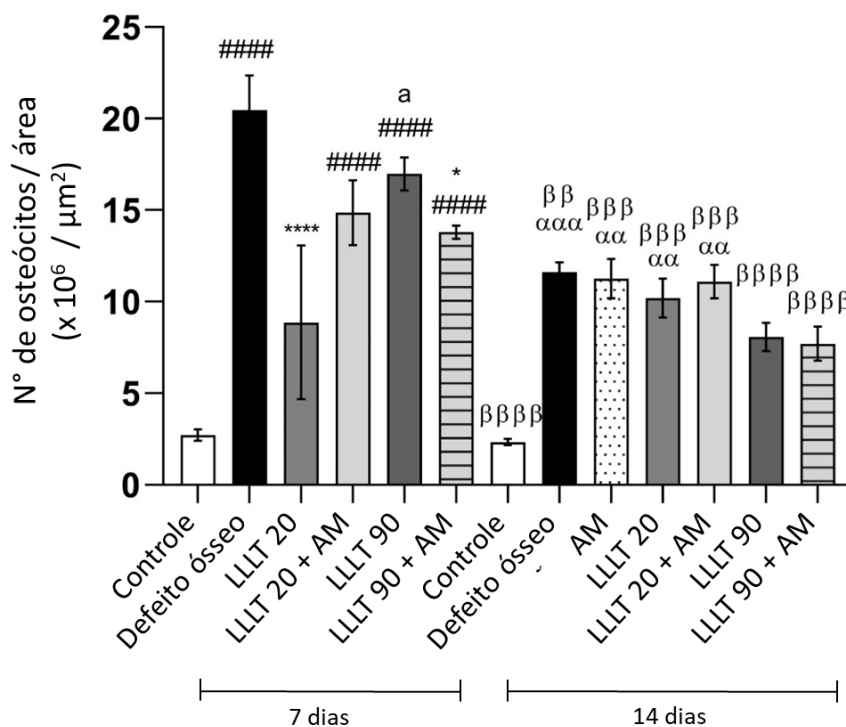


Figura 12. Número de osteócitos por área óssea neoformada ($\mu\text{m}^2 \times 10^6$) comparado a de um osso maduro, no processo de reparo em defeitos realizados no fêmur direito de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos de 90 dias, após sete e quatorze dias do procedimento cirúrgico e tratados pela LLLT (irradiados por 20 s e 90 s, em dias alternados), associada ou não ao AM. Grupos: Defeito ósseo - defeitos submetidos à simulação da irradiação pelo laser; Azul de metileno - defeitos preenchidos com 10 μl de azul de metileno 0,01% e submetidos à simulação da irradiação laser; LLLT 20 - defeitos submetidos à irradiação laser por 20 s durante o trans e pós-operatório; LLLT 20 + AM - defeitos preenchidos com 10 μl de azul de metileno 0,01% e submetidos à irradiação laser por 20 s durante o trans e pós-operatório; LLLT 90 - defeitos submetidos à irradiação laser direta por 90 s durante o trans e pós-operatório; LLLT 90 + AM - defeitos preenchidos com 10 μl de azul de metileno 0,01% e submetidos à irradiação laser direta por 90s durante o trans e pós-operatório. Os valores dos gráficos apresentam média e desvio padrão. Foi utilizado *one-way* ANOVA seguido pelo teste post hoc de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls. Para todos os casos, o nível de significância foi definido em 5%. #### $p < 0,0001$ comparado ao grupo Controle, aos sete dias; * $p < 0,01$ comparado ao grupo Defeito Ósseo, aos sete dias; **** $p < 0,0001$ comparado ao grupo Defeito Ósseo, aos sete dias; ^a $p < 0,01$ comparado ao LLLT 20 aos sete dias; ^βββ $p < 0,001$ comparado ao grupo Defeito Ósseo aos sete dias; ^ββββ $p < 0,0001$ comparado ao grupo Defeito Ósseo aos sete dias; ^ααα $p < 0,0001$ comparado ao grupo Controle, aos quatorze dias; ^αα $p < 0,00$ comparado ao grupo controle, aos quatorze dias. n=04/grupo. LLLT - *Low Level Laser Therapy*.

A PDT favorece à organização das trabéculas do tecido ósseo

Através da MEV foi possível observar, de uma maneira geral, que nenhum dos tratamentos realizados, em nenhum dos períodos de avaliação, apresentou características morfológicas semelhantes ao do grupo Controle (Figura 13-A). No entanto, diferentes características do estado de desenvolvimento e maturação óssea foram observadas entre os diferentes grupos tratados, variando entre: (1) estado inicial (fibroso) - superfície irregular contendo abundante número de células e fibras colágenas delgadas, sem sinais de neoformação óssea; (2) estado intermediário (osteogênico imaturo) - presença de infiltrado contendo células e fibras colágenas espessas e desorganizadas, entremeado por processos iniciais de neoformação óssea; (3) estado avançado (não lamelar) - áreas de neoformação óssea composta por matriz desorganizada; estado maduro (lamelar) (Figura 13-B).

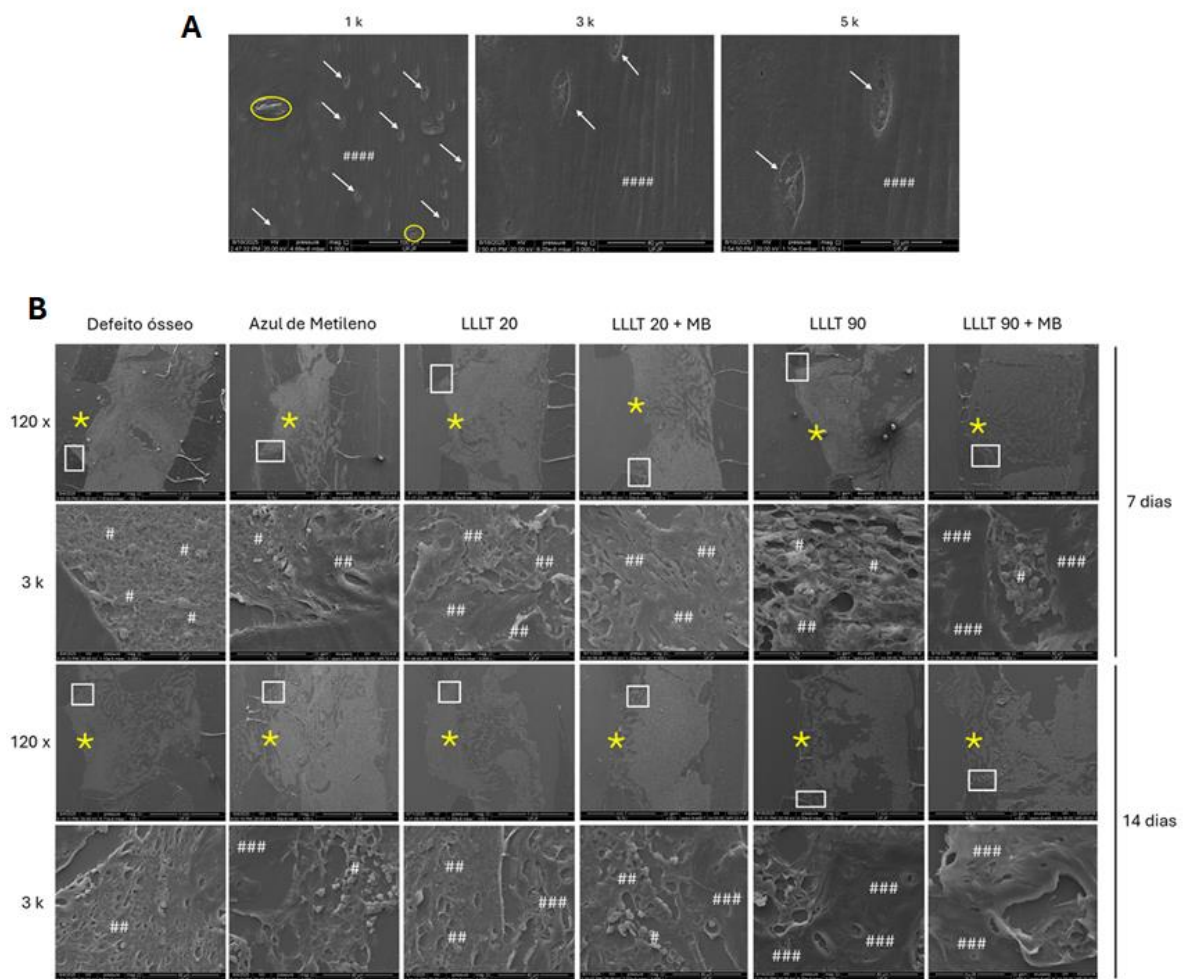


Figura 13. Imagens de microscopia eletrônica de varredura, em diferentes aumentos (120x, 1k, 3k e 5k) de fêmures de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos de 90 dias. A - Osso cortical maduro sem qualquer tipo de tratamento. Nota-se as lamelas ósseas organizadas paralelamente, entremeadas por lacunas (####) contendo osteócitos (seta branca) e canais isolados contendo vasos sanguíneos (círculo amarelo); (B) áreas de reparo ósseo em defeitos experimentais realizados com broca de 2 mm de diâmetro, em períodos distintos (sete e 14 dias). Grupos: Defeito ósseo - defeitos submetidos à simulação da irradiação laser; Azul de metileno - defeitos preenchidos por 10µl de azul de metileno 0,01% e submetidos à simulação da irradiação laser; LLLT 20 - defeitos submetidos à irradiação laser, durante 20 s; LLLT 20 + MB - defeitos preenchidos por 10µl de azul de metileno 0,01% e submetidos à irradiação laser, durante 20 s; LLLT 90 - defeitos submetidos à irradiação laser, durante 90 s; LLLT 90 + MB - defeitos preenchidos por 10µl de azul de metileno 0,01% e submetidos à irradiação laser, durante 90 s. Diferentes formações são observadas em relação ao desenvolvimento ósseo neoformado (# - fibroso; ## - intermediário; ### - avançado) nos diferentes grupos tratados. LLLT (*Low Level Laser Therapy*); *(centro do defeito ósseo); retângulos (áreas delimitadas analisadas no maior aumento). n=04/grupo.

A PDT não favorece a expressão de T-bet em linfócitos T helper-1

As análises que geraram os resultados apresentados quanto à expressão de T-bet em linfócitos presentes nas áreas de reparo ósseo, foram realizadas através de microscopia de luz em objetiva de 100x e estão representados na figura 14.

A imunopositividade para o fator de transcrição T-bet foi evidenciada por meio da marcação nuclear de coloração castanha em linfócitos presentes na área de reparo ósseo, com destaque para o grupo LLLT 90 que aumentou mais de duas vezes ($9,656 \pm 1,482$; $P < 0,0026$) a presença de células positivas marcadas por T-bet, quando comparada ao grupo Defeito ósseo ($3,163 \pm 0,8398$), mostra que a LLLT induziu maior presença de linfócitos T helper do tipo 1. A

média do grupo Azul de metileno ($4,995 \pm 1,023$) aumentou discretamente, entretanto sem diferença significativa em relação ao grupo não tratado. Já o grupo LLLT 90 + AM ($2,664 \pm 0,6660$) não apresentou aumento, como visto no grupo que se destacou, se assemelhando à média do grupo Defeito ósseo (Figura 15).

