

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA
BUCOMAXILOFACIAL**

**FOTOENGENHARIA DO PROCESSO DE REPARO ÓSSEO INDUZIDO
PELA LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA (GaAIIAs): ESTUDO EM FÊMURES
DE RATOS**

KARIS BARBOSA GUIMARÃES

Porto Alegre
2006

Karis Barbosa Guimarães

**FOTOENGENHARIA DO PROCESSO DE REPARO ÓSSEO INDUZIDO
PELA LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA (GaAIIAs): ESTUDO EM FÊMURES
DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, na área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial

Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber

- Orientador -

Profa. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira

- Consultora -

Porto Alegre
2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

G963f Guimarães, Karis Barbosa
Fotoengenharia do processo de reparo ósseo
induzido pela laserterapia de baixa potência (GaAIs):
estudo em fêmures de ratos / Karis Barbosa Guimarães.
Porto Alegre, 2006.
154 f.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) –
Faculdade de Odontologia, PUCRS, 2006.
Orientador: Prof. Dr. João Batista Blessmann
Weber.

1. Terapia a *laser* de baixa intensidade. 2.
Desenvolvimento ósseo. 3. Osteogênese. 4.
Bioestimulação a laser I. Weber, João Batista
Blessmann. II. Título.

CDD 617.52

Bibliotecária Responsável

Isabel Merlo Crespo
CRB 10/1201



Dedicatória

À DEUS, grande pai, norteador e condutor da minha vida. Sempre presente, nos momentos fáceis e difíceis, dando-me confiança, coragem, discernimento, fé e esperança a cada dia da minha caminhada.

“não temas, porque eu sou contigo; não te assombres, porque eu sou o teu Deus; eu te fortaleço, e te ajudo, e te sustento com a minha destra fiel.”

(Isaias 41:10)

À minha mãe, VILMA LÍGIA BARBOSA, alicerce da minha vida, responsável direta pela minha formação e por todos os meus princípios. Exemplo de perseverança, coragem, dedicação e sempre transmitindo a convicção de uma família coesa, unida e próspera, cujos valores sempre amoldaram meus ideais de vida. A você – minha - dedico todo o amor e mais uma etapa vencida.

“Assim diz o Senhor, o teu Redentor, o Santo de Israel: Eu sou o Senhor, o teu Deus, que te ensina o que é útil, e te guia pelo caminho em que deves andar.”

(Isaias 48:17)



Agradecimientos

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus irmãos, **Karine** e **Aldo Vinícius Barbosa Guimarães** e sobrinhos, **Matheus Barbosa Guimarães Motta** e **Adriano Dantas Motta Filho**, por todo o apoio, incentivo e estímulo para que eu não sentisse tanto a distância geográfica existente. Esses dois anos longe de casa mostraram, ainda mais, o quanto são importantes e o quanto os amo! Sei que essa vitória também é de vocês!

A você, **Kleper Cavalcante Medeiros**, sempre presente em minha vida. Amigo, companheiro e que, em nenhum momento me deixou desanimar. Suas palavras são objetos de crença e valores de que sempre podemos moldar e melhorar o mundo que construímos. Ao meu amor, obrigada por toda compreensão e incontestável apoio nesses últimos seis anos.

Aos meus tios, **Vânia Barbosa**, **Waldir e Vera Luna**, e primos, **André**, **Rita**, **Arthur**, **Aníbal**, **Vanille** e **Torquato Neto** por compartilharem comigo os momentos de minha vida e acima de tudo, transmitirem e valorizarem o sentido da família. Estaremos sempre juntos e unidos.

A grande amiga, **Liana Maria Pinto**, a sua presença constante em minha vida, me faz admirá-la cada vez mais. Tenho certeza do quanto este momento também é especial para você. Obrigado pela confiança, admiração e apoio incondicional.

Ao Prof. **Dr. João Batista Blessmann Weber**, pela extrema confiança em minha capacidade e pelo apoio no desencadeamento deste projeto. Sei da sua sólida e inegável contribuição no âmbito da Odontologia e, sobretudo, por ser uma pessoa vocacionada para ensinar e, orientar de forma bastante serena. Agradeço-lhe profundamente pela orientação e compreensão a mim dispensadas.

Ao grande incentivador Prof. **Dr. Lino João da Costa**, da Universidade Federal da Paraíba. Você que tão bem sabe como é árdua a tarefa de deixar tudo

em busca de qualificação profissional, foi e é exemplo em que procuro me inspirar. Espero sempre tê-lo por perto nesta caminhada, a qual apenas se inicia. Bons professores e grandes amigos jamais serão esquecidos...

Ao grande mestre Prof. **Ms. Marcelino Guedes de Lima**, da Universidade Estadual da Paraíba. Desde os tempos da graduação pude presenciar e aprender com você a realizar uma cirurgia onde se prima pela técnica e valorização do ser humano. Você opera com sabedoria e amor à profissão. Agradeço-lhe pela oportunidade de aprendizado. Foi muito bom tê-lo como mestre e espero continuarmos juntos na caminhada da cirurgia e traumatologia bucomaxilofacial.

Ao **Prof. Dr. Cláiton Heitz**, a quem aprendi muito a respeitar e ouvir, pois sempre se mostrou uma pessoa centrada e responsável no cumprimento de suas obrigações, e com o qual, obtive sólidos conceitos em alusão aos procedimentos cirúrgicos. A tua prática cirúrgica em muito me mostrou a desmistificar os entraves cirúrgicos, tornando-os assim, atingíveis e alcançáveis, sempre com o maior respeito e responsabilidade ao ser humano. Você em muito contribuiu para o meu engrandecimento pessoal e profissional.

A **Profa. Dra. Daniela Nascimento Silva**, com quem tive a oportunidade de conviver e estabelecer um vínculo técnico-científico bastante consistente. Seu jovem talento e sua competência a fazem uma grande pessoa e profissional. Sei que você fará e contribuirá muito para o engrandecimento da nossa especialidade. Nossos momentos cirúrgicos sempre ficarão em minha memória. Obrigada por todo o incentivo, apoio e dedicação oferecidos neste período de crescimento profissional.

Aos meus grandes amigos, **Marcelo Ferraro Bezerra** e **Marconi Eduardo Sousa Maciel Santos**, companheiros permanentes em todos os momentos desta jornada. Esse período da nossa vida nos mostrou invariavelmente a cordialidade, o companheirismo, a convivência e o apoio contínuo entre nós. A motivação permanente, a busca pelo aperfeiçoamento e a superação fazem parte dos nossos ideais de vida. Agradeço a Deus constantemente pela vida de vocês e sei que o nosso elo de amizade jamais se findará...

Às amigas **Juliana Pinto Villarim Almeida, Vanessa Pereira Gomes Diniz e Maria Conceição Santa Cruz**, pelo companheirismo e pelos bons momentos que passamos juntas. Bom saber que posso contar com vocês. Espero que nossa amizade se consolide ainda mais com o decorrer do tempo.

AGRADECIMENTOS

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, na pessoa do seu magnífico **Reitor Prof. Dr. Joaquim Clotet**.

À **Faculdade de Odontologia da PUCRS**, em nome do seu atual diretor, **Prof. Marcos Túlio Mazzini Carvalho**, pela oportunidade de ter realizado este tão bem conceituado curso.

Ao **Ministério da Educação**, por meio da **CAPES**, por acreditar e investir nos alunos do Programa de Pós-graduação em Odontologia da PUCRS e contribuírem para a formação de novos docentes e pesquisadores.

À **Profa. Dra. Nilza Pereira da Costa**, coordenadora do Programa de Pós-graduação em Odontologia da PUCRS e ao **Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho**, coordenador da área de concentração CTBMF, pela dedicação que têm dispensado ao curso de pós-graduação.

À **Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS)**, em nome da médica veterinária **Dra. Luísa Maria Gomes de Macedo Braga** e da bióloga, **Dra. Patrícia Sesterheim**, pela receptividade e apoio maciço diuturno. A colaboração de vocês foi fundamental para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Odontologia da PUCRS, em nome do técnico responsável **Cláudio Rogério de Oliveira**, pela sua inestimável colaboração para que este trabalho se tornasse exeqüível, mediante o processamento das amostras teciduais para a análise microscópica e **Vanessa Maria Stamatto** no detalhamento do programa de captura de imagens Image Pro-Plus®.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da PUCRS: **Dr. Cláiton Heitz**, **Dr. Rogério Belle de Oliveira**, **Dr.**

Rogério Miranda Pagnoncelli, Dr. Manoel Sant'Ana Filho, Dr. Rubem Weismann, Dr. Gilson Correia Beltrão, Dra. Daniela Nascimento Silva, Dra. Marília Gerhardt de Oliveira, Dra. Karen Cherubini, Dra. Liliane Yurgel, Dra. Nilza Pereira da Costa, Dra. Elaine Bauer Veeck e Dra. Wanyce Robinson, pelos preciosos ensinamentos técnico-científicos e, pela certeza, do engrandecimento pessoal e profissional fornecidos aos seus discentes.

Ao Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho, pela disponibilidade de colaborar com a análise microscópica deste trabalho e pelos ensinamentos na área de patologia bucomaxilofacial.

A Profa. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira, exemplo de persistência e de produção científica. Obrigada pela confiança na minha capacidade profissional e pelo exemplo de liderança e determinação.

Ao Prof. Dr. Rogério Belle de Oliveira pela confiança e oportunidades cirúrgicas oferecidas nos procedimentos cirúrgicos ambulatoriais e hospitalares. Nosso Deus sempre nos guiará pelo melhor caminho. Obrigado por todo apoio e pelos primeiros ensinamentos no campo da cirurgia ortognática.

Ao Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli pelo estímulo e palavras de confiança em momentos difíceis, apoio e incentivo permanente na descoberta da tecnologia *laser* e enquadramento desta no âmbito da cirurgia bucomaxilofacial.

Ao Prof. Dr. João Feliz de Moraes, pela valorosa contribuição na análise estatística deste trabalho.

Aos amigos **Diego Blaya, Marcelo Ferraro Bezerra e Letícia Kirst Post** que não mediram esforços, e tampouco, alento, e assim ajudarem sobejamente na fase experimental deste trabalho.

Aos colegas e companheiros do curso de mestrado: **Carla Costa Moreira, Danilo Ibrahim, Guilherme Fritscher, Letícia Kirst Post, Marcelo Ferraro Bezerra, Marcelo Emir Requia Abreu e Marconi Eduardo Maciel Santos**, por

formarem um grupo caracterizado singularmente pelo ecletismo e solicitude. Vocês foram importantes na minha formação enquanto colegas e amigos. Foi uma honra conviver com vocês.

À **Leticia Kirst Post**, abrilhantada colega de mestrado que, ao longo dos tempos, mostrou ser uma pessoa solidária e de grande coração. Obrigado pelos bons momentos de convívio e divisão de conhecimentos.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação em Odontologia da PUCRS: **Ana Prestes, Davenir Bruschi, Marcos Correa e Carlos Minossi**, pela disponibilidade, dedicação e rigor na execução de suas tarefas.

Aos **funcionários da Faculdade de Odontologia da PUCRS** e do **Hospital São Lucas da PUCRS**, em especial à **Maria Luíza Braga Kurowski e Carolina Santis**, as quais sempre demonstraram eficiência, integridade e respeito aos alunos, jamais medindo esforços no sentido de viabilizar o bom êxito da prática cirúrgica.

Aos **legítimos e verdadeiros amigos**, que próximos ou distantes, exacerbaram sua solidariedade para que fosse possível transpor as barreiras e superar minhas limitações. A vocês o meu muito obrigado!

*“O coração do homem pode fazer planos, mas a
resposta certa vem dos lábios do Senhor.
Todos os caminhos do homem são puros aos seus
olhos, mas o Senhor pesa o espírito.
Confia ao Senhor as tuas obras, e os teus desígnios
serão estabelecidos.
O coração do homem traça o seu caminho, mas o
Senhor lhe dirige os passos.”*

(Provérbios 16: 1-3; 9)



Resumo

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo avaliar, por meio de análise histológica e morfométrica, a biomodulação do processo de reparo ósseo nas regiões de periósteo, endósteo e medula óssea de cavidades confeccionadas em fêmures de ratos, submetidas à radiação com *laser* diodo infravermelho (GaAIs). Foram utilizados 30 ratos machos da linhagem *Wistar*, com peso entre 350 a 550 gramas, distribuídos aleatoriamente em dois grupos, o controle (GI) e o experimental (GII), e seis subgrupos de acordo com o período de observação dos animais. Para os grupos controle e experimental destinaram-se 13 e 14 animais, respectivamente. Os subgrupos experimentais receberam a terapia *laser* de baixa potência (LLLT), em um defeito ósseo considerado experimental, identificado por meio de um parafuso de titânio, fixado, previamente, a 8mm do mesmo. No grupo GI todo o protocolo cirúrgico foi realizado, porém sem a aplicação do *laser*. No grupo GII foi utilizado o *laser* infravermelho ($\lambda = 830 \text{ nm}$, 6 J/cm^2 , 50 mW , 120 s) de forma pontual e contínua. O protocolo de radiação foi estabelecido com intervalos de 48 horas, iniciando-se imediatamente após a confecção do defeito ósseo, na cavidade medular. Os animais foram mortos aos 07, 15 e 21 dias. Para análise histológica, executou-se o processamento de rotina para as técnicas de HE e picrossírius. As lâminas foram estudadas segundo análise descritiva e morfométrica. Os fenômenos teciduais avaliados, na análise descritiva, incluíram a resposta inflamatória e a neoformação óssea. Para a análise morfométrica determinaram-se as médias de trabeculado ósseo neoformado além das devidas localizações anatômicas destes trabeculados. Os resultados obtidos demonstraram que, nos grupos em que o *laser* foi aplicado na loja cirúrgica (GII), a atividade de remodelação óssea foi quantitativamente maior quando comparada à dos grupos GI, com maior maturação da matriz óssea orgânica e padrões de osteogênese em estágios mais avançados, nos períodos iniciais do experimento. Além disso, segundo a análise morfométrica, a biomodulação óssea positiva evidenciada nos grupos GII apresentou maior média de trabeculado ósseo quando comparada aos grupos não submetidos à LLLT. O mapeamento morfométrico evidenciou a produção de estímulos biomoduladores positivos apenas na localização de periósteo, denotando assim, maior potencial de penetração, estimulação e aceleração da consolidação óssea na região cortical do defeito ósseo. Os resultados permitiram concluir que, a laserterapia de baixa potência no protocolo estabelecido atua como biomoduladora óssea em região de periósteo, podendo ser utilizada como coadjuvante no processo de reparo ósseo.

Descritores¹: Terapia a *laser* de baixa intensidade; desenvolvimento ósseo; osteogênese; bioestimulação a *laser*.

¹ Descritores em Ciências da Saúde (DeCS); disponível em <http://decs.bvs.br/>



Abstract

ABSTRACT

The main objective of the present study was to evaluate, through histological and morphometric analysis, the biomodulation process of bone repair on the periosteum, endosteum and medullary regions in femoral cavities of mice, which were submitted to diode infrared laser radiation (GaAlAs). 30 male mice *Wistar* were used, weighing between 350 and 550 grams, distributed randomly in two groups, the control (GI) and the experimental one (GII) and six subgroups in accordance with the period of observation of the animals. For the groups, control and experimental, there has been designated each 13 and 14 animals, respectively. The experimental groups received low power Laser therapy (LLLT), in the experimental bone cavity, identified through a Titanium screw, which was previously fixed, 8mm from the cavity. In group GI, a surgical protocol was carried out, without laser application. In groups GII, infrared laser was used ($\lambda = 830 \text{ nm}$, 6 J/cm^2 , 50mW , 120s) of punctual and continuous potency was used. The radiation period was every 48 hours, initiated immediately after the injury production, in the medullar cavity. The death of the animals occurred on the 07th, 15th, 21st days. For the histological analysis, the routine processing was carried out, with the HE and picosirius technique. The laminas were studied through descriptive and morphometric analysis. The evaluated tissue phenomena were the inflammatory answer and bone neoformation. For the morphometric analysis the averages of mineralized new bone had been determined and the anatomical localizations of these had been made. The results achieved by this study demonstrated that in the groups where laser was used in the experimental bone cavity (GII) the bone healing was quantitatively better if compared to the results achieved by GI, with evidences of bigger maturation of organic bone matrix and standards of osteogenesis in more advanced periods of training in the initial periods of the experiment. However, according to morphometric analysis, the positive biomodulation was presented bigger when comparative to the groups not submitted to the LLLT. The histomorphometric mapping evidenced the production of stimulations positive biomodulation only in the localization of periosteum, thus denoting, greater potential of penetration, stimulation and acceleration of the bone consolidation in the cortical region of the bone defect. The results led to the conclusion that the use of low power laser therapy with this protocol causes positive biomodulation effects on the healing process on periosteum and can be used as coadjuvant in the bone repair process.

Keywords²: Laser Therapy, Low-Level, Bone Development, Osteogenesis, Biomodulation Laser

² Mesh: Medical Subject Headings; disponível em: www.nlm.nih.gov/mesh



LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Incisão contínua e longitudinal na derme da região femoral direita. | 79 |
| Figura 2: Exposição do tecido ósseo do fêmur, após descolamento periosteal..... | 79 |
| Figura 3: Confeção do primeiro defeito ósseo no terço superior da face lateral do fêmur | 80 |
| Figura 4: Fixação do parafuso de titânio no terço superior da face lateral do fêmur | 80 |
| Figura 5: Defeito ósseo experimental confeccionado no terço médio da face lateral do fêmur..... | 81 |
| Figura 6: Aplicação do <i>laser</i> não-ablativo.. .. | 83 |
| Figura 7: Peça cirúrgica dissecada evidenciando o parafuso localizador de titânio, disposto a uma distância de 8mm do defeito ósseo experimental..... | 84 |
| Figura 8: Modelo esquemático para confeção dos cortes histológicos..... | 85 |
| Figura 9: Delimitação das trabéculas ósseas, com auxílio do cursor do <i>mouse</i> . A área é calculada automaticamente, através do programa Image Tool Scripting. Coloração por HE; ampliação original, 40X..... | 88 |
| Figura 10: Imagem do corte histológico do grupo GIA. Observa-se deposição óssea com trabéculas neoformadas (TO) e interpostas entre o tecido medular (TM) e corticais internas da loja cirúrgica (CI). H.E., aumento aproximado 40X. | 92 |
| Figura 11: Imagem do corte histológico do grupo GIB. Observa-se maior deposição óssea com trabéculas neoformadas (TO) com aspecto mais maduro e interpostas entre o tecido medular (TM) e cortical interna da loja cirúrgica (CI). H.E., aumento aproximado 40X..... | 92 |
| Figura 12: Imagem do corte histológico do grupo GIC. Observa-se deposição óssea com trabéculas (TO) com aspecto mais maduro em direção ao fechamento da cortical óssea. H.E., aumento aproximado 40X. | 93 |
| Figura 13: Imagem de corte histológico do grupo GIA. Observa-se trabéculas ósseas neoformadas (TO), tecido medular (TM), cortical interna da loja cirúrgica (CI) e trama de fibras colágenas (FC). Picrosírius, aumento aproximado 40X. | 93 |
| Figura 14: Imagem de corte histológico do grupo GIB. Observa-se trabéculas ósseas neoformadas (TO), tecido medular (TM), cortical | |

| | |
|---|----|
| interna da loja cirúrgica (CI) e trama de fibras colágenas (FC). Picrosírius, aumento aproximado 40X..... | 94 |
| Figura 15: Imagem de corte histológico do grupo GIC. Observa-se trabéculas ósseas neoformadas (TO), tecido medular (TM), cortical interna da loja cirúrgica (CI) e trama de fibras colágenas (FC). Picrosírius, aumento aproximado 40X..... | 94 |
| Figura 16: Imagem do corte histológico do grupo GIIA. Observa-se deposição óssea com trabéculas (TO) em direção ao tecido medular (TM) e maiores que o GI e corticais internas da loja cirúrgica (CI). H.E., aumento aproximado 40X..... | 96 |
| Figura 17: Imagem do corte histológico do grupo GIIB. Observa-se deposição óssea com trabéculas neoformadas (TO) com aspecto mais maduro e interpostas entre o tecido medular (TM) e cortical interna da loja cirúrgica (CI). H.E., aumento aproximado 40X..... | 96 |
| Figura 18: Imagem do corte histológico do grupo GIIC. Observa-se deposição óssea com trabéculas (TO) com aspecto mais maduro em direção ao fechamento da cortical óssea. Observa-se tecido medular (TM). H.E., aumento aproximado 40X..... | 97 |
| Figura 19: Imagem de corte histológico do grupo GIIA. Observa-se trabéculas ósseas neoformadas (TO), tecido medular (TM), cortical interna da loja cirúrgica (CI) e trama de fibras colágenas (FC). Picrosírius, aumento aproximado 40X..... | 97 |
| Figura 20: Imagem de corte histológico do grupo GIIB. Observa-se trabéculas ósseas neoformadas (TO), tecido medular (TM), cortical interna da loja cirúrgica (CI) e trama de fibras colágenas (FC). Picrosírius, aumento aproximado 40X..... | 98 |
| Figura 21: Imagem de corte histológico do grupo GIIC. Observa-se trabéculas ósseas neoformadas (TO), tecido medular (TM), cortical interna da loja cirúrgica (CI) e ausência de fibras colágenas (FC). Picrosírius, aumento aproximado 40X..... | 98 |



Lista de Quadros e Tabelas

LISTA DE QUADROS E TABELAS

| | |
|--|-----|
| Quadro 1: Organização dos grupos e subgrupos por períodos de observação..... | 76 |
| Quadro 2: Doses totais de radiação com o <i>laser</i> GaAlAs, por subgrupo. | 82 |
| Tabela 1: Comparação da distribuição das fibras colágenas entre os grupos controle e experimental | 99 |
| Tabela 2: Comparação do grau de neoformação óssea entre os grupos controle e experimental | 100 |
| Tabela 3: Comparação do sentido da neoformação óssea entre os grupos controle e experimental | 100 |
| Tabela 4: Comparação do grau de fechamento da cortical óssea entre os grupos controle e experimental | 101 |
| Tabela 5: Comparação da presença do infiltrado inflamatório neutrofílico entre os grupos controle e experimental | 101 |
| Tabela 6: Comparação da presença de fibras colágenas entre os grupos e os períodos de observação. | 102 |
| Tabela 7: Padrão de distribuição das fibras colágenas segundo os períodos de observação e as localizações periosteal, endosteal e medular. | 103 |
| Tabela 8: Padrão de distribuição das fibras colágenas segundo os períodos de observação e as zonas de transição periosteal-medular e endosteal-medular. | 104 |
| Tabela 9: Comparação do grau de neoformação óssea entre os grupos e os períodos de observação. | 104 |
| Tabela 10: Padrão de distribuição da neoformação óssea segundo os períodos de observação e as localizações periosteal, endosteal e medular. | 104 |
| Tabela 11: Comparação do padrão da neoformação óssea segundo os períodos de observação e as zonas de transição periosteal-medular e endosteal-medular | 107 |
| Tabela 12: Comparação do grau de fechamento da cortical entre os grupos e os períodos de observação. | 107 |
| Tabela 13: Comparação do sentido da neoformação óssea entre os grupos e os períodos de observação. | 107 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 14: Comparação da presença de infiltrado inflamatório neutrofílico entre os grupos e os períodos de observação..... | 108 |
| Tabela 15: Comparação das médias referentes às áreas de trabeculado ósseo neoformado nos grupos estudados e nos períodos de observação..... | 109 |
| Tabela 16: Média, desvio padrão, intervalo de confiança, valores mínimos e máximos referentes às áreas de trabeculado ósseo nos grupos analisados. | 110 |
| Tabela 17: Comparação das médias, desvio-padrão e valor de p referentes às áreas de trabeculado ósseo nos grupos estudados segundo a localização do periósteeo. | 110 |
| Tabela 18: Comparação entre os subgrupos analisados segundo a localização do periósteeo e associação estatística. | 111 |
| Tabela 19: Comparação das médias, desvio-padrão e valor de p referentes às áreas de trabeculado ósseo nos grupos estudados segundo a localização medular. | 111 |
| Tabela 20: Comparação das médias, desvio-padrão e valor de p referentes às áreas de trabeculado ósseo nos grupos estudados segundo a localização do endósteeo. | 112 |



Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|-----------------|---|
| ANOVA | Análise de Variância |
| ATP | trifosfato adenosina |
| ArF | fluoreto de argônio |
| cAMP | Adenosina monofosfato cíclica |
| CEP | Comitê de Ética em Pesquisa |
| CI | cortical interna |
| cm | centímetro |
| cm ² | centímetro quadrado |
| cm ³ | centímetro cúbico |
| CO ₂ | dióxido de carbono |
| CTBMF | Cirurgia e traumatologia bucomaxilofacial |
| CW | corrente contínua |
| DE | densidade de energia |
| DP | densidade de potência |
| DNA | ácido desoxirribonucléico |
| E | energia |
| Er:YAG | érbio, ítrio, alumínio, granada |
| f | freqüência |
| FDA | Food and Drug Administration (Administração de drogas e alimentos) |
| FEPPS | Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde |
| Ga | gálio |
| GaAIs | arseneto de gálio e alumínio |
| GaAs | arseneto de gálio |
| h | hora |
| HE | hematoxilina-eosina |
| HLLT | <i>High level laser therapy</i> (Terapia <i>laser</i> de alta potência) |
| HeNe | hélio-neônio |
| Ho:YAG | holmio, ítrio, alumínio, granada |

| | |
|-------------------|--|
| Hz | Hertz |
| IgA | Imunoglobulina A |
| InGaAsP | Fosfeto de Índio-Gálio-Arsênio |
| J | Joule |
| J/cm ² | joule por centímetro quadrado |
| J/m ² | Joule por metro quadrado |
| LEA | Limite de Emissão Acessível |
| LLLT | <i>Low level laser therapy</i> (Terapia laser de baixa potência) |
| m | metro |
| mg | miligrama |
| min | minutos |
| ml | Mililitro |
| mm | milímetro |
| m/s | minutos por segundo |
| mW | miliwatts |
| mm | micrômetro |
| n.º | número |
| Nd:YAG | Neodímio, ítrio, alumínio, granada |
| nm | nanômetro |
| O ₂ | Oxigênio |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| p | probabilidade de erro |
| P | Potência |
| PUCRS | Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul |
| RNA | ácido ribonucléico |
| s | segundo |
| TM | tecido medular |
| TO | trabéculas ósseas |
| XeCl | cloreto de xenônio |
| W/cm ² | Watts por centímetro quadrado |

| | |
|---------------|--|
| YAG | ítrio-alumínio-granada |
| λ | comprimento de onda |
| β | Beta |
| ® | marca registrada |
| \varnothing | diâmetro da secção transversal da fibra óptica |
| % | porcento |
| °C | graus Celsius |



Sumário

SUMÁRIO

| | |
|---|------------|
| 1 INTRODUÇÃO | 30 |
| 2 REVISTA DE LITERATURA | 34 |
| 2.1 Tecido ósseo e bases biológicas para reparo ósseo..... | 34 |
| 2.2 Radiação <i>Laser</i> | 39 |
| 2.3 Laserterapia | 47 |
| 2.4 Laserterapia no processo de reparo ósseo | 60 |
| 3 PROPOSIÇÃO | 71 |
| 4 METODOLOGIA | 73 |
| 4.1 Respaldo ético da pesquisa..... | 73 |
| 4.2 Caracterização..... | 73 |
| 4.3 Paradigma..... | 73 |
| 4.4 Variáveis | 74 |
| 4.4.1 Variável independente | 74 |
| 4.4.2 Variável dependente..... | 74 |
| 4.5 Problemas | 74 |
| 4.6 Hipótese | 75 |
| 4.7 Configuração da amostra..... | 75 |
| 4.8 Organização dos grupos..... | 75 |
| 4.9 Critérios de inclusão / exclusão | 76 |
| 4.10 Técnica cirúrgica..... | 77 |
| 4.11 Radiação com o <i>laser</i> não-cirúrgico. | 81 |
| 4.12 Preparo das amostras..... | 83 |
| 4.13 Análise histológica | 85 |
| 4.14 Procedimento de captura de imagens e análise morfométrica | 86 |
| 4.12 Análise estatística | 88 |
| 5 RESULTADOS | 91 |
| 6 DISCUSSÃO | 114 |
| 7 CONCLUSÃO | 131 |
| REFERÊNCIAS | 133 |
| APÊNDICE A Ficha de avaliação microscópica semiquantitativa | 142 |
| APÊNDICE B Cálculo da dosimetria utilizada..... | 143 |
| ANEXO A Protocolo da Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS | 145 |
| ANEXO B Protocolo do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS..... | 146 |

| | |
|--|------------|
| ANEXO C Normas para prática didático-científica da vivisseccão de animais | 147 |
| ANEXO D Declaração de permissão de utilização da FEPPS para o experimento | 149 |
| ANEXO E Laudo da intensidade do aparelho Thera Lase® realizado pelo Departamento de Física da PUCRS | 150 |
| ANEXO F Seqüência prática para coloração hematoxilina-eosina | 153 |
| ANEXO G Seqüência prática para coloração picrosírius | 154 |



Introdução

1 INTRODUÇÃO

A palavra *laser* é um acrônimo para *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (Amplificação da luz por emissão estimulada de radiação) (BRUGNERA JÚNIOR; PINHEIRO, 1998; KERT; ROSE, 1998).

O *laser* é uma forma de radiação não-ionizante, altamente concentrada, que, em contato com os diferentes tecidos, resulta em efeitos fototérmicos, fotoquímicos e não lineares. Ao contrário de outras formas de radiação usadas com finalidades terapêuticas, a radiação *laser* não é invasiva e muito bem tolerada pelos tecidos. É considerada por muitos autores como a mais significativa descoberta deste século por envolver infinitas perspectivas nas áreas de pesquisas biológicas e ciências médicas (BRUGNERA JÚNIOR, 2003).

O *laser* de baixa potência tem sido utilizado em tratamentos médicos e odontológicos visando sua ação terapêutica sobre os diferentes tecidos biológicos. Estudos experimentais, *in vitro* e *in vivo*, com severos e bem controlados parâmetros metodológicos, têm sugerido que a terapia *laser* de baixa potência (LLLT) modula vários processos biológicos em modelos animais após terem sido expostos a algum tipo de trauma. A LLLT atua na estimulação da reparação tecidual, melhorando a regeneração e a cicatrização de tecidos através da promoção da proliferação celular (KARU, 1989; SILVA; CAMILLI, 2006); da aceleração na formação de tecidos de granulação (KOLÁVORÁ et al., 1999); do estímulo na síntese do colágeno, com formação das fibras procolágenas tipo I e tipo III (PINHEIRO; GERBI, 2006) e do aumento da síntese de ATP (KARU, 1989).

A literatura também afirma que a LLLT promove o aumento na concentração das β -endorfinas e, conseqüentemente, desencadeia efeito analgésico (ELSAYED; DYSON, 1990; MERLI et al., 2005). O *laser* também promove a liberação dos mastócitos, aumentando a concentração de histamina, provoca vasodilatação, com aumento da permeabilidade vascular, além de atuar nas prostaglandinas, inibindo e

bloqueando a ação da enzima ciclooxigenase e na ativação dos linfócitos, promovendo, assim, efeito antiinflamatório (MESTER et al., 1973; TAKEDA, 1988; CATÃO, 2004).

A laserterapia de baixa intensidade está bem indicada como coadjuvante no processo reparacional tecidual através de seus efeitos terapêuticos gerais (BRUGNERA JR. et al.2003). Proporciona ao paciente submetido a uma intervenção cirúrgica, uma maior rapidez na cicatrização tecidual, reparando os tecidos moles, ósseo e nervoso; reduz o edema e o desconforto no pós-operatório (TRELLES; MAYAYO, 1987) além de interferir na modulação e atenuação da sintomatologia dolorosa (FERNANDO; HILL; WALKER, 1993).

As perdas ósseas constituem um dos maiores problemas dentro das especialidades médicas e odontológicas e, provavelmente, estão associadas à exposição do tecido ósseo a várias condições fisiológicas e patológicas. O tecido ósseo possui uma enorme capacidade regenerativa e, em muitas situações, é capaz de restabelecer perfeitamente sua estrutura óssea arquetônica e as propriedades mecânicas através de um processo complexo que envolve atividade local e sistêmica do organismo, participando deste processo vários tipos de células, enzimas e fatores de regeneração tecidual. A extensão e a velocidade da reparação dependem da localização anatômica, do agente etiológico, das dimensões da lesão, além das características biológicas de cada indivíduo. No entanto, a capacidade reparativa óssea tem limites e também pode falhar, caso certas condições não forem atendidas. Os fatores que impedem ou previnem o reparo ósseo são, entre outros: falhas de vascularização, instabilidade mecânica; defeitos sobre-estendidos e tecidos competidores com alta atividade de proliferação. A perda de fragmentos ou a remoção cirúrgica de fragmentos necróticos proporcionam defeitos. em geral, largos para serem preenchidos de forma espontânea e promoverem, desta forma, o reparo ósseo (PINHEIRO; GERBI, 2006).

As perdas ósseas promovidas por fraturas faciais com perdas de substância ou processos patológicos dentro do complexo estomatognático, tais como osteomielites, lesões císticas, tumores odontogênicos e defeitos ósseos

periodontais, e a necessidade contínua e crescente a osseointegração de implantes e enxertos ósseos nos sítios receptores e doadores têm conduzido vários pesquisadores ao desenvolvimento de novas tecnologias que visem auxiliar a reparação do tecido ósseo ou acelerar o processo de cicatrização óssea.

O uso potencial dos *lasers* na biomodulação do reparo ósseo através de suas propriedades fotoquímicas e fotobiológicas tem sido estudado por pesquisadores em todo o mundo como método de estimulação da osteogênese e redutor do tempo da reconsolidação óssea (SILVA, CAMILLI, 2006). Entretanto, a revista de literatura revela que, estudos sobre a influência da radiação com *laser* de baixa potência sobre o tecido ósseo, através de uma detalhada análise da fotoengenharia do processo de reparo ósseo, com descrição histológica e quantitativa do padrão e das regiões anatômicas de cicatrização tecidual ainda são deficientes.



