

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

ANDRÉ LUIZ MARINHO FALCÃO GONDIM

**EFEITO DA LASERTERAPIA NA BIOMODULAÇÃO DA OSTEOGÊNESE EM
DEFEITOS CRÍTICOS CONFECCIONADOS EM CALOTA CRANIANA DE RATOS**

**PORTO ALEGRE
2007**

ANDRÉ LUIZ MARINHO FALCÃO GONDIM

**EFEITO DA LASERTERAPIA NA BIOMODULAÇÃO DA OSTEOGÊNESE EM
DEFEITOS CRÍTICOS CONFECCIONADOS EM CALOTA CRANIANA DE RATOS**

Dissertação (Mestrado) apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de Mestre em Odontologia, na área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial pela Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli

PORTO ALEGRE

2007

ANDRÉ LUIZ MARINHO FALCÃO GONDIM

**EFEITO DA LASERTERAPIA NA BIOMODULAÇÃO DA OSTEOGÊNESE EM
DEFEITOS CRÍTICOS CONFECCIONADOS EM CALOTA CRANIANA DE RATOS**

Dissertação (Mestrado) apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de Mestre em Odontologia, na área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial pela Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA

Porto Alegre, de de 2007.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli

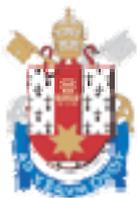


DEDICATÓRIA

A **Deus**, meu maior amigo, inseparável, a quem, infelizmente, recorro muito mais nos momentos difíceis do que nos alegres. Agradeço por tudo o que fizestes e fazes por mim, pelas oportunidades e pelas dificuldades, tornando a minha vida feliz.

Aos meus pais, **João Gondim e Fátima Gondim**, por dedicarem a integralidade de suas vidas, única e exclusivamente, ao bem estar de seus filhos. Por tudo o que representam de bom na minha vida. Tudo o que um dia eu possa fazer, nunca terá a grandeza do amor a mim dedicado. São o meu maior orgulho, os meus maiores ídolos, os meus dois maiores exemplos na vida.

À minha irmã, **Roberta** pela amizade, pela generosidade, pelo enorme coração. Minha amiga e IRMÃ para toda a vida. Espero um dia poder ajudar alguém da maneira como me ajudas.



AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Às minhas avós, **Hilda Gondim e Maria Guedes**, pelo exemplo de fé e educação na família, são as matrizes de amor que cercam a minha família, amo vocês.

À **Maria Clara Piloto**, pelo amor a mim dispensado, fonte de equilíbrio que contei durante vários momentos, sua alegria de viver e o sorriso no rosto me fazem encarar a vida com mais tranquilidade. Agradeço por ter entrado em minha vida e trazendo contigo uma família maravilhosa, amo você.

Aos meus familiares, tios, tias, primos e primas pelo apoio nessa caminhada, por confiarem em mim e no meu trabalho.

Aos meus primos, **Léo, Tone, e Wladimir**, a grandeza da nossa é amizade e prova de que o “Amor” existe, só escrevendo outra dissertação para explicar o que somos um para o outro, **meus irmãos**.

Aos meus amigos **Giuliano Luchi e Henrique Telles**, foi Deus que colocou vocês em meu caminho, companheiros de toda hora, seja alegre ou triste. Agradeço a vocês a família que formamos, posso dizer que são meus irmãos, pessoas que posso confiar minha vida pessoal e profissional. Agradeço as experiências profissionais à mim confiadas, foram pilares importantíssimos na minha formação profissional, muito obrigado.

Às amigas e colegas de trabalho, **Luciana, Marcele e Sílvia**, pelo carinho que transmitem, muito obrigado pela compreensão e apoio que me deram, sei que estão felizes com esta minha conquista.

Ao orientador, Prof. Dr. **Rogério Miranda Pagnoncelli**, pela tranquilidade com que orienta. Agradeço os erros e acertos que tive perante o Sr. me fizeram amadurecer como pessoa e crescer como profissional.

Aos meus colegas de mestrado, **Angelo Freddo, Carlos Martins, Daniel Gaziri, Gisela Grandi, Gleisse Wantovski e Simone Rodrigo**, companheiros de 2 anos, com quem muito aprendi, pela grande amizade, pelo respeito mútuo e pela oportunidade de conviver com pessoas de muito valor. Que Deus ilumine vocês.

Ao meu amigo **Wagner Ranier Maciel Dantas**, por sempre me apontar o melhor caminho a ser trilhado em busca dos meus objetivos profissionais, você é uma pessoa iluminada por Deus, nunca vou esquecer o que fez por mim.

À **Prof. Dra. Nilza Pereira da Costa**, embora redunde os agradecimentos de outros alunos, em relação à forma exemplar de conduzir a pós-graduação, à competência profissional, à maneira ímpar de aplicar a ciência na sua profissão e ao exemplo que representas aos alunos da pós-graduação, eu agradeço, de forma muito especial, a amizade, a atenção dispensada para ouvir problemas e discutir soluções. Juntamente com os demais professores, faz dessa escola, não apenas escola de ciência, mas acima disso, uma escola de vida.

Ao **Prof. Dr. Alfredo Júlio Fernandes Neto**, pela forma exemplar com que conduz a docência, és exemplo de professor, és horizonte de muitos alunos e tens um caráter inestimável. Por onde passas não deixas apenas ensinamentos científicos, mas ensinamentos de vida.

À Profa. Dra. **Daniela Silva**, pela ajuda na confecção deste trabalho, suas colocações sempre bem vindas enriqueceram esta pesquisa. Agradeço a forma como trata seus alunos e pela confiança em mim depositada na execução de procedimentos cirúrgicos.

Aos **Profesores Claiton Heitz, Rogério Belle, Manoel Santana, Marília Gerardt, Gilson Beltrão, Roberto e Rafael Loro**, pela seriedade, pela competência e pela dedicação com que conduzem o serviço de cirurgia da PUCRS, sendo para nós, alunos, exemplos profissionais.

Às professoras Dras. **Maria Martha Campos** e **Fernanda Bueno Morrone**, pela oportunidade de executar o trabalho experimental. Agradeço a disponibilidade de atender pedidos até em fins de semana para aplicações de laser. Muito obrigado pela compreensão, respeito e dedicação que tiveram no decorrer deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À **Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS**, representada pelo Magnífico Reitor, **Prof. Dr. Joaquim Clotet**, ao qual expresso meu respeito.

À **Faculdade de Odontologia da PUCRS**, representada pelo seu excelentíssimo Diretor, **Prof. Marcos Túlio**, por capacitarem a realização do Curso de Pós-Graduação em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial – CTBMF.

À **Universidade Federal de Uberlândia**, através do **Hospital de Clínicas de Uberlândia**, onde fiz minha especialização, pela estrutura capaz de proporcionar a formação profissional e ser Instituição de referência para várias áreas do conhecimento.

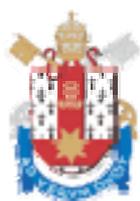
À **Universidade Potiguar**, através da **Faculdade de Odontologia**, pela minha formação como Cirurgião-Dentista.

Aos professores, **Denise Cantareli Machado, Elaine Bauer Veck, João Feliz, Marta Sisson e Betina Steren dos Santos**.

Aos funcionários do **Hospital São Lucas da PUCRS**.

Aos funcionários da **Faculdade de Odontologia da PUCRS**, em especial à funcionária **Vanessa M. S. Stamatto**, pela confecção das lâminas.

Aos **Pacientes**, por confiarem em nosso serviço e nos proporcionar uma excelente formação.



ΕΠΪΓΡΑΦΕ

Que Deus não permita que eu perca o ROMANTISMO, mesmo eu sabendo que as rosas não falam.

Que eu não perca o OTIMISMO, mesmo sabendo que o futuro que nos espera não é assim tão alegre

Que eu não perca a VONTADE DE VIVER, mesmo sabendo que a vida é, em muitos momentos, dolorosa...

Que eu não perca a vontade de TER GRANDES AMIGOS, mesmo sabendo que, com as voltas do mundo, eles acabam indo embora de nossas vidas

Que eu não perca a vontade de AJUDAR AS PESSOAS, mesmo sabendo que muitas delas são incapazes de ver, reconhecer e retribuir esta ajuda.

Que eu não perca o EQUILÍBRIO, mesmo sabendo que inúmeras forças querem que eu caia

Que eu não perca a VONTADE DE AMAR, mesmo sabendo que a pessoa que eu mais amo, pode não sentir o mesmo sentimento por mim...

Que eu não perca a LUZ e o BRILHO NO OLHAR, mesmo sabendo que muitas coisas que verei no mundo, escurecerão meus olhos...

Que eu não perca a GARRA, mesmo sabendo que a derrota e a perda são dois adversários extremamente perigosos.

Que eu não perca a RAZÃO, mesmo sabendo que as tentações da vida são inúmeras e deliciosas.

Que eu não perca o SENTIMENTO DE JUSTIÇA, mesmo sabendo que o prejudicado possa ser eu.

Que eu não perca o meu FORTE ABRAÇO, mesmo sabendo que um dia meus braços estarão fracos...

Que eu não perca a BELEZA E A ALEGRIA DE VER, mesmo sabendo que muitas lágrimas brotarão dos meus olhos e escorrerão por minha alma...

Que eu não perca o AMOR POR MINHA FAMÍLIA, mesmo sabendo que ela muitas vezes me exigiria esforços incríveis para manter a sua harmonia.

Que eu não perca a vontade de DOAR ESTE ENORME AMOR que existe em meu coração, mesmo sabendo que muitas vezes ele será submetido e até rejeitado. Que eu não perca a vontade de SER GRANDE, mesmo sabendo que o mundo é pequeno...

E acima de tudo

Que eu jamais me esqueça que Deus me ama infinitamente, que um pequeno grão de alegria e esperança dentro de cada um é capaz de mudar e transformar qualquer coisa, pois... A VIDA É CONSTRUÍDA NOS SONHOS E CONCRETIZADA NO AMOR!

Amorosamente,

Francisco Cândido Xavier



RESUMO

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo avaliar, por meio de análise histológica e morfométrica, a biomodulação do processo de osteogênese em defeitos críticos confeccionados em calotas craninas de ratos, submetidos à radiação com *laser* diodo infravermelho (GaAIs). Foram utilizados 40 ratos machos da linhagem *Wistar*, com peso entre 300 a 500 gramas, distribuídos aleatoriamente em dois grupos, o controle (GC-I e II) e o experimental (GT-I e II), e quatro subgrupos de acordo com o período de observação dos animais. Para os grupos controle e experimental destinaram-se 20 animais, igualmente distribuídos. Os subgrupos experimentais receberam a terapia *laser* de baixa potência (LLLT), em um defeito ósseo crítico de 4mm confeccionado no osso parietal direito do animal. No grupo GC-I e II todo o protocolo cirúrgico foi realizado, porém sem a aplicação do *laser*. No grupo GT-I e II foi utilizado o *laser* infravermelho ($\lambda = 830 \text{ nm}$, 2 J/cm^2 , 90mW , 27 s), de forma pontual e contínua. O protocolo de radiação foi estabelecido com intervalos de 48 horas, iniciando-se imediatamente após a sutura do procedimento cirúrgico e seguindo-se até o sexto dia de pós-operatório. Os animais foram mortos aos 07 e 21 dias após o procedimento cirúrgico. Para análise histológica, executou-se o processamento de rotina para a técnica de HE. As lâminas foram estudadas segundo análise descritiva e morfométrica. O fenômeno tecidual avaliado, na análise descritiva, incluiu a neoformação óssea. Para a análise morfométrica determinaram-se as médias das áreas de trabeculado ósseo neoformado em relação a área total do defeito. Os resultados obtidos demonstraram que, segundo a análise morfométrica, a biomodulação óssea positiva evidenciada nos grupos GT-I e II apresentou maior área de trabeculado ósseo quando comparada aos grupos não submetidos à LLLT. Os resultados permitiram sugerir que a laserterapia de baixa potência no protocolo estabelecido atua como biomoduladora óssea, estimulando a osteogênese, 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 presented study aims at evaluating, through histological and morphometrical analysis, the biomodulation of the process of osteogenesis in critical defects made in skull bones of rats, submitted to infrared laser diode therapy (GaAlAs). There were used 40 rats, weight between 300 and 500 grams, distributed randomly in two groups, the control (GC-I and II) and the experimental (GT-I and II) and 4 subgroups according to the period of observation of the animals. For the control and experimental group, there were destined 20 animals, equally distributed. The subgroups received a low-level laser therapy (LLLT) in a critical-size bone defect of 4mm made in the right parietal bone. In the group GC-I and II all the surgical procedures were made, but without using laser. In the group GT-I and II was used infrared laser ($\lambda = 830 \text{ nm}$, 2 J/cm^2 , 90 mW , 27 s) in a punctual and steady way. The protocol for radiation was established within breaks of 48 hours, beginning right after the suture of the surgical procedure and following it until six days after the surgery. The animals were sacrificed at 07 and 21 days after the surgery. For histological analysis, it was used the common technique of HE. The plates were studied according to descriptive and morphometric analysis. The tissues evaluated, in the descriptive analysis, included a new formation of bone. For morphometrical analysis, there were determined the average areas of new forming trabeculated bones related to the total area of the defect. The obtained results show that, according to a morphometric analysis, the positive biomodulation in bone of the groups GT-I and II presented a bigger area of trabeculated bone when compared to groups which did not received LLLT. The results allow to suggest that low-level laser therapy acts like biomodulation in bone, stimulating the osteogenesis, being able to be used in the process of bone repairing.