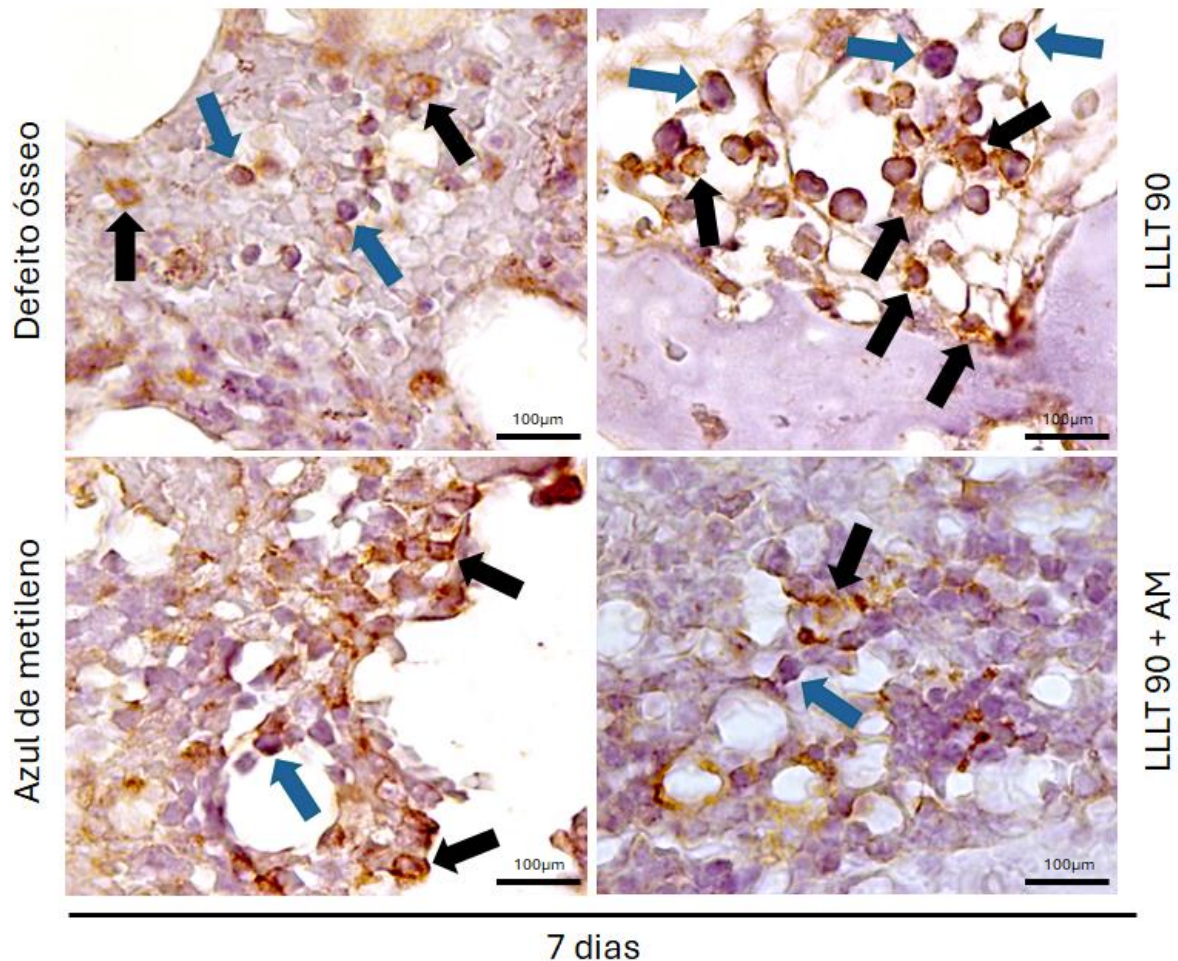


Figura 14. Análise imuno-histoquímica da expressão do fator de transcrição T-bet em linfócitos presentes nas áreas de reparo ósseo, em defeitos realizados no fêmur direito de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos de 90 dias, após sete dias do procedimento cirúrgico, tratados pela LLLT (aplicação de 90 s, em dias alternados), associada ou não ao AM. Após identificação dos linfócitos, aqueles que apresentaram marcação nuclear de coloração castanha-amarronzada (setas pretas), indicando positividade ao cromógeno diaminobenzidina 3,3' - DAB, foram quantificados; diferentemente daqueles que não apresentaram marcação (setas azuis). Grupos: Defeito ósseo - defeitos submetidos à simulação da irradiação laser; Azul de metileno - defeitos preenchidos com 10µl de azul de metileno 0,01% e submetidos à simulação da irradiação laser; Grupo LLLT 90 - defeitos submetidos à irradiação laser; LLLT 90 + AM - defeitos preenchidos com 10µl de azul de metileno 0,01% e submetidos à irradiação laser. LLLT (*Low Level Laser Therapy*). n=04/ grupo. (Magnificação original: 1000x / Escala da barra 20µm).

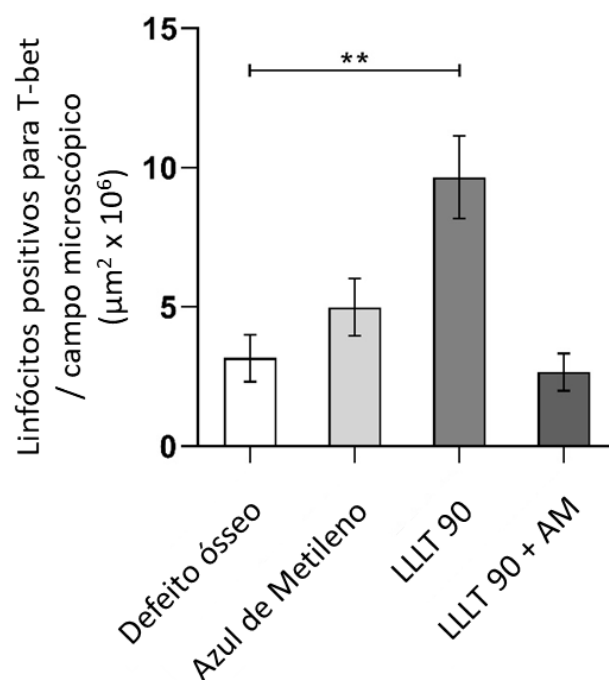


Figura 15. Resultados da expressão do fator de transcrição T-bet em linfócitos presentes nas áreas de reparo ósseo, em defeitos realizados no fêmur direito de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos de 90 dias, após sete dias do procedimento cirúrgico, tratados pela LLLT (aplicação de 90 s, em dias alternados), associada ou não AM. Grupos: Defeito ósseo - defeitos submetidos à simulação da irradiação laser; Azul de metileno - defeitos preenchidos com 10 μ l de azul de metileno 0,01% e submetidos à simulação da irradiação laser; Grupo LLLT 90 - defeitos submetidos à irradiação laser; LLLT 90 + AM - defeitos preenchidos com 10 μ l de azul de metileno 0,01% e submetidos à irradiação laser. São representados os valores das médias e desvios-padrão de cada grupo. Foi utilizado ANOVA unidirecional seguida pelo teste post hoc de Kruskal-Wallis. Em todos os casos, os níveis de significância foram definidos em 5%. **P<0,01 comparado ao grupo Defeito ósseo. LLLT (Low Level Laser Therapy). n=04/ grupo.

A PDT favorece a expressão de iNOS em células da linhagem osteoblásticas

A imunopositividade para a enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) foi evidenciada por meio da marcação citoplasmática de coloração castanha em osteoblastos e osteócitos presentes na área de reparo ósseo e revelaram aumento na expressão de iNOS tanto no grupo LLLT 90 ($1,531 \pm 0,732$) quanto no grupo LLLT 90 + AM ($2,015 \pm 0,689$), quando comparados ao grupo Defeito ósseo ($0,354 \pm 0,257$), sendo mais evidente naquele preenchido pelo corante (Figura 16).

A comparação entre os grupos quanto ao número de osteoblastos e osteócitos que expressaram iNOS por área de neoformação óssea ($\mu\text{m}^2 \times 10^6$), foi realizada através de microscopia de luz em objetiva de 40x e está representada na figura 17.

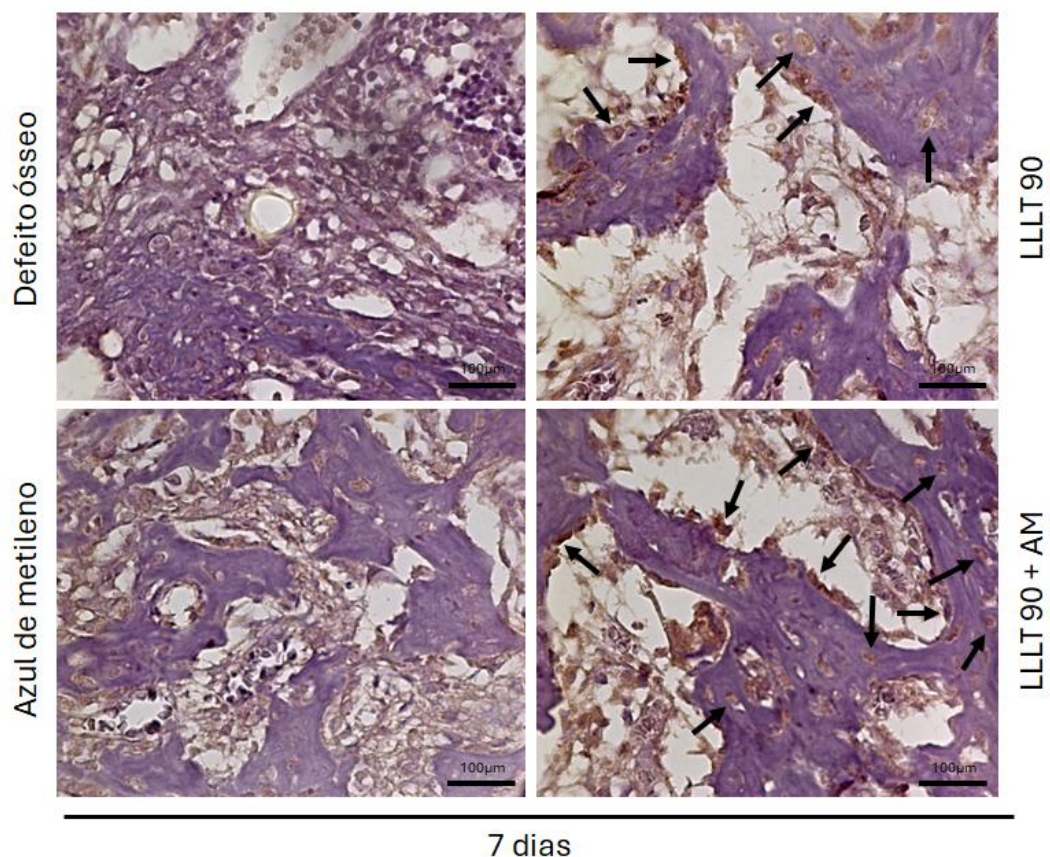


Figura 16. Análise imuno-histoquímica da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em células da linhagem osteoblástica presentes nas áreas de reparo ósseo, em defeitos realizados no fêmur direito de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos de 90 dias, após sete dias do procedimento cirúrgico, tratados pela LLLT (aplicação de 90 s, em dias alternados), associada ou não ao AM. Foram quantificados osteoblastos e osteócitos corados em marrom indicando positividade ao cromógeno diaminobenzidina 3,3' – DAB (seta preta). Grupos: Defeito ósseo - defeitos submetidos à simulação da irradiação laser; Azul de metileno - defeitos preenchidos com 10µl de azul de metileno 0,01% e submetidos à simulação da irradiação laser; Grupo LLLT 90 - defeitos submetidos à irradiação laser; LLLT 90 + AM - defeitos preenchidos com 10µl de azul de metileno 0,01% e submetidos à irradiação laser. LLLT (*Low Level Laser Therapy*). n=04/ grupo. Magnificação original: 400x / Escala da barra 100µm.

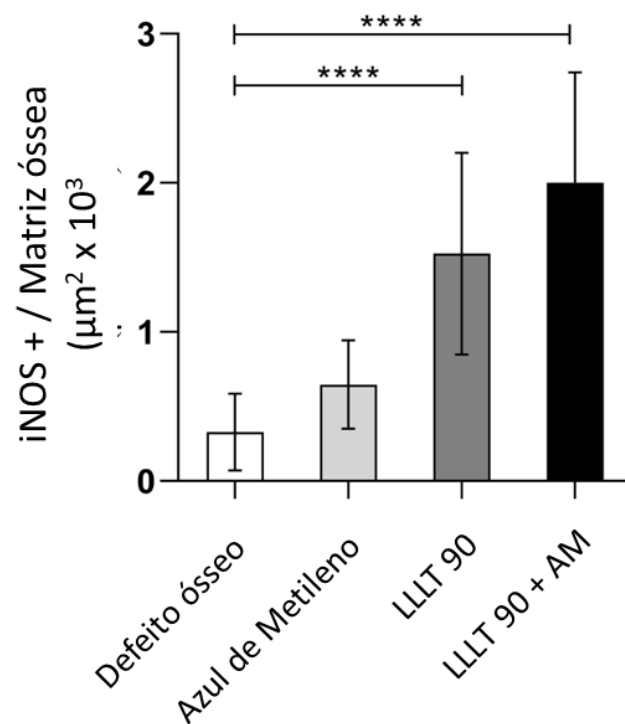


Figura 17. Expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em células da linhagem osteoblástica presentes nas áreas de reparo ósseo de defeitos realizados no fêmur direito de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos de 90 dias, após sete dias do procedimento cirúrgico e tratados pela LLLT (aplicação de 90 s, em dias alternados), associada ou não ao AM. A - Foram quantificados osteoblastos e osteócitos corados em marrom indicando positividade ao cromógeno diaminobenzidina 3,3' - DAB. Grupos: Defeito ósseo - defeitos submetidos à simulação da irradiação laser; Azul de metileno - defeitos preenchidos com 10µl de azul de metileno 0,01% e submetidos à simulação da irradiação laser; Grupo LLLT 90 - defeitos submetidos à irradiação laser; LLLT 90 + AM - defeitos preenchidos com 10µl de azul de metileno 0,01% e submetidos à irradiação laser. B - Os São representados os valores das médias e desvios-padrão de cada grupo. Foi utilizado ANOVA unidirecional seguida pelo teste post hoc de Kruskal-Wallis. Em todos os casos, os níveis de significância foram definidos em 5%. **P<0,01 comparado ao grupo Defeito ósseo. LLLT - Low Level Laser Therapy. n=04/grupo.

5 DISCUSSÃO

A partir de blocos parafinados - contendo fêmures de ratos Wistar machos com dois defeitos ósseos diafisários induzidos por broca de 2 mm acoplada a um motor de baixa rotação e irradiados pela LLLT em diferentes intervalos de tempo (20 s e 90 s), associada ou não ao azul de metileno - foi possível demonstrar efeitos variáveis nas áreas de neoformação do tecido ósseo reparado. De uma maneira geral, as análises evidenciaram melhora na quantidade, na qualidade e na maturação da matriz óssea neoformada, dos grupos irradiados com laser quando comparados a defeitos ósseos não irradiados, em ambos os intervalos de tempo analisados, sendo isto comprovado através da contagem de células totais, da densidade de número de osteócitos, do percentual de colágeno depositado, assim como através da expressão de uma das moléculas que participam da diferenciação das células da linhagem osteoblástica. Além disso, a irradiação sobre os defeitos ósseos apresentou influência direta no processo inflamatório local induzido. Os resultados referentes à deposição de matriz óssea corroboram os dados de Oliveira *et al.* (2022) que, ao utilizarem a PDT em defeitos ósseos femorais de ratos Wistar - com os mesmos parâmetros e métodos utilizados neste trabalho -, observaram aumento quantitativo no processo de reparo ósseo, tanto aos sete (484%) como no décimo quarto dia (214%), quando irradiados por 90 s. Além disso, os autores também concluíram que, quando utilizada de maneira isolada, a LLLT também foi capaz de aumentar a área de neoformação, melhorando o reparo ósseo, entretanto isto ocorreu somente no décimo quarto dia (240%).