Revista de Literatura

2 REVISTA DE LITERATURA

2.1 TECIDO ÓSSEO E BASES BIOLÓGICAS PARA REPARO ÓSSEO

O tecido ósseo é um tecido mineralizado rígido, de natureza conjuntiva, que se dispõe formando os ossos, estruturas rígidas e resistentes que formam o esqueleto, apresentando propriedades mecânicas e biológicas distintas e diferenciáveis. Ao lado do excelente comportamento mecânico, o osso exibe um excelente potencial para regeneração (SCHENK, 1996).

Sendo o principal constituinte do esqueleto, o tecido ósseo serve de suporte e proteção para as partes moles e protege os órgãos vitais, como os contidos nas caixas craniana e torácica e no canal raquidiano. O osso é também o sítio onde se aloja o tecido hematopoiético. Tem ainda, como função, apoiar os músculos esqueléticos, transformando suas contrações em movimentos úteis, constituindo, assim, um sistema de alavancas que amplia as forças geradas na contração muscular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999). Além disso, os ossos são reservatórios de cálcio, fosfato, dentre outros íons, e são essenciais na manutenção dos níveis desses elementos no sangue (KATCHBURIAN; ARANA, 1999).

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado constituído de 33% de matriz orgânica, que inclui 28% de colágeno tipo I e o restante de matriz orgânica formada por proteínas não colágenas, incluindo osteonectina, osteocalcina, proteína morfogênica óssea, proteoglicana óssea e sialoproteína óssea. Apesar do aspecto aparentemente inerte, os ossos crescem, são remodelados e mantêm-se ativos durante toda a vida do organismo. Quando lesados, como em fraturas, são capazes de sofrer reparação, fenômeno que demonstra sua permanente vitalidade. A homeostase do tecido ósseo é controlada por fatores mecânicos e humorais, locais e gerais (TEN CATE, 1994; KATCHBURIAN; ARANA, 1999).

Vários hormônios possuem a capacidade de controlar a remodelação óssea, a qual ocorre simultaneamente em múltiplos ossos. Os hormônios sexuais esteroidais, a exemplo do estradiol, bem como os hormônios paratireoidianos, paratormônio (PTH) são envolvidos no controle da remodelação óssea por atuarem diretamente no processo de diferenciação dos osteoclastos e, assim, no processo de reabsorção óssea (DUCY; SCHINKE; KARSENTY, 2000).

Do ponto de vista macroscópico, a estrutura óssea é classificada de acordo com a densidade em osso compacto ou trabecular. Microscopicamente são classificados segundo a sua composição em osso trançado, lamelar, fibroso e composto (ROBERTS; GARETTO, 2000).

Diversos tipos celulares compõem o tecido ósseo, dentre os quais:

- *osteoblastos*: células que sintetizam a parte orgânica da matriz óssea e que, no momento em que estão envolvidos completamente por matriz óssea dão origem aos osteócitos. São encontrados alinhados ao longo das superfícies ósseas (ROSS; ROMRELL, 1993; BURKITT; YOUNG; HEALTH, 1997; SILVA JÚNIOR, 2000);

- *osteócitos*: células localizadas em cavidades ou lacunas dentro de trabéculas ósseas formadas. Estas células estão associadas à nutrição das trabéculas, possuindo prolongamentos citoplasmáticos que se conectam uns aos outros e representam, sobretudo, osteoblastos inativos aprisionados dentro do osso (ROSS; ROMRELL, 1993; BURKITT; YOUNG; HEALTH, 1997; SILVA JÚNIOR, 2000);

- *osteoclastos*: células que participam do processo de reabsorção do tecido ósseo. São células gigantes e multinucleadas, extensamente ramificadas, derivadas da fusão de monócitos que atravessam os capilares sanguíneos. Os osteoclastos penetram na matriz óssea, através da ação enzimática, formando depressões conhecidas como superfícies de reabsorção ou Lacunas de Howship e constituem um grupo extremamente importante, pois juntamente com os osteoblastos participam na rotatividade e na remodelação constante do osso (BURKITT; YOUNG; HEALTH, 1997).

As superfícies internas e externas dos ossos são recobertas por células osteogênicas e tecido conjuntivo, constituindo o endóstio e o perióstio,

respectivamente. A camada mais superficial do periósteo contém, sobretudo, fibras colágenas e fibroblastos. Alguns feixes de fibras colágenas do periósteo, denominadas fibras de Sharpey, penetram no tecido ósseo prendendo firmemente o periósteo ao osso (BURKITT; YOUNG; HEALTH, 1997).

Na sua porção mais profunda, o periósteo é mais celular e apresenta células osteoprogenitoras, morfológicamente parecidas com os fibroblastos. As células osteoprogenitoras multiplicam-se por mitose e diferenciam-se em osteoblastos, desempenhando importante papel no crescimento dos ossos e na reparação das fraturas. O endósteo é, em geral, constituído por uma camada de células osteogênicas achatadas, revestindo as cavidades do osso esponjoso, o canal medular, os canais de Havers e os de Volkmann (BURKITT; YOUNG; HEALTH, 1997; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

A presença de mineral faz do osso um tecido único, não somente do ponto de vista biossintético, mas também do ponto de vista catabólico. A quantidade de tecido ósseo presente durante o crescimento fisiológico e a remodelação do esqueleto é determinada pela proporção entre as taxas de formação e reabsorção óssea (LERNER, 2000).

As células osteoblásticas desempenham papel fundamental nos processos de formação óssea e ativação da função osteoclástica. Quando completamente diferenciados, os osteoblastos dispõem-se numa única camada de células que recobre as superfícies dos ossos compactos e esponjosos (VAES, 1988). Desta forma, estas células podem manter-se ativas produzindo osso, permanecerem inativas ou envolvidas no processo de iniciação de reabsorção óssea. Para ocorrer o processo de reabsorção óssea é necessário que as células osteoclásticas penetrem nas camadas celulares constituídas pelos osteoblastos e osteócitos, e recebam acesso direto à superfície mineralizada (LERNER, 2000). Desta forma, as células osteoblásticas e osteoclásticas possuem atividades intimamente relacionadas (DUCY; SCHINKE; KARSENTY, 2000).

Não apenas durante o desenvolvimento esquelético, mas também por toda a vida, células advindas da linhagem dos osteoblastos sintetizam e secretam

determinadas moléculas que desencadeiam e controlam a diferenciação dos osteoclastos (DUCY; SCHINKE; KARSENTY, 2000). As alterações promovidas no fenótipo dos osteoblastos permitem a secreção de enzimas proteolíticas, as quais degradam a matriz extracelular constituída pelos osteócitos, além de estimularem a diferenciação das células progenitoras mononucleares dos osteoclastos, presentes no perióstio, transformando-as em osteoclastos ativos multinucleares, para que, assim, possam iniciar o processo de reabsorção do tecido ósseo (LERNER, 2000).

Os osteoclastos também desenvolvem papel primordial na manutenção dos níveis de cálcio no organismo. Observa-se um aumento da atividade osteoclástica em processos de excessiva perda óssea numa variedade de condições patológicas. Por outro lado, a diminuição da atividade osteoclástica, possivelmente pela produção de osteoclastos defeituosos ou devido a uma diminuição na ativação destes, é causa de excessivo acúmulo de osso, fato observado em diferentes patologias osteopetróticas (LERNER, 2000).

A formação óssea depende de dois pré-requisitos: suprimento vascular e amplo suporte mecânico. Os osteoblastos exercem suas atividades apenas nas proximidades adjacentes aos vasos sanguíneos. A redução do oxigênio parece alterar o código genético em direção ao tecido fibroso e fibrocartilaginoso (SCHENK, 1996), pois é conhecido que o suprimento adequado de oxigênio favorece a síntese de colágeno e a epitelização das feridas (KARU, 1987).

O processo de reparo ósseo é descrito por três fases: fase inflamatória, fase reparadora e fase de remodelação. A fase inflamatória é caracterizada pela formação de um coágulo sanguíneo que envolve as superfícies ósseas no local da lesão, estendendo-se pelo perióstio e cavidades medulares próximas, acompanhadas de edema mais ou menos intenso. Instala-se, assim, um processo inflamatório agudo com grande mobilização de neutrófilos e macrófagos, provocado pela liberação de substâncias quimiotáticas (a exemplo da histamina e serotonina) no local lesionado. Esta fagocitose tem como objetivo iniciar a remoção do coágulo das regiões necrosadas e dos osteócitos mortos que surgem nas superfícies ósseas da região lesionada. Imediatamente após, inicia-se a fase reparadora com o aparecimento de um grande número de fibroblastos produtores de colágeno tipo III

responsáveis pela formação de um calo fibroso, no qual as fibras colágenas envolvem a região lesionada. À medida que a ação dos macrófagos prossegue, reabsorvendo o coágulo e o tecido ósseo necrosado, surge, gradativamente, uma nova rede capilar, oriunda das células endoteliais remanescentes dos vasos rompidos e das células mesenquimais indiferenciadas, as quais invadem a região do coágulo juntamente com fibroblastos e osteoblastos, para formar rapidamente, um novo tecido ósseo no local, por um processo de ossificação intramembranosa ou endoconjuntiva, resultando em um osso imaturo. O calo ósseo tem uma textura própria, mais celular e menos mineralizada, indicando a rapidez do processo de ossificação e justificando a denominação de osso imaturo. Na fase remodeladora, o calo ósseo passa por uma série de processos de reabsorção e neoformação até que a região lesionada retome as características morfológicas, biomecânicas e funcionais, as quais possuíam antes da lesão. As atividades osteoblásticas e osteoclásticas removem os excessos de material do calo ósseo, restabelecendo as cavidades ósseas que existiam e reconstróem os sistemas de Havers e o trabeculado de osso esponjoso na mesma disposição anterior à lesão (CATANZARO GUIMARÃES, 1982; POSPISILOVÁ, 1982).

A remodelação óssea fisiológica é um processo complexo que resulta na reabsorção do osso pré-existente de uma determinada área específica, seguida pela neoformação óssea (HILL e ORTH, 1998). Desta forma, o equilíbrio da massa óssea depende da interação entre esses dois processos (SWAMINATHAN, 2001).

O processo de reabsorção óssea inclui a dissolução dos cristais de hidroxiapatita e a quebra das proteínas da matriz óssea extracelular (LERNER, 2000). Morfologicamente e bioquimicamente, o processo de reabsorção óssea inicia-se pela dissolução de componentes inorgânicos seguida da degradação da matriz óssea. Com a evolução deste processo, os componentes orgânicos são fagocitados através de vesículas, enquanto que, os componentes inorgânicos são conduzidos para o meio extracelular através da membrana celular (SALO et al., 1997; LERNER et al., 1997).

Entende-se por regeneração a substituição das células lesadas por outras de mesma morfologia e função. No tecido ósseo, defeitos com dimensões pequenas

reparam-se com facilidade sem deixar cicatriz fibrosa, em virtude de dispor de mecanismo reparador semelhante ao da osteogênese embriológica (SEAL; OTERO; PANITCH, 2001), mecanismo este que não ocorre em defeitos que apresentam dimensões maiores.

Estudos experimentais com o objetivo de avaliar o processo de regeneração óssea deverão apresentar defeitos com determinadas características morfológicas de extensão e largura suficientes para impedir a regeneração óssea espontânea. Estes defeitos foram denominados por Schmitz e Hollinger (1986) como críticos. Nestas situações, em que o defeito ósseo criado atinge as proporções do tamanho estipulado como crítico ocorre à formação de tecido conjuntivo fibroso em lugar de osso. Isto pode ser considerado como o fator distintivo que serve para sugerir uma inter-relação entre defeito ósseo crítico e a não união fibrosa.

2.2 RADIAÇÃO LASER

No início do século XX, o físico alemão Albert Einstein, em 1917, expôs os princípios físicos da emissão estimulada baseados na teoria quântica proposta por Planck em 1900, a qual discute as relações entre as quantidades de energia liberadas por processos anatômicos bem como a interação de átomos, íons e moléculas com a radiação eletromagnética em termos de absorção e emissão espontânea de radiação. Os princípios da emissão estimulada de fótons são estabelecidos a partir do “bombeamento” de um meio ativo, elevando o átomo a um nível superior de energia. A emissão de energia ocorre quando o átomo retorna do seu estado orbital de excitação para um nível inferior. O excesso de energia é liberado na forma de um fóton (PINHEIRO et al., 1998). É sob este princípio de emissão estimulada que a luz *laser* está apoiada (BRUGNERA JÚNIOR; PINHEIRO, 1998).

O *laser* é um dispositivo que produz radiação eletromagnética no espectro da luz. Inicialmente, apenas uma pequena parte da radiação eletromagnética era conhecida, isto é, a parte visível. Newton e outros físicos foram os primeiros a

demonstrar as características das ondas eletromagnéticas, quando propuseram que as ondas de luz podiam interferir umas com as outras. O passo seguinte foi mostrar que as várias cores correlacionavam-se com diferentes comprimentos de onda. A luz vermelha tem o maior comprimento de onda, enquanto a violeta possui o menor. As outras cores (laranja, amarelo, verde e azul) estão entre estes extremos. A radiação com comprimento de onda maior que o vermelho foi denominada infravermelha. Esta radiação, entretanto, é completamente invisível, pois não tem energia de fóton suficiente para excitar as células visuais na retina do olho humano. Do mesmo modo, a radiação invisível com comprimento de onda menor que a luz violeta foi denominada de radiação ultravioleta (PÖNTINEN, 1992).

Somente em 1960, Maiman criou o primeiro *laser* sólido, utilizando como meio ativo uma pedra de Rubi. Em 1961, praticou-se com êxito a primeira intervenção cirúrgica com *laser*. O primeiro relato, *in vivo*, do uso da radiação *laser* em Odontologia foi descrito por Goldman, Ruben e Sherman, em 1964, os quais utilizaram o *laser* de Rubi em tecidos dentários duros. Apesar dos danos térmicos provocados pelo *laser*, os autores foram capazes de demonstrar a real importância dos princípios estabelecidos por Einstein no início do século passado (BRUGNERA JÚNIOR; VILLA; GENOVESE, 1991). A aplicação da terapia *laser* não cirúrgica, especificamente na Odontologia, teve início com Benedito (1982) com um aparelho *laser* diodo de Arseneto de Gálio (GaAs $\lambda=904$ nm) (NICCOLI FILHO et al., 1993).

As características fundamentais do *laser*, derivadas dos fenômenos físicos de sua produção, e que o tornam totalmente diferente da luz natural, são: coerência, monocromaticidade, unidirecionalidade e alto brilho (PINHEIRO; FRAME, 1992).

Sabe-se que a luz coerente é caracterizada por possuir todas as ondas com o mesmo comprimento, conseqüentemente possuindo a uniformidade da luz. A monocromaticidade revela a pureza da luz *laser*, composta de uma única cor, com qualidade de brilho e comprimento de onda específico, enquanto que, o efeito colimado apresenta todas as ondas sempre paralelas entre si, não havendo dispersão, ou seja, são capazes de percorrer longas distâncias sem aumentar seu diâmetro (MAILLET, 1987; GENOVESE, 1992; MAINAN, 1996; BRUGNERA

JUNIOR; PINHEIRO, 1998; LOW; RED, 2001; BRUGNERA JÚNIOR et al., 2003). Cada uma destas propriedades, em separado ou em conjunto, possibilita aplicações específicas e de grande resultados na área biológica (PÖNTINEN, 1992; NICCOLI FILHO et al., 1993).

Conforme Brugnera e Pinheiro (1998) os *lasers* podem ser classificados em dois grandes grupos, conforme sua potência e capacidade de interação com os tecidos: os *lasers* de baixa potência ou não-cirúrgicos e os *lasers* de alta potência ou cirúrgicos. Os *lasers* podem ser ainda classificados quanto à forma de emissão da radiação em contínuos (onda contínua), pulsáteis (onda com pulsos) e Q-switched (ondas desencadeantes). O meio ativo destes *lasers* pode ser sólido, líquido, gasoso ou misto.

Segundo Miserendino e Pick (1995), no modo contínuo a radiação é emitida continuamente durante o acionamento do aparelho em potência constante. Os efeitos térmicos causados pela elevação da temperatura na área de aplicação são marcantes, pois não há tempo para o resfriamento do tecido. Esse modo de emissão é utilizado, principalmente, para vaporização, corte e coagulação de tecidos moles. No modo pulsátil, o *laser* é emitido em pulsos cuja duração e repetição podem ser variáveis, intercalados por um período sem emissão. Isso diminui os efeitos térmicos, possibilitando especificidade e precisão na interação entre o *laser* e o tecido. Assim, pode-se obter a ablação de tecidos duros com danos térmicos mínimos e a vaporização superficial de tecidos moles. Os efeitos são modulados não só pela energia por pulso aplicada, mas também pelo número, duração e repetição dos mesmos.

Os *lasers* podem ainda ser entregues em contato ou não com o tecido-alvo. Na entrega em contato dos *lasers* de alta potência, além do efeito específico no tecido, pode ocorrer interação entre o instrumento de entrega do *laser* e este último, o que é especialmente válido para os *lasers* de alta potência entregues em contato por intermédio de fibra óptica. As altas temperaturas, atingidas na interface de contato entre a fibra e o tecido, causam o derretimento da primeira. Múltiplos tipos de pontas para entrega de *lasers* estão disponíveis para utilização, cada uma

conduzindo a efeitos específicos e distintos, possibilitando aplicações diversas (BRADLEY, 1997).

Os *lasers* também podem ser classificados de acordo com seu comprimento de onda e densidade de potência. O comprimento de onda determina as propriedades do *laser*, enquanto a densidade de potência modula seus efeitos (ROSENSHEIN, 1997). O comprimento de onda, analisado fisicamente, corresponde à distância entre dois picos máximos ou dois picos mínimos, medida na direção em que a onda está se movimentando, enquanto que, a frequência de onda é determinada pela quantidade total de ondas que passam por um determinado ponto durante o período de um segundo (WALSH, 1992). O comprimento de onda é determinado especificamente pelo meio contido no interior da câmara de ressonância óptica. Este meio pode ser sólido (rubi, cristais de Nd:YAG, Er:YAG, Ho:YAG), líquido (*lasers* de corante, como o rodamina) ou gasoso (CO₂, *lasers* excimer, ArF, XeCl) (ROSENSHEIN, 1997). O meio ativo determina afinidade ou não do *laser* com o tecido alvo, o que é extremamente relevante, pois apenas a indicação correta do *laser* para determinado tecido resultará no objetivo esperado (BRUGNERA JÚNIOR et al., 2003).

A densidade de potência (DP), expressa em W/cm², modula os efeitos do *laser* através da regulação da quantidade de energia que é entregue aos tecidos. Além dos fatores físicos, os fatores temporais devem ser considerados, a exemplo da forma de emissão da luz (contínua, pulsada ou desencadeada), da taxa e da duração da pulsação. Deve-se, ainda, considerar a utilização ou não de fibras de contato, ou se o raio é focado ou desfocado (PINHEIRO, 1998).

Outro fator a ser considerado é a densidade de energia (DE) ou fluência, a qual estabelece a relação entre a energia administrada por um emissor *laser* e a superfície de radiação do raio de luz *laser* ou *spot*, sendo expressa em J/cm². Geralmente, refere-se à densidade quando se fala em dose de tratamento (RIGAU; MAS, 1998). Atualmente são muitos os equipamentos que dispõem de cálculo direto, sendo determinado automaticamente o tempo de exposição através da inserção da DE, potência de emissão e da área do *spot*.

O *laser* de baixa potência foi introduzido na área médica há aproximadamente 30 anos. Os aparelhos utilizados atualmente estão disponíveis em ambas as formas de emissão, contínua e pulsátil, e operam com comprimentos de onda no espectro visível ou invisível (TURNÉR; HODE, 1997). Ao contrário do *laser* cirúrgico que opera com potência de miliwatts a centenas de watts, provocando ablação tecidual, o *laser* não-cirúrgico tem sua potência variando de 1-50 mW, o que não provoca alterações de temperatura nos tecidos (HALL et al., 1994). Apesar disto, há uma tendência de se produzirem equipamentos com potências mais elevadas, como, por exemplo, alguns aparelhos de *laser* de Arseneto de Gálio e Alumínio (AlGaAs) cuja potência já alcança 1000 mW (TURNÉR; HODE, 1997).

A terapia com a luz *laser* em baixa potência deve seguir os seguintes parâmetros: escolha do comprimento de onda, densidade de energia, densidade de potência, tipo de regime de operação do *laser*, frequência do pulso, número de sessões, características ópticas do tecido, como os coeficientes de absorção e espalhamento (CATÃO, 2004).

Os *lasers* de baixa intensidade são usados com o propósito terapêutico, em virtude das baixas densidades de energias usadas e comprimento de onda capaz de penetrar nos tecidos. Muitos estudos têm demonstrado a utilização do *laser* em baixa intensidade na Odontologia promovendo uma recuperação mais rápida e menos dolorosa (CATÃO et al., 2003).

Os *lasers* em baixa potência mais utilizados na terapêutica são os *lasers* Hélio-Neônio (HeNe) e os diodos (BASFORD, 1995; PINHEIRO, 1998). O *laser* HeNe foi o primeiro *laser* gasoso desenvolvido e também o primeiro a emitir de forma contínua raios com dois comprimentos de onda: $\lambda=632,8$ nm (vermelho) e $\lambda=543,5$ nm (verde) com potência podendo variar de 1 mW a dezenas de mW (BASFORD, 1995). Segundo Ribeiro (1999) é útil definir a possível ação dos *lasers* em baixas intensidades de potência como efeitos não térmicos no ponto de vista físico.

O *laser* diodo é um *chip* semicondutor que funciona como um diodo elétrico, com comprimento de onda variando entre $\lambda =620$ nm e $\lambda =1500$ nm, nos espectros

vermelho e infravermelho, que são determinados pelo tipo de material semiconductor utilizado. Na maioria dos semicondutores, a energia é liberada na forma de calor. Porém, em materiais como gálio, alumínio e arsênio, a energia é liberada na forma de fótons (PINHEIRO et al., 1998). Os mais comuns são, geralmente, variações do GaAlAs, o qual emite um espectro na faixa do infravermelho ($\lambda=700$ nm a 940nm), ou do fosfeto arseneto de gálio e índio (InGaAsP), o qual emite espectro visível de luz vermelha ($\lambda=600$ a 680nm), com potência tipicamente entre 10 e 50 mW (WALSH, 1997).

Os *lasers* de GaAlAs são muito utilizados na biomodulação. A composição do cristal semiconductor de luz pode variar consideravelmente. Dependendo da porcentagem de cada substância utilizada, o comprimento de onda da luz emitida pode variar de $\lambda=660$ a $\lambda=940$ nm. Os mais utilizados são os *lasers* com comprimento de onda de $\lambda =820$ a $\lambda =830$ nm (infravermelhos) e $\lambda=670$ nm (vermelho), os quais emitem radiação tanto no modo contínuo quanto no pulsado (PÖNTINEN, 1992).

As propriedades terapêuticas dos *lasers* vêm sendo estudadas desde a sua descoberta, sendo a sua ação analgésica observada particularmente sobre as formas de dor crônica de diversas etiopatogenias, desde os receptores periféricos até o estímulo no sistema nervoso central. Portanto, a terapia LLLT quando utilizada nos tecidos e nas células não é baseada em aquecimento, isto é, a energia dos fótons absorvidos não será transformada em calor, mas sim nos efeitos fotoquímicos, fotofísicos e/ou fotobiológicos (CATÃO, 2004). Um pequeno aumento da temperatura local, o qual não excede 1°C, é observado em consequência do aumento da atividade metabólica celular na área irradiada. A resposta celular é o referencial biológico que diferencia a ação dos *lasers* operando em diferentes densidades de potência, determinando, conseqüentemente uma resposta foto-reativa do tecido após a radiação (BRUGNERA JÚNIOR et al., 2003).

O entendimento da interação entre os *lasers* e os tecidos, baseia-se principalmente no entendimento das reações que podem ser induzidas nestes tecidos pela luz *laser*. Cada tipo de *laser* resulta em uma luz de comprimento de onda específico, e cada comprimento de onda reage de uma maneira diferente com

cada tecido. Outro fator importante que deve ser analisado, conjuntamente, é a densidade de energia (KARU, 1987; VEÇOSO, 1993; BRUGNERA JÚNIOR, 2003).

A laserterapia tem sido usada com grande sucesso na clínica odontológica. Possuidora de uma metodologia simples e de baixo custo, pode ser integrada como terapia coadjuvante a tratamentos convencionais ou usada isoladamente de forma eletiva em algumas patologias. É uma grande auxiliar no exercício profissional em associação com praticamente todas as especialidades da Odontologia, considerando que as respostas orgânicas decorrentes de agentes agressivos, sejam mecânicos, químicos ou biológicos, geram uma resposta inflamatória acompanhada na maioria das vezes de sintomatologia dolorosa (BRUGNERA JÚNIOR et al., 2003).

A laserterapia de baixa intensidade tem sido associada com uma variedade de efeitos biológicos, como o aumento da proliferação epitelial e fibroblástica, estímulo à produção de colágeno e atividade fagocitária, bem como à produção de endorfinas (MESTER et al., 1971, MESTER et al., 1973, TAKEDA, 1988; DO NASCIMENTO et al., 2004), tendo por conseqüência a produção de efeitos terapêuticos analgésicos, antiinflamatórios e reparador tecidual (FRANKS, 1999; BRUGNERA JÚNIOR et al., 2003).

A laserterapia está indicada para regiões traumatizadas, pois aumenta a atividade fibroblástica, auxiliando a reparação tecidual. Também na dessensibilização dentinária pós-preparo cavitário ou cervical aumentando o limiar das terminações nervosas livres, produzindo assim, um efeito analgésico (MELLO; MELLO; MELLO, 2001).

A ação anti-álgica da radiação *laser* parece resultar de uma soma de intervenções em diferentes níveis, entre outras causas, analgesia de curta duração (de 12 a 24h), tornando-se mais intensa com o decorrer do tratamento aplicado a cada caso, podendo transformar-se em durável ou definitiva (CATÃO, 2004). A resposta analgésica da fototerapia pode ser medida por mecanismos hormonais/opióides e suas respostas dependem diretamente da dose e do comprimento de onda (LAAKSO, 1994).

A ação antiinflamatória é exercida mediante a aceleração da microcirculação, originando alterações na pressão hidrostática capilar, com reabsorção do edema e eliminação do acúmulo de catabólitos intermediários, tais como o ácido purínico e o láctico. Por outro lado, o *laser* aumenta a celularidade dos tecidos radiados, acelerando o tempo de mitose, ação esta que é observada principalmente nos processos de reparação cicatricial de lesões, por proporcionar uma maior vascularização e formação abundante de tecido de granulação (KARU, 1987; VEÇOSO, 1993).

A terapia com *laser* de baixa intensidade influencia mudanças de caráter metabólico, energético e funcional nos corpos submetidos à radiação. Favorece o aumento da resistência e da vitalidade celular, biomodula a resposta inflamatória e permite a evolução para a cura em período de tempo menor, ou seja, proporciona um maior estímulo à normalidade funcional celular, com maior rapidez (BRUGNERA JR., 2003; CATÃO, 2004).

2.3 LASERTERAPIA

A laserterapia é usada na Biomedicina, principalmente para promover a regeneração tecidual e tem como vantagens, o controle da dor pós-operatória, a estimulação da cicatrização, redução da inflamação e a diminuição da dor. O aumento na produção de fibroblastos e colágeno, o aumento da circulação sanguínea dentro do tecido regenerado bem como o efeito supressivo nas reações imunes são também alcançados com a laserterapia (PINHEIRO; FRAME, 1992).

Observações clínicas têm sugerido que a LLLT tem efeitos benéficos no processo de cicatrização tecidual. Embora a terapia com *lasers* de baixa potência seja utilizada sem o estabelecimento de protocolos clínicos específicos, vários autores têm reportado os efeitos biomoduladores nos processos de cicatrização em modelos animais e em meios de cultura tecidual. A terapia com *laser* em baixa intensidade é caracterizada por promover a estimulação no crescimento celular,

revascularização e redução dos sinais inflamatórios em processos de cicatrização de feridas. O mecanismo pelo qual o *laser* promove a aceleração nos processos cicatriciais é estabelecido através de um estímulo no metabolismo intracelular e na produção de colágeno pelos fibroblastos, os quais produzem uma maior organização e entrelaçamento das fibras colágenas (KERT; ROSE, 1989; LYONS et al., 1987).

A laserterapia tem sido promovida, desde o final dos anos 60 do século passado, como um tratamento novo, seguro e efetivo para várias condições neurológicas, músculoesqueléticas e de tecidos moles, ocupando intensidades de radiação tão baixas que qualquer efeito biológico que possa ocorrer é decorrente do efeito direto da radiação e não do resultado do aquecimento promovido. Isto significa que a elevação da temperatura induzida pela radiação deve ser mínima, talvez não mais do que 0,1° C a 0,5° C (BASFOR, 1989).

O *laser*, que há muito vem tentando ganhar reconhecimento mundial, ainda não é uma terapia bem definida. Durante muito tempo seu estudo deu-se em artigos sem grande valor científico, principalmente em países do Leste da Europa. Documentação incompleta sobre o protocolo de radiação e ausência de grupos controles apropriados causavam dificuldades de comparação entre os diferentes trabalhos. Contudo, trabalhos mais controlados, passíveis de reprodução, trouxeram maior credibilidade à terapia. Estudos recentes do *Food and Drug Administration (FDA)* com *lasers* de baixa potência estão atraindo bastante interesse para a laserterapia (SCHINDL et al., 2000).

A compreensão dos fenômenos que envolvem a interação entre os diversos *lasers* e tecidos baseia-se principalmente no entendimento das reações que podem ser induzidas nesses tecidos pela luz *laser*. Todavia, além de fatores inerentes ao *laser*, devem ser observadas as características peculiares de cada tecido, principalmente as que controlam as reações moleculares e bioquímicas. Outro aspecto a considerar é a propriedade óptica de cada tecido, a qual determina a extensão e a natureza da resposta tecidual que ocorre através dos processos de absorção, transmissão, reflexão e difusão da luz *laser* (BRUGNERA JÚNIOR; PINHEIRO, 1998).

A extensão da interação entre *lasers* e tecidos é determinada pelo comprimento de onda da luz *laser* e pelas características ópticas de cada tecido. Quando a luz *laser* incide em um tecido biológico, uma parte da luz é refletida e uma parte da luz remanescente que foi transmitida é espalhada dentro do tecido; a parte da luz remanescente é absorvida, tanto pela água do tecido ou por algum outro cromóforo absorvedor, como a hemoglobina e a melanina. Finalmente, uma parte da luz pode ser transmitida ao longo de toda a espessura do tecido (ZEZELL et al., 2004).

Existe no organismo animal, uma função foto-reguladora, a partir de certos fotorreceptores capazes de absorver um fóton de um determinado comprimento de onda, chegando a provocar uma transformação na atividade funcional e metabólica da célula (PINHEIRO, 1998).

Na maioria dos comprimentos de onda, a propagação do *laser* nos tecidos é influenciada pela dispersão e pela absorção. A absorção da radiação *laser* nos tecidos tem sido bastante investigada e seu comportamento básico, particularmente a dependência do comprimento de onda, é bem documentado para a maioria dos seus cromóforos. A dispersão do *laser* nos tecidos é muito complexa. Várias estruturas como fibras colágenas, células e organelas celulares, vasos e outros componentes teciduais, bem como a forma e a orientação de tais estruturas, influenciam na dispersão do *laser* no tecido (HILLENKAMP, 1989).

De acordo com Kolárová, Ditrichová e Wagner (1999) a transmissão da radiação óptica depende de fatores individuais de cada estrato celular componente da pele humana. Em geral, parte da luz é refletida após alcançar a pele e parte da luz penetra dentro das camadas celulares profundas, a qual pode sofrer o fenômeno de espalhamento ou absorção de acordo com as características ópticas de cada tecido. Na pele humana, o fenômeno de absorção é predominante na epiderme e nas camadas mais superficiais da derme, enquanto que, o fenômeno de espalhamento é promovido pelas fibras colágenas nos estratos celulares mais profundos.

A penetração e a dispersão da luz ultravioleta e da luz visível na pele são dependentes do comprimento de onda da fonte emissora e das propriedades ópticas individuais das camadas da pele. Na epiderme, a maior responsável pela absorção é a melanina. O comprimento de onda de $\lambda=400$ a $\lambda=600$ nm é absorvido na derme por cromóforos da pele: hemoglobina, oxi-hemoglobina, bilirrubina e caroteno. Uma pobre absorção pelo sangue ocorre com comprimentos de onda de $\lambda=700$ a $\lambda=1300$ nm, com pouca dispersão na derme (KOLÁROVÁ; DITRICHOVÁ; WAGNER, 1999).

Segundo Ohshiro e Fujino (1993), a absorção e a difusão do *laser* no tecido resultam numa resposta fotorreativa. Esta é consequência de uma fotodestruição ou uma fotoativação tecidual, determinadas pelos efeitos fotoquímico, fototérmico, fotomecânico e fotoelétrico do *laser*.

O *laser* cirúrgico normalmente causa fotodestruição celular, elevando a temperatura do tecido (efeito fototérmico), desnaturando o conteúdo protéico celular, coagulando, vaporizando o conteúdo hídrico da célula e carbonizando o tecido. Enquanto isso, o *laser* de baixa intensidade atua por fotoativação celular, também denominada de fotobiomodulação, determinada pelos efeitos fotoquímicos, fotoelétricos ou fotofísicos, não acarretando o efeito fototérmico (BRUGNERA JÚNIOR et al., 2003).

