

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA

Bruno Salles Sotto Maior

**EFEITO DA TERAPIA LASER DE BAIXA INTENSIDADE ASSOCIADA
A ENXERTO ÓSSEO LIOFILIZADO BOVINO NO PROCESSO DE
REPARAÇÃO ÓSSEA – ESTUDO CONDUZIDO EM RATOS**

Juiz de Fora
2008

BRUNO SALLES SOTTO MAIOR

**EFEITO DA TERAPIA LASER DE BAIXA INTENSIDADE ASSOCIADA
A ENXERTO ÓSSEO LIOFILIZADO BOVINO NO PROCESSO DE
REPARAÇÃO ÓSSEA – ESTUDO CONDUZIDO EM RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Neuza Maria Souza Picorelli Assis

Co-Orientadora: Profa. Dra. Rosangela Almeida Ribeiro

Juiz de Fora

2008

SOTTO-MAIOR, B. S. Efeito da terapia laser de baixa intensidade associada a enxerto ósseo liofilizado bovino no processo de reparação óssea – estudo conduzido em ratos. 2008. 90 f. (Curso de Pós-Graduação *stricto sensu* – Mestrado em Clínica Odontológica) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora (MG).

BRUNO SALLES SOTTO MAIOR

**EFEITO DA TERAPIA LASER DE BAIXA INTENSIDADE ASSOCIADA
A ENXERTO ÓSSEO LIOFILIZADO BOVINO NO PROCESSO DE
REPARAÇÃO ÓSSEA – ESTUDO CONDUZIDO EM RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Aprovado em ____/____/____.

Profa. Dra. Neuza Maria Souza Picorelli Assis
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Silvio Issáo Myaki
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – *Campus* São José dos Campos

Prof. Dr. Celso Neiva Campos
Universidade Federal de Juiz de Fora

AGRADECIMENTOS

A **Prof^a. Dr^a. Neuza Maria de Souza Picorelli Assis** e a **Prof^a. Dr^a. Rosangela Almeida Ribeiro**, pela dedicação, disponibilidade e competência na orientação desta dissertação. Agradeço o acolhimento e a oportunidade de aprendizado.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, na pessoa do **Prof. Dr. Josemar Parreira Guimarães** e da **Prof^a. Dr^a. Maria das Graças Afonso Miranda Chaves**, agradeço as oportunidades proporcionadas na realização deste curso de mestrado.

Ao Centro de Biologia da Reprodução e ao Biotério da Universidade Federal de Juiz de Fora, em especial a **Prof^a. Dr^a. Vera Maria Peters**, pela realização de toda a parte experimental deste trabalho.

A **Prof^a. Dr^a. Beatriz Julião Vieira** e ao **Prof. Dr. Fernando Monteiro Aarestrup** pelo auxílio nas análises dos resultados deste trabalho.

Aos meus **colegas da primeira turma** de Pós-Graduação-Mestrado em Clínica Odontológica da UFJF, que tive a oportunidade de conhecer e conviver. Aprendemos uns com os outros a sermos melhores como pessoas e profissionais.

À **toda minha família**, em especial à minha mãe **Myrian Salles Sotto Maior** pelo carinho e apoio, e ao melhor professor da minha vida, o meu pai, **Henrique Furlani Sotto Maior**, pelos ensinamentos profissionais e principalmente pelos ensinamentos da vida que estão sendo essenciais em toda essa minha caminhada.

À minha noiva, **Sabine Horn Miana**, pela paciência, compreensão e por estar sempre ao meu lado. Te amo.

Finalmente, agradeço a **Deus**, ser superior, por ter me concedido essa oportunidade e ter colocado todas essas pessoas em meu caminho.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi realizar uma avaliação histológica e histomorfométrica do efeito da associação da terapia laser de baixa intensidade e o enxerto ósseo bovino orgânico Gen-ox[®] no reparo de defeitos ósseos de fêmures de ratos *Wistar albinus* nas fases iniciais do processo de reparo. Cinquenta ratos foram divididos em três grupos de 25 fêmures cada, da seguinte forma: grupo I (controle), grupo II (Gen-ox[®]) e grupo III (LLLT e Gen-ox[®]). Os animais do grupo III foram irradiados, transcutaneamente, em quatro pontos ao redor do defeito a cada 48 horas. A primeira irradiação foi imediatamente após o procedimento. Em cada ponto, foi aplicada uma dose de 5 J/cm² (Ø~0,4; 70 mW) e a dose total por sessão foi de 20 J/cm². Os animais foram sacrificados com overdose de anestésico geral 1, 3, 5, 7 e 15 dias após a cirurgia. Para análise histológica dos dias 1, 3 e 5, os espécimes foram incluídos em parafina, feitos cortes seriados corados pela HE e analisados em microscopia de luz. Para a análise histomorfométrica, a média do volume de osso neoformado foi estimada pela captura digital (Axiovision[®]) de três áreas em cada espécime nos dias 5, 7 e 15. Os valores histométricos foram analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA), com $p \leq 0,05$ e pelo teste *post hoc* LSD. Os resultados mostraram que os espécimes do grupo III apresentaram maior concentração de fibras colágenas, intensa reação no periósteo celular oposto ao defeito nos dias 3 e 5 quando comparados com os grupos I e II. Foi observada maior formação óssea no grupo III em todos os períodos experimentais, com diferença estatisticamente significativa nos dias 5 e 15 quando comparado com os grupos I e II. Dentro dos parâmetros deste estudo, foi concluído que a LLLT associada ao enxerto ósseo bovino orgânico teve um efeito positivo no reparo de defeitos ósseos de ratos.

Descritores: Laser de baixa potência; regeneração óssea; substitutos ósseos.

ABSTRACT

The aim of this study was to assess histologically and histometrically the effect of the association of low level laser therapy and organic bovine bone graft Gen-ox[®] on the repair of bone defects on the femur of *Wistar albinus* rats during the early stages of bone repair. Fifty rats were divided in three groups of 25 femurs each, as follow: group I (control), group II (Gen-ox[®]) and group III (Gen-ox[®] and LLLT). The animals on group III were irradiated transcutaneously at four points around the defect every 48 h. The first irradiation was immediately after the procedure. At each point a dose of 5 J/cm² was given (Ø~0.4, 70 mW) and the total dose per session was 20 J/cm². The animals were killed by an overdose of general anesthetic 1, 3, 5, 7 e 15 days after surgery. For histological assessment at days 1, 3 and 5, the specimens were routinely processed by embedding in paraffin, serially cut and stained with H&E and analyzed under light microscopy. For histomorphometric assessment, the mean volume of the newly formed bone was estimated by digital capture (Axiovision[®]) of three areas in each specimen at days 5, 7 and 15. Statistical analyses of the mean values were performed using analysis of variance (ANOVA), with $p \leq 0,05$ and *post hoc* LSD test. The results showed that the specimens of group III presented a higher concentration of collagen fibers, intense reaction in the periosteum cell opposite to the defect at days 3 and 5 as compared to groups I and II. It was observed an increased bone formation in group III in all experimental periods of time. These results showed statistical significance at days 5 and 15 as compared to groups I and II. Within the parameters of this study, it was concluded that LLLT associated to organic bovine bone graft had a positive effect on the repair of bone defects of rats.

Descriptors: Low level laser; Bone regeneration; Bone substitutes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fotografia do Aparelho Twin Laser (MM Optics, São Carlos, SP, Brasil) utilizado no experimento.....	52
Figura 2	Frasco contendo enxerto ósseo bovino orgânico medular da linha GenOx [®]	53
Figura 3	Tricotomia.....	54
Figura 4	Incisão.....	54
Figura 5	Exposição do tecido ósseo.....	54
Figura 6	Defeito ósseo.....	54
Figura 7	Enxerto ósseo.....	54
Figura 8	Sutura.....	54
Figura 9	Aplicação do laser.....	55
Figura 10	Sistema óptico Zeiss para captura digital de fotomicrografias.....	56
Figura 11	Áreas microscópicas selecionadas para captura e morfometria..	57
Figura 12	Programa Axiovision [®] (Versão 4.5 para Windows), para morfometria semi-automática de fotomicrografias.....	57
Figura 13	Fotomicrografia do grupo I com 1 dia. Neutrófilos (setas), edema exsudativo (EX). Aumento original de 250X. Coloração HE.....	61
Figura 14	Fotomicrografia do grupo II com 1 dia. Neutrófilos (setas), edema exsudativo (EX), partículas do enxerto (EN). Aumento original de 250X. Coloração HE.....	61
Figura 15	Fotomicrografia do grupo III com 1 dia. Neutrófilos (setas), edema exsudativo (EX), partículas do enxerto (EN). Aumento original de 250X. Coloração HE.....	62
Figura 16	Fotomicrografia do grupo I com 3 dias. Margem óssea oposta a ferida óssea (MO); periosteio celular (PC); periosteio fibroso (PF). Aumento original de 250X. Coloração HE.....	62

Figura 17	Fotomicrografia do grupo II com 3 dias. Observar Margem óssea oposta a ferida óssea (MO); periosteio celular (PC); periosteio fibroso (PF). Aumento original de 250X. Coloração HE.....	63
Figura 18	Fotomicrografia do grupo III com 3 dias. Margem óssea oposta a ferida óssea (MO); periosteio celular (PC); periosteio fibroso (PF). Aumento original de 250X. Coloração HE.....	63
Figura 19	Fotomicrografia do grupo I com 5 dias. Margem óssea oposta a ferida óssea (MO); fibras colágenas (*); neoformação vascular (seta). Aumento original de 250X. Coloração HE.....	89
Figura 20	Fotomicrografia do grupo II com 5 dias. Margem óssea oposta a ferida óssea (MO); fibras colágenas (*); discreta produção de osteoide (X); neoformação óssea (ON); partículas de enxerto (EN). Aumento original de 250X. Coloração HE.....	64
Figura 21	Fotomicrografia do grupo III com 5 dias. Fibras colágenas; discreta produção de osteoide (X); neoformação óssea (ON). Aumento original de 250X. Coloração HE.....	65
Figura 22	Fotomicrografia da histomorfometria do grupo I com 5 dias após do procedimento cirúrgico. Aumento original de 250X. Coloração HE.....	66
Figura 23	Fotomicrografia da histomorfometria do grupo II com 5 dias após do procedimento cirúrgico. Aumento original de 250X. Coloração HE.....	67
Figura 24	Fotomicrografia da histomorfometria do grupo III com 5 dias após do procedimento cirúrgico. Aumento original de 250X. Coloração HE.....	67
Figura 25	Fotomicrografia da histomorfometria do grupo I com 7 dias após do procedimento cirúrgico. Aumento original de 250X. Coloração HE.....	68
Figura 26	Fotomicrografia da histomorfometria do grupo II com 7 dias após do procedimento cirúrgico. Aumento original de 250X. Coloração HE.....	69
Figura 27	Fotomicrografia da histomorfometria do grupo III com 7 dias após do procedimento cirúrgico. Aumento original de 250X. Coloração HE.....	69
Figura 28	Fotomicrografia da histomorfometria do grupo I com 15 dias após do procedimento cirúrgico. Aumento original de 250X. Coloração HE.....	71

Figura 29	Fotomicrografia da histomorfometria do grupo II com 15 dias após do procedimento cirúrgico. Aumento original de 250X. Coloração HE.....	71
Figura 30	Fotomicrografia da histomorfometria do grupo III com 15 dias após do procedimento cirúrgico. Aumento original de 250X. Coloração HE.....	72

LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS

Gráfico 1	Média da neoformação óssea por grupo com 5 dias de pós-operatório.....	66
Gráfico 2	Média da neoformação óssea por grupo com 7 dias de pós-operatório.....	68
Gráfico 3	Média da neoformação óssea por grupo com 15 dias de pós-operatório.....	70
Tabela 1	Resultados da Análise de Variância (ANOVA): comparação entre os grupos nos períodos experimentais estabelecidos.....	72
Tabela 2	Resultado do teste Post Hoc LSD para os valores de neoformação óssea entre os grupos.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
BMP	Bone morphogenetic protein - proteínas ósseas morfogenéticas
cm ²	Centímetro quadrado
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DFDBA	Decalcified freeze dried bone allograft - enxerto alógeno seco congelado desmineralizado
FDBA	Freeze dried bone allograft - enxerto alógeno seco congelado mineralizado
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos - fibroblast growth factor
FOB-USP	Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo
g	Grama
GaAs	Arseneto de Gálio
GaAlAs	Arseneto de Gálio e Alumínio
HE	Coloração hematoxilina e eosina
HeNe	Hélio Neônio
Hz	Hertz
IGF	Insulin-like growth factor - fator de crescimento de insulina
J	Joule
J/cm ²	Joule por centímetro quadrado
LIPUS	Ultra-som pulsado de baixa intensidade

LLLT	Low level laser therapy - terapia com laser de baixa intensidade
mW	Miliwatt
mW/cm ²	Miliwatt por centímetros quadrado
Nm	Nanometro
PDGF	Platelet derived growth factor - Fator de crescimento derivado de plaquetas
RNA	Ácido ribonucléico
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
W	Watt

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	19
2.1	BASES BIOLÓGICAS DO TECIDO ÓSSEO.....	19
2.2	REPARAÇÃO ÓSSEA.....	22
2.3	ENXERTOS ÓSSEOS.....	24
2.3.1	Enxerto ósseo bovino liofilizado.....	26
2.4	LASERTERAPIA NA REPARAÇÃO ÓSSEO.....	31
3	PROPOSIÇÃO.....	48
4	METODOLOGIA.....	49
4.1	ANIMAIS.....	49
4.2	GRUPOS.....	49
4.3	MATERIAIS, INSTRUMENTOS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS	50
4.4	APARELHO LASER.....	51
4.5	ENXERTO ÓSSEO.....	52
4.6	PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS.....	53
4.7	IRRADIAÇÃO LASER.....	55
4.8	Obtenção Das Amostras.....	55
4.9	ANÁLISES HISTOMORFOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA ..	56
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	58
4.11	ASPECTOS ÉTICOS.....	58
5	RESULTADOS.....	59
5.1	ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA.....	59

5.2	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA ÓSSEA.....	65
6	DISCUSSÃO.....	74
7	CONCLUSÕES.....	83
8	REFERÊNCIAS.....	84
9	ANEXO.....	90

1 INTRODUÇÃO

Perdas ósseas significativas podem ocorrer em função de acidentes, extrações dentárias, e patologias como doenças periodontais, osteomielites, cistos ou tumores. Dependendo da extensão, da localização e das características da lesão, o tecido ósseo consegue regenerar-se. Porém, em defeitos ósseos extensos, o organismo repara o local apenas com um tecido fibroso que não é compatível com a função do tecido ósseo. Situações desta natureza dificultam a reabilitação funcional e estética dos pacientes. Na tentativa de reconstrução total ou parcial dessas estruturas, foram desenvolvidas técnicas cirúrgicas que podem associar o uso de enxertos ósseos, com o objetivo de recuperar o contorno anatômico normal e permitir a reabilitação oral funcional e fisiológica com o uso de implantes e/ou próteses convencionais (KÜBLER et al., 2004; MARINS et al., 2004; MISCH, 2000; QUEIROZ et al., 2006; TAPETY et al., 2004).

Dentre os tipos de enxertos utilizados (autógeno, alógeno, xenógeno e aloplástico) para a substituição ou preenchimento de falhas ósseas, o enxerto ósseo autógeno apresenta os resultados mais favoráveis. É considerado como o padrão ouro para reconstrução de defeitos ósseos. Apresenta algumas vantagens biológicas tais como não induzir rejeição, não ser imunogênico e apresentar características osteoindutora e osteocondutora. Porém, apresentam algumas desvantagens como necessidade de intervenções em outros sítios cirúrgicos, quantidade de enxerto limitada, maior morbidade e maior período de convalescença (GRAZIANI et al., 2004; KÜBLER et al., 2004; TONG et al., 1998).

No intuito de superar estes problemas e as adversidades do enxerto ósseo autógeno, foram desenvolvidos biomateriais para enxerto sob a forma de blocos e partículas (MARINS et al., 2004). Dentre estes biomateriais pode-se destacar o enxerto xenógeno, que apresenta como vantagens à quantidade ilimitada de material, menor morbidade operatória por não necessitar de um sítio doador e características osteoindutora e osteocondutora. É um biomaterial obtido de animais e preparado por um processo químico que remove parcialmente o material orgânico deixando a porção inorgânica, composta de todos os minerais ósseos naturais como a hidroxiapatita, o carbonato e o fosfato. O crescimento ósseo ocorre dentro das

cavidades, onde antes existia o material protético, tendo como arcabouço o tecido mineral intacto (MISCH, 2000; QUEIROZ et al., 2006; TAPETY et al., 2004), o que é favorável nas reconstruções de defeitos ósseos (POLYZOIS et al., 2008).

Apesar das vantagens dos enxertos xenógenos, o processo de reparação ocorre de forma mais lenta (AL RUHAIMI, 2001; QUEIROZ et al., 2006), sendo necessário um tempo maior de espera para utilização da área enxertada com implantes. Nesse sentido, tratamentos coadjuvantes como oxigenação hiperbárica (WEISS et al., 2000), estimulação elétrica (WANG et al., 2003), ultra-som (LYON; LIU; MÉIER, 2003; OLIVEIRA et al., 2008), e irradiação laser são de grande relevância clínica, uma vez que permitem uma aceleração do processo de reparação, e possibilitam, assim, a reabilitação do paciente e seu retorno às atividades sociais e profissionais mais rapidamente.

A utilização da terapia laser de baixa intensidade (*Low-level Laser Therapy – LLLT*) foi introduzida como forma terapêutica há mais de duas décadas na Odontologia com evidências do seu efeito biomodulador sobre o processo de reparação de tecido ósseo (GERBI et al., 2008; HOSOKAWA et al., 2007; KNAPPE; FRANK; RODHE, 2004; LIRANI; LAZARETTI-CASTRO, 2005; NISSAN et al., 2006; SHIMIZU et al., 2007; SILVA; CAMILLI, 2006). Entretanto, a associação da *LLLT* com enxertos para tratamentos de defeitos ósseos é recente. Khadra et al. (2004a) demonstraram que a ação da laserterapia sobre o reparo e a remineralização óssea foi benéfica, promovendo formação óssea nos defeitos esqueléticos. Também foi demonstrado um resultado positivo na biomodulação do reparo ósseo quando associado com enxerto ósseo autógeno (WEBER et al., 2006) e com biomaterial bovino (GERBI et al., 2008; PINHEIRO et al., 2003). Uma ação favorável na estimulação da osteogênese durante as fases iniciais do reparo ósseo foi observada por Silva e Camilli (2006).

Frente ao exposto, verifica-se que a terapia a laser de baixa intensidade apresenta bons resultados na biomodulação do reparo ósseo. Entretanto, há poucos relatos de investigações sobre a associação da *LLLT* com biomateriais de enxerto, particularmente nas fases iniciais do processo de reparação. Desta forma, justifica-se a realização do presente estudo que se propõe a avaliar, *in vivo*, o efeito da terapia laser de baixa intensidade associada a enxerto ósseo liofilizado bovino nas fases iniciais do processo de reparação óssea em feridas de fêmures de ratos.

2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Para melhor compreensão do tema proposto, este capítulo será subdividido em tópicos.

2.1 BASES BIOLÓGICAS DO TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo apresenta-se como um tecido conjuntivo altamente especializado e mineralizado de origem mesenquimatosa, que se dispõe formando os ossos, estruturas rígidas e resistentes, que compõem o esqueleto. Ao constituir o esqueleto, o suporte mecânico do organismo, o tecido ósseo, além de servir de apoio para as contrações dos músculos esqueléticos, transformando-as em movimentos, proporciona proteção para as partes e órgãos moles. Todavia, os ossos são também reservatórios de cálcio, fosfato e outros íons e são essenciais na manutenção dos níveis desses elementos no sangue. Apesar do aspecto aparentemente inerte, os ossos crescem, são remodelados e se mantêm ativos durante toda a vida do organismo. Quando lesados, como em fraturas, são capazes de sofrer reparação, fenômeno que demonstra sua permanente vitalidade (ANDIA; CERRI; SPOLIDORO, 2006; KATCHBURIAN; ARANA, 1999).

Sua composição química é aproximadamente distribuída em 65% de material inorgânico. O principal sal inorgânico constituinte do osso são os cristais de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. O material orgânico corresponde a 35%, sendo responsável pela estrutura de suporte para a deposição dos sais inorgânicos. Do peso seco, 90% correspondem a proteínas colagenosas, principalmente tipo I; o restante é constituído de proteoglicanas e proteínas não-colagenosas como osteocalcina, osteopontina e osteonectina (ANDRADE et al., 2007; KATAGIRI; TAKAHASHI, 2002; SCHENK, 1996).

O tecido ósseo pode ser dividido em aspectos morfológicos e histológicos. Quanto aos aspectos morfológicos pode ser dividido macroscopicamente, em compacto, na região mais periférica do osso, e em esponjoso ou trabecular que

consiste em rede de trabéculas contendo espaços intercomunicantes que abrigam a medula óssea. Microscopicamente, o tecido maduro apresenta lamelas, camadas de fibras colágenas, principalmente tipo I, mineralizadas de forma paralela ou concêntrica ao redor de vasos sanguíneos formando o sistema harvesiano (ANDIA; CERRI; SPOLIDORO, 2006; RHO; KUHN-SPEARING; ZIOUPOS, 1998). Além do sistema harvesiano, o tecido ósseo apresenta dois componentes microscópicos básicos, células e matriz óssea, sobre a qual se deposita a parte mineral. As células são osteoblastos, osteócitos e osteoclastos (ANDIA; CERRI; SPOLIDORO, 2006; ANDRADE et al., 2007; KATAGIRI; TAKAHASHI, 2002;).

Os osteoblastos são células completamente diferenciadas derivadas de células osteoprogenitoras. Sua diferenciação e desenvolvimento são dependentes da liberação das proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs – *Bone Morphogenetic Protein*) e fatores de crescimento, como fator de crescimento de insulina (IGF – *Insulin-like Growth Factor*), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF – *Platelet-Derived Growth Factor*) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF – *Fibroblast Growth Factor*) (ANDRADE et al., 2007). Os osteoblastos apresentam características de células produtoras de proteínas e secretoras com abundante quantidade de retículo endoplasmático e complexo de Golgi. Estas células secretam proteínas colagenosas e não colagenosas encontradas na matriz óssea. Estes componentes interagem entre si e organizam-se fornecendo um arcabouço que permite a deposição de sais minerais, além de algumas destas moléculas atuarem diretamente na mineralização (ANDIA; CERRI; SPOLIDORO, 2006).

Os osteócitos são osteoblastos em estágio final de diferenciação que ficaram aprisionados na matriz óssea secretada; mostram diminuição gradativa da quantidade de organelas de síntese e secreção como o retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi, caracterizando pobre atividade metabólica, porém indispensável para a manutenção da homeostase óssea. Possuem diversos prolongamentos citoplasmáticos situados no interior dos canalículos ósseos que se estendem em direção a outros osteócitos e osteoblastos e células de revestimento. Estabelecem junções, tipo *gap*, entre as células, por onde estas irão receber nutrientes e informações sistêmicas (ANDIA; CERRI; SPOLIDORO, 2006). Esse arranjo permite aos osteócitos participar da regulação da homeostasia do cálcio sanguíneo, perceber a carga mecânica e transmitir essa informação às outras células dentro do osso (ANDRADE et al., 2007).

Os osteoclastos são células gigantes multinucleadas responsáveis pela reabsorção da matriz óssea, promovendo no tecido metabolicamente mais antigo escavações denominadas lacunas de Howship. Adjacentes à superfície óssea, os osteoclastos apresentam invaginações formando uma borda de escova. Circundando essa área existe uma zona citoplasmática que se assemelha a uma faixa denominada zona clara desprovida de organelas e rica em actina e miosina. Esse é o local responsável pela adesão dos osteoclastos à matriz óssea, criando um ambiente fechado onde serão liberadas enzimas proteolíticas, colagenases e outras hidrolases, e prótons, tornando o local ácido e favorecendo a dissolução de cristais de sais de cálcio (ANDIA; CERRI; SPOLIDORO, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO; 1999; SCHENK, 1996). Diferentemente dos osteoblastos que têm origem em células osteoprogenitoras, os osteoclastos originam-se do sistema fagocitário mononuclear (ANDRADE et al., 2007).