A síntese de colágeno desempenha um papel relevante durante o início do reparo ósseo e terapias capazes de induzir a deposição desta proteína na matriz podem beneficiar o tratamento de fraturas (STEWART; RALSTON, 2000). A LLLT apresenta efeitos estimulatórios no metabolismo tecidual capazes de promover proliferação celular (PALLOTTA *et al.*, 2012) e aumento na produção e deposição de colágeno por fibroblastos e osteoblastos (SAMOILOVA *et al.*, 2008; BOSSINI *et al.*, 2012) favorecendo, conseqüentemente, à formação e a organização do reparo ósseo (CHEN *et al.*, 2009). De acordo com os resultados encontrados nesta pesquisa, tanto o grupo Azul de metileno quanto o grupo LLLT 90 apresentaram aumento na quantidade total de colágeno por área de matriz óssea em defeitos ósseos realizados no fêmur de ratos Wistar aos sete dias de avaliação. A deposição de colágeno, investigada através de análises utilizando a coloração *Picrosirius Red* permitiu correlacionar o crescimento da área óssea primária (trabecular) com a deposição de fibras de colágeno. Segundo Rittié (2017), essa coloração é usada para investigar, de maneira qualitativa e quantitativa a birrefringência das tonalidades vermelha e amarela indicativas dos feixes de fibras de colágeno tipo I e III, respectivamente, presentes nos diferentes estágios de organização da matriz óssea. Desta forma o presente estudo corrobora àquele realizado por Garavello-Freitas *et al.* (2003) que utilizaram *Picrosirius Red* e demonstraram que a LLLT é capaz de estimular o crescimento da área trabecular e acelerar a organização do colágeno da matriz durante a primeira semana de reparo ósseo. Da mesma forma, Bossini *et al.* (2012) demonstraram que animais irradiados pela LLLT apresentaram maior deposição e melhor organização de fibras de colágeno, quando comparadas ao grupo controle.

Apesar de o grupo LLLT 90 + AM não ter apresentado aumento na quantidade total de colágeno por área de matriz, relatos da literatura demonstram que quando utilizada em cultura de células do tecido ósseo (linhagem celular de osteoblastos humanos), a PDT - com corantes azul de metileno ou verde de indocianina - é capaz de promover alteração na atividade osteoanabólica celular, ao promover aumento nas expressões de fosfatase alcalina e de colágeno tipo I, além de melhorar a mineralização pelos osteoblastos existentes (ATES *et al.*, 2017; ATES *et al.*, 2018).

Embora o presente trabalho traga resultados positivos quanto às análises das fibras colágeno utilizando somente a coloração *Picrosirius Red*, outras metodologias podem ser utilizadas na avaliação desta proteína constituinte da matriz óssea, incluindo a avaliação da expressão gênica de colágeno tipo I, assim como análise imuno-histoquímica desta proteína. Tim *et al.* (2016) avaliaram os efeitos da LLLT em defeitos ósseos de 3 mm de diâmetro, realizados na tíbia de ratos Wistar, 5 dias após sua confecção. Durante os estágios iniciais da reparação do tecido ósseo - período mais ativo no recrutamento de células - os autores encontraram que as fibras colágenas apresentaram maior organização e maturação, quando comparadas ao grupo controle, ao mesmo tempo em que as análises genética e imuno-histoquímica evidenciaram regulação positiva na expressão do gene e da proteína do colágeno tipo I, respectivamente.

Apesar de esforços, a falta de consenso e a ausência de padronização dos diversos parâmetros da LLLT nos diferentes tecidos até hoje encontra dificuldades (MAGHFOUR, *et al.*, 2025). De acordo com Berni *et al.* (2023) - que realizaram uma revisão sistemática e meta-análise das principais evidências que estabelecem o papel da LLLT, a nível molecular, no processo de cicatrização óssea -, embora apresentem ações comprovadas no tecido ósseo e diferentes aplicações clínicas, a literatura não fornece conhecimento preciso sobre a estimulação de respostas celulares da LLLT no tecido ósseo devido à ampla diferença nos parâmetros de dosimetria (comprimento de onda, densidade de potência, energia, tempo de irradiação, frequência de repetição e distância) que são utilizados, o que demonstra que as evidências da literatura são conflitantes, não comparáveis e, por isso, inconclusivas. O experimento que gerou os resultados deste estudo foi realizado durante o período de mestrado e reportado aqui, na seção de material e métodos, para melhor entendimento do leitor. Os parâmetros (ArGa, 660 nm, luz vermelha pulsátil, 40 mW, 2,3 J/cm², em intervalos de tempo de 20 s e 90 s) e momentos de aplicações (durante a cirurgia e em dias alternados) do laser utilizado, baseou-se em um levantamento prévio da literatura, realizado à época, onde foram calculadas as menores e maiores médias de intervalos de tempo e protocolos de aplicação da LLLT sobre defeitos ósseos experimentais. Como podemos observar, o simples fato de alterar uma das variáveis - como por exemplo “intervalo de tempo” - já foi suficiente para tornar os resultados aqui encontrados de difícil comparação com aqueles presentes na literatura.

Quanto ao volume de 10 µl de AM utilizado nos defeitos ósseos distais do presente estudo e que geraram os grupos AM, LLLT 20 + AM e LLLT 90 + AM, foi calculado de maneira prévia em análise que avaliou diferentes volumes de AM capazes de preencher o defeito ósseo femoral realizado com uma broca de 2 mm de diâmetro, sem que houvesse o transbordamento do corante para outras regiões, o que dificultaria controlar e padronizar o local em que o corante pudesse atingir. No entanto, a drenagem de parte do volume de AM para dentro do canal medular não foi limitada, sendo possível sua migração tanto no sentido proximal quanto distal no interior do osso. No entanto, de acordo com os diferentes resultados encontrados entre os grupos, sugerem que esta possibilidade não tenha ocorrido. Além disso, certificamos que nenhum outro tipo de substância tenha sido adicionada no local, apenas o AM a 0,01%. A única associação utilizada foi o uso do laser de baixa intensidade - caracterizando a PDT - naqueles defeitos irradiados. A decisão pela escolha desta concentração do corante ocorreu pelo fato de esta ser aquela mais comumente encontrada no mercado de produtos da área da saúde para uso da PDT, além de apresentar-se de fácil aquisição, fácil aplicação e não apresentar efeitos colaterais. Quando utilizada para outras finalidades, a concentração de AM a 0,01% já foi testada previamente. Marotti *et al.*, (2010) relataram sua utilização no tratamento de herpes labial em pacientes humanos, os quais apresentaram melhoras das vesículas labiais e alívio da dor. Pasini (2014) avaliou histologicamente o efeito de diferentes formulações de AM na PDT como adjuvante ao tratamento periodontal convencional sobre as fibras colágenas do tecido

gingival e no tratamento da doença periodontal induzida em ratos, e perceberam que a ação das diferentes formulações do agente fotossensibilizador foi semelhante na quantidade e organização das fibras colágenas, o que, consequentemente, indica que os produtos associados não promovem interferência. Sperandio *et al.* (2010) investigaram o processo de cicatrização de feridas realizadas no dorso de ratos após PDT mediada pelo AM e observaram que não houve atraso da cicatrização da ferida quando comparada ao grupo controle. Já Oliveira *et al.* (2022), obtiveram excelentes resultados da PDT no processo de reparo ósseo em defeitos induzidos no fêmur de ratos Wistar e tratados com LLLT, com avanços no reparo tecidual tanto aos sete como aos 14 dias, resultados comprovados no presente trabalho.

A utilização da MEV no processo de avaliação qualitativa permitiu observar, de maneira detalhada, variações estruturais nas áreas de neoformação nos diferentes grupos. Através do aumento de 120 x, observou-se os defeitos ósseos de maneira ampla e com detalhes da interseção entre as corticais e o canal medular, assim como da área de preenchimento pelo tecido em formação. Com o aumento de 3000 x (3k) evidenciou-se a microarquitetura local, possibilitando visualizar variações na qualidade do tecido ósseo neoformado, principalmente quanto a sua porosidade e organização, sendo possível, inclusive, compará-la a de uma cortical madura. Segundo a literatura, a MEV constitui uma técnica capaz de obter informações estruturais e analíticas detalhadas do tecido ósseo e tem sido amplamente empregada para a análise da microarquitetura do tecido ósseo, investigação dos processos de reabsorção *in vitro* e *in vivo*, bem como para avaliar as estruturas de superfície e as interações célula-matriz em diferentes substratos (SHAH *et al.*, 2019). A técnica permite a utilização de uma ampla faixa de ampliações - variando de 10 a 10.000 vezes - o que possibilita tanto uma visão panorâmica das amostras quanto a observação minuciosa de detalhes microestruturais (MARSHALL *et al.*, 2003). Quando aplicada na avaliação do reparo ósseo, a MEV possibilita uma análise semiautomática e quantitativa do tecido neoformado, permitindo determinar o número, a área e a circunferência de regiões ainda não preenchidas, contribuindo, assim, para uma caracterização morfológica precisa do processo regenerativo (FOLLAK *et al.*, 2003; YAMAMOTO *et al.*, 2012).

As análises estereológicas há anos vem sendo utilizadas em pesquisas na área da saúde (GUNDERSEN *et al.*, 1998; MANDARIM DE LACERDA, 2003), demonstrando resultados comprovados em diversos tipos de tecidos (MATHIEU *et al.*, 2013; DADRAS, *et al.*, 2018; MELCHIORETTO *et al.*, 2020). Com o uso deste recurso foi possível estimar a área de tecido ósseo neoformado e o número total de osteócitos presentes nestas áreas, o que permitiu definir a densidade de número de osteócitos após os diferentes tratamentos realizados. Através desta metodologia observou-se que este parâmetro diminuiu nos grupos LLLT 20 e LLLT 90 + AM, aos sete dias de avaliação, quando comparado ao grupo Defeito ósseo, demonstrando uma tendência aos valores da densidade encontrados em um osso maduro (grupo Controle), corroborando dados da literatura, que afirmam que a LLLT é capaz de promover a antecipação da maturação do processo de reparo ósseo, tanto quando utilizada de maneira isolada (UEDA *et al.*, 2003; FONSECA *et al.*, 2022) quanto associada ao AM (OLIVEIRA *et al.*, 2022). A presença dos osteócitos em áreas de neoformação óssea é um dos indicadores microscópicos de viabilidade e sucesso de consolidação de fraturas (ANDRADE *et al.*, 2007) e a densidade de número de osteócitos já foi utilizada posteriormente ao uso da LLLT, apresentando-se como um potencial indicador da maturação do tecido ósseo no processo de reparo ósseo em modelos de osteoporose (MOHSENFAR *et al.*, 2016; SCALIZE *et al.*, 2019; SEMEGHINI *et al.*, 2022).

Na confirmação dos nossos resultados, em se pensando do lado benéfico da LLLT, a maior expressão de iNOS estaria relacionada à maior produção NO, o que leva ao aumento da angiogênese e da vasodilatação, favorecendo a regeneração; por outro lado, se pensado pelo lado maléfico da produção de NO, a LLLT estaria aumentando a expressão de peroxinitrito e

uma menor taxa de deposição e maturação óssea seria observada, no entanto, não foi o que nós observamos. Desta forma, tudo leva a crer que o aumento de iNOS se direcionou para a primeira situação que, assim como qualquer outro tipo de processo inflamatório e regenerativo, promove a formação de novos vasos sanguíneos e vasodilatação, favorecendo à migração de MSC's, que por sua vez se diferenciam em osteoblastos. Um dos efeitos mais relevantes do NO nos tecidos corresponde à sua reconhecida ação sobre o sistema vascular, promovendo vasodilatação capaz de aumentar a perfusão tecidual local (IGNARRO, 2002). No contexto da regeneração óssea, essa molécula induz a angiogênese a partir de vasos preexistentes, favorecendo a restauração da microvascularização no foco de fratura, contribuindo tanto para a resolução da fase inflamatória quanto para as etapas seguintes, caracterizadas pela intensificação da atividade osteoblástica (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2018). A LLLT é capaz de promover relaxamento da musculatura lisa vascular imediatamente após a irradiação, resultando em vasodilatação local nas fases iniciais do processo inflamatório, efeito este associado ao aumento da biodisponibilidade de NO (KARU; PYATIBRAT; KOLYAKOV, 2005). No tecido ósseo, ao estimular a angiogênese, a LLLT exerce impacto positivo sobre a atividade e diferenciação de osteoblastos (KHAN *et al.*, 2018), contribuindo para maior formação de tecido ósseo regenerado e para aceleração do reparo de defeitos ósseos experimentais (BAI *et al.*, 2021). No presente estudo, a análise da expressão de iNOS evidenciou que o aumento dessa enzima ocorreu em ambos os grupos submetidos à LLLT, independentemente do agente fotossensibilizador, ao mesmo tempo em que tais grupos apresentaram melhor organização do trabeculado ósseo. Assim, sugere-se que o efeito vasodilatador mediado pelo NO, quando associado à ação da LLLT, possa ter contribuído para os resultados observados.