A biomodulação pelo *laser* é um fenômeno fotobiológico. A magnitude do efeito da bioestimulação depende do estado fisiológico da célula antes da radiação. Estudos indicam que a radiação com *lasers* causa um aumento no número de células, especificamente se estas encontrarem-se na fase de transição G1-S, bem como, na fase S da mitose celular. Tal fato está relacionado ao aumento da síntese de DNA (Ácido Desoxirribonucléico) pelas células na fase S da mitose celular (KARU, 1989).

Os efeitos positivos da fototerapia em casos de tratamento sistêmico podem ser explicados pelo fato de a luz de baixa potência (azul, vermelha) atuar nas células excitáveis para gerar um potencial de ação nas mesmas (KARU, 1989). Quando as células são radiadas por *lasers* com vários espectros de ondas visíveis, a luz é absorvida pelos componentes da cadeia respiratória e os eventos primários

fotoquímicos e fotofísicos ocorrem no interior das mitocôndrias, em caso de organismos eucariontes; e nas membranas celulares, em caso de células procariontes (TIPHLOVA; KARU, 1987).

A luz *laser* através da reação fotoquímica promovida induz a uma direta ativação na síntese de enzimas (LOPES, 1999), e essa luz tem como primeiros alvos os lisossomos e as mitocôndrias das células. As proteínas são as estruturas que mais têm afinidade pela luz vermelha e infravermelha usada na laserterapia (WALSH, 1992).

A cadeia respiratória mitocondrial é um sistema dinâmico unitário responsável pela absorção da energia *laser* em um determinado ponto, promovendo transformações em toda a cadeia respiratória celular e em todo o estado metabólico celular (TIPHLOVA; KARU, 1987). A absorção da luz por componentes da cadeia respiratória – flavinas desidrogenases, citocromos e citocromos oxidase – causa uma pequena ativação da cadeia respiratória, o que ocasiona alterações em ambos os potenciais de ação das membranas, mitocondrial e citoplasmática (KREBS; VEECH, 1970).

A luz *laser* promove um estímulo proliferativo celular através de ações sobre sistemas específicos responsáveis pela proliferação celular (KARU, 1989; KAWASAKI; SHIMIZU, 2000). O sistema cíclico da adenosina monofosfato (cAMP) é o responsável pelo controle da biossíntese do DNA e RNA (ácido ribonucléico) e pela realização das atividades biológicas destas macromoléculas (BOYNTON; WHITFIELD, 1983). As organelas não absorvem a luz infravermelha, apenas as membranas apresentam respostas a este estímulo. As alterações no potencial de membrana, causadas pela energia de fótons no infravermelho próximo, induzem a efeitos fotoelétricos, causando choque entre células que se traduz intracelularmente por um incremento na síntese de ATP (trifosfato adenosina) (LOPES, 1999; PINHEIRO; GERBI, 2006).

Segundo Karu (1989) é possível concluir que a radiação com luz monocromática, nos espectros azul, vermelho e infravermelho, pode aumentar os processos metabólicos celulares e ativar a proliferação celular. Os efeitos

fotobiológicos de estimulação dependem diretamente do comprimento de onda, da dose e da potência da luz utilizada. Além disso, quando se requer a produção de efeitos biomoduladores é necessário que a densidade de energia efetiva seja comparativamente baixa (10^{-10^3} J/m²) e o período de tempo da radiação seja curto (10 -100s).

Portanto, quando a luz *laser* interage com as células e com os tecidos na dose adequada, outras funções celulares poderão ser estimuladas, tais como: a ativação de linfócitos e mastócitos (CATÃO, 2004), incrementos da formação de colágeno e precursores (PÖNTINEN, 1992), aumento do nível β -endorfinas no líquido cefalorraquidiano nos tratamentos de algias do trigêmio; variações quantitativas de prostaglandinas; liberação do conteúdo dos grânulos citoplasmáticos da fagocitose (ELSAYED; DYSON, 1990), como também o efeito modulador na síntese protéica, na revascularização, na proliferação e na diferenciação celular (BASFORD, 1989; ROCHKIND et al., 1989; BASFORD, 1995; PINHEIRO; GERBI, 2006). Outros efeitos relatados incluem a capacidade imunossupressora (RIGAU, 1998) e a regeneração nervosa (ANDERS et al., 1993).

Em alguns estudos sobre neoformação óssea, existe a sugestão de que o efeito biomodulador do *laser* não seria apenas por suas propriedades específicas, mas também pela criação de uma série de condições locais que acelerariam a neoformação óssea (TRELLES; MAYAYO, 1987).

A biomodulação tecidual é, sem dúvida, uma das áreas de maior controvérsia no uso dos *lasers* na Odontologia. Uma área de grande dúvida no momento é o uso de *lasers* em tecido ósseo, embora muitos autores aceitem e recomendem seu uso (PINHEIRO; FRAME, 1992).

Os efeitos da laserterapia na ferida cirúrgica têm sido atribuídos ao aumento da proliferação celular. Porém, há controvérsias no que diz respeito aos efeitos da laserterapia não cirúrgica na proliferação celular, pois existem estudos que, ora apresentam efeitos estimulatórios e, ora inibitórios da ação do *laser* nas culturas celulares (KARU, 1989).

Tal mecanismo estimulatório e inibitório da ação do *laser* nas culturas celulares, utilizando luz visível com o mesmo comprimento de onda e mesmo coeficiente de absorção da luz podem ser explicados da seguinte forma: há dois processos envolvendo os mesmos fotoprocessos primários de excitação eletrônica: um dos quais é o responsável pela aceleração da transferência dos elétrons, ocasionando alterações no potencial de membrana celular em alguma seção da cadeia respiratória mitocondrial, enquanto que, o outro processo explicita a transferência da energia de excitação do oxigênio sob a forma de radical livre. A baixa dose de radiação causa regulação do metabolismo celular e conseqüentemente, ocorre à predominância dos processos formativos. Com doses elevadas, o dano ao sistema fotodinâmico prevalece; sendo a quantidade de luz fornecida à célula, um gatilho para regulação do metabolismo celular. Isto explica porque as baixas doses e intensidades são necessárias (KARU, 1989). A magnitude do efeito biomodulador está diretamente relacionada com o estado fisiológico da célula antes da radiação. Por essa razão, os efeitos biomoduladores nem sempre são possíveis (WEBER et al., 2006).

O processo de reparo das feridas pode ser dividido em três fases: a celular, a proliferativa e a remodeladora. A maior parte dos relatos sobre bioestimulação a *laser* sugere que os efeitos mais importantes da laserterapia ocorrem na fase de proliferação, pois se acredita que o processo de metabolismo celular acentua-se devido à fotorecepção mitocondrial pela luz monocromática; isto sugere que o *laser* aumenta o metabolismo respiratório de certas células e, assim, modifica as propriedades eletrofisiológicas da célula (MEYERS, 1990; PINHEIRO; GERBI, 2006).

A laserterapia tem empregado largas porções do espectro de luz visível e infravermelho. Os primeiros estudos enfatizavam a luz visível de *laser* com meio ativo gasoso, como o hélio-neônio, rubi, argônio e criptônio. Mais recentemente, os *lasers* diodos semicondutores de GaAs e GaAlAs tornaram-se mais disponíveis e vêm sendo muito utilizados e estudados. Há uma aceitação crescente que estes *lasers* são particularmente efetivos. Hoje, os aparelhos de HeNe ainda são muito utilizados, mas a maioria dos trabalhos é feita com o GaAs e GaAlAs com comprimentos de onda entre $\lambda=820$ nm e $\lambda=904$ nm (BASFOR, 1995).

A laserterapia inicialmente envolvia *lasers* com potências iguais ou menores a 1 mW. Com o tempo, a tecnologia melhorou e as potências aumentaram, variando entre 10 e 90 mW, ou mesmo um pouco acima de 100 mW. O tempo de tratamento, entretanto, diminuiu enquanto a potência aumentou e a dose permaneceu próxima de 1 a 4 J/cm². Devido às semelhanças na dose e a convergência na escolha do *laser*, diferenças significativas persistem entre os tratamentos, destacando-se: velocidade do pulso, modo de aplicação (em contato ou não) e utilização de um único comprimento de onda ou uma combinação destes (BASFORD, 1995).

Kolárová, Ditrichová e Wagner (1999) investigaram o grau de penetração da luz *laser* de diferentes comprimentos de onda através de camadas da pele e de tecido de granulação em úlceras. Para o estudo, as amostras de pele foram obtidas de homens com idades entre 16 e 40 anos, submetidos à cirurgia plástica, em diferentes regiões do corpo, enquanto as amostras do tecido de granulação foram obtidas de úlceras femurais. Os *lasers* utilizados foram o HeNe ($\lambda=632,8$ nm; 50 mW) e um *laser* semiconductor ($\lambda=675$ nm; 21 mW). A medição da penetração do *laser* foi efetivada com um fotodetector e a análise de dados, realizada em computador. A espessura das amostras foi padronizada em 19 mm. Aproximadamente 0,3% do *laser* HeNe e 2,1% do semiconductor penetraram nas amostras. O tecido de granulação apresentou propriedades ópticas significativamente diferentes e a medição da penetração do *laser* foi quase 2,5 vezes maior do que a penetração na pele normal com espessura semelhante, devido às diferenças histológicas estruturais. Diferenças também foram encontradas entre tecidos normais de distintas regiões do corpo. Os autores concluíram que a penetração do *laser* na pele é um fator decisivo para a seleção da dose de sua radiação.

Vários mecanismos de bioestimulação pelo *laser* têm sido propostos e investigados. Passarella et al. (1984) mostraram que a radiação *laser* geraria um potencial eletroquímico extra e um aumento na síntese de ATP a nível mitocondrial. Utilizando o *laser* de HeNe ($\lambda= 632,8$ nm; 15 mW), constataram um aumento no gradiente de íons ao nível da membrana mitocondrial e uma síntese de ATP aumentada em 70%, em células radiadas, em relação aos controles não radiados. Os autores atribuíram à radiação *laser* as alterações nas mitocôndrias celulares, pois

quando os experimentos foram realizados na presença de inibidores dos canais de transporte de elétrons da membrana mitocondrial, a radiação não produziu nenhum efeito, indicando que a bioestimulação com o *laser* requer o transporte de elétrons nas membranas mitocôndrias para exercer a sua ação.

Anneroth et al. (1988) analisaram o efeito do tratamento com um *laser* infravermelho na cicatrização de feridas em ratos, tanto histológica quanto macroscopicamente. Para o estudo, foram utilizados 14 ratos *Sprague-Dawley*, nos quais duas feridas foram realizadas bilateralmente na região caudal de cada animal. Uma ferida em cada rato recebeu tratamento com radiação *laser*. A ferida contralateral foi mantida sem tratamento, servindo como grupo controle. O período de observação total foi de 15 dias, sendo que, a cada dia, um animal era morto para avaliação. Os ratos foram radiados diariamente com um *laser* diodo (GaAs; $\lambda = 904$ nm; 500 Hz; 0.5 mW e aproximadamente 8 min), tendo a ponteira do *laser* sido posicionada perpendicularmente e com uma distância de 5 mm, até o momento de sua morte. Os resultados não mostraram nenhuma diferença no que se refere ao tempo de sangramento e ao período de cicatrização e no que concerne à formação e a perda da crosta. Nenhuma ferida apresentou sinais de infecção durante o período de observação. O exame histológico também não apresentou nenhuma diferença morfológica óbvia entre as feridas tratadas e não-tratadas. Os autores não confirmaram, com este estudo, que o uso do *laser* de baixa potência pode melhorar o processo de cicatrização de feridas.

Os efeitos da LLLT na cicatrização e contração das feridas também foram observados por In de Braekt et al. (1991) após cirurgia de palatoplastia em cães Beagles de 12 anos de idade. Um total de 30 cães foi utilizado como amostra, sendo um grupo controle sem *laser* (n=6) e outros dois experimentais: sem *laser* (n=12) e com *laser* (n=12). Em ambos os grupos experimentais, a incisão de Von Langerbeck foi instituída no palato tendo a área de exposição óssea palatina de um dos grupos experimentais sido submetida à radiação com o *laser* AsGaAl ($\lambda = 830$ nm; 30 mW; 1 J/cm², 33s, CW). Os animais foram submetidos a três sessões por semana, tendo a primeira radiação estabelecida no pós-operatório imediato, perfazendo um total de dez sessões. Em cada sessão foram instituídos quatro pontos de aplicação adjacentes à área óssea exposta. O processo de cicatrização tecidual foi observado

cl clinicamente até a completa cicatrização das feridas, perdurando por 04 semanas. A contração das feridas foi realizada pela mensuração da distância entre pontos tatuados na mucosa palatina - na área de fechamento da incisão promovida - até as margens opostas da exposição óssea das feridas. Não foram observadas diferenças significativas na qualidade, na taxa de formação da cicatrização da ferida e na distância entre os pontos tatuados, comparando os dois grupos experimentais. Os autores concluíram que, macroscopicamente, a terapia com LLLT não teve influência no processo de fechamento ou contração das feridas.

Bisht et al. (1994) avaliaram o efeito do *laser* de HeNe (λ -632 nm), com aplicações diárias de 4 J/cm² por 5 min, em feridas no dorso de ratos. Os animais foram mortos em 3, 5, 7, 9, 12, 15, e 17 dias. Macroscopicamente as feridas tratadas com o *laser* foram fechadas em menor tempo do que as produzidas nos animais do grupo controle e, histologicamente, houve maior quantidade de tecido de granulação até o nono dia, no grupo testado; entretanto após o 12° dia, não foram encontradas diferenças significativas entre os dois grupos. Fato este também observado nos estudos de Longo et al. (1987), os quais utilizaram um protocolo de radiação com o *laser* diodo GaAlAs (λ =904 nm; 3 J/cm²; 3 Hz; 5 min; aplicado diariamente por um período de 5 dias).

O mesmo efeito da terapia com *laser* em baixa potência no processo de cicatrização de feridas não foi observado nos estudos de Hall et al. (1994). Os autores realizaram um experimento randomizado na região caudo-dorsal de 38 ratos, confeccionando duas lojas cirúrgicas com estratos celulares de epiderme e derme em cada lado da região caudal dos animais. Os animais foram divididos em 2 grupos, cada qual com 2 subgrupos: o grupo experimental, tendo uma loja cirúrgica irradiada e a loja contralateral, não irradiada, servindo de comparação para possíveis efeitos sistêmicos surgidos na região distante da radiação e o grupo controle, com ambas as cavidades sem sofrerem irradiação. Foram estabelecidas baixas doses de radiação (DE = 0,4 a 4 J/cm²) diárias de 0,2 J/cm² (λ =904 nm; 1 mW; 500 Hz). O *laser* foi utilizado perpendicularmente a uma distância de 2 mm. Os animais foram mortos a partir do terceiro dia, aos pares, e a cada 48h, sucessivamente, totalizando 21 dias. Os autores não encontraram diferenças clínicas e microscópicas entre o grupos radiado e o grupo controle, durante o período de observação.

Hallman et al. (1988) estudando, *in vitro*, os efeitos do *laser* HeNe ($\lambda = 0.633 \mu\text{m}$; 0.9 mW; 60s, diariamente) sobre o processo de proliferação celular de fibroblastos humanos, não encontraram diferenças que pudessem afirmar o efeito da LLLT sobre a proliferação de fibroblastos. Os fibroblastos foram cultivados em meios de cultura e dispostos em placas de petri durante todo o período experimental e analisados por um período de 05 dias. O grupo controle foi estabelecido sob as mesmas condições de cultura e ambiente que o grupo experimental, excetuando-se a radiação. Os resultados foram avaliados por uma análise de covariância e não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Almeida-Lopes et al. (2001) fizeram uma comparação dos efeitos da terapia com *laser* de espectro visível com *lasers* infravermelhos sobre a proliferação de culturas de fibroblastos de gengiva humana, mantendo a DE constante em 2 J/cm^2 , porém com diferentes irradiações. A radiação *laser* foi realizada com *lasers* diodo com os seguintes comprimentos de onda: $\lambda = 670 \text{ nm}$, $\lambda = 780 \text{ nm}$, $\lambda = 692 \text{ nm}$, $\lambda = 786 \text{ nm}$. Os fibroblastos estavam imersos em meios de cultura com diferentes deficiências nutricionais (5% e 10%). Os resultados mostraram que, nas culturas de fibroblastos, em condições de déficit nutricional, radiadas com a mesma dose, o *laser* infravermelho induziu a uma maior proliferação celular quando comparado ao *laser* visível, sendo as potências diferentes. Entretanto, *lasers* de mesma potência de saída apresentaram efeitos semelhantes no crescimento celular, independentemente do comprimento de onda. Para os autores, a LLLT melhora a proliferação de fibroblastos, *in vitro*, além de resultar em uma maior proliferação celular em um menor tempo de exposição.

Kreisler et al. (2002) também avaliaram o efeito do *laser* diodo ($\lambda = 809 \text{ nm}$) na taxa da proliferação de fibroblastos gengivais humanos *in vitro*. Um grupo de 110 culturas de fibroblastos foram radiadas com um *laser* diodo (GaAlAs; $\lambda = 809 \text{ nm}$; 10 mW) com doses entre $1,96 \text{ J/cm}^2$ e $7,84 \text{ J/cm}^2$. O tempo de exposição variou entre 75 e 300s. Outras 110 culturas de fibroblastos serviram como controle e não receberam radiação. O tratamento com *laser* realizou-se alternadamente em uma, duas e três vezes, em um intervalo de 24h. A taxa de proliferação foi determinada pela atividade de fluorescência por um indicador adicionado a cultura celular. A proliferação foi determinada 24, 48 e 72h após a radiação. Os resultados mostraram

que as células radiadas revelaram uma atividade proliferativa consideravelmente maior. As diferenças foram bastante significativas, 24h após a radiação, mas diminuíram de uma maneira energia-dependente 48 e 72h após a radiação. Os autores concluíram a evidência da laserterapia no processo de proliferação fibroblástica, porém o tempo de duração parece ser limitado. Os pesquisadores ressaltaram que os resultados encontrados podem ser clinicamente relevantes, indicando que tratamentos repetitivos são necessários para alcançar um efeito positivo do *laser* nas aplicações clínicas.

Mendez et al. (2004) realizaram um estudo histológico comparando os efeitos do *laser* de GaAIAs ($\lambda=830$ nm) e do InGaAlP ($\lambda=685$ nm), em seis grupos de ratos, onde foram produzidas feridas no dorso e, utilizando diferentes dosimetrias, sendo mortos em 3, 5 e 7 dias. Os animais foram radiados nos dias 1, 3, 5 e 7. Os autores encontraram como melhor resultado, a associação dos dois tipos de *lasers*, com dosimetria de 20 J/cm^2 por sessão, divididos em 4 pontos da ferida, onde foi comprovado o efeito positivo biomodulador da LLLT em feridas cutâneas.

Al-Watban e Zhang (1994) realizaram um estudo, em ratos, para avaliar vários tipos de *lasers* (HeCd, $\lambda=442$ nm; Argônio, $\lambda=488-514$ nm; HeNe, $\lambda=632$ nm; Kriptônio, $\lambda=647-670$ nm; GaAIAs, $\lambda=780$ nm e GaAIAs, $\lambda=830$ nm) com diferentes doses (10 J/cm^2 , 20 J/cm^2 e 30 J/cm^2) a fim de encontrar qual a melhor dosimetria e efeito mais satisfatório dentre os *lasers* analisados. O HeNe demonstrou ser o mais efetivo com a dose de 20 J/cm^2 . Foi avaliada, também, a transmissão do *laser* na pele, a qual cresce proporcionalmente ao comprimento de onda. Pelos resultados, os autores observaram que a transmissão não é proporcional à quantia de biomodulação do *laser*. Assim, concluíram que a aceleração na cura das feridas pode não estar atribuída à transmissão na pele.

Fonnof (2002) utilizou 48 ratos no intuito de avaliar os efeitos do processo de reparo em frenulectomias labiais inferiores, as quais foram realizadas com *laser* de CO_2 , com potência de 40 mW e luz contínua. A seguir os animais foram divididos em dois grupos, tendo o experimental recebido radiação no ato cirúrgico com GaAIAs por 3 minutos. Os ratos foram mortos no ato e, em 1, 3, 6, 7 e 10 dias. Na reparação tecidual, conforme observações efetuadas ao longo dos sucessivos períodos de

tempo, ocorreram proliferação de fibroblastos e de tecido conjuntivo. O autor concluiu que as amostras que receberam aplicação da LLLT mostravam-se ligeiramente mais avançadas em seus processos reparativos.

Freitas et al. (2001) avaliaram a capacidade de modulação antiinflamatória do *laser* diodo infravermelho ($\lambda=830$ nm) no pós-operatório de cirurgias para remoção de terceiros molares retidos, por meio da análise cinética da variação dos níveis da proteína C-reativa (PCR). A radiação foi realizada a uma distância focal de 0,5cm, por dois minutos e em corrente contínua (CW), nos pontos pré-estabelecidos. A população-alvo foi de 24 sujeitos divididos aleatoriamente em dois grupos. O grupo teste foi submetido à laserterapia nas 24 e 48h pós-operatórias, enquanto o controle foi submetido a uma falsa radiação, com os mesmos intervalos do grupo teste. As amostras de sangue, para a dosagem da PCR, foram colhidas antes da cirurgia e após 48 e 72 horas. Os valores da PCR no grupo teste com 48h de pós-operatório apresentaram uma distribuição bastante simétrica em torno de sua média e com a variabilidade bem menor comparada com o grupo controle, porém não foi encontrada diferença estatisticamente significativa. Após 72h os valores da PCR foram bastante semelhantes, o que pode ser explicado por uma tendência natural da queda desta proteína nesta fase. Os autores concluíram que, embora o estudo tenha falhado estatisticamente em confirmar o efeito antiinflamatório da laserterapia, os resultados mostraram uma redução no nível de PCR nos pacientes radiados, podendo indicar uma atenuação da inflamação.

Rochkind et al. (1989) avaliaram o efeito do *laser* HeNe na cicatrização de feridas e de queimaduras cutâneas. A radiação com *laser* somente no lado direito, em animais com feridas cutâneas bilaterais, melhorou o restabelecimento em ambos os sítios, quando comparada com o grupo controle, o qual não recebeu radiação. Resultados similares foram obtidos em queimaduras bilaterais: a radiação em uma das lesões também causou uma aceleração na cicatrização no sítio não radiado. Entretanto, no grupo controle não radiado, todos os ratos sofreram necrose avançada na perna e gangrena bilateral. A análise estatística mostrou uma diferença significativamente maior entre o grupo tratado com *laser* e o grupo controle não radiado. Os autores concluíram que o *laser* HeNe exerce um efeito sistêmico pronunciado na pele e nos tecidos adjacentes. Relataram que, os efeitos persistiram

por longo período após a aplicação do *laser*. Os autores ressaltaram que os efeitos sistêmicos observados são relevantes tanto em termos de aplicação clínica da laserterapia quanto para pesquisas básicas envolvendo os possíveis mecanismos envolvidos.

2.4 LASERTERAPIA NO PROCESSO DE REPARO ÓSSEO

O mecanismo pelo qual a radiação *laser* interfere na formação óssea não é completamente entendido. É provável que a regeneração óssea seja dependente não apenas da dose de energia total da radiação *laser*, mas também do tempo e da forma de radiação (SAITO; SHIMIZU, 1999; PINHEIRO; GERBI, 2006). Recentes estudos têm sugerido que parâmetros de densidade de energia e intensidade da radiação *laser* são fatores biológicos independentes entre si e contribuem diretamente para o sucesso ou fracasso da laserterapia de baixa potência (PINHEIRO; GERBI, 2006).

Trelles e Mayayo (1987) avaliaram a biomodulação óssea de fraturas induzidas e submetidas a radiação com *laser* não-cirúrgico, onde os achados histológicos determinaram maior atividade osteoblástica e maior predominância de vasos e trabéculas ósseas. Em seu experimento, fraturas de tíbias de 30 ratos foram tratadas com *laser* HeNe (632 nm, 4 mW, 2,4 J) por 10 minutos (a 20 cm de distância do foco), em dias alternados num total de 12 sessões, com início no pós-operatório imediato. Tratamento simulado foi dado a 30 animais controles. Ao microscópio óptico, foi observado, no grupo tratado, um aumento significativo na vascularização e formação mais rápida de tecido ósseo com uma densa rede trabecular comparado ao grupo controle, o qual apresentou apenas tecido cartilaginoso e pobre vascularização, correspondendo assim a um estágio mais precoce do reparo ósseo.

Takeda (1988) avaliou histologicamente o efeito da laserterapia (GaAs) na cicatrização inicial do alvéolo após a exodontia dos primeiros molares superiores direitos em ratos *Wistar*. Os alvéolos do grupo experimental foram radiados no pós-

operatório imediato à exodontia e por três dias alternados. Um *laser* semiconductor de GaAs foi utilizado com um comprimento de onda de $\lambda=904$ nm; DP de 25 mw/cm^2 e DE de 20 J/cm^2 . Animais não radiados serviram como grupo controle. Os resultados sugeriram que a radiação com *laser* não-ablativo teve um efeito benéfico na cicatrização inicial do alvéolo dentário. Esta conclusão resultou na observância da proliferação de fibroblastos de remanescentes do ligamento periodontal mais pronunciada no grupo radiado e a formação de um trabeculado osteóide ou de osso neoformado no osso radiado.

Kucerová et al. (2000) avaliaram o efeito de diferentes freqüências da radiação com *laser* não ablativo (diodo GaAlAs $\lambda= 670$ nm e HeNe $\lambda= 632.8$ nm) no processo de cicatrização de alvéolos pós exodontia de molares humanos. As diferentes freqüências utilizadas nos grupos experimentais submetidos à radiação foram 5 Hz, 292 Hz e 9.000 Hz, enquanto que, as potências aplicadas também variaram entre 5 e 20 mW e as densidades de energias em todos os grupos foram mantidas em $1,5 \text{ J/cm}^2$. As paredes alveolares, vestibular e lingual, foram radiadas no pós-operatório imediato à exodontia e por quatro dias consecutivos. Os efeitos da biomodulação promovida pela radiação *laser* foram mensuradas através da monitoração da secreção de imunoglobulina A (IgA), níveis de albumina e variações na densidade óssea visualizadas por meio de radiografias digitais, analisados no período pré e pós-exodontia. Além destes efeitos, foram avaliadas as respostas subjetivas dos pacientes quanto ao tratamento. Os autores observaram diferenças significativas nos marcadores dos níveis salivares (IgA e albumina) e na sintomatologia subjetiva dos pacientes entre os grupos radiados frente ao grupo controle e também em comparação aos grupos radiados com as várias freqüências, resultando em um incremento no metabolismo celular, maior suporte vascular sanguíneo, melhor efeito antiinflamatório produzido e numa diminuição no grau de edema tecidual, promovendo assim, influência direta no grau de conforto pós operatório ao paciente. No entanto, a terapia com o *laser* de baixa potência não resultou em diferenças significativas na densidade óssea quando avaliada num período de seis meses após a exodontia entre o grupo experimental e controle, demonstrando, portanto, ausência de influência no processo de osseointegração.

Freitas et al. (2000) observaram que a aplicação diária do *laser* terapêutico por mais de sete dias produziu melhora na neoformação trabecular em um estudo feito com fratura de tibia de ratos. Pela análise histológica, observou-se que os osteoblastos apresentavam uma disposição linear, de maneira que aparentavam um epitélio simples na periferia da trabécula óssea. Esta disposição é característica de osteoblastos ativamente engajados na síntese de matriz óssea. A terapia *laser* não só diminuiu o tempo de reparo como também produziu uma maior área de reparo ósseo. Como foi utilizado o *laser* de baixa potência (1 mw), os resultados deste estudo demonstraram que processos fotobiológicos não relacionados a efeitos térmicos provavelmente constituem os mecanismos básicos envolvidos na recuperação do tecido lesado.

Dörtbudak, Haas e Mailath-Pokorny (2000) avaliaram o efeito do *laser* diodo em culturas de osteoblastos de ratos. Três grupos, com 10 culturas cada um, foram radiados três vezes com um *laser* diodo (690 nm) por um período de 60s com uma dose de $1,6 \text{ J/cm}^2$ por aplicação, de forma pulsátil. Outros três grupos, com 10 culturas cada um, foram utilizados como grupos controle. O método da fluorescência com tetraciclina foi utilizado para comparar o crescimento ósseo nos espécimes após um período de 8, 12 e 16 dias. Os resultados mostraram que todas as culturas radiadas apresentaram um depósito ósseo significativamente maior do que os grupos controles. Os autores concluíram que a radiação com *laser* diodo não-ablativo tem um efeito bioestimulador nos osteoblastos, *in vitro*.

Em um estudo-piloto, Gordjestani, Dermaut e Thierens (1994) investigaram o efeito da laserterapia no metabolismo ósseo. Um defeito ósseo circular foi realizado nos ossos parietais, em seis ratos. Os animais foram divididos em dois grupos: experimental e controle. O primeiro recebeu tratamento com *laser* infravermelho (GaAs; $\lambda=904 \text{ nm}$) no defeito do lado esquerdo, com DP de $33,3 \text{ mW/cm}^2$ e DE equivalente a 20 J/cm^2 , administrada diariamente, mas não recebeu radiação no defeito ósseo do lado direito. O *laser* infravermelho foi escolhido devido à sua maior penetração nos tecidos subcutâneos, em função de sua baixa absorção na água ou nos pigmentos da pele. O grupo controle não recebeu radiação em ambos os lados. A escolha de um grupo experimental e de um grupo controle baseou-se na consideração de que a aplicação do *laser* em uma área bem definida pode ter um

efeito local e sistêmico. Após 28 dias, o metabolismo ósseo foi avaliado por meio de cintilografia. Os resultados não mostraram diferença no metabolismo ósseo entre os lados direito e esquerdo no grupo controle. Os valores encontrados no grupo experimental também não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados com o grupo controle.

David et al. (1996) estudaram, radiográfica, biomecânica e histologicamente, os efeitos do *laser* HeNe na cicatrização de fraturas ósseas em ratos. Para o estudo, 62 ratos sofreram osteotomia na tíbia, bilateralmente, seguida por fixação interna com fios intramedulares. As pernas direitas receberam radiação com *laser* HeNe ($\lambda=632,8$ nm; 10 mW) com uma dose de 0,2 e 4J, diariamente, durante duas a seis semanas. A perna esquerda serviu como controle, não recebendo radiação. Os resultados radiográficos e histológicos não apresentaram melhora no processo de cicatrização óssea. Biomecanicamente, os ossos radiados em dois espécimes dos grupos teste foram significativamente mais fracos que o grupo controle. Os autores concluíram, de acordo com os resultados obtidos, que a laserterapia com o *laser* HeNe não influenciou a cicatrização óssea.

Friesen et al. (1999) avaliaram e compararam histologicamente a cicatrização óssea em osteotomias realizadas em tíbias de ratos realizadas com brocas, *laser* CO₂ e *laser* Nd:YAG, observando, em todos os grupos, uma cicatrização progressiva ao longo dos 21 dias após o tratamento. Entretanto, os grupos tratados com *laser*, independentemente do tipo, da densidade de energia ou de outros parâmetros, apresentaram, quando comparados com o grupo controle, um retardo no processo de cicatrização, o que parece estar relacionado com a presença de resíduos carbonizados no defeito ósseo.

Silva Júnior (2000) avaliou histologicamente o tecido ósseo neoformado frente à radiação com *laser* diodo infravermelho (GaAlAs; $\lambda=830$ nm), sobre feridas mecânicas previamente realizadas em fêmur de ratos. Quarenta ratos *Wistar* foram utilizados para o estudo, divididos em 4 grupos. O grupo A recebeu 12 aplicações ($4,8$ J/cm²), com um período de observação de 28 dias; o grupo C, três aplicações ($4,8$ J/cm²), com período de observação de 7 dias. Os grupos B e D (não radiados)

foram utilizados como os respectivos controles. As lâminas histológicas foram avaliadas através de um *software* para análise de imagens teciduais e da descrição dos achados histopatológicos. Os resultados indicaram a existência de diferenças estatisticamente significativas em relação às médias de áreas de trabéculas ósseas neoformadas entre os resultados do grupo C e D. Não foram observadas diferenças significativas entre os resultados do grupo A e B. Os resultados deste estudo denotaram que a LLLT favorece o processo de reparo ósseo nos períodos iniciais da cicatrização.

Limeira Júnior (2001) investigou, através da análise histológica, a influência da laserterapia (GaAIs, $\lambda=830$ nm) no processo de reparo ósseo de feridas cirúrgicas em fêmures de ratos, submetidas a implante de osso bovino liofilizado anorgânico associado ou não à regeneração óssea guiada com membrana biológica de cortical óssea bovina descalcificada. Para o estudo foram utilizados 42 ratos *Wistar*, divididos em cinco grupos. O primeiro grupo serviu como controle, o segundo recebeu osso anorgânico, o terceiro osso anorgânico e radiação com *laser*, o quarto, osso anorgânico e membrana biológica, e o quinto, osso anorgânico, membrana biológica e radiação com *laser*. Os animais dos grupos experimentais receberam sete aplicações de *laser* (40 mW, CW), a cada 48h, durante duas semanas, transcutaneamente. A radiação foi realizada por contato direto, com fibra óptica posicionada perpendicularmente em quatro pontos cutâneos ao redor da ferida cirúrgica. Cada ponto recebeu uma dose de 4 J/cm^2 por dois segundos, perfazendo uma dose de 16 J/cm^2 . Ao final do tratamento a dose total foi de 112 J/cm^2 . A biomodulação do *laser* sobre o reparo ósseo em fêmures de ratos submetidos a implante de osso anorgânico, com ou sem membrana biológica, foi evidenciada, sobretudo pela estimulação na produção de grandes quantidades de fibras colágenas nos grupos radiados, principalmente a partir dos 21 dias. Foi concluído que o uso da LLLT resulta em efeito biomodulador positivo sobre o reparo ósseo em cavidades de fêmur de ratos submetidas a implante de osso anorgânico, evidenciado aos 21 e 30 dias, bem como a implante de osso anorgânico associado à membrana biológica, mais evidente aos 30 dias.

