

**CRISTIANE BECHER ROSA**

**Efeito da Fotobiomodulação LASER ou LED na formação óssea após disjunção da sutura palatina mediana**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia UFPB-UFBA, como um dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia.**

**Área de concentração: Laser em Odontologia  
Linha de Pesquisa: Laserterapia clínica**

**Orientadores: Prof. Dr. Antonio Luiz Barbosa Pinheiro, PhD**

**Prof. Dr. Fernando Antonio Lima Habib**

**Co-orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dra. Telma Martins de Araújo**

**CRISTIANE BECHER ROSA**

**Efeito da Fotobiomodulação LASER ou LED na formação óssea após disjunção da sutura palatina mediana**

**Salvador, 11 de Fevereiro de 2014.**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Doutor Antonio Luiz Barbosa Pinheiro - UFBA**

---

**Prof. Doutor Maria Isabel Pereira Vianna - UFBA**

---

**Prof. Doutor Luciana Maria Pedreira Ramalho – UFBA**

---

**Prof. Doutor Gustavo Pina Godoy – UEPB**

---

**Prof. Doutor Marina Oliveira Ribas - PUCPR**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde,  
SIBI - UFBA.

R788 Rosa, Cristiane Becher  
Efeito da fotobiomodulação laser ou led na formação óssea  
após disjunção da sutura palatina mediana. – Salvador, 2014.  
166 f.  
Orientador: Prof. Dr. Antonio Luiz Barbosa Pinheiro;  
Prof Dr Fernando Lima Habib.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia.  
Faculdade de Odontologia, 2014.

1. Fototerapia. 2. Lasers. 3. Ortodontia. I. Pinheiro,  
Antonio Luiz Barbosa. II. Torres, Ednildo Andrade. III. Título.  
CDU 616-314-089.23

## Agradecimentos

Agradeço a **Deus** por ser a luz presente na minha vida, guiando-me e fortalecendo-me em todos os caminhos por mim escolhidos.

Agradeço aos meus pais, **Adalberto José Rosa e Teresinha Becher Rosa**, alicerces na minha educação, e através dos quais sempre me espelhei sobre o modo com que gostaria de conduzir minha vida em relação a princípios, caráter, ética e dedicação, tanto no campo pessoal quanto no profissional.

A **Marcelo Becher Rosa**, que além de ser meu irmão, que muito admiro, é também meu amigo querido, companheiro de horas intermináveis de conversas e presente em todos os momentos da minha vida.

Ao **Prof. Antonio Luiz Barbosa Pinheiro**, meu orientador, pelos conhecimentos transmitidos, por me guiar em todos os passos da minha pesquisa de forma a superar as dificuldades encontradas e concretizar os objetivos traçados, mostrando-me um novo campo de possibilidades dentro da Odontologia através dos ensinamentos sobre a luz.

Ao **Prof. Fernando Antonio Lima Habib**, meu orientador, por me incentivar a aprimorar meus conhecimentos através da pós-graduação, me auxiliar e orientar na realização desta pesquisa e por fazer a diferença no meu caminho dentro da Ortodontia.

À **Prof<sup>a</sup>. Telma Martins de Araújo**, minha co-orientadora, pelo incentivo, orientação e apoio dados ao longo dos meus anos de vida acadêmica, desde a graduação, a especialização e até o Doutorado. Sua seriedade e empenho relacionados à vida acadêmica e Ortodontia são admiráveis.

Ao **Prof. Jean Nunes dos Santos** pela orientação e leitura das lâminas desta pesquisa. Seus conhecimentos e sua dedicação foram fundamentais para a concretização deste estudo.

À **Prof<sup>a</sup>. Maria Cristina Teixeira Cangussú** pela disponibilidade, atenção e conhecimentos transmitidos, fazendo a análise estatística usada nesta pesquisa.

À **Prof<sup>a</sup>. Aparecida Maria Cordeiro Marques**, pelo carinho, experiência e conhecimentos repassados nos seminários e nas clínicas, participando de nossas conquistas ao longo dos anos.

Ao **Prof. Paulo Flores** pela disponibilidade e orientação quanto à avaliação radiográfica usada nesta pesquisa e também ao longo das aulas.

À **Luciana Oliveira** pela atenção e auxílio na obtenção e avaliação das imagens radiográficas deste estudo.

Aos meus colegas de turma, **Fabíola Bastos de Carvalho, Isabele Cardoso Vieira de Castro, João Alves Reis Junior, Joubert Mateus Aciole e Luiz Guilherme Pinheiro Soares** pelo companheirismo, apoio e convivência ao longo destes anos de dificuldades, superação e conquistas.

Ao colega **Arthur Felipe Santos Barbosa**, pelo companheirismo, por dividir seus conhecimentos da Biologia durante o curso e contribuir com a leitura da espectroscopia Raman realizada nesta pesquisa.

Às pós-graduandas **Priscila Chagas Oliveira, Carolina Montagn e Ana Paula Cavalcanti de Souza** pelo companheirismo e auxílio prestado, e em especial, a **Susana Carla P. Oliveira Sampaio e Juliana S. C. Monteiro** pela amizade, atenção e por possibilitarem minha participação em suas pesquisas.

Aos estagiários **Juliana Aragão, Rafael Soares, Carolina Mathias, Carolina Souza, Renan Trindade, Aline Silva Andrade, Juliana Mattos, Brunna Barreto, Drielli Sotero e Luiz Gaudencio**, que contribuíram e me auxiliaram durante a realização da parte experimental desta pesquisa, sempre dedicados e fundamentais para a realização desta e de outras pesquisas.

A **Maria de Lourdes Silva Santos**, técnica em histopatologia da UFBA, pela dedicação no processamento histológico do material coletado durante a fase experimental.

Aos **funcionários da FOUFBA** que de forma direta ou indireta contribuíram para realização desta pesquisa.

Ao **CNPq** pela colaboração científica e financeira, possibilitando a realização desta e de outras pesquisas, investindo no desenvolvimento profissional e acadêmico.

---

## SUMÁRIO

---

<b>LISTA DE TABELAS</b>	
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b>	
<b>RESUMO</b>	
<b>ABSTRACT</b>	
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>16</b>
<b>3 PROPOSIÇÃO</b>	<b>37</b>
3.1 Objetivo Geral	37
3.2 Objetivo Específico	37
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>38</b>
4.1 Respaldo ético da pesquisa	38
4.2 Delineamento	38
4.3 Amostra	38
4.4 Procedimento de disjunção	39
4.5 Procedimento da irradiação a laser e LED	42
4.6 Avaliação dos grupos experimentais	47
4.6.1 Avaliação da densidade óssea	47
4.6.2 Morte dos animais	51
4.6.3 Espectroscopia Raman e avaliação histológica	52
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>58</b>
5.1 Espectroscopia Raman	58
5.2 Histologia	67
5.3 Radiografia digital direta	79
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>81</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b>	<b>101</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>102</b>
<b>ANEXO A</b>	<b>116</b>

---

**LISTA DE TABELAS**

---

<b>Tabela 01</b>	Protocolo de expansão, aplicação do laser e LED (ROSA, 2014).	<b>43</b>
<b>Tabela 02</b>	Parâmetros usados para laser e LED (ROSA, 2014).	<b>47</b>
<b>Tabela 03</b>	Critérios utilizados para análise semi-quantitativa de microscopia óptica (ROSA, 2014).	<b>57</b>
<b>Tabela 04</b>	Valores médios ( $\pm$ desvio padrão) em mmAI da área na sutura palatina mediana (ROSA, 2014).	<b>59</b>
<b>Tabela 05</b>	Valores médios ( $\pm$ desvio padrão) dos picos do Raman para colágeno ( $1454\text{ cm}^{-1}$ ) na sutura palatina mediana (ROSA, 2014).	<b>62</b>
<b>Tabela 06</b>	Valores médios ( $\pm$ desvio padrão) dos picos do Raman para HA ( $960\text{ cm}^{-1}$ ) na sutura palatina mediana (ROSA, 2014).	<b>65</b>
<b>Tabela 07</b>	Valores médios ( $\pm$ desvio padrão) dos picos do Raman para colágeno ( $1454\text{ cm}^{-1}$ ) na cortical (ROSA, 2014).	<b>67</b>
<b>Tabela 08</b>	Valores médios ( $\pm$ desvio padrão) dos picos do Raman para HA ( $960\text{ cm}^{-1}$ ) na cortical (ROSA, 2014).	<b>68</b>

---

**LISTA DE FIGURAS**


---

<b>Figura 01</b>	A - Dispositivo com helicóide triplo. B - Separação dos incisivos com espátula. C - Incisivos separados com fio dental. D - Dispositivo helicóide entre os incisivos (ROSA, 2014).	<b>41</b>
<b>Figura 02</b>	A - Condicionamento ácido. B - Lavagem com água. C - Inserção da resina. D - Resina fotopolimerizada (ROSA, 2014).	<b>42</b>
<b>Figura 03</b>	A - Irradiação com laser. B - Irradiação com LED (ROSA, 2014).	<b>44</b>
<b>Figura 04</b>	Aparelho utilizado no experimento para realização da fototerapia laser (ROSA, 2014).	<b>45</b>
<b>Figura 05</b>	Aparelho utilizado no experimento para realização da fototerapia LED (ROSA, 2014).	<b>45</b>
<b>Figura 06</b>	A - Vista lateral do posicionamento do filme e escala de alumínio. B - Vista superior com posicionador acoplado. (ROSA, 2014).	<b>48</b>
<b>Figura 07</b>	Radiografias oclusais da maxila. A - Sutura normal (sem tratamento). B – Aspecto 7 dias pós-disjunção. (ROSA, 2014).	<b>49</b>
<b>Figura 08</b>	A - Demarcação e recorte da área de escolha na sutura palatina mediana. B – Histograma, com valores médios, de densidade óssea (ROSA, 2014).	<b>50</b>
<b>Figura 09</b>	Demarcação da escala de alumínio para avaliar a média dos valores de pixels através do histograma (ROSA, 2014).	<b>51</b>
<b>Figura 10</b>	Espectro Raman de osso basal sem tratamento com marcação dos picos (ROSA, 2014).	<b>54</b>
<b>Figura 11</b>	Radiografias de cada grupo. I - Controle. II - DISJ 7d. III - DISJ + L7d. IV - DISJ + LED 7d. V - DISJ 14d. VI - DISJ + L14d1. VII - DISJ+LED 14d1. VIII - DISJ+L14d2. IX - DISJ + LED 14d2 (ROSA, 2014).	<b>59</b>
<b>Figura 12</b>	Demonstração gráfica das intensidades médias de todos os grupos para o pico Raman $\sim 1454\text{ cm}^{-1}$ , nos períodos observacionais de 7 e 14 dias (ROSA, 2014).	<b>62</b>
<b>Figura 13</b>	Demonstração gráfica das intensidades médias de	<b>65</b>



todos os grupos para o pico Raman  $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$ , nos períodos observacionais de 7 e 14 dias (ROSA, 2014).

<b>Figura 14</b>	Demonstração gráfica da presença de inflamação (ROSA, 2014).	<b>70</b>
<b>Figura 15</b>	Fotomicrografia mostrando osso neoformado com atividade osteoblástica, células inflamatórias e hemorragia (Controle - HE) (ROSA, 2014).	<b>71</b>
<b>Figura 16</b>	Fotomicrografia mostrando inflamação crônica marcante, macrófago em atividade e osso remanescente (DISJ+LED7d - HE) (ROSA, 2014).	<b>71</b>
<b>Figura 17</b>	Fotomicrografia mostrando inflamação crônica, tecido de granulação e vasos neoformados (DISJ+L14d1 - HE) (ROSA, 2014).	<b>71</b>
<b>Figura 18</b>	Demonstração gráfica da presença de colágeno (ROSA, 2014).	<b>73</b>
<b>Figura 19</b>	Fotomicrografia mostrando osso neoformado com presença discreta de colágeno (DISJ 7d - Picrosírius). (ROSA, 2014).	<b>74</b>
<b>Figura 20</b>	Fotomicrografia mostrando osso neoformado maduro com moderada presença de fibras colágenas (DISJ 14d - Picrosírius). (ROSA, 2014).	<b>74</b>
<b>Figura 21</b>	Fotomicrografia mostrando osso neoformado maduro com muita colagenização (DIS+LED14d2 - Picrosírius) (ROSA, 2014).	<b>74</b>
<b>Figura 22</b>	Demonstração gráfica da atividade osteoblástica (ROSA, 2014).	<b>76</b>
<b>Figura 23</b>	Fotomicrografia mostrando osso neoformado com osteócitos irregulares e atividade osteoblástica (DISJ 7d - HE) (ROSA, 2014).	<b>77</b>
<b>Figura 24</b>	Fotomicrografia mostrando osteócitos irregulares, tecido estromal com inflamação crônica e numerosas células gigantes em atividade (DISJ+L7d - HE) (ROSA, 2014).	<b>77</b>
<b>Figura 25</b>	Fotomicrografia mostrando osso neoformado com osteócitos irregulares, linhas basofílicas e osteoblastos em atividade (DISJ+LED14d1 - HE) (ROSA, 2014).	<b>77</b>
<b>Figura 26</b>	Demonstração gráfica da atividade osteoclástica	<b>79</b>

(ROSA, 2014).