Embora não tenha apresentado diferença em relação ao grupo Defeito ósseo, o grupo de defeitos preenchidos por AM e não irradiado, demonstrou uma tendência no aumento da expressão de iNOS. Quando somado ao laser, durante 90 s, os resultados sugerem que juntos, o LLLT e o AM são capazes de promover efeito sinérgico na expressão de iNOS, o que pode direcionar o entendimento da via de indução da atividade osteoblásticas desta associação ao NO. Desta forma, é prudente pensar que o AM possa estar relacionado ao aumento da expressão de iNOS no grupo em que as terapias foram associadas. Apesar de ainda não se ter definido qual é o mecanismo molecular deste corante na terapia de doenças, no processo inflamatório, assim como sua interação com o sistema imunológico, estudos demonstram algumas possibilidades do seu envolvimento capazes de auxiliarem neste entendimento. Quando utilizado em camundongos com trauma crânioencefálico induzido, o AM demonstrou capacidade em reduzir a neuroinflamação por meio da atenuação da expressão de genes inflamatórios, como interleucina-1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), em microglia/macrófagos (FENN *et al.*, 2015); ao ser utilizado sobre a ativação de inflamassomas - complexos proteicos que induzem a maturação de algumas interleucinas (ILs - 1 β e 18) e a morte celular mediada por caspase-1 - o AM foi capaz de atenuar a ação de alguns destes complexos (NLRP3, NLRC4 e AIM2), ao promover a inibição de sua montagem e sua expressão gênica via inibição da sinalização de NF- κ B, assim como reduzir a atividade de caspase-1 (AHN *et al.*, 2017); além disso, o AM previne a formação de superóxido e NO nas mitocôndrias, sendo, desta forma, capaz de melhorar o metabolismo oxidativo cerebral, aumentando o consumo de oxigênio mitocondrial (SCHIRMER *et al.*, 2011); ao ser investigado em hipotensão refratária a medicamento vasopressores diante de sepse grave induzida por lipopolissacarídeo (LPS), o AM demonstrou ser capaz reduzir o acúmulo de NO por meio da supressão da atividade da iNOS, sendo este efeito comprovado devido à redução das interações do NF- κ B e do transdutor de sinal e ativador da transcrição 1 (STAT-1) com a região promotora do gene da iNOS, bloqueando, consequentemente, a ligação de fatores de transcrição responsáveis pela síntese do mRNA de iNOS (HUANG *et al.*, 2015).

A provável hipótese para os achados do parágrafo anterior pode estar relacionada ao mecanismo de ação do laser - associado ou não ao AM - que envolve o metabolismo mitocondrial celular e a formação de ROS (HOCHMAN, 2018). Sabe-se que quando utilizada no controle de microorganismos e de neoplasias, a PDT gera ROS, como superóxido (O_2^-), radicais hidroxila (OH), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete (1O_2) (ONISZCZUK *et al.*, 2016; KWIATKOWSKIA *et al.*, 2018), capazes de levar ao desequilíbrio destas moléculas no interior das células, promovendo estresse oxidativo, o que resulta na destruição celular (KONOPKA; GOSLINSKI, 2007; ROBERTSON *et al.*, 2009; REDDY *et al.*, 2012; SELLERA *et al.*, 2014; ONISZCZUK *et al.*, 2016; KWIATKOWSKIA *et al.*, 2018). No entanto, no que diz respeito ao uso desta terapia no processo de reparo ósseo, seu mecanismo de ação ainda encontra-se indefinido. O que está claro é que: dentre outros fatores, as lesões decorrentes de cirurgias, traumas e fraturas, são causas conhecidas de aumento do estresse oxidativo; que o NO também está envolvido na formação de ROS - proveniente do sistema enzimático celular (HOLMSTRÖM; FINKEL, 2014); e que, quando utilizada no processo de reparo ósseo, a LLLT pode promover a fotodissociação do NO - frequentemente ligado ao sítio ativo heme-cobre da citocromo C oxidase - aumentando a renovação metabólica (MONCADA; ERUSALIMSKY, 2002; BALL *et al.*, 2011). Desta forma, entende-se que esse processo é capaz de melhorar a respiração celular assim também como favorecer os tecidos circundantes pelas já reconhecidas ações do NO em mediar a vasodilatação, promover a angiogênese e melhorar respostas inflamatórias e imunológicas (BOGDAN, 2001), levando-nos a inferir que tal molécula esteja envolvida no processo de reparo ósseo, sendo isto o que provavelmente promoveu aumento da expressão da enzima demonstrado. No entanto, indaga-se qual seria o comportamento da outra via de ação do NO - formação de peroxinitrito - no reparo do tecido ósseo, visto que o mecanismo de ação da PDT quando utilizado para outras finalidades, envolve diretamente o estresse oxidativo celular. Neste sentido, como perspectivas futuras, o aprofundamento das vias relacionadas às RNS e à ROS diante da ação da PDT no processo de reparo ósseo se faz questionável.

Diversos estudos demonstram que o processo inflamatório é capaz de induzir à formação de NO a partir de iNOS (LIN *et al.*, 1996; VANT HOF; RALSTON, 2001; WIMALAWANSA, 2010; DAS *et al.*, 2015; NASCIMENTO *et al.*, 2020) e que, a depender do estímulo, pode promover a diferenciação de células T virgens em linfócitos Th1. Além disso, outros estudos trazem que a LLLT é capaz de regular positivamente diversas ações do processo inflamatório, como na inibição da expressão de ciclooxygenase 2 / IL-1 e IFN- γ (ROCHA JÚNIOR, *et al.*, 2009; ROCHA, *et al.* 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2012; BRITO *et al.*, 2024). Pesquisas envolvendo estes elementos demonstram que respostas distintas podem ocorrer quando são avaliados em diferentes tipos celulares e tecidos. Curiosamente, os resultados aqui apresentados demonstraram que o grupo LLLT 90 apresentou aumento significativo na expressão de T-bet e de iNOS, o que sugere que a ação anti-inflamatória da LLLT no processo de reparo ósseo não ocorreu por nenhuma destas duas vias, no sétimo dia de avaliação. Estes resultados corroboram aqueles encontrados por Silva *et al.* (2016) que avaliaram a influência da LLLT na liberação de NO e na viabilidade celular em culturas de macrófagos irradiados com laser Ga-Al-As em comprimentos de onda de 660 e 808 nm, e diferentes densidades de energia e potência. Os autores observaram que a LLLT apresenta um impacto significativo no aumento da liberação de NO sem afetar a viabilidade celular, no entanto eles não conseguiram elucidar a significância destes achados na resposta inflamatória. Por outro lado, Lima *et al.* (2013) ao avaliarem o efeito da LLLT (660 nm, 7,5 J/cm²) na liberação de mediadores inflamatórios de pulmões após isquemia e reperfusão intestinal em ratos, encontraram que a terapia foi capaz de controlar a resposta inflamatória do pulmão e a disfunção da reatividade das vias aéreas, ao reduzir simultaneamente TNF- α (citocina efetora das células Th1) e o iNOS.

Embora o nosso estudo tenha ocorrido no reparo ósseo, a hipótese deste trabalho surgiu da incerteza em que resposta do perfil Th1 apresenta na reabsorção óssea, seja inibindo (VALSH *et al.*, 2018) ou ativando (MURAYAMA *et al.*, 2024) a osteoclastogênese. Quando avaliados os dados da expressão de T-bet e, levando-se em consideração que no presente estudo houve também aumento na neoformação óssea nos defeitos de alguns grupos, podemos entender que houve a supressão da osteoclastogênese. Sabendo-se que o LLLT apresenta papel na neoformação (TIM *et al.*, 2016; BAI *et al.*, 2021) e que os nossos resultados convergem para esta informação, podemos dizer que as células diferenciadas pela expressão de T-bet (linfócitos Th1) apresentaram efeito supressor na osteoclastogênese, devido à maior deposição de osteóide e formação óssea observada. Desta forma, sugere-se que a LLLT pode estimular, via ativação de T-bet, a diferenciação de linfócitos virgens em Th1, o que não foi observado no grupo tratado pela LLLT associado ao AM.

Reconhece-se que o presente estudo apresenta limitações em alguns aspectos, tais como: (1) o baixo número de defeitos ósseos por grupo; (2) o número de períodos analisados ao longo do processo de reparo ósseo; assim como (3) a reduzida exploração do número de vias que envolvem a osteoimunologia. Embora tenham sido obtidos resultados consistentes dos efeitos positivos da terapia proposta no processo de reparo ósseo a partir das diferentes análises realizadas, nem todas as avaliações foram realizadas de maneira completa nos períodos avaliados. Levando-se em consideração que o ciclo de reparo de defeitos ósseos ocorre aproximadamente em 28 dias em roedores saudáveis (WALSH *et al.*, 2018), o entendimento do uso da PDT permanece limitado às fases iniciais desse processo e incerto durante as demais fases. Desta forma, recomenda-se que novas investigações relacionadas ao tema possam ser realizadas com experimentos que incluam um número maior de defeitos ósseos por grupo, assim como que a estas análises sejam acrescidos outros períodos de análises que auxiliem na complementação dos resultados aqui iniciados. Além disso, considera-se que a incorporação de novos métodos - como por exemplo, análise genética e outras imunológicas - possam contribuir para uma compreensão mais abrangente do envolvimento da PDT nas vias que interligam o processo inflamatório do tecido ósseo às respostas imunológicas, ampliando, assim, o entendimento de seus mecanismos de ação na osteoimunologia.

Baseado nos resultados aqui apresentados, assim como naqueles demonstrados por Oliveira *et al.* (2022) - nos quais ambos demonstram potencial da PDT no processo de reparo de defeitos ósseos - cabe pensar numa perspectiva clínica futura quanto à utilização desta terapia. No entanto, uma importante limitação prática encontrada na forma de aplicação e utilização do AM diretamente sobre a lesão - como comumente aplicado em lesões tegumentares -, assim como na irradiação direta de uma fonte de luz sobre a área afetada, pode ser contornada ao se analisar que muitas intervenções cirúrgicas ortopédicas são realizadas de forma minimamente invasiva, e que novos métodos de utilização da PDT no tratamento de lesões não cutâneas tem sido realizados (PETERS *et al.*, 2005; DOS SANTOS, 2020; YANO; WANG, 2020). Desta forma, sugere-se o desenvolvimento de novos dispositivos capazes de entregar não apenas o produto (AM) ao local afetado, como também a irradiação laser, o que poderá permitir que pacientes possam se beneficiar dos resultados deste trabalho - embora saibamos que estudos clínicos deverão ser realizados antes da implementação deste protocolo na rotina.

Em conjunto, os resultados desta pesquisa sugerem que a PDT - além das suas clássicas ações - também pode atuar de maneira promissora no reparo do tecido ósseo, ao ser capaz de favorecer os estágios iniciais das áreas neoformadas em defeitos experimentais, ao promover sua melhor organização. O aumento na expressão de iNOS contribui para o estímulo da atividade osteoblástica, promovendo aumento na deposição de colágeno, no número de osteócitos e na adequada organização morfológica do local reparado. No entanto, vimos que a

LLLT associada ao AM não interferiu na expressão T-bet, sugerindo que a PDT não promove ação na resposta imunomediada por estas células.

6 CONCLUSÃO

A partir do presente estudo, conclui-se que a Terapia Fotodinâmica (PDT), quando utilizada de maneira precoce, foi capaz de melhorar a morfologia da matriz óssea em áreas de neoformação após defeitos femorais induzidos em ratos, sugerindo que esta ação seja induzida pelo aumento na concentração de NO, via aumento na expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS). No entanto, a terapia não modificou a resposta inflamatória do perfil Th1, pois não promoveu alteração na expressão do fator nuclear T-bet em linfócitos T *helper* 1.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, B.J. **Histologia essencial**. 1ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 457 p.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 9. ed. Philadelphia: Elsevier, 2018.
- ADAMOPOULOS, I. E.; CHAO, C. C.; GEISSLER, R.; LAFACE, D.; BLUMENSCHNEIN, W.; IWAKURA, Y.; McCLANAHAN, T.; BOWMAN, E. P. Interleukin-17A upregulates receptor activator of NF-kappaB on osteoclast precursors. **Arthritis Research & Therapy**, v. 12, p. 29, 2010.
- AGOSTINIS, P.; BERG, K.; CENGEL, K.A.; FOSTER, T.H.; GIROTTI, A.W.; GOLLNICK, S.O.; HAHN, S.M.; HAMBLIN, M.R.; JUZENIENE, A.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; MROZ, P.; NOWIS, D. Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, p. 250-281, 2011.
- AHMAD, N.; ANSARI, M.Y.; HAQQI, T.M. Role of iNOS in osteoarthritis: pathological and therapeutic aspects. **Journal of Cellular Physiology** v. 235, n.10, p.6366-6376. 2020.
- AHN, H.; KANG, S.G.; YOON, S.; KO, H.J.; KIM, P.H.; HONG, E.J.; AN, B.S.; LEE, E.; LEE, G.S. Methylene blue inhibits NLRP3, NLRC4, AIM2, and non-canonical inflammasome activation. **Scientific Reports**, v. 7, p. 12409, 2017.
- AKYOL, U.K.; ALKAN, A.; YILDIZ, A.B.; ATES, B.; GOKAY, N. S.; KAYA, M.; KOCYIGIT, I. The influence of low-level laser therapy with alendronate irrigation on healing of bone defects in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 3, p. 1141-1146, 2015.
- ALFORD, A.; KOZLOFF, K.M.; HANKENSON, K.D. Extracellular matrix networks in bone remodeling. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 65, p. 20-31, 2015.
- ALIDADI, S.; ORYAN, A.; BIGHAM-SADEGH, A.; MOSHIRI, A. Role of platelet gel embedded within gelatin scaffold on healing of experimentally induced critical-sized radial bone defects in rats. **International Orthopaedics (SICOT)**, v. 41, p. 805-812, 2017.
- 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.
- AMINI, A.R.; LAURENCIN, C.T.; NUKAVARAPU, S.P. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. **Critical Reviews in Biomedical Engineering**, v. 40, n. 5, p. 363-408, 2012.
- 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.