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

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



LISTA FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

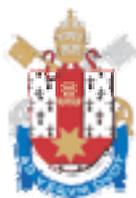
Figura 1	(A) tricotomia, (B) infiltração de lidocaína 2% com norepinefrina 1:50 000	72
Figura 2	(A) incisão cutânea, (B) incisão periosteal	73
Figura 3	(A) descolamento dermo-periosteal, (B) confecção da cavidade cirúrgica	73
Figura 4	Modelo esquemático para confecção dos cortes histológicos	75
Figura 5	Peça operatória obtida do osso parietal direito, cortada no centro da ferida cirúrgica, no sentido longitudinal	76
Figura 6	Procedimento de histomorfometria utilizando o programa image pro-plus	78
Figura 7	Defeito experimental com 07 dias de observação	83
Figura 8	Defeito controle com 07 dias de observação	84
Figura 9	Defeito experimental com 21 dias de observação	85
Figura 10	Defeito controle com 21 dias de observação	86



LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Resultados da Comparação entre os grupos Controle e Teste para cada tempo	88
Gráfico 2	Resultados da Comparação entre os tempos 7 e 21 dias para cada grupo	90



LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resultados descritivos (média, desvio-padrão, mediana) para os valores do resultado em porcentagem de todos os grupos, de acordo com os períodos de observação, considerando um intervalo de confiança (IC) de 95%	87
Tabela 2	Resultados da Comparação entre os grupos Controle e Teste para cada tempo	88
Tabela 3	Resultados da Comparação entre os tempos 07 e 21 dias para cada grupo	89



LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcento
°C	Graus Celsius
ANOVA	Análise de Variância
ArF	Fluoreto de argônio
ATP	Trifosfato adenosina
BD	Borda do defeito
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
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Densidade de potência
E	Energia
Er:YAG	Érbio, ítrio, alumínio, granada
f	Freqüência
FDA	Food and Drug Administration (Administração de drogas e alimentos)
Ga	Gálio
GaAlAs	Arseneto de gálio e alumínio
GaAs	Arseneto de gálio
h	Hora
HE	Hematoxilina-eosina
HeNe	Hélio-neônio
HLLT	<i>High level laser therapy</i> (Terapia laser de alta potência)
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
L	Lacuna
LEA	Limite de Emissão Acessível
LLLT	<i>Low level laser therapy</i> (Terapia <i>laser</i> de baixa potência)
m	Metro
m/s	Minutos por segundo
mg	Miligrama
min	Minutos
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mm	Micrômetro
mW	Miliwatts
n.º	Número
Nd:YAG	Neodímio, ítrio, alumínio, granada
nm	Nanômetro
Ø	Diâmetro da secção transversal da fibra óptica
O ₂	Oxigênio
ON	Oso Neoformado
p	Probabilidade de erro
P	Potência
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
RNA	Ácido ribonucléico
s	Segundo
TC	Tecido conjuntivo
TM	Tecido medular
TO	Trabéculas ósseas
W/cm ²	Watts por centímetro quadrado

XeCl	Cloreto de xenônio
YAG	Ítrio-alumínio-granada
λ	Comprimento de onda



SUMÁRIO

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	30
2 REVISTA DA LITERATURA	35
2.1 TECIDO ÓSSEO	35
2.2 REPARO ÓSSEO	38
2.3 <i>LASER</i>	40
2.4 LASERTERAPIA	45
2.5 LASERTERAPIA NO PROCESSO DE REPARO ÓSSEO	53
3 PROPOSIÇÃO	65
3.1 OBJETIVO GERAL	65
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	65
4 METODOLOGIA	67
4.1 RESPALDO ÉTICO DA PESQUISA	67
4.2 CARACTERIZAÇÃO	67
4.3 PARADIGMA	67
4.4 VARIÁVEIS	68
4.4.1 Variável independente	68
4.4.2 Variáveis dependentes	68
4.5 PROBLEMA	68
4.6 HIPÓTESE	68
4.7 CONFIGURAÇÃO DA AMOSTRA	69
4.8 ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS	69
4.9 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO / EXCLUSÃO	70
4.10 TÉCNICA CIRÚRGICA	71
4.11 RADIAÇÃO COM O <i>LLL</i> T	73
4.12 PREPARO DAS AMOSTRAS	74
4.13 ANÁLISE HISTOLÓGICA	76
4.14 PROCEDIMENTO DE CAPTURA DE IMAGENS E ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	77
4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA	79

5 RESULTADOS	82
5.1 RESULTADOS DESCRITIVOS DO EXAME MICROSCÓPICO	82
5.2 GRUPO TESTE-I (GT-I – 07 DIAS)	82
5.3 GRUPO CONTROLE-I (GC-I – 07 DIAS)	83
5.4 GRUPO TESTE-II (GT-II – 21 DIAS)	84
5.4.1 Laser	84
5.5 GRUPO CONTROLE-II (GC-II – 21 DIAS)	85
5.6 RESULTADOS DESCRITIVOS PARA OS VALORES DO RESULTADO EM PORCENTAGEM DE TODOS OS GRUPOS	86
5.7 COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS COM SEUS RESPECTIVOS TEMPOS DISTINTOS	87
5.8 COMPARAÇÃO ENTRE OS TEMPOS DISTINTOS COM SEUS RESPECTIVOS GRUPOS	89
6 DISCUSSÃO	92
7 CONCLUSÕES	98
REFERÊNCIAS	100
APÊNDICE A – QUADROS DE COLETA DE DADOS	110
ANEXO A – LEI N.º 6.638 , DE 08 DE MAIO DE 1979	112
ANEXO B – PRINCÍPIOS ÉTICOS NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	114
ANEXO C – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL	116
ANEXO D – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA E PESQUISA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL	117



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, 1989). Constitui uma forma de radiação não-ionizante, altamente concentrada, que, em contato com os diferentes tecidos, resulta em efeitos fototérmicos, fotoquímicos e não lineares. É considerada por muitos autores como a mais significativa descoberta do século passado por envolver infinitas perspectivas nas áreas de pesquisas biológicas e ciências médicas (BRUGNERA JÚNIOR, 2003).

Essa terapia tem ação biomoduladora terapêutica importante no processo de reparo tecidual e é empregada amplamente nas diversas áreas da saúde, sendo a Odontologia uma das ciências que mais faz uso dessa tecnologia.

O *laser* de baixa potência é utilizado em tratamentos médicos e odontológicos visando a sua ação terapêutica sobre os diferentes tecidos biológicos. Estudos experimentais, *in vitro* e *in vivo*, com severos e bem controlados parâmetros metodológicos, sugerem que a terapia *laser* de baixa potência (LLLT – *Low Level Laser Therapy*) modula vários processos biológicos em modelos animais após exposição 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; DITRICHOVÁ; WAGNER, 1999); do estímulo na síntese do colágeno, com formação das fibras pro-colágenas tipo I e tipo III (PINHEIRO; GERBI, 2006) e do aumento da síntese de ATP (adenosina trifosfato) (KARU, 1989).

A LLLT de baixa intensidade está bem indicada como coadjuvante no processo reparacional tecidual através de seus efeitos terapêuticos gerais (BRUGNERA JUNIOR. et al., 2003). Proporciona ao paciente submetido a uma

intervenção cirúrgica uma maior rapidez na cicatrização tecidual, reparando os tecidos moles, ósseo e nervoso; reduzindo o edema e o desconforto no pós-operatório (TRELLES; MAYAYO, 1987), além de interferir na modulação e na 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 arquitetônica 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).

Os procedimentos cirúrgicos no osso, como remoções de cistos, enucleações de lesões tumorais, tratamento de processos inflamatórios crônicos, exodontias, bem como os traumatismos ósseos, levam à perda da estrutura calcificada, promovendo um afastamento das bordas dos tecidos traumatizados, osteotomizados e ostectomizados, induzindo a uma cicatrização por segunda intenção, considerada o reparo mais complexo para o organismo (PETERSON et al., 2003; ROBERTS; GARETTO, 2000). 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 conduzem vários pesquisadores ao desenvolvimento de novas tecnologias que visem auxiliar a reparação do tecido ósseo ou acelerar o processo de cicatrização óssea.

A terapia a *laser* vem sendo promovida, desde o final dos anos 60 do século passado, como um tratamento novo, seguro e efetivo para várias condições neurológicas, musculoesqueléticas e de tecidos moles (BASFOR, 1989). O uso potencial dos *lasers* na biomodulação do reparo ósseo através de suas propriedades fotoquímicas e fotobiológicas é estudado por pesquisadores em todo o mundo como método de estimulação da osteogênese e redutor do tempo da reconsolidação óssea (SILVA, CAMILLI, 2006).

O efeito fotobioestimulatório da terapia com *laser* de baixa potência (laserterapia) tem sido comprovado pela literatura. Em pesquisas de laboratório, a laserterapia utilizando *laser* de He-Ne exerce um efeito pronunciado na proliferação, diferenciação e calcificação da cultura de células osteoblásticas; contudo, há uma janela terapêutica específica para esse efeito. A proliferação de células e síntese de DNA é aumentada pela laserterapia somente quando as células estão na fase de crescimento ativo. Além disso, a laserterapia causa aumento do acúmulo de cálcio e acelera a calcificação *in vitro* (DÖRTBUDAK; HAAS; MAILATH-POKORNY, 2000; GUZZARDELLA; FINI; TORRICELLI. 2002; HAMAJIMA et al., 2003; KHADRA et al., 2005; OZAWA, 1998; UEDA; SHIMIZU, 2001, 2003). O paralelo *in vivo* também foi comprovado: a laserterapia aplicada nas fases iniciais do processo de reparo em defeitos ósseos causou um aumento da deposição óssea e aceleração da regeneração óssea (BARUSHKA et al., 1995; CORSAIR 1997; DÖRTBUDAK; HAAS; MAILATH-POKORNY, 2002; GARAVELLO-FREITAS et al., 2003; MERLI et al. 2005). A bioestimulação causada pelo *laser* também foi comprovada experimentalmente na otimização do processo de reparo de enxertos (PINHEIRO et al. 2003; GERBI et al. 2005; WEBER et al. 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 do processo de reparo ósseo, com descrição histológica e

quantitativa do padrão e das regiões anatômicas de cicatrização tecidual, ainda são deficientes.

Com base nestes pressupostos, a presente pesquisa teve por objetivo avaliar a ação biomoduladora do LLLT, na osteogênese de defeitos ósseos críticos confeccionados em calota craniana de ratos, por meio de análise histomorfométrica.



REVISTA DE LITERATURA

2 REVISTA DA LITERATURA

2.1 TECIDO ÓSSEO

O osso é uma estrutura que possuiu várias funções específicas, sendo considerado o maior reservatório de cálcio do corpo. Sua composição é aproximadamente distribuída em 8% de água e 92% de material sólido, sendo este último dividido em aproximadamente 21% de material orgânico e 71% de material inorgânico. O material orgânico, ou matriz, é responsável pela estrutura de suporte para deposição dos sais inorgânicos, sendo constituído de colágeno (90%), com o restante de proteoglicanas. O principal sal inorgânico constituinte do osso são os cristais de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). O colágeno presente no osso é do tipo I, similar ao encontrado na pele e nos tendões, mas pode ser observada, também, a presença do colágeno tipo II (cartilagem), nos estágios tardios de união óssea das cicatrizações dos ossos fraturados de origem endocondral, através do calo ósseo. Entretanto, se o osso fraturado for fixado de forma compressiva, haverá uma formação mínima do calo ósseo, predominando o colágeno tipo I. Durante o processo de formação e remodelação do osso, são encontrados três tipos de células ósseas: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

Os eventos de cicatrização no tecido ósseo possuem uma fase inflamatória, uma fibroblástica e uma remodeladora. Diferente do que ocorre nos tecidos moles, no tecido ósseo, osteoblastos e osteoclastos irão agir na reconstrução e remodelação do tecido lesado. As células osteogênicas (osteoblastos), com grande importância na cicatrização, são derivadas do periósteo, endósteo e células mesenquimais indiferenciadas circulantes. Os osteoclastos agem reabsorvendo osso necrótico e aquele que necessita de remodelação, induzindo os osteoblastos a depositarem osteóide que, quando mantido imóvel durante o processo de cicatrização, torna-se uma estrutura calcificada por deposição de mineral. Quando um osso é fraturado e suas extremidades livres afastam-se por mais de um milímetro, ele cicatriza por segunda intenção, ou seja, durante a fase fibroblástica,

deve haver uma grande deposição de colágeno destinado a preencher o espaço formado. Os fibroblastos e os osteoclastos produzem uma grande quantidade de matriz fibrosa cicatricial, que se estende além das extremidades livres do osso, formando o calo ósseo (PETERSON et al., 2003).