- Figura 27** Fotomicrografia mostrando presença de numerosas células gigantes multinucleadas e inflamação crônica severa (DISJ 7d - HE) (ROSA, 2014). **80**
- Figura 28** Fotomicrografia mostrando osso neoformado com osteócitos e células gigantes (macrófagos) em atividade (DISJ 14d - HE) (ROSA, 2014). **80**
- Figura 29** Fotomicrografia mostrando osso neoformado com osteócitos no interior, linhas basofílicas e presença de célula osteoclástica (DIS+LED7d - HE) (ROSA, 2014). **80**

---

**LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**


---

AsGa	Arseneto de Gálio
AsGaAl	Arseneto de Gálio Alumínio
ATP	Adenosina-trifosfato
Ca <sup>+2</sup>	Íon Cálcio
CEEAA	Comissão de Ética na Experimentação Animal
cm <sup>2</sup>	Centímetro quadrado
cm <sup>-1</sup>	Centímetro elevado a menos um
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CW	<i>Continuous wave</i> - Comprimento de onda contínuo
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> – Ácido desoxirribonucléico
FDA	<i>Food and drug administration</i>
Fig	Figura
FOUFBA	Faculdade de Odontologia da UFBA
g	Gramma
HA	Hidroxiapatita
HE	Hematoxilina-eosina
hs	Horas
J	Joule
J/cm <sup>2</sup>	Joule por centímetro quadrado
kV	Kilovolt
Laser	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i> - Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação
LED	<i>Light emitting diode</i> - Diodo Emissor de Luz
LLLT	<i>Low level laser therapy</i> – Terapia com laser de baixa potência
mA	Miliampere
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
ml	Mililitros
mmAl	Milímetros de Alumínio
mW	MiliWatts
mW/cm <sup>2</sup>	MiliWatts por centímetro quadrado
n/A	Número de pontos dividido pela área
NIR	<i>Near infra-red</i> – infravermelho próximo
nm	Nanômetros
n <sup>o</sup>	Número
°C	Graus centígrados
P	Potência
P <sup>+2</sup>	Íon fósforo
PO <sub>4</sub> <sup>3</sup>	Íon Fosfato
RNA	Ribonucleic acid - Ácido ribonucleico
SAEF	<i>Spatial Average Energy Fluence</i> – Densidade de energia média espacial
s	Segundos
t	Tempo
TGF-β1	<i>Transformation growth factor beta</i> – Fator de crescimento e transformação beta
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UV	Ultra Violeta

## RESUMO

Acelerar a formação óssea após a disjunção da sutura palatina mediana reduziria o tempo de tratamento e os efeitos bioestimuladores da irradiação laser/LED poderiam contribuir neste sentido. O objetivo deste estudo foi analisar o efeito da fotobiomodulação laser/LED na aceleração da formação óssea na região de sutura palatina mediana após disjunção da maxila. A amostra formada por 45 ratos foi dividida em grupos com período experimental de sete dias: Controle (sem tratamento); Disjunção; Disjunção e aplicação de laser; Disjunção e aplicação do LED; e em grupos com período experimental de 14 dias: Disjunção; Disjunção e aplicação de laser na primeira semana; Disjunção e aplicação de LED na primeira semana; Disjunção e aplicação de laser na primeira e segunda semanas; Disjunção e aplicação de LED na primeira e segunda semanas. A irradiação com laser/LED foi realizada de 48 em 48 hs. A disjunção foi realizada com uma espátula e o espaço mantido com um helicóide triplo feito de fio ortodôntico 0,020" de aço inoxidável. Foram usados o laser diodo ( $\lambda 780\text{nm}$ ,  $70\text{mW}$ ,  $\text{spot}=0,04\text{cm}^2$ ,  $t=257\text{s}$ , SAEF de  $18\text{J}/\text{cm}^2$ ) ou LED ( $\lambda 850 \pm 10\text{nm}$ ,  $150\text{mW} \pm 10\text{mW}$ ,  $\text{spot}=0,5\text{cm}^2$ ,  $t=120\text{s}$ , SAEF de  $18\text{J}/\text{cm}^2$ ), aplicados em um ponto na sutura palatina mediana imediatamente posterior aos incisivos superiores. Foi realizada avaliação pela Espectroscopia Raman próximo ao infravermelho, avaliação histológica e avaliação da densidade óssea na região da sutura através de radiografia digital direta e em seguida os dados foram submetidos à análise estatística ( $p \leq 0,05$ ). Nas análises radiográficas, os grupos irradiados com laser e LED, em geral, apresentaram densidade óssea semelhante ao do grupo controle. A análise do espectro Raman mostrou que a irradiação laser e LED aumenta a deposição de hidroxiapatita na sutura palatina após expansão. Na análise histológica a inflamação se mostrou variável, houve maior produção de colágeno e atividade osteoblástica e menor atividade osteoclástica. Os resultados deste estudo indicam que tanto a irradiação com laser quanto com LED exercem biomodulação positiva, contribuindo para aceleração na formação óssea na sutura palatina mediana após o procedimento de disjunção.

**Palavras-chave:** Fototerapia; Lasers; Ortodontia; Osteogênese; Técnica de expansão palatina.

## ABSTRACT

Accelerate bone formation after maxillary would reduce treatment time and the biomodulating effects of laser/LED could contribute for it. The aim of this study was to analyze the effect of laser or LED phototherapy on the acceleration of bone formation at the midpalatal suture after maxilla expansion. A sample of forty five rats was divided into groups with 7 days of experimental time: Control (no treatment); Expansion; Expansion and laser irradiation; and Expansion and LED irradiation; and into groups with 14 days of experimental time: Expansion; Expansion and laser in the first week; Expansion and LED in the first week; Expansion and laser in the first and second weeks; Expansion and LED in the first and second weeks. Laser/LED irradiation occurred every 48hs. Expansion was accomplished with a spatula and maintained with a triple helicoid of 0.020" stainless steel orthodontic wire. A diode laser ( $\lambda$ 780nm, 70mW, spot of  $0.04\text{cm}^2$ ,  $t=257$  sec, SAEF of  $18\text{J}/\text{cm}^2$ ) or a LED ( $\lambda$ 850  $\pm$  10nm,  $150\text{mW} \pm 10\text{mW}$ , spot of  $0.5\text{cm}^2$ ,  $t=120$  sec, SAEF of  $18\text{J}/\text{cm}^2$ ) were applied in one point in the midpalatal suture immediately behind the upper incisors. Near infrared Raman spectroscopy, histological and bone density analysis through direct digital radiography of the suture region were carried and data submitted to statistical analyzes ( $p \leq 0.05$ ). In the radiograph analyzes the laser and LED irradiated groups presented, in general, similar bone density as the control group. Raman spectrum analyzes demonstrated that laser and LED irradiation increases hydroxiapatite in the midpalatal suture after expansion. In the histological analyzes inflammation varied, there was a higher production of collagen and osteoblastic activity and less osteoclastic. The results of this indicate that laser, as well as LED irradiation, have a positive biomodulation contributing to the acceleration of bone formation in the midpalatal suture after expansion procedure.

**Keywords:** Phototherapy; Lasers; Orthodontics; Osteogenesis; Palatal Expansion Technique.

---

## 1. INTRODUÇÃO

---

A disjunção da maxila é considerada um importante instrumento na correção de maxilares constrictos que frequentemente resultam em mordida cruzada posterior (SAITO, SHIMIZU, 1997; BRAUN et al., 2000). Esta é uma das maloclusões mais observadas em diferentes fases da dentição, podendo ocorrer da decídua à permanente (SARI et al., 2003).

A disjunção como meio de corrigir essa deficiência transversa tem sido usada cada vez mais rotineiramente (MARINI et al., 2007). O procedimento se baseia numa expansão com separação ortopédica dos segmentos maxilares que pode ocorrer se forças de uma magnitude significativa forem aplicadas de forma a romper as estruturas bioelásticas da sutura palatina mediana (BRAUN et al., 2000). Os efeitos esqueléticos e dentários desta terapia têm sido demonstrados em diversos estudos, comprovando sua eficácia, porém há discordâncias quanto ao tempo e tipo de contenção a serem usados após a remoção do aparelho (MARINI et al., 2007).

A recidiva é uma tendência dos tecidos expandidos (dentes, processos alveolares, suturas e ossos maxilares) a retornarem às suas posições originais pré-tratamento (BROSH et al., 1998). Após a disjunção, a sutura inicia um processo de remodelação que inclui reabsorção e formação óssea assim como um rearranjo das fibras colágenas até a região em questão atingir um equilíbrio estrutural (LEE et al., 2001). Uma regeneração óssea inadequada da sutura palatina mediana após disjunção tem sido apontada como um dos fatores que podem influenciar na recidiva pós-tratamento ortodôntico. Desta forma, estudos indicam o uso de contenções por períodos prolongados para prevenir a recidiva de arcadas expandidas enquanto os tecidos se reorganizam (SAITO, SHIMIZU, 1997; LEE et al., 2001).

Acelerar a formação óssea na região após a disjunção seria benéfico para evitar a recidiva e diminuir, também, o tempo de contenção (SAITO, SHIMIZU, 1997; STUANI, 2008; SANTIAGO, PIRAM, FUZIY, 2012).

Reconhecendo-se os efeitos bioestimuladores e de aceleração na formação óssea do laser de baixa potência (MERLI et al., 2005; STEIN et al., 2005; PRETEL, LIZARELLI, RAMALHO, 2007; CEPERA et al., 2008; PINHEIRO et al., 2011; PINHEIRO et al., 2012a; PINHEIRO et al., 2012b; PINHEIRO et al., 2012c) acredita-se que sejam necessários estudos da sua aplicabilidade na região da sutura palatina mediana quando do procedimento de disjunção (SAITO, SHIMIZU, 1997).

O uso da luz LED também tem sido relacionado a efeitos bioestimulatórios positivos e similares aos obtidos com o uso do laser (PINHEIRO et al., 2012; PINHEIRO et al., 2012a; SAMPAIO et al., 2012). No entanto, ainda não existe estudo que tenha avaliado a ação do LED no osso após disjunção da maxila.

Sendo assim, pretende-se com este trabalho avaliar a ação do laser e do LED na formação óssea após disjunção da sutura palatina mediana.

---

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

---

### 2.1 – Disjunção da maxila

Mordida cruzada posterior é uma das maloclusões mais frequentemente observadas em todas as fases da dentição (SARI et al., 2003). Esse tipo de maloclusão existe quando os dentes maxilares posteriores estão lingualmente posicionados em relação aos dentes mandibulares e muito frequentemente reflete uma arcada dentária maxilar estreita, significando um problema esquelético (PROFFIT, FIELDS, 2002). Pesquisadores relataram que esta alteração não é auto-corrigível e recomendaram que o tratamento seja realizado precocemente, de preferência na fase inicial da dentição permanente (SARI et al., 2003; SANTIAGO, PIRAM, FUZIY, 2012).

A disjunção da maxila é um dos tratamentos mais comuns na correção da atresia maxilar (SAITO, SHIMIZU, 1997; BRAUN et al., 2000; ARAT et al., 2003; PETRICK et al., 2011) e tem sido usada há muitos anos (McNAMARA Jr., 2002). A base da disjunção é a abertura da sutura palatina mediana aplicando-se força sobre a sutura e estimulando-se a formação de osso adicional naquele local (PROFFIT, FIELDS, 2002). As mudanças são produzidas, primariamente, nas estruturas esqueléticas basais expandindo e, portanto, aumentando as dimensões da arcada superior por meio da separação da sutura palatina (efeito ortopédico) e com movimento dos dentes posteriores e processos alveolares em diferentes intensidades a depender da maturação e da idade do paciente (efeito ortodôntico) (GRABER, VANARSDALL, 2002; SARI et al., 2003).