ARBOLEYA, L.; CASTAÑEDA, S. Osteoimmunology: The study of the relationship between the immune system and bone tissue. **Reumatología Clínica**, v. 9, n. 5, p. 303-315, 2013.

ARRON, J. R.; CHOI, Y. Bone versus immune system. **Nature**, v. 408, p. 535-540, 2000.

ASTM INTERNATIONAL. **Standard guide for pre-clinical in vivo evaluation in critical size segmental bone defects**. West Conshohocken, PA: ASTM International, 2014.

ATES, G.B.; AK, A.; GARIPCAN, B.; GÜLSOY, M. Methylene blue mediated photobiomodulation on human osteoblast cells. **Lasers in Medical Science**, 2017.

ATES, G.B.; AK, A.; GARIPCAN, B.; GÜLSOY, M. Indocyanine green-mediated photobiomodulation on human osteoblast cells. **Lasers in Medical Science**, 2018.

BAHT, G. S.; VI, L.; ALMAN, B. A. The role of the immune cells in fracture healing. **Current Osteoporosis Reports**, v. 16, p. 138-145, 2018.

BAI, L.; LI, L.; KOU, N.; BAI, Y.; ZHANG, Y.; LU, Y.; GAO, L.; WANG, F. Low level laser therapy promotes bone regeneration by coupling angiogenesis and Osteogenesis. **Stem Cell Research & Therapy**, v.12, p.432, 2021.

BALDIK, Y.; DIWAN, A.D.; APPELYARD, R.C.; FANG, Z.M.; WANG, M.X.; MURRELL, G.A.C. Deletion of iNOS gene impairs mouse fracture healing. **Bone**, v. 37, n. 1, p. 32-36, 2005.

BALL, K.A.; CASTELLO, P.R.; POYTON, R.O. Low-intensity light stimulates nitrite-dependent nitric oxide synthesis but not oxygen consumption by cytochrome c oxidase: implications for phototherapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 102, p. 182-191, 2011.

BASSO, N.; HEERSCHE, J.N.M. Effects of hind limb unloading and reloading on nitric oxide synthase expression and apoptosis of osteocytes and chondrocytes. **Bone**, v. 39, p. 807-814, 2006.

BATISTA, J.D.; SARGENTI-NETO, S.; DECHICHI, P.; ROCHA, F.S.; PAGNONCELLI, R.M. Low-level laser therapy on bone repair: is there any effect outside the irradiated field? **Lasers in Medical Science**, v. 30, p. 1569-1574, 2015.

BENJAMIN, N.; O'DRISCOLL, F.; DOUGALL, H.; DUNCAN, C.; SMITH, L.; GOLDEN, M.; MCKENZIE, H. Stomach NO synthesis. **Nature**, v. 368, p. 502, 1994.

BERNI, M.; BRANCATO, A.M.; TORRIANI, C.; BINA, V.; ANNUNZIATA, S.; CORNELLA, E.; TRUCCHI, M.; JANNELLI, E.; MOSCONI, M.; GASTALDI, G.; CALIOGNA, L.; GRASSI, F.A.; PASTA, G. The role of low-level laser therapy in bone healing: systematic review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 7094, 2023.

BIGHAM-SADEGH, A.; ORYAN, A. Selection of animal models for pre-clinical strategies in evaluating the fracture healing, bone graft substitutes and bone tissue regeneration and engineering. **Connective Tissue Research**, v. 56, n. 3, p. 175-194, 2015.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature Immunology**, v. 2, p. 907-916, 2001.

BOSSINI, P.S.; RENNO, A.C.M.; RIBEIRO, D.A.; FERNANDES, K.P.S.; ZANIN, F.A.A.; MARQUES, R.F.C.; ARISAWA, E.A.L.; PACHECO, M.T.T. Low level laser therapy (830 nm) improves bone repair in osteoporotic rats: similar outcomes at two different dosages. **Experimental Gerontology**, v. 47, n. 2, p. 136-142, 2012.

BORGSTRÖM, F.; KARLSSON, L.; ORTSÄTER, G.; NORDESTGAARD, J.; SVERÉUS, S.; LEMMELÄ, S.; LUNDGREN, A.; LOBI, B.E.; GRAVES, N.; RIZZOLI, R.; KANIS, J.A. Fragility fractures in Europe: burden, management and opportunities. **Archives of Osteoporosis**, v. 15, p. 59, 2020.

BRASSOLATTI, P.; ANDRADE, A.L.M.; BOSSINI, P.S.; ORTH, D.L.; DUARTE, F.O.; SOUZA, A.B.A.; PARIZOTTO, N.A.; ANIBAL, F.F. Photobiomodulation on critical bone defects of rat calvaria: a systematic review. **Lasers in Medical Science**, v. 33, p. 1841-1848, 2018.

BRESCHI, A.; GINGERAS, T.R.; GUIGO, R. Comparative transcriptomics in human and mouse. **Nature Reviews Genetics**, v. 18, p. 425-440, 2017.

BRITO, A.A.D.; HERCULANO, K.Z.; ALVARENGA-NASCIMENTO, C.R. de; ESTEFANO-ALVES, C.; DURAN, C.C.G.; MARCOS, R.L.; SILVA JUNIOR, J.A.; CHAVANTES, M.C.; ZAMUNER, S.R.; AIMBIRE, F.; LLADÓ-PELFORT, L.; GUBERN, A.; FÁBREGA, A.; PALMA, R.K. da; LIGEIRO DE OLIVEIRA, A.P. Effect of photobiomodulation in the balance between effector and regulatory T cells in an experimental model of COPD. **Frontiers in Medicine**, v. 11, p. 1347517, 2024.

BROMER, F. D.; BRENT, M. B.; THOMSEN, J. S.; BRUEL, A. Drill-hole bone defects in animal models of bone healing: protocol for a systematic review. **JMIR Research Protocols**, v. 11, n. 7, 2022.

BRYAN, N.S.; BIAN, K.; MURAD, F. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. **Frontiers in Bioscience**, v. 14, p. 1-18, 2009.

CALIOGNA, L.; MEDETTI, M.; BINA, V.; BRANCATO, A.M.; CASTELLI, A.; JANNELLI, E.; IVONE, A.; GASTALDI, G.; ANNUNZIATA, S.; MOSCONI, M.; PASTA, G. Pulsed electromagnetic fields in bone healing: molecular pathways and clinical applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 7403, 2021.

CAMILI, A.C.; DE GODOI, M.A.; COSTA, V.B.; FERNANDES, N.A.R.; CIRELLI, G.; DA SILVA, L.K.F.; ASSIS, L.R.; REGASINI, L.O.; GUIMARÃES-STABILI, M.R. Local application of a new chalconic derivative (Chalcone T4) reduces inflammation and oxidative stress in a periodontitis model in rats. **Antioxidants**, v. 13, n. 1192, 2024.

CARDNELL, R. J.; MIKKELSEN, R. B. Nitric oxide synthase inhibition enhances the antitumor effect of radiation in the treatment of squamous carcinoma xenografts. **PLoS ONE**, v. 6, e20147, 2011.

CASTRO, M.M.L.; NASCIMENTO, P.C.; SOUZA-MONTEIRO, D.; SANTOS, S.M.; AROUCK, M.B.; GARCIA, V.B.; ARAÚJO JR., R.F.; ARAUJO, A.A.; BALLLTNOT, G.S.; MONTEIRO, M.M.; COLLARES, F.M.; ROSING, C.K.; MAIA, C.S.F.; LIMA, R.R. Blood oxidative stress modulates alveolar bone loss in chronically stressed rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3728, 2020.

CHEN, C.H.; CHEN, C.H.; CHANG, H.M.; TSAI, R.K.; LIN, Y.C. Low-level laser irradiation promotes cell proliferation and mRNA expression of type I collagen and decorin in porcine Achilles tendon fibroblasts *in vitro*. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 27, n. 5, p. 646-650, 2009.

CLAES, L.; ECKERT-HÜBNER, K.; AUGAT, P. The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 20, p. 1099-1105, 2002.

CLAES, L.; IGNATIUS, A.; LECHNER, R.; GEBHARD, F.; KRAUS, M.; BAUMGÄRTEL, S.; RECKNAGEL, S.; KRISCHAK, G. D. The effect of both a thoracic trauma and a soft-tissue trauma on fracture healing in a rat model. **Acta Orthopaedica**, v. 82, n. 2, p. 223-227, 2011.

CLAES, L.; RECKNAGEL, S.; IGNATIUS, A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 8, n. 3, p. 133-143, 2012.

COSTA, S.Z.R.; CID, G.C.; D'ÁVILA, M.S.; FRANÇA, T.N.; SANTOS, B.B.N.; NOGUEIRA, V.A.; SANTOS, A.M.; PEIXOTO, T.C. Intoxicação por azul de metileno (cloreto de metiltionínio) em gato. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 38, supl. 2, p. 145-148. 2016.

COURT-BROWN, C.M.; CAESAR, B. Epidemiology of adult fractures: a review. **Injury**, v. 37, p. 691-697, 2006.

DADRAS, S.; ABDOLLAHIFAR, M.A.; NAZARIAN, H.; GHOREISHI, S.K.; FALLAHNEZHAD, S.; NASERZADEH, P.; JAJARMI, V.; CHIEN, S.; BAYAT, M. Photobiomodulation improved stereological parameters and sperm analysis factors in streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 186, p. 81-87, 2018.

DAR, H.Y.; AZAM, Z.; ANUPAM, R.; MONDAL, R.K.; SRIVASTAVA, R.K. Osteoimmunology: the nexus between bone and immune system. **Frontiers in Bioscience (Landmark)**, v. 23, p. 464-492, 2018.

DAS, A.; SINHA, M.; DATTA, S.; ABAS, M.; CHATTOPADHYAY, S.; CHAFFEE, S.; SEN, C. K.; ROY, S. Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration. **American Journal of Pathology**, v. 185, n. 10, p. 2596-2606, 2015.

DE FREITAS, L. F.; HAMBLIN, M. R. Proposed mechanisms of photobiomodulation or low-level light therapy. **IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics**, v. 22, p. 7000417, 2016.

DIMITRIOU, R.; JONES, E.; MCGONAGLE, D.; GIANNOUDIS, P.V. Bone regeneration: current concepts and future directions. **BMC Medicine**, v. 9, n. 66, 2011.

DIWAN, A.D.; WANG, M.X.; JANG, D.; ZHU, W.; MURRELL, G.A.C. Nitric oxide modulates fracture healing. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 15, n. 2, p. 342-351, 2000.

DODSON, M.; DARLEY-USMAR, V.; ZHANG, J. Cellular metabolic and autophagic pathways: traffic control by redox signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 63, p. 207-221, 2013.

DOS SANTOS, Thiago Vieira Soares. **Terapia fotodinâmica: uma revisão dos conceitos gerais e dos avanços de novos sistemas carreadores desenvolvidos com base na nanotecnologia**. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Licenciatura) - Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2020.

EINHORN, T.A.; GERSTENFELD, L.C. Fracture healing: mechanisms and interventions. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 11, n. 1, p. 45-54, 2015.

EINHORN, T. A. The science of fracture healing. **Journal of Orthopaedic Trauma**, v. 19, suppl., p. 4-6, 2005.

ESQUIVEL-SOLÍS, H.; VALLECILLO, A.J.; BENÍTEZ-GUZMÁN, A.; ADAMS, L. G.; LÓPEZ-VIDAL, Y.; GUTIÉRREZ-PABELLO, J.A. Nitric oxide, not apoptosis, mediates differential killing of *Mycobacterium bovis* in bovine macrophages. **PLoS ONE**, v. 8, e63464, 2013.

FAYAZ, H.C.; GIANNOUDIS, P.V.; VRAHAS, S.; SMITH, R.M.; MORAN, C.; PAPE, H.C.; KRETTEK, C.; JUPITER, J.B. The role of stem cells in fracture healing and nonunion. **International Orthopaedics (SICOT)**, v. 35, p. 1587-1597, 2011.

FAZZALARI, N. Bone fracture and bone fracture repair. **Osteoporosis International**, v. 22, n. 6, p. 2003-2006, 2011.

FEELISCH, M.; STAMLER, J.S. **Methods in nitric oxide research**. Chichester: J. Wiley & Sons, 1996.

FENN, A.M.; SKENDELAS, J.P.; MOUSSA, D.N.; MUCCIGROSSO, M.M.; POPOVICH, P.G.; LIFSHITZ, J.; EIFERMAN, D.S.; GODBOUT, J.P. Methylene blue attenuates traumatic brain injury-associated neuroinflammation and acute depressive-like behavior in mice. **Journal of Neurotrauma**, v. 32, p. 127-138, 2015.

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**, Article ID 421746, 17 pages, 2015.

FOLLAKE, N.; KLÖTING, I.; GANZER, D.; MERK, H. Scanning electron microscopic examinations on retarded bone defect healing in spontaneously diabetic BB/O(ttawak)K(arlshurg) rats. **Histology and Histopathology**, v. 18, p. 111-120, 2003.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**, v. 33, n. 7, p. 829-837, 2012.