FRAME (1980 apud SCHMITZ; HOLLINGER, 1986) relatou que, em todo estudo experimental, deve ser determinado o defeito de tamanho crítico (CSD – Critical Size Defect). O CSD é definido como o menor defeito intra-ósseo que não cicatrizará durante a vida do animal. Dessa forma, quando se objetiva a cicatrização óssea completa, deve-se optar por dimensões menores ao CSD determinado, caso contrário haverá formação de tecido fibroso ao invés de tecido ósseo.

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).

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

- a) 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 (BURKITT; YOUNG; HEALTH, 1997; ROSS; ROMRELL, 1993; SILVA JÚNIOR, 2000);
- b) osteócitos: células localizadas em cavidades ou lacunas dentro de trabéculas ósseas formadas. Essas 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 (BURKITT; YOUNG; HEALTH, 1997; ROSS; ROMRELL, 1993; SILVA JÚNIOR, 2000);

- c) 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 perióstio contém, sobretudo, fibras colágenas e fibroblastos. Alguns feixes de fibras colágenas do perióstio, denominadas fibras de Sharpey, penetram no tecido ósseo prendendo firmemente o perióstio ao osso (BURKITT; YOUNG; HEALTH, 1997).

Na sua porção mais profunda, o perióstio 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 endóstio 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).

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).

2.2 REPARO ÓSSEO

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, 1989).

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 periósteo 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 que 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; 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 desse 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 disporem 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. Esses 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 a 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.

2.3 LASER

Ao *laser* de baixa potência é atribuído efeito analgésico, antiinflamatório e estimulante do processo de cicatrização, sendo o estudo das interações entre a luz *laser* e a matéria viva marcadamente complexos. A energia depositada nos tecidos sobre fenômenos de absorção, reflexão, difusão e transmissão (PANARELLO, 2003).

O uso dos *lasers* na biomodulação do processo inflamatório e reparo ósseo através de suas propriedades fotoquímicas e fotobiológicas tem sido estudado por pesquisadores do mundo inteiro com o objetivo de proporcionar ao paciente submetido à cirurgia uma maior rapidez na cicatrização óssea, menor desconforto pós-operatório, menor quadro de edema pós-cirúrgico e melhor cicatrização tecidual (TAKEDA, 1988).

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. Essa 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, quando eles 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 Beneditente (1982), com um aparelho *laser* diodo de Arseneto de Gálio (GaAs $\lambda=904$ nm) (NICCOLI FILHO et al., 1993).

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 (BRUGNERA JUNIOR; PINHEIRO, 1998; BRUGNERA JÚNIOR et al., 2003; MAILLET, 1997; LOW; RED, 2001; 1987; MAINAN, 1996).

Conforme Brugnera Júnior 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.

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 et al., 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 (BASFOR, 1995; PINHEIRO et al., 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 (BASFOR, 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 semicondutor 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 fotoreativa 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 (BRUGNERA JÚNIOR, 2003; KARU, 1989; VEÇOSO, 1993).

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, 1989; 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 JÚNIOR, 2003; CATÃO, 2004).

2.4 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, a redução da inflamação e a diminuição da dor. O aumento na produção de fibroblastos e colágeno, o aumento da circulação sangüínea 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 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 et al., 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).

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 nelas (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 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 ($10-10^3 \text{ J/cm}^2$) 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 (EL SAYED; DYSON, 1990), como também o efeito modulador na síntese protéica, na revascularização, na proliferação e na diferenciação celular (BASFORD, 1989, 1995; ROCHKIND et al., 1989; 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, 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, pode ser explicado 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 secção 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 a 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 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 esses *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 à 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 (BASFOR, 1995).

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 em nível mitocondrial. Utilizando o *laser* de HeNe (.= 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.

Bisht et al. (1994) avaliaram o efeito do *laser* de HeNe (.-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 12º dia, não foram encontradas diferenças significativas entre os dois grupos. Este fato também foi observado nos estudos de Longo et al. (1987), os quais utilizaram um protocolo de radiação com o *laser* diodo GaAlAs (.=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 (.=904 nm; 1 mW; 500 Hz). O *laser* foi utilizado perpendicularmente a uma distância de 2 mm. Os animais foram

sacrificados 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 foi radiado 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 GaAlAs ($\lambda=830$ 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 (1999) 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; GaAlAs, $\lambda=780$ nm e GaAlAs, $\lambda=830$ 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 qual o 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 quantidade de biomodulação do *laser*. Assim, concluíram que a aceleração na cura das feridas pode não estar atribuída à transmissão na pele.

2.5 LASERTERAPIA NO PROCESSO DE REPARO ÓSSEO

Barushka et al. (1995) investigaram o efeito do *laser* de (He-Ne) no reparo ósseo de defeitos criados na tíbia de rato, empregando métodos bioquímicos e histomorfométricos quantitativos. A atividade da fosfatase alcalina (ALP) foi máxima em 6 dias após a criação do defeito, sendo reduzida no 12º dia. A cinética total da atividade da fosfatase ácida resistente ao tartrato (TRAP) coincidiu com aquela da ALP, mas com pico aos 12 dias após a cirurgia. O cálcio acumulou progressivamente no local da lesão, com pico aos 11 dias e subsequente declínio. A avaliação histológica revelou afinamento do canal intramedular com osso jovem no local da lesão 6 dias após a cirurgia e progressiva diminuição do defeito ósseo cortical por ossificação membranosa. A irradiação direta no defeito ósseo com *laser* He-Ne no 5º e 6º dia após a cirurgia alterou a população de células osteoblásticas e osteoclásticas, como demonstrado pelo aumento significativo de 2,2 pontos na atividade da ALP em relação aos ratos controle (não irradiados com 10 dias após a cirurgia) e uma diminuição significativa de 40% na atividade da TRAP em 11 dias. A análise histomorfométrica revelou um acúmulo mais rápido de novo osso reparativo no local do defeito, nos ratos irradiados com *laser*. O volume fracionado (percentual total do volume da zona do defeito) do novo osso compacto reparativo foi de $27 \pm 9\%$, $88 \pm 9\%$, e $94 \pm 6\%$ em 10, 13 e 15 dias após o defeito, respectivamente, nos ratos tratados com *laser*. Os valores respectivos do controle foram $9 \pm 7\%$, $44 \pm 9\%$, e $58 \pm 5\%$ para o mesmo intervalo de tempo. A fração de volume do trabeculado ósseo no defeito diminuiu mais rapidamente com o tempo nas tíbias tratadas com *laser* do que no controle. Foi sugerido que a irradiação *laser* He-Ne com tempo, energia e frequência adequados após o defeito, provavelmente, afeta a população local de osteoblastos e osteoclastos, como demonstrado pela alteração na atividade do ALP e TRAP. Ademais, a análise histomorfométrica revelou um reparo ósseo mais acentuado em dois pontos distintos da tíbia em relação às demais regiões naqueles animais submetidos à laserterapia.

Saito e Shimizu (1997) avaliaram os efeitos da irradiação com *laser* de baixa potência na regeneração óssea durante expansão de sutura palatina média em ratos. A irradiação com *laser* diodo Galium-alumínio-arsênio 100 mW foi aplicada na sutura palatina média durante expansão, por 7 dias (3 a 10 minutos por dia), 3 dias (7 minutos por dia por dia 0-2 ou 4-6) e 1 dia (21 minutos ininterruptos no dia 0). A

regeneração óssea na sutura média palatina foi estimada pelo método histomorfométrico. Após 7 dias, o grupo irradiado mostrou aceleração significativa de 1,2 a 1,4 pontos, em comparação aos ratos não irradiados. A irradiação durante os períodos iniciais da expansão (dias 0 a 2) foi mais efetiva; entretanto, em nenhum dos períodos tardios (4 a 6 dias) a irradiação teve efeito na regeneração óssea. Esses resultados sugerem que a irradiação *laser* de baixa potência pode acelerar a regeneração óssea na sutura palatina mediana durante a expansão rápida do palato e que esse efeito é dependente não somente na dose de irradiação *laser* total, mas também do tempo e da frequência da irradiação. Esses dados sugerem que a terapia *laser* pode ter benefício terapêutico na inibição de recidiva e redução do período de retenção pela aceleração da regeneração óssea na sutura palatina mediana.

Ozawa et al. (1998) investigaram os efeitos da irradiação *laser* de baixa energia em vários estágios da proliferação celular, formação de nódulos ósseos, atividade da fosfatase alcalina e expressão gênica da osteocalcina, usando células em cultura obtidas da calvária de ratos. Os osteoblastos foram isolados da calvária de fetos de ratos e irradiados com um *laser* Ga-Al-As de baixa energia (830 nm, 500 mW, 1 min, 3,82 J/cm²) em vários estágios da cultura de células (1-16 dias). A irradiação nos estágios iniciais estimulou significativamente a proliferação celular, atividade de fosfatase alcalina e expressão da osteocalcina. Além disso, estimulou significativamente o maior número e maior área de nódulos ósseos que se desenvolveram na cultura no 21º dia. Entretanto, esses efeitos não puderam ser encontrados nas irradiações dos períodos tardios. Esses resultados sugerem que a irradiação *laser* pode ter dois papéis importantes na estimulação da formação óssea. O primeiro é estimular a proliferação de células, especialmente a proliferação de células formadoras de nódulos de linhagens osteoblásticas e estimular a diferenciação celular, resultando em um aumento no número de células osteoblásticas mais diferenciadas e um aumento na formação óssea. A estimulação e a formação óssea podem ser vistas somente quando células imaturas são irradiadas.

Freitas, Baranauskas e Cruz-Höfling (2000) estudaram a influência de um *laser* He-Ne (hélio neônio) na osteogênese após um defeito cirúrgico crítico. Foram

utilizados ratos machos Wistar com peso entre 250 e 300 g. O defeito ósseo realizado na tíbia de ratos foi de 2 mm de diâmetro e atingiu apenas uma cortical óssea. O tratamento com *laser* iniciou após 24 horas a cirurgia. Os animais foram separados em três grupos, pelas diferentes doses de irradiação e, após as aplicações diárias, eles foram sacrificados com 8 e 15 dias após a cirurgia. A análise microscópica óptica e eletrônica revelou que o tratamento com *laser* das lesões ósseas com doses de 31,5 e 94,7 J/cm² resulta em formação de fino trabeculado ósseo, que indica maior síntese de fibras colágenas e que a atividade osteoblástica foi aumentada pela radiação *laser* de baixa energia.

Ueda e Shimizu (2003) determinaram o efeito da frequência do pulso da laserterapia de baixa intensidade na formação de nódulos ósseos em células da calvária de ratos *in vitro*. Células parecidas com osteoblastos foram isoladas da calvária de fetos de ratos e foram irradiados uma vez com *laser* GaAIs de baixa energia (830 nm, 500 mW, 0,48 – 3,84 J/cm²) em 4 diferentes modos de irradiação: irradiação contínua (CI), e 1-, 2-, e 8- Hz irradiação pulsada (PI-1, PI-2, PI-8). Então, foram investigados os efeitos na proliferação celular, formação de nódulo ósseo, atividade de fosfatase alcalina (ALP) e expressão gênica de ALP. A irradiação *laser* em todos os grupos estimulou significativamente a proliferação celular, formação de nódulos ósseos, atividade de ALP e expressão gênica do ALP, quando comparado com grupo não irradiado. Notavelmente, PI-1 e -2 irradiados marcadamente estimularam esses fatores, quando comparados com os grupos CI e PI-8 e PI-2, onde a irradiação foi a melhor abordagem para formação de nódulos ósseos nessas condições experimentais. Visto que baixa frequência da irradiação de *laser* pulsado significativamente estimula a formação de osso *in vitro*, isso sugere que a frequência do pulso da laserterapia é um importante fator que afeta a resposta biológica na formação óssea.