A matriz óssea é constituída por uma parte orgânica formada por proteínas colagenosas, colágeno tipo I, formando o tecido chamado de osteóide, e proteínas não colagenosas como: osteocalcina, que promove a ligação dos íons cálcio promovendo a mineralização; osteopontina, que tem importância na adesão dos osteoclastos e osteoblastos na matriz óssea; e osteonectina, que está relacionada à mineralização, porém sua função não está bem definida (ANDRADE et al., 2007). Além das proteínas colagenosas e não colagenosas há também as proteoglicanas e glicoproteínas adesivas e uma porção inorgânica formada por íons de fosfato e cálcio que irão constituir a hidroxiapatita e em menor quantidade bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato. O fosfato e o cálcio formam cristais de hidroxiapatita, que associados às fibras colágenas, fornecem a resistência e dureza características do tecido ósseo. Um importante grupo de glicoproteínas da matriz óssea são as proteínas ósseas morfogenéticas, responsáveis pela indução óssea. Existem mais de 20 BMPs com diferenças entre elas na capacidade de induzir a osteogênese, sendo que as BMPs 2, 6 e 9 apresentam o maior potencial na indução da diferenciação osteoblástica a partir de células osteoprogenitoras (ANDIA; CERRI; SPOLIDORO, 2006).

Quanto ao aspecto histológico, segundo Junqueira e Carneiro (1999), o tecido ósseo pode ser dividido em tecido ósseo primário (imaturo, trabecular ou embrionário) ou em tecido ósseo secundário (maduro ou lamelar). Apesar de ambos

apresentarem as mesmas células e os mesmos constituintes da matriz óssea existem diferentes organizações tridimensionais de suas fibras colágenas.

O tecido ósseo primário aparece no início da formação da estrutura óssea. No adulto é pouco freqüente persistindo apenas próximo às suturas dos ossos do crânio, nos alvéolos dentários, em alguns pontos de inserção de tendões, nos reparos ósseos, no início da consolidação de fraturas e em condições patológicas como doença de Paget, osteodistrofia, hipoparatiroidismo e tumores ósseos. A matriz óssea neste estágio apresenta fibras colágenas dispostas em várias direções, sem organização definida, pouco mineralizada e com grande número de osteócitos irregularmente distribuídos no interior das trabéculas ósseas neo-formadas (ANDIA; CERRI; SPOLIDORO, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; SCHENK, 1996).

O tecido ósseo secundário é a variedade normalmente encontrada nos adultos, que gradativamente substitui o tecido ósseo primário pela deposição gradual de estratos ou camadas de matriz, que o transformam da forma trabecular para lamelar. Como característica principal às fibras colágenas são organizadas em lamelas de 3 a 7 μ m de espessura, em camadas concêntricas em torno de um canal central denominado canal de Havers, por onde correm vasos sangüíneos e nervos. Em cada lamela as fibras colágenas estão paralelas umas às outras. Separando grupos de lamelas, ocorre freqüentemente o acúmulo de uma substância cimentante que é formada por uma matriz mineralizada com muito pouco colágeno. Os canais medulares de Havers comunicam-se entre si com a cavidade medular, e com a parte externa do osso por canais transversais ou oblíquos, os canais de Volkmann (ANDIA; CERRI; SPOLIDORO, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; SCHENK, 1996).

2.2 REPARAÇÃO ÓSSEA

Reparação é a capacidade que os tecidos apresentam de repor as suas estruturas lesadas. Um tecido lesado pode ser reparado segundo dois processos distintos, denominados regeneração e cicatrização. Regeneração é a reposição das estruturas lesadas por células com morfofuncionalidade semelhante àquela que

anteriormente existia. Cicatrização, por sua vez, é a reposição das estruturas lesadas por um tecido conjuntivo fibroso, chamado de tecido cicatricial (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; SCHENK, 1996).

O tecido ósseo exibe um potencial de regeneração surpreendente e restaura sua estrutura original e suas propriedades mecânicas, porém com certos limites e possibilidade de falhas, caso determinadas condições não sejam observadas. Alguns fatores que impedem ou dificultam o reparo ósseo são: falha de vascularização, instabilidade mecânica, defeitos de grandes volumes, infecções como osteomielites e tecidos competidores com alta atividade de proliferação (ALMEIDA et al., 2006; SCHENK, 1996).

A reparação óssea é semelhante em pequenas ou grandes injúrias e em fraturas ósseas ou defeitos cirúrgicos. Quando o tecido ósseo é lesado, o perióstio, vasos na cortical, medula e tecidos circundantes são rompidos. Ocorre um sangramento oriundo das margens do tecido ósseo lesado e dos tecidos moles vizinhos, formando um hematoma ou coágulo sangüíneo dentro do canal medular, entre as extremidades da fratura óssea e o perióstio. Simultaneamente à formação do coágulo, o tecido imediatamente adjacente à fratura necrosa e estimula intensa resposta inflamatória caracterizada por vasodilatação, exsudação do plasma, leucócitos e células mesenquimais. Por volta do terceiro ao quinto dia, o perióstio e o endóstio apresentam uma intensa proliferação de células osteogênicas. Esse processo evolui de modo a aparecer, após algum tempo, o calo ósseo o qual é constituído por tecido ósseo imaturo, que se formou de modo desordenado, caracterizado por arranjo irregular dos osteócitos e orientação irregular das fibras colágenas. Com o prosseguimento do processo de reparação, ocorre a remodelação óssea, na qual o calo torna-se desnecessário, sendo reabsorvido. As trabéculas são formadas e orientadas ao longo de linhas de esforços tornando-se funcionais (ANDIA; CERRI; SPOLIDORO, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; SCHENK, 1996). A velocidade deste processo depende de alguns fatores locais e sistêmicos como o tipo de tecido ósseo a ser reparado (cortical ou esponjoso), presença de infecção, hemorragias, imobilização local, idade e alterações nutricionais (AMADEI et al., 2006; TAPETY et al., 2004) e hormonais (MORAES et al., 2005).

Tapety et al. (2004) realizaram um estudo para avaliar o comportamento osteogênico das células durante a cronologia de regeneração óssea nos estágios iniciais. Foram utilizados no estudo fêmures de 12 ratos com defeitos de 1,4mm de

diâmetro divididos em dois grupos. No grupo controle foi realizado somente o defeito ósseo e no grupo experimental foi realizado defeito ósseo que foi tratado com enxerto ósseo bovino liofilizado. A análise imunohistoquímica foi realizada com 1, 3, 5, 7, 14 dias após o ato cirúrgico. Nos estágios iniciais, houve migração de células osteogênicas e de fosfatase alcalina. No quinto dia nova formação óssea em ambos os grupos. Nos estágios mais tardios da regeneração, 7 e 14 dias, os osteoclastos apresentaram atividade predominante no metabolismo ósseo, o que sugere a remodelação óssea. Em conclusão, os autores sugeriram que o volume final da regeneração depende de vários fatores, os quais incluem tamanho do defeito, presença de inflamação e idade do paciente.

Segundo Schell et al. (2006), a regeneração óssea é um processo complexo que envolve quatro fases: inflamação, calo ósseo imaturo, calo ósseo duro e remodelação. No local do defeito ósseo, os osteócitos que ali estão morrem por falta de nutrientes, já que o suprimento sangüíneo ali encontrado foi rompido. No local destes osteócitos, haverá lacunas ósseas que serão posteriormente preenchidas pelos osteoblastos que depositarão novo tecido ósseo. Este tecido será posteriormente remodelado pela ação dos osteoclastos. Durante o reparo ósseo ocorrem dois picos de ação dos osteoclastos. O primeiro ocorre durante a fase inflamatória, na qual é necessária a remoção do tecido ósseo necrótico; o segundo pico ocorre durante a fase de remodelação correspondente à reabsorção do tecido ósseo em excesso do calo ósseo.

2.3 ENXERTOS ÓSSEOS

Perdas ósseas alveolares significativas podem ocorrer em função de acidentes, perdas dentárias por extrações, e patologias como doença periodontal, cistos ou tumores. Dependendo da extensão, da localização e das características da lesão, o organismo consegue regenerar o tecido ósseo. Entretanto, em defeitos ósseos extensos, o organismo consegue apenas reparar o local com um tecido fibroso que não é compatível com a função do tecido ósseo (MISCH, 2000). Ao longo dos últimos anos, vários procedimentos cirúrgicos utilizando enxertos com osso biológico ou sintético foram desenvolvidos para o tratamento destes defeitos,

na tentativa de promover regeneração de um novo tecido ósseo que tenha características morfológicas e funcionais semelhantes às do tecido original. No intuito de superar os problemas causados por defeitos ósseos extensos, diversos laboratórios desenvolveram vários biomateriais para enxerto ósseo sob a forma de blocos e partículas (MARINS et al., 2004).

O critério para a seleção do material para enxerto é determinado pelas seguintes características: capacidade de produção óssea por proliferação celular através de osteoblastos transplantados ou por osteocondução de células da superfície do enxerto, capacidade de produzir osso por osteoindução de células osteoprogenitoras, capacidade do osso inicialmente formado de se transformar em osso medular maduro, manutenção do osso maduro ao longo do tempo sem perda após entrar em função, capacidade para estabilizar implantes quando colocados simultaneamente com enxerto, baixa taxa de infecção, fácil acesso, baixa antigenicidade e alto nível de confiabilidade (SPIEKERMANN et al., 2000).

Dentre os materiais de opção para a realização do enxerto incluem-se: enxerto autógeno, o enxerto alógeno, enxerto aloplástico e enxerto xenógeno.

O enxerto autógeno pode ser obtido de áreas extrabucais como o osso ilíaco e a calota craniana, e de áreas intrabucais como o túber, o mento e a região retromolar. O osso autógeno é aquele que apresenta o padrão mais próximo do ideal para a reconstrução de defeitos ósseos (BECKTOR et al., 2008; GRAZIANI et al., 2004; KUBLER et al., 2004; TONG et al., 1998).

Um aloenxerto é um tecido ósseo transplantado, da mesma espécie que o receptor, porém de genótipo diferente. O tecido ósseo é obtido de cadáveres, processado e, então, armazenado sob várias formas e tamanhos. O substrato orgânico remanescente contém a proteína morfogenética que atua nas células mesenquimais indiferenciadas da região vizinha à área receptora do enxerto e induz diferenciação de osteoblastos com posterior formação de tecido ósseo por osteoindução. Os principais tipos de aloenxerto são os enxertos alógenos mineralizados (FDBA – *Freeze Dried Bone Allograft*) e os enxertos alógenos desmineralizados liofilizados (DFDBA – *Decalcified Freeze Dried Bone Allograft*) (MISCH, 2000).

Os enxertos aloplásticos são as cerâmicas biocompatíveis como a de coral natural, fosfato de cálcio e hidroxiapatita sintética, vidros bioativos e polímeros. Os derivados inorgânicos sintéticos, como a hidroxiapatita e fosfato tricálcio, têm

recebido grande atenção como materiais de preenchimento, espaçadores e substitutos para os enxertos ósseos, principalmente devido a sua biocompatibilidade, bioatividade e características de osteocondução em relação ao tecido hospedeiro (MIRANDA et al., 2005; MISCH, 2000).

O enxerto xenógeno é obtido dos animais e é preparado por um processo químico que remove todo o material orgânico e deixa apenas a porção inorgânica, composta de todos os minerais ósseos naturais, hidroxiapatita, carbonato e fosfato. Atua como um material osteocondutor, ou seja, o crescimento ósseo ocorre dentro das cavidades onde antes existia o material protéico, tendo como arcabouço o tecido mineral intacto (MISCH, 2000).

Em 2007, Habibovic e Groot constataram que, mediante a melhoria da qualidade de vida e, conseqüentemente, o aumento da expectativa de vida da população, a utilização de enxertos ósseos tem crescido significativamente. A necessidade de desenvolvimento de novos materiais também foi mencionada, pois, embora os enxertos autógenos tenham sucesso clinicamente comprovado, eles trazem consigo alguns inconvenientes ao uso, além da limitada disponibilidade, como a necessidade de intervenção suplementar, aumento da duração da cirurgia e do risco de infecções, dor e desconforto no local doador. Em seu estudo de revisão de literatura, no qual deram ênfase aos biomateriais osteoindutores, os autores concluíram que estes têm ampla disponibilidade, não causam reações imunológicas e têm o mesmo desempenho biológico dos enxertos autógenos. Dentro de suas propriedades intrínsecas, foi citada a indução de crescimento de osso ectópico, ou seja, em ambiente não-ósseo.

2.3.1 Enxerto ósseo bovino liofilizado

Um dos dilemas da Implantodontia e da Cirurgia Buco-Maxilo-Facial é a questão sobre como tratar lesões ósseas extensas acompanhadas da perda do tecido duro. Durante os últimos anos, vários biomateriais foram desenvolvidos a partir de osso bovino, com características químicas semelhantes aos dos ossos humanos, para o uso em cirurgias ortopédicas e orais como uma alternativa ao enxerto autógeno. Comercialmente, materiais de enxerto ósseo de origem bovina

diferem de acordo com a sua composição, orgânica ou inorgânica, e apresentação física, sob a forma de partículas ou blocos (MARINS et al., 2004).

Spiekermann et al., em 2000, realizaram um estudo histológico e histomorfométrico com o objetivo de avaliar a formação óssea proveniente de um enxerto xenógeno (Bio-Oss®) em cirurgias de levantamento de seio maxilar. Este estudo envolveu um total de 15 procedimentos em 11 pacientes, com média de idade de 49,6 anos, seguindo a técnica descrita por Tatum, em 1986. As cavidades sinusais subantral foram preenchidas com a combinação de Bio-Oss® e sangue venoso. Após a fase de cicatrização com média de 6,8 meses, 22 biópsias ósseas foram realizadas com trefinas nas áreas enxertadas. As análises histomorfométricas apresentaram uma média de 14,7% de osso neoformado e material residual de enxerto em 29,7%. Histologicamente ficou evidente a neoformação óssea podendo ser comprovada pelas partículas de apatita formando pontes do trabeculado ósseo e as partículas do material de enxerto.

Al Ruhaimi (2001) avaliou o potencial osteogênico de três polímeros sintéticos: HTR (Bioplant, Norwalk, CT) que é uma resina não reabsorvida de polimetil-metilmacrilato com uma camada de hidróxido de cálcio; BOP (Tech International SA, Bélgica) polímero reabsorvido composto de metil-metacrilato e biogran (Implant Innovations); e vidro bioativo. Avaliou também três hidroxiapatitas de origem diferentes: hidroxiapatita derivada de osso bovino, Laddec; hidroxiapatita natural, porém derivada de osso humano, Dembone; e uma hidroxiapatita sintética, Osteograf. Foram utilizados 28 coelhos, 24 para o grupo experimental e quatro para o controle. Foram confeccionados defeitos de 5mm de diâmetro por 8mm de profundidade nas epífises mediais de ambas as tíbias. No grupo experimental, os defeitos foram preenchidos com os materiais designados, sendo oito defeitos para cada material. No grupo controle os defeitos foram deixados sem preenchimento. Os animais foram sacrificados após oito semanas e as peças coletadas. Metade dos espécimes foi descalcificada para análise histológica e a outra metade preparada para análise em microscopia eletrônica de varredura. O Laddec apresentou o melhor potencial osteogênico seguido pelo Biogran e Osteograf, respectivamente. O menor potencial osteogênico foi demonstrado pelos HTR e BOP e não houve formação de novo osso com o uso do Dembone.

Stavropoulos et al. (2003) avaliaram a formação óssea a partir da regeneração tecidual guiada entre o Bio-Oss® e o Biogran® com o uso de membrana

em um modelo animal. Foram utilizados neste estudo 18 ratos divididos em três grupos de seis animais. Os animais receberam uma membrana em forma de cúpula de teflon com 6mm de diâmetro na qual foi acrescentado Bio-Oss[®] no grupo teste 1 e Biogran[®] no grupo teste 2. O estudo incluiu ainda um grupo controle, no qual não houve acréscimo de material de enxerto na cúpula. Após um ano, os animais foram sacrificados e o exame histológico foi realizado nas áreas de osso neoformado, avaliando-se o volume de osso recém-formado e a presença de partículas de enxerto e tecido conjuntivo no espaço criado pela cúpula. Os autores relataram que no grupo teste 1 (Bio-Oss[®]) havia presença de partículas de enxerto incorporada ao novo tecido ósseo formado. O exame histológico revelou abundante formação óssea no grupo controle (88,2% da cúpula de teflon), enquanto que nos grupos testes 1 e 2 foi observada formação óssea de 23,1% e 12,6%, respectivamente. No grupo controle, o tecido neoformado apresentava continuidade com o tecido ósseo ao redor, sendo constituído de espaços medulares maduros. Nos grupos testes, Bio-Oss[®] e Biogran[®], o tecido neoformado também apresentou continuidade com o tecido ósseo e as partículas do enxerto estavam totalmente incorporadas. O tecido ósseo neoformado encontrava-se na porção mais inferior da cúpula, e as partículas do enxerto encontravam-se no meio de um tecido conjuntivo fibroso. Os autores concluíram que o uso de Bio-Oss[®] e Biogran[®] abaixo de membrana oclusiva não apresenta vantagens. Porém, como suplemento para regeneração tecidual guiada pode ser vantajoso em uma situação clínica envolvendo o risco de colapso de membrana.

Tapety et al. (2004) realizaram um estudo com o intuito de analisar a resposta das células frente ao enxerto ósseo bovino, Bio-Oss[®] (Geistlich-Pharma, Wolhunsen) em defeitos ósseos em fêmur de ratos, analisando a cronologia dos eventos celulares durante as fases iniciais de regeneração óssea. Trinta e dois ratos Wistar com 12 semanas e peso variando entre 400 e 450g foram divididos em dois grupos. No grupo experimental, nos fêmures direitos foram enxertadas partículas de Bio-Oss[®], enquanto que os fêmures esquerdos foram utilizados como grupo controle. Em ambos os grupos foram feitos defeitos ósseos com diâmetro de 1,4mm. Os fêmures foram avaliados imunohistoquimicamente com 1, 3, 5, 7 e 14 dias após o ato cirúrgico. No primeiro dia, foi observada a migração osteogênica para o interior das cavidades tanto no grupo controle quanto no experimental. No terceiro dia, imunohistoquimicamente, foi observada a migração de fosfatase alcalina para as

cavidades do grupo experimental. No quinto dia, foi reconhecida nova formação óssea nas cavidades dos dois grupos. No grupo experimental, foi observada uma fina camada de matriz óssea cobrindo o material de enxerto, Bio-Oss®. Com 7 e 14 dias, as cavidades do grupo controle e experimental apresentavam-se ocupadas por tecido ósseo e acompanhada de diferenciação de osteoblastos. Os autores concluíram que o Bio-Oss® representa uma excelente opção de material de enxerto promovendo atividade osteoblástica nas fases iniciais de regeneração óssea.

Queiroz et al. (2006) realizaram uma análise histológica do processo de reparo ósseo em crânios de coelhos submetidos a enxerto de osso liofilizado (BIOGRAFT, FOB-USP, Bauru – SP) e membrana de osso bovino (BIOPLATE-FOB-USP) tendo como controle o lado contra-lateral onde não foram utilizados osso e membrana. Em 30 animais, sob anestesia geral, foram confeccionados dois defeitos ósseos de 6mm no osso parietal por meio de uma trefina. Os defeitos ósseos, então, foram divididos em quatro grupos iguais de 15 defeitos da seguinte forma: grupo 1 – defeito ósseo sem enxerto e membrana; grupo 2 – defeito ósseo e enxerto; grupo 3 – defeito ósseo, enxerto e membrana; e grupo 4 – defeito ósseo e membrana. Esses animais foram sacrificados com 15, 30 e 60 dias. Em cada período de tempo, 10 animais foram sacrificados. Os fragmentos ósseos foram processados e analisados sob microscopia de luz e micrografias foram realizadas. Com 15 dias, no grupo 1, não foi observada presença de processo inflamatório, enquanto que nos grupos 2 e 3, as partículas do enxerto encontravam-se cercadas por tecido conjuntivo fibroso com a presença de processo inflamatório crônico caracterizado pela presença de macrófagos e células gigantes. No grupo 4, os espaços foram preenchidos por tecido conjuntivo fibroso com a membrana apresentando sinais de reabsorção e cercada por infiltrado inflamatório crônico. Com 30 dias, a cavidade do grupo 1 foi preenchida com tecido conjuntivo fibroso e teve as bordas da cavidade remodeladas com significativa neo-formação óssea. No grupo 2, fragmentos de osso liofilizado foram visualizados em intenso processo de reabsorção. O grupo 3 apresentou o centro da cavidade com poucos fragmentos de enxerto sendo a maioria reabsorvida e com tecido ósseo neoformado associado; a membrana foi quase totalmente reabsorvida e associada com infiltrado inflamatório crônico. No grupo 4, foi observado osso neoformado nas bordas das cavidades preenchidas com tecido conjuntivo fibroso e presença de infiltrado inflamatório crônico. A membrana apresentava altas taxas de reabsorção. No final do experimento, com 60 dias, o

grupo 1 apresentou as bordas das cavidades remodeladas com formação óssea, porém sem fechamento completo das cavidades e com tecido conjuntivo denso no interior. No grupo 2, houve intensa neoformação óssea nas bordas da cavidade com a presença de ilhas ósseas imaturas no centro. No grupo 3, as bordas das cavidades mostraram significativa neoformação e remodelação com as cavidades preenchidas com tecido ósseo neoformado e tecido conjuntivo denso. No grupo 4, as bordas das cavidades foram remodeladas e o osso neoformado estava presente dentro das cavidades em pequenas quantidades quando comparadas com os grupos 2 e 3. A membrana foi totalmente reabsorvida. De acordo com os resultados o uso da membrana cobrindo o defeito ósseo pode agir como uma barreira contra a migração de células adjacentes ao tecido conjuntivo criando espaço favorável para a angiogênese e neoformação óssea. Porém não houve formação óssea suficiente quando foi utilizada apenas a membrana. Com isso, a combinação com osso bovino, impedindo o colapso da membrana, e uma membrana, agindo contra a migração de células adjacentes ao tecido conjuntivo, resultou em aumento do efeito osteogênico.

Calixto et al. (2007) realizaram um estudo histomorfométrico em ratos para avaliar o reparo ósseo alveolar de extrações dentárias após o tratamento com enxerto ósseo. Foram realizados extrações dos incisivos superiores direitos dos animais. Os alvéolos foram tratados com enxerto ósseo bovino (Gen-Ox[®], Baumer, São Paulo, Brasil) ou com biomaterial a base de vidro bioativo (PerioGlass[®], USBiomaterials Corp., Jacksonville Beach, FL, Estados Unidos). No grupo controle somente foi realizado a extração dentária. Os animais divididos de acordo com a época de sacrifício, 1, 2, 3 e 9 semanas pós-operatórias, e o tratamento realizado. Os grupos de 1 e 3 semanas foram constituídos de 5 animais cada, nos quais foram realizadas análises histológicas. Os grupos de 2 e 9 semanas foram constituídos por 10 animais, nos quais foram realizadas análises histológica e histomorfométrica. Os grupos apresentaram resultados semelhantes com intensa resposta inflamatória, reação de corpo estranho, atraso na formação óssea, e deposição de fibras colágenas ao redor dos biomateriais. Com nove semanas foram observadas reabsorção de algumas partículas de enxerto. Histomorfometricamente foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos avaliados. Nos dois tempos avaliados, 2 e 9 semanas o grupo controle apresentou maior neoformação óssea quando comparado aos grupos experimentais. Entretanto o padrão de neoformação óssea, entre os grupos experimentais, foi diferente nos dois tempos avaliados. Com

duas semanas o grupo enxertado com osso bovino liofilizado apresentou menor formação óssea quando comparado ao grupo tratado com vidro bioativo. Porém com nove semanas a quantidade de tecido ósseo neoformado no grupo enxertado com osso bovino liofilizado foi maior que no grupo tratado com vidro bioativo. Frente a esses resultados os autores concluíram que os dois biomateriais, enxerto ósseo bovino e vidro bioativo, quando usados para a neoformação óssea de defeitos alveolares após extrações de dentárias em ratos, provocam atraso nas fases de neoformação óssea.