FONSECA, G.A.M.D.; CAVALCANTI, M.F.X.B.; MAIOR, J.D.S.; PEREIRA, J.S.; PINTO, L.A.; MATIAS, M.; FRIGO, L. Laser-photobiomodulation on titanium implant bone healing in rat model: comparison between 660- and 808-nm wavelength. **Lasers in Medical Science**, v. 37, n. 4, p. 2179-2184, 2022.

GAO, H.; HUANG, J.; WEI, Q.; HE, C. Advances in animal models for studying bone fracture healing. **Bioengineering**, v. 10, n. 201, 2023.

GARAVELLO-FREITAS, I.; BARANAUSKAS, V.; JOAZEIRO, P.P.; PADOVANI, C.R.; DAL PAI, A.; DAL PAI-SILVA, M. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 70, n. 2, p. 81-89, 2003.

GERSTENFELD, L. C.; CULLINANE, D. M.; BARNES, G. L.; GRAVES, D. T.; EINHORN, T. A. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 88, p. 873-884, 2003.

GHOLIPOUR, H.; MEIMANDI-PARIZI, A.; ORYAN, A.; SADEGH, A.B. The effects of gelatin, fibrin-platelet glue and their combination on healing of the experimental critical bone defect in a rat model: radiological, histological, scanning ultrastructural and biomechanical evaluation. **Cell Tissue Bank**, v. 19, p. 341-356, 2018.

GILLMAN, C.E.; JAYASURIYA, A.C. FDA-approved bone grafts and bone graft substitute devices in bone regeneration. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 6, 2021.

GREWAL, B.S.; KELLER, B.; WEINHOLD, P.; DAHNERS, L.E. Evaluating effects of deferoxamine in a rat tibia critical bone defect model. **Journal of Orthopaedics**, v. 11, p. 5-9, 2014.

GUNDERSEN, H.J.G.; BENDTSEN, T.F.; KORBO, L.; MARCUSSEN, N.; MIZILLER, A.; NIELSEN, K.; NYENGAARD, J.R.; PAKKENBERG, B.; SIZIRENSEN, F.B.; VESTERBY, A.; WEST, M.J. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **APMIS**, v. 96, p. 379-394, 1988.

HALDAR, S.M.; STAMLER, J.S. S-nitrosylation: integrator of cardiovascular performance and oxygen delivery. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, p. 101-110, 2013.

HARADA, N.; WATANABE, Y.; SATO, K.; ABE, S.; YAMANAKA, K.; SAKAI, Y.; KANEKO, T.; MATSUSHITA, T. Bone regeneration in a massive rat femur defect through endochondral ossification achieved with chondrogenically differentiated MSCs in a degradable scaffold. **Biomaterials**, v. 35, p. 7800-7810, 2014.

HARRINGTON, L. E.; MANGAN, P. R.; WEAVER, C. T. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, p. 349-356, 2006.

HELFRICH, M.H.; EVANS, D.E.; GRABOWSKI, P.S.; POLLOCK, J.S.; OHSHIMA, H.; RALSTON, S.H. Expression of nitric oxide synthase isoforms in bone and bone cell cultures. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 12, p. 1108-1115, 1997.

HENRIQUES, B. O.; SARAIVA, K. L.; FERREIRA, C. M. Nitric oxide and bone remodeling: molecular pathways and therapeutic perspectives. **Journal of Bone Research**, v. 9, p. 1-12, 2021.

HIXON, K.R.; MILLER, A.N. Animal models of impaired long bone healing: tissue engineering- and cell based in vivo interventions. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 40, p. 767-778, 2022.

HOCHMAN, L. Photobiomodulation therapy in veterinary medicine: a review. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 33, p. 83-88, 2018.

HOLMSTRÖM, K.; FINKEL, T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, p. 411-421, 2014.

HORNER, E.A.; KIRKHAM, J.; WOOD, D.; CURRAN, S.; SMITH, M.; THOMSON, B.; YANG, X.B. Long bone defect models for tissue engineering applications: criteria for choice. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 16, p. 263-271, 2010.

HUANG, C.; TONG, L.; LU, X.; WANG, J.; YAO, W.; JIANG, B.; ZHANG, W. Methylene blue attenuates iNOS induction through suppression of transcriptional factor binding amid iNOS mRNA transcription. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 116, p. 1730-1740, 2015.

HUANG, E.E.; ZHANG, N.; SHEN, H.; LI, X.; MARUYAMA, M.; UTSUNOMIYA, T.; GAO, Q.; GUZMAN, R.A.; GOODMAN, S.B. Novel techniques and future perspective for investigating critical-size bone defects. **Bioengineering**, v. 9, n. 171, 2022.

IGNARRO, L. J. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 53, n. 4, p. 503-514, 2002.

INOUE, M.; NAKAJIMA, M.; HOJO, T.; ITOI, M.; KITAKOJI, H. The effect of electroacupuncture on osteotomy gap healing in a rat fibula model. **Acupuncture in Medicine**, v. 31, p. 222-227, 2013.

ISLAM, M.A.; KAMARRUDIN, N.S.; DAUD, R.; MOHD NOOR, S.N.F.; AZMI, A. I.; RAZLAN, Z.M. A review of surgical bone drilling and drill bit heat generation for implantation. **Metals**, v. 12, n. 1900, 2022.

ISRAEL, C.B.; SANTOS, D.F.; MAUÉS, T.; QUEIRÓZ, 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. 2014.

ITO, H. Chemokines in mesenchymal stem cell therapy for bone repair: a novel concept of recruiting mesenchymal stem cells and the possible cell sources. **Modern Rheumatology**, v. 21, n. 2, p. 113–121, 2011.

JAGER, M.; SAGER, M.; LENSING-HOHN, S.; KRAUSPE, R. The critical size bony defect in a small animal for bone healing studies (II): implant evolution and surgical technique on a rat's femur. **Biomedical Technology**, v. 50, p. 137-142, 2005.

JOHNSON, A. L.; HOULTON, J. E. F.; VANNINI, R. **AO Principles of Fracture Management in the Dog and Cat**. Davos: AO Publishing; Stuttgart: Thieme, 2005.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 14. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2023. 600 p.

KANCZLER, J.M.; GINTY, P.J.; WHITE, L.; CLARKE, N.M.; HOWDLE, S.M.; SHAKESHEFF, K.M.; OREFFO, R.O.C. The effect of the delivery of vascular endothelial growth factor and bone morphogenic protein-2 to osteoprogenitor cell populations on bone formation. **Biomaterials**, v. 31, p. 1242-1250, 2010.

KARU, T.; PYATIBRAT, L.; KALENDU, G. Irradiation with He–Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 27, p. 219-223, 1995.

KARU, T. **Ten lectures on basic science of laser phototherapy**. New York: Prima Books, 2007.

KHAN, I.; TANG, E.; ARANY, P. Molecular pathway of near-infrared laser phototoxicity involves ATF-4 orchestrated ER stress. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, 2015.

KHARKWAL, G. B.; SHARMA, S. K.; HUANG, Y.-Y.; DAI, T.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy for infections: clinical applications. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 43, p. 755-767, 2011.

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 Sciences**, v. 16, p. 24111-24126, 2015.

KIM, Y. G.; LEE, C.-K.; NAH, S.-S.; MUN, S. H.; YOO, B.; MOON, H.-B. Human CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit the differentiation of osteoclasts from peripheral blood mononuclear cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 357, p. 1046-1052, 2007.

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.

KOLAR, P.; SCHMIDT-BLEEK, K.; SCHELL, H.; GABER, T.; TOBEN, D.; SCHMIDMAIER, G.; PERKA, C.; BUTTGEREIT, F.; DUDA, G. N. The early fracture hematoma and its potential role in fracture healing. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 16, n. 4, p. 427-434, 2010.

KONOPKA, K.; GOSLINSKI, T. Photodynamic Therapy in Dentistry. **Journal of Dental Research**, v. 86, n. 8, p. 694-707, 2007.

KONTIS, T.C.; RIVKIN, A. The history of injectable facial fillers. **Facial Plastic Surgery**, v. 25, p. 67-72, 2009.

KRUGER, T.E.; MILLER, A.H.; WANG, J. Collagen scaffolds in bone sialoprotein-mediated bone regeneration. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1-6, 2013.

KWIATKOWSKI, S.; KNAP, B.; PRZYSTUPSKI, D.; SACZKO, J.; KĘDZIERSKA, E.; KNAP-CZOP, K.; KOTLIŃSKA, J.; MICHEL, O.; KOTOWSKI, K.; KULBACKA, J. Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, p. 1098-1107, 2018.

LE, P. S.; ELIAS, R.; ZHAO, S.; ARAUJO, A. B.; GUO, N.; TRUCCO, E.; FRENKEL, B. Osteocytes regulate senescence of bone and bone marrow. **eLife**, v. 7, p. 1-27, 2018.

LI, Y.; CHEN, S.K.; LI, L.; QIN, L.; WANG, X.L.; LAI, Y.X. Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials. **Journal of Orthopaedic Translation**, v. 3, n. 3, p. 95-104, 2015.

LI, R.; ZHU, Z.; ZHANG, B.; JIANG, T.; ZHU, C.; MEI, P.; JIN, Y.; WANG, R.; LI, Y.; GUO, W.; LIU, C.; XIA, L.; FANG, B. Manganese enhances the osteogenic effect of silicon-hydroxyapatite nanowires by targeting T lymphocyte polarization. **Advanced Science**, v. 11, n. 2305890, 2024.

LIMA, F.M.; VITORETTI, L.; COELHO, F.; ALBERTINI, R.; VILLAYERDE, A.B.; ARAÚJO, R.P. Suppressive effect of low-level laser therapy on tracheal hyperresponsiveness and lung inflammation in rat subjected to intestinal ischemia and reperfusion. **Lasers in Medical Science**, v. 28, p. 551-564, 2013.

LIN, C.L.; MONIZ, C.; CHAMBERS, T.J.; CHOW, J.W.M. Colitis causes bone loss in rats through suppression of bone formation. **Gastroenterology**, v. 111, p. 1263-1271, 1996.

LIENAU, J.; SCHMIDT-BLEEK, K.; PETERS, A.; HASCHKE, F.; DUDA, G. N.; PERKA, C.; et al. Differential regulation of blood vessel formation between standard and delayed bone healing. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 27, n. 9, p. 1133-1140, 2009.

LOI, F.; CORDOVA, L.A.; PAJARINEN, J.; LIN, T.H.; YAO, Z.; GOODMAN, S.B. Inflammation, fracture and bone repair. **Bone**, v. 86, p. 119-130, 2016.

LORENZO, J.; HOROWITZ, M.; CHOI, Y. Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. **Endocrine Reviews**, v. 29, n. 4, p. 403-440, 2008.

LUO, C. Y.; WANG, L.; SUN, C.; LI, D. J. Estrogen enhances the functions of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells that suppress osteoclast differentiation and bone resorption in vitro. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 8, p. 50-58, 2011.

MACPHERSON, H.; NOBLE, B.S.; RALSTON, S.H. Expression and functional role of nitric oxide synthase isoforms in human osteoblast-like cells. **Bone**, v. 24, p. 179-185, 1999.

MAGHFOUR, J.; MINEROFF, J.; OZOG, D. M.; JAGDEO, J.; LIM, H. W.; KOHLI, I.; ANDERSON, R.; KELLY, K. M.; MAMALIS, A.; MUNAVALLI, G.; CLEBER, F.; SIEGEL, D.; GENEVA, I.; WEISS, R.; MORITA, A.; JUANITA, A.; GOLDMAN, M. P.; ARANY, P. R.; SLINEY, D.; IBRAHIMI, O. A.; CHOPP, M.; ESMAT, S.; TUNER, J. Evidence-based consensus on the clinical application of photobiomodulation. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 2025.

MALIK, R.; MANOCHA, A.; SURESH, D. K. Photodynamic therapy - a strategic review. **Indian Journal of Dental Research**, v. 21, n. 2, p. 285-291, 2010.

MANASSERO, M.; DECAMBRON, A.; HUU THONG, B.T.; VIATEAU, V.; BENSIDHOUM, M.; PETITE, H. Establishment of a segmental femoral critical size defect model in mice stabilized by plate osteosynthesis. **Journal of Visualized Experiments**, v. 116, n. 52940, 2016.

MANDARIM-DE-LACERDA, Carlos A. Stereological tools in biomedical research. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 75, n. 4, p. 469-486, 2003.

MAGALHÃES, I.A.; CARVALHO, C.P.F.F.; ANGELIM, T.S.; RODRIGUES, C.; MATTOS, R.; VERDE, L.; PELES, D.; ANTONIO, R.L.; NETO, T.P.; LIMA, R.A.; DANTAS, T.S. Photobiomodulation and antimicrobial photodynamic therapy as adjunct in the treatment and prevention of osteoradionecrosis of the jaws: A case report. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 31, p. 101959, 2020.

MAROTTI, J.; SPERANDIO, F.F.; FREGNANI, E.R.; ARANHA, A.C.C.; FREITAS, P.M.; EDUARDO, C.P. High-Intensity Laser and Photodynamic Therapy as a Treatment for Recurrent Herpes Labialis. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28, n. 3, p. 439-444, jun. 2010.

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. **Lasers in Medical Science**, v. 30, p. 1225-1230, 2015.

MARSELL, R.; EINHORN, T. A. The biology of fracture healing. **Injury**, v. 42, n. 6, p. 551-555, 2011.

MARSHALL, D.; HELFRICH, M.H.; ASPDEN, R.M. Scanning electron microscopy of bone. In: HELFRICH, M.H.; RALSTON, S.H. (ed.). **Bone research protocols**. Totowa, NJ: Humana Press, 2003. (Methods in Molecular Medicine, v. 80).