Khadra et al. (2004) avaliaram os efeitos da laserterapia de baixa intensidade, usando *laser* diodo GaAIs, no reparo e crescimento ósseo e em defeitos ósseos na calvária de ratos. Uma amostra de animais com duração de 04 semanas foi conduzida usando um estudo randomizado, cego, placebo controlado. Após a padronização de um defeito ósseo circular de 2,7 mm de diâmetro foram feitos em cada osso parietal de 20 ratos (n = 40 defeitos). Os animais foram aleatoriamente

divididos dentro de um grupo experimental e controle de 10 animais cada. No grupo experimental, um *laser* diodo GaAlAs foi aplicado imediatamente após a cirurgia e então diariamente por 6 dias consecutivos. O grupo controle recebeu o mesmo manejo e tratamento, mas com o *laser* desligado. Cinco ratos de cada grupo foram sacrificados no 14º dia e os restantes, no 28º dia após a cirurgia. Para cada animal, amostras de tecido do defeito foram preparadas histoquimicamente, e o mesmo para os defeitos contralaterais para histologia. Os níveis de cálcio, fósforo e proteínas foram determinados por um espectrômetro de absorção atômica, colorimetria e fotometria. A análise estatística utilizou o teste t de Student e Mann-Whitney. Em ambos os tempos, as amostras de tecido dos animais experimentais continham significativamente mais cálcio, fósforo e proteínas que o controle. Similarmente, a análise histológica evidenciou angiogênese mais pronunciada e formação de tecido conjuntivo e formação óssea mais avançada no grupo experimental do que no grupo controle. A laserterapia pode aumentar a formação de osso nos defeitos de calvária de ratos.

Silva e Camilli (2006) avaliaram os efeitos da irradiação *laser* de baixa potência no reparo ósseo de crânios de ratos tratados com enxerto autógeno. Um defeito medindo 3 mm de diâmetro foi produzido no osso parietal esquerdo e preenchido com osso parietal do lado direito. Os animais foram divididos em 03 grupos de 20 ratos cada: controle não-irradiado, irradiado com 5,1 J/cm² e irradiado com 10,2 J/cm². O *laser* (2,4 mW, 735 nm, 3,4 x 10⁻² W/cm², 3mm área) foi aplicado 3 vezes por semana por 4 semanas. Um maior volume de osso neoformado foi observado no grupo irradiado com 10,2 J/cm². Em ambos os grupos irradiados, o maior volume de osso neoformado ocorreu somente nas primeira 2 semanas. Os resultados demonstram que a irradiação *laser* no local enxertado estimula a osteogênese durante os estágios iniciais do processo de cura nos defeitos do crânio de ratos e que esse efeito é dose-dependente.

Weber et al. (2006) avaliaram histologicamente a influência do *laser* diodo infravermelho (GaAlAs, $\lambda=830\text{ nm}$, 50mW) no processo de cicatrização óssea de feridas cirúrgicas em fêmur de ratos Wistar, submetidas a enxerto ósseo autógeno. Os grupos experimentais tratados com *laser* receberam radiação a cada 48 horas, sendo a primeira realizada durante o procedimento cirúrgico. A dosimetria utilizada

foi de $10\text{J}/\text{cm}^2$ por sessão, divididas em quatro pontos de $2,5\text{J}/\text{cm}^2$. Os autores concluíram que a terapia a *laser* resultou num efeito biomodulador positivo sobre o processo de cicatrização óssea em cavidades de fêmur de ratos Wistar submetidas a enxertos ósseos autógenos, sendo o efeito maior quando o *laser* é aplicado diretamente na loja cirúrgica, durante o trans-operatório, antes da adaptação do enxerto 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, 1997; 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).

Freitas, Baranauskas e Cruz-Höfling (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 tíbia 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.

Silva Júnior (2000) avaliou histologicamente o tecido ósseo neoformado frente à radiação com *laser* diodo infravermelho (GaAlAs; $\lambda=830\text{ nm}$) 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 ($4,8\text{ J}/\text{cm}^2$), com um período de observação de 28 dias; o grupo C, três aplicações ($4,8\text{ J}/\text{cm}^2$), com período de observação de 7 dias. Os grupos B e D (não radiados)

foram utilizados com 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 desse 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 sacrificados 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 , $\varnothing 0.6\text{mm}$, 40 mW. Os animais foram sacrificados 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.

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/cm^2 , 50 mW, CW e forma pontual. Já nos grupos III e VI, utilizou-se o laser vermelho de 685nm, 10 J/cm^2 , 35 mW e CW. A periodicidade da radiação foi a cada 48h, iniciando-se imediatamente após a confecção da lesão, com o sacrifício 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 (= 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 10J/cm², 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.

O que se pode afirmar é que a maioria dos trabalhos publicados relata evidências claras de que a radiação *laser* altera processos celulares em animais e em bactérias de uma maneira não-térmica e dependente do comprimento de onda. O mecanismo desta interação não está estabelecido. Entretanto, os componentes da corrente respiratória mitocondrial exibem um espectro de ação frequência-dependente, e vários pesquisadores acreditam que a corrente respiratória possa ser a base de qualquer efeito que a terapia a *laser* possa ter (BASFOR, 1995).



PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar, através de análise histomorfométrica, o processo de osteogênese, nas fases iniciais no processo de reparo ósseo de defeitos críticos confeccionados em calotas cranianas de ratos (07 e 21 dias de observação), submetidos à laserterapia de baixa potência (Arseneto de Gálio e Alumínio - GaAIs, $\lambda = 830\text{nm}$).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) realizar análise histológica descritiva do processo de reparo ósseo, por meio de microscopia óptica;
- b) quantificar a área de neoformação óssea, por meio da análise histomorfométrica.



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 0048/07. Nesta pesquisa, foram respeitados os princípios éticos na experimentação animal, bem como as normas para a prática didático-científica da vivisseção dos mesmos, de acordo com a **Lei n.º 6.638, de 08 de Maio de 1979** (Anexo 1) e os Princípios éticos na Experimentação Animal, segundo o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA; Anexo B).

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; STANLEY, 1979).

4.4 VARIÁVEIS

4.4.1 Variável independente

Laser não cirúrgico Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAlAs), $\lambda = 830$ nm.

4.4.2 Variáveis dependentes

Efeito biomodulador do LLLT na osteogênese promovido pela terapia *laser* de baixa potência na localização anatômica do defeito ósseo e nos distintos períodos de observação: 07 e 21 dias.

4.5 PROBLEMA

Existe biomodulação da osteogênese nas fases iniciais do reparo ósseo em calota craniana de ratos, utilizando a laserterapia de baixa potência (GaAlAs, $\lambda=830$ nm, 2 J/cm², 90 mW,CW).

4.6 HIPÓTESE

A laserterapia atua de forma positiva, estimulando o processo de osteogênese, quando utilizado o *laser* GaAlAs $\lambda=830$ nm.

4.7 CONFIGURAÇÃO DA AMOSTRA

Para composição da amostra foram utilizados 40 ratos albinos, da espécie *Rattus norvegicus*, classe *Mammalia*, ordem *Roedentia*, da linhagem *Wistar*, machos, com peso variando de 300 a 550 gramas (g) e clinicamente saudáveis. Os animais foram obtidos junto ao Laboratório de Farmacologia Aplicada e do Biotério da Faculdade de Farmácia da PUCRS. Durante todo o período experimental, os animais foram alimentados com dieta sólida e água *adlibitum*.

4.8 ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS

Os animais selecionados foram divididos aleatoriamente em dois grupos distintos: Grupo Teste (GT-I e II) e Grupo Controle (GC-I e II), ambos com 20 animais. No decorrer do experimento, nenhum animal precisou ser excluído da amostra. No entanto, na etapa laboratorial de confecção das lâminas, houve falha no processamento, resultando em perda do material correspondente a quatro animais do grupo experimental, sendo dois do GT-I e dois do GT-II.

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 e 21 dias após o procedimento cirúrgico. Desta forma, cada grupo foi subdividido em dois subgrupos (A e B), de acordo com o período de observação (Quadro 1).

GRUPO	PRECEDIMENTO	AMOSTRA	PERÍODO DE OBSERVAÇÃO
GC-I	SEM LASER	10	07
GC-II	SEM LASER	10	21
GT-I	LASER	08	07
GT-II	LASER	08	21

Quadro 1 - Organização dos grupos e subgrupos por períodos de observação
 Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2007).

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:

- a) ser da raça proposta;
- b) estar em bom estado nutricional;
- c) 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;

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%³ e 0,05 ml/100g de peso corpóreo do animal do anestésico geral Cloridrato de Ketamina 10%⁴. Após a anestesia, os animais foram submetidos à tricotomia em região da calota craniana, com auxílio de aparador elétrico de pelos⁴, na região compreendida entre os pavilhões auriculares externos. Com a pele exposta e livre de pêlos, procedeu-se a antissepsia da região com álcool iodado 0,5%⁵. A área operatória foi isolada com campo cirúrgico fenestrado de TNT (tecido não tecido) esterilizado, adaptado para o procedimento. Com o animal posicionado em decúbito ventral, o acesso cirúrgico à região da calota craniana foi obtido por meio de uma incisão contínua transversal, na pele e tecido subcutâneo de aproximadamente 1,5 cm de extensão, utilizando-se lâmina de aço inox⁶ nº 15 montada em cabo de bisturi Bard Parker nº3.

Após a incisão da fáscia muscular, o periósteo foi incisado e descolado ao longo da área óssea a ser exposta, permitindo, assim, acesso direto à calota craniana do animal.

Após a exposição da calota, com o objetivo de padronizar a área a ser manipulada, o osso parietal direito, foi o local de eleição para a realização do experimento. Para tal, estabeleceu-se uma medida linear de 2 mm à partir da sutura sagital mediana com auxílio de régua metálica milimetrada, delimitando-se assim, o ponto inicial de confecção do defeito. O defeito ósseo foi realizado com uma broca cilíndrica, medindo 4 mm de diâmetro, acoplada em um motor elétrico⁷ com 1000 rpm, associado à irrigação contínua com solução fisiológica estéril de cloreto de sódio a 0,9%. O defeito ósseo criado teve o diâmetro da broca, e como profundidade

³ Anasedan® Divisão Vertbrands Saúde Animal – Jacareí – SP/Brasil.

⁴ Dopalen® Divisão Vertbrands Saúde Animal – Jacareí – SP/Brasil.

⁵ Merck S. A. – Rio de Janeiro – RJ/Brasil.

⁶ BD Lâmina – Curitiba – PR/Brasil.

⁷ Beltec Indústria e Comércio de Equipamentos Odontológicos LTDA, Araraquara – SP/Brasil.

a espessura da calota. A broca promoveu o rompimento da díploe (corticais ósseas externa e interna), até exposição da dura-máter.

Em seguida, o tecido muscular e a pele foram reposicionados e suturados, por meio de pontos isolados, com fio monofilamentar de nylon (4-0)⁸, montado em agulha atraumática semicircular de 1,5 cm de comprimento e seção triangular. O procedimento cirúrgico foi realizado por apenas 01 operador. Após estes procedimentos, os animais permaneceram no Laboratório de Farmacologia Aplicada e do Biotério da Faculdade de Farmácia da PUCRS, acomodados em gaiolas plásticas, mantidos em condições adequadas de temperatura (25oC), umidade e ventilação, identificados e numerados de acordo com o grupo correspondente, data da cirurgia e data das irradiações (Figuras 1, 2 e 3).



Figura 1 - (A) tricotomia, (B) infiltração de lidocaína 2% com norepinefrina 1:50 000
Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2007).

⁸ Ethicon Co – São Paulo – SP/Brasil.



Figura 2 - (A) incisão cutânea, (B) incisão periosteal
Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2007).



Figura 3 - (A) descolamento dermo-periosteal, (B) confecção da cavidade cirúrgica
Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2007).

4.11 RADIAÇÃO COM O LLLT

O laser utilizado nos GT-I e II foi o laser de diodo infravermelho (GaAlAs)⁹, com comprimento de onda de 830nm. A potência estabelecida foi de 90 mw e a dose de 2 J/cm² por sessão, conforme protocolo da linha de pesquisa laser em odontologia da PUCRS.

O sistema de entrega foi constituído por fibra óptica com $\varnothing = 0,06\text{cm}$. O procedimento foi realizado por contato direto, com a fibra óptica posicionada perpendicularmente, em um ponto cutâneo aproximadamente a 4mm da linha média, na condição emissão contínua, com uma dose de 2 J/cm², na região da loja cirúrgica

⁹ Thera Lase® DMC Equipamentos, São Paulo, SP/Brasil.

com tempo total de 27s, utilizado no pós-operatório imediato e em 02, 04 e 06 dias após a cirurgia. A primeira dose de radiação foi realizada logo após o término da sutura. As radiações, a cada 48hs, no período pós-operatório, perfizeram um total de quatro aplicações, independente do subgrupo, conforme data de sacrifício.