2.4 LASERTERAPIA NA REPARAÇÃO ÓSSEA

O uso da biomodulação a laser na área da saúde e na biologia está crescendo com os avanços das pesquisas e com a melhora substancial da habilidade dos clínicos quanto ao seu uso. Evidências permitem concluir que o laser de baixa intensidade pode influenciar no comportamento de muitos tipos de células, e efeitos múltiplos podem ocorrer simultaneamente (REDDY, 2003). Embora a aceleração da regeneração óssea pelo laser seja largamente relatada, o seu mecanismo de ação ainda é obscuro (OZAWA et al., 1998).

Cafalli et al. (1993) realizaram um estudo experimental sobre os efeitos da irradiação laser de baixa intensidade na regeneração osteocartilagínea em joelhos de coelho. Após a execução de lesões na cartilagem articular e osso subcondral dos joelhos, os animais foram sacrificados aos 15, 30, 45 e 60 dias de pós-operatório, sendo realizado nesta oportunidade, estudo histológico. Tanto a área correspondente à lesão produzida, como a cartilagem articular localizada na sua periferia, foram submetidas à aplicação da radiação infravermelha de um laser de baixa intensidade de HeNe com potência de 4J e comprimento de onda de 920nm, mediante três pulsos de 30 segundos. A caneta de aplicação foi mantida a uma distância de aproximadamente 4,0 cm da lesão. Os resultados mostraram que não houve qualquer reação de regeneração articular e que aos 60 dias de evolução a cartilagem danificada foi totalmente substituída por tecido conjuntivo de natureza cicatricial. Quanto à lesão do osso subcondral, observou-se evolução com formação de calo ósseo típico, que, entretanto, demonstrou velocidade de aparecimento mais

rápida e com maior intensidade nos espécimes irradiados em relação aos não-irradiados.

Em um estudo piloto realizado em 1994, Gordjestani, Dermaut e Thierens relacionaram o laser infravermelho de arseneto de gálio (GaAs, 904nm, 33,3mW/cm² e 20J/cm²) e o metabolismo ósseo. Defeitos ósseos circulares de 2,7mm foram criados no osso parietal de seis ratos subdivididos em dois grupos com três animais: o grupo experimental, no qual a radiação infravermelha foi aplicada diariamente no defeito esquerdo por 15 dias; e o grupo controle, que não recebeu radiação. Após 28 dias, o reparo ósseo foi avaliado por meio de cintilografia e foi possível constatar que não houve diferença na atividade metabólica do osso entre o grupo tratado com laser e o grupo controle.

Barushka, Yaakobi e Oron (1995) discutiram os efeitos do laser de baixa intensidade de HeNe no processo de reparo ósseo em tibia de ratos após realização de defeitos padronizados. Foram realizadas avaliações histomorfométricas, bioquímicas e quantitativas. A atividade da fosfatase alcalina e o acúmulo de cálcio foram bioquimicamente mensurados. A avaliação histológica revelou um preenchimento com tecido ósseo do local de ferimento em seis dias após a cirurgia, e um enchimento progressivo da abertura do ferimento por ossificação membranosa. A aplicação do laser de HeNe alterou as populações de osteoblastos e osteoclastos como reflexo do aumento da atividade enzimática da fosfatase alcalina, em comparação ao grupo não-irradiado. A análise histomorfométrica revelou um acúmulo mais rápido de osso reparador no local da ferida no grupo irradiado do que no grupo controle, sendo que nesse último grupo, o volume de osso trabecular diminuiu mais lentamente do que no grupo irradiado. Como conclusão, os autores mencionaram que a aplicação do laser de HeNe com tempo, energia e frequência apropriados, provavelmente afeta a população de osteoblastos e osteoclastos no local da ferida, principalmente como resultado de alterações na atividade enzimática da fosfatase alcalina.

David et al. (1996) investigaram o efeito radiológico, biomecânico e histológico da radiação laser de HeNe na reparação de fraturas em modelos animais. Eles utilizaram 62 ratos pesando entre 225 e 300g. Os animais foram submetidos à osteotomia na superfície anterior da tibia e posterior fixação interna das áreas osteomizadas com fios intramedulares. O pé direito de cada animal teve o local osteomizado irradiado transcutaneamente por varredura com o laser de HeNe

(sentido horário, 10mW, 632,8nm) por duas a seis semanas, enquanto que o pé esquerdo não foi irradiado. Os animais foram divididos em três grupos de acordo com o tempo de sacrifício (14, 21 e 28 dias). Cada grupo foi subdividido em mais três subgrupos de acordo com a dose de irradiação: controle, 2J/cm² e 4J/cm². Depois de sacrificados, os animais tiveram as tíbias submetidas a exame radiográfico, teste de força mecânica e histológica. Os exames radiológicos e histológicos não mostraram nenhum efeito destacado da radiação laser de HeNe no processo de reparação óssea. Entretanto, biomecanicamente, os ossos irradiados de dois dos seis grupos experimentais eram significativamente mais fracos que os controles. Assim, os autores concluíram que esses resultados foram insuficientes em demonstrar os efeitos do laser de HeNe no processo de reparação óssea. Por isso, sugeriram que mais pesquisas são necessárias para investigar o papel dos diferentes comprimentos de onda e intensidades do laser HeNe no processo de reparação de fraturas ósseas, preferencialmente usando modelos experimentais.

Luger et al. (1998) realizaram um estudo em animais utilizando método biomecânico para avaliar o efeito do laser de baixa intensidade no reparo ósseo, visto que foram encontrados efeitos positivos em estudos anteriores com base em critérios morfogênético, bioquímico e radiográfico, e em dados de microscopia eletrônica. Para isso, utilizaram dois grupos de ratos, com 25 espécimes cada um, que foram submetidos à fratura da tíbia e à fixação interna da mesma. O primeiro grupo foi tratado com o laser de baixa intensidade (HeNe, 632,8nm, 35mW), aplicado por via transcutânea, durante 30 minutos na área da fratura, diariamente durante 14 dias, enquanto que o segundo grupo serviu como controle. Após quatro semanas, os calos ósseos formados nas tíbias fraturadas foram analisados e submetidos à tensão até a falha. A carga máxima de falha, a rigidez estrutural da tíbia e sua extensão máxima foram mensuradas. No grupo irradiado, a carga máxima de falha e a rigidez estrutural da tíbia foram significativamente mais elevadas que no grupo não-irradiado, enquanto que a carga máxima de extensão foi reduzida. Além disso, foram encontradas quatro fraturas no grupo controle comparadas a nenhuma no grupo irradiado, o que contribuiu para os autores concluírem que o tratamento com o laser de baixa intensidade pode ter papel benéfico no reparo ósseo.

Ozawa et al. (1998) mencionaram que, embora a aceleração da regeneração óssea pelo laser seja relatada, os mecanismos de ação do laser ainda

são obscuros. Para determinar as células responsáveis pela ação do laser e o papel da radiação dessas células durante a reparação óssea, os autores investigaram os efeitos do laser de baixa intensidade em vários estágios de proliferação celular, na formação de nódulos em culturas de células ósseas, na atividade da fosfatase alcalina e da osteocalcina e na expressão de genes, utilizando células da calvária de ratos. As células isoladas eram irradiadas uma única vez com laser de GaAlAs, de emissão contínua, 830nm, 500mW, durante 15 dias. Os resultados permitiram sugerir que o laser, provavelmente, estimula a formação de osso por meio de duas funções: estimulação da proliferação celular, principalmente na formação de células da linhagem osteoblástica; estimulação da diferenciação celular, resultando no aumento de células osteoblásticas diferenciadas, com conseqüente aumento na formação óssea. Entretanto, foi constatado que esses papéis só podem ser exibidos em células imaturas, e não em osteoblastos diferenciados.

Dörtbudack, Haas, Pokorny (2000) discutiram a capacidade de bioestimulação de osteoblastos derivados de células mesenquimais, pelo laser diodo de baixa intensidade. Três grupos de dez culturas foram irradiados em intervalos de 3, 5 e 10 dias, utilizando um laser com os seguintes parâmetros: 690nm, 60 segundos cada aplicação, dose de 2,4J. Outros três grupos foram utilizados para controle. Após a aplicação de tetraciclina fluorescente nas culturas, foi observado que as culturas expostas ao laser mostraram uma fluorescência significativamente maior (indicativa de depósito ósseo) em relação aos grupos não-irradiados. Esses achados levaram os autores à conclusão de que a radiação laser de baixa intensidade, do tipo diodo pulsado, apresenta efeito de biomodulação em osteoblastos *in vitro*, podendo assim ser utilizada na osteointegração de implantes dentários.

Freitas; Baranauskas e Cruz-Hofling (2000) estudaram os efeitos do laser HeNe na osteogênese de fraturas cirúrgicas em ratos. A fratura foi feita com broca odontológica com 2mm de diâmetro em uma superfície cortical da tíbia. Vinte e quatro horas após a cirurgia começou o tratamento com o laser de HeNe (633nm de comprimento de onda – λ ; 1mW de potência). Para três grupos de animais, foram utilizadas as seguintes doses: 3,15J/cm²; 31,5J/cm²; e 94,7J/cm²; o tempo de exposição à radiação foi de 30 segundos, 5 e 15 minutos respectivamente. As tíbias contralaterais foram usadas como controle. Após o sacrifício dos animais no oitavo e no 15^o dia de tratamento, foram realizadas análises histológicas qualitativas através

de microscopia eletrônica de varredura. A aceleração no processo de formação óssea foi claramente observada nos animais tratados com doses de $31,5\text{J}/\text{cm}^2$ e $94,7\text{J}/\text{cm}^2$, sendo maior com a dose de $94,7\text{J}/\text{cm}^2$. No entanto, os tratamentos com doses de $3,15\text{J}/\text{cm}^2$ não apresentaram diferenças significativas em comparação aos resultados encontrados no grupo controle. A eficácia do tratamento com laser demonstrou-se dose-dependente. No oitavo e no 15^o dia, o efeito da dose de $3,15\text{J}/\text{cm}^2$ não apresentou diferença em relação aos controles. No entanto, doses de $31,5\text{J}/\text{cm}^2$ e $94,7\text{J}/\text{cm}^2$ causaram consolidação óssea progressiva e mais rápida, quando comparadas aos controles. Os resultados deste estudo demonstraram que o uso sucessivo diário de laser HeNe com doses de $31,5\text{J}/\text{cm}^2$ e $94,7\text{J}/\text{cm}^2$ após períodos de 7 e 14 dias de irradiação asseguraram melhor resultado em áreas lesadas, sendo a dose de $94,7\text{J}/\text{cm}^2$ mais efetiva. A aceleração do processo de reparação ossea foi observada ao microscópio eletrônico de varredura, de forma qualitativa, que permitiu identificar um tecido osseo mais organizado nos grupos experimentais.

Garavello-Freitas et al. (2003) realizaram um estudo para avaliar a cicatrização e a organização da matriz óssea durante o reparo ósseo de feridas cirúrgicas. Foram selecionados 36 ratos divididos em dois grupos com 18 animais. Em ambos os grupos foram realizadas feridas na tíbia dos animais com diâmetro de 1,8mm apenas em uma cortical. O grupo experimental foi irradiado com 1mW de laser de HeNe após 24 horas da cirurgia. Os tempos de exposição foram: 0,5; 5 e 10 minutos, correspondentes a uma energia de 0,03J; 0,3J e 0,9J, respectivamente. Cada tempo de exposição compôs um grupo com seis animais que posteriormente foi subdividido de acordo com a época do sacrifício: oito e 15 dias. Após o sacrifício os fêmures foram dissecados e fixados. A análise morfométrica foi baseada na mensuração da área trabeculada neoformada em contato com o osso primário. Secções histológicas coradas por picrossírius foram analisadas por luz polarizada para avaliar as mudanças estruturais na matriz óssea neoformada. Esse método permite uma avaliação indireta da fase de organização da matriz óssea baseado na birrefringência da fibra de colágeno. Para a análise estatística foi utilizado o teste de Tukey. Com oito dias, ocorreu um aumento significativo na área trabecular neoformada nas tíbias irradiadas com 0,3J e 0,9J comparadas ao grupo controle. Com uma dose diária de 0,9J (15 minutos de irradiação por dia), houve um aumento significativo no crescimento ósseo com oito dias quando comparado com o grupo de

15 dias. Porém, o grupo com irradiação diária de 0,3J não apresentou o mesmo aspecto. Entretanto, houve um aumento significativo na área neoformada no grupo controle quando comparado os grupos de oito e 15 dias. Pelo método de polarização–picrosírius foram reveladas faixas de fibras de colágeno paralelas no local do defeito no grupo irradiado com 15 dias. Essa organização foi mais evidente quando se comparou o grupo irradiado com o controle no tempo de oito dias. A terapia com laser de baixa intensidade estimulou o crescimento ósseo e a invasão concomitante de osteoclastos durante a primeira semana e acelerou a organização de matriz de colágeno (alinhando as fibras paralelamente), resultados não observados no grupo controle. Os osteoclastos ativos que invadiram o local regenerado foram, provavelmente, responsáveis pela diminuição da área trabecular no 15^o dia de irradiação. Com isso, os autores concluíram que o laser de baixa intensidade é eficaz na aceleração da consolidação de defeitos cirúrgicos produzidos em tíbias de ratos, deixando claro que a laserterapia pode ser uma ferramenta eficaz nos processos de reparação óssea.

Para avaliar o reparo ósseo em associação a osso orgânico bovino e à membrana óssea descalcificada, Gerbi et al. (2003) utilizaram laser de baixa intensidade (830nm, 40mW, sentido horário, 16J/cm² por sessão, sete sessões a cada 48 horas) em dois dos cinco grupos estudados. Uma amostra de 42 animais, ratos Wistar, foi dividida em cinco grupos: grupo I, controle com 6 animais, e 4 grupos experimentais com 9 animais. O grupo II foi tratado apenas com enxerto ósseo bovino (Gen-Ox[®] Baumer S/A Mogi Mirim – SP, Brazil), o grupo III, com a associação de enxerto ósseo bovino e LLLT; o grupo IV, com enxerto ósseo bovino e membrana óssea cortical descalcificada; e no grupo V com a associação de enxerto ósseo bovino, membrana óssea cortical descalcificada e LLLT. Foram criados defeitos cirúrgicos no fêmur dos ratos e realizado o tratamento de acordo com os grupos estudados. Após 15, 21 e 30 dias os animais foram sacrificados. Realizou-se avaliação histológica do reparo ósseo. Histologicamente constatou-se uma maior quantidade de fibras colágenas em estágios avançados de reparação óssea (15 dias) e um maior volume de trabeculado ósseo bem organizado, no fim do período experimental (30 dias), sugerindo o reparo completo dos defeitos ósseos tratados com o laser. Essas observações foram verificadas nos grupos irradiados em comparação aos grupos não-irradiados, o que permitiu aos autores concluírem que o efeito biomodulador do laser de baixa intensidade é favorável para o processo de

reparo ósseo associado ou não ao uso do osso liofilizado orgânico e da membrana biológica bovina.

Nicolau et al., em 2003, realizaram um estudo experimental para avaliar o efeito do laser de GaAlAs de baixa intensidade, 660nm de comprimento de onda, sobre a estrutura óssea e a atividade celular. Neste estudo, foram utilizados 24 animais divididos em dois grupos. Em todos os ratos foram realizados defeitos ósseos cirúrgicos nas pernas direitas. No grupo experimental realizou-se irradiação laser com $10\text{J}/\text{cm}^2$ com 2, 4, 6 e 8 dias após a cirurgia, enquanto que o grupo controle não recebeu qualquer tipo de tratamento. Ambos os grupos foram subdivididos em três tempos de sacrifício: 5, 15 e 25 dias. O comportamento do tecido ósseo foi analisado pelos índices da estrutura óssea e de formação e reabsorção óssea por meio de histomorfometria. Os resultados quanto ao volume ósseo, espessura trabecular, separação trabecular e número de trabéculas, nos dois grupos, foram semelhantes. Entretanto, os volumes ósseos dos animais irradiados com 5 dias após a cirurgia foram estatisticamente maiores do que o grupo controle. A formação óssea foi analisada pelo volume de osteóide, superfície de osteóide, superfície de osteoblasto e espessura de osteóide. Com 15 dias, a quantidade de osteoblastos e os volumes de osteóide nos animais irradiados foram estatisticamente maiores quando comparados ao grupo controle. Entre o 15^o e o 25^o dia após o sacrifício, ocorreu um aumento menor na taxa de aposição mineral nos dois grupos. Além disso, no grupo irradiado a taxa de aposição mineral foi maior no 15^o dia e 25^o dia quando comparado ao grupo controle. Com 5 e 25 dias, a quantidade de osteoclastos foi significativamente maior no grupo irradiado quando comparado ao não-irradiado. Em conclusão, o laser de baixa intensidade usado no período inflamatório do processo de reparo ósseo aumenta a atividade celular normal de reabsorção e formação.

Pinheiro et al. (2003) avaliaram a influência do laser não-cirúrgico no reparo ósseo de defeitos padronizados em fêmures de ratos, submetidos a enxerto de osso bovino inorgânico (Gen-Ox[®] ; Baumer S/A, Mogi Mirim, SP, Brasil). Os espécimes foram divididos em três grupos: o grupo I (n=6), o controle; o grupo II (n=9), aquele que recebeu apenas o material de enxerto, e o grupo III (n=9) o que recebeu, além do material de enxerto, o tratamento com o laser de baixa intensidade. Os animais irradiados receberam esse tratamento a cada 48 horas, sendo a primeira aplicação realizada logo após a cirurgia, de forma transcutânea em

quatro pontos em torno da ferida. Cada ponto recebeu uma dose de $4\text{J}/\text{cm}^2$, com parâmetros de 830nm e 40mW , somando uma dose de $16\text{J}/\text{cm}^2$ por sessão. Após o sacrifício dos animais com 15, 21 e 30 dias, os espécimes foram removidos e fixados com hematoxilina e eosina para análise em microscopia de luz. Observou-se reparo ósseo mais avançado nos espécimes irradiados em relação aos não-irradiados. Nos irradiados, evidenciou-se uma maior neoformação óssea, bem como uma maior proliferação de fibras colágenas no interior do defeito a partir de 15 dias após a cirurgia, também considerando a capacidade osteoindutora do enxerto ósseo. Assim, os autores concluíram que o laser de baixa intensidade produziu um efeito de biomodulação positivo sobre o reparo do defeito ósseo submetido a implante de osso bovino inorgânico.

Khadra et al. (2004a) discutiram os efeitos do laser de baixa intensidade de GaAIs na integração de implantes ósseos. O estudo cego placebo-controlado foi realizado em coelhos com duração de oito semanas. Os implantes foram fixados na superfície proximal de cada tíbia de 12 coelhos divididos aleatoriamente em um grupo irradiado e um controle. O laser utilizado foi do tipo contínuo, com espectro de 830nm , potência de 150mW , diâmetro de 18mm da ponta de aplicação. O tempo de tratamento foi de 20 segundos, resultando numa densidade de $23\text{J}/\text{cm}^2$. A aplicação teve início logo após a cirurgia e foi mantida diariamente por 10 dias consecutivos. Foram realizados testes de tensão, análise histomorfométrica, microanálise de dispersão de raios-X e análise de cálcio e fósforo da superfície de teste do implante. Essas mensurações sugeriram um ganho funcional no implante e uma maior osseointegração no grupo irradiado quando comparado com o grupo controle, confirmado pelo maior contato osso-implante no grupo irradiado. Os implantes irradiados mostraram uma melhor ligação ao osso do que os não-irradiados. A análise mineral sugeriu que os índices de cálcio e fósforo na superfície do implante aumentaram com a aplicação do laser. Os autores puderam então concluir que a maturação óssea se deu mais rapidamente no osso irradiado e que, dessa forma, o laser pode representar uma modalidade de tratamento eficaz em acelerar a osseointegração de implantes.

Khadra et al. (2004b) realizaram outro estudo para avaliar a laserterapia de baixa intensidade infravermelha no reparo de defeitos ósseos na calvária de ratos. Foram utilizados 20 animais divididos em dois grupos, controle e experimental. O grupo experimental foi irradiado por seis dias consecutivos com $23\text{J}/\text{cm}^2$ com laser

de GaAsAl. Os animais foram sacrificados com 14 e 28 dias para análise histoquímica, concentração de cálcio e fósforo e nível de proteínas insolúveis, e análise histomorfológica. Os autores encontraram maiores concentrações de cálcio e fósforo no grupo experimental com 14 e 28 dias ($p=0,02$ e $p=0,06$) e maior nível de proteínas insolúveis no grupo experimental nos dois tempos de sacrifício. Histologicamente observou-se maior formação de vasos sanguíneos e aumento ósseo no grupo experimental. Os autores concluíram que a *LLLT* apresenta um efeito favorável no reparo ósseo de defeitos em calvária de ratos, o que pode ser explicado pela promoção da angiogênese, produção de colágeno, proliferação e diferenciação de células osteogênicas e aumento da síntese de ATP.

Rochkind et al. (2004) realizaram um estudo experimental em modelo animal com o objetivo de comprovar a efetividade da irradiação a laser de baixa intensidade nos componentes orgânicos e inorgânicos de ferida óssea. Foram utilizados 29 animais nos quais foram realizados defeitos ósseos de 3mm no processo alveolar. Os animais foram divididos em quatro grupos. No grupo I, controle, com cinco ratos, foi realizado defeito ósseo no processo alveolar direito e o lado esquerdo foi deixado intacto. No grupo II, com oito ratos, o defeito ósseo foi preenchido com Bio-Oss[®]. No grupo III, com oito ratos, foram feitos uma ferida óssea no processo alveolar e tratamento com laser HeNe (632,8nm, 35mW) por 14 dias consecutivos. No grupo IV, com oito ratos, o defeito ósseo foi preenchido com Bio-Oss[®] e foi feito o mesmo protocolo de irradiação laser do grupo III. Após 14 dias os animais foram sacrificados e o tecido ósseo do processo alveolar sofreu análise física e química por meio de espectroscopia infravermelha. Os autores obtiveram resultados favoráveis estatisticamente significativos com a combinação da laserterapia de baixa intensidade e Bio-Oss[®] no tratamento pós-traumático. Baseado nos resultados os autores sugeriram que a terapia laser de baixa intensidade sobre defeitos ósseos pode melhorar a qualidade da reparação bem como reduzir o tempo terapêutico.

Woodruff et al. (2004) avaliaram o efeito da laserterapia de baixa intensidade na cicatrização de feridas em um estudo de meta-análise. Os resultados encontrados nos estudos avaliados apresentavam variações de certos parâmetros, tais como: modo de tratamento (com ou sem contato da ponteira do laser), potência do aparelho, comprimento de onda, dose aplicada, quantidade de sessões do tratamento e a frequência das dosagens. No entanto, os autores concluíram que a

laserterapia de baixa intensidade apresenta efeitos positivos quanto à cicatrização, como aumento da síntese de colágeno, aumento da força de resistência da cicatrização, redução do tempo de cicatrização e redução do perímetro e área da ferida.

Merli et al. (2005) realizaram um estudo com o intuito de avaliar o efeito do laser de baixa intensidade no processo de reparação óssea. Em 10 ratos Wistar foram realizadas feridas ósseas de 2mm nas duas pernas totalizando 20 fêmures. Foi utilizado o laser de GaAsAl de 670nm, 15mW e ponteira de 5mm de diâmetro, por meio da técnica de aplicação por varredura com 6J/cm². Os tempos de aplicação foram de 24, 48 e 72 horas após o ato cirúrgico. Os animais foram divididos em dois grupos: lado experimental irradiado e lado controle não-irradiado, sendo sacrificados após 14 dias. Os fêmures foram analisados histomorfometricamente, através de um *software*, Image Pro-plus para delimitar a área de osso formado. Como resultado, foi observada uma média de formação óssea mais significativa no grupo irradiado, além de uma massa óssea mais densa e menor *gap* quando comparado com o lado controle. Com esses resultados os autores concluíram que a terapia laser de baixa intensidade em ratos promove um melhor reparo de defeitos ósseos.