Pinheiro et al. (2001) avaliaram morfológicamente a neoformação óssea após a radiação com *laser* de 830 nm em feridas cirúrgicas criadas em fêmures de ratos.

Quarenta ratos *Wistar* foram divididos em quatro grupos: grupo A (12 sessões, 4,8 J/cm² por sessão, 28 dias); grupo C (3 sessões, 4,8 J/cm² por sessão, 7 dias). Os grupos B e D serviram como grupos controle não radiados. Quarenta e oito horas após a cirurgia, os defeitos dos grupos experimentais foram radiados transcutaneamente com um *laser* diodo de $\lambda=830$ nm e P=40 mW, com uma dose total de 4,8 J/cm². As irradiações foram realizadas três vezes por semana. A morfometria computadorizada mostrou diferença estatisticamente significativa entre as áreas de mineralização óssea nos grupos C e D. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos A e B (28 dias). Em uma segunda investigação, foi determinado o efeito da laserterapia na cicatrização óssea após a inserção de implantes. Dez cães foram divididos em dois grupos de cinco animais, os quais receberam os implantes. Dois animais de cada grupo serviram de controle. Os animais foram radiados três vezes por semana, por duas semanas, com um *laser* diodo ($\lambda=830$ nm; 40 mW) com uma dose total de 4,8 J/cm² por sessão e uma dose de 1,2 J/cm² por ponto. Os animais foram mortos aos 45 e aos 60 dias após a cirurgia. Os resultados da microscopia eletrônica de varredura mostraram uma melhor cicatrização óssea após a radiação com o *laser* diodo de 830nm. Os autores ressaltam que estes achados sugerem que a utilização da LLLT melhora significativamente a cicatrização óssea nos estágios iniciais. Os autores concluíram que a laserterapia pode aumentar o reparo ósseo nos estágios iniciais da cicatrização.

Silva Júnior et al. (2002) avaliaram através de análise morfométrica a quantidade de osso neoformada após a radiação com *laser* GaAlAs em feridas cirúrgicas em fêmures de ratos. Neste estudo, 40 ratos foram divididos em quatro grupos, com 10 animais cada, da seguinte maneira: Grupo A (12 sessões, 4,8 J/cm² por sessão, período de observação de 28 dias); Grupo C (3 sessões, 4,8 J/cm² por sessão, período de observação de 7 dias). Os grupos B e D serviram como controle, não recebendo radiação. A morfometria computadorizada mostrou uma diferença significativa entre as áreas de osso mineralizado nos grupos C e D. Não houve diferença entre o grupo A e B. Os autores concluíram que, nestas condições experimentais, a terapia com *laser* não-ablativo com 830nm melhora a cicatrização óssea nos estágios iniciais.

Objetivando analisar histologicamente o efeito da laserterapia com comprimento de onda de 830nm no reparo de defeitos ósseos padronizados em fêmures de ratos albinos *Wistar* e enxertados com osso bovino inorgânico (Gen-Ox) e associados ou não à membrana cortical óssea descalcificada (Gen-derm), Pinheiro et al. (2003) utilizaram cinco grupos randomizados para o estudo: Grupo I (controle); Grupo IIA (Gen-Ox); Grupo IIB (Gen-Ox associado ao *laser*); Grupo IIIA (Gen-Ox associado à Gen-derm) e Grupo IIIB (Gen-Ox associado à Gen-derm e *laser*). Os animais dos grupos submetidos à radiação foram radiados a cada 48 horas, num período total de 15 dias. A primeira radiação foi instituída imediatamente ao transoperatório, sendo aplicada transcutaneamente em quatro pontos ao redor do defeito ósseo criado, tendo cada ponto recebido uma dose total de 4 J/cm^2 , \varnothing 0.6mm, 40 mW. Os animais foram mortos em 15, 21 e 30 dias de pós-operatório e submetidos à análise histológica, a qual demonstrou um reparo ósseo mais avançado nos grupos radiados quando comparados ao controle, com uma maior formação óssea e uma quantidade de fibras colágenas ao redor do enxerto ósseo bovino inorgânico dentro do defeito criado, a partir dos 15 dias de pós-operatório, considerando a capacidade osteocondutora do enxerto e o incremento na cortical óssea quando associada à membrana Gen-derm. Assim, os autores concluíram que a laserterapia, no protocolo instituído, modulou um efeito positivo no reparo de defeitos ósseos enxertados associados ou não ao uso de membranas biológicas.

Khadra et al. (2004) avaliaram, histológica e histoquimicamente, o processo de reparo ósseo em calvária de ratos, divididos em dois grupos: o que foi submetido à laserterapia não-ablativa com GaAlAs ($\lambda=830 \text{ nm}$; \varnothing 18 mm; 23 J/cm^2 ; 75 mW) e o controle. Foram selecionados 20 ratos machos, sendo padronizadas perfurações ósseas de 2,7mm bilaterais em seus ossos parietais. O grupo 1 (controle) não recebeu qualquer tratamento. O grupo 2 (experimental) foi radiado bilateralmente, logo após a cirurgia e nos seis dias seguintes, tendo períodos de morte após 14 e 28 dias de pós-operatório. Os autores direcionaram um estudo para cada um dos ossos parietais, concluindo que a laserterapia atuou de forma benéfica nos processos de reparo ósseo.

O efeito da laserterapia de baixa intensidade no processo de reparo ósseo também foi avaliado por Merli et al. (2005). Lojas cirúrgicas foram confeccionadas

através de brocas cirúrgicas em fêmures de ratas. Como amostra, foram selecionados vinte animais, divididos em dois grupos: o primeiro (com 10 fêmures esquerdos) recebeu radiação imediatamente após a injúria cirúrgica e no período de 24, 48 e 72h pós-operatório, e o segundo (com 10 fêmures direitos) constituiu o grupo controle, tendo sido submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém com ausência de radiação. Os animais foram sacrificados no 14º dia e os resultados analisados pelo método morfométrico. Os resultados evidenciaram uma maior e mais rápida neoformação óssea nas lojas cirúrgicas radiadas, podendo concluir que a laserterapia com GaAIAs promoveu biomodulação óssea efetiva na reparação óssea de feridas cirúrgicas quando comparada com o grupo controle.

Gerbi et al. (2005) avaliaram histologicamente o efeito do *laser* diodo (GaAIAs; $\lambda=830$ nm; 40 mW, CW; \varnothing 0.6 mm; 16 J/cm² por sessão) no processo de reparo de defeitos ósseos criados em fêmures de ratos da linhagem *Wistar* submetidos a implante de osso bovino liofilizado (matriz orgânica), associadas ou não à membrana biológica de osso bovino liofilizado desmineralizado. Para o estudo, dividiram 42 animais em cinco grupos: o primeiro, com 6 animais, serviu como controle e não recebeu implantes ou radiação, enquanto os demais contavam com 9 animais em cada um. O grupo 2 recebeu implante com osso bovino liofilizado; o grupo 3, implante de osso bovino liofilizado e tratamento com *laser*; o grupo 4, implante de osso bovino liofilizado e membrana biológica, enquanto o grupo 5 recebeu o mesmo tratamento do grupo 4 acrescido das aplicações com *laser*. Os grupos experimentais receberam irradiações com intervalos de 48h, sendo a primeira realizada imediatamente após o ato cirúrgico. A dosimetria utilizada foi de 16 J/cm² por sessão, divididas em quatro pontos de 4 J/cm². Os períodos de morte dos animais foram 15, 21 e 30 dias. Os resultados demonstraram que nas feridas cirúrgicas radiadas ficaram evidenciadas, histologicamente, maior concentração de fibras colágenas, no início do período (15 dias) e maior neoformação óssea, com um trabeculado mais denso e organizado, no final do período (30 dias), quando comparados com os grupos não-radiados. Os autores concluíram que a LLLT resultou em efeito de biomodulação positiva sobre o processo de reparo ósseo em feridas cirúrgicas realizadas em fêmures de ratos, com implante de osso bovino liofilizado e membrana biológica.

Blaya (2005) avaliou, por meio de análise histológica e molecular com a técnica de PCR em tempo real, a biomodulação do processo de reparo ósseo em cavidades confeccionadas em fêmures de ratos, submetidos à radiação com *laser* não-ablativo. Foram utilizados 36 ratos *Wistar* machos, com peso entre 300 a 400 gramas, distribuídos aleatoriamente em seis grupos de seis animais. Destes grupos, três destinaram-se à análise histológica e os demais, à molecular. Os grupos experimentais receberam a terapia com *laser* não-ablativo, na cavidade óssea, a qual foi identificada por um parafuso de titânio, fixado, previamente, a 5 mm da mesma. Nos grupos I e IV, realizou-se todo o protocolo cirúrgico, sem a aplicação do *laser*. Nos grupos II e V, foi utilizado *laser* infravermelho, com comprimento de onda de 830nm, onde a dose empregada foi de 10 J/cm², 50 mW, CW e forma pontual. Já nos grupos III e VI, utilizou-se o *laser* vermelho de 685nm, 10 J/cm², 35 mW e CW. A periodicidade da radiação foi a cada 48h, iniciando-se imediatamente após a confecção da lesão, com a morte dos animais sendo realizada no período de 15, 21 e 30 dias de pós-operatório. Nos grupos indicados para análise molecular, empregaram-se os mesmos protocolos e a quantidade da proteína osteopontina foi avaliada. Os resultados mostraram que não foram evidenciadas diferenças significativas na expressão da proteína osteopontina entre os grupos, através da análise molecular, enquanto que, a análise histológica descritiva revelou um maior grau de fechamento cortical e de neoformação óssea nos grupos radiados quando comparados com o controle, demonstrando que a laserterapia nos protocolos utilizados exerceu efeito positivo no processo de reparo ósseo.

Pinheiro e Gerbi (2006) descrevendo acerca da fotoengenharia do processo de reparo ósseo confirmaram que a laserterapia com comprimento de onda no espectro infravermelho mostrou-se como um estimulante na proliferação osteoblástica, na deposição de colágeno e na neoformação óssea, desde que, aplicados nos momentos iniciais da reparação óssea, com predominância da fase proliferativa celular. As respostas vasculares à laserterapia têm sido sugeridas como possíveis mecanismos responsáveis pelos resultados clínicos positivos observados. Afirmaram também, permanecer incerto o mecanismo pelo qual se desenvolve a estimulação óssea, sugerindo ser um efeito sistêmico ou uma estimulação isolada dos osteoblastos. Os autores concluíram que o efeito da laserterapia na regeneração óssea depende não apenas da dose total de radiação, mas também do

tempo e do modo da radiação. Afirmaram ser a densidade de energia e a dose fatores biológicos independentes. Essa independência contribui para o sucesso ou fracasso da laserterapia de baixa intensidade.

Weber et al. (2006) avaliaram histologicamente a influência da radiação *laser* GaAIs ($\lambda = 830$ nm, 50 mW, CW) no processo de cicatrização de enxertos ósseos autógenos. Para tanto, criaram-se defeitos ósseos em fêmures de 60 ratos *Wistar*, sendo que o fragmento ósseo removido foi utilizado como enxerto autógeno. Os animais foram divididos em quatro grupos, com 15 exemplares cada, de acordo com o protocolo de radiação no transoperatório: G1 (grupo controle); G2 (radiação na loja cirúrgica); G3 (radiação no enxerto ósseo) e G4 (radiação na loja cirúrgica e no enxerto ósseo). A dose de radiação, durante o ato operatório, foi de 10 J/cm^2 , aplicada sobre a loja cirúrgica (G2 e G4) e sobre o enxerto ósseo (G3 e G4). Todos os animais, com exceção do grupo controle, foram radiados por 15 dias, a cada 48h, com uma dose de 10 J/cm^2 ($4 \times 2,5 \text{ J/cm}^2$), em quatro pontos diferentes, com períodos de observação de 15, 21 e 30 dias. -Os resultados obtidos demonstraram que nos grupos em que o *laser* foi aplicado na loja cirúrgica, no transoperatório (G2 e G4), a atividade de remodelação óssea foi qualitativa e quantitativamente mais exuberante quando comparada a dos grupos G1 e G3, resultando assim, em um efeito de biomodulação positiva sobre o processo de cicatrização óssea em enxertos ósseos.



Proposição

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar, através de análise histológica e morfométrica, o processo de fotoengenharia do reparo ósseo, com minuciosa mensuração da neoformação óssea (sobre as regiões de perióstio, endóstio e medula óssea), influenciada pela laserterapia de baixa potência (Arseneto de Gálio e Alumínio - GaAIs, $\lambda = 830\text{nm}$), no processo de reparo ósseo de feridas cirúrgicas em fêmures de ratos da linhagem *Wistar*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar as reações biológicas do reparo ósseo induzidas pelo *laser* de baixa potência, nas áreas de perióstio (adjacentes ao defeito ósseo e na cortical neoformada), no endóstio e na medula óssea.
- Analisar histologicamente o processo de reparo ósseo, nas regiões de perióstio, endóstio e medula óssea.
- Analisar, por meio de morfometria, o efeito biomodulador do *laser* em relação à neoformação óssea, com 07, 15 e 21 dias de observação.



Metodologia

4 METODOLOGIA

4.1 RESPALDO ÉTICO DA PESQUISA

Esta pesquisa foi submetida à avaliação e aprovação pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) e protocolado sob o número 0054/05 (Anexo A) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS (CEP-PUCRS), protocolado sob o número 015/2006-CEP (Anexo B).

Nesta pesquisa, foram respeitados os princípios éticos na experimentação animal, bem como as normas para a prática didático-científica da vivisseccção dos mesmos, de acordo com a Lei 6.638/79 (GOLDIN, 1995) (Anexo C).

4.2 CARACTERIZAÇÃO

A pesquisa foi realizada junto ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, área de concentração CTBMF, da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), como parte integrante da Linha de Pesquisa *Laser* em Odontologia.

4.3 PARADIGMA

O trabalho foi desenvolvido dentro do paradigma tradicional quantitativo, no *design* de estudo quase experimental (CAMPBELL E STANLEY, 1979).

4.4 VARIÁVEIS

4.4.1 Variável independente

Laser não cirúrgico Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAlAs),³ com comprimento de onda de 830nm.

4.4.2 Variáveis dependentes

1- Padrão de cicatrização óssea no perióstio, no endóstio e medula óssea radiados;

2- Efeito biomodulador do reparo ósseo promovido pela terapia *laser* de baixa potência nas diferentes localizações anatômicas e nos distintos períodos de observação: 07, 15 e 21 dias.

4.5 PROBLEMAS

Utilizando o laser diodo infravermelho (GaAlAs, $\lambda=830$ nm, 6 J/cm², 50 mW, CW), procurar-se-á investigar:

- Existe efeito do *laser* infravermelho sobre as regiões de endóstio, perióstio e medula óssea?

- A ação da laserterapia sobre o padrão da cicatrização óssea ocorrerá nas células do perióstio adjacente à região do defeito ósseo, nas células do endóstio ou nas células da medula óssea?

- Existe diferença morfométrica entre as médias de trabeculado ósseo neoformado, a nível de perióstio e endóstio, utilizando-se a laserterapia com o *laser* infravermelho nos períodos de observação de 07, 15, 21 dias?

³ Thera Lase® DMC Equipamentos, São Paulo, SP/Brasil

4.6 HIPÓTESE

A laserterapia atua de forma positiva no processo de osteogênese, quando utilizado o *laser GaAlAs* com comprimento de onda de 830nm.

4.7- CONFIGURAÇÃO DA AMOSTRA

Para composição da amostra foram utilizados 27 ratos albinos, da espécie *Rattus norvegicus*, classe *Mammalia*, ordem *Roedentia*, da linhagem *Wistar*, machos, com peso variando de 350 a 550 gramas (g) e clinicamente sadios. Os animais foram obtidos junto a FEPPS (ANEXO D) e passaram por um período de sete dias de ambientação no biotério de manutenção desta Instituição. Durante todo o período experimental, os animais foram alimentados com dieta sólida e água *ad libitum*.

4.8 ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS

Os animais selecionados foram divididos aleatoriamente em dois grupos distintos: Grupo Experimental (GII) e Grupo Controle (GI), ambos com 15 animais. Durante o decorrer do experimento três animais tiveram de ser excluídos da amostra, pois apresentaram fratura óssea no fêmur escolhido para a realização do experimento, constatada apenas ao término do período de observação. Desta forma, a amostra foi finalizada com 27 animais (n=27), sendo constituída por 14 e 13 animais, distribuídos nos grupos, experimental e controle, respectivamente.

Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com cobertura metálica e com assoalho forrado por serragem de pinho. As gaiolas foram etiquetadas, durante toda a pesquisa, conforme o grupo a que pertenciam os animais. Para a identificação dos animais, procedeu-se à marcação na cauda dos mesmos, com

caneta de tinta permanente, onde o número de marcas indicava o número do respectivo animal. Em todos os grupos, experimental e controle, o período de observação foi de 07, 15 e 21 dias após o procedimento cirúrgico. Desta forma, cada grupo foi subdividido em três subgrupos (A, B, e C), de acordo com o período de observação (Quadro 1).

Quadro 1 - Organização dos grupos e subgrupos por períodos de observação

| GRUPO | PROCEDIMENTOS | SUBGRUPOS | AMOSTRA (n) | PERÍODO DE OBSERVAÇÃO |
|-------|---|-----------|-------------|-----------------------|
| I | Grupo Controle, sem radiação. | GIA | 05 | 07 dias |
| | | GIB | 04 | 15 dias |
| | | GIC | 04 | 21 dias |
| II | Radiação no defeito ósseo trans operatório e no pós-operatório. | GIIA | 05 | 07 dias |
| | | GIIB | 04 | 15 dias |
| | | GIIC | 05 | 21 dias |

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

Os procedimentos de manipulação e alimentação foram realizados diariamente, durante todo o período do experimento, seguindo a dieta padrão do biotério, trocando-se a serragem e lavando-se as gaiolas com água corrente e sabão, a cada 48 horas.

4.9- CRITÉRIOS DE INCLUSÃO / EXCLUSÃO

Para que os animais pudessem ser incluídos nos experimentos, deveriam:

- ser da raça proposta;
- estar em bom estado nutricional;
- chegar ao final do período de observação com bom estado de saúde;

Os critérios avaliados para exclusão dos animais abrangeram:

- presença de complicações (infecções, necroses, debilitação do estado geral) trazendo problemas e desconforto ao animal durante o período do experimento e no momento da morte dos mesmos;

- fratura óssea do fêmur direito constatada ao término do período de observação.

4.10 - TÉCNICA CIRÚRGICA

Previamente ao ato cirúrgico, os animais foram submetidos à anestesia geral através da injeção intraperitoneal, contendo 0,025 ml/100g de peso corpóreo do animal, do sedativo, analgésico e relaxante muscular Cloridrato de Xilazina 2%⁴ e 0,05 ml/100g de peso corpóreo do animal do anestésico geral Cloridrato de Ketamina 10%⁵.

Após a anestesia, os animais foram submetidos à tricotomia da região coxofemoral direita, por raspagem dos pêlos, evitando-se lesão epidérmica. Com a pele exposta e livre de pêlos, procedeu-se a antissepsia da região com álcool iodado 0,5%⁶. A área operatória foi isolada com campo cirúrgico fenestrado de TNT (tecido não tecido) esterilizado, adaptado para o procedimento. O sítio para intervenção cirúrgica foi o osso fêmur direito do animal.

Com o animal posicionado em decúbito lateral esquerdo, o acesso cirúrgico à região lateral do fêmur direito foi obtido por meio de uma incisão contínua longitudinal, na pele e tecido subcutâneo de aproximadamente 2 cm de extensão, utilizando-se lâmina de aço inox⁷ n° 15 montada em cabo de bisturi n°3 *Bard Parker* (Figura 1).

⁴ Anasedan® Divisão Vertbrands Saúde Animal – Jacareí – SP/Brasil

⁵ Dopalen® Divisão Vertbrands Saúde Animal – Jacareí – SP/Brasil

⁶ Merck S. A. – Rio de Janeiro – RJ/Brasil

⁷ BD Lâmina – Curitiba – PR/Brasil

Após a incisão da fáscia muscular, a musculatura da região foi divulsionada com auxílio de uma tesoura tipo *Matzemaum*⁸ e pinça de dissecação⁹, até a exposição do periósteo. Em seguida, o periósteo foi incisado e descolado ao longo da área óssea a ser exposta, permitindo, assim, acesso direto à face exposta da diáfise do fêmur (Figura 2)

Após a exposição da diáfise, o fêmur foi delimitado em três porções (superior, mediana e inferior), com o objetivo de padronizar a área a ser manipulada, sendo a região mediana, o local de eleição para a realização do experimento. Na porção superior da face lateral do fêmur, próximo à junção coxofemural, foi realizado um primeiro defeito ósseo (Figura 3), ao qual foi fixado um parafuso de titânio¹⁰, monocortical, pertencente ao sistema 2.0 de miniplacas e parafusos e medindo 3 mm de comprimento (Figura 4). A fixação do parafuso serviu como ponto de referência para a confecção do defeito ósseo considerado sítio de eleição do experimento. Para tal, estabeleceu-se uma medida linear de 8 mm entre a margem lateral do parafuso de titânio e a margem delimitante da loja cirúrgica do experimento, sendo, desta forma, o parafuso de titânio e a medida linear, fatores determinantes para a confecção da loja cirúrgica no terço mediano.

Realizada a fixação do parafuso de titânio e aferida a distância linear preconizada, confeccionou-se um segundo defeito ósseo no terço mediano da face lateral do fêmur (Figura 5). Ambos os defeitos ósseos foram realizados com uma broca esférica nº 10, acoplada em um motor elétrico¹¹ com 1000 rpm, associado à irrigação contínua com solução fisiológica estéril de cloreto de sódio a 0,9%. Os defeitos ósseos criados tiveram um diâmetro de 2,5 mm, correspondendo a uma área aproximada de 0,049cm² e apresentaram como parâmetro de profundidade, o rompimento da cortical óssea e a profundidade na medula óssea. Utilizou-se uma broca para cada três animais, devido à perda do corte da ponta ativa, com o uso.

⁸ PROMM®, Indústria de Materiais Cirúrgicos, Porto Alegre, RS/Brasil

⁹ PROMM®, Indústria de Materiais Cirúrgicos, Porto Alegre, RS/Brasil

¹⁰ PROMM®, Indústria de Materiais Cirúrgicos, Porto Alegre, RS/Brasil

¹¹ Beltec Indústria e Comércio de Equipamentos Odontológicos LTDA, Araraquara – SP/Brasil



Figura 1: Incisão contínua e longitudinal na derme da região femoral direita.

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

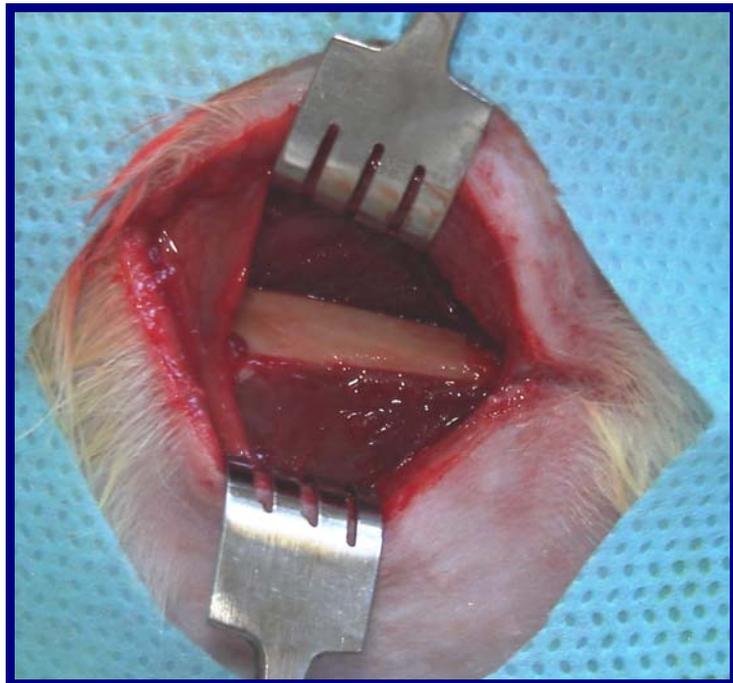


Figura 2: Exposição do tecido ósseo do fêmur, após descolamento periosteal.

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

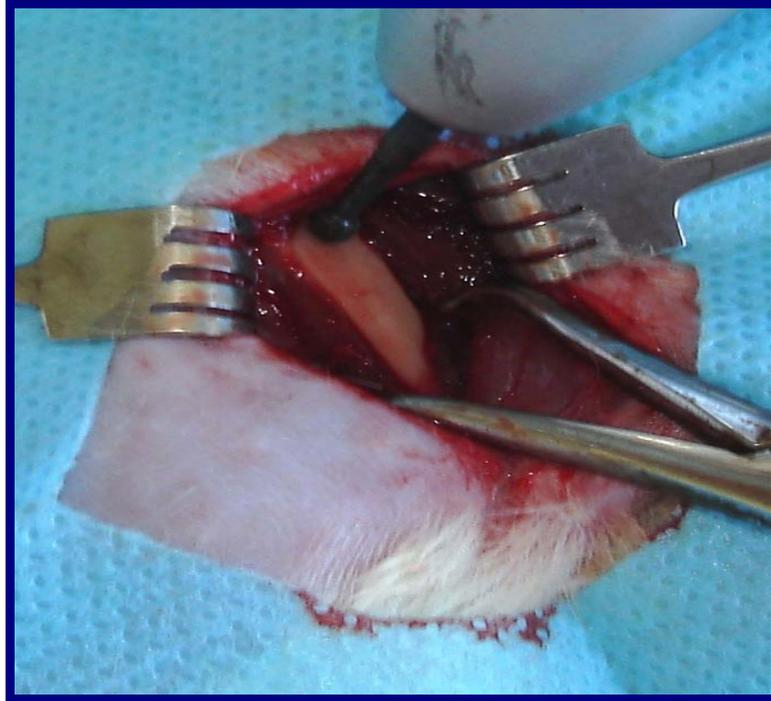


Figura 3: Confeção do primeiro defeito ósseo no terço superior da face lateral do fêmur.

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

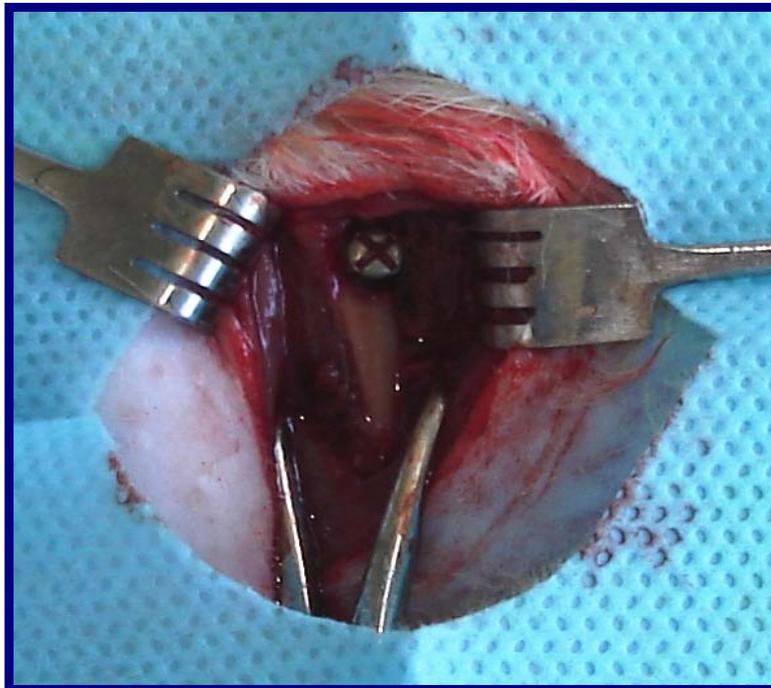


Figura 4: Fixação do parafuso de titânio no terço superior da face lateral do fêmur.

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

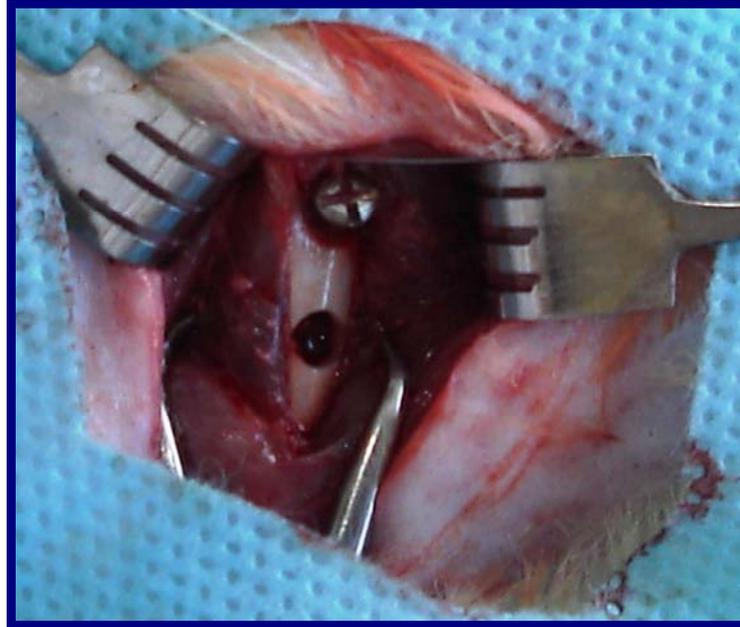


Figura 5: Defeito ósseo experimental confeccionado no terço médio da face lateral do fêmur.

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

Em seguida, o tecido muscular e a pele foram reposicionados e suturados, por meio de pontos isolados, com fio monofilamentar de nylon (4-0)¹², de 45 cm de comprimento, montado em agulha atraumática semicircular de 1,5 cm de comprimento e seção triangular.

Após estes procedimentos, os animais permaneceram no Biotério da FEPPS, acomodados em gaiolas plásticas, mantidos em condições adequadas de temperatura (25°C), umidade e ventilação, identificados e numerados de acordo com o grupo correspondente, data da cirurgia e data das irradiações.

4.11 - RADIAÇÃO COM O LASER NÃO-CIRÚRGICO

O *laser* utilizado no GII foi o *laser* de diodo infravermelho (GaAlAs), devidamente calibrado segundo o teste espectrorradiométrico (ANEXO E), com comprimento de onda de 830nm. A potência estabelecida foi de 50 mw e a dose de 6 J/cm² por sessão, conforme indicação do manual do usuário do aparelho

¹² Ethicon Co – São Paulo – SP/Brasil

(ALMEIDA-LOPES; MASSINI, 2002) (Apêndice A). O sistema de entrega foi constituído por fibra óptica com $\varnothing = 0,06\text{cm}$. O procedimento foi de forma pontual, na condição emissão contínua, com uma dose de 6 J/cm^2 , na região central da loja cirúrgica com tempo total de 120s, utilizado tanto no trans-operatório quanto no pós-operatório.

A primeira dose de radiação foi realizada logo após o término da confecção da loja cirúrgica no fêmur dos animais, sendo o sistema de entrega (ponteira do aparelho) da luz *laser* posicionado perpendicularmente e diretamente sobre a região medular exposta pela confecção da loja cirúrgica. É importante ressaltar que, nem o tecido muscular nem a pele dos animais haviam sido reposicionados no momento da primeira radiação.

Continuaram-se as radiações, a cada 48h, no período pós-operatório, durante 07, 15 e 21dias, perfazendo um total de 4, 8 e 11 aplicações, conforme o subgrupo pertencente de cada animal, GIIA, GIIB, GIIC, respectivamente. A radiação neste período foi realizada por contato direto, com a fibra óptica posicionada perpendicularmente, em um ponto cutâneo central da ferida cirúrgica (Figura 6). As doses totais estão descritas no Quadro 2.

Quadro 2: Doses totais de radiação com *laser* GaAIs, por subgrupo.

| GRUPO | SUBGRUPO | DE |
|-------|----------|---------------------|
| GI | GIA | 0J/cm^2 |
| | GIB | 0J/cm^2 |
| | GIC | 0J/cm^2 |
| GII | GIIA | 24J/cm^2 |
| | GIIB | 48 J/ cm^2 |
| | GIIC | 66 J/ cm^2 |

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

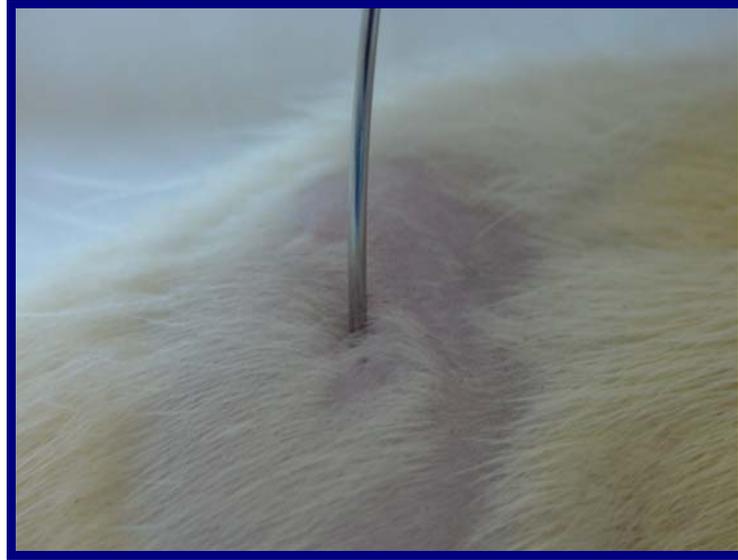


Figura 6: Aplicação do *laser* não-ablativo.

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

De acordo com as regulamentações brasileiras, o *laser* foi aplicado em local isolado, com caracteres e simbologia internacional para área em uso ou presença de radiação e observados os procedimentos de segurança recomendados para tratamento com luz *laser*.