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 e 21 dias após a cirurgia, através de inalação contínua de isoflurano, até que a morte dos animais pudesse ser constatada pela ausência dos sinais vitais, seguindo os princípios da **Lei n.º 6.638, de 08 de Maio de 1979** que estabelece normas para a prática Didático-Científico da vivisseção de animais (Anexo A) e os Princípios éticos na Experimentação Animal, segundo o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA; Anexo B).

Para obtenção das amostras (peças cirúrgicas) foi realizada uma incisão transversal acompanhando a cicatriz cutânea existente. Após minuciosa e completa exposição óssea procedeu-se a remoção completa da área operada e assim foram constituídas as peças cirúrgicas do grupo controle (GC-I e II), que não sofreram radiação e os segmentos do grupo teste, submetidos à radiação com *laser* (GT-I e II).

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 (HNO₃) a 5%, trocado

diariamente, por 2 a 4 dias, de acordo com a espessura óssea. Após a descalcificação, procedeu-se o corte na região central do defeito. O material obtido foi mergulhado em parafina e os blocos submetidos à inclusão foram identificados e submetidos à microtomia (Figura 4 e 5).

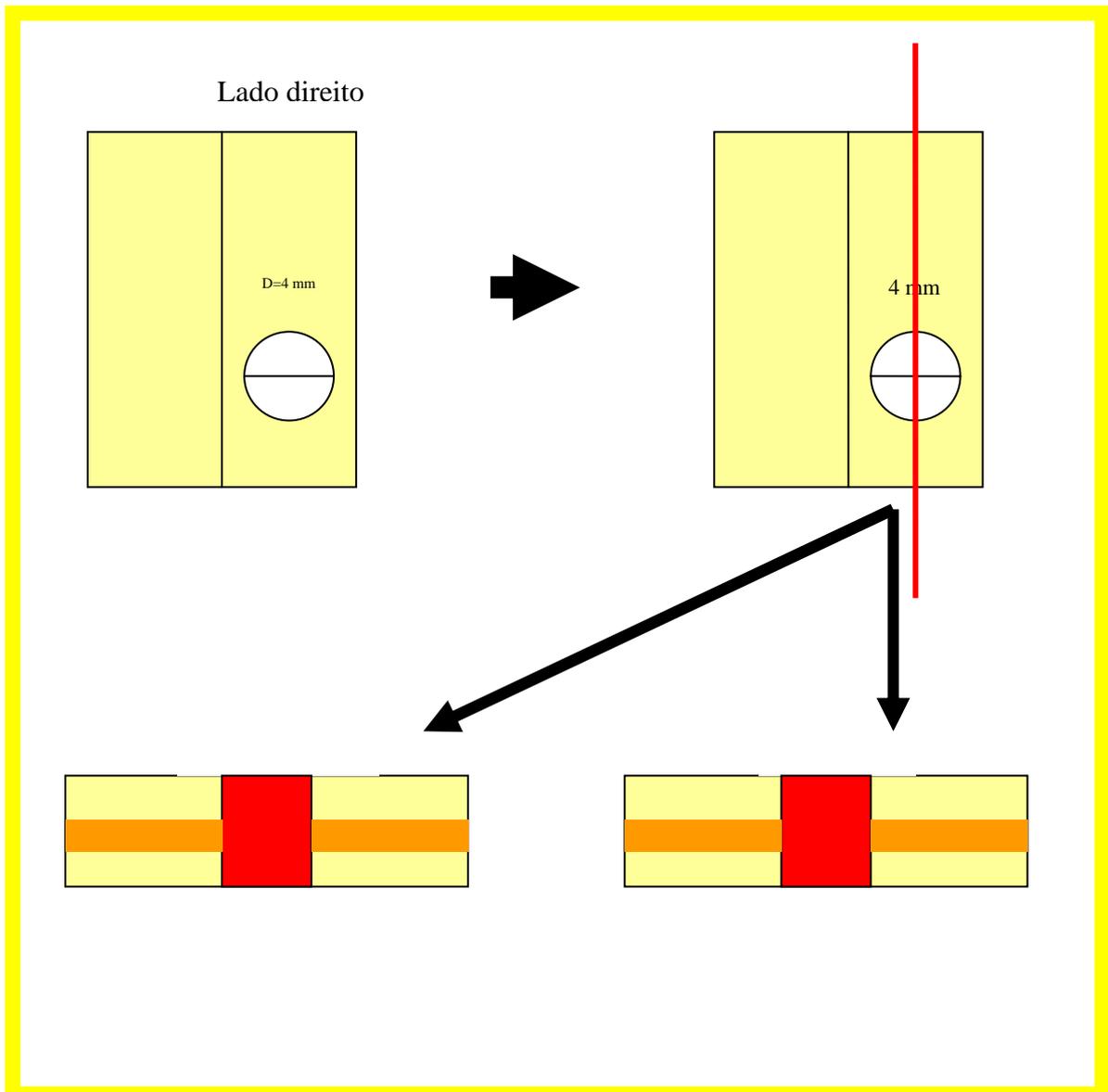


Figura 4 - Modelo esquemático para confecção dos cortes histológicos.
Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2007).



Figura 5 - Peça operatória obtida do osso parietal direito, cortada no centro da ferida cirúrgica, no sentido longitudinal.
Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2007).

4.13 ANÁLISE HISTOLÓGICA

O estudo das lâminas foi realizado com o emprego da microscopia óptica, visando o estudo do processo de reparo ósseo. Para tal, foi utilizado o aumento microscópico de 40X¹⁰. 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 neoformação de tecido ósseo. Todas as

¹⁰ Microscópio Óptico, marca Olympus, modelo BX50.

lâminas foram codificadas, impossibilitando desta forma, a identificação a qual grupo de estudo pertenceria cada lâmina analisada.

4.14 PROCEDIMENTO DE CAPTURA DE IMAGENS E ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

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 Plus¹¹. Sob um foco fixo e com clareza de campo, a imagem do microscópio foi capturada pela câmera de vídeo¹² acoplada ao microcomputador¹³, 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*¹⁴ (1 pixel = 6,5 µm).

Após a captura das imagens em formato *JPEG*, em um total de 36 cortes histológicos correspondentes a todos os grupos do estudo (controle e experimental), as mesmas foram direcionadas ao programa de histomorfometria Image Tool Scripting Language¹⁵. Através deste programa, pôde-se realizar a mensuração, 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 endóstio e medula (Figura 6).

¹¹ Programa IMAGE-PRO® PLUS, versão 4.5.1 desenvolvido por MediaCybernetics.

¹² Marca Sony (CCD-Iris – Color Vídeo Câmera, modelo DXX-107A).

¹³ Marca Compaq (Pentium 4, CPU 1.8 GHz, 128 MB de memória RAM, HD 40 GB, sistema operacional Microsoft Windows versão 2002).

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

¹⁵ Programa Image Tool Scripting Language®, versão 2.0 (alpha 2).

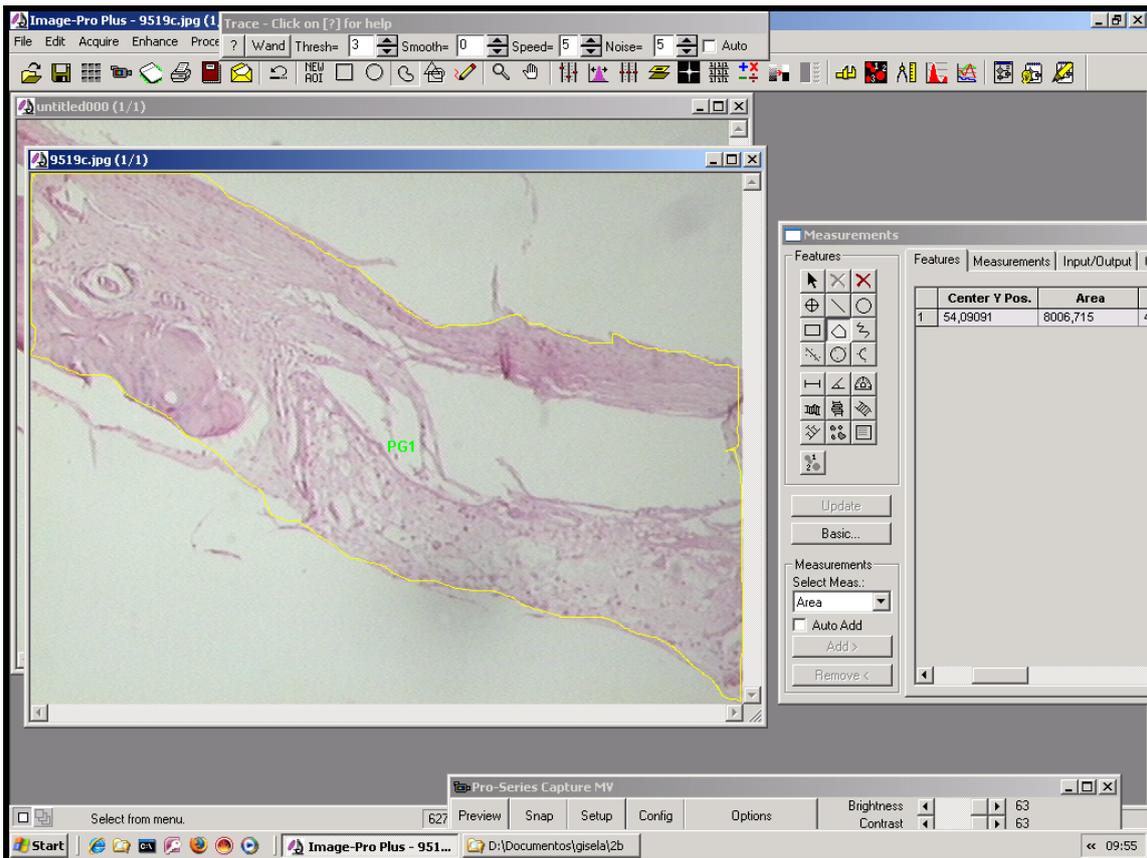


Figura 6 – Procedimento de histomorfometria utilizando o programa image pro-plus.
 Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2007).

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 Windows¹⁶, inseridos nas tabelas definitivas e submetidos à análise estatística por meio do programa SPSS para o Windows¹⁷.

Toda a análise histomorfométrica foi realizada sem o conhecimento prévio da distribuição das imagens nos seus respectivos grupos de estudo, sendo, portanto, codificadas todas as lâminas do estudo e, conseqüentemente, todas as imagens capturadas.

¹⁶ Programa EXCEL desenvolvido pela Microsoft®.

¹⁷ Statistical Pckage for Social Science. Versão 11.5. Produzido por rograma SPSS® Inc. 233 South Wacker Drive, 11th floor Chicago, IL 6060.

A qualidade do reparo ósseo foi avaliada comparativamente entre os grupos estudados, determinando-se, de forma descritiva, as alterações teciduais ocorridas. Foram observados:

- a) neoformação óssea nas margens do defeito (aumento de 40x);
- b) neoformação óssea no centro do defeito (aumento de 40x).

Após a aquisição da imagem, realizou-se, com o auxílio do mouse, a delimitação do contorno das regiões desejadas (osso neoformado), e o valor dessas áreas, em μm^2 , foi quantificado através do sistema computacional de captura e análise de imagem - Image-Pro Plus 4.5.1. Foi quantificada também a área inicial de cada defeito para que pudéssemos obter a proporção de osso neoformado:

$$\text{Proporção de Osso Neoformado} = \frac{\text{Área de Osso Neoformado}}{\text{Área Total do Defeito}}$$

4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

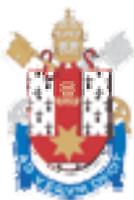
A análise estatística deste trabalho foi realizada através de tabelas, gráficos, estatísticas descritivas (média e desvio-padrão) e alguns testes estatísticos destacados a seguir.

Para a verificação da normalidade dos dados foi utilizado o teste não-paramétrico **Kolmogorov-Smirnov**. Este teste é considerado uma prova de aderência, diz respeito ao grau de concordância entre a distribuição de um conjunto de valores amostrais e determinada distribuição teórica específica, neste caso, a distribuição normal (SIEGEL, 1975). Para os dados deste estudo todas as medidas

tiveram esta condição foi garantida, por este motivo, o teste aplicado neste estudo foi um teste paramétrico.

Para a comparação entre os grupos (Controle e Teste) e entre os tempos (7 e 21 dias) foi utilizado o teste de comparações de médias *t-student*. Este teste é o método mais utilizado para se avaliarem as diferenças entre as médias de dois grupos (ARANGO, 2001).