Foram destacadas no estudo de Stein et al. (2005), as habilidades do laser de baixa intensidade em promover o reparo ósseo também em seres humanos. Segundo esses autores, o laser de baixa intensidade, na dose apropriada, pode significativamente promover a proliferação e a diferenciação de osteoblastos humanos *in vitro*, quando comparados a células não-irradiadas. Eles realizaram um estudo no qual uma cultura de osteoblastos foi irradiada com o laser de HeNe com parâmetros de 632nm e potência de 10mW. O efeito da irradiação nos osteoblastos após 24 e 48 horas decorridas da segunda aplicação do laser foi quantificado pela contagem de células e pelo método de colorimetria por MTT (Brometo de Tetrazolim Dimetiliazol). Foi encontrado um aumento significativo de 31-58% na sobrevivência das células, e uma contagem mais elevada de células no grupo irradiado quando comparado ao grupo não-irradiado. A diferenciação e a maturação das células foram avaliadas por meio de marcadores osteogênicos, como a fosfatase alcalina a osteopontina e a sialoproteína óssea. Por fim, os autores puderam concluir que mediante uma taxa mais elevada de proliferação e diferenciação de osteoblastos no local da ferida, pode haver um aumento do acúmulo de cálcio e, conseqüentemente,

a promoção do reparo ósseo. Esses achados permitiram destacar as habilidades do laser de baixa intensidade em promover o reparo ósseo também em seres humanos.

Carvalho et al. (2006) avaliaram comparativamente a influência do laser GaAIs, de 650nm de comprimento de onda, sobre a ação das proteínas morfogenéticas ósseas em defeitos ósseos produzidos em fêmures de ratos. Utilizaram uma amostra composta por 12 ratos machos (*Rattus norvegicus*) de linhagem Wistar albino, mantidos confinados em caixas com temperatura ambiente constante e iluminação adequada. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais. Após o procedimento anestésico, foi realizada a retirada dos pêlos da face lateral da coxa direita, seguida de procedimento cirúrgico para permitir a visualização da região. Foi realizado um defeito ósseo empregando brocas diamantadas do tipo esféricas. Nos grupos 1 e 3 o defeito foi preenchido com uma pasta formada por substância osteoindutora Gen-Tech[®]. Os animais foram tratados com o laser de GaAIs, com dose pré-determinada de 4J/cm² e tempo de 80 segundos para uma área de 1cm². Os grupos 2 e 4 foram adotados como grupo controle. As amostras do osso foram retiradas para realização de procedimento histológico e análise morfométrica nos 7^º, 14^º e 21^º dias de pós-operatório. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística de variância (ANOVA). Os autores concluíram que a associação da aplicação do laser de baixa intensidade e a substância osteoindutora Gen-Tech[®] alcançou melhor resultado do que do que a aplicação de laser ou apenas o uso das BMPs.

Lirani-Galvão, Jorgetti e Silva (2006) realizaram um estudo com o intuito de comparar as conseqüências da laserterapia de baixa intensidade e do ultra-som pulsado de baixa intensidade (LIPUS), no processo de reparo ósseo. Para tal, foram utilizados 48 ratos, os quais foram divididos em três grupos e submetidos à osteotomia na tíbia. Um dos grupos, após ser osteomizado, foi submetido à aplicação do laser de baixa intensidade de GaAIs (parâmetros: 780nm, 30mW, 112,5J/cm²) e um segundo grupo, à aplicação do LIPUS (1,5mHz, 30mW/cm²), ambos durante 12 sessões (cinco vezes por semana). O terceiro grupo representou o grupo controle. Após 20 dias, os ratos foram sacrificados e as tíbias foram submetidas a um teste de dobra ou uma análise histomorfométrica. No teste de dobra, a carga máxima foi mais bem suportada pelo grupo submetido à laserterapia de baixa intensidade. A avaliação histológica revelou um aumento significativo no número de osteoblastos e no volume de osteóide no grupo submetido ao laser de

baixa intensidade. No grupo exposto ao LIPUS, observou-se e um aumento significativo no número de osteoclastos e de perda óssea. Esses achados confirmaram que há uma fase exata do reparo ósseo onde cada modalidade terapêutica pode ter efetividade máxima. O LIPUS, portanto, incentivou o reparo ósseo promovendo a reabsorção do osso na área osteomizada, enquanto que o laser de baixa intensidade acelerou este processo com a formação de osso.

Em 2006, Nissan et al. investigaram os efeitos da laserterapia de baixa intensidade em defeitos ósseos criados cirurgicamente em ratos. Foi utilizado o laser de GaAs com densidade de 4 e 22,4mW/cm² nos defeitos ósseos criados na mandíbula de ratos. Os espécimes foram divididos em dois grupos, sendo que em cada um, a cavidade cirúrgica esquerda serviu como controle e a direita foi tratada com uma energia específica (4 ou 22,4mW/cm²) por três minutos diários a partir da data da cirurgia. Os ratos foram então sacrificados após 1, 2 e 4 semanas de tratamento e foram pesquisados a formação de calo ósseo, o acúmulo de cálcio e a atividade da fosfatase alcalina, com o objetivo de quantificar a atividade osteogênica. Observou-se que quando utilizado o laser de 4mW/cm², houve um acúmulo significativamente maior de cálcio em duas semanas, do que no grupo onde se utilizou 22,4mW/cm². Nenhuma mudança foi verificada na atividade da fosfatase alcalina com a aplicação do laser. Esses resultados permitiram aos autores sugerir que o laser terapêutico de baixa intensidade é eficaz no processo de reparo ósseo em cavidades cirúrgicas, afetando o transporte de cálcio durante a formação do novo osso.

Em um estudo de revisão sobre o papel da fotoengenharia no processo de reparo ósseo, Pinheiro e Gerbi (2006) descreveram a laserterapia como uma ferramenta importante no estímulo da reparação óssea, com ênfase na sua utilização em culturas de células ósseas, luz laser no tecido ósseo e sucesso da fotoengenharia no reparo ósseo. Os resultados de inúmeros trabalhos indicaram propriedades fotofísicas e fotoquímicas de diferentes comprimentos de onda, como as responsáveis pelas respostas teciduais. O uso de parâmetros corretos e apropriados foi considerado eficaz na promoção de um efeito biomodulador positivo no reparo ósseo. Os resultados desses estudos indicaram que os ossos irradiados com laser infravermelho mostraram a proliferação de osteoblastos aumentada, deposição de colágeno e neoformação óssea, quando comparados ao osso não-irradiado. Foi proposto ainda que o efeito da laserterapia é mais eficaz se o

tratamento for realizado em estágios iniciais, quando a proliferação celular é mais elevada. A estimulação óssea pela diferenciação de osteoblastos e as respostas vasculares ao laser terapêutico foram consideradas os mecanismos responsáveis pela maior parte dos resultados clínicos positivos observados. Os autores indicaram que o efeito da laserterapia na reparação óssea não depende somente da dose total de radiação, mas também do tempo e da modalidade de aplicação. A densidade e a intensidade da energia foram consideradas parâmetros biologicamente independentes um do outro e essa independência pode esclarecer o sucesso ou a falha da terapia com laser de baixa intensidade.

Silva e Camilli, em 2006, em um estudo experimental, no qual avaliaram reparo ósseo em defeitos tratados com enxerto ósseo autógeno e laser de baixa intensidade, relataram o efeito bioenergético e bioelétrico da LLLT. O efeito bioenergético foi verificado por meio do aumento da produção de ATP, que promove o aumento da produção de ácido nucléico e conseqüentemente a divisão celular. O efeito bioelétrico foi verificado com a normalização do potencial iônico da membrana, e conseqüente normalização das funções das células. Além de induzir a proliferação e diferenciação de osteoblastos, a estimulação laser aumenta a quantidade de RNA mensageiro que sintetiza o colágeno tipo I, a proteína mais importante da matriz óssea. O aumento da produção de colágeno favorece a formação de tecido ósseo e a regeneração do defeito ósseo. Neste estudo, os autores utilizaram 61 animais nos quais realizaram defeitos de 3mm na calvária. O laser utilizado foi de GaAs. A aplicação foi feita três vezes por semana durante quatro semanas com uma dosagem de $5,1\text{J}/\text{cm}^2$ e $10,2\text{J}/\text{cm}^2$. A primeira aplicação ocorreu logo após a cirurgia. Os animais foram divididos em três grupos: não-irradiados (controle), irradiados com $5,1\text{J}/\text{cm}^2$ e irradiados com $10,2\text{J}/\text{cm}^2$. Cada grupo foi subdividido de acordo com o tempo de sacrifício: 1, 2, 4, e 24 semanas após a cirurgia. Após o sacrifício foram realizadas avaliações radiológicas e histomorfométricas. Uma semana depois da cirurgia não havia nenhuma evidência de reabsorção de margem nos locais da implantação no grupo irradiado com $10,2\text{J}/\text{cm}^2$, considerando uma intensa reabsorção no grupo controle e no grupo irradiado com $5,1\text{J}/\text{cm}^2$; uma área radiolúcida mais espessa foi observada ao redor dos enxertos. Na quarta semana depois da cirurgia, os grupos irradiados e o grupo controle apresentaram áreas radiopacas conectando o enxerto com a borda do defeito. Diferenças em radiopacidade e radiolucidez foram notadas nos enxertos dos três grupos, indicando

atividade de absorção do enxerto de osso. Os resultados histológicos revelaram células periosteais entre a margem do enxerto e a borda do defeito no grupo controle na primeira semana, enquanto que nos grupos irradiados com $5,1\text{J}/\text{cm}^2$ e $10,2\text{J}/\text{cm}^2$, o tecido observado na superfície do enxerto e perto da borda dos defeitos apresentava células indiferenciadas proliferando ao redor dos enxertos, com depósitos de osteóide. Na segunda semana o grupo controle apresentou depósitos ósseos na superfície do enxerto ósseo e na borda dos defeitos ósseos. Em alguns locais a nova formação óssea promoveu a união entre o enxerto ósseo e osso parietal. Nos grupos irradiados a deposição de tecido ósseo promoveu a união entre o enxerto e o osso parietal. Grande quantidade de tecido ósseo neoformado foi evidente no grupo irradiado com $10,2\text{J}/\text{cm}^2$. Na quarta semana após a cirurgia foram observadas alterações na forma e redução no volume do enxerto nos três grupos. Em adição, a deposição óssea promoveu a união entre o enxerto e o tecido ósseo. Após 24 semanas, a redução do volume de enxerto ósseo e alterações na forma puderam ser observadas nos três grupos. De acordo com os achados morfológicos, uma diferença significativa entre o tecido ósseo neoformado foi observada entre os grupos controle (0,2%) e o grupo irradiado com $5,1\text{J}/\text{cm}^2$ (1,4%). Durante o mesmo período foi observada maior formação óssea no grupo irradiado com $10,2\text{J}/\text{cm}^2$ (3,75%). Na segunda semana o volume ósseo neoformado foi de 8,7% no grupo controle e de 6,9% no grupo irradiado com $5,1\text{J}/\text{cm}^2$. Esta diferença não foi estatisticamente significativa. No mesmo período o grupo irradiado com $10,2\text{J}/\text{cm}^2$ obteve uma formação óssea maior de 13,48% com diferença estatística. Após a quarta semana, não houve diferença estatística entre os grupos controle e irradiados. Os autores sugeriram que a irradiação de laser nos defeitos de crânio de rato tratados com enxerto ósseo estimulou osteogênese durante as fases iniciais do processo curativo, e este efeito foi dose-dependente.

Weber et al. (2006) realizaram um estudo histológico com o objetivo de avaliar a eficácia da LLLT na cicatrização de defeitos ósseos associada a enxerto ósseo autógeno. Foi utilizado um laser de 830nm de comprimento de onda. Foram selecionados 60 ratos divididos em quatro grupos, a saber: grupo 1 – controle; grupo 2 – aplicação de LLLT no sítio cirúrgico; grupo 3 – aplicação de LLLT sobre o enxerto ósseo autógeno; e grupo 4 – aplicação de LLLT sobre o sítio cirúrgico e sobre o enxerto ósseo autógeno. A dose de LLLT utilizada foi de $10\text{J}/\text{cm}^2$ por sessão sendo realizadas oito sessões separadas com intervalos de 48 horas entre cada

sessão. Os animais foram sacrificados com 15, 21 e 30 dias. Os fêmures foram analisados histologicamente quanto ao infiltrado inflamatório, neoformação e reabsorção óssea e deposição de colágeno. Os autores observaram neoformação óssea maior nos estágios iniciais do processo de reparo ósseo, com 15 dias, tendendo a estabilizar com 21 dias em todos os grupos irradiados. Observou-se uma melhor remodelação óssea, quantitativa e qualitativamente, nos grupos 2 e 4, com intensa neoformação óssea e reabsorção do material de enxerto com 15 e 21 dias, e remodelação e maturação óssea com 30 dias, quando comparados aos grupos 1 e 3. Frente aos resultados, os autores concluíram que a terapia laser de baixa intensidade trans-operatória apresenta um efeito biomodulatório positivo na cicatrização de defeitos ósseos.

Pretel, Lizarelli e Ramalho (2007) avaliaram o reparo ósseo de defeitos em mandíbulas de ratos após a estimulação a LLLT infravermelho. Para isto, utilizaram um modelo experimental animal com 30 ratos Holtzman com média de 300g. Foram confeccionados defeitos cirúrgicos nas mandíbulas dos animais com 4mm de profundidade e 10mm de comprimento e divididos em dois grupos: controle e experimental. No grupo experimental foram realizadas aplicações únicas de LLLT com dose total de $178\text{J}/\text{cm}^2$ e energia total de 1,4J. Após 15, 45 e 60 dias os animais foram sacrificados com overdose anestésica. Realizou-se avaliação histomorfológica. Para avaliar a ação do laser os autores utilizaram uma escala atribuída aos diferentes eventos histológicos: inflamação, formação óssea, qualidade de tecido ósseo neoformado e grau de maturação das fibras colágenas. Os resultados demonstraram formação óssea nos dois grupos. Porém, com 15 e 30 dias o grupo laser apresentou menor grau de inflamação, maior quantidade de tecido ósseo neoformado e maior maturação das fibras colágenas. Entretanto, com 60 dias não foram observadas diferenças entre os dois grupos. Os autores concluíram que aplicação única de laser infravermelho de GaAlAs, em defeitos ósseos criados em mandíbulas de ratos, com 1,4J de energia e dose de $178\text{J}/\text{cm}^2$ nos parâmetros estabelecidos, acelera o reparo ósseo.

Gerbi et al. (2008) conduziram um estudo histológico para avaliar o efeito da fotobiomodulação laser no reparo de feridas ósseas tratadas com proteínas morfogenéticas e enxerto ósseo bovino. Foram utilizados 48 ratos Wistar entre 270 e 300g divididos em quatro grupos: controle, somente a aplicação LLLT sobre o defeito cirúrgico, somente a colocação do material de enxerto (Gen-Ox + GenPro) e

associação da aplicação da LLLT e colocação do material de enxerto. Foi utilizado um aparelho laser de 830nm com 40W de potência em quatros pontos de aplicação de $4\text{J}/\text{cm}^2$, iniciando no pós-operatório e com aplicações sucessivas a cada 48 horas até o 15º dia. Os animais foram sacrificados com 15, 21 e 30 dias para análise histológica descritiva e quantitativa. Os parâmetros utilizados foram: grau de reabsorção da cortical óssea e do material de enxerto, presença de tecido de granulação, intensidade da reação inflamatória, presença de células gigantes, densidade de fibras colágenas, número de sistema haversiano e quantidade e qualidade do tecido ósseo neoformado. Os resultados foram favoráveis à associação da LLLT ao enxerto ósseo e BMPs, o que foi comprovado pelo reparo total da cortical óssea e início de formação óssea com sistema haversiano com 15 dias, não observado nos demais grupos. Os autores concluíram que o uso de laser infravermelho foi efetivo na redução do tempo de reparo ósseo de defeitos preenchidos com enxerto ósseo bovino associado à BMP, o que ficou evidente com o aumento da deposição de colágeno, reparo da cortical mais rápido e mais precoce desenvolvimento do sistema haversiano.

Pinheiro et al. (2008) avaliaram a associação do laser de baixa intensidade, membrana, proteínas morfogenética e enxerto ósseo bovino (Gen-Ox) no tratamento de defeitos ósseos em fêmures de ratos. Foram utilizados 48 animais da raça Wistar divididos em quatro grupos: grupo 1, controle, somente o defeito ósseo; grupo 2, defeito ósseo e laserterapia; grupo 3, defeito ósseo, proteínas morfogenéticas, enxerto ósseo bovino e membrana; grupo 4, defeito ósseo, laserterapia, proteínas morfogenéticas, enxerto ósseo bovino e membrana. Os grupos foram sub-divididos de acordo com a época de sacrifício, 15, 21 e 30 dias. A terapia laser foi realizada com aparelho laser de 830nm com 40W de potência em quatros pontos de aplicação de $4\text{J}/\text{cm}^2$, iniciando no pós-operatório e com aplicações sucessivas a cada 48 horas até o 15º dia. Após o sacrifício os fêmures foram preparados para análise histológica descritiva e semi-quantitativa de acordo com os seguintes parâmetros: grau de reabsorção da cortical óssea e do material de enxerto, presença de tecido de granulação, intensidade da reação inflamatória, presença de células gigantes, densidade de fibras colágenas, número de sistema haversiano e quantidade e qualidade do tecido ósseo neoformado. Os resultados demonstraram histologicamente aumento do depósito de fibras colágenas com 15 e 21 dias e tecido ósseo mais organizado no final do trabalho com 30 dias nos grupos irradiados. Desta forma os autores concluíram que a biomodulação a laser em defeitos ósseos tratados com

proteínas morfogenéticas, enxerto ósseo bovino e membrana apresentam resultados favoráveis.

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo se propõe a avaliar, *in vivo*, o efeito da terapia laser de baixa intensidade associada a enxerto ósseo liofilizado bovino nas fases iniciais da reparação óssea de defeitos padronizados produzidos em fêmures de ratos.

Especificamente, o estudo se propõe a:

- Avaliar, qualitativamente, por meio de análise histopatológica descritiva, a resposta tecidual e o tecido ósseo neoformado com 1, 3 e 5 dias após o procedimento operatório em comparação com apenas enxerto ósseo e controle.
- Avaliar, quantitativamente, por meio de análise histomorfométrica, o tecido ósseo neoformado com 5, 7 e 15 dias após o procedimento operatório em comparação com apenas enxerto ósseo e controle.

4 METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS

Para o desenvolvimento deste estudo foram empregados cinquenta ratos (*Wistar Albinus*), machos, adultos, com peso variando entre 300-360 g. Estes animais foram cedidos pelo Biotério do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais.

Os animais foram mantidos em gaiolas. Em cada gaiola, com no máximo quatro animais foram mantidos em condições naturais de luz, umidade e temperatura e tratados com ração granulada e água *ad libitum*, antes e durante o período experimental (WEBER et al., 2006).

4.2 GRUPOS

Os cinquenta animais, foram divididos aleatoriamente em três grupos nos quais foram utilizados 75 fêmures:

- Grupo I – controle: 25 fêmures direitos, nos quais foram realizados apenas os defeitos ósseos;
- Grupo II – 25 fêmures esquerdos, nos quais foram realizados os defeitos ósseos preenchidos com enxerto ósseo orgânico bovino (GenOx[®]; Baumer S/A, Mogi Mirim, SP, Brasil);
- Grupo III – 25 fêmures esquerdos, nos quais foram realizados os defeitos ósseos preenchidos com enxerto ósseo orgânico bovino (GenOx[®]; Baumer S/A, Mogi Mirim, SP, Brasil) e irradiação laser diretamente sobre o defeito.

Vinte e cinco animais constituíram os grupos I e II, nos quais foram analisados os fêmures direito e esquerdo, e vinte e cinco animais constituíram o grupo

III, nos quais foram analisados apenas os fêmures esquerdos, com o intuito de evitar a ação sistêmica da laserterapia.

Os três grupos foram subdivididos em cinco subgrupos, com cinco fêmures em cada, de acordo com a data de sacrifício dos animais nos períodos de tempo de 1, 3, 5, 7 e 15 dias após a cirurgia (TAPETY et al., 2004).

4.3 MATERIAIS, INSTRUMENTAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

Os materiais utilizados para este estudo foram os seguintes:

- Cloridrato de Cetamina (VETANARCOL[®] – Konig S.A. Avellaneda, Argentina);
- Cloridrato de Xilasina (ROMPUM[®] – Bayer S.A., São Paulo, Brasil);
- Enxerto ósseo bovino (GenOx[®], – Baumer S.A., Mogi Mirim, São Paulo, Brasil);
- Campos descartáveis de TNT;
- Gazes estéreis;
- Luvas cirúrgicas estéreis (Lemgruber, Indústria Frontinense de Látex S/A, Eng. Paulo de Frontim, Rio de Janeiro, Brasil);
- Luvas de procedimento (Supermax – Embramac);
- Máscaras descartáveis (Descarpack);
- Toucas descartáveis
- Polivilnilpirrolidona-iodo
- Seringas estéreis descartáveis de 1ml com agulha (Plastipak – Becton Dickinson);
- Soro fisiológico
- Lâminas de barbear para tricotomia
- Lâminas de bisturi nº 15c (Solidor, Suzhou Kyuan Medical Apparatus Co LTDA, China);
- Fios de sutura seda 5-0 (Technofio, ACE – Indústria Comércio LTDA, Goiânia, Goiás, Brasil);

- Broca carbide esférica cirúrgica nº 8 (KG) de 2mm;
- Cabo de Bisturi Bard-Parker (Golgran Ind. e Com. de Instrumental Odontológico LTDA.);
- Descolador tipo Molt (Golgran Ind. e Com. de Instrumental Odontológico LTDA.);
- Afastadores de tecido mole (Golgran Ind. e Com. de Instrumental Odontológico LTDA.);
- Aplicador de amálgama (Golgran Ind. e Com. de Instrumental Odontológico LTDA.);
- Tesoura de Metzemaum (Golgran Ind. e Com. de Instrumental Odontológico LTDA.);
- Porta agulha Mayo (Golgran Ind. e Com. de Instrumental Odontológico LTDA.);
- Motor elétrico (Driller DL 600[®]; VK Driller, Jaguaré, SP, Brasil).

4.4 APARELHO LASER

Foi utilizado um aparelho laser de diodo de baixa intensidade (Figura 1), com as seguintes características:

- Laser de emissão infravermelho contínua;
- Semicondutores: Arsênio e Gálio;
- Comprimento de onda: 780 nm;
- Potência de pico: 70 mW;
- Forma de aplicação: fibra óptica;
- Área da ponta emissora: 4 mm².



Figura 1 – Fotografia do Aparelho Twin Laser (MM Optics, São Carlos, SP, Brasil) utilizado no experimento.

4.5 ENXERTO ÓSSEO

É uma matriz orgânica de osso bovino liofilizado, e seu preparo consiste, em obter cortical óssea descalcificada, totalmente livre de osso medular, e depois desidratada pelo processo de liofilização, sendo preservados todos os componentes orgânicos do osso (BMPs, colágeno e proteínas), e eliminado toda a parte mineral. Por possuir somente os componentes orgânicos do osso, induz a formação de tecido ósseo humano, altamente celularizado e vascularizados, com todas as características de um osso vivo, com a capacidade de acelerar o reparo ósseo (propriedade osteogênica) aliada a um potencial osteoindutor, já que as BMPs e os fatores de crescimento ósseo são mantidos intactos durante o processamento do material. A sua apresentação é na forma de partículas microgranuladas porosa, permitindo a invaginação de vasos sanguíneos e células para o seu interior. O Registro no Ministério da Saúde (RMS): 103.455.00001. (GERBI et al., 2003).



Figura 2 – Fotografia do frasco contendo enxerto ósseo bovino orgânico da linha GenOx[®].

4.6 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no biotério da Universidade Federal de Juiz de Fora por um único pesquisador previamente treinado e calibrado.