4.12 - PREPARO DAS AMOSTRAS

Os animais foram mortos aos 07, 15 e 21 dias após a cirurgia, através da exposição dos mesmos em uma câmara hermética de dióxido de carbono, até que a morte dos animais pudesse ser constatada pela ausência dos sinais vitais, seguindo os princípios da Declaração dos Direitos dos Animais (GOLDIN, 1995).

Para obtenção das amostras (peças cirúrgicas) foi realizada uma incisão longitudinal acompanhando a cicatriz cutânea existente, ao longo do osso fêmur operado. Após minuciosa e completa exposição óssea procedeu-se a remoção completa do osso e assim foram constituídas as peças cirúrgicas do grupo controle (G1), que não sofreram radiação e os segmentos do grupo teste, submetidos à radiação com *laser* (GII) (Figura 7).

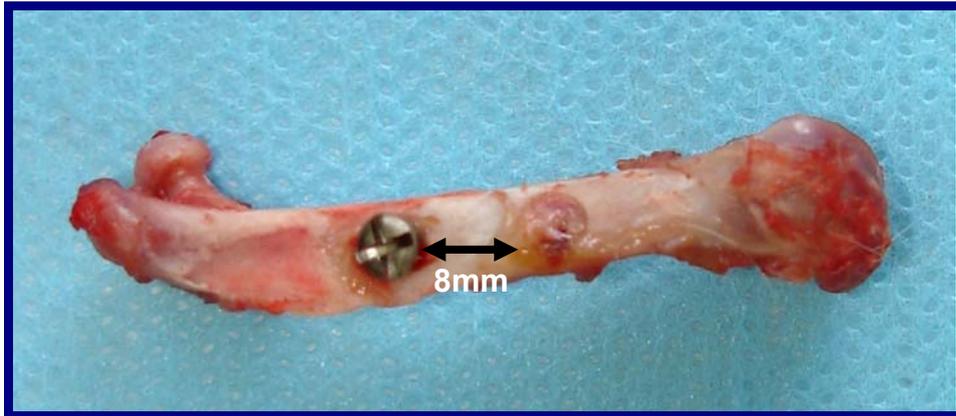


Figura 7: Peça cirúrgica dissecada evidenciando o parafuso localizador de titânio, disposto a uma distância de 8 mm do defeito ósseo experimental.

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

Os espécimes obtidos foram colocados em vidros previamente etiquetados, contendo solução de formalina tamponada a 10%, e mantidos por um período de 48 horas, tempo necessário para a fixação, até o momento de sua preparação.

O processamento histológico foi desenvolvido no Laboratório de Anatomia Patológica do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Odontologia da PUCRS, seguindo a rotina laboratorial padronizada.

Após o período de fixação, os espécimes foram descalcificados com uma solução de ácido nítrico (HNO_3) a 5%, trocado diariamente, por cinco a sete dias, de acordo com a espessura óssea. Após a descalcificação, procedeu-se à remoção do parafuso localizador. O material obtido foi mergulhado em parafina e os blocos submetidos à inclusão foram identificados e submetidos à microtomia. Os cortes foram semi-seriados longitudinais, com espessura de cinco micrômetros, originando uma média de três lâminas por peça e assim destinadas: uma série à técnica de coloração histológica Hematoxilina-Eosina (HE) (Anexo F) e outra série à técnica de coloração histológica picrossírius (Anexo G) (Figura 8).

A análise histológica, descritiva-comparativa, das lâminas foi realizada no laboratório de Anatomia Patológica e Bucodental da PUCRS, sendo todas as amostras fotografadas.

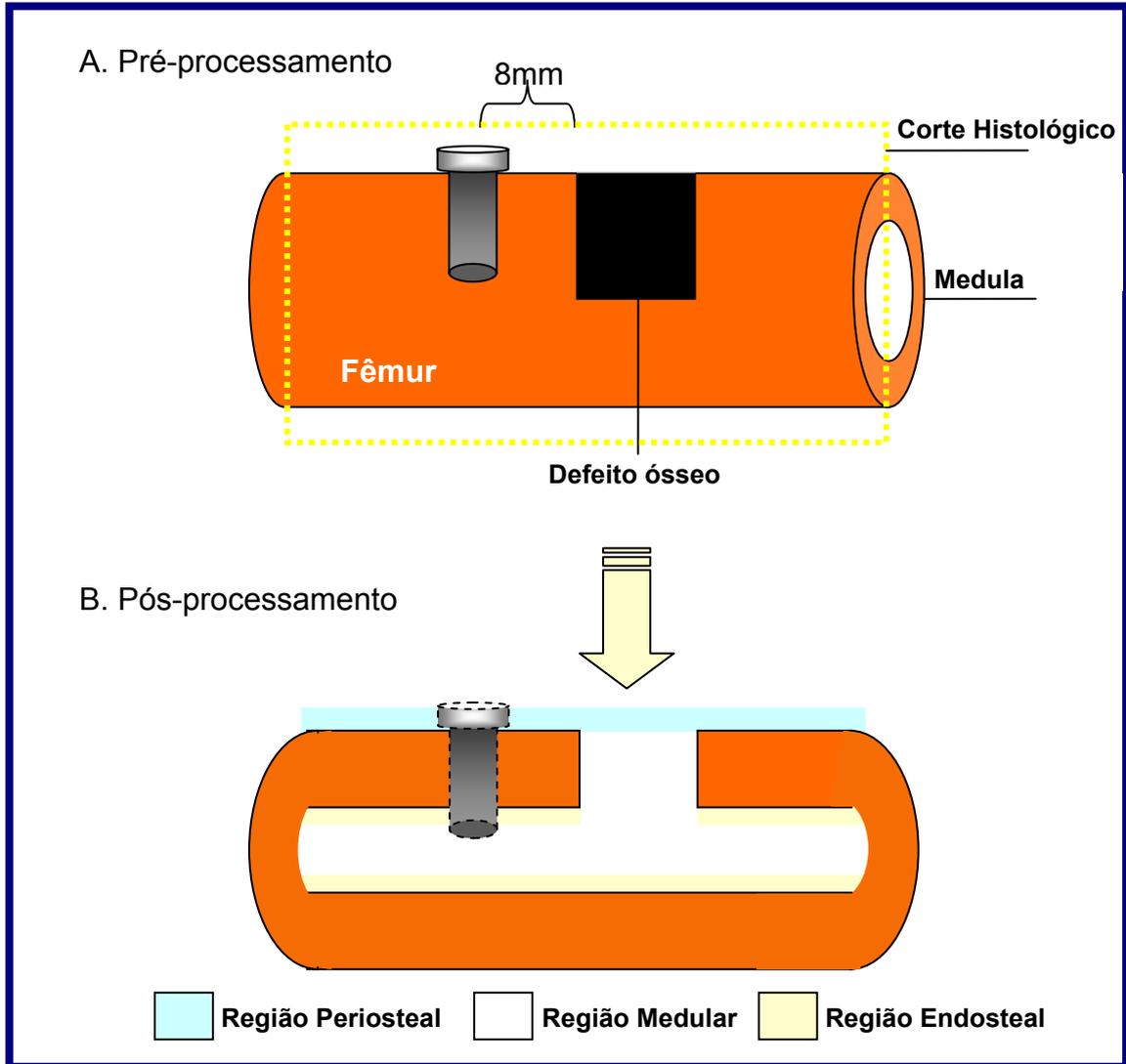


Figura 8: Modelo esquemático para confecção dos cortes histológicos.

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

4.13 ANÁLISE HISTOLÓGICA

O estudo das lâminas foi realizado com o emprego da microscopia óptica¹³, visando o estudo do processo de reparo ósseo através da análise descritiva. Para

¹³ Microscópio Óptico, marca Olympus, modelo BX50.

tal, foram utilizados os aumentos microscópicos de 40X e 100X. Os aspectos histológicos das peças ósseas submetidas à radiação com *laser* diodo, bem como das peças ósseas do grupo controle foram descritas levando-se em consideração a resposta inflamatória e a neoformação de tecido ósseo. Todas as lâminas foram codificadas, impossibilitando desta forma, a identificação a qual grupo de estudo pertenceria cada lâmina analisada.

Os critérios utilizados para avaliação do reparo ósseo foram: o fechamento da cortical óssea, avaliado quantitativamente em ausente, parcial, total (em pequena espessura) e total (em espessura igual ou maior que a diáfise); o grau de neoformação óssea, avaliado em ausente, moderado, alto e intenso, e avaliado também, sob o padrão de distribuição óssea mais preponderante, em região periosteal, endosteal ou medular, bem como nas zonas de transição periosteal-medular e endosteal-medular. Outro fator estudado foi a determinação do sentido da neoformação óssea através dos sentidos periosteal-medular ou endosteal-medular.

A resposta inflamatória também foi avaliada segundo os critérios de ausente, moderada, alta e intensa. Todos os critérios utilizados para avaliação do reparo ósseo e a resposta inflamatória foram evidenciados através das lâminas coradas pela técnica de coloração histológica HE.

Outro critério analisado foi a presença de fibras colágenas, bem como o padrão de distribuição destas nas regiões de periosteal, endosteal, medula e nas zonas de transição periosteal-medular e endosteal-medular. As lâminas coradas pela técnica de coloração histológica picrosírius foram as responsáveis pela análise de fibras colágenas da presente investigação (Apêndice B).

4.14 PROCEDIMENTO DE CAPTURA DE IMAGENS E ANÁLISE MORFOMÉTRICA

O estudo microscópico revelou ser um importante instrumento na mensuração quantitativa do trabeculado ósseo neoformado. Para isto, as lâminas obtidas de cada animal foram submetidas ao exame microscópico através do sistema computacional de captura e análise de imagem - Image-Pro Plus¹⁴. Sob um foco fixo e com clareza de campo, a imagem do microscópio foi capturada pela câmera de vídeo¹⁵ acoplada ao microcomputador¹⁶, em um aumento de 40X, transformada em sinal elétrico na forma analógica, e transmitida para a tela do computador, onde a imagem foi digitalizada, sendo constituída por um conjunto de *pixels*¹⁷ (1 pixel = 6,5 µm).

Após a captura das imagens em formato *JPEG*, em um total de 159 cortes histológicos correspondentes a todos os grupos do estudo (controle e experimental), as mesmas foram direcionadas ao programa de histomorfometria Image Tool Scripting Language¹⁸. Através deste programa morfométrico, pôde-se realizar a mensuração das áreas desejadas, através da delimitação do contorno das regiões desejadas, com o auxílio do cursor *mouse*, avaliando, desta forma, o processo de evolução do reparo ósseo, pela mensuração das áreas de neoformação óssea nas regiões de periosteio, endosteio e medula (Figura 9).

Os valores obtidos de cada trabécula óssea neoformada foram transferidos para uma tabela, na qual se registraram e calcularam a formação óssea total em cada lâmina analisada. Todos esses valores foram transportados para o programa Microsoft Excel for Windows¹⁹, inseridos nas tabelas definitivas e submetidos à análise estatística por meio do programa SPSS para o Windows²⁰.

Toda a análise morfométrica foi realizada sem o conhecimento prévio da distribuição das imagens nos seus respectivos grupos de estudo, sendo, portanto,

¹⁴ Programa IMAGE-PRO® PLUS, versão 4.5.1 desenvolvido por MediaCybernetics.

¹⁵ Marca Sony (CCD-Iris – Color Vídeo Câmera, modelo DXX-107A).

¹⁶ Marca Compaq (Pentium 4, CPU 1.8 GHz, 128 MB de memória RAM, HD 40 GB, sistema operacional Microsoft Windows versão 2002).

¹⁷ Pixel (*Picture element*) – Menor unidade gráfica de uma imagem digital (ROMANS, 1995).

¹⁸ Programa Image Tool Scripting Language®, versão 2.0 (alpha 2).

¹⁹ Programa EXCEL desenvolvido pela *Microsoft*®.

²⁰ Statistical Pckage for Social Science. Versão 11.5. Produzido por programa SPSS® Inc. 233 South Wacker Drive, 11th floor Chicago, IL 6060

codificadas todas as lâminas do estudo e, conseqüentemente, todas as imagens capturadas.



Figura 9: Delimitação das trabéculas ósseas, com auxílio do cursor do *mouse*. A área é calculada automaticamente, através do programa Image Tool Scripting. Coloração por HE; ampliação original, 40X.

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados obtidos, constituiu-se um modelo de análise de comparação das médias, sendo analisados os seguintes efeitos:

1. efeito experimento: comparação entre os grupos experimental e controle;
2. efeito tempo: comparação entre os períodos 07, 15 e 28 dias e seus respectivos grupos;
3. efeito localização: comparação entre as localizações das zonas de neoformação óssea (periósteo, endósteo e região medular), nos respectivos grupos controle e experimental.

Para análise do efeito experimento e tempo utilizaram-se o Teste do Qui-Quadrado com dois fatores enquanto que para o efeito localização foram utilizados os testes de Bonferroni, Dunnet e t-independente (VIEIRA, 2003).



Resultados

5 RESULTADOS

Durante o período de observação, os animais permaneceram saudáveis, com cicatrização normal no local operado, sem evidência de infecção ou deiscência de sutura.

5.1 RESULTADOS DESCRITIVOS DO EXAME MICROSCÓPICO

Os resultados obtidos através da microscopia óptica para os grupos experimentais e controle estão de acordo com as estruturas avaliadas (fibras colágenas, trabeculado ósseo neoformado, infiltrado inflamatório neutrofílico e reabsorção óssea inflamatória), em todas as lâminas (27 lâminas para cada técnica de coloração, HE e picrosírius, a qual é específica para observação das fibras colágenas) e foram os seguintes:

5.1.1 Grupo Controle (GI)

As secções histológicas exibiram dois fragmentos de tecido ósseo corticalizados, contendo inúmeros osteócitos e delicados canais medulares dispersos pelo seu interior. Em uma das corticais citadas, visualizaram-se soluções de continuidade compatíveis com os defeitos ósseos confeccionados. O defeito ósseo experimental apresentou-se quase totalmente preenchido por tecido medular em meio ao qual foram observadas delicadas esquirolas ósseas. Observou-se, ainda, intenso processo de neoformação óssea, com maior atividade secretora nos primeiros 15 dias (GIA e GIB) do experimento (Figuras 10 e 11). Disposta entre as trabéculas neoformadas observou-se, pela coloração de picrosírius, uma delicada trama de fibrilas colágenas, dispostas nas regiões periosteal, medular e na interface periosteó-medular (Figuras 13, 14 e 15). Moderado infiltrado inflamatório neutrofílico foi evidenciado na abertura da cavidade aos sete dias (GIA) do experimento, estando ausente nos demais períodos de observação. Ao término do período de observação (GIC), o interior da cavidade ainda apresentou predomínio de tecido medular. A nível da cortical rompida, verificou-se que o processo de reparo ósseo

estava quase completo. Em um dos espécimes, observou-se a união total das margens da cortical, porém com uma espessura ainda inferior à do tecido íntegro e de aspecto mais esponjoso (Figura 12). Nos campos estudados, não foram observados episódios de necrose, reabsorção óssea inflamatória e nem de invaginação de tecido conjuntivo para o interior do defeito ósseo.

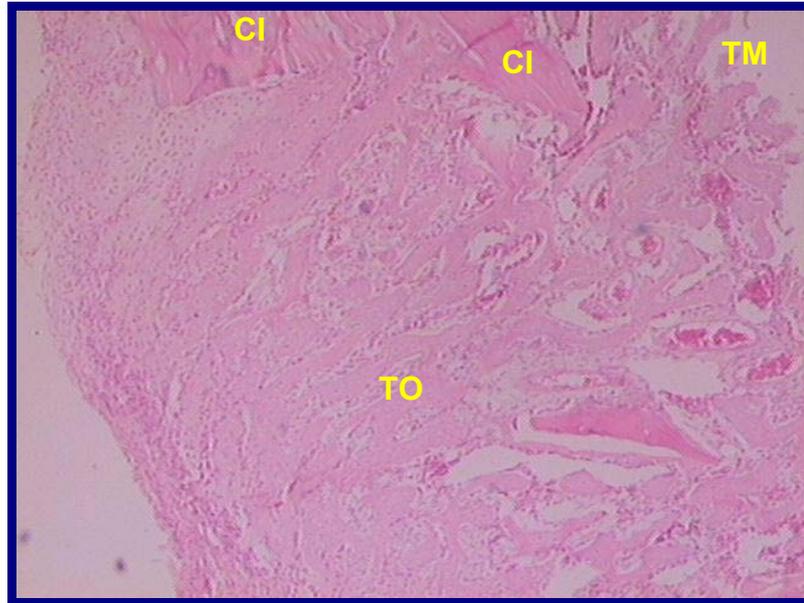


Figura 10: Imagem de corte histológico do grupo GIA. Observa-se deposição óssea com trabéculas neoformadas (TO) interpostas entre o tecido medular (TM) e corticais internas da loja cirúrgica (CI). H.E., aumento aproximado 40X.

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

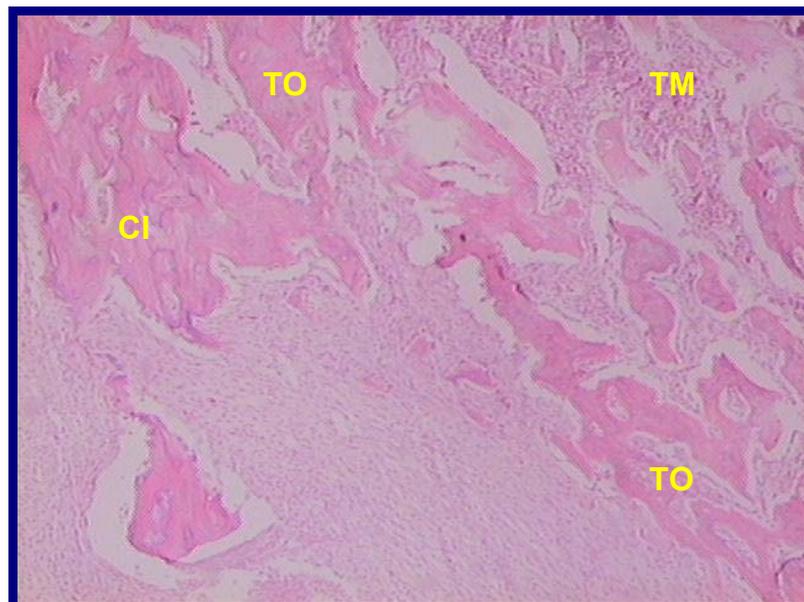


Figura 11: Imagem de corte histológico do grupo GIB. Observa-se maior deposição óssea com trabéculas neoformadas (TO) com aspecto mais maduro e interpostas entre o tecido medular (TM) e cortical interna da loja cirúrgica (CI). H.E., aumento aproximado 40X.

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

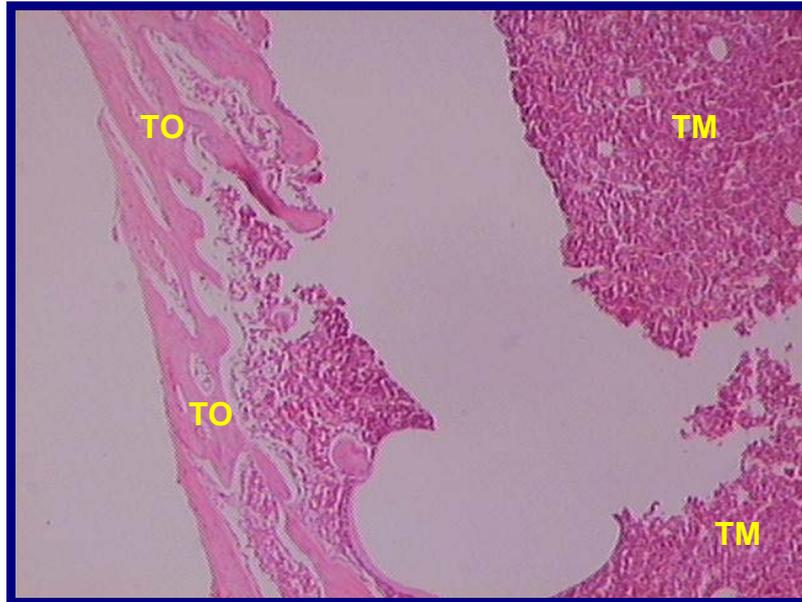


Figura 12: Imagem de corte histológico do grupo GIC. Observa-se deposição óssea com trabéculas (TO) com aspecto mais maduro em direção ao fechamento da cortical óssea. Predominância pelo tecido medular (TM) em região medular. H.E., aumento aproximado 40X.

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

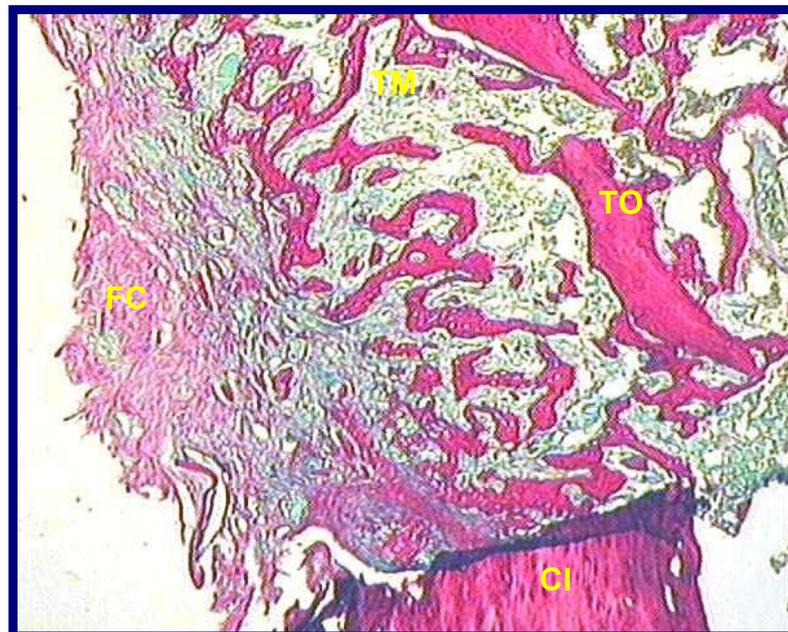


Figura 13: Imagem de corte histológico do grupo GIA. Observa-se trabéculas ósseas neoformadas (TO), tecido medular (TM), cortical interna da loja cirúrgica (CI) e trama de fibras colágenas (FC). Picrosirius, aumento aproximado 40X.

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

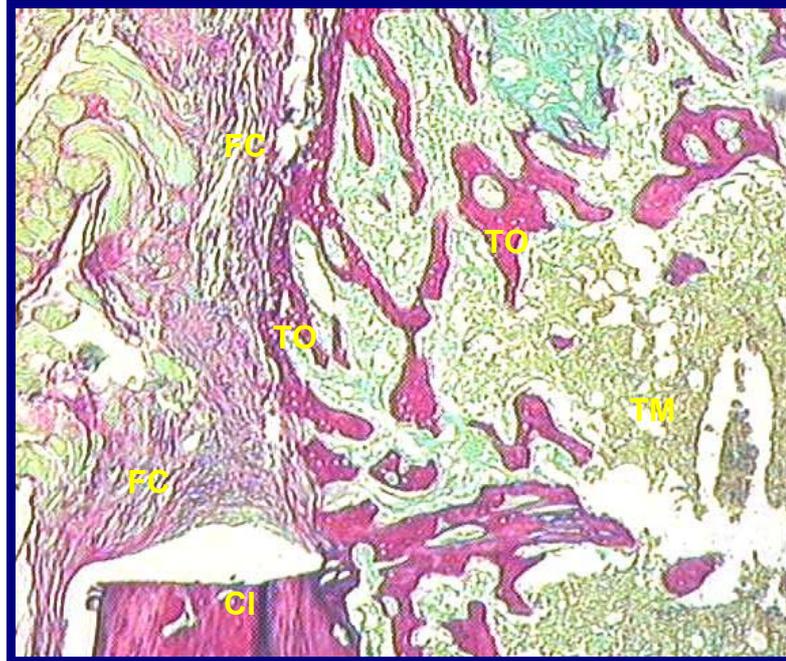


Figura 14: Imagem de corte histológico do grupo GIB. Observa-se trabéculas ósseas neofornadas (TO), tecido medular (TM), cortical interna da loja cirúrgica (CI) e trama de fibras colágenas (FC). Picrosirius, aumento aproximado 40X.

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)



Figura 15: Imagem de corte histológico do grupo GIC. Observa-se trabéculas ósseas neofornadas (TO), tecido medular (TM), cortical interna da loja cirúrgica (CI) e trama de fibras colágenas (FC). Picrosirius, aumento aproximado 40X.

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

5.1.2 Grupo Experimental (GII)

As secções histológicas revelaram dois fragmentos de tecido ósseo corticalizado contendo inúmeros osteócitos e delicados canais medulares dispersos no seu interior, em meio aos quais se visualizaram tecidos ósseo esponjoso e medular. As soluções de continuidade compatíveis com os defeitos ósseos confeccionados foram evidenciadas. No local do defeito ósseo experimental, considerando-se todos os tempos de observação, foi possível identificar uma maior atividade de neoformação óssea diferente do grupo controle, pois neste grupo (GII) observou-se maior quantidade de tecido ósseo neoformado e uma distribuição simultânea do mesmo em direção à porção central do tecido medular, tanto no sentido perióstéo-medular como endóstéo-medular, diferente do grupo controle, onde houve predomínio do sentido endóstéo-medular (Figuras 16 e 17).

Igualmente ao ocorrido no grupo controle, foi observada a presença de fibras colágenas associadas ao tecido ósseo neoformado, porém com menor expressão e até ausente em quatro espécimes (GIIC) (Figuras 19, 20 e 21). O infiltrado inflamatório neutrofílico, a exemplo do grupo controle de 07 dias (GIA), também foi considerado discreto, estando ausente nos demais períodos de observação. À entrada da cavidade, trabéculas ósseas neoformadas promoveram o reparo total das extremidades da cortical aos 15 (GIIB) e 21 (GIIC) dias (Figura 18). Sinais de necrose, invaginação de tecido conjuntivo para o interior da cavidade e atividade reabsortiva óssea inflamatória não foram evidenciados nos campos histológicos estudados.

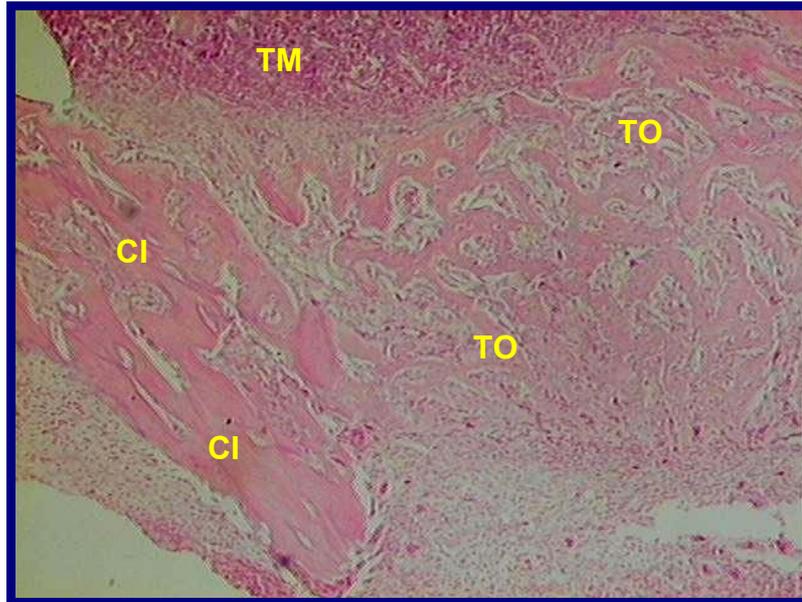


Figura 16: Imagem de corte histológico do grupo GIIA. Observa-se deposição óssea com trabéculas neoformadas (TO) em direção ao tecido medular (TM) e quantitativamente maiores que o GI e corticais internas da loja cirúrgica (CI). H.E., aumento aproximado 40X.

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

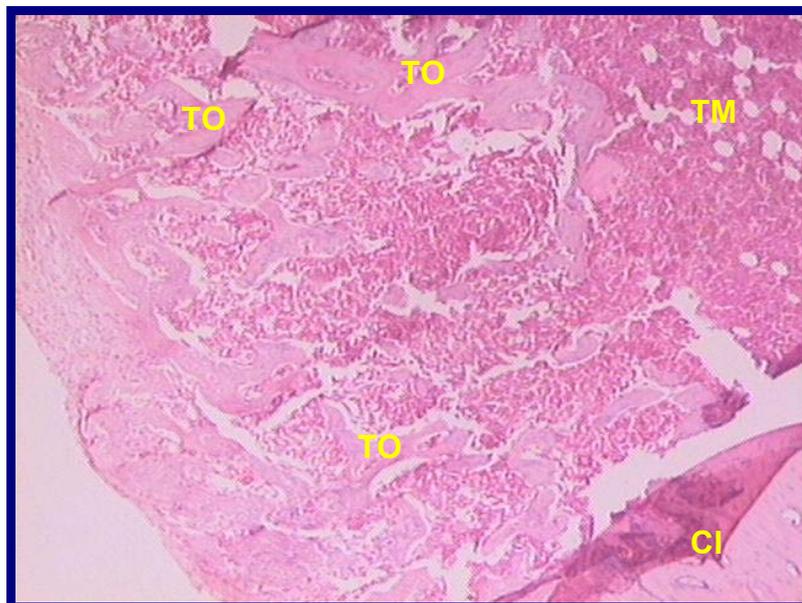


Figura 17: Imagem de corte histológico do grupo GIIIB. Observa-se deposição óssea com trabéculas neoformadas (TO) com aspecto mais maduro e interpostas entre o tecido medular (TM) e cortical interna da loja cirúrgica (CI). H.E., aumento aproximado 40X.

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

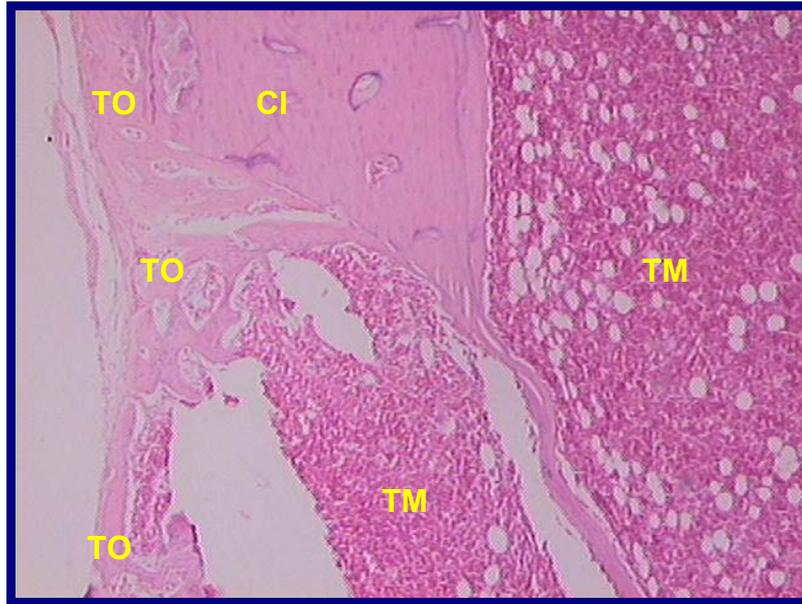


Figura 18: Imagem de corte histológico do grupo GIIc. Observa-se deposição óssea com trabéculas (TO) com aspecto mais maduro em direção ao fechamento da cortical óssea. Observa-se tecido medular (TM). H.E., aumento aproximado 40X.

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)



Figura 19: Imagem de corte histológico do grupo GIIa. Observa-se trabéculas ósseas neoformadas (TO), tecido medular (TM), cortical interna da loja cirúrgica (CI) e trama de fibras colágenas (FC). Picrosirius, aumento aproximado 40X.

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

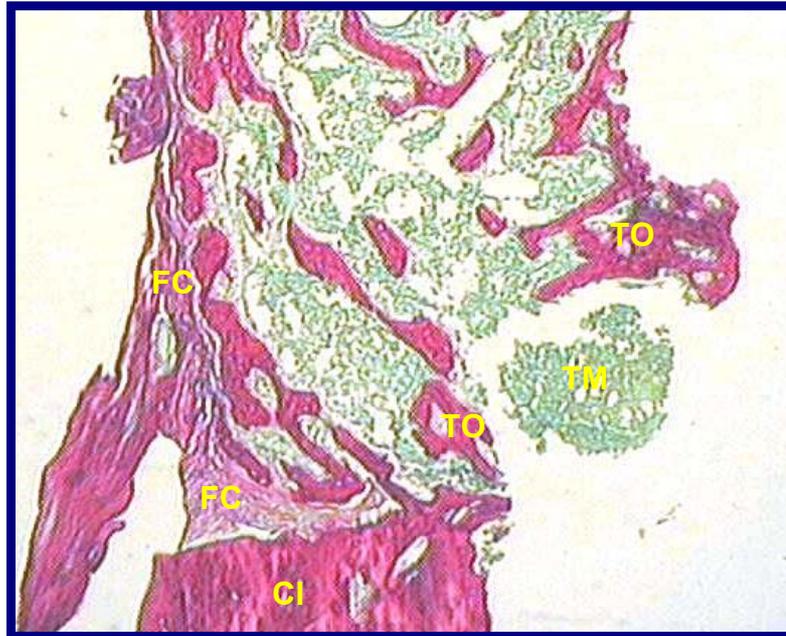


Figura 20: Imagem de corte histológico do grupo GII B. Observa-se trabéculas ósseas neoformadas (TO), tecido medular (TM), cortical interna da loja cirúrgica (CI) e trama de fibras colágenas (FC). Picrosirius, aumento aproximado 40X.