MARTINEZ, E.F.; SILVA, L.A.H.; FURUSE, C.; ARAÚJO, N.S.; ARAÚJO, V.C. Dentin Matrix Protein 1 (DMP1) expression in developing human teeth. **Brazilian Dental Journal**, v. 20, n. 5, p. 365-369, 2009.

MATHIEU, C.; CHEVRIER, A.; LASCAU-COMAN, V.; RIVARD, G.E.; HOEMANN, C.D. Stereological analysis of subchondral angiogenesis induced by chitosan and coagulation factors in micro drilled articular cartilage defects. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 21, p. 849-859, 2013.

MCGOVERN, J. A.; GRIFFIN, M.; HUTMACHER, D. W. Animal models for bone tissue engineering and modelling disease. **Disease Models & Mechanisms**, v. 11, n. 033084, 2018.

MELCHIORETTO, E.F.; ZENI, M.; VERONEZ, D.A.L.; FILIPAK NETO, F.; DIGNER, I.S.; FRAGA, R. Stereological study and analysis of oxidative stress during renal aging in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 35, n. 11, e351103, 2020.

MELNYK, M.; HENKE, T.; CLAES, L.; AUGAT, P. Revascularisation during fracture healing with soft tissue injury. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, v. 128, p. 1159-1165, 2008.

MILES, J. D.; WEINHOLD, P.; BRIMMO, O.; DAHNERS, L. Rat tibial osteotomy model providing a range of normal to impaired healing. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 29, p. 109-115, 2011.

MESTER, A.; MESTER, A. The history of photobiomodulation: Endre Mester (1903-1984). **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 35, p. 393-394, 2017.

MOHSENIFAR, Z.; FRIDONI, M.; GHATREHSAMANI, M.; ABDOLLAHIFAR, M.A.; ABBASZADEH, H.; MOSTAFAVINIA, A.; FALLAHNEZHAD, S.; ASGHARI, M.; BAYAT, S.; BAYAT, M. Evaluation of the effects of pulsed wave LLLT on tibial diaphysis in two rat models of experimental osteoporosis, as examined by stereological and real-time PCR gene expression analyses. **Lasers in Medical Science**, v. 31, p. 721-732, 2016.

MONCADA, S.; ERUSALIMSKY, J.D. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, p. 214-220, 2002.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine nitric oxide pathway. **New England Journal of Medicine**, v. 329, p. 2002-2012, 1993.

MONCADA, S.; REES, D.D.; SCHULZ, R.; PALMER, R.M. Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilators after inhibition of vascular nitric oxide synthesis in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p. 2166-2170, 1991.

MOUNTZIARIS, P. M.; MIKOS, A. G. Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 14, p. 179-186, 2008.

MURAYAMA, M.; CHOW, S.K.-H.; LEE, M.L.; YOUNG, B.; ERGUL, Y.S.; SHINOHARA, I.; SUSUKI, Y.; TOYA, M.; GAO, Q.; GOODMAN, S.B.

The interactions of macrophages, lymphocytes, and mesenchymal stem cells during bone regeneration. **Bone & Joint Research**, v. 13, n. 9, p. 462-473, 2024.

MUSCHLER, G.F.; RAUT, V.P.; PATTERSON, T.E.; WENKE, J.C.; HOLLINGER, J.O. The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine. **Tissue Engineering. Part B, Reviews**, v. 16, n. 1, p. 123-145, 2010.

NASCIMENTO, M.H.M.; PELEGRINO, M.T.; PIERETTI, J.C.; SEABRA, A.B. How can nitric oxide help osteogenesis? **AIMS Molecular Science**, v. 7, n. 1, p. 29-48, 2020.

NATHAN, C.; XIE, Q. W. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. **Cell**, v. 78, p. 915-918, 1994.

NOONAN, K.; MARCHIONNI, L.; ANDERSON, J.; PARDOLL, D.; ROODMAN, G. D.; BORRELLO, I. A novel role of IL-17-producing lymphocytes in mediating lytic bone disease in multiple myeloma. **Blood**, v. 116, p. 3554-3564, 2010.

NUNAMAKER, D.M. Experimental models of fracture repair. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 355, p. 56-65, 1998.

OLIVEIRA, F.L.D.; NAGATO, A.C.; AARESTRUP, F.M.; AARESTRUP, B.J.V. Bone neoformation induced by low-level laser and methylene blue suggests early ossification in rats. **Journal of Lasers in Medical Sciences**, v. 13, n. 48, 2022.

OLIVEIRA, G.J.P.L.; ARONI, M.A.T.; PINOTTI, F.E.; MARCANTONIO JUNIOR, E.; MARCANTONIO, R.A.C. Low-level laser therapy (LLLT) in sites grafted with osteoconductive bone substitutes improves osseointegration. **Lasers in Medical Science**, v. 35, p. 1519-1529, 2020.

OLIVEIRA, R.G.; FERREIRA, A.P.; CÔRTEZ, A.J.; AARESTRUP, B.J.V.; ANDRADE, L.C.; AARESTRUP, F.M. Low-level laser reduces the production of TNF- α , IFN- γ , and IL-10 induced by OVA. **Lasers in Medical Science**, 2012.

ONISZCZUK, A.; WOJTUNIK-KULESZA, K.A.; ONISZCZUK, T.; KASPRZAK, K. The potential of photodynamic therapy (PDT) - experimental investigations and clinical use. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 83, p. 912-929, 2016.

PALLOTTA, R.C.; MARQUEZ, J.O.; DE ALMEIDA, P.; DE ALMEIDA, R.G.; FERREIRA, L.A.N.; BRAGA, F.C.; RAMALHO, L.T.O.; DE PAULA, A.C. Infrared (810-nm) low-level laser therapy on rat experimental knee inflammation. **Lasers in Medical Science**, v. 27, n. 1, p. 71-78, 2012.

PETERS, F.P.; KARA, M.A.; ROSMOLEN, W.D.; AALDERS, M.C.G.; TEN KATE, F.J.W.; BULTJE, B.C.; KRISHNADATH, K.K.; FOCKENS, P.; VAN LANSCHOT, J.J.B.; VAN DEVENTER, S.J.H.; BERGMAN, J.J.G.H.M. Endoscopic treatment of high-grade dysplasia and early-stage cancer in Barrett's esophagus. **Gastrointestinal Endoscopy**, v. 61, p. 506-514, 2005.

PHILLIPS, A.M. Overview of the fracture healing cascade. **Injury**, v. 36, suppl. 3, p. S5-S7,

2005.

PIERMATTEI, D.L.; FLO, G.L.; BRINKER, W.O. Brinker, Piermattei and Flo's **Handbook of Small Animal Orthopedics and Fracture Repair**. 5. ed. St. Louis: Elsevier, 2016.

PIKE, C.; BIRNBAUM, H.G.; SCHILLER, M.; SHARMA, H.; BURGE, R.; EDGELL, E.T. Direct and indirect costs of non-vertebral fracture patients with osteoporosis in the US. **PharmacoEconomics**, v. 28, p. 395-409, 2010.

POLINDER, S.; HAAGSMA, J.A.; PANNEMAN, M.J.M.; SCHOLTEN, A.C.; BRUGMANS, M.J.P.; VAN BEECK, E.F. The economic burden of injury: health care and productivity costs of injuries in the Netherlands. **Accident Analysis & Prevention**, v. 93, p. 92-100, 2016.

PONZETTI, M.; RUCCI, N. Updates on osteoimmunology: what's new on the cross-talk between bone and immune system. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, p. 236, 2019.

QU, H.; FU, H.; HAN, Z.; SUN, Y. Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: a review. **RSC Advances**, v. 9, n. 45, p. 26252-26262, 2019.

RAGGATT, L.J.; PARTRIDGE, N.C. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 33, p. 25103-25108, 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.

RECHENBERG, B.V.; VAN LENTEN, E.C. Animal models in bone repair. **Drug Discovery Today: Disease Models**, 2015.

REDDY, S. R.; KOTHA, R.; TATAPUDI, R.; GUDAPATI, S.; MADHAVAI, S.; CH., S. K. Photo Dynamic Therapy in Oral Diseases. **International Journal of Biological & Medical Research**, v. 3, n. 2, p. 1875-1883, 2012.

RIBEIRO, G. A.; BARROS, L. C.; SANTOS, M. L. Nitric oxide in bone biology: implications for repair and regeneration. **Bone Reports**, v. 14, p. 1-10, 2021.

RIBEIRO, L.N.S.; FIGUEIREDO, F.A.T.; SILVA MIRA, P.C.; ARNEZ, M.F.M.; MATSUMOTO, M.A.N.; MENEZES, L.M.; KÜCHLER, E.C.; STUANI, M.B.S. Low-level laser therapy (LLLT) improves alveolar bone healing in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 37, p. 961-969, 2022.

RITTIE, L. Fibrosis: Methods and Protocols. **Methods in Molecular Biology**, v. 1627. New York: Springer Science+Business Media LLC, 2017.

ROBERTSON, C.A.; HAWKINS EVANS, D.; ABRAHAMSE, H. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research

applications for PDT. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 96, p. 1-8, 2009.

ROBINSON, L.J.; WEREMOWICZ, S.; MORTON, C.C.; MICHEL, T. Isolation and chromosomal localization of the human endothelial nitric oxide synthase (NOS3) gene. **Genomics**, v. 19, p. 350-357, 1994.

ROCHA JÚNIOR, A.M.; VIEIRA, B.J.; ANDRADE, L.C.F.; AARESTUP, F.M. Low-level laser therapy increases transforming growth factor- β 2 expression and induces apoptosis of epithelial cells during the tissue repair process. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 27, n. 2, p. 303-309, 2009.

ROCHA, M.; ROVIRA-LLOPIS, S.; HERANCE, J.R.; BANULS, C.; POLO, M.; BLAS-GARCIA, A.; HERNANDEZ-MIJARES, A.; VICTOR, V.M. The pivotal role of nitric oxide: effects on the nervous and immune systems. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, p. 4679-4689, 2014.

ROSA, L.P.; SILVA, F.C. Antimicrobial Photodynamic Therapy: A New Therapeutic Option to Combat Infections. **Journal of Medical Microbiology & Diagnosis**, v. 3, n. 158, 2014.

ROSA, L.P.; SILVA, F.C.; NADER, S.A.; MEIRA, G.A.; VIANA, M.S. 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, p.276-281. Jan. 2015.

SAFAVI, S.M.; KAZEMI, B.; ESMAEILI, M.; RAKHSHAN, V.; HEKMATFAR, S.; GHORBANI, M. Effects of low-level He-Ne laser irradiation on the gene expression of IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , TGF- β , bFGF, and PDGF in rat's gingiva. **Lasers Medical Science**, v. 23, p. 331-335, 2008.

SAMOILOVA, K.A.; ZVEREVA, V.V.; ZOTINA, R.S.; KARSANINA, E.M.; ZHEREBTSOV, E.A.; ROMANOV, G.S.; SHIROKOV, A.A.; ZENINA, O.V.; SAMUILOV, V.D. Role of nitric oxide in the visible light-induced rapid increase of human skin microcirculation at the local and systemic levels: II. healthy volunteers. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 26, n. 5, p. 443-449, 2008.

SATO, K.; SUEMATSU, A.; OKAMOTO, K.; YAMAGUCHI, A.; MORISHITA, Y.; KADONO, Y. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. **Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 12, p. 2673-2682, 2006.

SATO, K.; WATANABE, Y.; HARADA, N.; ABE, S.; MATSUSHITA, T.; YAMANAKA, K.; KANEKO, T.; SAKAI, Y. Establishment of reproducible, critical-sized, femoral segmental bone defects in rats. **Tissue Engineering - Part C: Methods**, v. 20, p.1037-1041, 2014.

SAURA, M.; TARIN, C.; ZARAGOZA, C. Recent insights into the implication of nitric oxide in osteoblast differentiation and proliferation during bone development. **The Scientific World Journal**, v.10, p. 624-632, 2010.

SCALIZE, P.H.; DE SOUSA, L.G.; GONÇALVES, L.M.N.; PITOL, D.L.; PALINKAS, M.; COPPI, A.A.; RIGHETI, M.A.; RICARDO, V.; BOMPONATO-PRADO, K.F.; REGALO, S.C.H.; SIESSERE, S. Low-level laser therapy enhances the number of osteocytes in calvaria bone defects of ovariectomized rats. **Animal Model Experimental Medicine**, v. 2, n. 1, p. 51-57, 2019.

SCHETT, G. Effects of inflammatory and anti-inflammatory cytokines on the bone: cytokine effects on bone. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 41, p. 1361-1366, 2011.

SCHINDELER, A.; McDONALD, M. M.; BOKKO, P.; LITTLE, D. G. Bone remodeling during fracture repair: the cellular picture. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 19, n. 5, p. 459-466, 2008.

SCHIRMER, R.H.; ADLER, H.; PICKHARDT, M.; MANDELKOW, E. Lest we forget you - methylene blue. **Neurobiology of Aging**, v. 32, p. 2325. e2327-2316, 2011.

SCHMIDT, A.H. Autologous bone graft: is it still the gold standard? **Injury**, v. 52, suplemento 2, p. 18-22, 2021.

SCHMIDT-BLEEK, K.; SCHELL, H.; SCHULZ, N.; HOFF, P.; PERKA, C.; BUTTGEREIT, F.; et al. Inflammatory phase of bone healing initiates the regenerative healing cascade. **Cell and Tissue Research**, v. 347, n. 3, p. 567-573, 2012.