Para o processamento e análise destes dados foi utilizado o software estatístico SPSS versão 10.0



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 a estrutura avaliada (trabeculado ósseo neoformado), em todas as lâminas 36 lâminas. Foram os seguintes:

5.2 GRUPO TESTE-I (GT-I – 07 DIAS)

O defeito ósseo apresenta-se nítido, com rompimento completo da cúpula. Observa-se em oito lâminas a existência de neoformação óssea nas margens do defeito, do contrario, essa neoformação é inexistente nas regiões centrais do defeito. Nas duas lâminas restantes, não há neoformação óssea em nenhuma região do defeito. Observa-se formação de um tecido conjuntivo desorganizado e infiltrado inflamatório crônico, preenchendo a quase totalidade do defeito ósseo. 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 7).

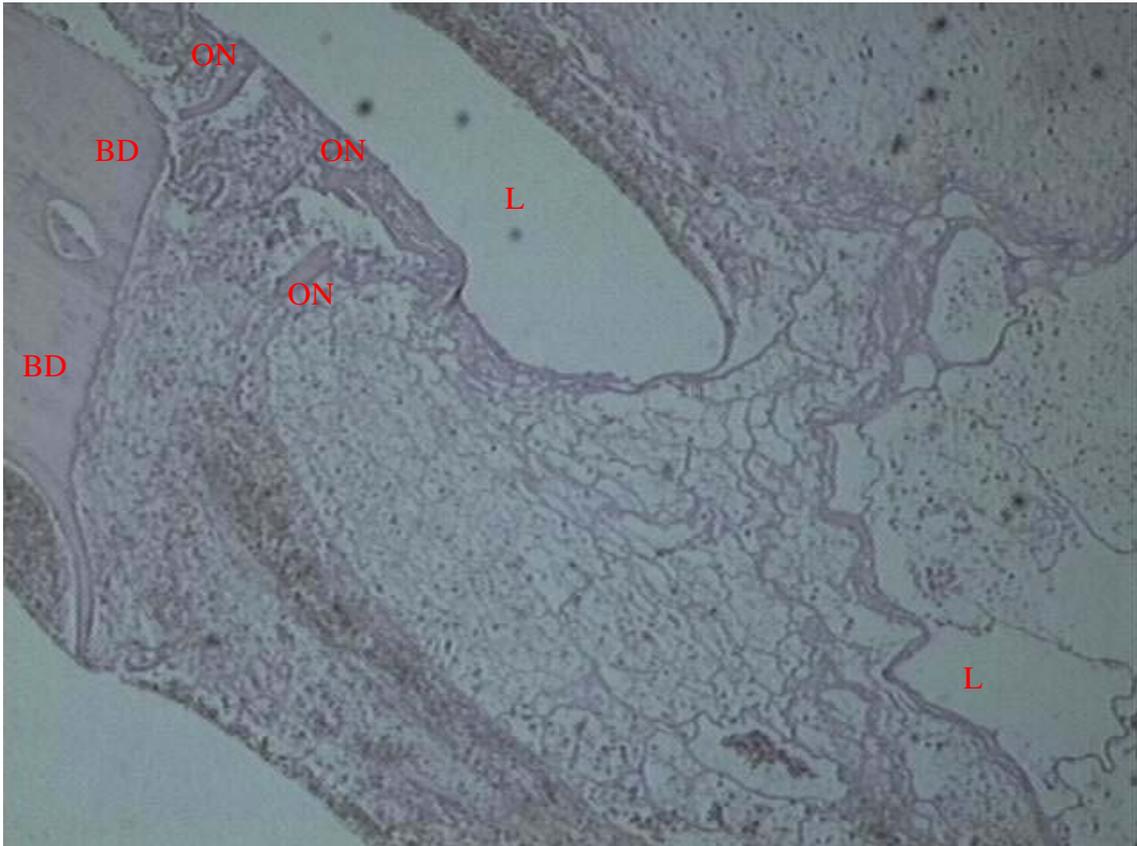


Figura 7 - Defeito experimental com 07 dias de observação. BD – borda do defeito; ON – osso neoformado; L – lacuna. Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2007)

5.3 GRUPO CONTROLE-I (GC-I – 07 DIAS)

O defeito ósseo apresenta-se nítido, com rompimento completo da cúploe. Não observa-se em oito lâminas a existência de neoformação óssea em nenhuma área do defeito. Nas duas lâminas restantes, existe discreta neoformação óssea nas margens do defeito. Observa-se formação de um tecido conjuntivo desorganizado e infiltrado inflamatório crônico, preenchendo a quase totalidade do defeito ósseo. 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 8).



Figura 8 - Defeito controle com 07 dias de observação. BD – borda do defeito; TC – tecido conjuntivo
Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2007).

5.4 GRUPO TESTE-II (GT-II – 21 DIAS)

5.4.1 Laser

O defeito ósseo apresenta-se nítido, com rompimento completo da díploe. Observa-se em todas as lâminas a existência de neoformação óssea nas margens do defeito, do contrario, essa neoformação é inexistente nas regiões centrais do defeito. Observa-se um tecido conjuntivo mais organizado e infiltrado inflamatório crônico, preenchendo a quase totalidade do defeito ósseo. 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 9).

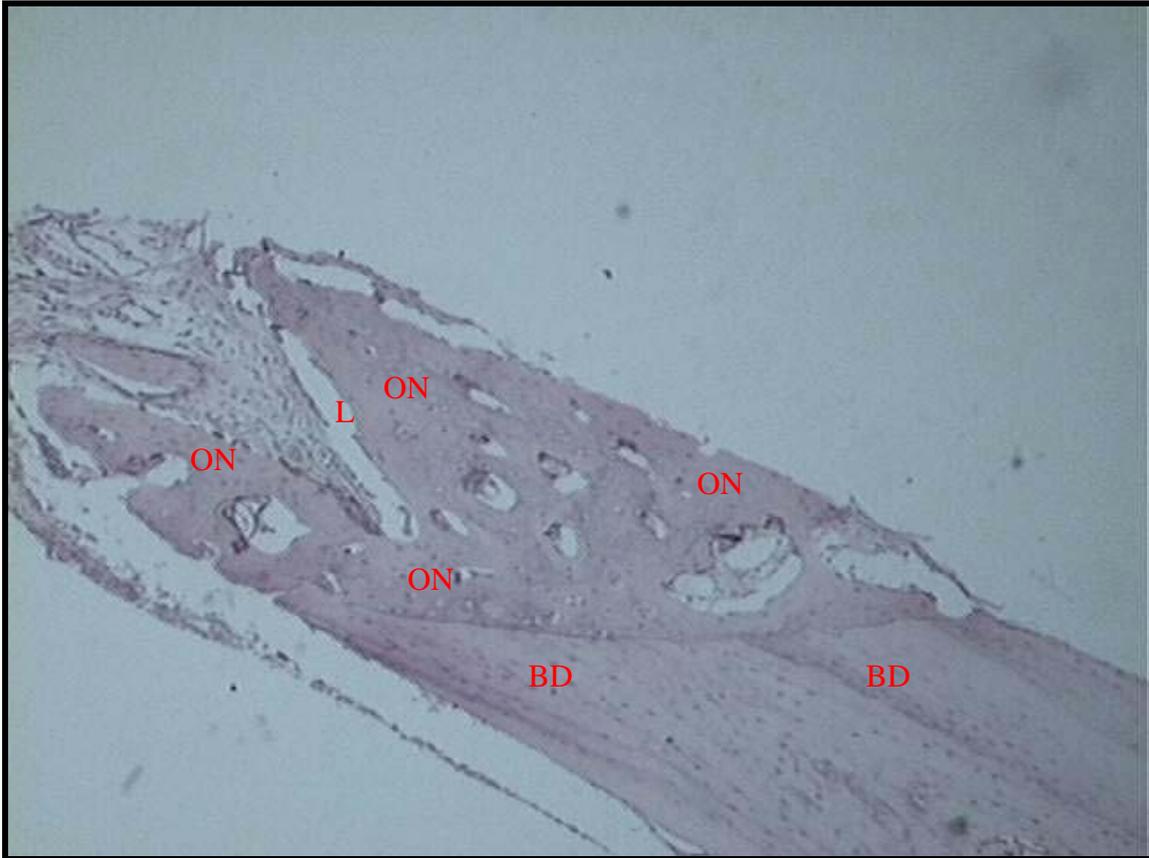


Figura 9 - Defeito experimental com 21 dias de observação. BD – borda do defeito; ON – osso neoformado; L – lacuna. Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2007).

5.5 GRUPO CONTROLE-II (GC-II – 21 DIAS)

O defeito ósseo apresenta-se nítido, com rompimento completo da díploe. Observa-se em todas as lâminas a existência de neoformação óssea nas margens do defeito, do contrario, essa neoformação é inexistente nas regiões centrais do defeito. Observa-se um tecido conjuntivo mais organizado e infiltrado inflamatório crônico, preenchendo a quase totalidade do defeito ósseo. 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).

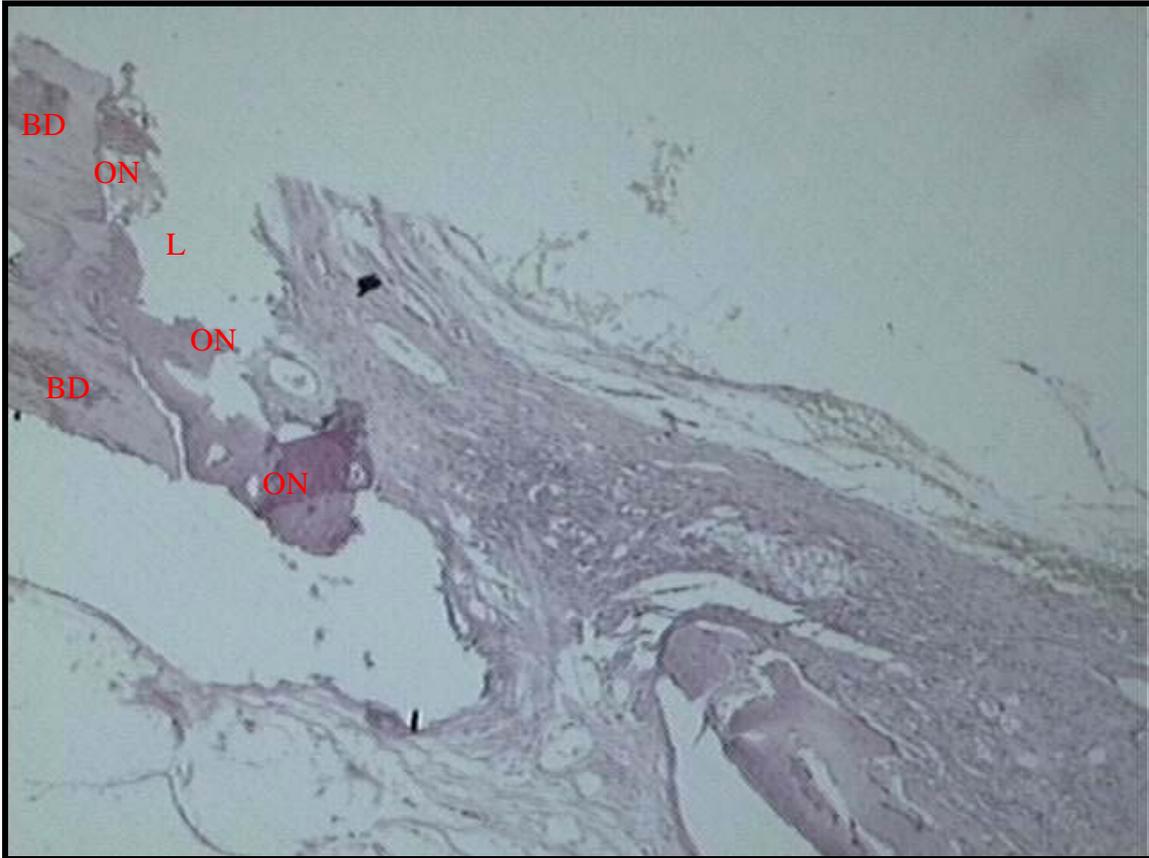


Figura 10 - Defeito controle com 21 dias de observação. BD – borda do defeito; ON – osso neoformado; L – lacuna. Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2007).

5.6 RESULTADOS DESCRITIVOS PARA OS VALORES DO RESULTADO EM PORCENTAGEM DE TODOS OS GRUPOS

Os resultados percentuais foram calculados em relação à área de neoformação em relação a área total do defeito, considerando um total de 10 cavidades para cada tempo pesquisado.

A Tabela 1 mostra o percentual de formação óssea em cada grupo estudado, com seus respectivos tempos de observação. Os melhores resultados na formação óssea foram encontrados nas cavidades do grupo teste 21 dias (6,33%), seguidos pelo grupo controle de 21 dias (4,52%) e grupo teste de 7 dias (0,52%). O grupo controle de 7 dias obteve a menor média (0,16%), obtendo mediana igual a zero, sendo praticamente desprezível a porcentagem de neoformação óssea.