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

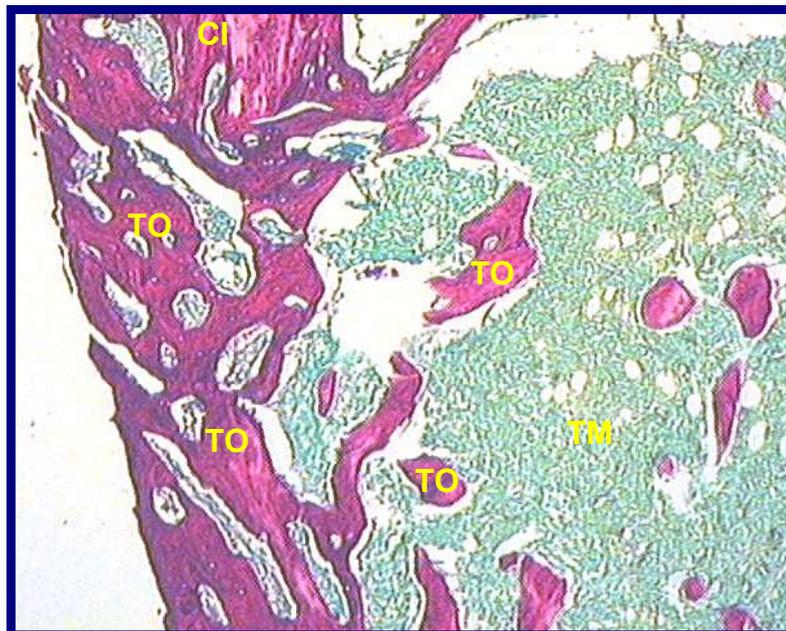


Figura 21: Imagem de corte histológico do grupo GII C. Observa-se trabéculas ósseas neoformadas (TO), tecido medular (TM), cortical interna da loja cirúrgica (CI) e ausência de fibras colágenas. Picrosirius, aumento aproximado 40X.

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

5.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA, SEMIQUANTITATIVA E DESCRITIVA, DO EXAME MICROSCÓPICO

5.2.1 Comparação entre os grupos

Vários fatores foram analisados quando da avaliação semiquantitativa da análise histológica evidenciada pelas técnicas HE e picrosírius. Para análise específica da presença, distribuição e localização das fibras colágenas utilizaram-se cortes histológicos evidenciados pela técnica de picrosírius. A justificativa para análise das fibras colágenas é o conhecimento de que o colágeno é o componente mais abundante da matriz orgânica óssea, a qual é sintetizada e secretada pelos osteoblastos.

A partir dos resultados do teste do qui-quadrado, verificou-se que existe diferença significativa na distribuição das fibras colágenas entre os grupos estudados (Tabela 1). Observa-se que o grupo controle apresentou distribuição em todos os níveis estudados, com alta incidência nos níveis de variação altos e intensos, enquanto que, o grupo *laser* denotou a ausência de padrões intensos de distribuição das fibras colágenas ($p \leq 0,05$).

Tabela 1: Comparação da distribuição das fibras colágenas entre os grupos controle e experimental.

| Grupo | Fibras Colágenas | | | | Número de Animais (n) | p |
|-------|------------------|----------|----------|----------|--------------------------|--------|
| | Ausente | Moderado | Alto | Intenso | | |
| GI | 1(7,7%) | 2(15,4%) | 6(46,2%) | 4(30,8%) | 13(100,0%) | 0,010* |
| GII | 4(28,6%) | 8(57,1%) | 2(14,3%) | 0(0%) | 14(100,0%) | |

* Apresenta diferença estatística significativa, para $p \leq 0,05$.

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

Analisando-se a neoformação óssea, segundo parâmetros descritivos quantitativos e associados a graus moderado, alto e intenso, observou-se que não houve diferença significativa entre os grupos analisados (Tabela 2). Evidencia-se que o grupo experimental apresentou maiores graus de neoformação óssea do que

o grupo controle, expressando, desta forma, padrões altos e intensos de neoformação, com distribuição equinânime nestes graus, porém sem diferenças estatística significativa entre os grupos, segundo o teste do qui-quadrado ($p= 0,177$).

Tabela 2: Comparação do grau de neoformação óssea entre os grupos controle e experimental.

| Grupo | Grau de neoformação óssea | | | | Número de Animais (n) | p |
|-------|---------------------------|----------|----------|----------|--------------------------|-------|
| | Ausente | Moderado | Alto | Intenso | | |
| GI | 0(0%) | 8(61,5%) | 5(38,5%) | 0(0%) | 13(100,0%) | 0,177 |
| GII | 0(0%) | 8(57,1%) | 3(21,4%) | 3(21,4%) | 14(100,0%) | |

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

Outro fator considerado na neoformação óssea entre os grupos analisados foi o sentido preponderante pelo qual estavam formando-se as trabéculas ósseas. A disposição periósteeo-medular mostrou-se primordial na neoformação óssea do grupo experimental, enquanto que, o sentido endósteeo-medular mostrou-se preponderante no grupo controle. Observou-se também a tendência à linearidade dos grupos analisados, a qual não expressou padrões estatisticamente significativos, quando utilizado para comparação dos grupos o teste do qui-quadrado (Tabela 3).

Tabela 3: Comparação do sentido da neoformação óssea entre os grupos controle e experimental

| Grupo | Sentido da neoformação óssea | | Número de Animais (n) | P |
|-------|------------------------------|-------------------|--------------------------|-------|
| | Periósteeo-medular | Endósteeo-medular | | |
| GI | 5(38,5%) | 8(61,5%) | 13(100,0%) | 0,085 |
| GII | 10(71,4%) | 4(28,6%) | 14(100,0%) | |

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

Ao estudar a disposição da neoformação óssea e o padrão de cicatrização óssea com o fechamento da cortical da loja cirúrgica confeccionada observaram-se padrões distintos de corticalização entre os grupos estudados. O grupo controle revelou padrões diminutos de fechamento da cortical associada, enquanto que, o grupo experimental revelou padrões expressivos de corticalização, com fechamento total da cortical óssea, porém com padrões de espessura menores que os da diáfise adjacente (Tabela 4).

Tabela 4: Comparação do grau de fechamento da cortical óssea entre os grupos controle e experimental.

| Grupo | Grau de fechamento da cortical óssea | | | | Número de Animais (n) | p |
|-------|--------------------------------------|----------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------|-------|
| | Ausente | Parcial | Total (Espessura < diáfise) | Total (Espessura ≥ diáfise) | | |
| GI | 9(69,2%) | 3(23,1%) | 1(7,7%) | 0(0%) | 13(100,0%) | 0,285 |
| GII | 6(42,9%) | 4(28,6%) | 4(28,6%) | 0(0%) | 14(100,0%) | |

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

O infiltrado inflamatório neutrofílico foi analisado sob os parâmetros de ausente, moderado, alto e intenso dentre os grupos. Observaram-se padrões variando de ausente a moderado em ambos os grupos, porém com evidenciação de um menor infiltrado inflamatório no grupo *laser* e sem associação estatística significativa entre os grupos, posto ser o valor de $p > 0,05$ (Tabela 5).

Tabela 5: Comparação da presença do infiltrado inflamatório neutrofílico entre os grupos controle e experimental

| Grupo | Infiltrado inflamatório neutrofílico | | | | Número de Animais (n) | p |
|-------|--------------------------------------|----------|-------|---------|-----------------------|-------|
| | Ausente | Moderado | Alto | Intenso | | |
| GI | 8(61,5%) | 5(38,5%) | 0(0%) | 0(0%) | 13(100,0%) | 0,152 |
| GII | 12(85,7%) | 2(14,3%) | 0(0%) | 0(0%) | 14(100,0%) | |

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

5.2.2 Comparação entre os grupos e os períodos de observação

Analisando-se o padrão de distribuição das fibras colágenas de acordo com os diferentes períodos de observação e os grupos estudados, verificou-se que houve diferenças estatisticamente significativas na distribuição das fibras colágenas dentro do grupo experimental e nos diferentes períodos de observação, de acordo com o teste do qui-quadrado ($p=0,010$) (Tabela 6). Observou-se que, a partir dos 15 dias do experimento, as fibras colágenas do grupo *laser* passaram a adquirir níveis de distribuição variando de ausente a moderado, enquanto que, níveis de distribuição variando de ausente a intenso prevaleceram no grupo controle ($p \leq 0,05$).

Tabela 6: Comparação da presença de fibras colágenas entre os grupos e os períodos de observação.

| Grupo | Tempo | Fibras Colágenas | | | | Número de Animais (n) | p |
|-------|---------|------------------|----------|----------|----------|-----------------------|--------|
| | | Ausente | Moderado | Alto | Intenso | | |
| GI | 07 dias | 0(0%) | 1(7,7%) | 4(30,7%) | 0(0%) | 5(38,4%) | 0,109 |
| | 15 dias | 0(0%) | 1(7,7%) | 2(15,4%) | 1(7,7%) | 4(30,8%) | |
| | 21 dias | 1(7,7%) | 0(0%) | 0(0%) | 3(23,1%) | 4(30,8%) | |
| GII | 07 dias | 0(0%) | 3(21,5%) | 2(14,2%) | 0(0%) | 5(35,7%) | 0,010* |
| | 15 dias | 0(0%) | 4(28,6%) | 0(0%) | 0(0%) | 4(28,6%) | |
| | 21 dias | 4(28,6%) | 1(7,1%) | 0(0%) | 0(0%) | 5(35,7%) | |

* Apresenta diferença estatística significativa, para $p \leq 0,05$.

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

Analisando-se o padrão de distribuição das fibras colágenas nas regiões de periosteó, endosteó e medula e segundo os grupos (controle e *laser*) e os períodos de observação, observou-se que tanto na zona periosteal como na zona medular houve diferenças estatisticamente significativas no grupo *laser* ($p=0,050$ e $p=0,027$) quando observado o comportamento das fibras colágenas nos diferentes períodos experimentais, segundo o teste do qui-quadrado. Tomando-se por referência os grupos controle e *laser*, observou-se, na região periosteal, um predomínio na distribuição das fibras colágenas nos primeiros 15 dias de observação, tendendo a ausência aos 21 dias do experimento. Analisando-se a região endosteal observou-se ausência na distribuição das fibras colágenas em ambos os grupos. Essa ausência seguiu um padrão constante em toda a amostra e, conseqüentemente, inviabilizou a análise estatística. A região medular evidenciou no grupo controle um predomínio de fibras colágenas em todos os períodos, enquanto que, no grupo *laser* observou-se um predomínio nos primeiros sete dias do experimento, tendendo a desaparecer a partir dos 15 dias de observação (Tabela 7).

Tabela 7: Padrão de distribuição das fibras colágenas segundo os períodos de observação e as localizações periosteal, endosteal e medular.

| Grupo | Tempo | Padrão de distribuição das fibras colágenas | | | | | | | | |
|-------|---------|---|--------------|--------|--------------|-----------|---|--------------|--------------|--------|
| | | Periosteal | | | Endosteal | | | Medular | | |
| | | Ausente | Presente | p | Ausente | Presente | p | Ausente | Presente | p |
| GI | 07 dias | 2 (15,4%) | 3 (23,1%) | | 5 (38,4%) | 0 (0%) | | 3 (23,1%) | 2 (15,4%) | |
| | 15 dias | 1 (7,7%) | 3 (23,1%) | 0,344 | 4 (30,7%) | 0 (0%) | - | 0 (0%) | 4 (30,7%) | 0,146 |
| | 21 dias | 3 (23,1%) | 1 (7,7%) | | 4 (30,7%) | 0 (0%) | | 1 (7,7%) | 3 (23,1%) | |
| GII | 07 dias | 3 (21,5%) | 2 (14,2%) | | 5 (35,7%) | 0 (0%) | | 1 (7,1%) | 4 (28,6%) | |
| | 15 dias | 0 (0%) | 4 (28,6%) | 0,050* | 4 (28,6%) | 0 (0%) | - | 3 (21,5%) | 1 (7,1%) | 0,027* |
| | 21 dias | 4 (28,6%) | 1 (7,1%) | | 5 (35,7%) | 0 (0%) | | 5 (35,7%) | 0 (0%) | |

* Apresenta diferença estatística significativa, para $p \leq 0,05$.

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

Analisando-se o padrão de distribuição das fibras colágenas nas regiões de transição periosteal-medular e endosteal-medular e segundo os grupos (controle e *laser*) e os diferentes períodos do experimento, observou-se que a zona periosteal-medular apresentou diferença estatisticamente significativa no grupo *laser* ($p=0,027$) quando observado o comportamento das fibras colágenas nos diferentes períodos de observação, segundo o teste do qui-quadrado. Tomando-se por referência os grupos controle e *laser*, observou-se, na região periosteal-medular um padrão de distribuição das fibras colágenas similar ao observado no periosteal, com predomínio nos primeiros 15 dias de observação, tendendo a ausência nos 21 dias do experimento. A região endosteal-medular evidenciou, em ambos os grupos analisados, predomínio pela ausência das fibras colágenas a partir dos sete dias de observação (Tabela 8).

Tabela 8: Padrão de distribuição das fibras colágenas segundo os períodos de observação e as zonas de transição periósteo-medular e endósteo-medular.

| Grupo | Tempo | Padrão de distribuição das fibras colágenas | | | | | |
|-------|---------|---|------------|--------|------------------|----------|-------|
| | | Periósteo-Medular | | | Endósteo-Medular | | |
| | | Ausente | Presente | p | Ausente | Presente | p |
| GI | 07 dias | 1 (7,7%) | 4 (30,7%) | 0,057 | 5 (38,4%) | 0 (0%) | 0,296 |
| | 15 dias | 0 (0%) | 4 (30,7%) | | 3 (23,1%) | 1 (7,7%) | |
| | 21 dias | 3 (23,1%) | 1 (7,7%) | | 4 (30,7%) | 0 (0%) | |
| GII | 07 dias | 0 (0%) | 5 (35,7%), | 0,027* | 4 (28,6%) | 1 (7,1%) | 0,379 |
| | 15 dias | 1 (7,1%) | 3 (21,5%) | | 4 (28,6%) | 0 (0%) | |
| | 21 dias | 4 (28,6%) | 1 (7,1%) | | 5 (35,7%) | 0 (0%) | |

* Apresenta diferença estatística significativa, para $p \leq 0,05$.

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

Através dos resultados do teste qui-quadrado (Tabela 9) verificou-se que não houve diferença significativa no grau de neoformação óssea entre os tempos e os grupos estudados. Evidenciou-se também, que apenas o grupo *laser* apresentou padrões intensos de neoformação óssea com conseqüente exacerbação da osteogênese e biomodulação óssea positiva em relação ao grupo controle. Observou-se que o padrão de intensificação da neoformação óssea no grupo *laser* teve maior incidência nos primeiros sete dias do experimento.

Tabela 9: Comparação do grau de neoformação óssea entre os grupos e os períodos de observação.

| Grupo | Tempo | Grau de neoformação óssea | | | | Número de Animais (n) | p |
|-------|---------|---------------------------|----------|----------|----------|--------------------------|-------|
| | | Ausente | Moderado | Alto | Intenso | | |
| GI | 07 dias | 0(0%) | 2(15,4%) | 3(23,1%) | 0(0%) | 5(38,4%) | 0,157 |
| | 15 dias | 0(0%) | 2(15,4%) | 2(15,4%) | 0(0%) | 4(30,7%) | |
| | 21 dias | 0(0%) | 4(30,7%) | 0(0%) | 0(0%) | 4(30,7%) | |
| GII | 07 dias | 0(0%) | 1(7,1%) | 2(14,2%) | 2(14,2%) | 5(35,7%) | 0,244 |
| | 15 dias | 0(0%) | 3(21,5%) | 1(7,1%) | 0(0%) | 4(28,6%) | |
| | 21 dias | 0(0%) | 4(28,6%) | 0(0%) | 1(7,1%) | 5(35,7%) | |

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

Segundo os resultados do teste qui-quadrado (Tabela 10) verifica-se que não houve associação significativa entre os grupos e a neoformação óssea segundo as

localizações de perióstio e endóstio ($p>0,05$). Analisando a neoformação óssea segundo a localização do perióstio pôde-se observar que no grupo controle houve um equilíbrio na incidência da osteogênese durante todos os períodos de observação, enquanto que, o grupo *laser* evidenciou um aumento progressivo na incidência da neoformação óssea conforme se prolongava o período de observação. O endóstio referiu, no grupo controle, padrões de neoformação óssea similares na incidência da neoformação óssea conforme se estenderam os períodos de observação, enquanto que, no grupo *laser*, observou-se predomínio da neoformação óssea em todos os tempos analisados, porém, com predomínio pelos sete primeiros dias de observação. Quanto à região medular, observou-se que a neoformação óssea seguiu um padrão constante em todos os grupos analisados, e, por consequência, impossibilidade de análise estatística.

Tabela 10: Padrão de distribuição da neoformação óssea segundo os períodos de observação e as localizações periosteal, endosteal e medular.

| Grupo | Tempo | Padrão de distribuição da neoformação óssea | | | | | | | | |
|-------|---------|---|--------------|-------|--------------|--------------|-------|-----------|--------------|---|
| | | Perióstio | | | Endóstio | | | Medular | | |
| | | Ausente | Presente | p | Ausente | Presente | p | Ausente | Presente | p |
| GI | 07 dias | 4 (30,7%) | 1 (7,7%) | 0,979 | 1 (7,7%) | 4 (30,7%) | 0,420 | 0 (0%) | 5 (38,4%) | - |
| | 15 dias | 3 (23,1%) | 1 (7,7%) | | 0 (0%) | 4 (30,7%) | | 0 (0%) | 4 (30,7%) | |
| | 21 dias | 3 (23,1%) | 1 (7,7%) | | 0 (0%) | 4 (30,7%) | | 0 (0%) | 4 (30,7%) | |
| GII | 07 dias | 3 (21,5%) | 2 (14,2%) | 0,108 | 1 (7,1%) | 4 (28,6%) | 0,772 | 0 (0%) | 5 (35,7%) | - |
| | 15 dias | 1 (7,1%) | 3 (21,5%) | | 1 (7,1%) | 3 (21,5%) | | 0 (0%) | 4 (28,6%) | |
| | 21 dias | 0 (0%) | 5 (35,7%) | | 2 (14,2%) | 3 (21,5%) | | 0 (0%) | 5 (35,7%) | |

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

Analisando-se o padrão de distribuição da neoformação óssea nas regiões de transição perióstio-medular e endóstio-medular e segundo os grupos e os períodos experimentais, observou-se que a zona perióstio-medular apresentou diferença estatisticamente significativa no grupo *laser* ($p=0,010$), segundo o teste do qui-quadrado. Tomando-se por referência o grupo *laser*, observou-se, na região perióstio-medular, um predomínio na incidência da osteogênese nos grupos analisados aos 15 e 21 dias de observação, enquanto que, no grupo controle observou-se, uma maior incidência nos primeiros 07 dias de observação. A região

endósteo-medular referiu no grupo controle um processo de osteogênese mais intenso do que no grupo *laser*, com predomínio pelos primeiros 15 dias de observação. O grupo *laser* evidenciou um equilíbrio da neoformação óssea nos diferentes períodos de observação (Tabela 11).

Tabela 11: Comparação do padrão da neoformação óssea segundo os períodos de observação e as zonas de transição periósteo-medular e endósteo-medular.

| Grupo | Tempo | Padrão de distribuição da neoformação óssea | | | | | |
|-------|---------|---|-----------|--------|------------------|-----------|-------|
| | | Periósteo-Medular | | | Endósteo-Medular | | |
| | | Ausente | Presente | p | Ausente | Presente | p |
| GI | 07 dias | 3 (23,1%) | 2 (15,4%) | 0,365 | 3 (21,5%) | 2 (15,4%) | 0,344 |
| | 15 dias | 4 (30,7%) | 0 (0%) | | 1 (7,7%) | 3 (23,1%) | |
| | 21 dias | 3 (23,1%) | 1 (7,7%) | | 3 (23,1%) | 1 (7,7%) | |
| GII | 07 dias | 5 (35,7%) | 0 (0%), | 0,010* | 4 (28,6%) | 1 (7,1%) | 0,979 |
| | 15 dias | 0 (0%) | 4 (28,6%) | | 3 (21,5%) | 1 (7,1%) | |
| | 21 dias | 2 (14,2%) | 3 (21,5%) | | 4 (28,6%) | 1 (7,1%) | |

* Apresenta diferença estatística significativa, para $p \leq 0,05$.

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

Quando analisada a presença da corticalização entre os grupos e os períodos experimentais, verificou-se que houve associação estatística significativa entre o grupo *laser* e a presença de corticalização segundo os períodos de tempo analisados, segundo o teste qui-quadrado ($p=0,008$). O grupo *laser* expressou a formação total da cortical óssea, contudo em menor espessura que a diáfise adjacente, a partir dos 15 dias, tendo uma maior incidência aos 21 dias de observação. O grupo controle denotou predomínio pela ausência na formação da corticalização óssea (69,3%) (Tabela 12).

Tabela 12: Comparação do grau de fechamento da cortical entre os grupos e os períodos de observação.

| Grupo | Tempo | Grau de fechamento da cortical | | | | Número de Animais (n) | p |
|-------|---------|--------------------------------|----------|--------------------|--------------------|-----------------------|--------|
| | | Ausente | Parcial | Total (<Espessura) | Total (≥Espessura) | | |
| GI | 07 dias | 3(23,1%) | 2(15,4%) | 0(0%) | 0(0%) | 5(38,4%) | 0,420 |
| | 15 dias | 3(23,1%) | 1(7,7%) | 0(0%) | 0(0%) | 4(30,7%) | |
| | 21 dias | 3(23,1%) | 0(0%) | 1(7,7%) | 0(0%) | 4(30,7%) | |
| GII | 07 dias | 5(35,7%) | 0(0%) | 0(0%) | 0(0%) | 5(35,7%) | 0,008* |
| | 15 dias | 0(0%) | 3(21,5%) | 1(7,1%) | 0(0%) | 4(28,6%) | |
| | 21 dias | 1(7,1%) | 1(7,1%) | 3(21,5%) | 0(0%) | 5(35,7%) | |

* Apresenta diferença estatística significativa, para $p \leq 0,05$.

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

Pelos resultados do teste qui-quadrado, verificou-se que houve diferença significativa no sentido da neoformação óssea entre os grupos e os períodos de tempo estudados no grupo *laser* (Tabela 13). Observou-se que o grupo controle apresentou predomínio pelo sentido endósteo-medular (61,5%) durante o processo de neoformação óssea, porém sem associação estatística significativa. O grupo *laser*, por sua vez, apresentou predomínio pelo sentido inverso ao observado no grupo controle, ressaltando a cicatrização óssea no sentido periósteo-medular (71,4%).

Tabela 13: Comparação do sentido da neoformação óssea entre os grupos e os períodos de observação.

| Grupo | Tempo | Sentido da neoformação óssea | | Número de Animais (n) | p |
|-------|---------|------------------------------|------------------|-----------------------|--------|
| | | Periósteo-medular | Endósteo-medular | | |
| GI | 07 dias | 2(15,4%) | 3(23,1%) | 5(38,4%) | 0,082 |
| | 15 dias | 0(0%) | 4(30,7%) | 4(30,7%) | |
| | 21 dias | 3(23,1%) | 1(7,7%) | 4(30,7%) | |
| GII | 07 dias | 1(7,1%) | 4(28,6%) | 5(35,7%) | 0,006* |
| | 15 dias | 4(28,6%) | 0(0%) | 4(28,6%) | |
| | 21 dias | 5(35,7%) | 0(0%) | 5(35,7%) | |

* Apresenta diferença estatística significativa, para $p \leq 0,05$.

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

Analisando-se a presença de infiltrado inflamatório neutrofílico entre os grupos e os distintos períodos de observação, ressaltou-se associação estatística significativa no grupo controle, segundo o teste qui-quadrado ($p=0,002$). O grupo *laser* denotou menor incidência de infiltrado inflamatório quando comparados ao grupo controle, contudo sem associação estatística significativa (Tabela 14).

Tabela 14: Comparação da presença de infiltrado inflamatório neutrofílico entre os grupos e os períodos de observação.

| Grupo | Tempo | Infiltrado Inflamatório Neutrofílico | | | | Número de Animais (n) | p |
|-------|---------|--------------------------------------|----------|-------|---------|-----------------------|--------|
| | | Ausente | Moderado | Alto | Intenso | | |
| GI | 07 dias | 0(0%) | 5(38,4%) | 0(0%) | 0(0%) | 5(38,4%) | 0,002* |
| | 15 dias | 4(30,7%) | 0(0%) | 0(0%) | 0(0%) | 4(30,7%) | |
| | 21 dias | 4(30,7%) | 0(0%) | 0(0%) | 0(0%) | 4(30,7%) | |
| GII | 07 dias | 3(21,5%) | 2(14,2%) | 0(0%) | 0(0%) | 5(35,7%) | 0,122 |
| | 15 dias | 4(28,6%) | 0(0%) | 0(0%) | 0(0%) | 4(28,6%) | |
| | 21 dias | 5(35,7%) | 0(0%) | 0(0%) | 0(0%) | 5(35,7%) | |

* Apresenta diferença estatística significativa, para $p \leq 0,05$.

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA MORFOMÉTRICA DA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA

5.3.1 Comparação morfológica da neoformação óssea segundo as localizações, os grupos e os períodos de observação estudados

A tabela 15 mostra os valores das médias e desvio-padrão referentes às áreas de trabeculado ósseo neoformado e analisadas quantitativamente em cada um dos grupos, bem como, nos períodos de observação estudados, analisadas em um conjunto de *pixels*. A tabela evidencia que o grupo *laser* exprimiu valores de área de trabeculado ósseo superior ao grupo controle. Analisando os diferentes períodos de observação, pôde-se observar valores de neoformação óssea homogêneos entre os grupos controle e *laser* aos 07 e 15 dias. Durante os períodos de observação de 07 e 21 dias, observaram-se maiores áreas de trabeculado ósseo no grupo *laser*. É

importante ressaltar o declínio da osteogênese ocorrido na transição dos 15 aos 21 dias de observação em ambos os grupos. Através dos resultados obtidos com o teste de Bonferroni, pela comparação linear independente entre os grupos, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos grupos estudados.

Tabela 15: Comparação das médias referentes às áreas de trabeculado ósseo neoformado nos grupos estudados e nos períodos de observação.

| Grupo | Média | Tempo | Média | Desvio-padrão | p |
|-------|------------|---------|------------|---------------|-------|
| GI | 262.049,22 | 07 dias | 307.132,40 | 62996,049 | 0,621 |
| | | 15 dias | 310.601,00 | 70431,724 | |
| | | 21 dias | 168.414,25 | 70431,724 | |
| GII | 289.392,30 | 07 dias | 312.868,60 | 62996,049 | |
| | | 15 dias | 308.379,50 | 70431,724 | |
| | | 21 dias | 246.928,80 | 62996,049 | |

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

Ao analisar quantitativamente as áreas de trabeculado ósseo neoformado considerando-se às localizações de perióstio, medula e endóstio e os grupos, controle e *laser*, observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre as medidas de área dos grupos estudados apenas na localização de perióstio, segundo o teste t independente ($p=0,038$) (Tabela 16). Na localização periosteal foi ressaltada uma maior osteogênese no grupo experimental.

Tabela 16: Média, desvio padrão, intervalo de confiança, valores mínimos e máximos para o trabeculado ósseo nos grupos analisados.

| Localização | Grupo | Média | Desvio-Padrão | Intervalo de Confiança de 95% | | p |
|-------------|-------|------------|---------------|-------------------------------|-----------------|-------|
| | | | | Limite Inferior | Limite Superior | |
| | | | | Periosteio | GI | |
| | GII | 85.571,07 | 108710,446 | | | |
| Medular | GI | 164.627,69 | 75987,351 | 47936,272 | 100771,228 | 0,471 |
| | GII | 138.210,21 | 107543,242 | | | |
| Endosteio | GI | 83.963,08 | 64742,813 | 24759,276 | 64184,430 | 0,370 |
| | GII | 64.250,50 | 46636,321 | | | |

* Apresenta diferença estatística significativa, para $p \leq 0,05$.

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

Quando comparados os grupos e os períodos de observação segundo a localização do periosteio, foram verificadas diferenças significativas entre as medidas de área dos grupos estudados, segundo o teste de Bonferroni ($p=0,026$). Evidenciou-se maior processo de neoformação óssea, em todos os períodos de observação, no grupo submetido à radiação *laser*. Quando comparado ao grupo controle observou-se que o grupo experimental apresentou valores de área superiores (Tabela 17).

Tabela 17: Comparação das médias, desvio-padrão e valor de p referentes às áreas de trabeculado ósseo nos grupos estudados segundo a localização do periosteio.

| Grupo | Tempo | Média | Desvio-Padrão | P |
|-------|---------|------------|---------------|--------|
| GI | 07 dias | 7.376,80 | 32386,474 | 0,026* |
| | 15 dias | 6.703,50 | 36209,178 | |
| | 21 dias | 39.086,25 | 36209,178 | |
| GII | 07 dias | 16.985,80 | 32386,474 | 0,026* |
| | 15 dias | 76.977,00 | 36209,178 | |
| | 21 dias | 161.031,60 | 32386,474 | |

* - Apresenta diferença estatística significativa, para $p \leq 0,05$.

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

Com a finalidade de evidenciar os períodos e os grupos aonde existiram as diferenças estatisticamente significativas para a localização do periosteio, pôde-se utilizar o teste de Dunnett C, o qual expressou associação estatística significativa entre todos os subgrupos controle com o grupo experimental analisado aos 21 dias. Dentro do grupo *laser* observou-se associação significativa dos grupos analisados aos 07 e 21 dias (Tabela 18).

Tabela 18: Comparação entre os subgrupos analisados segundo a localização do periosteio e associação estatística.

| Subgrupo | Subgrupo | p |
|----------|----------|--------|
| GIA | GIIC | 0,003* |
| GIB | GIIC | 0,005* |
| GIC | GIIC | 0,020* |
| GIIA | GIIC | 0,005* |

* Apresenta diferença estatística significativa, para $p \leq 0,05$.

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

Quando comparados os grupos e os períodos de observação, segundo a localização medular, não foram verificadas diferenças significativas entre as medidas de área dos grupos estudados, segundo o teste de Bonferroni ($p=0,484$). Evidenciou-se um maior processo de neoformação óssea no grupo controle quando comparado ao grupo *laser*, em todos os períodos de observação (Tabela 19).

Tabela 19: Comparação das médias, desvio-padrão e valor de p referentes às áreas de trabeculado ósseo nos grupos estudados segundo a localização medular.

| Grupo | Tempo | Média | Desvio-Padrão | P |
|-------|---------|------------|---------------|-------|
| GI | 07 dias | 214.066,00 | 32681,314 | 0,484 |
| | 15 dias | 190.121,50 | 36538,820 | |
| | 21 dias | 77.336,00 | 36538,820 | |
| GII | 07 dias | 200.474,60 | 32681,314 | 0,484 |
| | 15 dias | 170.328,00 | 36538,820 | |
| | 21 dias | 50.251,60 | 32681,314 | |

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)

Através dos resultados obtidos com o teste Bonferroni, não foram verificadas diferenças significativas entre as médias dos grupos estudados nos distintos períodos e segundo a localização do endóstio ($p=0,358$). Evidenciou-se dentro do grupo submetido à radiação *laser* uma maior área de trabeculado ósseo nos sete primeiros dias, com decréscimo progressivo nos demais períodos de observação. O grupo controle, nesta área de localização, denotou padrões mais intensos de neoformação óssea (Tabela 20).

Tabela 20: Comparação das médias, desvio-padrão e valor de p referentes às áreas de trabeculado ósseo nos grupos estudados segundo a localização do endóstio.

| Grupo | Tempo | Média | Desvio-Padrão | p |
|-------|---------|------------|---------------|-------|
| GI | 07 dias | 85.689,60 | 24286,645 | 0,358 |
| | 15 dias | 113.776,00 | 27153,295 | |
| | 21 dias | 51.992,00 | 27153,295 | |
| GII | 07 dias | 95.396,20 | 24286,645 | 0,358 |
| | 15 dias | 61.074,50 | 27153,295 | |
| | 21 dias | 35.645,60 | 24286,645 | |

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2006)



Discussão

6 DISCUSSÃO

O advento do *laser* trouxe inúmeros benefícios para a humanidade. Entretanto, por tratar-se de um avanço tecnológico recente, os padrões de aplicação sobre o tecido ósseo demandam exaustivas pesquisas nesta área, com o objetivo de estabelecer parâmetros de utilização que contribuam para a efetividade biomoduladora do *laser*. Assim, torna-se necessária a definição de protocolos adequados, com o estabelecimento de corretas densidades de potência e de energia, comprimento de onda, frequência, tempo e modo de exposição do aparelho *laser*, bem como a interação entre o *laser* com cada tipo de tecido radiado (HALLMAN et al., 1988; HALL et al., 1994; BRUGNERA JÚNIOR; PINHEIRO, 1998; FRANKS, 1999; KOLÁROVÁ; DITRICOVÁ; WAGNER, 1999; KREISLER et al., 2002; CATÃO, 2004).

As características da radiação *laser* – coerência, colimação e monocromia – têm sido examinadas em detalhes. Em particular, a coerência e a colimação não parecem ser cruciais, uma vez que as mesmas são rapidamente degradadas pela reflexão enquanto o raio passa pelo tecido. Suportando sua relativa falta de importância está o fato que tanto os *lasers* diodos quanto uma luz não-coerente, oriunda de fontes monocromáticas, podem alterar os processos biológicos. A monocromia, entretanto, parece vital para a laserterapia (BASFORD, 1995), pois a absorção no tecido é específica em relação ao comprimento de onda (FRANKS, 1999).

A dispersão do *laser* nos tecidos é muito complexa. Inúmeras estruturas como fibras colágenas, células e organelas celulares, vasos e outros componentes teciduais, assim como o tamanho, a forma e a orientação destas estruturas influenciam enormemente a dispersão do *laser* nos tecidos. A velocidade da radiação *laser* depende, portanto, do meio de propagação. Sendo assim, a caracterização verdadeira da radiação eletromagnética deve ser determinada por

sua freqüência, a qual é independente do meio de propagação (HILLENKAMP, 1989).