Contudo, a idade do paciente é um fator definitivo para obtenção da separação da sutura, pois como todas as suturas crânio-faciais, a sutura palatina mediana fica mais tortuosa e interdigitada com o aumento da idade. A separação da sutura, além do movimento dos molares, é conseguida, em crianças de até 10 anos de idade, usando-se quase todo tipo de dispositivo expensor, como, por exemplo, placas removíveis. Na adolescência, são necessárias forças mais pesadas, pois já há um início de imbricamento da sutura. Estas forças são normalmente transmitidas usando-se um mecanismo de parafuso fixo nos dentes superiores, com ou sem acrílico para apoio na mucosa palatina, como nos aparelhos do tipo Haas ou Hyrax respectivamente. Após a adolescência, as espículas ósseas terão imbricado a sutura de tal maneira a tornar impossível uma extensa expansão esquelética (PROFFIT, FIELDS, 2002). Desta forma em adultos, deve ser feita a expansão palatina cirurgicamente assistida (PROFFIT, FIELDS, 2002; PETRICK et al., 2011), também conhecida como disjunção ortodôntica-cirúrgica (MEDEIROS, MEDEIROS, 2004), que usa cortes ósseos para reduzir a resistência sem livrar totalmente os segmentos maxilares, seguida por expansão rápida do parafuso (PROFFIT, FIELDS, 2002).

O procedimento clínico da disjunção da maxila inclui uma fase ativa, que libera forças laterais, e outra passiva, a de contenção. A fase ativa estende-se de uma a duas semanas, dependendo da magnitude da atresia maxilar (CAPELOZZA, SILVA FILHO, 1997). Arcadas expandidas, porém, recidivam rapidamente caso não seja usada uma contenção por período prolongado (SAITO, SHIMIZU, 1997). Parece não haver entre os pesquisadores um consenso quanto à estabilidade em longo prazo da disjunção da maxila, assim como em relação ao tempo e tipo de contenção indicada (MARINI et al., 2007).

Após a fase da expansão, alguns autores recomendam a permanência do aparelho em posição por um período mínimo de três (CAPELOZZA, 1997) a cinco meses ou mais (ZAHROWSKI, TURLEY, 1992; GRABER, VANARSDALL, 2002), para permitir a reorganização sutural da maxila e a dissipação de forças acumuladas (CAPELOZZA, 1997; GRABER, VANARSDALL, 2002). Enquanto estas forças residuais não forem eliminadas haverá uma tendência ao colapso dos segmentos expandidos (ZAHROWSKI, TURLEY, 1992). Com a retirada do disjuntor, em alguns casos ainda é dada ao paciente uma placa palatina de contenção removível para manter o resultado alcançado com o seu uso por um período mínimo de mais seis meses (CAPELOZZA, 1997; GRABER, VANARSDALL, 2002; SILVA FILHO et al., 2008). O grau de recidiva diminui quanto maior for o tempo de contenção (LEE et al., 2001). Disjunção sem contenção resulta em alta percentagem de recidiva (MARINI et al., 2007).

Avaliações em radiografias oclusais digitalizadas revelaram que, em humanos, mesmo após um período de acompanhamento de 120 dias pós-disjunção cirúrgica da maxila, ao se comparar os valores de pixels ao longo da sutura palatina mediana em diferentes tempos (30, 60, 90 e 120 dias) nenhum paciente alcançou o valor observado no pré-operatório (MALMSTROM, GURGEL 2007; GURGEL, MALMSTROM, PINZAN-VERCELINO, 2012). Demonstra-se, então, a necessidade de um maior período de contenção para o restabelecimento da densidade e completa neoformação óssea da sutura (MALMSTROM, GURGEL 2007). Ademais, tem-se observado que após disjunção da maxila, ocorre uma mineralização 2,5 vezes maior na região posterior da sutura quando comparado com a anterior, indicando ainda que o padrão de mineralização (fechamento) da sutura expandida é semelhante a um zíper fechando com direção posteroanterior. A região anterior,

portanto, deveria ser contida por um tempo mais prolongado para compensar a reconstrução e remodelação tardia do tecido ósseo recentemente depositado (VARDIMON et al., 1998).

Uma das principais causas para a recidiva é a regeneração óssea insuficiente da sutura palatina mediana com a falta de um restabelecimento estrutural da mesma antes do final do tratamento. Desta forma, seria benéfico acelerar a formação de osso na região para evitar a recidiva e, com isto, diminuir o tempo de contenção (SAITO, SHIMIZU, 1997).

Estudos mostraram que a sutura palatina mediana normal apresenta um espaço sutural de espessura uniforme, com tecido conjuntivo fibroso, rico em fibroblastos e colágeno, osteoblastos ativos, revelando intensa atividade de síntese e numerosos osteócitos (STUANI, 2008).

As suturas unem os ossos através de um complexo de tecido conjuntivo com fibras periféricas inseridas nas margens ósseas calcificadas. A resposta biológica da sutura quando um sistema de forças é aplicado é similar à do ligamento periodontal. A rica vascularização proporciona fonte de osteoclastos e osteoblastos, células oriundas do tecido mesenquimal presentes na corrente sanguínea. A primeira reação após a disjunção é uma resposta inicial traumática relacionada à magnitude da expansão e conseqüentemente à força aplicada. A segunda corresponde ao reparo do tecido conjuntivo seguido de depósito de um novo osso nas bordas ósseas da sutura, de forma progressiva, a fim de restabelecer a morfologia original da mesma (STUANI, 2008).

Quando os ossos são separados, forma-se osso nas bordas das suturas com diferenciação de novas células a partir da camada de câmbio do periósteo. O comportamento das suturas na disjunção da maxila apresenta muita semelhança

com o desenvolvimento da sutura durante o crescimento (STUANI, 2008). Pesquisas indicam que com dois dias após disjunção, células mesenquimais se arranjam paralelamente às forças expansivas e preenchem o centro da sutura. Há diversos vasos sanguíneos, não presentes antes, e osso novo começa a ser formado (KOBAYASHI et al., 1999). A tração produzida por forças ortopédicas provoca um aumento de osteoblastos e zona osteóide em ambas as superfícies ósseas permitindo que a sutura recupere um quadro histológico normal (STUANI, 2008).

Desta forma, quando estresse é aplicado na sutura palatina mediana, a força mecânica é transformada em sinais biológicos que resultam em uma série de eventos (MA et al., 2008). Forças expansivas promovem reabsorção óssea através da ativação de osteoclastos e formação óssea pelo aumento da proliferação e diferenciação de células periostais em osteoblastos (HOU, FUKAI, OLSEN, 2007).

Estudos mostraram que o comportamento da regeneração óssea na sutura palatina mediana de ratos é similar à de humanos (GERBI et al., 2005). A disjunção da maxila por sete dias com helicóides em ratos de seis semanas demonstraram que as fibras colágenas são reorientadas na sutura a partir do primeiro dia da expansão. Ao mesmo tempo, células periostais começam a migrar para dentro da sutura. Formação óssea é observada nas bordas do osso palatino no sétimo dia. Após quatro semanas, a sutura restabelece um aspecto similar ao de antes da expansão, porém com uma camada óssea adicional neoformada na margem de ambos os lados (HOU, FUKAI, OLSEN, 2007).

## 2.2 – Laser

A palavra laser é uma abreviatura para *Light Amplification of Stimulated Emission of Radiation* que na língua portuguesa traduz-se para Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação. O laser é uma fonte de radiação que varia do espectro infravermelho ao ultravioleta passando pelo espectro visível (NEVES et al., 2005).

A luz laser difere das outras formas de luz devido a três características principais que são a monocromaticidade, a coerência e a unidirecionalidade ou colimação. A monocromaticidade significa que a luz laser é composta de fótons da mesma cor e com mesmo comprimento de onda. A coerência representa as ondas viajando ordenadamente em relação ao tempo e com suas amplitudes iguais. A unidirecionalidade ou colimação indica que o fluxo dos fótons é paralelo ao tubo que gera este tipo de energia. A luz laser possui divergência angular muito pequena (NEVES et al., 2005).

Os lasers de baixa potência não têm poder destrutivo e apresentam ação fotoquímica de analgesia, ação anti-inflamatória e bioestimuladora tecidual. Dentre eles estão os lasers Diodos de Arseneto de Gálio (AsGa) e de Arseneto de Gálio Alumínio (AsGaAl) (NEVES et al., 2005).

## 2.3 – Diodo Emissor de Luz (LED)

Uma alternativa para os lasers é o uso do LED (*light emitting diode*), também chamado em português de Diodo Emissor de Luz ou ainda Diodo Foto Emissor (SOUZA, 2008). O LED produz uma luz com comprimento de onda e densidade de

energia do ultravioleta (UV) ao infra-vermelho próximo (NIR) (POSTEN et al., 2005; PINHEIRO et al., 2011).

Os LEDs são formados pela união de semicondutores do tipo p e do tipo n, formando uma junção p-n. Quando aplicada uma diferença de potencial elétrico positiva no lado p e negativa no lado n, o diodo passa ao estado polarizado. Ocorre uma recombinação de elétrons e lacunas na região da junção, cujo resultado é a emissão espontânea de energia sob a forma de elétrons (SEEGER, 1997). Os semicondutores contêm materiais dopantes na sua composição, também chamados de impurezas, e o tipo de dopante usado na confecção dos LEDs é que determina a cor da emissão da luz. O LED que utiliza o Arseneto de Gálio e Alumínio emite radiações infra-vermelhas (SOUZA, 2008).

Uma diferença entre os LEDs e o laser é a forma de emissão de luz, pois os LEDs emitem luz através de emissão espontânea de radiação, diferentemente dos lasers que trabalham com emissão estimulada de radiação (SOUZA, 2008). Outra diferença significativa entre lasers e LEDs é a forma como a energia é entregue. Os LEDs promovem uma entrega do comprimento de onda de forma mais amena e com uma energia de potência substancialmente menor (PINHEIRO et al., 2011). O LED é uma fonte de luz monocromática que emite em uma faixa espectral relativamente pequena, considerada como uma banda estreita (POSTEN et al., 2005), mas com um espectro de emissão mais amplo que o laser (SAMPAIO et al., 2012). Desta forma, O LED tem uma distribuição espectral distinta, possivelmente interagindo com maior número de fotoreceptores (TACHIAHRA, FARINELLI, ANDERSON, 2002; SAMPAIO et al., 2012).

Os LEDs trabalham sem emitir calor, o que elimina o perigo de danos aos tecidos assim como os possíveis danos acidentais ao olho quando do uso dos

lasers, mas necessitam também de proteção ocular durante os procedimentos de irradiação tanto para o paciente quanto para o profissional e o assistente (DESMET et al., 2006; PINHEIRO et al., 2011).

Os LEDs se dispersam em uma maior área que os lasers e podem ser usados em regiões alvo mais largas, resultando em tempos de tratamentos mais reduzidos (PINHEIRO et al., 2011). Ademais, a fototerapia LED no infra-vermelho é considerada sem risco pela FDA e tem sido aprovada para uso em humanos (DESMET et al., 2006). Para os pacientes, o tratamento com LED é indolor, rápido e sem desconforto (POSTEN et al., 2005).

#### **2.4 - Fotobiomodulação Laser e LED na formação óssea**

A fotobiomodulação laser, também conhecida como terapia de laser de baixa potência (LLLT), tem como alvo a fotoativação de mecanismos celulares (PINHEIRO, GERBI, 2006; SILVA et al., 2010).

Com a irradiação laser, podem ser observados resultados de efeitos positivos nas membranas celulares e nas mitocôndrias (PINHEIRO et al., 2011). Estudos consideram que o mecanismo deste efeito positivo nos tecidos é a estimulação de porfirinas e citocromos aumentando a atividade celular e, conseqüentemente, aumentando a concentração de ATP para ser usado na síntese de proteína e aceleração ou estimulação da proliferação celular, assim como na liberação de  $Ca^{+2}$  (PINHEIRO, GERBI, 2006).