Tabela 1 – Resultados descritivos (média, desvio-padrão, mediana) para os valores do resultado em porcentagem de todos os grupos, de acordo com os períodos de observação, considerando um intervalo de confiança (IC) de 95%.

<i>Grupo</i>	<i>Tempo</i>	<i>Nº casos</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-padrão</i>	<i>Mediana*</i>	<i>IC 95%**</i>
<i>Grupo Controle</i>	7 dias	10	0,16	0,33	0,00	[-0,08 a 0,39]
	21 dias	10	4,52	2,21	5,02	[2,94 a 6,09]
<i>Grupo Teste</i>	7 dias	8	0,52	0,53	0,39	[0,08 a 0,96]
	21 dias	8	6,33	3,00	7,07	[3,82 a 8,84]

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2007).

* Valor que divide a distribuição de dados ao meio ou ainda valor central da distribuição

** Intervalo de confiança com 95% de probabilidade de conter o parâmetro média

5.7 COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS COM SEUS RESPECTIVOS TEMPOS DISTINTOS

Na Tabela 2, observou-se a comparação entre os grupos com os tempos distintos (7 e 21 dias). No tempo de 7 dias, a média numérica foi superior no grupo teste (0,52) em relação ao grupo controle (0,16), o mesmo acontecendo para o tempo de 21 dias, onde o grupo teste atingiu média de neoformação óssea de (6,33) e o grupo controle de (4,52). Através do teste t-student, observa-se que não houve diferença significativa entre os grupos em ambos os tempos (7 e 21 dias), sendo $p=0,093$ e $p=0,158$ respectivamente. O gráfico 1, nos trás as médias comparativas em relação aos tempos estudados (7 e 21 dias).

Tabela 2 - Resultados da Comparação entre os grupos Controle e Teste para cada tempo

<i>Grupo</i>	<i>Nº casos</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-padrão</i>	<i>t</i>	<i>P</i>
Tempo 7 dias					
Grupo Controle	10	0,16	0,33	-1,787	0,093
Grupo Teste	8	0,52	0,53		
Tempo 21 dias					
Grupo Controle	10	4,52	2,21	-1,480	0,158
Grupo Teste	8	6,33	3,00		

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2007).

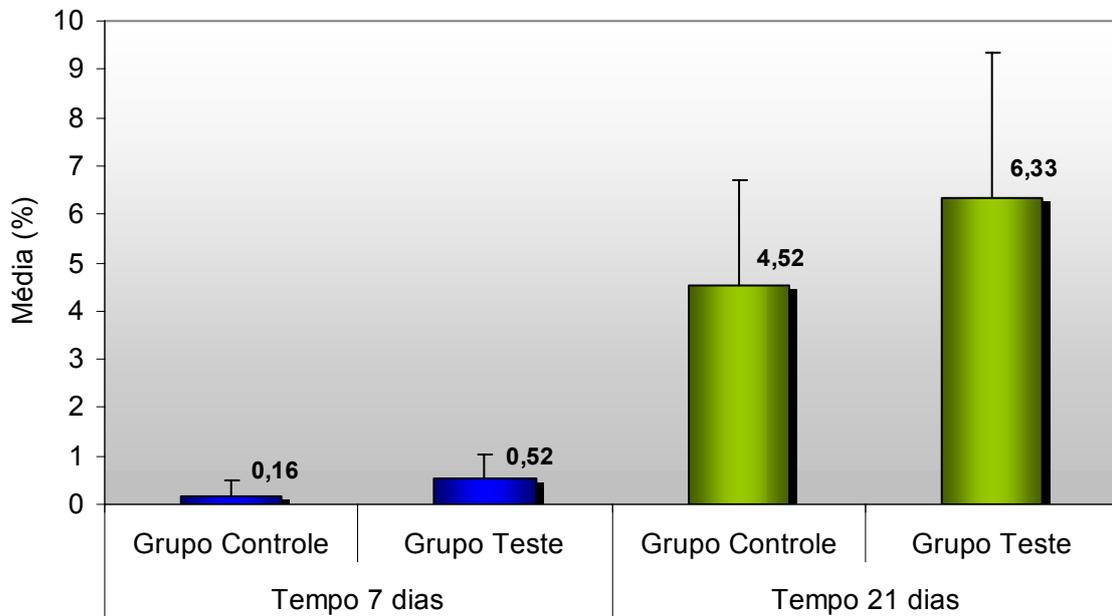


Gráfico 1 - Resultados da Comparação entre os grupos Controle e Teste para cada tempo
Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2007).

5.8 COMPARAÇÃO ENTRE OS TEMPOS DISTINTOS COM SEUS RESPECTIVOS GRUPOS

Pelo teste t-student, observou-se diferença estatisticamente significativa na comparação entre os tempos (7 e 21 dias), onde o tempo de 21 dias obteve média (5,32) e o tempo de 7 dias (0,32), com $p=0,000$, (tabela 3). Também pelo teste t-student, observou-se diferença estatisticamente significativa para a comparação entre os tempos para cada grupo, (controle) e (Laser), mostrando que em ambos os grupos, o tempo de 21 dias obteve média de neoformação óssea superior ao tempo de 7 dias, com $p=0,000$, (Gráfico 2)

Tabela 3 - Resultados da Comparação entre os tempos 07 e 21 dias para cada grupo

<i>Tempo</i>	<i>Nº casos</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-padrão</i>	<i>t</i>	<i>p</i>
Grupo Controle					
7 dias	10	0,16	0,33	-6,180	0,000*
21 dias	10	4,52	2,21		
Grupo Teste					
7 dias	8	0,52	0,53	-5,396	0,000*
21 dias	8	6,33	3,00		

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2007).

*Apresenta diferença estatisticamente significativa entre os tempos 07 e 21 dias para $p \leq 0,05$...

Através dos resultados do teste de comparações t-student verifica-se que, para ambos grupos, existe diferença significativa entre os tempos 7 e 21 dias. Observa-se que o tempo 21 dias apresenta média superior ao tempo 7 dias.

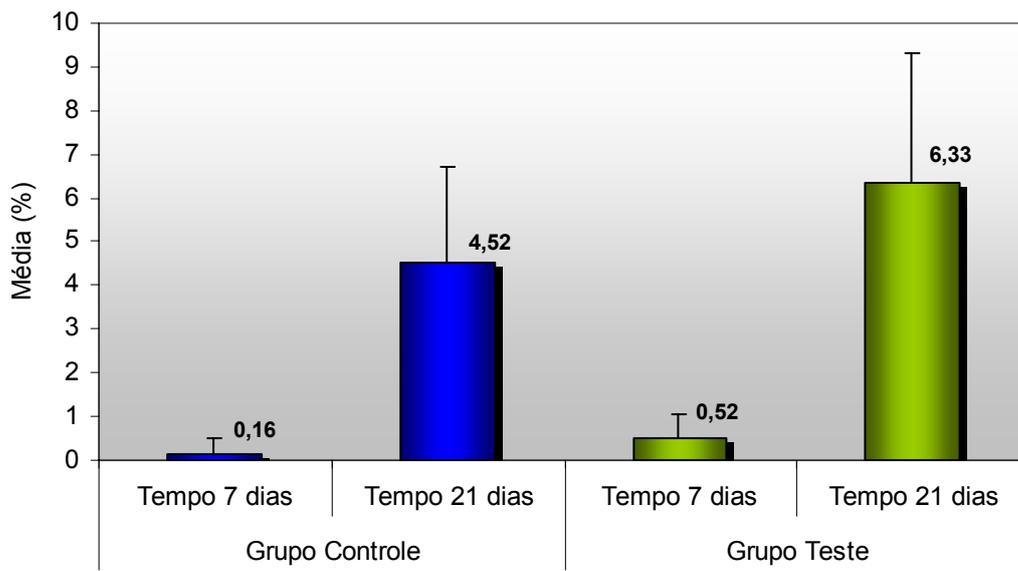


Gráfico 2 - Resultados da Comparação entre os tempos 7 e 21 dias para cada grupo
Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2007).



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 (BRUGNERA JÚNIOR; PINHEIRO, 1998; CATÃO, 2004; HALL et al., 1994; HALLMAN et al., 1988; KREISLER et al., 2002; KOLÁROVÁ; DITRICHOVÁ; WAGNER, 1999).

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 (≥ 2 mm) que o *laser* HeNe (luz vermelha), o qual trabalha com uma comprimento de onda na faixa de $\lambda= 632,8$ 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; KOLÁROVÁ; DITRICHOVÁ; WAGNER, 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 (10-103 J/cm²) 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 2 J/cm² por sessão, segundo o protocolo clínico estabelecido pela linha de pesquisa Laser em Odontologia da PUCRS. Pinheiro et al. (1998, 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 J/cm² e com densidades de potência variando entre 5 e 90 mW, como também, Kreisler et al. (2002) observaram que doses variando de 2 a 8 J/cm² são capazes de biomodular efeitos positivos nas células radiadas.

A radiação a cada 48h após a confecção do defeito cirúrgico 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), Limeira Júnior (2001) e Merli et al. (2005).

O presente estudo apresentou valores numéricos de média de área, através da análise histomorfométrica, uma maior formação de trabeculado ósseo nos grupos 7 e 21 dias do experimento, submetidos à radiação laser, porém sem significância

estatística. Este fenômeno sugere o motivo pelo qual a freqüência da aplicação da laserterapia, a cada 48 horas, pode ser efetiva, quando aplicada durante a fase celular proliferativa, confirmando os estudos de Karu (1989), Limeira Júnior (2001) Pinheiro e Gerbi (2006) e Weber et al. (2006).

A angiogênese é um dos fatores responsáveis pelo 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 modulação do processo de síntese celular.

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).

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 21 dias do experimento, com valores de neoformação óssea homogêneos quando comparados aos 07 dias do experimento, diferentemente de Pinheiro et al. (2003), Gerbi et al. (2005); Merli et al. (2005) e Silva e Camilli (2006), que especificam que os primeiros 14 dias de pós-operatório coincidem com o início do declínio da atividade da fosfatase alcalina, o 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, o qual é um ponto importante para a atividade osteoclástica, iniciando assim, os processos de reabsorção óssea.

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 periósteo, 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).

Observando-se as áreas de trabeculado ósseo e os períodos de observação, se evidenciou média de trabeculado ósseo maior e estatisticamente significativa no grupo experimental, e em progressão proporcional ao período de observação. Este fato é justificado pelo processo dinâmico de remodelamento 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).

O uso potencial dos *lasers* na biomodulação da osteogênese através de suas propriedades fotoquímicas e fotobiológicas são estudados 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 deverão solidificar os resultados obtidos no presente trabalho, objetivando assim, o aprofundamento dos efeitos biomoduladores positivos vistos nesta pesquisa. O advento de novas tecnologias na área, poderão definir melhores resultados da laserterapia na biomodulação de processo de reparo 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 histomorfométricos obtidos nesta pesquisa, pode-se concluir que:

- a) a LLLT pode ser utilizada como coadjuvante no processo de osteogênese no reparo do tecido ósseo;
- b) o uso da LLLT resulta em um efeito biomodulador positivo sobre a osteogênese no processo do reparo ósseo, com maiores médias de trabéculas ósseas, mas sem associação estatística significativa, porém, com estágios mais avançados de osteogênese.



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- 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. **Laser in Surgery and Medicine**, New York, v. 29, p. 179-184, 2001.
- AL-WATBAN, F. A. H.; ZHANG, X. Y. The acceleration of wound healing is not attributed to laser skin transmission. **Laser Therapy**, New York, v. 11, n. 1, p. 6-10, 1999.
- ARANGO, H. **Bioestatística teórica e computacional**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2001.
- BARUSHKA, O. et al. Effect of Low energy laser (He-Ne) irradiation on the process of bone repair in the rat tibia. **Bone**, New York, 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.
- BISHT, D. et al. Effect of low intensity laser radiation on healing of open skin wounds in rats. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, 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**. 2005. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- 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**. New York: Raven Press, 1983. v. 15, p. 193-294.
- BRUGNERA JUNIOR, A.; PINHEIRO, A. L. B. **Lasers na odontologia moderna**. São Paulo: Pancast, 1998.

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

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

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

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

CATANZARO GUIMARÃES, S. **A. patologia básica da cavidade bucal**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1982.

CATÃO, M. H. C. V. Os benefícios do laser de baixa intensidade na clínica odontológica na estomatologia. **Revista Brasileira de Patologia Oral**, Natal, 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. In: LASER DENTAL SHOW: 1º Salão Brasileiro de Práticas Clínicas com Laser, 1., 2003, São Paulo. **Anais...** São Paulo: [s.n.], 2003. p. 8-9.

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. **Legislação**. São Paulo, 2007. Disponível em: <http://www.cobea.org.br/etica.htm#topo#topo>. Acesso em: 21 março 2006.