A biomodulação tecidual é uma das áreas de maior controvérsia no uso dos *lasers* na Odontologia, principalmente no que concerne à biomodulação óssea, embora muitos autores tenham encontrado resultados positivos e recomendem o seu uso. Dentre estes, citam-se algumas pesquisas realizadas *in vivo* (FREITAS; BARANAUSKAS; CRUZ-HÖFLING, 2000; DÖRTBUDAK; HAAS; MAILATH-POKORNY, 2002; GARAVELLO-FREITAS et al., 2003; PINHEIRO et al., 2003; BLAYA, 2005; GERBI et al., 2005; MERLI et al., 2005; SILVA; CAMILLI, 2006; WEBER et al., 2006) e também *in vitro* (KOLÁROVÁ; DITRICHOVÁ; WAGNER, 1999; DÖRTBUDAK et al., 2000; ALMEIDA-LOPES et al., 2001; KREISLER et al., 2002). Embora, Anneroth; Hall e Ryden (1988), In de Braekt et al. (1991), Gordjestani; Dermaut e Thierens (1994), Hall et al. (1994) e Kucerová et al. (2000), não tenham observado nenhum resultado positivo em suas pesquisas sobre a influência do *laser* na cicatrização de feridas cutâneas ou no reparo ósseo.

A enorme variação quanto aos parâmetros utilizados na LLLT em processos de cicatrização, tem dificultado uma interpretação adequada de seus efeitos, bem como a diversidade de modelos usados. Isso porque a escolha dos parâmetros para a definição dos protocolos para a utilização do *laser* é realizada segundo a experiência dos autores, uma vez que não existem parâmetros universalmente aceitos. Além disso, muitos pesquisadores que utilizam protocolos e unidades de *laser* similares têm relatado resultados conflitantes. Acredita-se que não há um determinado parâmetro que, por si só, produza os efeitos biomoduladores, mas a conjugação de diferentes parâmetros e suas variações de acordo com o modelo experimental (PINHEIRO; GERBI, 2006).

Nesta pesquisa, utilizou-se o *laser* diodo infravermelho de GaAlAs ($\lambda=830$ nm) pela propriedade de maior penetração tecidual, em especial nos tecidos subcutâneos. É sabido que, a penetração e a dispersão da luz (vermelha e infravermelha) na pele estão diretamente associadas ao comprimento de onda da

fonte emissora e as propriedades ópticas individuais das camadas da pele. Segundo Basford (1995) o *laser* de GaAlAs apresenta maior penetração tecidual ($\geq 2\text{mm}$) que o *laser* HeNe (luz vermelha), o qual trabalha com um comprimento de onda na faixa de $\lambda = 632,8\text{ nm}$ e tem um poder de penetração superficial de 0,5 a 1mm, antes de perder 37% de sua intensidade. Quanto às propriedades teciduais, observa-se que o *laser* infravermelho demonstra baixa absorção pela água ou cromóforos da pele, assegurando, desta forma, uma penetração mais profunda nos estratos teciduais (GORDJESTANI; DERMAUT; THIERENS, 1994; BASFORD, 1995; KOLÁROVÁ et al., 1999).

A importância de escolher um nível adequado de energia tem sido enfatizada por muitos autores, mas a energia recomendada para a obtenção de uma biomodulação ótima varia muito na literatura (HALL et al., 1994). Dados experimentais revelam que baixas doses ($10\text{-}10^3\text{ J/m}^2$) aplicadas em curtos períodos (10-100s) denotam efeitos biomoduladores positivos, os quais persistem por um longo intervalo de tempo (KARU, 1989).

Nos procedimentos de radiação executados nesta pesquisa, foi utilizada a dose efetiva de 6 J/cm^2 por sessão, segundo o protocolo clínico estabelecido pelo fabricante do aparelho Thera Lase[®] e uma dose total de tratamento de 24 J/cm^2 , 48 J/cm^2 e 66 J/cm^2 , conforme o subgrupo de cada animal. Pinheiro et al. (1997; 2003) e Khadra et al. (2005) recomendam, através da observação de experimentos clínicos, que a laserterapia de baixa intensidade visando a obtenção de efeitos terapêuticos e biomoduladores em tecidos moles e ósseos deverá ser estabelecida com densidades de energia variando entre 1,8 e $5,4\text{ J/cm}^2$ e com densidades de potência variando entre 5 e 90 mW. No entanto, Kreisler et al. (2002) observaram que doses variando de 2 a 8 J/cm^2 são capazes de biomodular efeitos positivos nas células radiadas.

A dose efetiva de 6 J/cm^2 adotada por este estudo é confirmada pelo trabalho de Merli et al. (2005), os quais utilizaram essa densidade de energia durante a radiação trans e pós-operatória, objetivando alcançar uma melhor cicatrização tecidual, promover uma melhor estimulação no perióstio, proporcionando um

estímulo na proliferação das células osteoblásticas e conseqüente diminuição na modulação da dor e inflamação.

As radiações foram realizadas de forma pontual e transcutânea, em um único ponto, o qual se localizava sobre o defeito ósseo confeccionado, a cada 48h, sendo a primeira sessão estabelecida ainda no trans-operatório, sem o reposicionamento das camadas musculares e da pele do animal. Estes procedimentos, de radiação no trans-operatório, foram embasados nos protocolos clínicos usados por Merli et al. (2005) e Weber et al. (2006).

A radiação a cada 48h após a confecção dos defeitos cirúrgicos objetivou aguardar a diminuição do processo inflamatório e o início do processo do reparo das feridas cirúrgicas, onde o *laser* parece ser mais efetivo, incrementando as mitoses celulares e criando condições para acelerar o reparo ósseo, como anteriormente descrito por Karu (1989), Silva Júnior (2000), Merli et al. (2005) e Weber et al. (2006).

Durante os primeiros estágios da reparação óssea, observa-se um maior predomínio pelos componentes celulares, fase proliferativa celular da cicatrização óssea, havendo maior propensão para incidência e completa absorção da luz *laser* (KARU, 1989; BASFORD, 1995; PINHEIRO; GERBI, 2006; SILVA; CAMILLI, 2006). Observa-se, também, que o estado fisiológico da célula no momento da radiação interfere diretamente na magnitude do efeito biomodulador da terapia *laser*. No entanto, os fatores anteriormente citados não ocorrem nos períodos mais avançados da cicatrização óssea (WEBER et al., 2006). O presente estudo confirmou, através da análise morfométrica, uma maior formação de trabeculado ósseo durante os primeiros 15 dias do experimento nos grupos submetidos à radiação *laser*. Este fenômeno explicita o motivo pelo qual a freqüência da aplicação da laserterapia, a cada 48 horas, é efetiva, quando aplicada durante a fase celular proliferativa, confirmando os estudos de Karu (1989), Pinheiro e Gerbi (2006) e Weber et al. (2006).

É sabido que os efeitos estimulantes da laserterapia sobre o tecido ósseo ocorrem durante a fase inicial da proliferação dos fibroblastos e dos osteoblastos,

como também, nas fases iniciais da diferenciação das células mesenquimais. A proliferação fibroblástica, com o aumento da sua atividade, tem sido demonstrada previamente em estudos *in vivo* e *in vitro*, submetidos à radiação com o *laser* de baixa potência. Acredita-se que o *laser* é o responsável pelo aumento da concentração das fibras colágenas observado no tecido ósseo submetido à radiação (DÖRTBUDAK; HASS; MAILATH-POKORNY, 2000; FREITAS; BARANAUSKAS; CRUZ-HÖFLING, 2000; ALMEIDA-LOPES et al., 2001; PINHEIRO et al., 2003; DO NASCIMENTO, 2004; PINHEIRO; GERBI, 2006).

Nesta pesquisa, a biomodulação do *laser* sobre o reparo ósseo em fêmures de ratos submetidos à LLLT, foi evidenciada, sobretudo pela estimulação na produção de fibras colágenas nos grupos radiados e do conseqüente avanço na maturação da matriz óssea orgânica destes animais. Analisando-se a distribuição das fibras colágenas nos grupos, controle e experimental, foi evidenciado que dentro dos níveis (ausente, moderado, alto, intenso) estudados, o grupo controle apresentou uma distribuição em todos os níveis, enquanto que, o grupo *laser* denotou ausência de padrões intensos de distribuição das fibras colágenas. Ao comparar o grau de distribuição das fibras colágenas segundo cada período de observação e entre os grupos estudados, observou-se que as fibras colágenas do grupo *laser* passaram a adquirir níveis de distribuição variando de ausente a moderado, com tendência a um menor nível de distribuição a partir dos 15 dias de observação, enquanto que, no grupo controle prevaleceram níveis de distribuição variando de ausente a intenso. A ausência de padrões intensos de fibras colágenas e o predomínio pela ausência destas revelaram a presença de uma matriz orgânica óssea em fase de maturação avançada no grupo *laser* e, conseqüentemente, padrões de osteogênese em estágios mais avançados. Pode-se também sugerir que a LLLT promoveu um auxílio cicatricial e reparacional no perióstio radiado, modulando-o para uma maior produção de fibras colágenas e aceleração do processo de maturação da matriz óssea orgânica.

Burkitt, Young e Health (1997) descreveram que, após a fase de maturação da matriz orgânica óssea, ocorrida após alguns dias do início do reparo ósseo, os cristais amorfos de fosfato de cálcio iniciam a colonização e a precipitação das lacunas anteriormente ocupadas pelas fibras colágenas. Este fenômeno também

justifica a maior fase de maturação da matriz orgânica óssea, com ausência de fibras colágenas, observada no grupo *laser*.

Embora as aplicações com *laser* nos estágios iniciais sejam mais efetivas na regeneração óssea, Saito e Shimizu (1997) ressaltaram que o tratamento com *laser* nos períodos posteriores pode ter um importante papel na manutenção da atividade da regeneração óssea. Considerando-se este argumento, o protocolo de radiação do presente estudo, além da radiação no transoperatório, no grupo experimental, incluiu a radiação no pós-operatório, a cada 48h, por um período que se estendeu até o dia anterior à morte prevista de cada subgrupo dos animais, de forma padronizada para todos os subgrupos experimentais ($\lambda=830$ nm, 50 mW, 6 J/cm²).

Acredita-se que a radiação LLLT é mais efetiva em áreas pobremente vascularizadas (BASFOR, 1995), submetidas a trauma e em tecidos com deficiência nutricional (KARU, 1989), e que, múltiplos tratamentos, com intervalos diários, são necessários para a máxima efetividade. Kolávorá et al. (1999) afirmaram que tecidos granulares denotam significativas e diferentes propriedades ópticas teciduais, sendo estas, as responsáveis pela maior penetração tecidual da luz *laser*, aproximadamente duas vezes, quando comparada à penetração em tecidos normais e de mesma espessura tecidual.

A literatura tem reportado que os efeitos biomoduladores do *laser* são doses dependentes (BASFOR, 1995; SAITO; SHIMIZU, 1997; PINHEIRO, 1997; FREITAS; BARANAUSKAS; CRUZ-HÖFLING, 2000; KAWASAKI; SHIMIZU, 2000; PINHEIRO et al., 2003; KHADRA et al., 2005; PINHEIRO; GERBI, 2006). Adicionalmente, o presente estudo, acrescenta que a frequência estipulada e o número de sessões direcionadas podem influenciar nos resultados finais a serem obtidos com a LLLT, concordando com os achados de Gerbi et al. (2005) e Pinheiro; Gerbi (2006).

Na presente pesquisa foi utilizado como modelo animal, ratos *Wistar* machos e adultos jovens para evitar interferências de fatores hormonais e assegurar uma melhor absorção da luz *laser* pelas condições metabólicas e fisiológicas acentuadas em roedores jovens.

Os ratos vêm sendo utilizados como modelo experimental por numerosos pesquisadores para avaliar a cicatrização óssea. Assim, a resposta cicatricial sob uma variedade de condições tem sido bem documentada. Os ossos longos dos ratos apresentam uma camada de osso cortical densamente mineralizada e bem formada, não sofrem remodelação interna e, conseqüentemente, adaptam-se ao estudo da cinética óssea. Estudos prévios têm relatado um ciclo de remodelação óssea alveolar de seis dias, para ratos, comparados aos 60 a 120 dias para adultos humanos. Além disso, a neoformação óssea em ratos tem sido observada após seis dias do tratamento cirúrgico (FRIESEN et al., 1999).

A escolha dos grupos, experimental e controle, com animais distintos para cada grupo e devidamente enquadrados nos subgrupos pertencentes, baseou-se na consideração de que a aplicação do *laser* em uma área bem definida pode ter tanto efeito local, quanto sistêmico.

A ocorrência de efeitos sistêmicos da terapia com *laser* de baixa potência tem sido relatada (ROCKHIND et al., 1989). Prováveis efeitos sistêmicos podem explicar a ausência de efeitos biomoduladores do *laser* em trabalhos experimentais, nas quais feridas radiadas e não radiadas foram estudadas no mesmo animal, com feridas contralaterais sendo usadas como controle para verificação dos efeitos do *laser* em feridas radiadas no mesmo animal. No entanto, em outros trabalhos onde os efeitos sistêmicos da LLLT foram bem monitorados, por meio de feridas controles em animais não radiados, houve a não constatação de efeitos biomoduladores do *laser* (DAVID et al, 1996; GORDJESTANI; DERMAUT; THIERENS, 1994; IN DE BRAEKT et al, 1991).

A remodelação óssea é um processo fisiológico dinâmico mais lento no osso do que nos tecidos moles. Seu curso natural compreende consecutivas fases, as quais diferem de acordo com o tipo e a intensidade do trauma, bem como da extensão do dano ao osso. Após o trauma, o osso é imediatamente preenchido por uma seqüência de processos reparativos, nos quais células osteogênicas periosteais iniciam a proliferação e a diferenciação em células osteoblásticas (PINHEIRO et al., 2001; PINHEIRO; GERBI, 2006).

A angiogênese é um dos fatores responsáveis para o reparo ósseo. A produção de fatores de crescimento e outros mediadores angiogênicos influenciam na diferenciação dos osteoblastos. A hipóxia provocada pela injúria tecidual conduz a regulação na produção de fatores de angiogênicos e seus receptores procuram restaurar o suprimento sanguíneo na loja cirúrgica. Os vasos sanguíneos são importantes para a formação e a manutenção do tecido ósseo. É observado que os *lasers* são mediadores responsáveis pelo estímulo e aumento dos níveis dos fatores de crescimento fibroblásticos e osteoblásticos, encontrados na cicatrização do tecido ósseo. Estes fatores de crescimento agem diretamente na proliferação, agrupamento e diferenciação das células, localizadas em todas as superfícies ósseas, aumentando os níveis de proliferação e estimulando a maturação e a secreção da matriz óssea (KATCHBURIAN; ARANA, 1999; PINHEIRO; GERBI, 2006). O presente estudo sugere que a aceleração do reparo ósseo pode ser resultado da LLLT na síntese da matriz óssea através de um incremento na vascularização e o desencadeamento precoce de uma resposta antiinflamatória.

Comparando-se a metodologia e os resultados desse estudo com algumas pesquisas apresentadas na literatura, observam-se relatos que carecem de sistematização reproduzível da metodologia empregada, visto que os resultados, descritivos quantitativos, são parciais à medida que se definem critérios subjetivos de avaliação. Takeda (1988) utilizou os critérios histopatológicos da cicatrização graduados como ausente, desprezível, moderado e proeminente; enquanto que, Bisht et al (1994) estabeleceram os critérios em ausentes, incompletos e completos e Blaya (2005) relatou-os como ausente, moderado, alto e intenso. Preconizou-se, nesta pesquisa, a utilização dos critérios estabelecidos por Blaya (2005) para a análise descritiva quantitativa.

Pelo caráter da subjetividade apresentado pela análise descritiva quantitativa, decidiu-se associar um critério objetivo de avaliação, através da mensuração quantitativa das áreas das trabéculas ósseas neoformadas, através da delimitação da área deste trabeculado, concordando com os estudos de Silva Júnior (2000), Merli et al. (2005) e Silva e Camilli (2006).

Os resultados obtidos pela análise descritiva quantitativa demonstraram que a neoformação óssea foi maior, porém sem associação estatística significativa, no grupo experimental quando comparada ao grupo controle, estando assim, de acordo com os estudos de Saito e Shimizu (1997), Freitas; Baranauskas e Cruz-Höfling (2000), Kawasaki e Shimizu (2000), Pinheiro et al. (2003), Blaya (2005), Gerbi et al. (2005), Merli et al. (2005), Silva e Camilli (2006) e Weber et al. (2006).

Analisando-se o grau de neoformação óssea nos grupos, controle e experimental, dessa pesquisa, foi constatada que dentro dos níveis (ausente, moderado, alto, intenso) estudados, o grupo controle apresentou níveis de formação óssea variando de moderado a alto, enquanto que, o grupo experimental evidenciou níveis altos e intensos de distribuição. Ao comparar o grau de neoformação óssea segundo cada período de observação e entre os grupos estudados, observou-se que apenas o grupo *laser* apresentou padrões intensos de neoformação óssea, com conseqüente, estímulo à osteogênese e biomodulação óssea positiva em relação ao grupo controle. Observou-se que o padrão de intensificação da neoformação óssea no grupo *laser* iniciou-se a partir dos primeiros sete dias, podendo sugerir o estímulo da LLLT sobre o perióstio radiado e, conseqüente estímulo à reparação óssea nos períodos iniciais do experimento, e prolongamento da neoformação óssea, porém com menor incidência, até os 21 dias do experimento, evidenciando desta forma, a ação do *laser* infravermelho no processo terapêutico de diferenciação celular em estágios iniciais. Estes resultados corroboram com os obtidos no estudo de Blaya (2005), o qual encontrou ausência de padrões intensos de neoformação óssea no grupo controle e padrões altos e intensos de neoformação óssea nos grupos submetidos à LLLT.

Do ponto de vista quantitativo, os resultados obtidos neste experimento demonstraram diferenças entre os grupos, experimental e controle, com maiores áreas de trabeculados ósseos nos grupos submetidos à radiação LLLT, contudo, sem associação estatística significativa, o que evidenciou a ação positiva do *laser* de baixa intensidade no processo de reparo ósseo. Estes resultados estão de acordo com os estudos de Saito e Shimizu (1997), Kawasaki e Shimizu (2000), Silva Júnior (2000), Merli et al. (2005) e Silva e Camilli (2006), os quais também encontraram

aumento da neoformação óssea frente à radiação com LLLT, utilizando *software* para análise das imagens e posterior estudo morfométrico.

Ao analisar quantitativamente as médias de trabeculado ósseo neoformado, segundo os períodos de observação, evidenciou-se que o modelo de estudo animal adotado apresentou maiores índices de formação óssea durante os primeiros 15 dias do experimento, com valores de neoformação óssea homogêneos quando comparados aos 07 e 15 dias do experimento e declínio nos níveis da osteogênese no período de transição dos 15 aos 21 dias. Garavello-Freitas et al. (2003), Pinheiro et al. (2003), Gerbi et al. (2005); Merli et al. (2005) e Silva e Camilli (2006) especificam que os primeiros 14 dias de pós-operatório coincidem com o início do declínio da atividade da fosfatase alcalina, a qual se revela como um marco importante na atividade de proliferação, diferenciação e maturação osteoblástica e com o nível mais superior de atividade da fosfatase ácida, a qual é um marco importante para a atividade osteoclástica, iniciando assim, os processos de reabsorção óssea. Assim, a presente pesquisa explicitou que a LLLT exerceu biomodulação óssea positiva com estimulação das células osteogênicas da região do defeito ósseo durante os primeiros 15 dias, tendo por consequência direta a proliferação, a diferenciação e a maturação celular osteoblástica. Ao analisar o período de 21 dias de experimento, observaram-se menores níveis de neoformação óssea quando comparados aos 07 e 15 dias do experimento, tendo, portanto, o grupo *laser* evidenciado maiores áreas de trabeculado ósseo quando comparado ao grupo controle. Esse declínio na neoformação óssea corrobora com os estudos de Pinheiro e Gerbi (2006); Silva e Camilli (2006) e Weber et al. (2006) quando afirmam que a LLLT não tem efeito em períodos tardios, posto que as células osteogênicas encontram-se em estágios avançados de diferenciação e a matriz óssea orgânica torna-se o principal componente do tecido em cicatrização. Salienta-se que, apesar das células osteogênicas encontrarem-se em estágios de diferenciação avançados, algumas destas células ainda foram capazes de absorverem a energia *laser*, porém em menor intensidade, fato este evidenciado pela maior área de trabéculas ósseas observadas no grupo *laser* no período 21 dias de observação.

Estudando o padrão de distribuição da neoformação óssea, pela análise descritiva quantitativa, segundo os grupos, períodos de observação e as

localizações de perióstio, endóstio, medula e as respectivas zonas de transição perióstio-medular e endóstio-medular, pôde-se observar que existiram diferenças, porém não estatisticamente significativas, exceto na zona de transição perióstio-medular, nos grupos controle e experimental.

Ao comparar, quantitativamente, a neoformação óssea segundo cada grupo estudado e as regiões de perióstio, medula e endóstio, a presente investigação observou que dentre os grupos submetidos à LLLT houve uma predominância da osteogênese na região de perióstio, com maiores áreas de trabeculado ósseo. As regiões de endóstio e medula apresentaram menores áreas de trabeculado ósseo nos grupos submetidos à LLLT.

A literatura revela, através do estudo dinâmico da osteogênese, que a superfície externa dos ossos compactos é revestida por uma camada de tecido fibroso condensado e altamente vascularizada, denominado por perióstio, o qual contém numerosas células osteoprogenitoras. Durante o crescimento ou o reparo ósseo, as células osteoprogenitoras diferenciam-se em osteoblastos, os quais são responsáveis pela deposição e pela maturação de lamelas concêntricas de osso cortical através do crescimento aposicional da matriz óssea orgânica. É considerado como o agente principal no reparo das fraturas ósseas (BURKITT; YOUNG; HEALTH, 1997).

Acredita-se, com a presente pesquisa, que os resultados de biomodulação positiva observados na região de perióstio nos grupos submetidos à LLLT devam ser uma consequência direta do mecanismo de interação da radiação *laser* sobre o processo de reparo ósseo em fêmures de ratos, corroborando, desta forma, com os estudos de Freitas, Baranauskas e Cruz-Höfling (2000) e Garavello-Freitas et al. (2003). Estima-se haver uma ativação dos osteoblastos para a produção da matriz óssea orgânica e, posteriormente, quando encontrada em estágios avançados de maturação, uma inibição do mecanismo fotobiológico, com subsequente diminuição da atividade osteoblástica e produção da matriz óssea. Assim, pode-se afirmar que a LLLT, no protocolo estabelecido, pôde ser um biomodulador positivo nas regiões de perióstio submetidas à radiação.

Ao serem observadas as áreas de trabeculado ósseo e os períodos de observação segundo a região de perióstio, evidenciaram-se médias de trabeculado ósseo maiores e estatisticamente significativas no grupo experimental, e em progressão proporcional ao período de observação. Este fato é justificado pelo processo dinâmico de remodelamento ósseo, com a neoformação e restabelecimento completo da cortical óssea alterada durante a confecção do defeito ósseo. Pode-se afirmar que, o aumento das trabéculas ósseas observado até os 21 dias do experimento corrobora com a literatura, conforme os estudos de Garavello-Freitas et al. (2003), Pinheiro et al. (2003); Gerbi et al. (2005); Merli et al. (2005) e Silva e Camilli (2006).

A LLLT atuou de forma estatisticamente significativa sobre a região de perióstio radiada, proporcionando um maior estímulo ao seu restabelecimento e, desta forma, promovendo maior estímulo à reparação óssea. Esse estímulo ao perióstio promovido pelo *laser* é fundamental para a prática da cirurgia e traumatologia bucomaxilofacial, posto ser esse o agente principal para o reparo ósseo, oferecendo nutrição e condições para a deposição e maturação de osso cortical.

Estudando quantitativamente a osteogênese na região medular, pôde-se revelar uma diminuição progressiva nas áreas de trabeculado ósseo neoformado com o decorrer dos períodos de observação e em ambos os grupos do presente estudo. Conforme afirmado por Weiner e Traub (1992), durante a cicatrização normal do tecido ósseo observa-se a ausência de remodelação interna nos ossos longos dos ratos, estando a neoformação óssea situada apenas na superfície periosteal, enquanto que, na cavidade medular há a remoção de trabéculas ósseas. Ressalta-se que ambos os grupos da presente investigação, seguiram o curso natural da cicatrização óssea, com tendência a remoção completa das trabéculas ósseas na região medular, estando estes resultados de acordo com os estudos de Weiner e Traub (1992).

Os grupos submetidos à LLLT não apresentaram o mecanismo de interação da radiação *laser* sobre o processo de reparo ósseo na região medular, com sugestiva ausência de penetração da luz *laser* nesta região e, posterior

biomodulação óssea positiva. Este fato pode ser considerado um fator de fundamental importância para a fisiologia tecidual, uma vez que a formação de tecido ósseo na região medular inviabiliza a formação das células hematopoiéticas, as quais ocorrem na medula óssea e nos períodos iniciais de maturação das células sanguíneas.

Avaliando quantitativamente a osteogênese na região do endóstio pôde-se observar a presença de menores áreas de trabeculado ósseo neoformado nos grupos submetidos à LLLT quando comparadas às do grupo controle. Burkitt, Young e Heath (1997) afirmam que o endóstio contém células osteogênicas, as quais são responsáveis pelo crescimento, remodelação óssea fisiológica e reparo ósseo em casos de fraturas. Esta investigação explicitou que, apesar de haverem células osteogênicas, com ampla capacidade proliferativa, a radiação *laser* não foi suficientemente eficaz em promover a estimulação com proliferação, diferenciação e maturação dos osteoblastos situados nesta região e, portanto, revelou possível ausência de penetração da luz *laser* e conseqüente biomodulação óssea positiva nos grupos submetidos à LLLT.

Weiner e Traub (1992) suscitaram que durante o processo fisiológico de osteogênese em ratos observa-se a formação de trabéculas ósseas em íntima associação com as fibras colágenas. Ao analisar o padrão de distribuição das fibras colágenas, segundo as localizações medular e endosteal, através da análise descritiva quantitativa, evidenciou-se a ausência destas fibras na região do endóstio em ambos os grupos. A região medular apresentou ampla incidência de fibras colágenas em progressão de acordo com os períodos de observação no grupo controle, uma vez que, no grupo *laser* observou-se padrões opostos de incidência das fibras colágenas, com diminuição progressiva de acordo com o prolongamento dos períodos de observação. A associação das fibras colágenas com a neoformação óssea analisada segundo as regiões de endóstio e medula justificaram os valores quantitativos de trabeculado ósseo expressados nestas regiões, concordando com o estudo de Weiner e Traub (1992) quanto à associação das fibras colágenas no processo de osteogênese.

O sentido preponderante da cicatrização óssea induzido pela confecção do defeito ósseo também foi estudado na presente investigação através da análise descritiva quantitativa. Ambos os grupos apresentaram distintos padrões na cicatrização óssea, tendo o grupo *laser* evidenciado o sentido periosteomedular primordial na formação das trabéculas ósseas, enquanto que, o grupo controle apresentou, predominantemente, o sentido endosteomedular. Quando observado o sentido da neoformação óssea segundo os períodos de observação pôde-se evidenciar que em todo o grupo submetido à LLLT o sentido periosteomedular foi mantido, exceto nos primeiros 07 dias do experimento; enquanto que, no grupo controle, aos 21 dias do experimento, observou-se o sentido periosteomedular predominante na neoformação óssea.

Pode-se justificar o predomínio da neoformação óssea no sentido periosteomedular nos grupos submetidos à LLLT através da interação positiva, com penetração e estimulação tecidual adequada da luz *laser* na região de perioste. Como consequência desta interação positiva, ressaltou-se a biomodulação óssea, com ativação, proliferação e diferenciação das células osteoblásticas situadas no perioste e subsequente formação de maiores trabéculas ósseas no sentido periosteomedular. Outro fator a ser considerado, foi a mudança do sentido da osteogênese ressaltada no grupo controle aos 21 dias do experimento, adquirindo o sentido periosteomedular como preponderante. Sabe-se que, pelo processo reparacional normal, a remodelação óssea tenderá a reparar o defeito ósseo confeccionado, com a consequente corticalização total da diáfise do fêmur do rato. Este fato justifica a predominância pelo sentido periosteomedular observada aos 21 dias do experimento.

O estudo do fechamento cortical, considerado parâmetro dinâmico da análise histológica, foi descrito por Saito e Shimizu (1997), no qual observaram maior aposição mineral em animais radiados com *laser* GaAlAs em comparação aos grupos controle, durante a disjunção palatina. Esse tipo de fechamento da cortical também foi avaliado no estudo de Blaya (2005), o qual avaliou o fechamento da cortical nos grupos controle e experimental, expostos à radiação com *laser* infravermelho e vermelho. Na presente pesquisa, utilizando o *laser* infravermelho, o enfoque esteve sobre a análise do tecido ósseo, pois tal técnica permitiu uma

análise quantitativa dos parâmetros de formação, reabsorção e estruturais, favorecendo a compreensão do processo de remodelação óssea normal e a modulada pela laserterapia. A padronização da lesão (profundidade, largura e local de perfuração) e da leitura histológica, permitiu que se avaliasse o processo de remodelação óssea entre a diáfise e a região da lesão. Os grupos submetidos à radiação LLLT apresentaram uma maior disposição de fechamento da cortical óssea quando comparada ao controle. Além de apresentarem graus de disposição de fechamento de cortical maiores, mostraram maiores incidências no fechamento total da cortical óssea, porém em menores espessuras que as diáfises adjacentes ao defeito ósseo.

Quando observado o grau de fechamento da cortical óssea, segundo os períodos de observação, pôde-se evidenciar que em todo o grupo submetido à LLLT houve maior tendência ao fechamento completo da cortical óssea, porém em espessura menor que a observada nas diáfises adjacentes ao defeito ósseo. Evidenciou-se o início da corticalização total a partir dos 15 dias de observação, enquanto que, no grupo controle a corticalização total só foi observada em um animal e no período de observação correspondente aos 21 dias. Estes fatores justificam que o grupo submetido à LLLT apresentou, segundo análise descritiva quantitativa, níveis de remodelação óssea mais avançados, corroborando, desta forma, com os estudos de Blaya (2005) e Gerbi et al. (2005).

A presença de infiltrado inflamatório neutrofílico também constituiu-se em parâmetro de avaliação descritiva quantitativa. O grupo controle exprimiu níveis moderados e em maior incidência de infiltrado inflamatório neutrofílico quando comparado ao grupo *laser*. Segundo os períodos de observação, ambos os grupos evidenciaram uma tendência à ausência de infiltrado inflamatório a partir dos 15 dias do experimento. Sabe-se que, o uso de técnicas terapêuticas pós-operatórias visam minimizar os sintomas inflamatórios produzidos por técnicas ou injúrias traumáticas aos tecidos, além de propiciar maior conforto ao paciente, contudo, sem supressão total da inflamação, a qual é considerada de extrema importância para a cicatrização das feridas. Assim, o grupo submetido à LLLT evidenciou atenuação no quadro de modulação do infiltrado inflamatório neutrofílico, através de uma produção precoce de resposta antiinflamatória e resolução da inflamação mais rapidamente do que no

grupo controle, como relatado previamente nos estudos de Franks (1999); Kucerová et al. (2000); Freitas et al. (2001); Do Nascimento (2004) e Gerbi et al. (2005).

Frente ao ineditismo desta pesquisa através do delineamento completo da fotoengenharia do processo de reparo ósseo através das análises descritiva quantitativa e morfométrica, em grupos distintos de roedores, tidos como modelo de estudo experimental, pode-se alicerçar que o grupo radiado com o *laser* GaAIs, no protocolo estabelecido, apresentou melhores resultados na biomodulação óssea e sem associação estatística significativa.

O uso potencial dos *lasers* na biomodulação do reparo ósseo através de suas propriedades fotoquímicas e fotobiológicas tem sido estudado por vários pesquisadores em todo o mundo, contudo, a literatura evidencia que o mecanismo regulador do reparo ósseo sob a influência da LLLT ainda permanece incerto. Detalhados e específicos estudos de imunohistoquímica e espectrorradiometria deverão solidificar os resultados obtidos no presente estudo, objetivando assim, o aprofundamento e a solidificação dos efeitos biomoduladores positivos da laserterapia no tecido ósseo.



Conclusões

7 CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia empregada e com os parâmetros de radiação utilizados, além dos resultados descritivos quantitativos e morfométricos obtidos nesta pesquisa, pode-se concluir que:

a) a terapia *laser* de baixa potência pode ser utilizada como coadjuvante no processo de reparo do tecido ósseo;

b) o uso da LLLT resulta em um efeito biomodulador positivo sobre o reparo ósseo, com maiores médias de trabéculas ósseas e sem associação estatística significativa. Ao ser analisada de forma descritiva quantitativa, evidenciam-se estágios de maior maturação da matriz óssea orgânica nos grupos submetidos à LLLT e, conseqüentemente, estágios mais avançados de osteogênese;

c) a LLLT atua de forma significativa sobre a região de perióstio radiada, proporcionando um maior estímulo ao seu restabelecimento; maior fechamento da cortical dos defeitos ósseos e em um padrão de cicatrização óssea preponderante no sentido perióstio-medular;

d) a LLLT é eficaz na produção de estímulos biomoduladores positivos na região de perióstio, com maiores graus de osteogênese. Ao passo que, nas regiões de medula óssea e endóstio a LLLT não é suficientemente eficaz na biomodulação óssea positiva, segundo mapeamento morfométrico.