Os animais foram sedados com solução aquosa a 2% de Cloridrato de Xilasina (ROMPUM[®] – Bayer S.A. São Paulo, Brasil) e após 5 minutos anestesiados com Cloridrato de Cetamina (VETANARCOL[®] – König S.A. Avellaneda, Argentina), na proporção de 2:1 e 0,1ml da mistura para cada 100g de peso animal, via intraperitoneal (RODRIGUES, 2006). Os animais foram submetidos à tricotomia (Figura 3) na área operada com lâminas de barbear e antissepsia com polivinilpirrolidona-iodo. Sob condições cirúrgicas estéreis e com o animal em decúbito lateral, foi realizada uma incisão com bisturi Bard-Parker (Figura 4) e lâmina descartável número 15c na área femoral lateral dos animais com extensão de 2,5cm (CARVALHO et al., 2006). Os tecidos foram divulsionados e o tecido ósseo exposto (Figura 5), onde foi realizada uma perfuração óssea de 2mm de diâmetro e 2mm de profundidade com uma broca esférica nº 8 (Figura 6) com motor elétrico (Driller DL 600[®]; VK Driller, Jaguaré, SP, Brasil) com 1500rpm sob irrigação constante de solução salina. Nos grupos II e III, os defeitos ósseos produzidos foram preenchidos com enxerto ósseo orgânico bovino (GenOx[®]; Baumer S/A, Mogi Mirim, SP, Brasil)

com o auxílio de um aplicador de amálgama até cobrir por completo o defeito ósseo produzido (Figura 7). A pele foi suturada (Figura 8) com fio de seda 5-0 (MARINS et al., 2004). Após o procedimento cirúrgico foi administrado subcutaneamente uma dose de 0,3ml de meloxicam por animal.



Figura 3 – Tricotomia.



Figura 4 – Incisão



Figura 5 – Exposição do tecido ósseo.

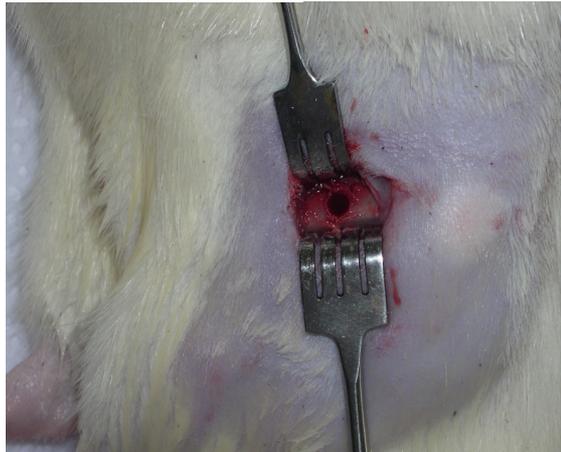


Figura 6 – Defeito

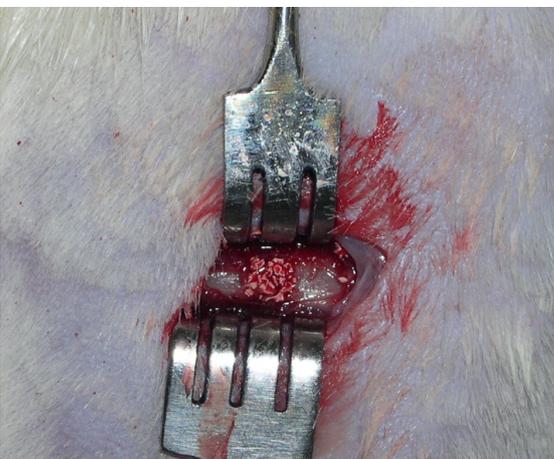


Figura 7 – Enxerto



Figura 8 – Sutura.

4.7 IRRADIAÇÃO A LASER

As lesões do grupo III foram submetidas à aplicação do laser de Arsênio e Gálio (780nm) com contato perpendicular entre a ponta ativa e a ferida em quatro pontos ao redor do defeito (Figura 9). Em cada sessão foram aplicadas quatro doses de $5\text{J}/\text{cm}^2$, por 10 segundos em cada dose, totalizando $20\text{J}/\text{cm}^2$ por sessão e tempo de aplicação de 40 segundos. A dose de $5\text{J}/\text{cm}^2$ está entre as doses recomendadas para reparos ósseos, que podem variar entre 1,8 a $5,4\text{J}/\text{cm}^2$ (PINHEIRO et al., 2003). Foram realizadas três sessões de laserterapia com o intervalo de 48 horas, iniciando-se imediatamente após a sutura do procedimento cirúrgico (GERBI et al., 2008; PINHEIRO et al., 2003; WEBER et al., 2006). A dose total foi de $60\text{J}/\text{cm}^2$ para os animais que receberam as três doses.

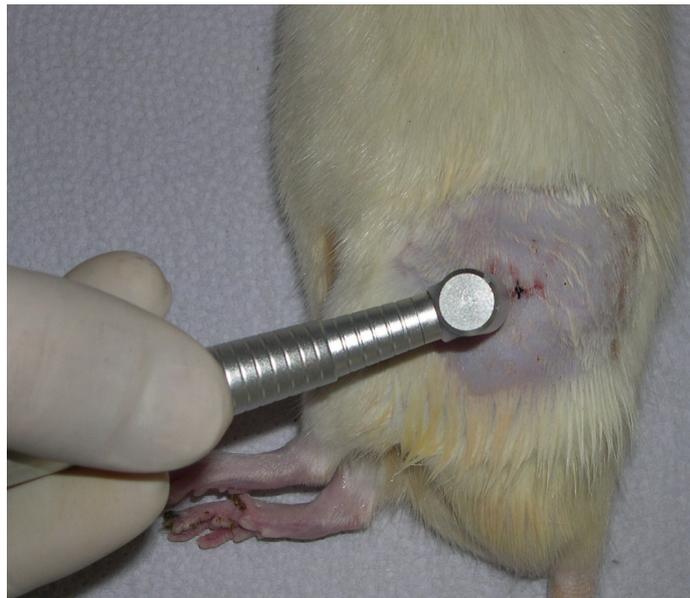


Figura 9 - Aplicação do laser.

4.8 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Decorridos com os tempos experimentais estabelecidos (1, 3, 5, 7 e 15 dias após o procedimento cirúrgico), os animais foram sacrificados com *overdose* de anestesia geral com o mesmo anestésico utilizado no procedimento cirúrgico.

Os fêmures foram dissecados e recortados com broca 1cm além do defeito ósseo e fixados em formalina por, no mínimo, 24 horas. Posteriormente foram descalcificados com solução de EDTA-2 e incluídos em parafina para a realização de cortes semi-seriados de 6µm de espessura longitudinais, a partir da cortical do defeito ósseo, e corados pela técnica da Hematoxilina e Eosina para avaliação sob microscopia de luz.

4.9 ANÁLISES HISTOMORFOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA

As amostras obtidas foram analisadas em sistema óptico microscópico Zeiss para digitalização de fotomicrografias (Figura 10). Todas as lâminas do experimento foram analisadas em aumentos de 250X, 400X E 1000X para avaliação histopatológica geral dos cortes.



Figura 10 – Sistema óptico Zeiss para captura digital de fotomicrografias.

A análise histopatológica dos cortes corados em hematoxilina e eosina foram realizadas com a finalidade de avaliação da intensidade e características da resposta inflamatória, composição do infiltrado inflamatório, intensidade e características do reparo tecidual mole e duro, bem como a organização do tecido ósseo neoformado nos dias 1, 3 e 5 por um avaliador previamente calibrado e

treinado. Os campos de cada grupo foram fotografados e os resultados foram apresentados de forma descritiva.

Com a finalidade de quantificação de tecido ósseo mineralizado, foram selecionadas para captura digital três fotomicrografias em cada lâmina nos dias 5, 7 e 15, em aumento de 40X, conforme metodologia esquemática apresentada na Figura 11, englobando os 2mm do defeito. A escolha das áreas para avaliação morfométrica foi determinada segundo trajeto de perfuração cirúrgica.

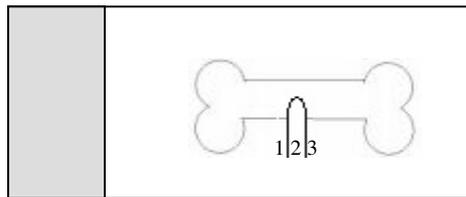


Figura 11 – Áreas microscópicas selecionadas para captura e morfometria.

As áreas foram fotografadas e as imagens capturadas analisadas por técnica semi-automática, com auxílio do programa Axiovision® (Versão 4.5 para Windows), aprovado pelo Instituto Nacional de Saúde (NIH), Bethesda, EUA. (Figura 12).

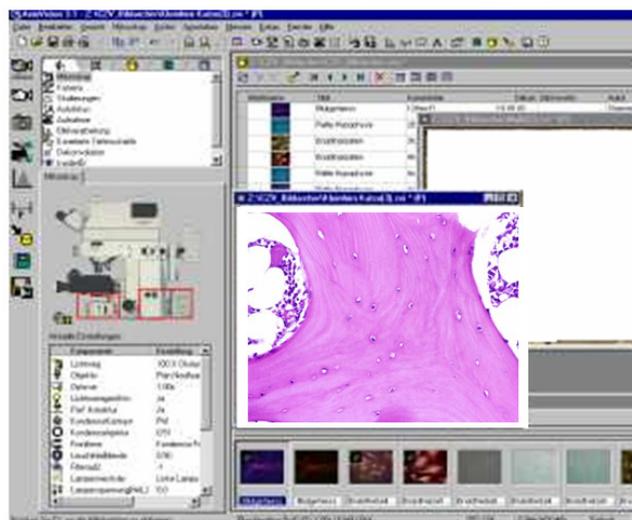


Figura 12 – Programa Axiovision® (Versão 4.5 para Windows), para morfometria semi-automática de fotomicrografias.

Foi obtida a soma da área total de matriz óssea neoformada, que foi circundada e medida em μm^2 nos três campos microscópicos pré-determinados.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foi usado o modelo de Análise de Variância (ANOVA) e o *Teste Post-hoc LSD*, sendo os grupos comparados entre si de acordo com os tempos de sacrifícios. O nível de significância adotado neste estudo foi de 5% ($p \leq 0,05$).

4.11 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COEBA), e aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal/UFJF, sob o protocolo 037/2007 (Anexo 1).

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA

No dia 1 após a confecção da ferida cirúrgica foi observada, em todos os grupos do experimento, reação inflamatória aguda em meio ao hematoma pós-operatório, característica esta típica do período inicial do processo de reparação.

O infiltrado inflamatório agudo das amostras apresentou predomínio de células polimorfonucleares, principalmente neutrófilos. Ainda, foram observados vasos dilatados associados à conseqüente formação de edema (Figuras 13, 14 e 15).

Foram observadas, no dia três após o procedimento cirúrgico, características típicas do início da fase de organização do reparo tecidual como a persistência do infiltrado inflamatório agudo predominantemente polimorfonuclear e edema, porém com menor intensidade inflamatória demonstrada microscopicamente por menor volume de edema na lâmina própria e discreto aumento da celularidade parenquimatosa conjuntiva, quando comparado com o dia 1.

No dia 3 não foi observada neoformação óssea em nenhum dos grupos do experimento, porém, as amostras do grupo III apresentaram, precocemente, reação celular periosteal intensa na cortical oposta à lesão em comparação com os grupos I e II. Esta reação foi observada a partir da presença de células de revestimento ósseo, localizadas no periósteo celular – camada periosteal intimamente associada à matriz óssea. Estas células se apresentam, quando em repouso, tipicamente dispostas em uma ou poucas camadas e morfológicamente pavimentosas, enquanto que em estímulo proliferativo as mesmas assumem morfologia cubóide alta com núcleos arredondados, intensamente basofílicos – características sugestivas de potencial mitótico e aumento de atividade metabólica para futura síntese protéica (Figuras 16, 17 e 18).

A partir do dia 5 após a confecção da ferida cirúrgica, as diferenças na quantidade e na organização de deposição do material extracelular colagenoso ficaram mais evidentes entre os grupos. Os grupos I e II apresentaram deposição de colágeno pobremente organizado, formando fibras eosinofílicas delicadas e

discretas, dispersas em interstício ainda acometido por edema e resquícios do hematoma inicial. Por outro lado, no grupo III, foi observada maior quantidade de deposição de colágeno, em relação aos grupos I e II, além de serem observadas claramente maior densidade de feixes organizados e maior quantidade de vasos sanguíneos neoformados.

Ainda neste período, pôde ser observado o início do processo de formação óssea, com produção de osteóide em todos os grupos do experimento, correspondendo ao período de proliferação e síntese da reparação tecidual. Foi observado, nos grupos II e III, maior intensidade do processo de síntese associada à maior produção de osteóide e, início de sua mineralização, originando osso imaturo, desorganizado (trançado) em ambos os grupos, com maior organização e maturação no grupo III (Figuras 19, 20, 21).

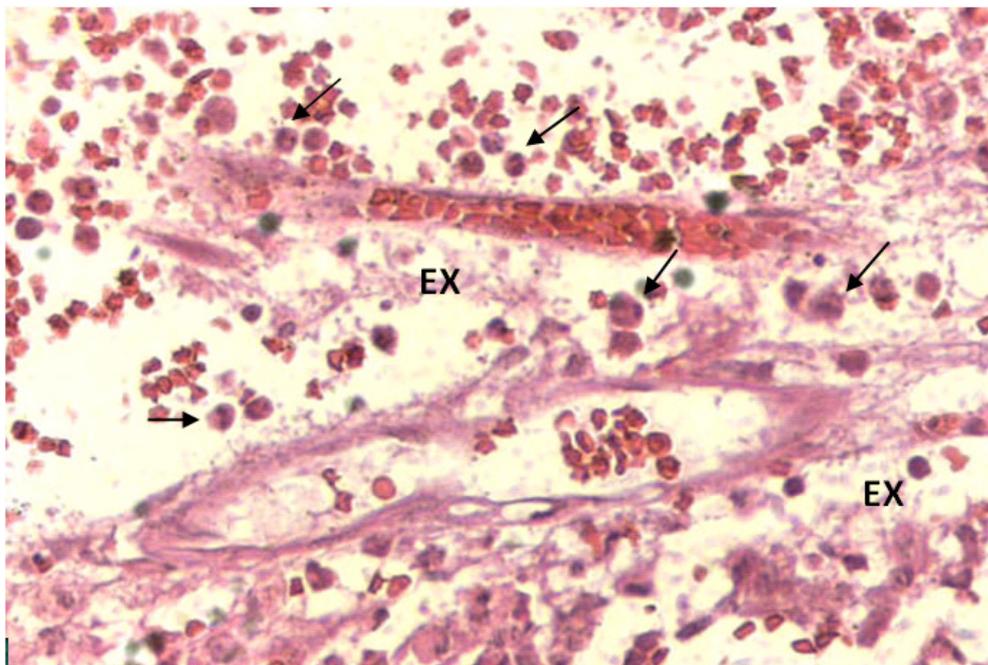


Figura 13 – Fotomicrografia do grupo I com 1 dia. Neutrófilos (setas), edema exsudativo (EX). Aumento original de 250X. Coloração HE.

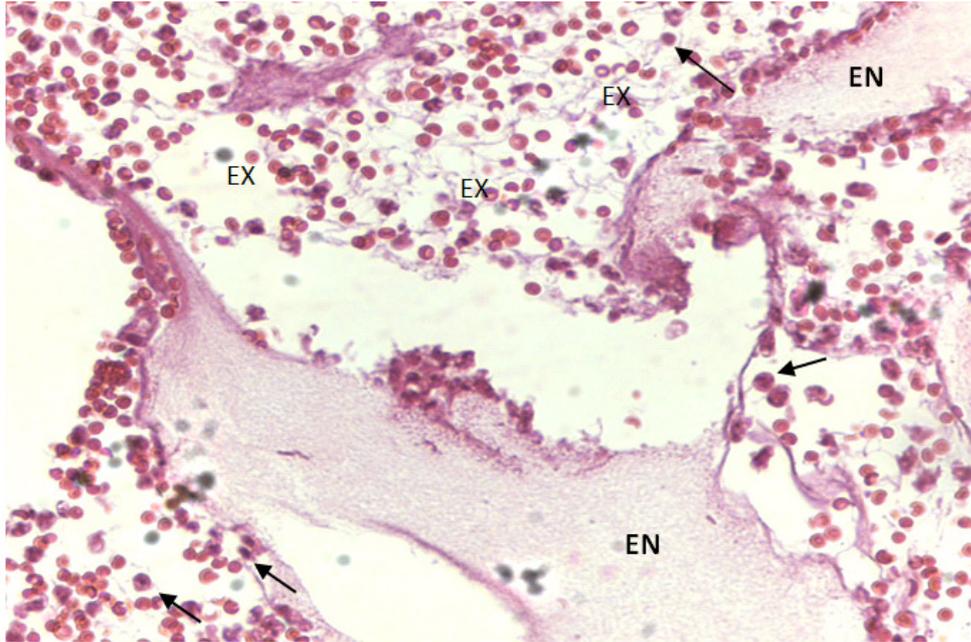


Figura 14 – Fotomicrografia do grupo II com 1 dia. Neutrófilos (setas), edema exsudativo (EX), partículas do enxerto (EN). Aumento original de 250X. Coloração HE.

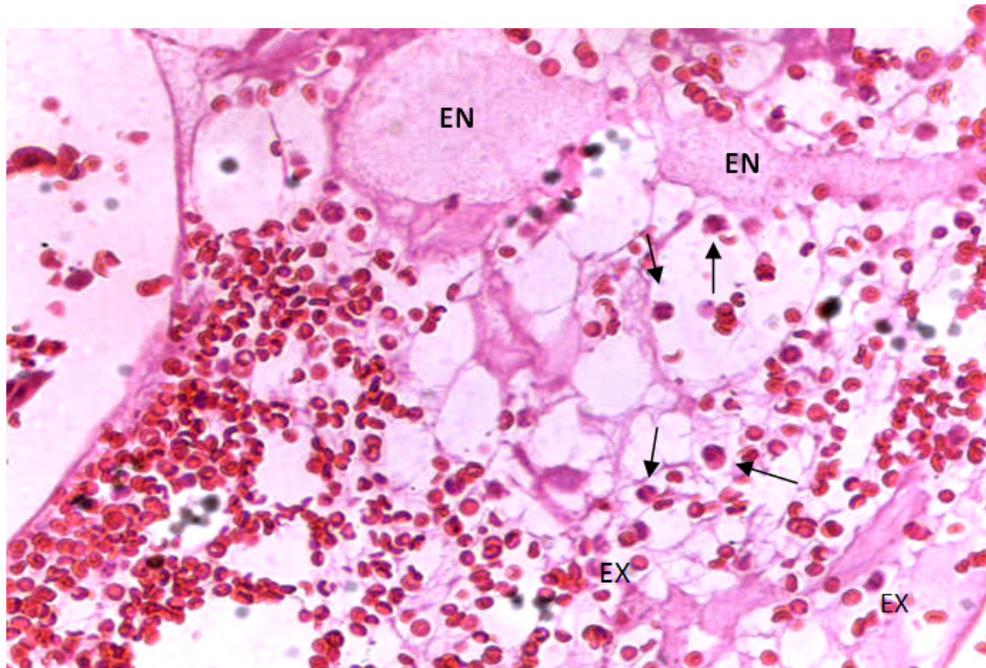


Figura 15 – Fotomicrografia do grupo III com 1 dia. Neutrófilos (setas), edema exsudativo (EX), partículas do enxerto (EN). Aumento original de 250X. Coloração HE.

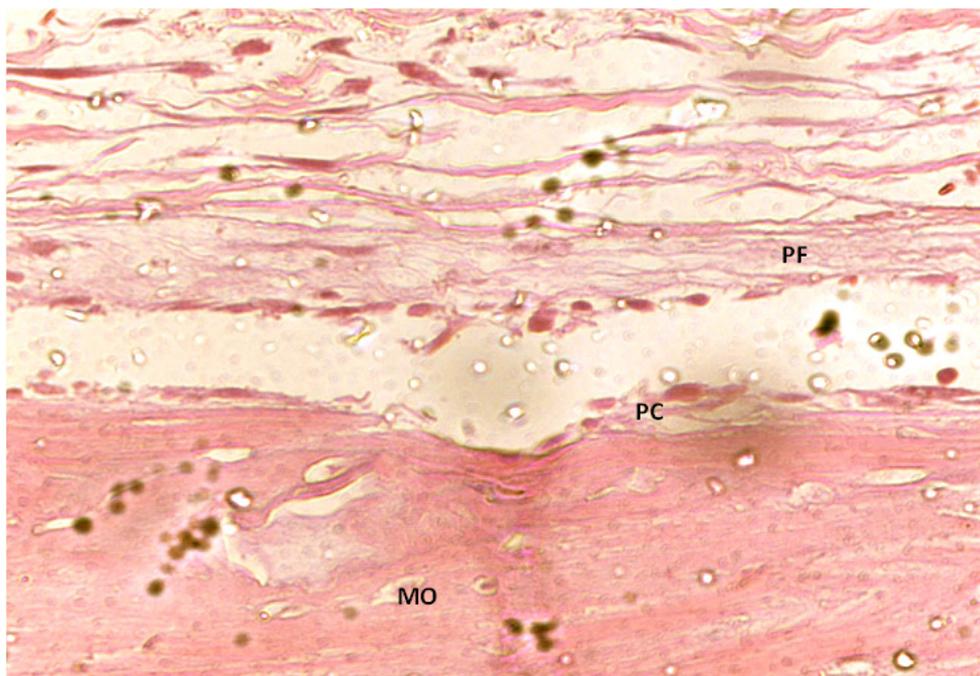


Figura 16 - Fotomicrografia do grupo I com 3 dias. Margem óssea oposta a ferida óssea (MO); periósteo celular (PC); periósteo fibroso (PF). Aumento original de 250X. Coloração HE.

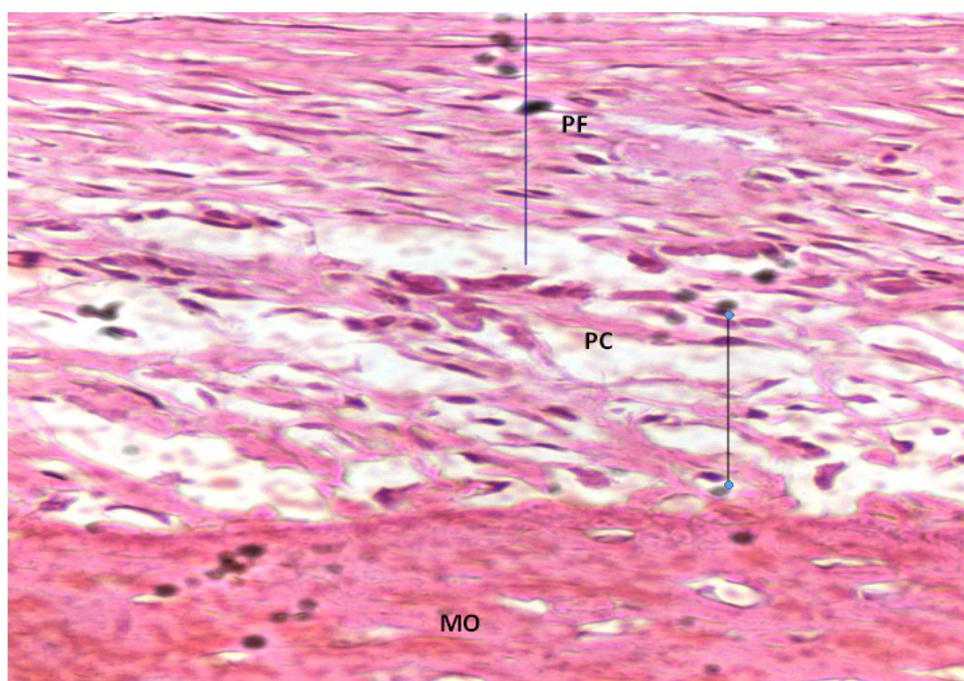


Figura 17- Fotomicrografia do grupo II com 3 dias. Observar Margem óssea oposta a ferida óssea (MO); periósteo celular (PC); periósteo fibroso (PF). Aumento original de 250X. Coloração HE.