Em estados fisiológicos alterados, o laser atua no processo de troca iônica, acelerando o incremento de ATP mitocondrial e favorecendo reações que interferem no metabolismo celular. Com a atividade celular aumentada, ocorre maior síntese de

DNA e RNA; incremento na formação de colágeno e precursores; aumento do nível de  $\beta$ -endorfina, responsável pelo efeito analgésico; variação quantitativa de prostaglandinas, oferecendo efeito anti-inflamatório; e modulação na síntese de proteínas, na revascularização, na proliferação e na diferenciação celular (KARU, 1987).

Células mesenquimais podem, com o efeito biomodulador, ser diferenciadas em osteoblastos e transformadas mais rapidamente em osteócitos. Os osteócitos que são o resultado do aprisionamento de osteoblastos pela matriz de tecido mineralizado, interferem no metabolismo do  $\text{Ca}^{+2}$  e do  $\text{P}^{+2}$  e se comunicam mantendo as funções ósseas. O potencial da diferenciação de células mesenquimais depende de fatores genéticos, sistêmicos e locais e a fotobiomodulação laser pode atuar como um fator indutor nesta diferenciação (PINHEIRO, GERBI, 2006).

Muitos processos fisiológicos incluindo a reabsorção tecidual e a osteogênese, presentes na disjunção de maxila, são acompanhados por um aumento do metabolismo, com necessidade de produção de energia. Proliferação e migração de células mesenquimais, osteoclastos, osteoblastos e fibroblastos são pré-requisitos para a concretização destes processos fisiológicos (MA et al, 2008).

A fotobiomodulação laser é efetiva quando aplicada em sítios de regeneração, com alta proliferação celular, tais como locais de fraturas ósseas, defeitos ósseos, extrações dentárias (SAITO, SHIMIZU, 1997), assim como durante movimentação ortodôntica (HABIB, 2008; HABIB et al., 2012) e após cirurgia de implantes (PINHEIRO, GERBI, 2006). Sua aplicação resulta em uma normalização da região afetada ao produzir uma redução no edema e indução de analgesia, assim como uma aceleração do processo de reparo tecidual (PINHEIRO, GERBI, 2006; SILVA et



al., 2010). Por outro lado, a aplicação do laser não é eficaz em sítios de tecidos normais ou inativos (SAITO, SHIMIZU, 1997; PINHEIRO, GERBI, 2006).

O laser diodo de arseneto de gálio e alumínio (AsGaAl) é reconhecido como um laser de alta penetração em tecidos já que a água e a hemoglobina apresentam um baixo coeficiente de absorção em relação a ele (SAITO, SHIMIZU, 1997; SIMÕES, 2008). A profundidade de penetração pode atingir de 2 a 3 cm e por isto tem-se a escolha de um laser operando no espectro infra-vermelho quando da investigação dos efeitos biomoduladores em tecido ósseo (STUANI, 2008).

Estudos prévios indicam que a fotobiomodulação laser próximo do infra-vermelho é efetiva em aumentar o reparo ósseo principalmente devido à sua boa capacidade de penetração quando comparada com a luz visível (PINHEIRO et al., 2012b; PINHEIRO et al., 2012c). Vários efeitos bioestimuladores do laser de baixa potência têm sido relatados, entre eles a aceleração na formação óssea (SAITO, SHIMIZU, 1997; STEIN et al., 2005; MERLI et al., 2005; PRETEL, LIZARELLI, RAMALHO, 2007; CEPERA et al., 2008; PINHEIRO et al., 2011; PINHEIRO et al., 2012a; PINHEIRO et al., 2012b; PINHEIRO et al., 2012c).

Tem-se observado que a irradiação laser, em comprimentos de onda com maior penetração, pode intensificar mudanças celulares amadurecendo antecipadamente osteoblastos que, conseqüentemente, produzirão mais cedo e em maior quantidade deposição de hidroxapatita resultando em maturação óssea e em um osso mais resistente. No entanto, o efeito da laserterapia na formação óssea provavelmente depende da dose total de radiação, assim como da duração e do modo de aplicação (STEIN et al., 2005; PINHEIRO, GERBI, 2006; HUBLER et al., 2010).

A eficácia da ação do laser no processo de cicatrização óssea tem sido confirmada em diversas pesquisas (NICOLAU et al., 2003; PRETEL, LIZARELLI, RAMALHO, 2007; PINHEIRO et al., 2011; PINHEIRO et al., 2012b; PINHEIRO et al., 2012c; PINHEIRO et al., 2013). Dentre elas, observou-se que em feridas ósseas na mandíbula de ratos há aceleração na neoformação e na cicatrização, o que favoreceu a reparação com o mesmo padrão celular de normalidade (PRETEL, LIZARELLI, RAMALHO, 2007). Já em outro estudo, o efeito do laser em feridas em fêmur de ratos aumentou a superfície de osteoblastos e levou a uma maior taxa de aposição mineral que nos grupos não irradiados (NICOLAU et al., 2003).

Em feridas ósseas foi observado que a fotobiomodulação laser intensifica a formação de osso ao ser associada com o uso de agregado trióxido mineral (MTA) (PINHEIRO et al., 2011). Da mesma forma, o uso do laser com enxertos cerâmicos (PINHEIRO et al., 2012c) e enxertos de hidroxiapatita associados com regeneração tecidual guiada aumenta a quantidade de hidroxiapatita (HA) depositada em defeitos ósseos (PINHEIRO et al., 2012b).

Com isto, o uso do laser de baixa potência no tratamento odontológico tem visado diminuir o tempo de reparo ósseo (SILVA, 2009). Sendo assim, a irradiação a laser poderia potencialmente estimular o recrutamento de osteoblastos e/ou maturação dos mesmos ao longo das bordas ósseas da sutura palatina mediana após disjunção (SAITO, SHIMIZU, 1997). A ação do laser possibilitaria o aumento da reparação óssea e qualidade da resistência óssea, levando à diminuição do tempo de contenção com aparelho fixo e removível, e uma oclusão mais estável com menor índice de recidivas (GENOVESE, ANGELLETTI, 2007; CEPERA et al., 2008).

Em um dos primeiros estudos realizados em ratos associando disjunção de maxila com laserterapia, usando laser de AsGaAl (λ830nm) com dose de 35,3J/cm<sup>2</sup>

(AsGaAl,  $\lambda 830\text{nm}$ ,  $100\text{mW}$ ,  $0,6\text{mm}$  de diâmetro do spot), observou-se, histologicamente, uma aceleração na formação óssea na sutura em grupos irradiados ao longo de 7 dias pós disjunção com uma maior área mineralizada. Os autores concluíram que o laser ativa a regeneração óssea nos estágios iniciais pós-disjunção e que prolongar a irradiação contribui com a manutenção da atividade regeneradora. Suspender a aplicação do laser antes deste tempo levaria à diminuição desta atividade. Ademais foi observado que quando a irradiação foi realizada com dose única, apenas no 1º dia da disjunção, não houve influência na regeneração óssea. Deduziu-se então, que sem um estímulo prolongado, provavelmente há uma diminuição da atividade regeneradora. A irradiação múltipla intermitente seria mais efetiva para a aceleração da formação óssea ou o crescimento de fibroblastos que uma única aplicação do laser (SAITO, SHIMIZU, 1997).

Outra pesquisa usando o laser de AsGaAl ( $\lambda 830\text{nm}$ ;  $40\text{mW}$ ) com dose única de  $4\text{J}/\text{cm}^2$  ou  $8\text{J}/\text{cm}^2$  no primeiro dia ou dose dupla de  $4\text{J}/\text{cm}^2$  no primeiro e no segundo dia após a expansão, observou efeito discreto na remodelação óssea da sutura e redução do número de osteoblastos encontrados sete e 15 dias após a irradiação (SIMÕES, 2008).

Por outro lado, um estudo de disjunção com uso do laser de AsGaAl ( $\lambda 830\text{nm}$ ) também utilizando uma dose única, mas com outros parâmetros ( $\lambda 830\text{nm}$ ,  $100\text{mW}$ ,  $126\text{J}/\text{cm}^2$ ) resultou em uma formação óssea mais precoce no grupo irradiado que no grupo controle, formando osso num intervalo de sete dias. A quantidade de osso presente ao 14º dia também foi mais evidente nos grupos irradiados que nos não irradiados (STUANI, 2008).

Já em um estudo com cultura de osteoblastos obtidos após expansão rápida de maxila associada a uma única dose de  $160\text{J}/\text{cm}^2$  de laser AsGaAl ( $\lambda 830\text{nm}$ ,  $30\text{mW}$ , CW, 42 segs) observou-se um efeito estimulante e de diferenciação nas células osteoblásticas. Notou-se que o pico dos efeitos in vivo da fotobiomodulação laser na atividade celular podem ocorrer por volta de 48h após o estímulo. Já in vitro, verificou-se o prolongamento dos efeitos até 17 dias após irradiação (SILVA, 2012).

Apesar de a irradiação a laser ser efetiva nos estágios iniciais da formação óssea, autores concordam que prolongar a aplicação para estágios mais posteriores aparentemente favorece a maturação celular e a manutenção da regeneração óssea, com processo de reparo conseqüentemente mais rápido (SAITO, SHIMIZU, 1997; BOURGUIGNON-FILHO et al., 2005; MERLI et al., 2005).

No entanto, as pesquisas que avaliam o efeito da fotobiomodulação laser na disjunção da maxila (SAITO, SHIMIZU, 1997; CEPERA et al., 2008; SIMÕES, 2008; STUANI, 2008) apresentam divergência como, por exemplo, quanto à dose e frequência, dentre outros parâmetros escolhidos. A dose total da irradiação, tempo e modo de aplicação são fatores que influenciam no resultado (SAITO, SHIMIZU, 1997).

Já o mecanismo de ação da terapia com LED ainda não está completamente elucidado, provavelmente devido a recente aplicação desta técnica, mas acredita-se que com o uso de parâmetros específicos a luz LED pode fotobiomodular certas células e receptores subcelulares. Esta fotobiomodulação pode acelerar ou reduzir cascatas de processos intracelulares culminando com efeitos teciduais ou até mesmo a depender dos parâmetros escolhidos não produzir efeito algum, assim como ocorre com o laser (POSTEN et al., 2005).

Várias pesquisas indicam que tanto o laser quanto o LED emitindo em comprimentos de onda de 630 a 1000nm apresentam efeitos estimulatórios tanto in vivo quanto in vitro (PINHEIRO et al., 2011). Há evidência que ambos, laser e LED, em um mesmo comprimento de onda podem ter resultados com efeitos bioquímicos semelhantes (PINHEIRO et al., 2011).

O número de pesquisas com LED em comparação ao laser ainda é pequeno (XAVIER et al., 2010). Em feridas cutâneas tem-se observado um efeito de biomodulação positivo com uso do LED, resultando em proliferação de fibroblastos, deposição de fibras colágenas e angiogênese (SOUZA, 2008). Da mesma forma, ainda em tecido mole, o uso de LED também tem resultado em menor quantidade de edema e células inflamatórias (MEYER et al., 2010; XAVIER et al., 2010). Por outro lado, o uso do LED em artrite induzida não reduziu a permeabilidade vascular e edema localizado (MORAIS et al., 2010).

No osso, estudos recentes têm provado que a irradiação LED infra-vermelha aumenta a deposição de colágeno (PINHEIRO et al., 2012). Em feridas ósseas, o uso do LED associado ou não com material de enxerto causa menor inflamação e aumento na deposição de colágeno (PINHEIRO et al., 2012; PINHEIRO et al., 2012a). O uso do LED na região do infra-vermelho também apresentou resultados favoráveis quanto à redução da sensibilidade dolorosa na separação dentária para instalação do aparelho ortodôntico (ESPER, 2010). Não existem estudos, no entanto, quanto ao efeito do LED associado à disjunção de maxila.

## 2.5 - Espectroscopia Raman

Exames microscópicos e de imagem, como histopatologia, morfometria, microscopia eletrônica de varredura, raio X e tomografia são métodos frequentemente usados para avaliação de cicatrização óssea, porém estes exames não fornecem informação ao nível molecular. Um método alternativo proposto para avaliar tecidos ao nível molecular é a espectroscopia próxima ao infravermelho de Raman (NIRS) que tem sido usada em diversas aplicações não invasivas de diagnóstico de amostras biológicas tais como implantes biocompatíveis, mineralizações, dentes e doenças ósseas, assim como cicatrização de fraturas ósseas (LOPES et al., 2005).