SELLA, V.R.G.; MACHADO, P.C.; FALONI, A.P.S.; MARQUES, M.M.; NAGATA, M.J.H.; GOMES, M.F.; GARCIA, V.G.; ERVOLINO, E.; THEODORO, L.H. Effect of low-level laser therapy on bone repair: a randomized controlled experimental study. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 3, p. 1061-1068, 2015.

SELLERA, F.P.; GARGANO, R.G.; POGLIANI, F.C. Terapia fotodinâmica: revisão de literatura / Photodynamic therapy: a review. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 12, n. 1, p. 6-13, 2014.

SEMEGHINI, M.S.; SCALIZE, P.H.; COELHO, M.C.; FERNANDES, R.R.; PITOL, D.L.; TAVARES, M.S.; DE SOUSA, L.G.; COPPI, A.A.; SIESSERE, S.; BOMPONATO-PRADO, K.F. Lycopene prevents bone loss in ovariectomized rats and increases the number of osteocytes and osteoblasts. **Journal of Anatomy**, v. 241, n. 3, p. 729-740, 2022.

SEN, M.K.; MICLAU, T. Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions? **Injury**, v. 38, p. 75-80, 2007.

SHAH, F.A.; RUSCSÁK, K.; PALMQUIST, A. 50 years of scanning electron microscopy of bone - a comprehensive overview of the important discoveries made and insights gained into bone material properties in health, disease, and taphonomy. **Bone Research**, v. 7, n. 15, 2019.

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. 146, n. 2, p. 137-141, 2011.

SILVA, S.K.; PLEPIS, A.M.G.; MARTINS, V.C.A.; HORN, M.M.; BUCHAIM, D.V.;

BUCHAIM, R.L.; PELEGRINE, A.A.; SILVA, V.R.; KUDO, M.H.M.; FERNANDES, J.F.R. Suitability of Chitosan Scaffolds with Carbon Nanotubes for Bone Defects Treated with Photobiomodulation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 12, p. 6503, 2022.

SONG, S.H.; YUN, Y.P.; KIM, H.J.; PARK, K.; KIM, S.E.; SONG, H.R. Bone formation in a rat tibial defect model using carboxymethyl cellulose/BioC/bone morphogenic protein-2 hybrid materials. **BioMed Research International**, 2014.

SPARKS, D.S.; SAIFZADEH, S.; SAVI, F.M.; DLASKA, C.E.; BERNER, A.; HENKEL, J.; REICHERT, J.C.; WULLSCHLEGER, M.; REN, J.; CIPITRIA, A.; MCGOVERN, J.A.; STECK, R.; WAGELS, M.; WOODRUFF, M.A.; SCHUETZ, M. A.; HUTMACHER, D.W. A preclinical large-animal model for the assessment of critical-size load-bearing bone defect reconstruction. **Nature Protocols**, v. 15, p. 877-924, 2020.

SPERANDIO, F.F.; SIMÕES, A.; ARANHA, A.C.C.; CORRÊA, L.; SOUSA, S.C.O.M. Photodynamic Therapy Mediated by Methylene Blue Dye in Wound Healing. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28, n. 5, p. 581-587, 2010

SROUJI, S.; BEN-DAVID, D.; KOHLER, T.; MULLER, R.; ZUSSMAN, E.; LIVNE, E. A model for tissue engineering applications: Femoral critical size defect in immunodeficient mice. **Tissue Engineering - Part C: Methods**, v. 17, p. 597-606, 2011.

STEWART, T.L.; RALSTON, S.H. Role of genetic factors in the pathogenesis of osteoporosis. **Journal of Endocrinology**, v. 166, n. 2, p. 235-245, 2000.

SUN, Y.; HELMHOLZ, H.; WILLUMEIT-RÖMER, R. Surgical classification for preclinical rat femoral bone defect model: standardization based on systematic review, anatomical analysis and virtual surgery. **Bioengineering**, v. 9, n. 476, 2022.

SUN, Y.; WENG, Y.; ZHANG, C.; ZHU, S.; ZHANG, W.; TANG, J.; CHEN, Z.; WANG, Y.; LIU, X.; LIU, Y.; YANG, J.; ZHANG, H.; FENG, J. Q. Glycosylation of dentin matrix protein 1 is critical for osteogenesis. **Nature Scientific Reports**, v. 5, 2015.

TAKAYANAGI H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. **Nature Reviews Immunology**, v.7, n.04, p.292-304, 2007

TATANGELO, G.; WATTS, J.; LIM, K.; SHARP, L.; BRENCHLEY, S.; DECOURCY, C.; NAGANATHAN, V.; DICK, I.M.; HOCKING, S.; PASCAL, C.; SHIELDS, N.; KOTOWICZ, M.; EPSTEIN, D. M. The cost of osteoporosis, osteopenia, and associated fractures in Australia in 2017. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 34, p. 616-625, 2019.

TEITELBAUM, S. L.; ROSS, F. P. Genetic regulation of osteoclast development and function. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 8, p. 638-649, 2003.

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.; RENNO, A. C.; PARIZOTTO, N. A. Low-level laser therapy induces an upregulation of collagen gene expression during the initial process of bone healing: a microarray analysis. **Journal of Biomedical Optics**, v. 21, n. 8, p. 088001, 2016.

UEDA, Y.; SHIMIZU, N. Effects of pulse frequency of low-level laser therapy (LLLT) on bone nodule formation in rat calvarial cells. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 21, n. 5, p. 271-277, 2003.

UENO, M.; LO, C.W.; BARATI, D.; CONRAD, B.; LIN, T.; KOHNO, Y.; UTSUNOMIYA, T.; ZHANG, N.; MARUYAMA, M.; RHEE, C.; HUANG, E.E.; ROMERO-LOPEZ, M.; TONG, X.; YAO, Z.; ZWINGENBERGER, S.; YANG, F.; GOODMAN, S.B. Interleukin-4 overexpressing mesenchymal stem cells within gelatin-based microribbon hydrogels enhance bone healing in a murine long bone critical-size defect model. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 108, p. 2240-2250, 2020.

VANT HOF, R.J.; RALSTON, S.H. Nitric oxide and bone. **Immunology**, v. 103, p. 255-261, 2001.

VOLK, S.W.; SHEN, X.; SOMERS, K.L.; DEVINE, D.; LEVINE, D.; BRADLEY, J.P. Type III collagen regulates osteoblastogenesis and the quantity of trabecular bone. **Calcified Tissue International**, v. 94, n. 6, p. 621-631, 2014.

WALSH, M.C.; TAKEGAHARA, N.; KIM, H.; CHOI, Y. Updating osteoimmunology: regulation of bone cells by innate and adaptive immunity. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 14, n. 3, p. 146-156, 2018.

WANCKET, L.M. Animal models for evaluation of bone implants and devices: comparative bone structure and common model use. **Veterinary Pathology**, v. 52, p. 842-850, 2015.

WANG, X.; WANG, Y.; GOU, W.; LU, Q.; PENG, J.; LU, S. Role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: a review. **International Orthopaedics (SICOT)**, v. 37, p. 2491-2498, 2013.

WEITZMANN, M. N.; PACIFICI, R. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 5, p. 1186-1194, 2006.

WILLIAMSON, S.; LAGGIOU, P.; GREGSON, C.L.; TUCKER, K.L.; AL-HUSSEINI, A.; PRINS, C.; EDWARDS, M.H.; DENISON, H.J.; CHANG, C.Y.; HUTCHINGS, K.; COOPER, C.; HARVEY, N.C. Costs of fragility hip fractures globally: a systematic review and meta-regression analysis. **Osteoporosis International**, v. 28, p. 2791-2800, 2017.

WIMALAWANSA, S.J. Rationale for using nitric oxide donor therapy for prevention of bone loss and treatment of osteoporosis in humans. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1117, p. 283-297, 2007.

WING, K.; YAMAGUCHI, T.; SAKAGUCHI, S. Cell-autonomous and non-autonomous roles

of CTLA-4 in immune regulation. **Trends in Immunology**, v. 32, p. 428-433, 2011.

WU, Y.; HANNA, E. L.; HOLMES, R. E.; LIN, Z.; CHIARAMONTI, A. M.; REEVES, R.A.; MCDONALD, D.G.; VANEK, KN.; BARFIELD, W.R.; YAO, H.; PELLEGRINI JR, V.D. External beam irradiation preferentially inhibits the endochondral pathway of fracture healing: a rat model. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 476, p. 2076-2090, 2018.

YAMAMOTO, T.; HASEGAWA, T.; SASAKI, M.; HONGO, H.; TABATA, C.; LIU, Z.; LI, M.; AMIZUKA, N. Structure and formation of the twisted plywood pattern of collagen fibrils in rat lamellar bone. **Journal of Electron Microscopy**, v. 61, n. 2, p. 113-121, 2012.

YANO, T.; WANG, K.K. Photodynamic therapy for gastrointestinal cancer. **Photochemistry and Photobiology**, v. 96, p. 517-523, 2020.

YILMAZ, S.; KAYA, E.; YILMAZ, E.; KAVAKLI, A.; GURBUZ, S.; OZKARACA, M. Effect of acupuncture therapy on fracture healing in rats with femur fractures. **Journal of Traditional Chinese Medicine**, v. 40, n. 2, p. 275-283, 2020.

YUN, Y.R.; WON, J.E.; JEON, E.; LEE, S.; KANG, W.; JO, H.; JANG, J.H.; SHIN, U.S.; KIM, H.W. Fibroblast growth factors: biology, function, and application for tissue regeneration. **Journal of Tissue Engineering**, v. 1, n. 218142, 2010.

ZACHARY, J.F. **Bases da patologia veterinária**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018. 1408 p.

ZHAO, T.; CHU, Z.; MA, J.; OUYANG, L. Immunomodulation effect of biomaterials on bone formation. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 13, n. 103, 2022.

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais



**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 JULIANO VIEIRA AARESTRUP com a colaboração de FABIANO LUIZ DULCE DE OLIVEIRA, ROBERTO SOTTO-MAIOR FORTES DE OLIVEIRA E CAROLINA DE LOURDES JULIANO 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 JULIANO VIEIRA AARESTRUP and collaboration of FABIANO LUIZ DULCE DE OLIVEIRA, ROBERTO SOTTO-MAIOR FORTES DE OLIVEIRA and CAROLINA DE LOURDES JULIANO 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 coloração *Picrosirius Red* realizado no Laboratório de Imunopatologia e Patologia Experimental do Centro de Bioterismo Regional da UFJF

PROTOCOLO DE COLORAÇÃO - *Picrosirius Red*

1º) Na capela, colocar as amostras (lâminas) em um suporte (barca) e em seguida submergi-las três vezes em xilol

I - 5'

II - 5'

III - 5'

2º) Trocar o suporte (barca) das lâminas e, agora, submergi-las três vezes em álcool 100%

I - 5'

II - 5'

III - 5'

3º) Em um local plano apropriado, distribuir as lâminas e aplicar *Picrosirius Red* em volume suficiente para cobrir as amostras. Aguardar 60'

4º) Retornar as amostras para o suporte (barca) e submetê-las a lavagem em água corrente (em fluxo leve) por 5'

5º) Novamente em um local plano apropriado, distribuir as lâminas e, agora, aplicar Hematoxilina (*Erlisch*) em volume suficiente para cobrir as amostras. Aguardar 10'

6º) Retornar as amostras para o suporte (barca) e submetê-las a lavagem em água corrente (em fluxo leve) por 10'

7º) Retornar à capela e, novamente com auxílio de suporte (barca), submergir as amostras três vezes em álcool 100%

I - 5'

II - 5'

III - 5'

8º) Trocar o suporte das amostras e em seguida submergi-las três vezes em xilol

I - 5'

II - 5'

III - 5'

9º) Montar as lâminas

ANEXO C - Protocolo de imuno-histoquímica realizado no Laboratório de Imunopatologia e Patologia Experimental do Centro de Bioterismo Regional da UFJF

PROTOCOLO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

- 1º) Desparafinar (estufa 60°C - *overnight*)
- 2º) Xilol
I - 5'; II - 5'; III - 5'
- 3º) Hidratar em álcool
100% - 3'; 90% - 3'; 80% - 3'; 70% - 3'
- 4º) Lavar em água destilada - 2'
- 5º) Bloqueio da peroxidase endógena em H₂O₂ a 30% em metanol (câmara escura)
1º banho - 30'; 2º banho - 30'
- 6º) Recuperação antigênica - banho maria 92°C em PBS por 40'
- 7º) Resfriar por 20' em temperatura ambiente => marcar com caneta hidrofóbica
- 8º) Lavar com PBS 60º por 1'
- 9º) *Background SNIPER* por 15' => 4 gotas (azul) à temperatura ambiente
- 10º) Remover o excesso com papel toalha
- 11º) Anticorpo primário (1h)
- 12º) Banho em PBS - 2' (submersão)
- 13º) *Link universal TREKKIE* (amarelo) - 4 gotas por 20' em temperatura ambiente
- 14º) Banho em PBS - 2' (submersão)
- 15º) *TREK AVIDIN-HRP LABEL* (laranja)
STREPT AVIDIN por 10' em temperatura ambiente (câmara escura)
- 16º) Banho em PBS - 2' (submersão)
- 17º) *BETAZOIDE DAB* cromógeno => 1 gota/1ml de substrato - 5'
- 18º) Lavar com água destilada
I - banho 2'; II - banho 2'; III - banho 2';
- 19º) Contra-corar com hematoxilina => 1 gota / 4'
- 20º) Lavar com água destilada
I - banho 5'; II - banho 5'
- 21º) Desidratar em álcool
I - 100% 1'; II - 100% 1'; III - 100% 1'
- 22º) Diafanizar
I - xilol 1'; II - xilol 1'
- 23º) Montar a lâmina