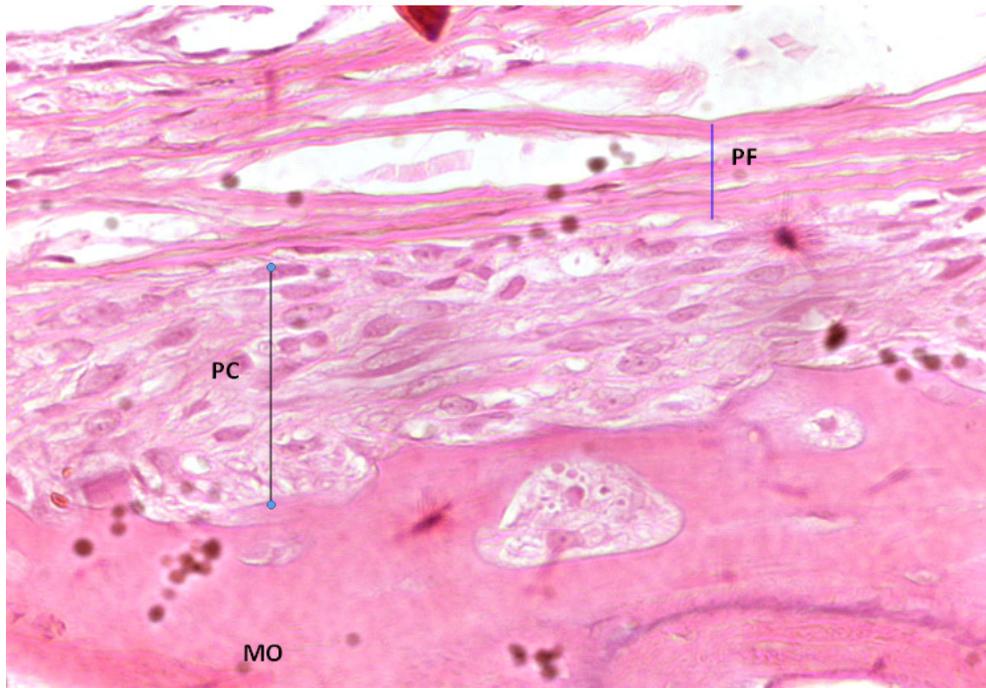


Figura 18 - Fotomicrografia do grupo III com 3 dias. Margem óssea oposta a ferida óssea (MO); periósteo celular (PC); periósteo fibroso (PF). Aumento original de 250X. Coloração HE.

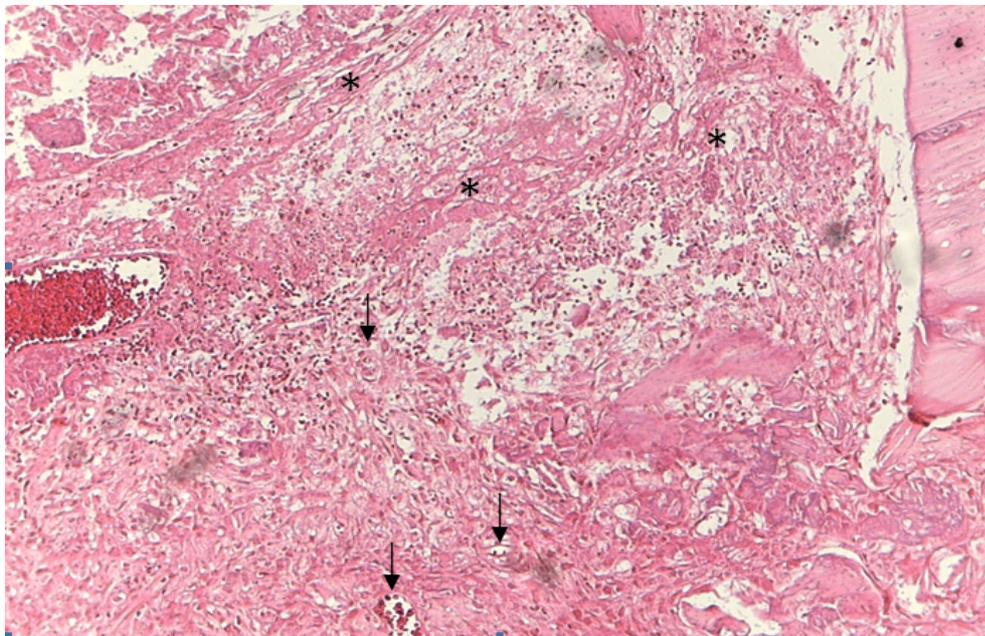


Figura 19 – Fotomicrografia do grupo I com 5 dias. Margem óssea oposta a ferida óssea (MO); fibras colágenas (*); neoformação vascular (seta). Aumento original de 250X. Coloração HE.

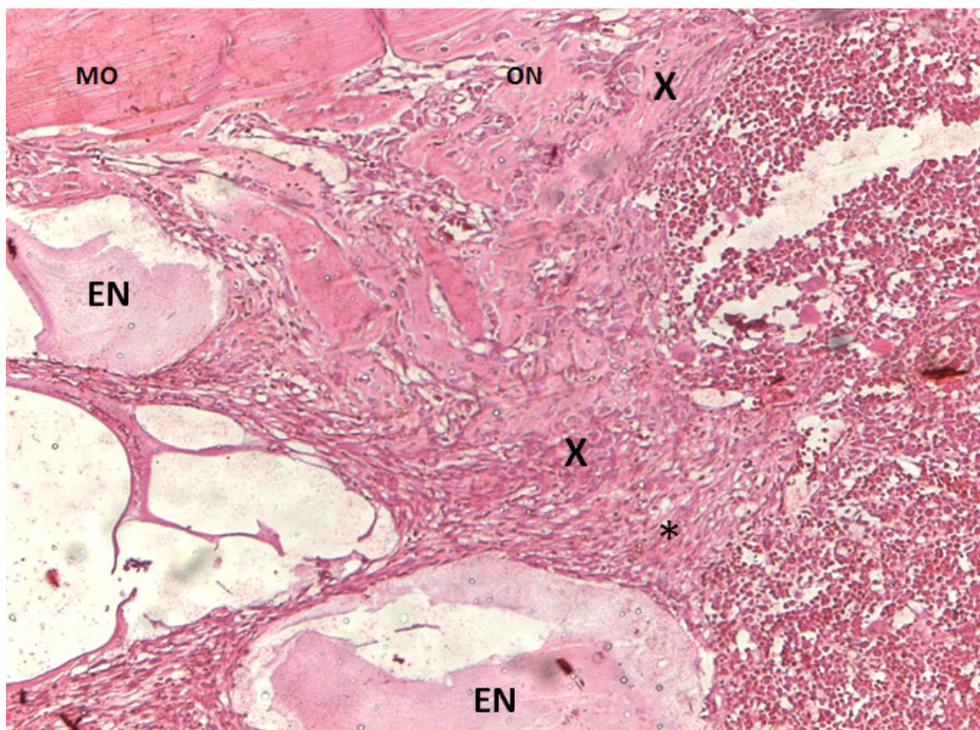
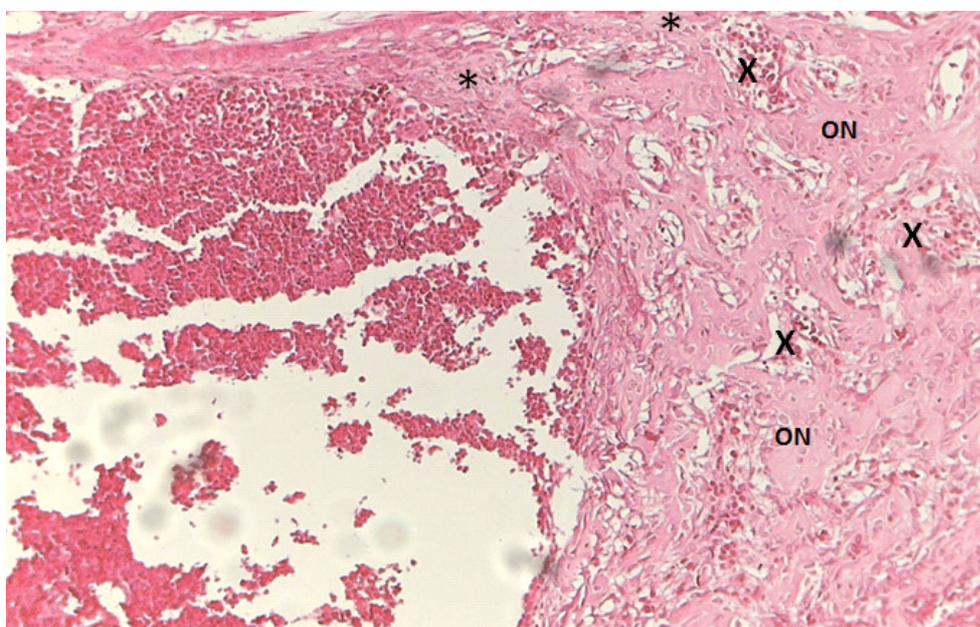


Figura 20 - Fotomicrografia do grupo II com 5 dias. Margem óssea oposta a ferida óssea (MO); fibras colágenas (*); discreta produção de osteoide (x); neoformação óssea (ON); partículas de enxerto (EN). Aumento original de 250X. Coloração HE.



5.2 AN Figura 21 – Fotomicrografia do grupo III com 5 dias. Fibras colágenas; discreta produção de osteoide (X); neoformação óssea (ON). Aumento original de 250X. Coloração HE.

A média de neoformação óssea do grupo I para o dia 5 foi de $705,4775\mu\text{m}^2$, enquanto que para os grupos II e III foram $565,0925\mu\text{m}^2$ e $1962,678\mu\text{m}^2$, respectivamente (Gráfico 1). Na análise de variância (ANOVA) observou-se que existe diferença estatisticamente significativa de pelo menos um dos grupos ($p=0,021$) com no tempo de sacrifício de 5 dias (Tabela 1). Utilizando o teste LSD conclui-se que existe diferença estatística entre o grupo III quando comparado aos grupos I e II, ($p=0,021$ e $p=0,012$). O grupo II apresentou menor formação óssea, porém a diferença não foi significativa quando comparado ao grupo I ($p=0,778$) (Tabela 2). As figuras 21, 22 e 23 apresentam a medida de neoformação óssea em uma lâmina de cada espécime de cada grupo.

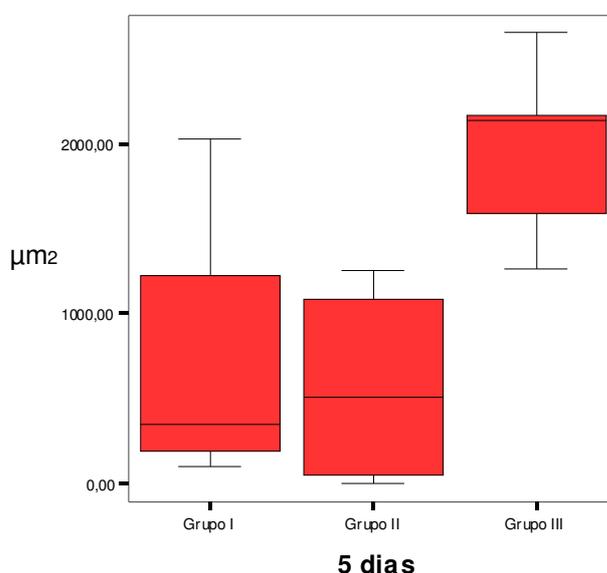


Gráfico 1 – Média da neoformação óssea por grupo com 5 dias de pós-operatório.

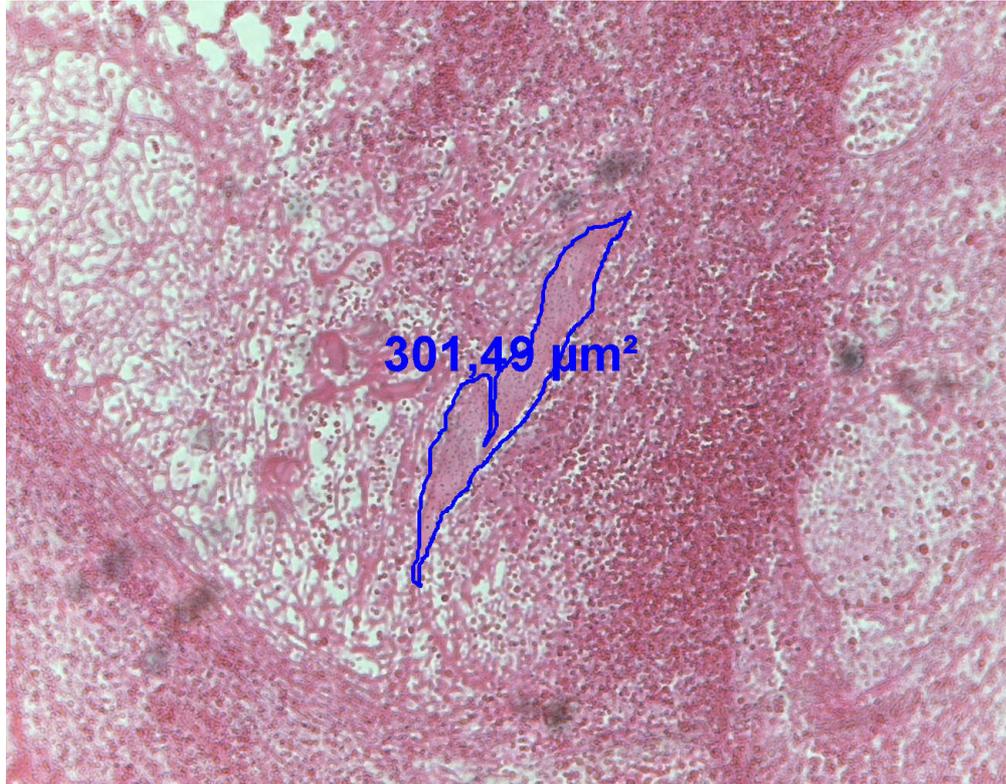


Figura 22- Fotomicrografia da histomorfometria de espécime do grupo I com 5 dias após do procedimento cirúrgico. Aumento original de 250X. Coloração HE.

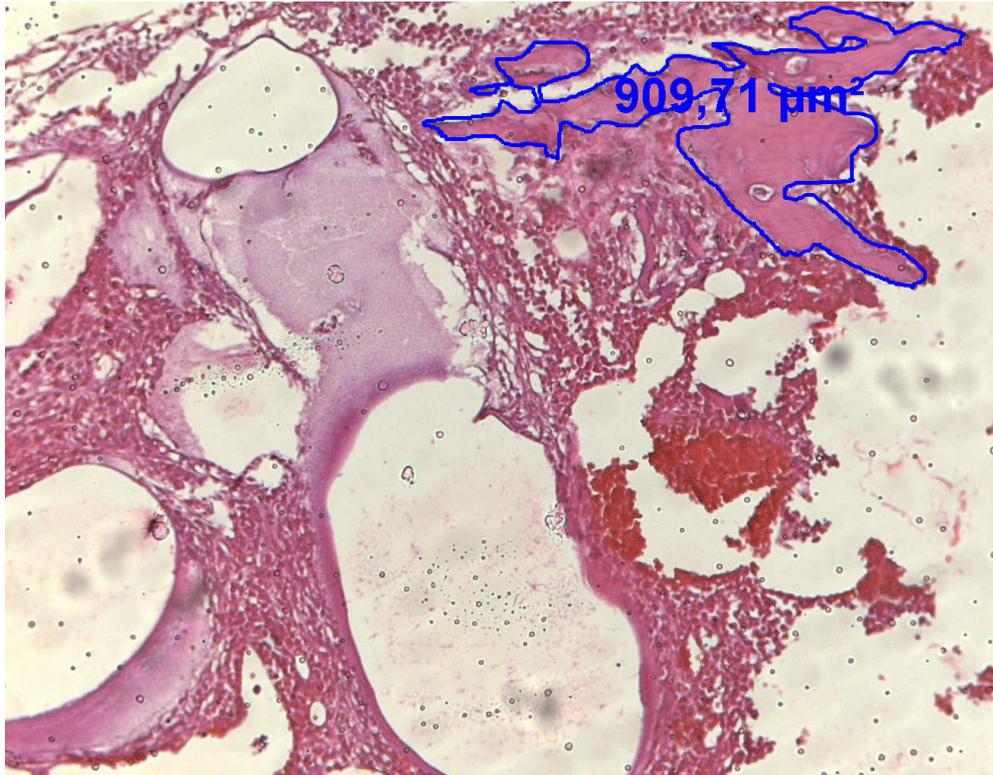


Figura 23- Fotomicrografia da histomorfometria de espécime do grupo II com 5 dias após do procedimento cirúrgico. Aumento original de 250X. Coloração HE.

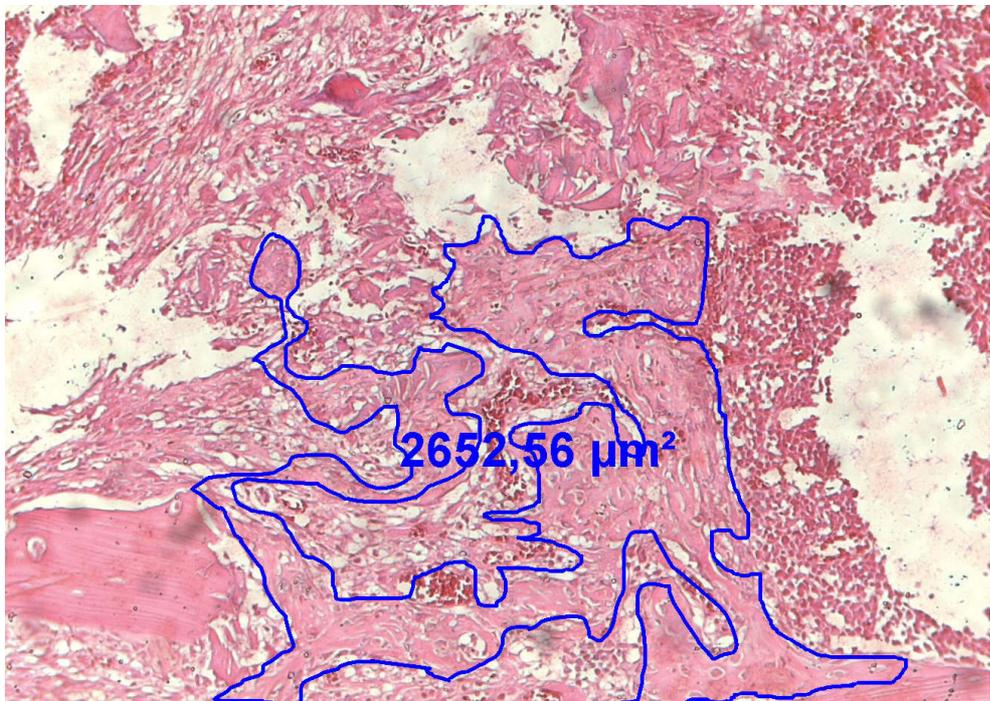


Figura 24- Fotomicrografia da histomorfometria de espécime do grupo III com 5 dias após do procedimento cirúrgico. Aumento original de 250X. Coloração HE.

no grupo
diferença

2,66μm²
)). Estas
s figuras

24, 25 e 26 apresentam a medida de neoformação óssea em uma lâmina de cada espécime de cada grupo.

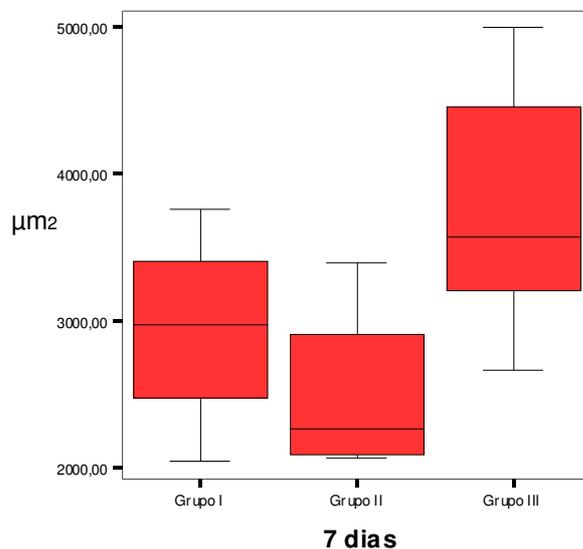


Gráfico 2 – Média da neoformação óssea por grupo com 7 dias de pós-operatório.

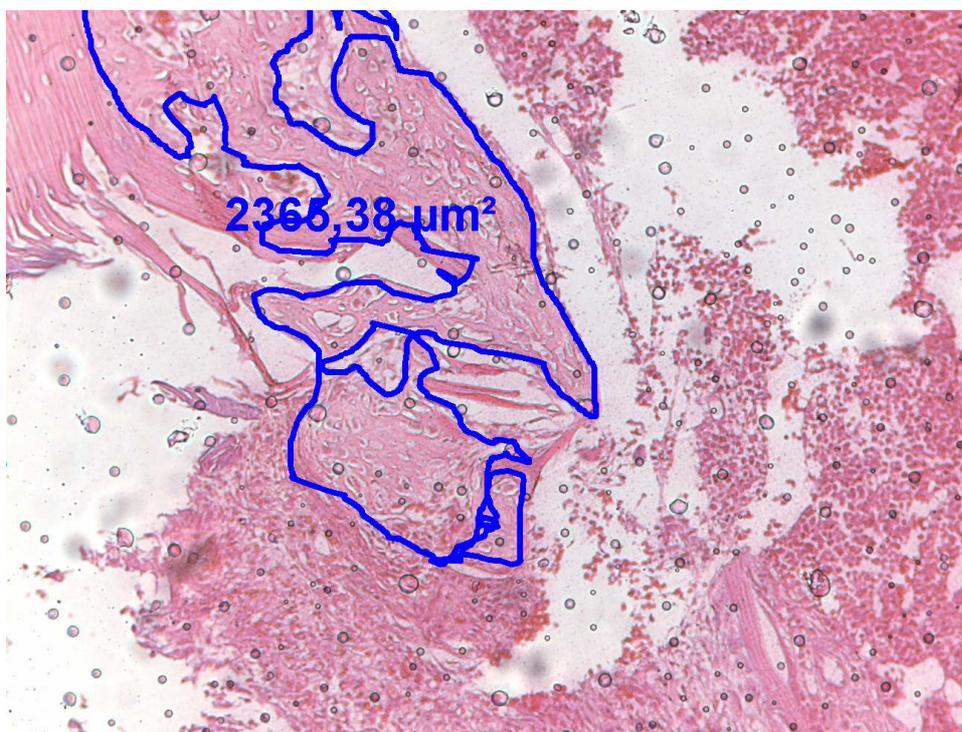


Figura 25- Fotomicrografia da histomorfometria de espécime do grupo I com 7 dias após do procedimento cirúrgico. Aumento original de 250X. Coloração HE.

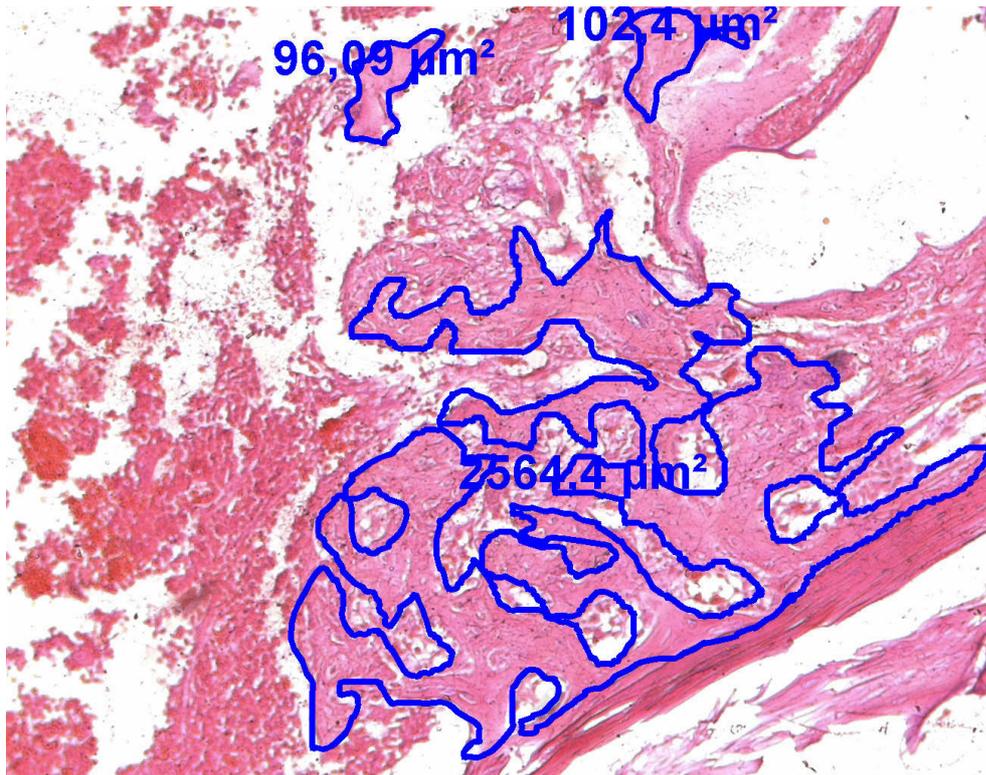


Figura 26- Fotomicrografia da histomorfometria de espécime do grupo II com 7 dias após do procedimento cirúrgico. Aumento original de 250X. Coloração HE.