A espectroscopia Raman pode fornecer informação detalhada sobre a composição química de um tecido analisado. O efeito Raman é um processo onde a energia é trocada entre luz e matéria (HANLON et al., 2000). É uma técnica de espectroscopia vibracional usada para avaliar luz espalhada por moléculas e íons biológicos. O espalhamento ocorre quando moléculas de um espécime são excitadas por uma luz laser incidente. Movimentos vibratórios dentro das moléculas culminam com uma pequena fração da luz perdendo energia e sendo espalhada em comprimentos de onda maiores (MORRIS, MANDAIR, 2011).

Mais especificamente, quando uma molécula é irradiada por uma radiação eletromagnética, esta radiação pode ser absorvida ou espalhada. A maioria da radiação espalhada tem a mesma frequência da radiação incidente. Este tipo de espalhamento chama-se espalhamento elástico (espalhamento Rayleigh), pois não há alteração da frequência da radiação. Existe um tipo específico de espalhamento, denominado espalhamento Raman que é inelástico, uma vez que há alteração na

frequência da radiação. Quando um feixe de radiação monocromática intenso é direcionado para uma molécula gera um campo elétrico que altera a polarizabilidade da molécula, ocorrendo a formação de um momento de dipolo induzido. A vibração molecular, que está relacionada com a estrutura da molécula e com os tipos de ligações químicas entre os átomos e apresenta frequência de vibração muito menor que a frequência de oscilação da radiação incidente, causa uma modulação na amplitude e na frequência do momento de dipolo induzido. Este dipolo oscilante emite radiação, sendo uma parcela representada por espalhamento elástico e outra com os componentes de frequência que acompanham os movimentos de vibração molecular representando o espalhamento Raman - inelástico (HANLON et al., 2000).

Do ponto de vista do nível energético, o processo de espalhamento Raman pode ser observado como uma transição da molécula em um estado fundamental, com nível mais baixo de energia, para um estado de excitação vibracional através da absorção de um fóton incidente e também emissão de um fóton (HANLON et al., 2000).

Como cada espécie molecular apresenta um conjunto de vibrações moleculares único, o espectro Raman de cada espécie em particular irá consistir em uma série de picos ou bandas características da frequência vibracional daquela molécula (HANLON et al., 2000). Então, a diferença no comprimento de onda da luz espalhada e incidente correspondente às vibrações moleculares específicas, chamadas de Raman shift, que levam às bandas espectrais que promovem informação direta sobre a composição bioquímica do espécime. Os picos Raman são espectralmente estreitos, e em muitos casos podem ser associados com a vibração de uma ligação química particular (ou um grupo funcional singular) em uma molécula (PINHEIRO et al., 2012). Desta forma, o espectro Raman é como uma

impressão digital da molécula, fornecendo informação bioquímica específica, não encontrada em outras técnicas ópticas (HANLON et al., 2000).

O espectro Raman do osso apresenta bandas vibracionais proeminentes relacionadas com a composição do tecido (MORRIS, MANDAR, 2011; PINHEIRO et al., 2012). A banda Raman em  $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$ , por exemplo, está relacionada com a HA fosfatada e a banda em  $\sim 1454 \text{ cm}^{-1}$  com o componente colágeno da matriz óssea (MORRIS, MANDAR, 2011; PINHEIRO et al., 2012). Desta forma, maior intensidade da banda fosfato em  $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$  indica um aumento do grau de mineralização do tecido, enquanto que maior intensidade de bandas em  $\sim 1454 \text{ cm}^{-1}$  indica menor nível de mineralização (MORRIS, MANDAR, 2011). A espectroscopia Raman tem sido usada recentemente em diversos estudos relacionados com formação óssea (LOPES et al., 2005; LOPES et al., 2007; MORRIS, MANDAR, 2011; PASHALIS, 2011; PINHEIRO et al., 2012).

A potencialidade da técnica Raman está fortemente relacionada à correta análise e interpretação da informação espectral. A posição, a largura e a intensidade relativa das bandas Raman podem ser utilizadas em um modelo de diagnóstico, classificando as alterações em diferentes categorias histopatológicas de acordo com as diferenças espectrais observadas. Porém, para a melhor exploração das informações presentes no espectro, a análise deve levar em conta todo o espectro, e não apenas bandas proeminentes. Diferenças relativas muito pequenas entre bandas e sobreposições podem passar despercebidas, porém com uma análise criteriosa de todo o espectro pode-se obter resultados interessantes (RIBEIRO, SATHAIAH, PACHECO, 2001).

A alta sensibilidade da técnica Raman para detectar minerais permite a utilização da mesma em análises quantitativas. As intensidades dos picos Raman



são correlacionadas com concentrações de forma a permitir que análises quantitativas dos minerais incorporados sejam descritas. Os critérios de diagnóstico por espectroscopia Raman são baseados na variação de concentração de substâncias minerais e substâncias orgânicas (RIBEIRO, SATHIAH, PACHECO, 2001).

## **2.6 - Histologia**

A regeneração óssea na região da sutura palatina mediana após disjunção maxilar tem sido analisada histologicamente desde o estudo clássico preliminar de Haas em 1961 (SIMÕES, 2008).

Na análise histológica é possível visualizar através da coloração das lâminas com corantes como hematoxilina-eosina e Picrosírius para colágeno, dentre outros corantes, o grau de inflamação encontrado na região, a presença de células envolvidas na remodelação e neoformação óssea como fibroblastos, osteoblastos e osteoclastos, assim como a deposição de componentes estruturais como o colágeno (SIMÕES, 2008; STUANI 2008).

As avaliações histológicas têm mostrado, na literatura, bons resultados da aplicação do laser no processo de reparo de feridas em áreas alveolares de extrações dentárias, sugerindo proliferação celular de osteoblastos, osteogênese e aceleração na regeneração óssea (SAITO, SHIMIZU, 1997; SIMÕES, 2008). Atualmente existem várias pesquisas com laser, mas ainda são poucas aquelas voltadas para sutura palatina mediana (SIMÕES, 2008).

## 2.7 - Radiografia digital direta

Para avaliar, comprovar e documentar a expansão e monitorar a regeneração óssea da região da sutura palatina mediana, o instrumento ideal de diagnóstico na clínica odontológica é a radiografia oclusal total da maxila (CAPELOZZA, SILVA, 2002; ANGELETTI et al., 2010). Na radiografia oclusal inicial a sutura se mostra, nos indivíduos jovens, como uma linha radiolúcida estreita margeando as superfícies ósseas, tornando-se mais sinuosa à medida que os indivíduos amadurecem (MELO, 2003). Após a expansão, a sutura se assemelha a uma área triangular, radiolúcida, com base maior voltada para a espinha nasal anterior (WERTZ, 1974; CAPELOZZA, SILVA, 2002). É importante que a radiografia seja executada para registro no momento após a expansão, uma vez que modificações histológicas começarão a surgir (MELO, 2003). Na fase de contenção, a radiografia oclusal registra, mediante tomadas subsequentes, a reorganização sutural com neoformação óssea, mineralização do tecido e aumento de radiopacidade na região (CAPELOZZA, SILVA, 2002; MELO, 2003), e ajuda a evitar a remoção do aparelho disjuntor antes do término do processo de ossificação (MARTINS et al., 2009).

A alta resolução e a exatidão proporcionadas pelas radiografias digitais com eliminação de distorção têm incentivado o uso desse recurso para avaliação da expansão da sutura palatina, pois se consegue quantificar alterações através da densidade óptica pela diferença de *pixels* (menor unidade de informação da imagem) (ANGELETTI et al., 2010).

A mensuração da densidade óssea, com medidas mais precisas dos índices de escala de tons de cinza do que as fornecidas pelo olho humano, é possível com as radiografias digitais (MELO, 2003). Programas específicos que fornecem

avaliação óptica da densidade para acompanhar o processo de regeneração óssea são baseados numa sequência de radiografias digitalizadas, nas quais diferenças sutis na densidade podem ser determinadas através de um histograma. A densidade óptica é dada por uma escala de cinza em *pixels* que varia do 0, representando o preto absoluto, a 255, representando o branco absoluto. Essa análise mede o valor médio do tom de cinza dos *pixels* de determinada região, onde valores próximos a 255 demonstram que houve remineralização e valores próximos ao 0 indicam perda de mineral (OLIVEIRA, 2010). Considerando que o olho humano só é capaz de detectar 25 tons de cinza, o método digital poderia detectar mudanças com maior eficácia que o método visual (CARVALHO et al., 2009).

Para auxiliar na avaliação da densidade, uma escala de alumínio é recomendada para calibrar a radiopacidade da radiografia (CEPERA et al., 2012). É feita a conversão das médias de *pixels* encontradas em valores equivalentes a milímetros de alumínio (mmAl). Como o alumínio possui uma curva de absorção da radiação X muito semelhante à do osso (LOUZADA, 1994), é possível calcular, a partir dos valores médios de *pixels* de cada degrau da escala, a densidade óssea em valores equivalentes a mmAl (TRÉ et al., 2006; OLIVEIRA, 2010). O alumínio possui uma densidade conhecida, isso garante uma reprodutibilidade das medições, assim como padroniza os valores em uma unidade única, que pode ser utilizada como parâmetro em outras pesquisas (OLIVEIRA, 2010). Alterações sutis de densidade radiográfica podem então ser detectadas com a escala em mmAl, enquanto que usando a média dos valores de *pixels* se os tons de cinza do pixel não se comportarem de maneira linear as alterações podem ser imprevisíveis (TRÉ et al., 2006; OLIVEIRA, 2010). Desta forma a escala funciona como uma referência interna que possibilita corrigir variações ocorridas durante o processamento de

imagem ou condições de exposição (SOUTHARD et al., 1999; OLIVEIRA, 2010). A comparação do método radiográfico convencional com o digital utilizando a ferramenta de análise de imagem através de avaliação por valores equivalentes em mmAl, mostrou que o método digital é superior para detectar diferenças sutis de densidade óssea (OLIVEIRA, 2010).

Os métodos quantitativos levam em consideração avaliações objetivas realizadas por softwares de computadores, e, por isso, critérios pessoais de avaliação são minimizados (OLIVEIRA, 2010).

A detecção de diferentes densidades, entre imagens sequenciadas, representa as alterações do conteúdo mineral ósseo. Sendo a imaturidade de osso formado na sutura palatina um dos fatores favoráveis à recidiva, a análise do grau de maturidade do osso reparado contribuirá no controle pós-tratamento (MELO, 2003).

A análise da média dos valores dos pixels tem sido usada por estudos que envolvem desde defeitos ósseos, fraturas, avaliação de cárie e de dentes tratados endodonticamente com lesões periapicais crônicas (BOZZO et al., 2004; BELTRAME et al., 2005; CARVALHO et al., 2009; CARNEIRO et al., 2009; BENFICA et al., 2010; OLIVEIRA, 2010) até análise da sutura palatina mediana durante o tratamento ortodôntico (ANGELLETTI et al., 2010; CEPERA et al., 2012; GURGEL, MALMSTROM, PINZAN-VERCELINO, 2012).

Considerando a escassez de informações na literatura a respeito do efeito do laser e do LED na disjunção da sutura palatina mediana, este trabalho busca avaliar essa interação, usando para tal, como meios de análise, a espectroscopia pelo sistema Raman próximo ao infravermelho, a avaliação histológica e a avaliação de densidade óssea através de radiografia digital direta.

---

### **3. PROPOSIÇÃO**

---

#### **3.1 - Objetivo Geral**

Avaliar através de espectroscopia Raman, histologia e radiografias, o efeito da fotobiomodulação laser e LED na formação óssea após disjunção da sutura palatina mediana em ratos.

#### **3.2 - Objetivos Específicos**

- Avaliar o efeito da fotobiomodulação laser e LED na densidade óssea da região de sutura palatina mediana após disjunção.
- Avaliar o efeito da fotobiomodulação laser e LED nos níveis de concentração de hidroxiapatita fosfatada (HA;  $\sim 960\text{ cm}^{-1}$ ) e de componentes orgânicos (proteínas) ( $\sim 1454\text{ cm}^{-1}$ ) na região da sutura palatina mediana após disjunção através da espectroscopia Raman no infravermelho próximo.
- Avaliar o efeito da fotobiomodulação laser e LED na formação óssea após disjunção da sutura palatina mediana quanto a características histológicas como a presença de processo inflamatório, fibras colágenas, atividade osteoblástica e atividade osteoclástica.