CORSAIR A. The effects of a CO2 laser on the healing of a bone defect. **Dentistry Today**, Montclair, v. 16, n. 3, p. 66-69, Mar, 1997.

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

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

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

EL SAYED, S.O.; DYSON, M. Comparison of the effect of multi-wavelength 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 Surgery and Medicine**, New York, 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**, local, v. 31, p. 170-172, 1993.

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.

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**, Lausanne, v. 70, p. 81-89, 2003.

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

GORDJESTANI, M.; DERMAUT, L.; THIERENS, H. Infrared laser and bone metabolism: a pilot study. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Copenhagen, v. 23, p. 54-56, 1994.

GUZZARDELLA GA, FINI M, TORRICELLI P, GIAVARESI G, GIARDINO R. Laser stimulation on bone defect healing: an in vitro study. **Lasers in Medical Science**, London, v. 17, n. 3, p. 216-220, 2002.

HALL, G. et al. Effect of low level energy laser irradiation on wound healing. Na experimental study in rats. **Swedish Dental Journal**, 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? **Laser in Surgery and Medicine**, New York, v. 8, p. 125-129, 1988.

- HAMAJIMA S. et al. Effect of low-level laser irradiation on osteoglycin gene expression in osteoblasts. **Lasers in Medical Science**, London, v. 18, n. 2, p. 78-82, 2003.
- HILL, P. A.; ORTH, M. Bone remodeling. **British Journal of Orthodontics**, London, 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.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 111-128.
- KARU, T. Photobiology of low-power laser effects. **Health Physics**, Baltimore, v. 56, n. 5, p. 691-704, May 1989.
- KAWASAKI, K.; SHIMIZU, N. Effects of low-energy laser irradiation on bone remodeling during experimental tooth movement in rats. **Laser in Surgery and Medicine**, New York, v. 26, p. 282-291, 2000.
- KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. Tecido ósseo. In: KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e embriologia oral: texto – atlas - correlações clínicas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 21-38.
- KERT, J.; ROSE, L. **Clinical laser therapy: low level laser therapy**. Copenhagen: Scandinavian Medical Laser Technology, 1989.
- KOLÁVORA, H.; DITRICOVÁ, D.; WAGNER, J. Penetration of the laser light into the skin in vitro. **Laser in Surgery and Medicine**, New York, v. 24, p. 231-235, 1999.
- KHADRA, M. et al. Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. **Biomaterials**, Surrey, v. 26, p. 3503-3509, 2005.
- KHADRA, M. et al. Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, St. Louis, v.97, n.6, p.693-700, Jun. 2004.

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

LERNER, U. H. Osteoclast formation and resorption. **Matrix Biology**, Stuttgart, 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**. 2001. Tese (Doutorado) –Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2001.

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

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

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.

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**, New York, v. 22, n. 1, p. 19-25, Feb. 2004.

MEYERS, A. Lasers and wound healing. **Archives of Otolaryngology Head & Neck Surgery**, Chicago, v. 116, p. 1128, 1990.

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

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. **Revista de Odontologia da UNESP**, Araçatuba, v. 2, n. 22, p. 213-221, 1993.

OZAWA Y. Low-power laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarian cells. **Bone**, New York, v. 22, n. 4, p. 347-354, 1998.

PANARELLO, A. F. **Avaliação da potência e intensidade de laser não ablativo no processo de inflamação e reparo de tecidos moles**. 2003. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de odontologia, PUCRS, Porto Alegre, 2003.

PASSARELLA, 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.

PETERSON, L. J. et al. Reparação das feridas. In: HUPP, J. R. **Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003. p. 57-67.

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

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. Low-level laser therapy in the management of the maxillofacial region. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, New York, v. 16, n. 4, p. 223-226, Aug.1998.

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 bone membrane. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, New York, v. 21, n. 5, p. 301-306, Oct. 2003.

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

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

POSPISILOVÁ, J. Healing of wounds. **Acta Chirurgiae Plasticae**, Praha, v. 24, p. 293-303, 1982.

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.

ROBERTS, W. E.; GARETTO, L. P. Fisiologia e Metabolismo Ósseos. In: MISCH, CE. **Implantes dentários contemporâneos**. 2. ed. São Paulo: Santos, 2000. Cap 17, p. 225-237.

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

ROMANS, L. E. **Introduction to computed tomography**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1995.

ROSENSHEIN, J. The physics of surgical Lasers. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, Philadelphia, v. 9, n. 1, p. 33-47, 1997.

ROSS, M. H.; ROMRELL, L. J. **Histologia, texto e atlas**. São Paulo: Panamericana, 1993.

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.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, n. 205, p. 299-308, Apr. 1986.

SALO, J. et al. Removal of osteoclast bone resorption products by transcytosis. **Science**, Washington, 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.

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.

SIEGEL, S. **Estatística não-paramétrica**. São Paulo: McGraw-Hill, 1975.

SILVA, R. V.; CAMILLI, J. A. Repair of bone defects treated with autogenous bone graft and low-power laser. **The Journal of Craniofacial Surgery**, Burlington, v. 17, n. 2, p. 297-301, 2006.

SILVA JÚNIOR, A. N. **Avaliação do efeito do laser diodo (GaAIs) infravermelho de 830nm na biomodulação da cicatrização óssea**. 2000. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

SILVA JÚNIOR, A. N. et al. Computerized morphometric assessment of effect of lowlevel laser therapy on bone repair: an experimental animal study. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, New York, 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**, Copenhagen, v. 17, n. 6, p. 388-391, 1988.

TEN CATE, A. R. **Histologia bucal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

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 master with low-power laser. **Laser in Surgery and Medicine**, New York, v. 7, p. 36-45, 1987.

TUNER, J.; HODE, L. It's all in the parameters: a critical analysis of some well-known negative studies on LLLT. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, New York, v. 16, n. 5, p. 245-248, 1998.

UEDA Y., SHIMIZU, N. Pulse irradiation of low-power laser stimulates bone nodule formation. **Journal of Oral Science**, Tokyo, v. 43, n. 1, p. 55-60, 2001.

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

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

VEÇOSO, M. C. **Laser em fisioterapia**. São Paulo: Lovise, 1993.

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.

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

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

ZEZELL, D. M. et al. Effect of low-intensity polarized visible laser radiation on skin burns: a light microscopy study. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, New York, v. 22, n. 1, p. 59-66, Feb. 2004.



APÊNDICE

APÊNDICE A – QUADROS DE COLETA DE DADOS

Período	Área Total do Defeito	Área de Osso Neoformado	Proporção de Osso Neoformado
7 dias			
21 dias			

Quadro 1 - Coleta de dados para análise histológica do processo de reparo ósseo – Grupo teste

Período	Área Total do Defeito	Área de Osso Neoformado	Proporção de Osso Neoformado
7 dias			
21 dias			

Quadro 2 - Coleta de dados para análise histológica do processo de reparo ósseo – Grupo controle



ANEXO A – LEI N.º 6.638 , DE 08 DE MAIO DE 1979¹⁸

Estabelece normas para a prática Didático-Científico da vivissecção de animais e determina outras providências.

ART. 1º - Fica permitida, em todo o território nacional, a vivissecção de animais, nos termos desta 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:

1. Sem o emprego de anestesia;
2. Em centros de pesquisas e estudos não registrados em órgão competente;
3. Sem a supervisão de técnico especializado;
4. Com animais que não tenham permanecido mais de quinze dias em biotérios legalmente autorizados;
5. Em estabelecimento de ensino de primeiro e segundo 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 aprendizado cirúrgico quando, durante ou após a vivissecção, receber cuidados especiais.

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

2. Caso não sejam sacrificados, os animais utilizados em experiência ou demonstrações somente poderão sair do biotério trinta dias após a intervenção,

¹⁸ COBEA, 2007.

desde que destinados a pessoas ou entidades idôneas que por eles queiram responsabilizar-se.

ART. 5º - Os infratores estão sujeitos:

1. Às penalidades cominadas no artigo 64, caput, do Decreto Lei nº 3.688 de 03.10.1941, no caso de ser a primeira infração;
2. À interdição e cancelamento do registro do biotério ou do centro de pesquisa, no caso de reincidência.

ART. 6º - O poder Executivo, no prazo de noventa dias, regulamentará a presente Lei, especificando:

1. O órgão competente para o registro e a expedição de autorização dos biotérios e centros de experiências e demonstração com animais vivos;
2. As condições gerais exigíveis para o registro e o funcionamento dos biotérios; III - Órgão e autoridades competentes para a fiscalização dos biotérios e centros mencionados no inciso I.

ART. 7º - Esta Lei entrará em vigor na data publicada.

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

*Assinado: João Figueiredo, Petrônio Portella, E. Portella e Ernani Guilherme Fernandes da Motta.*²⁷

ANEXO B – PRINCÍPIOS ÉTICOS NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL¹⁹

A evolução contínua das áreas de conhecimento humano, com especial ênfase àquelas de biologia, medicina humana e veterinária, e a obtenção de recursos de origem animal para atender necessidades humanas básicas, como nutrição, trabalho e vestuário, repercutem no desenvolvimento de ações de experimentação animal, razão pela qual se preconizam posturas éticas concernentes aos diferentes momentos de desenvolvimento de estudos com animais de experimentação.

Postula-se:

Artigo I - É primordial manter posturas de respeito ao animal, como ser vivo e pela contribuição científica que ele proporciona.

Artigo II - Ter consciência de que a sensibilidade do animal é similar à humana no que se refere a dor, memória, angústia, instinto de sobrevivência, apenas lhe sendo impostas limitações para se salvaguardar das manobras experimentais e da dor que possam causar.

Artigo III - É de responsabilidade moral do experimentador a escolha de métodos e ações de experimentação
Animal

Artigo IV - É relevante considerar a importância dos estudos realizados através de experimentação animal quanto a sua contribuição para a saúde humana em animal, o desenvolvimento do conhecimento e o bem da sociedade.

Artigo V - Utilizar apenas animais em bom estado de saúde.

Artigo VI - Considerar a possibilidade de desenvolvimento de métodos alternativos, como modelos matemáticos, simulações computadorizadas, sistemas biológicos "in

¹⁹ COBEA, 2007.

vitro", utilizando-se o menor número possível de espécimes animais, se caracterizada como única alternativa plausível.

Artigo VII - Utilizar animais através de métodos que previnam desconforto, angústia e dor, considerando que determinariam os mesmos quadros em seres humanos, salvo se demonstrados, cientificamente, resultados contrários.

Artigo VIII - Desenvolver procedimentos com animais, assegurando-lhes sedação, analgesia ou anestesia quando se confirmar o desencadeamento de dor ou angústia, rejeitando, sob qualquer argumento ou justificativa, o uso de agentes químicos e/ou físicos paralisantes e não anestésicos.

Artigo IX - Se os procedimentos experimentais determinarem dor ou angústia nos animais, após o uso da pesquisa desenvolvida, aplicar método indolor para sacrifício imediato.

Artigo X - Dispor de alojamentos que propiciem condições adequadas de saúde e conforto, conforme as necessidades das espécies animais mantidas para experimentação ou docência.

Artigo XI - Oferecer assistência de profissional qualificado para orientar e desenvolver atividades de transportes, acomodação, alimentação e atendimento de animais destinados a fins biomédicos.

Artigo XII - Desenvolver trabalhos de capacitação específica de pesquisadores e funcionários envolvidos nos procedimentos com animais de experimentação, salientando aspectos de trato e uso humanitário com animais de laboratório.

**ANEXO C – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DA FACULDADE
DE ODONTOLOGIA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO
GRANDE DO SUL**



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

Porto Alegre 22 de outubro de 2007

O Projeto de: Dissertação

Protocolada sob nº: 0048/07

Intitulado: Efeito da laserterapia na biomodulação da osteogênese em defeitos críticos em calota craniana de ratos

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli

Pesquisadores Associados: André Luiz Marinho Falcão Gordin

Nível: Mestrado

Foi aprovada pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS

em 22 de outubro de 2007.

Este projeto deverá ser imediatamente encaminhado ao CELA/PUCRS

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

**ANEXO D – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA E PESQUISA DA
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL**



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Ofício 1364/07-CEP

Porto Alegre, 16 de novembro de 2007.

Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS
apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 07/03983, intitulado:
"Efeito da laserterapia na biomodulação da osteogênese em defeitos críticos
em calota craniana de ratos".

Sua investigação está autorizada a partir da
presente data.

Relatórios parciais e final da pesquisa devem ser
entregues a este CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Roberto Goldim
COORDENADOR DO CEP-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)
Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli
M/Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Spranga, 9090 - Fone/Fax - CEP: 91510-000
Salv. 314 - Fone/Fax: (51) 3320-3348
E-mail: cep@pucrs.br
www.pucrs.br/cepppg/cep