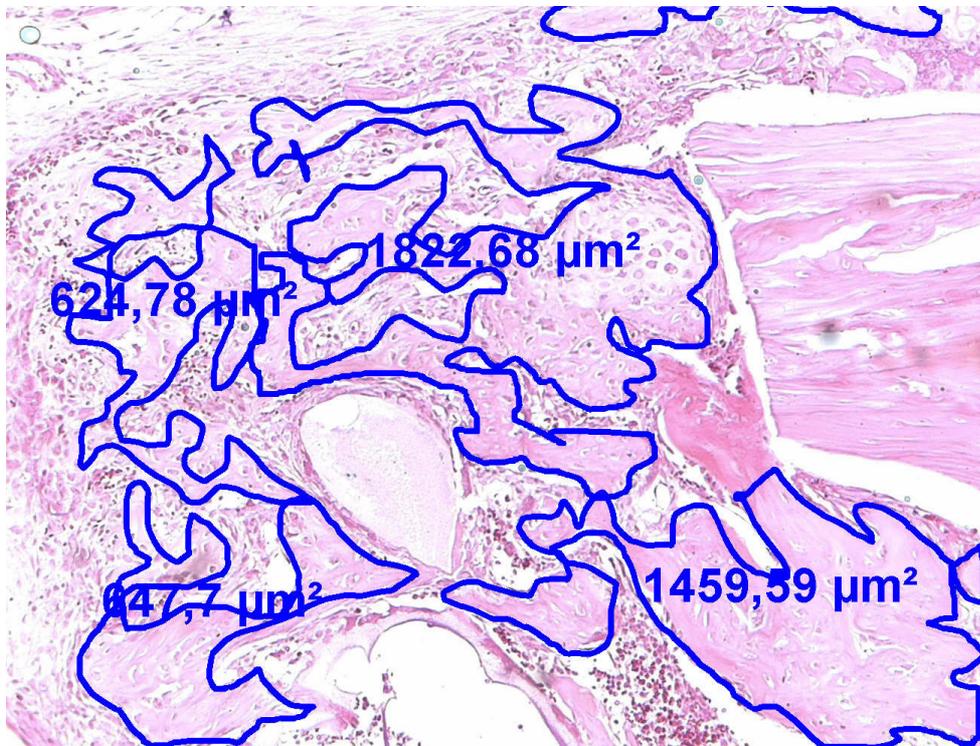


Figura 27- Fotomicrografia da histomorfometria de espécime do grupo III com 7 dias após do procedimento cirúrgico. Aumento original de 250X. Coloração HE.

ia foi de 3161,85μm², 3313,952μm² e 4250,176μm², respectivamente (Gráfico 3). Na análise

de variância (ANOVA), observou-se que existe diferença estatisticamente significativa de pelo menos um dos grupos ($p=0,047$) (Tabela 1). Utilizando-se o teste LSD, verifica-se que existe diferença estatística significativa entre os grupos I e III ($p=0,023$) e entre os grupos II e III ($p=0,044$). Entre os grupos I e II não verificou diferença estatística ($p=0,772$) (Tabela 2). As figuras 27, 28 e 29 apresentam a medida de neoformação óssea em uma lâmina de cada espécime de cada grupo.

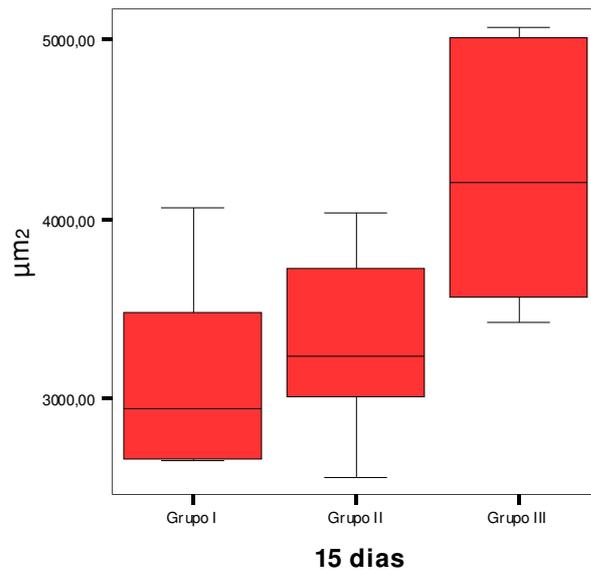


Gráfico 3 – Média da neoformação óssea por grupo com 15 dias de pós-operatório.

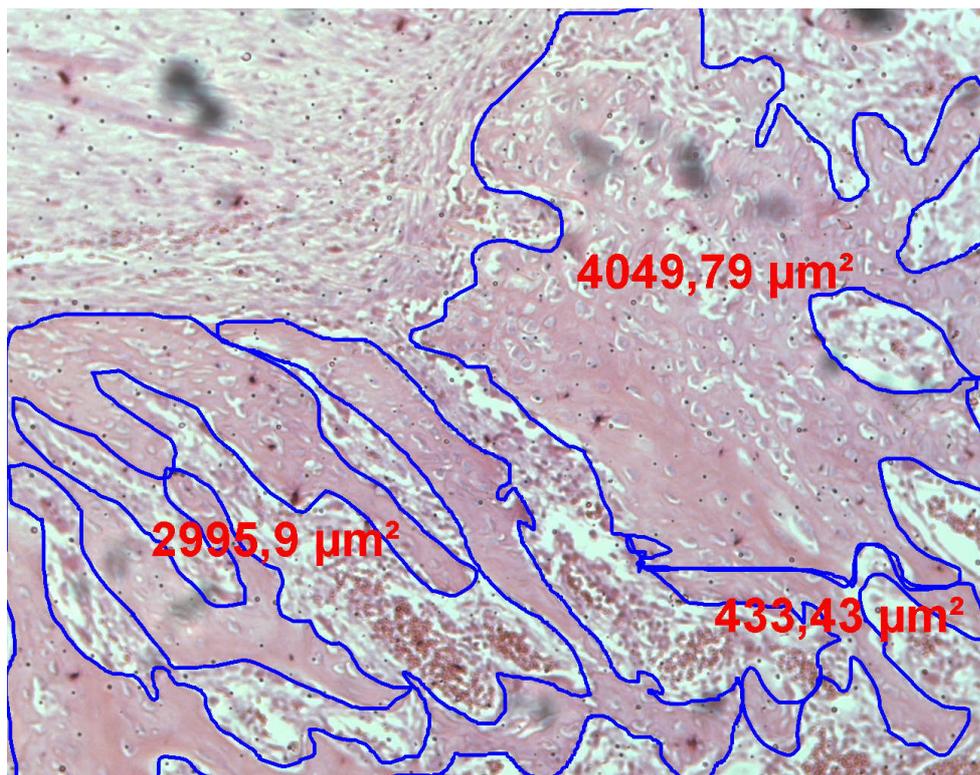


Figura 28- Fotomicrografia da histomorfometria de espécime do grupo I com 15 dias após do procedimento cirúrgico. Aumento original de 250X. Coloração HE.



Figura 29- Fotomicrografia da histomorfometria de espécime do grupo II com 15 dias após do procedimento cirúrgico. Aumento original de 250X. Coloração HE.

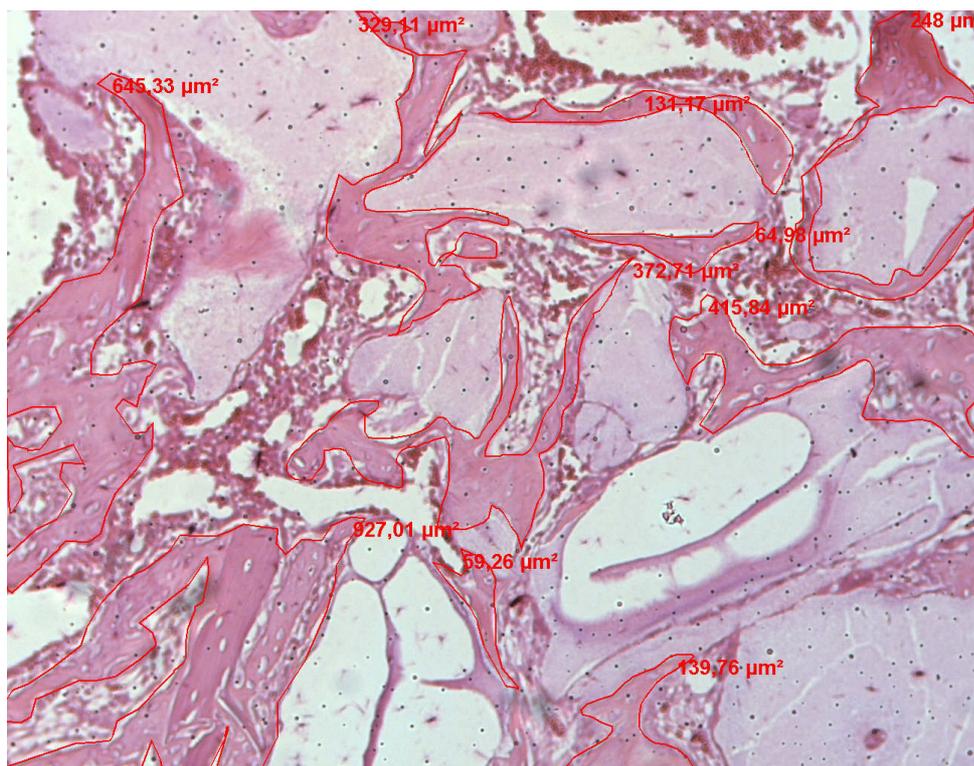


Figura 30- Fotomicrografia da histomorfometria de espécime do grupo III com 15 dias após do procedimento cirúrgico. Aumento original de 250X. Coloração HE.

Tabela 1 – Resultados da Análise de Variância (ANOVA): comparação entre os grupos nos períodos experimentais estabelecidos.

Tabela 2 – Resultado do teste Post Hoc LSD para os valores de neoformação óssea entre os grupos.

Tempo de sacrifício	Grupos	N	Média (μm^2)	Desvio Padrão	p
5 dias	Grupo I	4	705,4775	890,8161	0,021*
	Grupo II	4	565,0925	613,9161	
	Grupo III	5	1962,6780	542,8015	
7 dias	Grupo I	5	2942,6600	702,2776	0,089
	Grupo II	4	2501,7525	616,9852	
	Grupo III	5	3780,8700	941,9123	
15 dias	Grupo I	5	3161,8500	605,6014	0,047*
	Grupo II	5	3313,9520	580,8188	
	Grupo III	5	4250,1760	773,7385	

*Nível de significância de 5%

VARIÁVEL	(I) GRUPO	(J) GRUPO	p
5 dias	Grupo I	Grupo II	0,778
	Grupo I	Grupo III	0,021*
	Grupo II	Grupo III	0,012*
15 dias	Grupo I	Grupo II	0,772
	Grupo I	Grupo III	0,023*
	Grupo II	Grupo III	0,044*

*Nível de significância de 5%

6 DISCUSSÃO

O conhecimento da fisiologia da reparação e remodelação óssea é de suma importância para a prática odontológica, em especial na implantodontia (HOLLINGER et al., 1999). A utilização de técnicas cirúrgicas de enxertia óssea aliada a diferentes meios terapêuticos não invasivos, como a laserterapia, possibilitou melhores condições pós-operatórias, favorecendo a qualidade do osso neoformado e a osseointegração dos implantes (GUZZARDELLA; TORRICELLI; GIARDINO, 2003, KHADRA et al., 2004a). Alguns estudos anteriores demonstraram resultados benéficos da laserterapia em associação com enxertos ósseos no reparo de defeitos (FREITAS et al., 2000; GARAVELLO-FREITAS et al., 2003; GERBI et al., 2003; GERBI et al., 2008; KHADRA et al., 2004b; LOPES et al., 2005; MERLI et al., 2005; NICOLAU et al., 2003; NISSAN et al., 2006; PINHEIRO et al., 2003; PRETEL, LIZARELLI; RAMALHO, 2007; ROCHKIND et al., 2004; SILVA; CAMILLI, 2006; WEBER et al., 2006). Porém, até o momento, parece haver poucos estudos nos quais se avaliou o efeito da associação da terapia laser de baixa intensidade e biomateriais para enxerto, em períodos precoces de reparação. Esta avaliação é relevante, uma vez que o efeito do laser de baixa intensidade ocorre nas fases iniciais do processo de reparo, quando não houve ainda diferenciação celular (GERBI et al., 2003; GERBI et al., 2008; KNAPPE; FRANK; ROHDE, 2004; OZAWA et al., 1998; PINHEIRO et al., 2003; PRETEL; LIZARELLI; RAMALHO 2007; SILVA; CAMILLI, 2006; WEBER et al., 2006). Deste modo, este estudo foi realizado para avaliar o efeito biomodulador da associação laser e enxerto ósseo bovino no reparo de feridas em fêmures de ratos com 1, 3, 5, 7 e 15 dias após o procedimento cirúrgico.

No modelo experimental, *in vivo*, do presente estudo, optou-se pela utilização de ratos por serem de fácil manejo, baixo custo e por ser um modelo consagrado na literatura para estudos com laserterapia e enxertos ósseos (BARUSHKA; YAAKOBI; ORON, 1995; CARVALHO et al., 2006; FREITAS et al., 2000; GARAVELLO-FREITAS et al., 2003; GORDJESTANI; DERMAUT; THIERENS, 1994; GUZZARDELLA et al., 2003; LUGER et al., 1998; MERLI et al., 2005; NICOLAU et al., 2003; PINHEIRO et al., 2003; ROCHKIND et al., 2004;

STAVROPOULOS et al., 2003; TAPETY et al., 2004). As amostras foram padronizadas quanto à raça, *Wistar albinus*, idade e peso (AMADEI et al., 2006; ANDIA; CERRI; SPOLIDORO, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; SCHENK, 1996; TAPETY et al., 2007).

A fim de se excluir a possibilidade de influência hormonal, no caso de se utilizar fêmeas (MORAES et al., 2005), a amostra constituiu-se apenas de machos. Os animais pesavam entre 300 e 360g, eram adultos, não estavam em fase de crescimento e apresentavam maturidade óssea.

Para o procedimento cirúrgico, os animais foram sedados com solução aquosa a 2% de Cloridrato de Xilasina (ROMPUM® - Bayer S.A. São Paulo, Brasil) e após 5 minutos, anestesiados com Cloridrato de Cetamina (VETANARCOL® - König S.A. Avellaneda, Argentina), na proporção de 2:1 e 0,1ml da mistura para cada 100g de peso animal, via intraperitoneal de acordo com Gerbi et al. (2003), Pinheiro et al. (2003), Reddy (2003) e Rodrigues (2006), permitindo tempo de anestesia suficiente para os procedimentos cirúrgicos.

De acordo com Betti (2004), é recomendado o uso de defeitos ósseos não críticos para estudos de regeneração óssea com o intuito de se avaliar efeitos terapêuticos com resultados mais rápidos. São mais comumente utilizadas tíbias (BARUSHKA; YAAKOBI; ORON, 1995; DAVID et al., 1996; FREITAS et al., 2000; GARAVELLO-FREITAS et al., 2003; LIRANI-GALVÃO; JORGETTI; SILVA, 2006; LUGER et al., 1998) e fêmures (CARVALHO et al., 2006; GERBI et al., 2003; GERBI et al., 2008; GUZZARDELLA; TORRICELLI; GIARDINO, 2003; MERLI et al., 2005; PINHEIRO et al., 2003; WEBER et al., 2006). Neste estudo optou-se por realizar um defeito ósseo em fêmures de ratos por apresentar fácil acesso e maior diâmetro quando comparado à tibia. Os defeitos realizados foram não críticos com a remoção de apenas uma das corticais, o que permite a regeneração óssea espontânea pelo organismo e a possibilidade de compará-la àquela resultante de enxerto ósseo bovino liofilizado, associado ou não à terapia laser de baixa intensidade.

Para a comparação do reparo, foram realizados defeitos ósseos em 75 fêmures, de 50 animais, divididos em três grupos, sendo um controle e dois experimentais. O enxerto ósseo utilizado para o preenchimento dos defeitos foi o GenOx-org devido às suas características osteoindutora e osteocondutora (PINHEIRO et al., 2003; SPIEKERMANN et al., 2000; STAVROPOULOS et al., 2003; TAPETY et al., 2004).

Utilizou-se o laser infravermelho pela maior propriedade de penetração tecidual, maior que 2 a 3 mm quando comparados aos lasers vermelhos que apresentam um potencial de penetração superficial de 0,5 a 1mm (GRAZIANI et al., 2004; KHADRA et al., 2004b; PINHEIRO e GERBI, 2006). Embora, Freitas et al. (2000), Luger et al. (1998), Nicolau et al. (2003), Rochkind et al. (2004) tenham obtido resultados favoráveis com o uso do laser vermelho no reparo ósseo, o mesmo não foi observado por David et al. (1996) em seus resultados radiológicos e histológicos.

Foi utilizada a técnica pontual de aplicação do laser sobre os tecidos como preconizado por Carvalho et al. (2006), Gerbi et al. (2003), Gerbi et al. (2008), Pinheiro et al. (2003) e Weber et al. (2006). Esta técnica foi escolhida pela possibilidade de grande aproximação e por ser possível exercer uma leve pressão com a ponteira sobre os tecidos, na tentativa de minimizar a reflexão e a perda de absorção de energia na área a ser reparada.

A dose utilizada neste estudo foi $5\text{J}/\text{cm}^2$ aplicada em quatro pontos ao redor da ferida por 10 segundos, totalizando $20\text{J}/\text{cm}^2$ por sessão e tempo de aplicação de 40 segundos. Pinheiro et al. (1997) indicaram que a dose de aplicação para a estimulação do reparo ósseo pode variar de 1,8 a $5,4\text{J}/\text{cm}^2$. O intervalo de tempo entre as aplicações foi o preconizado em estudos anteriores (CARVALHO et al., 2006; GERBI et al., 2003; GERBI et al., 2008; PINHEIRO et al., 2003; WEBER et al., 2006), que corresponde ao período de maior resposta celular, liberação de fatores de crescimento e liberação de mediadores químicos da inflamação e da proliferação celular (ALMEIDA et al., 2006; SCHENK, 1996; TAPETY et al., 2004).

Os resultados deste estudo mostraram que no primeiro dia após o procedimento cirúrgico e o tratamento realizado, a resposta tecidual foi semelhante em todos os grupos do experimento, caracterizada por reação inflamatória aguda, própria do período inicial do processo de reparação óssea, descrita em estudos anteriores (AMADEI et al., 2006; ANDIA; CERRI; SPOLIDORO, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; SCHELL et al., 2006; SCHENK, 1996; TAPETY et al., 2004). Estes aspectos observados estão dentro dos padrões normais e fisiológicos do processo de reparação óssea. Quando o tecido ósseo é lesado, o perióstio, vasos da cortical óssea, medula e tecidos circundantes são rompidos. Ocorre um sangramento oriundo das margens do tecido ósseo lesado e dos tecidos moles vizinhos, formando um hematoma ou coágulo sangüíneo dentro do canal medular,

entre as extremidades da fratura óssea e o periosteio. Simultaneamente à formação do coágulo, o tecido imediatamente adjacente à fratura necrosa e estimula intensa resposta inflamatória caracterizada por vasodilatação, exsudação do plasma, leucócitos e células mesenquimais (AMADEI et al., 2006; CALIXTO et al., 2007; TAPETY et al., 2007).

O efeito biomodulador do laser foi observado a partir do terceiro dia quando se evidenciou nos espécimes irradiados uma reação periosteal mais intensa e células de revestimento ósseo na cortical oposta à lesão, indicativa de potencial mitótico e aumento da atividade metabólica para futura síntese protéica. Uma justificativa para estes achados pode ser encontrada em trabalhos com irradiação laser em culturas de osteoblastos. Em estudos *in vitro* de Ozawa et al. (1998) observou-se a estimulação significativa da proliferação celular, da atividade de fosfatase alcalina e expressão da osteocalcina. Demonstrou-se que a ação estimulatória da irradiação apenas ocorre nos estágios de proliferação e diferenciação de precursores imaturos, não sendo observados efeitos em osteoblastos diferenciados. Stein et al. (2005) também observaram um aumento significativo na sobrevivência celular e uma maior contagem de osteoblastos no grupo irradiado 24 e 48 horas após a aplicação do laser. A diferenciação e a maturação das células foram avaliadas por marcadores osteogênicos como fosfatase alcalina, osteopontina e sialoproteína óssea. De acordo com os autores, esta taxa mais elevada de proliferação e diferenciação pode levar a um aumento do acúmulo de cálcio e, conseqüentemente, a promoção do reparo ósseo. Baseado nestes dados, pode-se supor que as duas irradiações exerceram uma ação estimulatória sobre células osteogênicas do defeito nestes três primeiros dias, justificando nossos achados.

As propriedades osteocondutora e osteoindutora atribuída ao enxerto ósseo bovino (CALIXTO et al., 2007; PINHEIRO et al., 2003; SPIEKERMANN et al., 2000; STAVROPOULOS et al., 2003; TAPETY et al., 2004) foram confirmadas pelo grupo II que, também, apresentou uma reação periosteal oposta à lesão óssea, porém mais discreta quando comparado ao grupo III. Estudos histomorfométricos prévios em humanos, cirurgias de levantamento de seio maxilar e cicatrização alveolar têm demonstrado resultados semelhantes com a indução e condução da neoformação óssea quando utilizado o enxerto ósseo bovino como terapêutica na reparação óssea (CALIXTO et al. 2007; SPIEKERMANN et al., 2000).

Com cinco dias, o grupo III apresentou maior deposição de colágeno, além de maior densidade de feixes organizados e maior quantidade de vasos sanguíneos neoformados. Estes aspectos são considerados importantes durante a cronologia do reparo ósseo de acordo com Amadei et al. (2006) e Tapety et al. (2007). Podemos ainda destacar maior intensidade do processo de síntese associado à maior produção de osteóide e de forma importante o início da mineralização deste tecido, originando osso imaturo, desorganizado (trançado). De acordo com Andia, Cerri e Spolidoro (2006) o início do reparo do calo ósseo é caracterizado pelo arranjo irregular dos osteócitos e orientação irregular das fibras colágenas. Portanto, este reparo ósseo mais organizado pode ser considerado como resultante do efeito biomodulador da laserterapia. No sexto dia após a aplicação de laser de HeNe, Baruska, Yaakobi e Oron, (1995) também observaram um aumento significativo da atividade de fosfatase alcalina e um preenchimento do defeito cirúrgico com tecido osteóide, osteoblastos e restos de células sanguíneas. Quando comparado ao grupo I, o grupo II apresentou maior intensidade de síntese de colágeno ao redor das partículas de enxerto, confirmado a característica osteoindutora e osteocondutora do enxerto ósseo utilizado (CALIXTO et al., 2007; PINHEIRO et al., 2003; SPIEKERMANN et al., 2000; STAVROPOULOS et al., 2003; TAPETY et al., 2004). O efeito osteocondutor de um enxerto ósseo bovino também foi analisado por Tapety et al. (2004) em defeitos de fêmures de ratos que observaram formação óssea no grupo experimental e controle, bem como uma fina camada de matriz óssea cobrindo o Bio-Oss®.