---

## 4. MATERIAL E MÉTODO

---

### 4.1 - Respaldo ético da pesquisa

O protocolo de pesquisa foi submetido à apreciação e aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia da UFBA (**Anexo A**) sob o protocolo de número 03.2010.

Este experimento seguiu as normas de conduta obedecendo às recomendações éticas e legais especificadas para experimentação animal de acordo com a LEI Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008.

### 4.2 - Delineamento

Este foi um estudo do tipo longitudinal, analítico e comparativo.

### 4.3 - Amostra

Foi usado um total de 45 ratos machos da espécie *Rattus norvegicus*, classe *Mammalia*, ordem *Roedentia*, da linhagem *Wistar* com seis semanas de idade e peso variando entre  $170 \pm 20$ g, obtidos no Centro de Criação de animais da Faculdade de Medicina Veterinária da UFBA. Estes foram mantidos no Laboratório de Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia da UFBA (FOUFBA, Salvador, BA, Brasil) em gaiolas contendo cinco animais cada, com temperatura ambiente entre 22 e 26°C e iluminação ambiente. As gaiolas foram forradas com maravalha autoclavada substituída a cada dois dias para que garantisse condições favoráveis de higiene e bem-estar dos animais. A alimentação foi constituída de uma

ração padrão de laboratório (Labina<sup>®</sup>, Purina, Paulínia, SP, Brasil) e foi fornecida água *ad libitum*. Após o procedimento de disjunção da sutura palatina mediana, a ração fornecida era triturada, a fim de facilitar a alimentação e evitar eventuais danos à aparelhagem ortodôntica durante a mastigação.

Na fase experimental cada animal recebeu uma marcação individual para diferenciá-los dentro de seu próprio grupo. Os animais foram identificados, em sua cauda, com lápis hidrocor (Pilot Color 850, São Paulo, SP, Brasil) fazendo-se a quantidade de círculos correspondentes ao seu número no experimento (HABIB, 2008). Cada gaiola possuía um cartão de identificação especificando o grupo ao qual pertenciam os animais, a data de instalação do dispositivo disjuntor e o período experimental. Não houve perda de animais da amostra durante o presente estudo.

#### **4.4 - Procedimentos de disjunção**

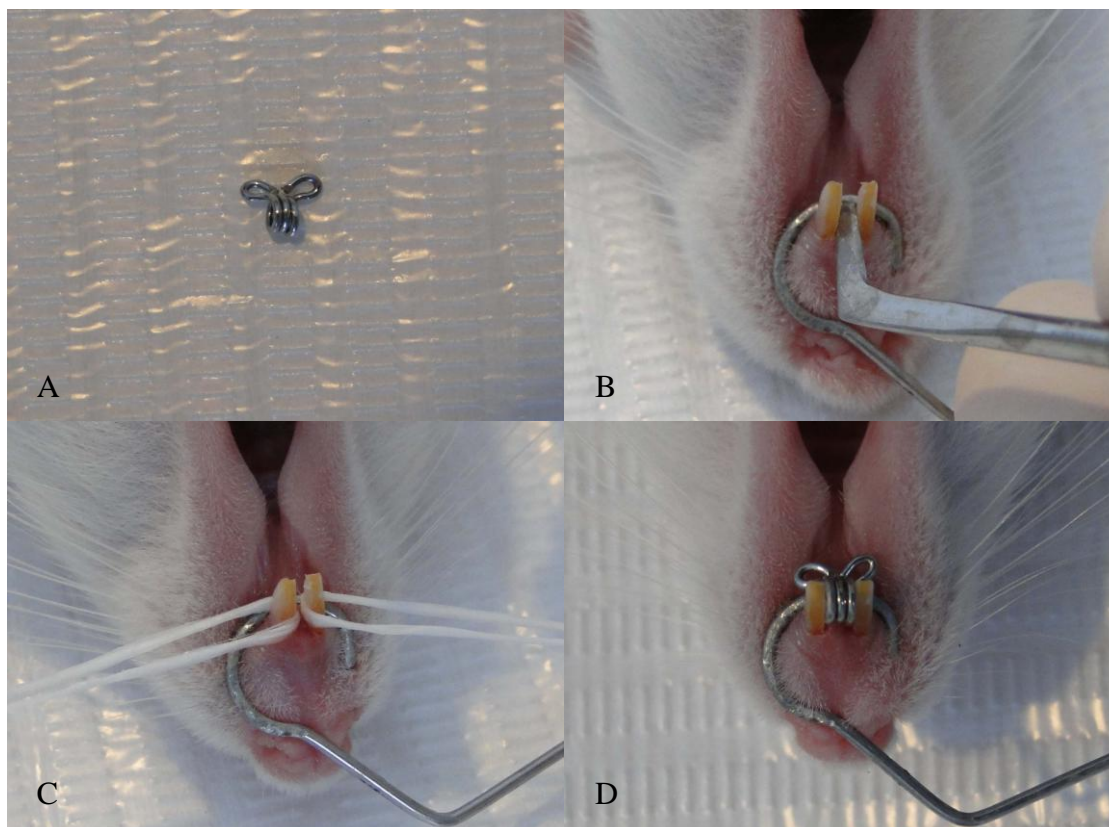
Antes dos procedimentos de montagem do aparelho disjuntor, os animais foram anestesiados com uma associação de 0,12ml/100g de cloridrato de cetamina (Vetaset<sup>®</sup>, São Paulo, SP, Brasil) e 0,06ml/100g de xilazina (Coopazine<sup>®</sup> – Coopers, São Paulo, SP, Brasil) por via intramuscular (HABIB, 2008).

Dispositivos disjuntores foram confeccionados com fio ortodôntico de aço inoxidável de secção circular e diâmetro de 0,020” (Morelli<sup>®</sup>, Sorocaba, SP, Brasil) com auxílio de alicate do tipo “Bird-beak plier” n<sup>o</sup> 139 (3M Unitek<sup>®</sup>, Monrovia, CA, USA). Os dispositivos consistiram de um helicóide triplo com ganchos laterais. O helicóide triplo ocupava um espaço de 1,5mm em largura mesio-distal entre os incisivos superiores do rato (SILVA 2009; MA et al., 2008; STUANI, 2008; SAITO E SHIMIZU, 1997). Os ganchos tinham a finalidade de facilitar a adaptação do

disjuntor e serviram de apoio para colagem do mesmo aos incisivos com resina composta. Todos os dispositivos foram manufaturados com o mesmo tamanho para padronização, sendo o helicóide triplo medido com paquímetro digital. A espessura de 1,5mm do disjuntor teve como base estudos anteriores que definiram esta quantidade de separação dos incisivos superiores como a que induz a taxa máxima de disjunção da sutura palatina mediana sem diminuição contínua do peso corporal dos animais (SAWADA E SHIMIZU, 1996; SAITO E SHIMIZU, 1997; SILVA, 2009; SILVA, 2012).

O procedimento de disjunção em si foi obtido com a separação dos incisivos superiores através do uso de uma espátula de inserção de resina nº1 (Golgran, São Paulo, SP, Brasil), inserida entre as unidades dentárias na altura da cervical (SIMÕES, 2008). Após a separação, cada incisivo foi envolvido por um fio dental a fim de que fossem mantidos afastados um do outro permitindo a instalação do disjuntor na linha mediana. Este dispositivo não tinha como objetivo aplicar força na área, nem ser ativado, mas apenas manter a disjunção alcançada com os incisivos separados em 1,5mm (**Fig. 01**).

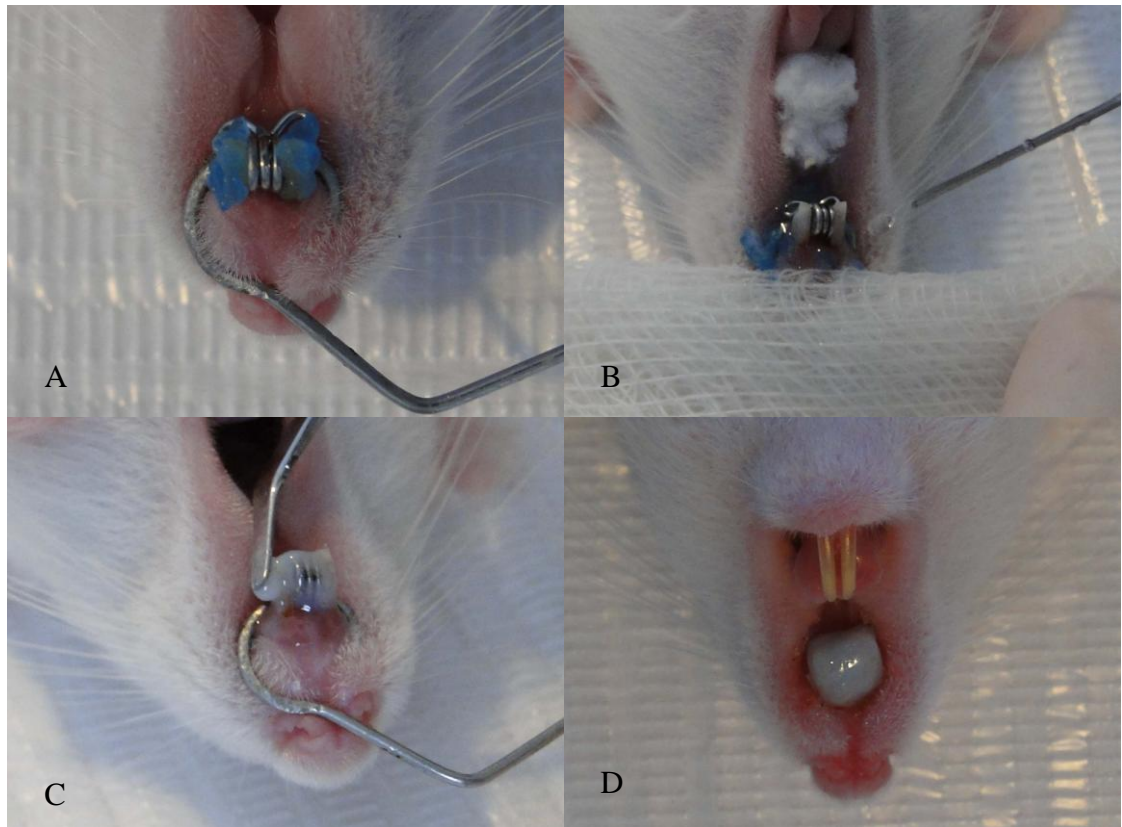




**Figura 01 – A - Dispositivo com helicóide triplo. B - Separação dos incisivos com espátula. C - Incisivos separados com fio dental. D - Dispositivo helicóide entre os incisivos (ROSA, 2014).**

Para a colagem do disjuntor entre os dentes, o esmalte foi condicionado com ácido fosfórico gel a 37% (Alpha Acid<sup>®</sup> – DFL, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) por 30 segundos, seguido de lavagem por 20 segundos com água destilada usando uma seringa de 50 ml e secagem com gaze e jato de ar proveniente de uma pêra odontológica. Os dispositivos disjuntores foram colados com sistema adesivo (Magic Bond<sup>®</sup>, Vigodente, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e resina composta fotopolimerizável microhíbrida (Fill Magic<sup>®</sup>, Vigodente, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; Fill Magic Ortodôntico<sup>®</sup>, Vigodente, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A fotopolimerização do compósito e sistema adesivo foi feita simultaneamente por 40 segundos utilizando um fotopolimerizador de luz fria (ULTRALED XP<sup>®</sup>, Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Para compensar o desgaste decorrente do contínuo hábito roedor dos

animais, várias camadas de resina foram fotopolimerizadas sobre o dispositivo (**Fig. 02**).



**Figura 02 – A - Condicionamento ácido. B - Lavagem com água. C - Inserção da resina. D - Resina fotopolimerizada (ROSA, 2014).**

#### **4.5 - Procedimentos da irradiação a Laser e LED**

Os ratos foram divididos aleatoriamente em nove grupos, com cinco animais cada, com período experimental de sete e 14 dias.