Referências

REFERÊNCIAS²¹

- AL-WATBAN, F. A. H.;ZHANG,X. Y. The acceleration of wound healing is not attributed to laser skin transmission. **Laser Therapy**, v.11, n.1, p.6-10, 1999.
- ALMEIDA-LOPES, L. et al. Comparison of the low-level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. **Lasers Surg Med**, v.29, p.179-184, 2001.
- ALMEIDA-LOPES, L.; MASSINI, R. J. *Laseres e suas aplicações: manual do usuário*. DMC Equipamentos LTDA: São Carlos, 2002.
- ANDERS, J. J. et al. Low power laser irradiation alters the rate of regeneration of the rat facial nerve. **Lasers Surg Med**, v.13, p.72-82, 1993.
- ANNERTH, G.; HALL, G.; RYDEN, H. The effect of low-energy infra-red laser radiation on wound healing in rats. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 26, n. 1, p. 12-17, 1988.
- BARUSHKA, O. et al. Effect of Low energy laser (He-Ne) irradiation on the process of bone repair in the rat tibia. **Bone**, v. 16, p. 47-55, 1995.
- BASFORD, J. R. Low-energy laser therapy: controversies and new research findings. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v. 9, n.1, p. 1-5, 1989.
- BASFORD, J. R. Low intensity laser therapy: still not an established clinical tool. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v. 16, n. 4, p. 331-342, 1995.
- BELKIN, M.; ZATURUNSKI, B.; SCHWARTZ, M. A critical review of low energy laser bioeffects. **Lasers and Light in Ophthalmology**, v.2, p.63-71, 1988.
- BISHT,D. et al. Effect of low intensity laser radiation on healing of open skin wounds in rats. **Indian J Med Res.**, v.100, p. 43-46, july 1994.
- BLAYA, D. S. **Análise comparativa da ação laserterápica com dois comprimentos de onda sobre processo de reparo ósseo**. Dissertação (Mestrado). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. 108p. 2005.
- BOULTON, M.; MARSHALL, J. HeNe laser simulation of human fibroblast proliferation and attachment in vitro. **Lasers in Life Sciences**, v.1, p.125-134, 1986.
- BOYNTON, A. L.; WHITFIELD, J. F. The role of cyclic AMP in cell proliferation: a critical assessment of the evidence. In: GREENGARD, P.; ROBINSON, G. A. **Advances in cyclic nucleotide research**. Vol. 15. New York: Raven Press, 1983. p. 193-294.

²¹ De acordo com NBR6023: Informação e Documentação- Referências-Elaboração, de 2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas. Rio de Janeiro-RJ

BRAVERMAN, B. et al. Effect of helium-neon and infrared laser irradiation on wound healing in rabbits. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v. 9, n. 1, p. 50-58, 1989.

BRUGNERA JUNIOR, A.; PINHEIRO, A. L. B. **Lasers na Odontologia Moderna**. São Paulo: Pancast, 1998.

BRUGNERA JUNIOR, A. et al. **Atlas de laserterapia aplicada à clínica odontológica**. São Paulo: Santos, 2003.

BRUGNERA JUNIOR, A.; VILLA, R. G.; GENOVESE, W. J. **Laser na Odontologia**, Ed. Pancast, São Paulo, 1991.

BURKITT, H. G.; YOUNG, B.; HEATH, J. W. **Wheater's Functional Histology: A text and color atlas**. Hong Kong: Longman Group, 3 ed, 1997.

CAMPBELL, D. T.; STANLEY, J. C. **Delineamentos experimentais e quase experimentais de pesquisa**. São Paulo: Ed. Pedagógica e Universitária, 1979.

CATANZARO GUIMARÃES, S. A. **Patologia básica da cavidade bucal**. Ed. Guanabara, Rio de Janeiro, 1982, p.282-315.

CATÃO, M. H. C. V. Os benefícios do laser de baixa intensidade na clínica odontológica na estomatologia. **Revista Brasileira de Patologia Oral**, v.3, n.4, p.214-218, 2004.

CATÃO, M.H.C.V. et al. A laserterapia no tratamento da radiomucosite em paciente com carcinoma espinocelular no palato mole: relato de caso. **Laser Dental Show**, p.8-9, 2003.

DÖRTBUDAK, O.; HAAS, R.; MAILATH-POKORNY, G. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. **Clin. Oral Implants Res.**, v.11, p.540-554, 2000.

DÖRTBUDAK, O.; HAAS, R.; MAILATH-POKORNY, G. Effect of low-power laser irradiation on bony implants sites. **Clin. Oral Implants Res.**, v.13, n.3, p.288-292, 2002.

DO NASCIMENTO, P. M. et al. A preliminary report on the effect of laser therapy on the healing of cutaneous surgical wounds as a consequence of an inversely proportional relationship between wavelength and intensity: histological study in rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.22, n.6, p.513-518, 2004.

DUCY, P.; SCHINKE, T.; KARSENTY, G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. **Science**, v.289, n.5484, p.1501-1504, Sept. 2000.

EL SAYED, S.O.; DYSON, M. Comparison of the effect of multiwavelength light produced by a cluster of semiconductor diodes and of each individual diode on mast cell number and degranulation in intact and injured skin. **Laser in Surg. and Med.**, n.10, p.559-568, 1990.

FERNANDO, S.; HILL, C. M.; WALKER, R. A. Randomised double blind comparative study of low level laser therapy following surgical extraction of lower molar teeth. **British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, v. 31, p. 170-172, 1993.

FONNOF, N. R. **Reparação tecidual da mucosa bucal de ratos submetidos à frenectomia labial com luz laser CO₂ seguida ou não da aplicação de luz laser de As/Ga/Al: estudo aos microscópios de luz e eletrônico de varredura**, São Paulo: s.n; 2002.142 p. illus. (BR).

FRANKS, Y. Low level laser therapy in the management of chronic wounds. **Journal of Community Nursing**, v.13, n.4, April 1999.

FREITAS, A. C. et al. Assessment of anti-inflammatory effect of 830 nm laser light using C-Reactive protein levels. **Braz Dent J**, v.12, n.3, p.187-190. 2001.

FREITAS, I. G. F.; BARANAUSKAS, V.; CRUZ-HÖFLING, M. A. Laser effects on osteogenesis. **Applied Surface Science**, Amsterdam, v. 154/155, p. 548-554, Feb. 2000.

FRIESEN, L. R. et al. Laser irradiation of bone: II. Healing response following treatment by CO₂ and Nd:YAG Lasers. **J Periodontol**, v.70, p.75-83, 1999.

GARAVELLO-FREITAS, I. et al. Low-power irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.70, p.81-89, 2003.

GENOVESE, W. J. **Laser na Odontologia**. São Paulo: Pancast, 1992, 61p.

GERBI, M. E. et al. Assessment of bone repair associated with the use of organic bovine bone irradiated at 830 nm. **Photomed Laser Surg**, v.23, n.4, p.382-388, Aug. 2005.

GOLDIN, J.R. **Pesquisa em saúde: normas leis e diretrizes**. 2^a ed. Porto Alegre: HCPA, 1995. 85p.

GORDJESTANI, M.; DERMAUT, L.; THIERENS, H. Infrared laser and bone metabolism: a pilot study. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.23, p.54-56, 1994.

HALL, G. et al. Effect of low level energy laser irradiation on wound healing. An experimental study in rats. **Swed. Dent. J.**, Jonkoping, v.18, n.1-3, p. 29-34, 1994.

HALLMAN, H. O. et al. Does low-energy helium-neon laser irradiation alter "In Vitro" replication of human fibroblasts?. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.8, p.125-129, 1988.

HILL, P. A.; ORTH, M. Bone remodeling. **British J. Orthodontics**, v.25, n.2, p.101-107, May 1998.

HILLENKAMP, F. Laser radiation tissue interaction. **Health Physics**, Baltimore, v. 56, n. 5, p. 613-616. May 1989.

IN DE BRAEKT, M. M. H. et al. Effect of low level laser therapy on wound healing after palatal surgery in beagles dogs. **Laser in Surgery and Medicine**, v.11, p.462-470, 1991.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido Ósseo. In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 111-128, 1999.

KARU, T. Photobiology of low-power laser effects. **Health Physics Baltimorev.** 56, n.5, p.691-704, May 1989.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. Tecido Ósseo. In: KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e Embriologia Oral. Texto – Atlas - Correlações Clínicas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 21-38, 1999.

KAWASAKI, K.; SHIMIZU, N. Effects of low-energy laser irradiation on bone remodeling during experimental tooth movement in rats. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.26, p.282-291, 2000.

KERT, J.; ROSE, L. **Clinical laser therapy: low level laser therapy**. Copenhagen: Scandinavian Medical Laser Technology, 1989.

KHADRA, M. et al. Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.97, n.6, p.693-700, Jun. 2004.

KHADRA, M. et al. Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. **Biomaterials**, v.26, p. 3503-3509, 2005.

KOLÁVORA, H.; DITRICHOVÁ, D.; WAGNER, J. Penetration of the laser light into the skin in vitro. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.24, p. 231-235, 1999.

KREBS, M. A.; VEECH, R. L. Regulation of the redox state of the pyridine nucleotides in rat liver. In: SUND, H. **Pyridine nucleotide-dependent dehydrogenases**. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 1970. p. 413-434.

KREISLER, M. et al. Low level 809nm diode laser induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.30, p. 365-369, 2002.

KUCEROVÁ, H. et al. Low level laser therapy after molar extraction. **J Clinical Laser Medicine & Surgery**, v.18, n.6, 2000.

LAAKSO, E. L. Plasma ACTH and β -endorphina levels in response to low level laser therapy (LLLT) for myofascial trigger points. **Laser Therapy**, v.6, p.133-142, 1994.

LERNER, U. H. Osteoclast formation and resorption. **Matrix Biology**, v.19, p.107-120, May 2000.

LERNER, U. H. et al. Cystatin C. an inhibitor of bone resorption produced by osteoblasts. **Acta Physiol. Scand**, v.161, p.81-92, 1997.

LIMEIRA JÚNIOR, F. A. **Avaliação do reparo ósseo com o uso de osso anorgânico e membrana reabsorvível após radiação com laser diodo 830nm**. Tese (Doutorado). Universidade Federal da Bahia. 177p. 2001.

LONGO, L. et al. Effect of diodes-laser silver arsenide-aluminium (Ga-Al-As) 904 nm on healing of experimental wounds. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.7, p. 444-447, 1987.

LOPES, L. A. **Análise in vitro da proliferação celular de fibroblastos de gengiva humana tratados com laser de baixa potência**. Dissertação (Mestrado em Ciências, Pós-Graduação em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba. 131p. 1999.

LOW, J.; REED, A. **Eletroterapia explicada princípios e pratica**. São Paulo: Manole, 2001. p.389-409.

LUGER, E. J. et al. Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v. 22, n. 2, p. 97-102, 1998.

LYONS, R. F. et al. Biostimulation of wound healing in vivo by a helium-neon laser. **Ann Plast Surg**, v.18, p.47-50, 1987.

MAILLET, H. **Princípios e técnicas de aplicação**. São Paulo: Manole. 1987. p.45-52.

MAINAN, T. H. Stimulated optical radiation in ruby. **Nature** 1996. p.187:493.

MELO, C. A. S. et al. Characterization of light penetration in rat tissues. **Journal of Clinical Laser and Medicine & Surgery**, v.18, n.4, p. 175-79, 2001.

MENDEZ, M. T. V. et al. Dose and wavelength of laser light have influence on the repair of cutaneous wounds. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v.22, n.1, p.--, 2004.

MERLI, L. A. et al. Effect of low-intensity laser irradiation on the process of bone repair. **Photomed Laser Surg**, v.23, n.2, p.212-215, Apr. 2005.

MESTER, E. et al. Effect of laser rays on wound healing. **The American Journal of Surgery**, v.122, p.532-535, 1971.

MESTER, E. et al. Stimulation of wound healing by means of laser rays. **Acta Chirurgica Academiae Scientiarum Hungaricae**, v.14, n.4, p.347-356, 1973.

MEYERS, A. Lasers and Wound Healing. **Arch Otolaryngol Head Neck Surgery**, 116, 1128. 1990.

NICOLLI FILHO, W. D. et al. Efeitos da radiação laser do tipo hélio-neônio verde (550nm) no processo de reparo em feridas de extração dental: estudo histológico em ratos. **Rev.Odont.UNESP**, v.2, n.22, p.213-221, 1993.

OHSHIRO, T.; FUJINO, T. Laser applications in plastic and reconstructive surgery. **Keio J. Med.**, v.42, n.4, 1993.

PASSARELA, S. et al. Increase of proton electro-chemical potencial and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. **FEBS Lett.**, v.175, p.95-99, 1984.

PINHEIRO, A. L. B.; FRAME, J. W. Laser em Odontologia: seu uso atual e perspectivas futuras. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v.40, n.5, p.327-332, set./out. 1992.

PINHEIRO, A. L. B.; GERBI, M. E. Photoengineering of bone repair processes. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.21, n.2, p.169-178, 2006.

PINHEIRO, A. L. B. et al. Low-level laser therapy in the management of the maxillofacial region. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, Larchmont, v.16, n.4, p.223-226, Aug.1998.

PINHEIRO, A. L. B. et al. Biomodulatory effects of LLLT on bone regeneration. **Laser Therapy**, v.13, p.73-79, 2001.

PINHEIRO, A. L. B. et al. Effect of 830-nm laser light on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone and descalcified cortical osseus membrane. **J Clin Laser Med Surg**, v.21, n.5, p.301-306, Oct 2003.

POSPISILOVÁ, J. Healing of wounds. **Acta Chir Plast**, v.24, p.293-303, 1982.

PÖNTINEN, P. J. **Low level laser therapy as a medical treatment modality**. Tampere: Art Urpo, 1992.

RIBEIRO, M. S. Workshop: Utilização clínica do laser. **FDCTO-USP**, p.25-27, 1999.

RIGAU I MAS, J. Bioenergia e Propriedades ópticas dos Tecidos. In: BRUGNERA JÚNIOR, A.; PINHEIRO, A. L. B. (Org.). **Laseres na Odontologia Moderna**. São Paulo: Pancast, 1998. p.65-78.

ROCHKIND, S. et al. Systemic effects of low-power laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds, and burns. **Lasers in Surgery and Medicine**, n.9, p.174-182, 1989.

ROSS, M. H.; ROMRELL, L. J. **Histologia, Texto e Atlas**. São Paulo: Panamericana, 1993, p.141-179.

- SAITO, S.; SHIMIZU, N. Stimulatory effects of low-laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in rat. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, St. Louis, v.111, n.5, p.525-532, May 1997.
- SALO, J. et al. Removal of osteoclast bone resorption products by transcytosis. **Science**, v.276, p.270-273, 1997.
- SCHENK, R. K. Regeneração óssea bases biológicas. In: BUSER, D.; DAHLIN, C.; SCHENK, R. K. **Regeneração óssea Guiada na Implantodontia**. São Paulo: Quintessence Books, 1996.
- SCHINDL, A. et al. Low-intensity laser therapy: a review. **J Investig Med.**, v.48, n.5, p.312-326, 2000.
- SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 205, April 1986.
- SEAL, B. L.; OTERO, T. C.; PANITCH, A. A polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. **Materials Science Engineering R.**, v.34, n.4-5, p.147-230, Oct. 2001.
- SILVA, R. V.; CAMILLI, J. A. Repair of bone defects treated with autogenous bone graft and low-power laser. **J Craniofac. Surg**, v.17, n.2, p.297-301, 2006.
- SILVA JÚNIOR, A. N. **Avaliação do efeito do laser diodo (GaAlAs) infravermelho de 830nm na biomodulação da cicatrização óssea**. Dissertação (Mestrado). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. 116p. 2000.
- SILVA JÚNIOR, A. N. et al. Computerized morphometric assessment of effect of low-level laser therapy on bone repair: an experimental animal study. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, v.20, n.2, p.83-87, Apr. 2002.
- SWAMINATHAN, R. Biochemical markers of bone turnover. **Clin. Chim. Acta**, v.313, n.1-2, p.95-105, Nov. 2001.
- TAKEDA, Y. Irradiation effect of low-energy laser on alveolar bone after tooth extraction: experimental study in rats. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.17, n.6, p.388-391, 1988.
- TEN CATE, A. R. **Histologia Bucal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994, p. 95-111.
- TIPHLOVA, O. A.; KARU, T. I. Action of low-intensity laser light on transient metabolic processes in cell. **Proc. USSR acad. Sci. (Biophysics)**, v.2955, p.1002-1005, 1987.
- TRELLES, M. A.; MAYAYO, E. Bone fracture consolidates faster with low-power laser. **Laser in surgery and Medicine**. v. 7, p. 36-45, 1987.

VAES, G. Cellular biology and biochemical mechanism of bone resorption. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 231, p.239-271, 1988.

VEÇOSO, M. C. **Laser em fisioterapia**. São Paulo: Lovise, 1993, p.25-54.

VIEIRA, S. **Metodologia científica para a área de saúde**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003. 192p.

WALSH, L. J. The use of lasers in implantology: an overview. **J. Oral Implantol.**, v.18, n.4, p.335-340, 1992.

WALSH, L. J. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 2. Hard Tissue applications. **Australian Dental Journal**, Sydney, v.42, n.5, p.302-306, Aug. 1997.

WEBER, J. B. B. et al. Laser therapy improves healing of bone defects submitted to autologous bone graft. **Photomed Laser Surg**, v. 24, n.1, p.38-44, Feb. 2006.

WEINER, S.; TRAUB, W. Bone structure: from angstroms to microns. **J Faseb**, v.6, p.879-885, Feb. 1992.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. London: Prentice-Hall, 1999. 870p.

ZEZELL, D. M. et al. Effect of low-intensity polarized visible laser radiation on skin burns: a light microscopy study. **J Clin Laser Med Surg**, v.22, n.1, p.59-66, Feb 2004.



Apêndices

APÊNDICE A – Cálculo da Dosimetria Utilizada

Para o cálculo da dosimetria aplicou-se a fórmula padrão:

$$DE = \frac{P (W) \times t (s)}{A (cm^2)}$$

onde, (DE) é a densidade de energia a ser calculada ou dosimetria, (P) é a potência, (t) é o tempo de aplicação e (A) representa a área a ser utilizada.

A dosimetria do estudo seguiu as recomendações para a biomodulação óssea do fabricante do aparelho de 120 J/cm² por sessão. No entanto, uma vez que a área da fibra óptica corresponde a aproximadamente 20 vezes menos que a área de 1 cm² (ALMEIDA-LOPES; MASSINI, 2002), têm-se que:

$$\frac{\text{ENERGIA NOMINAL}}{\text{ÁREA NOMINAL}} = \frac{\text{ENERGIA REAL (ER)}}{\text{ÁREA REAL (AR)}}$$

Assim, a dosimetria efetivamente aplicada por animal em cada sessão foi de:

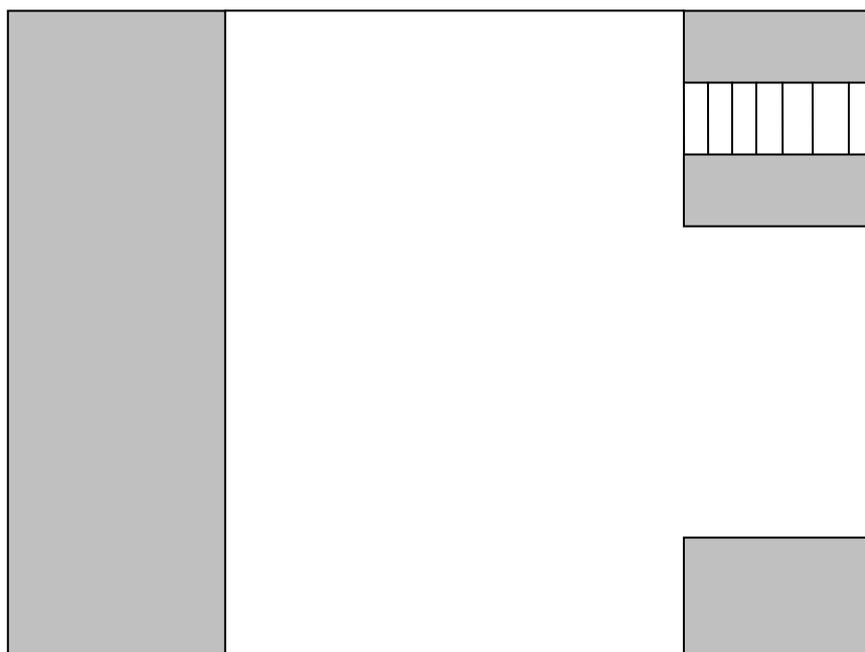
$$\frac{120 \text{ J}}{1 \text{ cm}^2} = \frac{ER}{1:20} \quad ER = 6 \text{ J/cm}^2$$

Resultando em um total diário de energia aplicada de 6 J/cm². Desta forma, a energia total aplicada ao final do experimento foi de 24 J/cm², 48 J/cm² e 66 J/cm², nos respectivos grupos experimentais com 07, 15 e 21 dias de observação, respectivamente.

APÊNDICE B – Ficha de avaliação microscópica descritiva quantitativa

Lâmina nº: _____

FOTOENGENHARIA DO PROCESSO DE REPARO ÓSSEO INDUZIDO PELA LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA (GaAIAs): ESTUDO EM FÊMURES DE RATOS



1. Distribuição das Fibras Colágenas:
 Ausente Moderada Alta Intensa
2. Localização das Fibras Colágenas: Sentido
 Periosteal Endosteal Medular P-M E-M
3. Grau de Neoformação Óssea:
 Ausente Moderada Alta Intensa
4. Neoformação Óssea – Sentido
 Periosteal Endosteal Medular P-M E-M
5. Fechamento da Cortical Óssea:
 Ausente Parcial Total (<Esp diáfise) Total (≥Esp. diáfise)
6. Infiltrado Inflamatório – Neutrófilos
 Ausente Moderada Alta Intensa

ANEXO A – Protocolo da Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS.



*Comissão Científica e de Ética
Faculdade da Odontologia da PUCRS*

Porto Alegre 11 de julho de 2005

O Projeto de: Dissertação

Protocolado sob nº: 0054/05

Intitulado: Avaliação histológica da osteogênese após a laserterapia (GAALAS) de defeitos ósseos em ratos da linhagem wistar

do(a) aluno(a): Karis Barbosa Guimarães

Programa de: Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial

do curso de: Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial

Nível: Mestrado

Orientado pelo(a): Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 08 de julho de 2005.


Profa. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira
Presidente da Comissão Científica e de Ética da
Faculdade de Odontologia da PUCRS

ANEXO B- Protocolo do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS.



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP - PUCRS



Ofício nº 015/2006-CEP

Porto Alegre, 03 janeiro de 2006.

Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa intitulado: "Avaliação histológica da osteogênese após a laserterapia (GaAIs) de defeitos ósseas em ratos da linguagem Wistar".

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Caio Coelho Marques
COORDENADOR EM EXERCÍCIO

Ilmo(a) Sr(a)
Mest Karis Barbosa Guimarães
N/Universidade

ANEXO C – Normas para prática didático-científica da vivissecção de animais²²

Art. 1º Fica permitida, em todo o território nacional, a vivissecção de animais, nos termos da lei.

Art. 2º Os biotérios e os centros de experiências e demonstrações com animais vivos deverão ser registrados em órgão competente e por ele autorizados a funcionar.

Art. 3º A vivissecção não será permitida:

- I – sem o emprego da anestesia;
- II – em centros de pesquisa e estudos não registrados em órgão competente;
- III – sem supervisão de técnico especializado;
- IV - com animais que não tenham permanecido mais de 15 dias em biotério legalmente autorizados;
- V – em estabelecimento de ensino de 1º e 2º graus e em quaisquer locais freqüentados por menores de idade.

Art. 4º O animal só poderá ser submetido às intervenções recomendadas nos protocolos das experiências que constituem a pesquisa ou os programas de aprendizagem cirúrgica, quando, durante ou após a vivissecção, receber cuidados especiais.

Parágrafo 1 – Quando houver indicação, o animal poderá ser sacrificado sob estrita obediência às prescrições científicas.

²² BRASIL. Lei 6638 de 08 de maio de 1979, que estabelece normas para a prática didático-científica da vivissecção de animais e determina outras providências.

Parágrafo 2 – caso não sejam sacrificados, os animais utilizados em experiências ou demonstrações somente poderão sair do biotério 30 (trinta) dias após a intervenção, desde que destinados a pessoas ou entidades idôneas que por eles queiram responsabilizar-se.

Art. 5º Os infratores da lei estarão sujeitos:

- I – às penalidades cominadas no artigo 64, caput, do Decreto-lei 3.688 de 03/10/1941, no caso de ser a primeira infração;
- II – à interdição e cancelamento do registro do biotério ou do centro de pesquisas, no caso de reincidência.

Art. 6º O poder Executivo, no prazo de 90 (noventa) dias, regulamentará a presente Lei, especificando:

- I – o órgão competente para o registro e a expedição de autorização dos biotérios e centros de experiências e demonstrações com animais vivos;
- II – as condições gerais exigíveis para o registro e o funcionamento dos biotérios;
- III – órgão e autoridades competentes para fiscalização dos biotérios em centros mencionados no inciso I.

Art. 7º Esta Lei entra em vigor na data da sua publicação.

Art. 8º Revogam-se as disposições em contrário.

ANEXO D - Declaração de permissão de utilização da FEPPS para o experimento.



FEPPS
Fundação Estadual de Produção
e Pesquisa em Saúde

Centro de Desenvolvimento
Científico e Tecnológico – CDCT

Coordenação de Produção e Experimentação Animal



Estado do Rio Grande do Sul

AUTORIZAÇÃO

A COORDENAÇÃO DE PRODUÇÃO E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CPEA), da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, informa que a pesquisadora **Karis Barbosa Guimarães** solicitou nosso apoio para a realização de sua pesquisa intitulada **Avaliação Histológica da Osteogênese após a Laserterapia (GaIAs) de defeitos óssea em ratos** que, uma vez aprovada pelo Comitê de Ética de sua instituição, poderá ser desenvolvida em nossas instalações.

Porto Alegre, 29 de abril de 2005.

Luisa Maria Gomes de Macedo Braga
Chefe da CPEA

Luisa Macedo Braga
Médica Veterinária
CRMV-1-2393 Matr.: 12178233

ANEXO E – Laudo da intensidade do aparelho Thera Lase® realizado pelo departamento de física da PUCRS



LABORATÓRIO DE IRRADIAÇÃO E RADIOMETRIA
GRUPO DE FÍSICA DAS RADIAÇÕES – GFR
NÚCLEO DE PESQUISA EM INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO COM A MATÉRIA
CENTRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM FÍSICA - PUCRS

1/3

Relatório Espectrorradiométrico

Nº 0006IEI/05 - GFR

Data 13/09/05

MEDIDA DE IRRADIÂNCIA ESPECTRAL E IRRADIÂNCIA

1. REQUERENTE

Razão Social/Nome: Faculdade de Odontologia da PUCRS – Marília Gerhardt de Oliveira
Endereço: Av. Ipiranga, 6681 – Prédio 6
Cep: 90619-900
Cidade: Porto Alegre – RS
Telefone: 3320-3538

2. DESCRIÇÃO DOS ITENS ENSAIADOS [1]

A tabela 2.1 identifica as duas fontes lasers ensaiadas do seguinte equipamento:

- **Marca:** DMC.
- **Modelo:** Thera Laser.
- **Tensão:** 127 V.
- **Número de série:** TLSR0391.

2.1 Tabela de Identificação:

| Código | Tipo | Potência | Obs. |
|-----------------|-----------------|----------|------|
| 0006IEI/05 – 01 | Fonte Laser Vis | 35 mW | --- |
| 0006IEI/05 – 02 | Fonte Laser IR | 100 mW | --- |

[1] Informações fornecidas pelo requerente.

3. INSTRUMENTO DE MEDIDA

- Espectrorradiômetro: Detecção espectral entre 250-1100 nm em intervalos de 1 nm, com largura de banda não excedendo a 2,5 nm.
- Certificado de Calibração nº 506074717 de 07/06/05.

4. MÉTODO DE MEDIDA

Método realizado de acordo com o Procedimento Técnico Interno de Medida de Irradiância Espectral Difusa.

- Distância fonte - detector: $(2,5 \pm 0,1)$ cm.
- Intervalos de medida: 400 - 800 nm e 750 - 1100 nm.

Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 96A / 104
CEP 90619-900 - Porto Alegre - RS - Brasil
Home-page: www.pucrs.br/gfr E-mail: gfr@pucrs.br

sed
Fone: (51) 3320-3682
Fax: (51) 3320-3616
CNPJ 88630413/0002-81



Relatório Espectrorradiométrico

Nº 0006IEI/05 - GFR

Continuação

Data 13/09/05

5. RESULTADO DAS MEDIDAS ^[2]

Tabela com Valores da Irradiância Difusa e Espectros das fontes identificadas pelo código da Tabela 2.1.

5.1 Tabela de Irradiância Difusa e Comprimento de Onda:

| Código | Comprimento de Onda | Irradiância Difusa |
|-----------------|---------------------|------------------------|
| 0006IEI/05 – 01 | 683 nm | 2,87 Wm ⁻² |
| 0006IEI/05 – 02 | 829 nm | 13,22 Wm ⁻² |

5.2 Anexo I: Espectros da Irradiância Espectral Difusa x Comprimento de Onda, para as fontes de radiação identificada pelo código da Tabela 2.1.

[2] Observações:

- Incerteza das medidas: 251-400 nm : ± 4.0 %; 400-900nm: ± 3.3 %; 900-1000: ± 5.1%; 1000-1100: ± 8.0%.
- Para as medidas de irradiância de barreiras (filtros, óculos, tecidos, entre outros) será acrescida ao código da fonte empregada a seguinte identificação: letra A para a primeira barreira, letra B para segunda e assim, sucessivamente.
- Esse relatório espectrorradiométrico é válido exclusivamente para as amostras identificadas na Tabela 2.1, não sendo extensivo a quaisquer lotes, mesmo que similares.
- O relatório espectrorradiométrico não deve ser reproduzido sem prévia autorização.

Esclarecimento:

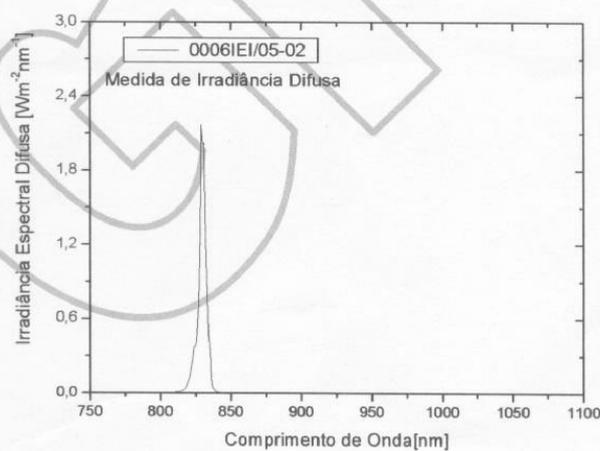
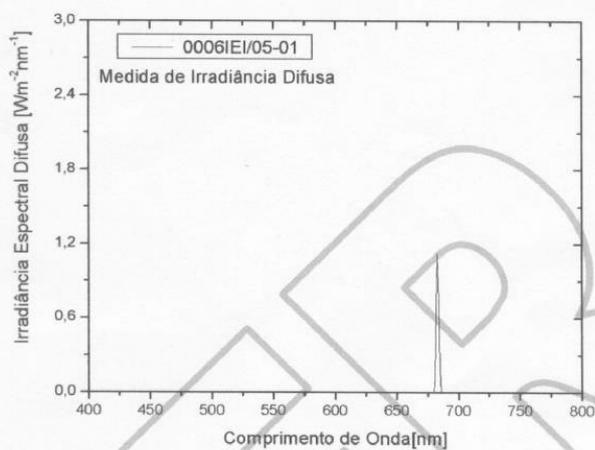
O presente Relatório Espectrorradiométrico nº 0006IEI/05 – GFR está inserido na rede de convênio-cooperação desse Laboratório com o solicitante desse serviço. Como consequência toda divulgação dessas medidas deverá ser acompanhada com a descrição: “Resultados concedidos pelo Grupo de Física das Radiações (GFR-PUCRS)”.

Porto Alegre, 13 de setembro de 2005.

Dra. M. R. Rizzatti
Coordenadora do GFR-PUCRS



ANEXO I (3/3)



ANEXO F – Coloração com Hematoxilina – Eosina (H.E.)

1. Lavar em água corrente.
2. Imergir na hematoxilina por 5 minutos.
3. Mergulhar rapidamente no diferenciador (álcool 70° + HCl) 2 ou 3 vezes.
4. Imergir em água por 1 minuto (quanto maior o tempo, mais intenso é o azul).
5. Imergir na eosina por 10 a 15 segundos.
6. Lavar rapidamente em água destilada.
7. Imergir em álcool 70° por 1 minuto.
8. Imergir em álcool 95° por 1 minuto, 2 vezes.
9. Imergir no álcool absoluto por 1 minuto, 2 vezes.
10. Lavar rapidamente em xilol.
11. Imergir em xilol (pode ser mantido no xilol até a montagem).

ANEXO G – Coloração de Picrosirius

Solução de Sirius Red

Água destilada.....100 ml

Ácido pícrico saturado

Sirius Red0,1g

Preparo da solução

Adicionar ácido pícrico à água destilada até saturar. Em seguida, acrescentar 0,1g do *Sirius Red* sob agitação.

Solução de Light Green

Light Green.....0,1g

Água destilada.....100 ml

Técnica de Coloração

1. Desparafinizar
2. Hidratar os cortes:
 - a) Álcool Absoluto.
 - b) Álcool 80%.
 - c) Álcool 70%.
 - d) Água destilada.
3. Corar em solução de *Sirius Red* por 30 minutos
4. Contra-corar em solução de *Light green* por 05 minutos.
5. Lavar rapidamente em água corrente.
6. Desidratar
7. Clarificar
8. Montar no bálsamo do Canadá.

Resultados: fibras colágenas em vermelho.

Fundo: esverdeado.