Nissan et al. (2006), Pinheiro e Gerbi (2006) e Silva e Camilli (2006) ressaltaram, também, o efeito bioenergético e bioelétrico da laserterapia. O efeito bioenergético é verificado por meio do aumento da produção de ATP através da estimulação mitocondrial, que promove o aumento da produção de ácido nucléico e conseqüentemente a divisão celular e síntese protéica. O efeito bioelétrico provoca a normalização do potencial iônico da membrana, e conseqüente normalização das funções das células.

Frente ao exposto, verifica-se pela análise histomorfológica o efeito biomodulador positivo do laser de baixa intensidade nas fases iniciais do reparo ósseo com atuação importante nas fases de proliferação e diferenciação das células de linhagem osteoblástica.

A área de formação óssea em toda a extensão do defeito foi avaliada, quantitativamente, por meio da histomorfometria. No período de cinco dias, o grupo III apresentou a maior área de formação com diferença estatisticamente significativa quando comparada com os grupos I e II. Com cinco dias, Nicolau et al. (2003) observaram um volume ósseo estatisticamente maior no grupo dos animais irradiados com laser de GaAlAs quando comparado com o grupo controle. Barushka, Yaakobi e Oron (1995) e Ozawa et al. (1998) encontraram altos níveis de fosfatase alcalina em estudos *in vitro* sugerindo intensa atividade osteoblástica após a irradiação a laser, o que pode explicar os achados deste estudo com maior neoformação óssea no grupo III. É interessante notar que neste período experimental, não houve diferença estatisticamente significativa na área de osso neoformado quando se comparou o grupo I com o grupo II. Isto sugere que a presença das partículas gera a necessidade de reabsorção do enxerto antes da neoformação óssea (TAPETY et al. 2004). Desta forma, quando utilizaram enxerto ósseo bovino inorgânico, Calixto et al. (2007) relataram que apesar da biocompatibilidade e das propriedades osteoindutoras e osteocondutoras atribuídas aos enxertos bovinos terem sido confirmadas em seu estudo, foi observado que o material causou um atraso no reparo ósseo. Como foi observada diferença estatisticamente significativa quando foram comparados os grupos II e III, pode-se sugerir que a associação entre o enxerto ósseo e a irradiação laser foi benéfica e acelerou a neoformação óssea.

Na análise histomorfométrica com sete dias, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos. Apesar disto, nota-se que houve maior formação no grupo III. A análise morfométrica no sétimo dia da associação da aplicação do laser de baixa intensidade com uma substância indutora contendo BMPs apresentou melhor resultado com diferença estatisticamente significativa no trabalho de Carvalho et al. (2006). Apesar de terem notado maior volume ósseo no grupo dos animais irradiados no quinto dia, Nicolau et al. (2003) também observaram que a quantidade de osteoclastos foi significativamente maior no grupo irradiado quando comparado ao não irradiado, e concluíram que o laser de baixa intensidade usado no período inflamatório do processo de reparo ósseo aumenta a atividade celular normal de reabsorção e formação. No presente trabalho, foi notado no dia 5, histologicamente, melhor organização tecidual indicando um reparo mais avançado e, histomorfometricamente, maior área de formação óssea.

Deste modo, poderia-se supor que o processo de reabsorção estaria mais avançado no dia 7 no grupo que sofreu ação da laserterapia, indicando que já teria sido iniciado o processo de remodelação por osteoclastos. Garavello-Freitas et al. (2003) observaram aumento significativo no crescimento ósseo em defeitos sem enxerto com oito dias após irradiação, com invasão concomitante de osteoclastos e aceleração da organização de matriz de colágeno. Consideraram que a ação de osteoclastos ativos foi responsável pela redução da área trabecular no 15º dia. Da mesma forma poderia ser sugerido que esta invasão precoce de osteoclastos tenha causado a diminuição da área óssea no sétimo dia do presente trabalho. A confirmação destes achados poderia ser feita por avaliação por imunohistoquímica.

Na análise histomorfométrica da formação óssea do dia 15, os resultados apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos. A maior formação óssea foi observada no grupo III com diferença estatisticamente significativa entre os grupos I e III e entre os grupos II e III. Não houve diferença entre os grupos I e II. Por meio de avaliação imunohistoquímica, Tapety et al. (2004) comprovaram a atividade osteoblástica do Bio-Oss® nas fases iniciais do reparo pelo preenchimento da cavidades por tecido ósseo após 14 dias de observação. Apesar do conhecido potencial osteocondutor e osteoindutor do enxerto ósseo bovino liofilizado, existem relatos de retardo no reparo ósseo neste período de observação. Queiroz et al. (2006) concluíram que houve um aumento do efeito osteogênico pela análise histológica do processo de reparo ósseo quando utilizaram enxerto ósseo liofilizado associado ou não ao uso de membrana. Entretanto, no período experimental de 15 dias, observaram que as partículas do enxerto encontravam-se cercadas por tecido conjuntivo fibroso com a presença de processo inflamatório crônico caracterizado pela presença de macrófagos e células gigantes. Na análise histomorfométrica realizada no estudo de Calixto et al. (2007), foi constatado que houve menor formação óssea no grupo tratado com enxerto ósseo bovino quando comparado com o controle no período de 15 dias.

A associação entre a laserterapia de baixa intensidade e o enxerto ósseo apresentou maior à área de neoformação óssea neste estudo, quando comparada com os outros tipos de tratamentos. A análise histológica dos trabalhos de Gerbi et al. (2003) e Pinheiro et al. (2003) mostraram um resultado eficaz da laserterapia associada a enxerto ósseo bovino orgânico e inorgânico, respectivamente. Apesar dos relatos de atraso na reparação (CALIXTO et al., 2007; QUEIROZ et al., 2006),

pode ser sugerido que a irradiação laser compensa o retardo provocado pelo enxerto por seu efeito bioestimulador. A aceleração do processo de reparo de fraturas cirúrgicas em ratos irradiadas com laser de HeNe foi observada em MEV, de forma qualitativa após 14 dias (FREITAS et al, 2000). O volume ósseo obtido e a taxa de aposição mineral foi significativamente maior no 15º dia no grupo irradiado com laser de GaAIs quando comparado com o controle no trabalho de Nicolau et al. (2003). O trabalho de Garavello-Freitas et al. (2003) mostrou faixas de fibras de colágeno paralelas no local do defeito no 15º dia e a aceleração da consolidação de defeitos cirúrgicos produzidos em ratos. Histologicamente, Khadra et al. (2004b) concluíram que o efeito favorável da LLLT sobre o reparo ósseo pode ser explicado pela promoção da angiogênese, produção de colágeno, proliferação e diferenciação de células osteogênicas e aumento da síntese de ATP. Uma média de formação óssea mais significativa, massa óssea mais densa e menor *gap* após 14 dias, foram os resultados obtidos por Merli et al. (2005) quando analisaram, por meio de histomorfometria, o reparo de defeitos em fêmur de ratos, após irradiação com laser de GaAIs. Melhor remodelação óssea, quantitativa e qualitativa foi obtida por Weber et al. (2006) nos grupo enxertados com osso autógeno e laserterapia com 15 dias. Outros trabalhos associando a LLLT com enxerto ósseo bovino e BMPs (CARVALHO et al., 2006; GERBI et al., 2008), LLLT com enxerto ósseo bovino, BMPs e membrana também obtiveram melhores resultados do que quando estas terapias foram aplicadas isoladamente (GERBI et al., 2003). Rochkind et al. (2004) utilizando uma metodologia diferente, a espectroscopia infravermelha, também obtiveram resultados favoráveis estatisticamente significativos com a combinação da laserterapia de baixa intensidade e enxerto ósseo bovino no tratamento pós-traumático. Por outro lado os estudos de David et al. (1996) e Gordjestani, Dermaut e Thierens (1994) não apresentaram efeitos biomodulador benéficos do laser. Estes resultados podem ser explicados pela metodologia e pelo laser utilizados.

Poucos são os trabalhos encontrados na literatura relatando os efeitos da associação do laser de baixa intensidade e enxerto ósseo bovino nos estágios precoces de reparo. Dentro dos parâmetros definidos pelo presente estudo, pode-se observar que a associação da terapia a laser e enxerto ósseo bovino foi benéfica tanto na organização do tecido nos estágios precoces de reparo (3 e 5 dias), quanto na quantidade de osso neoformado nos três tempos experimentais, apesar de relatos anteriores afirmando que a presença do enxerto ósseo traria um retardo em

determinadas fases do processo. Estudos de imunohistoquímica são necessários para elucidar os fenômenos celulares que ocorrem neste período e que possam explicar o efeito biomodulador observado com esta associação.

7 CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia utilizada e a análise dos resultados obtidos, concluiu-se que:

- Qualitativamente, a associação entre a terapia laser de baixa intensidade e o enxerto ósseo bovino resultou em efeito biomodulador positivo com melhor organização tecidual nas fases iniciais do reparo e formação precoce de osteóide quando comparado com apenas enxerto e o controle.

- Quantitativamente, a associação entre a terapia laser de baixa intensidade e o enxerto ósseo bovino resultou em maior quantidade de tecido ósseo neoformado nos três tempos experimentais, com diferença estatisticamente significativa nos dias 5 e 15.

- As análises qualitativa e quantitativa comprovaram a ação biomoduladora positiva da terapia laser de baixa intensidade em associação com enxerto ósseo bovino no reparo ósseo de defeitos em fêmures de ratos.

8 REFERÊNCIAS

- AL RUHAIMI, K. A. Bone graft substitutes: a comparative qualitative histologic review of current osteoconductive grafting materials. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Lombard, v. 16, n. 1, p. 105-114, 2001.
- ALMEIDA, J. et al. Estudo do efeito do plumbum metallicum 30ch na reparação óssea em mandíbula de ratos sem barreira mecânica. **Cienc Odontol Bras**, São José dos Campos, v. 9, n. 1, p. 69-76, 2006.
- AMADEI, S. U. et al. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **J Bras Patol Med Lab**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 1, p. 5-12, 2006.
- ANDIA, D. C.; CERRI, P. S.; SPOLIDORIO, L. C. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. **Revista de Odontologia da UNESP**, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 191-198, 2006.
- ANDRADE, A. D. et al. Biologia ossea: Uma revisão de literatura. **Implant News**, São Paulo, New York, v. 4, n. 6, p. 659-662, 2007.
- BARUSHKA, T.; YAAKOBI, T.; ORON, U. Effect of Low-Energy Laser (He-Ne) Irradiation on the Process of Bone Repair in the Rat Tibia. **Bone**, New York, v. 16, n. 1, p. 47-55, 1995.
- BECKTOR, J. P. et al. The use of particulate bone grafts from the mandible for maxillary sinus floor augmentation before placement of surface-modified implants: results from bone grafting to delivery of the final fixed prosthesis. **J Oral Maxillofac Surg**, Philadelphia, v. 66, n. 4, p. 780-786, Apr. 2008.
- BETTI, L. V. **Análises microscópica e radiográfico do reparo de defeitos confeccionados em fêmures de coelhos preenchidos com matriz óssea bovina medular em bloco ou cortical em microgrânulos**. 2004. 152 f. Tese (Doutorado)-Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru.
- CAFALLI, F. A. S. et al. Estudo experimental dos efeitos da radiação laser de baixa energia na regeneração osteocartilagínea em joelhos de coelhos: Aspectos histológicos. **Rev Bras Ortop**, São Paulo, v. 28, n. 9, p. 673-678, 1993.
- CALIXTO, R. F. E. et al. Grafting of tooth extraction socket with inorganic bovine bone or bioactive glass particles: comparative histometric study in rats. **Implant Dent**, Baltimore, v. 16, n. 3, p. 260-269, 2007.
- CARVALHO, P. D. T. C. D. et al. Effect of 650 nm low-power laser on bone morphogenetic protein in bone defects induced in rat femors. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 21, Supl 4, p. 63-68, 2006.
- DAVID, R. et al. Effect of low-power He-Ne laser on fracture healing in rats. **Lasers Surg Med**, New York, v. 19, n. 4, p. 458-464, 1996.

DORTBUDAK, O.; HASS, R.; MAINLATH-PORKOMY, G. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. **Clin Oral Implants Res**, Copenhagen, v. 11, n. 6, p. 540-545, 2000.

FREITAS, I. G. F.; BARANAUSKAS, V.; CRUZ-HOFLING, M. A. Laser effects on osteogenesis. **Applied Surface Science**, North-Holland, v. 154, n. 155, p. 548-554, 2000.

GARAVELLO-FREITAS, I. et al. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. **J Photochem Photobiol B**, Lausanne, v. 70, n. 2, p. 81-89, 2003.

GERBI, M. E. M. et al. Assessment of Bone Repair associated to the use of Organic Bovine Bone and Membrane irradiated with 830nm. **SPIE, Lasers in Dentistry IX**, Bellingham, v. 4950, p. 137-143, 2003.

GERBI, M. E. M. et al. Infrared laser light further improves bone healing when associated with bone morphogenetic proteins: an in vivo study in a rodent model. **Photomed Laser Surg**, Larchmont, v. 26, n. 1, p. 55-60, 2008.

GORDJESTANI, M.; DERMAUT, L.; THIERENS, H. Infrared laser and bone metabolism: a pilot study. **Int J Oral Maxillofac Surg**, Copenhagen, v. 23, n. 1, p. 54-56, 1994.

GRAZIANI, F. et al. Comparison of implant survival following sinus floor augmentation procedures with implants placed in pristine posterior maxillary bone: a systematic review. **Clin. Oral Impl. Res**, Copenhagen, v. 15, n. 6, p. 677-682, 2004.

GUZZARDELLA, G. A., TORRICELLI, P. G.; GIARDINO, R. Osseointegration of endosseous ceramic implants after postoperative low-power laser stimulation: an in vivo comparative study. **Clin Oral Implants Res**, Copenhagen, v. 14, n. 2, p. 226-232, 2003.

HABIBOVIC, P.; DE GROOT, K. D. Osteoinductive biomaterials – properties and relevance in bone repair. **J Tissue Eng Regen Med**, v. 1, n. 1, p. 25-32, 2007.

HOLLINGER, J. O.; KLEINSCHMIDT, J. C. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. **J Craniofac Surg**, Boston, v. 1, n. 1, p. 60-68, Jan. 1990.

HOSOKAWA, Y. et al. Effects of local and whole body irradiation on appearance of osteoclasts during wound healing of tooth extraction sockets in rats. **J Radiat Res**, Tokyo, v. 48, n. 4, p. 273-80, 2007.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 427 p.

KATAGIRI, T.; TAKAHASHI, N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. **Oral Diseases**, San Francisco, v. 8, n. 3, p. 147–159, 2002.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e Embriologia Oral**. São Paulo: Panamericana, 1999. v.1

KHADRA, M. et al. Low-level laser therapy stimulates bone-implant interaction: an experimental study in rabbits. **Clin Oral Implants Res**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 325-332. 2004a.

KHADRA, M. The effect of low level laser irradiation on implant-tissue interaction. In vivo and in vitro studies. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, Saint Louis, v. 97, n. 6, p.693-700, 2004b.

KNAPPE, V.; FRANK, F.; ROHDE, E. Principles of lasers and biophotonic effects. **Photomed Laser Surg**, Larchmont, v. 22, n. 5, p. 411-417, 2004.

KUBLER, A. et al. Growth and proliferation of human osteoblasts on different bone graft substitutes: an in vitro study. **Implant Dent**, Baltimore, v. 13, n. 2, p. 171-179, June, 2004.

LIRANI-GALVÃO, A. P.; JORGETTI, V.; SILVA, O. L. Comparative Study of How Low-Level Laser Therapy and Low-Intensity Pulsed Ultrasound Affect Bone Repair in Rats. **Photomed Laser Surg**, Larchmont, v. 24, n. 6, p. 735-740, 2006.

LIRANI, A. P.; LAZARETTI-CASTRO, M. Evidences of physical agents action on bone metabolism and their potential clinical use. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, São Paulo, v. 49, n. 6, p. 891-896, 2005.

LOPES, C. B.; PINHEIRO, A. L.; SATHAIAH, S.; DUARTE, J.; CRISTINA MARTINS, M. Infrared laser light reduces loading time of dental implants: a Raman spectroscopic study. **Photomed Laser Surg**, Larchmont, v. 23, n. 1, p. 27-31, 2005.

LYON, R.; LIU, X. C.; MEIER, J. The effects of therapeutic vs. highintensity ultrasound on the rabbit growth plate. **J Orthoped Res**; v. 21, n. 5, p. 865-871, 2003.

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

MARINS, L. V. et al. Radiographic and histological study of perennial bone defect repair in rat calvaria after treatment with blocks of porous bovine organic graft material. **J Appl Oral Sci**, Bauru, v. 12, n. 1, p. 62-69, 2004.

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

MIRANDA, E. S. et al. Estudo experimental comparativo no uso de enxerto ósseo orgânico e inorgânico no reparo de fraturas cirúrgicas em rádio de coelhos. **Acta Ortop Bras**, São Paulo, v. 13, n. 3, p. 245-248, 2005.

MISCH, C. **Implantes dentários contemporâneos**. São Paulo: Santos, 2000.

MORAES, M. E. L. D. et al. Estudo radiográfico da reparação óssea em tíbias de ratos estressados: densidade óptica por meio de radiografia digital. **Rev Odonto Cienc**, Porto Alegre, v. 20, n. 49, p. 257, 2005.

NICOLAU, R. A. et al. Effect of low-power GaAlAs laser (660 nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. **Lasers Med Sci**, Londres, v. 18, n. 2, p. 89-94, 2003.

NISSAN, J. et al. Effect of low intensity laser irradiation on surgically created bony defects in rats. **J Oral Rehabil**, Oxford, v. 33, n. 8, p. 619-924, 2006.

OLIVEIRA, R.F. et al. Comparison between the effect of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasonic irradiation in vitro. **Photomed Laser Surg**, Larchmont, v. 26, n. 1, 6-9. 2008.

OZAWA, Y. et al. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. **Bone**, New York, v. 22, n. 4, p. 347-54, 1998.

OZEN, T. et al. Efficacy of low level laser therapy on neurosensory recovery after injury to the inferior alveolar nerve. **Head Face Med**, London, v. 2, p. 3, 2006.

PINHEIRO, A. L.; GERBI, M. E. Photoengineering of bone repair processes. **Photomed Laser Surg**, Larchmont, v. 24, n. 2, p. 169-178. 2006.

PINHEIRO, A. L. et al. Low-level laser therapy in the management of disorders of the maxillofacial region. **J Clin Laser Med Surg**, Londres, v. 15, n. 4, p-181-183, 1997.

PINHEIRO, A. L. et al. Effect of low level laser therapy on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone. **Braz Dent J**, Ribeirão Preto, v. 14, n. 3, p. 177-181, 2003.

PINHEIRO, A. L. et al. Infrared laser light further improves bone healing when associated with bone morphogenetic proteins and guided bone regeneration: an *in vivo* study in a rodent model. **Photomed Laser Surg**, Larchmont, v. 26, n. 2, p. 1-8. 2008.

POLYZOIS, I. et al. The effect of Bio-Oss on osseointegration of dental implants surrounded by circumferential bone defects of different dimensions: an experimental study in the dog. **Clin Oral Impl Res.**, Copenhagen, v. 18, n. 3, p. 304-310, June, 2008.

PRETEL, H.; LIZARELLI, R. F. Z.; RAMALHO, L. T. O. Effects of Low-Level Laser Therapy on bone repair: histological study in rats. **Lasers Surg Med**, New York, v. 39, n. 10, p. 788-796, 2007.

QUEIROZ, T. P. et al. Use of bovine bone graft and bone membrane in defects surgically created in the cranial vault of rabbits. Histologic comparative analysis. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Copenhagen, v. 21, n. 1, p. 29-35, 2006.

REDDY, G. K. Comparison of the photostimulatory effects of visible He-Ne and infrared Ga-As lasers on healing impaired diabetic rat wounds. **Lasers Surg Med**, New York, v. 33, n. 5, p. 344-351, 2003.

RHO, J. Y.; KUHN-SPEARING, L.; ZIOUPOS, P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. **Med Eng Phys**, London, v. 20, n. 2, p. 92-102, 1998.

ROCHKIND, S. et al. Molecular structure of the bony tissue after experimental trauma to the mandibular region followed by laser therapy. **Photomed Laser Surg**, Larchmont, v. 22, n. 3, p. 249-253, 2004.

RODRIGUES, S. S. M. F. G. **Efeito do laser de baixa potência, sob diferentes protocolos de aplicação, no reparo de feridas cutânea de ratos**. 2006. 98 f. Dissertação (Mestrado)-Departamento de Odontologia, Universidade de Taubaté, Taubaté.

SCHELL, H. et al. Osteoclastic activity begins early and increases over the course of bone healing. **Bone**, New York, v. 38, n. 4, p. 547-554, 2006.

SCHENK, R. K. Regeneração Óssea: Bases Biológicas. In: BUSER, D.; DAHLIN, C. et al (Ed.). **Regeneração Óssea Guiada na Implantodontia**. Hong Kong: Quintessence, 1996. Regeneração Óssea: Bases Biológicas, v.1., p. 269.

SHIMIZU, N. et al. Low-intensity laser irradiation stimulates bone nodule formation via insulin-like growth factor-I expression in rat calvarial cells. **Lasers Surg Med**, New York, v. 39, n. 6, p. 551-559, 2007.

SILVA, R. V.; CAMILLI, J. A. Repair of bone defects treated with autogenous bone graft and low-power laser. **J Craniofac Surg**, Stuttgart, v. 17, n. 2, p. 297-301, 2006.

SPIEKERMANN, Y. M. et al. Maxillary sinus augmentation using xenogenic bone substitute material Bio-OssA in combination with venous blood: a histologic and histomorphometric study in humans. **Clin Oral Impl Res**, Copenhagen, v. 11, n. 3, p. 217-229, 2000.

STAVROPOULOS, A. et al. Deproteinized bovine bone (Bio-Oss) and bioactive glass (Biogran) arrest bone formation when used as an adjunct to guided tissue regeneration (GTR): an experimental study in the rat. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 30, n. 7, p. 636-643, 2003.

STEIN, A., et al. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. **Photomed Laser Surg**, Larchmont, v. 23, n. 2, p. 161-166, 2005.

TAPETY, F. I. et al. Histological evaluation of the involvement of Bio-Oss in osteoblastic differentiation and matrix synthesis. **Clin Oral Implants Res**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 315-324, 2004.

TONG, D. et al. A review of survival rates for implants placed in grafted maxillary sinuses using meta-analysis. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Copenhagen v. 13, n. 2, p. 175-182, 1998.

WANG, C. J. et al. Shock wave therapy induces neovascularization at the tendon-bone junction. A study in rabbits. **J Orthop Res**, New York, v. 21, p. 984-989, 2003.

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

WEISS, D. D. et al. Hyperbaric oxygen: a means of decreasing ischemic epiphyseal damage in a pediatric rabbit model. **J Hand Surg**, Oxford, v. 25, n. 1, p.159-165, 2000.

WOODRUFF, L. D. et al. The efficacy of laser therapy in wound repair: a meta-analysis of the literature. **Photomed Laser Surg**, Larchmont, v. 22, n. 3, p. 241-247, 2004.

9 ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética na Experimentação Animal

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 037/2007-CEEA sobre "Avaliação da irradiação laser de baixa intensidade associada a enxerto ósseo liofilizado bovino no processo de reparação óssea – estudo *in vivo* conduzido em ratos", projeto de ensino sob a responsabilidade de Neuza Maria Souza Picorelli Assis está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRO-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 07/08/2007.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 037/2007-CEEA about "Avaliação da irradiação laser de baixa intensidade associada a enxerto ósseo liofilizado bovino no processo de reparação óssea – estudo *in vivo* conduzido em ratos – Neuza Maria Souza Picorelli Assis - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRO-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 07/08/2007.

Juiz de Fora, 07 de agosto de 2007


Presidente/CEEA


Secretário/CEEA