Grupos com sete dias:

G-I: Controle

G-II: Disjunção (DISJ 7d)

G-III: Disjunção e laser (DISJ + L7d)

G-IV: Disjunção e LED (DISJ + LED7d)

Grupos com 14 dias:

G-V: Disjunção (DISJ 14d)

G-VI: Disjunção e laser na primeira semana (DISJ + L14d1)

G-VII: Disjunção e LED na primeira semana (DISJ + LED14d1)

G-VIII: Disjunção e laser na primeira e segunda semanas (DISJ + L14d2)

G-IX: Disjunção e LED na primeira e segunda semanas (DISJ + LED14d2)

A disjunção da sutura palatina foi realizada em todos os grupos exceto o grupo Controle (sem tratamento). A irradiação com laser ou LED foi realizada nos grupos DISJ+L7d; DISJ+LED7d; DISJ+L14d1 e DISJ+LED14d1 no primeiro, terceiro e quinto dia do experimento. Nos grupos DISJ+L14d2 e DISJ+LED14d2 houve aplicação do laser ou LED no primeiro, terceiro, quinto, oitavo, décimo e décimo segundo dia do experimento.

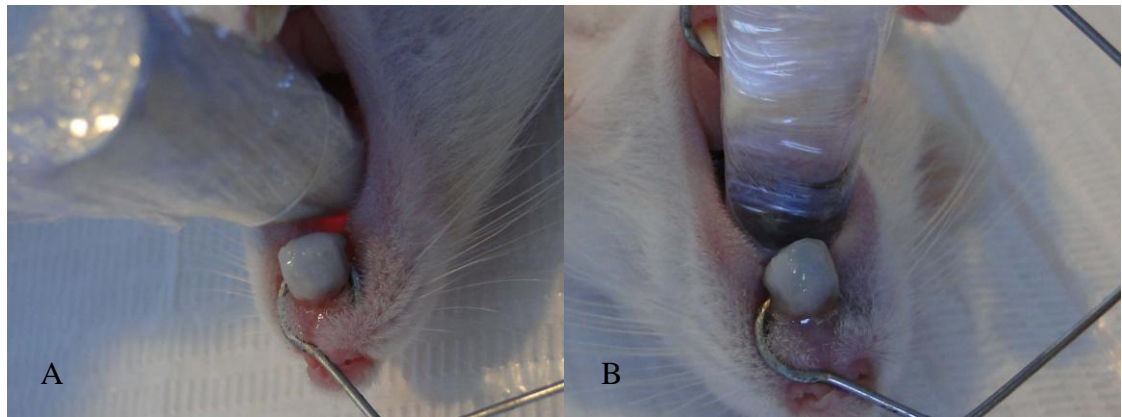
No sétimo dia, os animais dos grupos Controle, DISJ 7d; DISJ+L7d e DISJ+LED7d foram levados à morte. Os animais dos grupos DISJ 14d; DISJ+L14d1; DISJ+LED14d1; DISJ+L14d2 e DISJ+LED14d2 foram levados à morte no 14<sup>o</sup> dia (**Tabela 01**).

**Tabela 01 - Protocolo de disjunção, aplicação do laser e LED (ROSA, 2014).**

<b>Grupos</b>	<b>Dias 1, 3, 5</b>	<b>Dia 7</b>	<b>Dias 8, 10, 12</b>	<b>Dia 14</b>
Controle		Morte		
Disjunção (DISJ 7d)		Morte		
Disjunção e laser (DISJ+L7d)	laser	Morte		
Disjunção e LED (DISJ+LED7d)	LED	Morte		
Disjunção (DISJ 14d)				Morte
Disjunção e laser (DISJ+L14d1)	laser			Morte
Disjunção e LED (DISJ+LED14d1)	LED			Morte
Disjunção e laser (DISJ+L14d2)	laser		laser	Morte
Disjunção e LED (DISJ+LED14d2)	LED		LED	Morte

No início de cada sessão de irradiação, os animais foram anestesiados com a mesma substância usada para montagem do disjuntor, sendo aplicado um terço da dose, visto que o procedimento de irradiação demanda menos tempo do que para a instalação do aparelho (HABIB, 2008).

Um abridor de boca confeccionado com fio ortodôntico de aço inoxidável diâmetro 0,09" (Morelli®, Sorocaba, SP, Brasil) foi usado com a finalidade de facilitar o acesso à cavidade oral durante os procedimentos de irradiação (**Fig. 03**).



**Figura 03 – A - Irradiação com laser. B - Irradiação com LED (ROSA, 2014).**

Foi usado um aparelho emissor de laser de Arseneto de Gálio e Alumínio (AsGaAl) (Twin Flex Evolution®, MOptics, São Carlos, SP, Brasil) com emissão contínua de radiação infra-vermelha,  $\lambda=780\text{nm}$ ,  $P=70\text{mW}$  e área do spot=  $0,04\text{ cm}^2$  (**Fig 04**).

O LED (FisioLED®, MMOptics, São Carlos, SP, Brasil) usado foi o de Arseneto de Gálio e Alumínio (AsGaAl) com emissão contínua infra-vermelha,  $\lambda=850$  ( $\pm 10\text{nm}$ ),  $P=150\text{mW}$  e área do spot =  $0,5\text{ cm}^2$  (**Fig 05**).



**Figura 04 - Aparelho utilizado no experimento para realização da fototerapia laser (Twinflex Evolution<sup>®</sup>, MMOptics, São Carlos, SP, Brasil) (ROSA, 2014).**



**Figura 05 - Aparelho utilizado no experimento para realização da fototerapia LED (FisioLED<sup>®</sup>, MMOptics, São Carlos, SP, Brasil) (ROSA, 2014).**

Como as fontes de luz, laser e LED, apresentavam valores diferentes com relação à potência e área de saída do feixe (spot), para que uma densidade de energia única de  $18\text{J}/\text{cm}^2$ , a ser fornecida ao tecido, fosse equivalente para ambas as irradiações, optou-se para efeito de comparação das mesmas, usar como referência o SAEF - *Spatial Average Energy Fluence* (SOUZA, 2008; PINHEIRO, BRUGNERA, ZANIN, 2010; ROSA et al., 2011; PIRES-SANTOS et al., 2012) no cálculo da dose a ser administrada. O SAEF é dado pela fórmula  $\text{J}/\text{cm}^2 = P(\text{W}) \times t(\text{s}) \times n/A(\text{cm}^2)$ , sendo que foi usada a área de irradiação de  $1\text{cm}^2$  no cálculo do mesmo

em vez da área de saída do feixe de cada aparelho. O valor de  $1\text{cm}^2$  foi usado considerando o espalhamento da luz e da distribuição gaussiana, o que significa uma distribuição de energia além da área do spot incidente (BAXTER, 1997). Ademais, foi requisitado ao fabricante que os aparelhos de laser e LED usados nesta pesquisa fossem calibrados para que os equipamentos considerassem a área de  $1\text{cm}^2$  no cálculo da dose de energia a ser fornecida, desta forma possibilitando uma comparação mais fiel entre os equipamentos.

A densidade de energia média espacial (SAEF) usada foi de  $18\text{J}/\text{cm}^2$  por sessão. Esta dose foi aplicada em um ponto (SAITO, SHIMIZU, 1997; SASSO, 2008; SIMÕES, 2008) na sutura palatina mediana imediatamente posterior aos incisivos superiores com modo de aplicação por contato, mantendo-se a ponteira perpendicular com a superfície irradiada. Foi utilizado um único ponto de irradiação devido à pequena amplitude de abertura da cavidade oral do animal e ao volume das ponteiros do laser e LED. O tempo de aplicação para o laser foi de 257s e para o LED foi de 120s (**Tabela 02**).

A dose total de tratamento usada nos grupos DISJ+L7d e DISJ+L14d1 que tiveram aplicação do laser em apenas uma das fases do experimento (primeira semana) foi de  $54\text{J}/\text{cm}^2$  ( $18\text{J}/\text{cm}^2/\text{por dia} \times 3$  dias). A dose total de tratamento usada no grupo DISJ+L14d2 que teve aplicação do laser nas duas fases do experimento (primeira e segunda semanas) foi de  $108\text{ J}/\text{cm}^2$  ( $18\text{J}/\text{cm}^2/\text{por dia} \times 6$  dias).

A dose total de tratamento usada nos grupos DISJ+LED7d e DISJ+LED14d1 que tiveram aplicação do LED em apenas uma das fases do experimento (primeira semana) foi de  $54\text{J}/\text{cm}^2$  ( $18\text{J}/\text{cm}^2/\text{por dia} \times 3$  dias). A dose total de tratamento usada no grupo DISJ+LED14d2 que teve aplicação do LED nas duas fases do experimento (primeira e segunda semanas) foi de  $108\text{ J}/\text{cm}^2$  ( $18\text{J}/\text{cm}^2/\text{por dia} \times 6$  dias).

**Tabela 02 - Parâmetros usados para Laser e LED (ROSA, 2014).**

<b>Parâmetros</b>	<b>Laser</b>	<b>LED</b>
Comprimento de onda (nm)	780	850±10
SAEF (J/cm <sup>2</sup> )	18	18
Energia (J)	18	18
Potência (mW)	70	150
Potência (W)	0,07	0,15
Área de irradiação no tecido (cm <sup>2</sup> )	1	1
Modo	CW	CW
Aplicação	Por contato	Por contato
Área saída do feixe – spot (cm <sup>2</sup> )	0,04	0,5
Densidade de Energia (J/cm <sup>2</sup> )	450	36
Densidade de Potência (W/cm <sup>2</sup> )	1,75	0,3
Tempo de exposição por sessão (s)	257	120

#### **4.6 - Avaliação dos grupos experimentais**

##### **4.6.1 - Avaliação da densidade óssea**

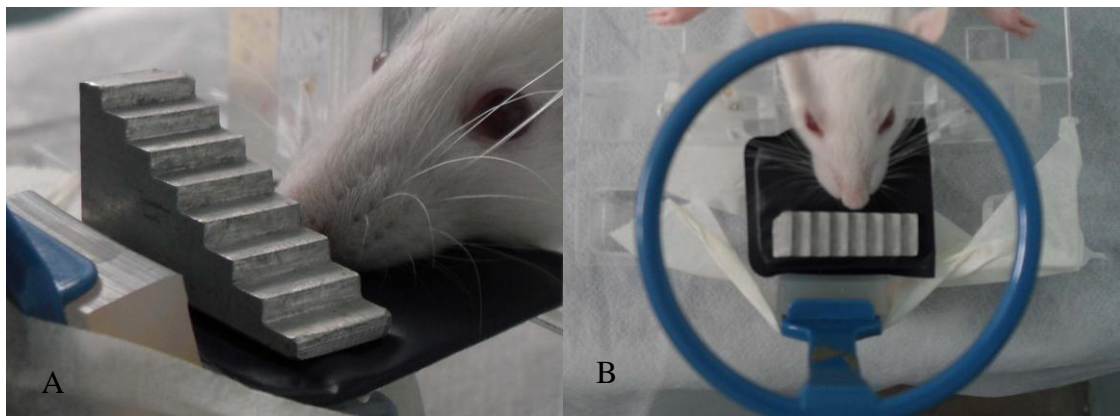
As radiografias foram realizadas no sétimo dia para os grupos Controle, DISJ 7d, DISJ+L7d e DISJ+LED7d e no 14º dia para os demais grupos.

Os animais foram anestesiados com a mesma substância e mesma dosagem usada para montagem do dispositivo disjuntor. Os incisivos superiores e inferiores foram cortados na cervical com disco diamantado (KG Sorensen<sup>®</sup>, Cotia, SP, Brasil) para que não interferissem no posicionamento do filme e na visualização da imagem radiográfica. O disjuntor foi simultaneamente removido ao cortar as unidades.

Para obtenção das imagens foi utilizada uma única placa de armazenamento de fósforo (DenOptix<sup>®</sup>, Gendex, Dental Systems, Milão, Itália), de dimensão 30mm X 40mm e um aparelho radiográfico periapical (Expert DC, Gendex Dental Systems,

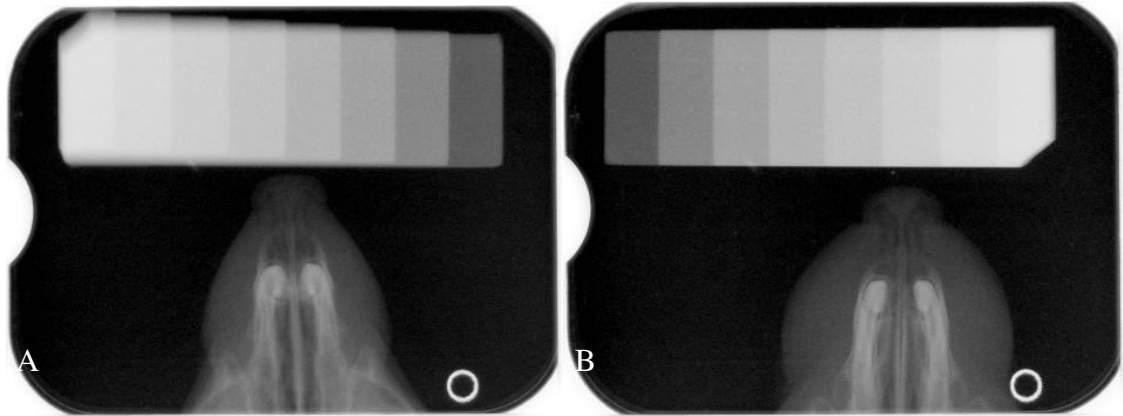


Milão, Itália), operando sob os parâmetros radiográficos: 10mA, 70kV e tempo de exposição de 0,5s (MALMSTRÖM, GURGEL, 2007; STUANI, 2008). As radiografias foram realizadas em incidência ortogonal e o posicionamento da placa foi intra-oral de forma que a maxila ficasse centralizada na mesma. Para padronização foi usado um suporte de acrílico e um posicionador acoplado neste, de modo que a incidência do feixe de Rx fosse ortogonal. No total foram obtidas 45 radiografias pelo método digital (DenOptix® - Dentsply International/Gendex® Dental X-ray Division, Des Plaines, Illinois, USA). Uma escala de alumínio foi posicionada na película em todas as tomadas radiográficas. Esta, além de garantir uma padronização da imagem, possibilitou o cálculo da radiopacidade na região da sutura (**Figs 06 e 07**).



**Figura 06 – A - Vista lateral do posicionamento do filme e escala de alumínio. B - Vista superior com posicionador acoplado (ROSA, 2014).**





**Figura 07 - Radiografias oclusais da maxila: A - Sutura normal (sem tratamento); B - Aspecto 7 dias pós-disjunção. (ROSA, 2014).**

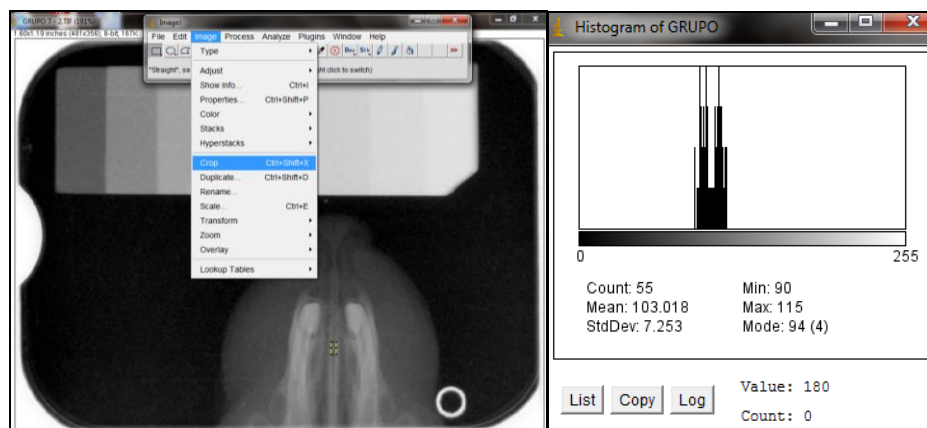
Após a tomada radiográfica, a placa de armazenamento de fósforo foi escaneada no *scanner* do sistema DenOptix®, imediatamente após sua sensibilização pela radiação X. Os arquivos eram exportados do *software* do fabricante e salvos em formato TIFF (Tagged Image File Format). A placa era então colocada em um negatoscópio por dois minutos, para garantir que a imagem fosse completamente apagada.

As imagens radiográficas foram avaliadas por um mesmo operador através do monitor do computador HP Pavilion dv4 (Hewlett-Packard Company®, Palo Alto, CA, USA). Para a avaliação das imagens foi utilizado o programa de domínio público Image J 1.43u (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA) e, então, as ferramentas da média de valores de *pixel* foram aplicadas para cada imagem (OLIVEIRA, 2010).

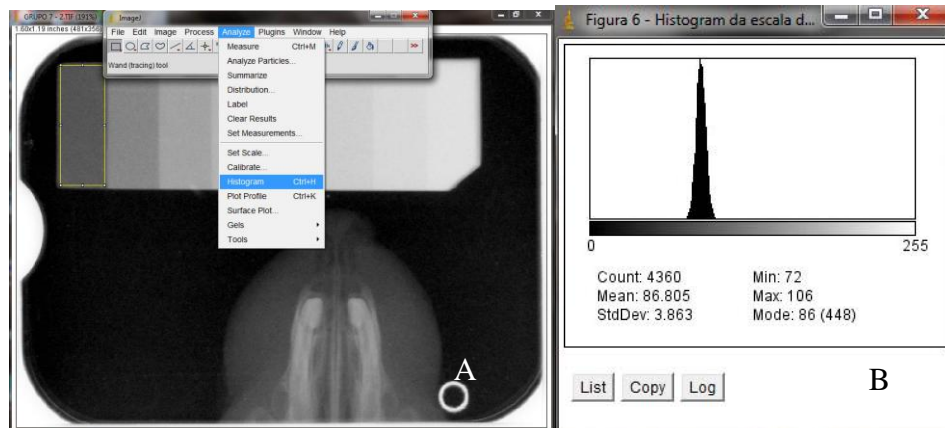
Para calcular o valor médio de pixels relativo à área de interesse da sutura, um retângulo de 0,04 x 0,02 polegadas foi demarcado na sutura palatina mediana a 5 mm da face palatina dos incisivos centrais superiores. A área escolhida para avaliação foi a mesma área de aplicação da luz laser ou LED, sendo também a mesma usada nas outras avaliações desta pesquisa.

Feita a demarcação, selecionou-se a ferramenta histograma, para obter-se o valor médio do *pixel* (**Fig. 08**). Cada imagem foi avaliada três vezes, para garantir uma reprodutibilidade entre as medições. Após cada avaliação, selecionava-se a função recorte (crop), e a área demarcada era salva como a imagem final.

A escala de alumínio foi usada para padronização dos resultados. Os valores médios de cinza em *pixels* obtidos na área da sutura palatina mediana foram convertidos para valores equivalentes em mmAL, usando como base a escala. Para isto, cada degrau da escala era demarcado com um retângulo que ocupasse a maior área de cada degrau. Em seguida, usando a ferramenta histograma obteve-se a média dos valores de *pixels* de cada degrau da escala. Esse procedimento foi repetido em todas as tomadas radiográficas (**Fig. 09**) (OLIVEIRA, 2010).



**Figura 08 – A - Demarcação e recorte da área de escolha na sutura palatina mediana. B - Histograma com valores médios de densidade óssea (ROSA, 2014).**



**Figura 9. Demarcação da escala de alumínio para avaliar a média dos valores de *pixels* através do histograma (ROSA, 2014).**

Os valores obtidos foram transferidos para o Microsoft Office Excel® 2007, onde foi possível gerar curvas de radiopacidade da escala de alumínio e equações matemáticas que permitiram calcular a radiopacidade da área da sutura convertendo os valores de *pixel* em valores de mAl (OLIVEIRA, 2010).

No que se refere à interpretação dos resultados, utilizou-se para essa análise a média de valores em mAl obtida do grupo Controle como referência para efeito de comparação com os demais grupos que receberam tratamento.

Os dados foram tabulados e submetidos à análise estatística ANOVA e, em seguida, teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) usando o programa Minitab® 14 Statistical Software (Minitab Inc., State Collage, Pennsylvania, USA, versão 14).

#### **4.6.2 - Morte dos animais**

A morte dos animais foi ao final de cada período experimental (sete e 14 dias) logo após as tomadas radiográficas. Utilizou-se uma câmara de gás de dióxido de Carbono (EB 248, Insight Equipamentos, Ribeirão Preto, SP, Brasil), recomendada para esse fim pela legislação vigente. A câmara é dimensionada e com ambiente condizente para evitar a inalação do gás por pessoas. Este gás tem rápida ação

letal, provocando depressão do sistema nervoso central. Após detecção da parada respiratória, os animais ficaram mantidos por 10 minutos na câmara para confirmação da morte. A ausência de movimentos respiratórios, batimentos cardíacos e perda de reflexos são os indicativos de morte.

A maxila dos ratos de todos os grupos foi então dissecada removendo-se os componentes musculares e cutâneos com auxílio de um bisturi cirúrgico (STUANI, 2008).

Fez-se um corte na maxila no plano transversal entre o terço inferior e médio da maxila com disco diamantado (KG Sorensen<sup>®</sup>, Cotia, SP, Brasil) montado em peça reta dividindo-a em duas partes. As peças com o terço inferior foram armazenadas em nitrogênio líquido tendo sido usadas posteriormente na espectroscopia Raman. As peças que englobavam a parte média e a parte superior da maxila foram armazenadas em frascos previamente preparados e etiquetados contendo formaldeído 10%, e em seguida encaminhados ao Laboratório de Patologia Oral do Departamento de Propedêutica e Clínica Integrada da FOUBA, onde foram processados.

#### **4.6.3 - Espectroscopia Raman e Avaliação Histológica**

##### **4.6.3.1 – Exame espectroscópico**

As peças com o terço inferior da maxila foram colocadas em microtubos Safe-Lock (Eppendorf<sup>®</sup>, São Paulo, SP, Brasil) e armazenadas em nitrogênio líquido (-196<sup>o</sup>C) para análise da espectroscopia Raman no infravermelho próximo. O nitrogênio líquido age minimizando o crescimento bacteriano aeróbico já que substâncias fixadoras não são recomendadas devido à emissão de fluorescência

(TIMLIN et al., 1999; PINHEIRO et al., 2011). No momento da avaliação, os espécimes foram retirados do nitrogênio líquido e colocados dentro de um isopor com gelo. Posteriormente, para leitura, as peças foram mergulhadas em solução salina antes das medições da espectroscopia (LOPES et al., 2007).

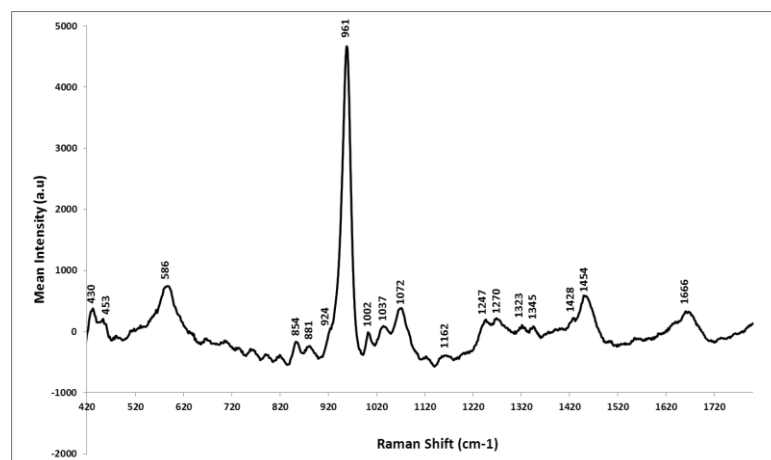
O experimento foi realizado com o sistema de espectroscopia Raman Dispersivo no Laboratório de Espectroscopia Raman do Centro de Biofotônica da FOUFBA.

Foi utilizado um espectrofotômetro Raman dispersivo (Andor Shamrock SR-303i<sup>®</sup>, ANDOR Technology, Belfast, Northern Ireland). O Equipamento utiliza um laser de diodo estabilizado, sintonizado em  $\lambda=785\text{nm}$  (infravermelho próximo) (B&WTEK, Newark, NJ, USA), obtendo-se na saída da fibra óptica uma potência total de 500mW. A excitação da amostra e a coleta dos espectros Raman foram realizadas por um sistema de cabos de fibra-óptica chamados de “Raman Probe” (modelo BRM-785.0.30-100-0.22.s B&WTEK<sup>®</sup>, Newark, NJ, USA). O “Raman Probe” tem uma fibra de excitação de 1005 $\mu\text{m}$  e uma fibra de coleta do sinal Raman de 200 $\mu\text{m}$ . A fibra de coleta é acoplada a um espectrômetro dispersivo SR-303i, composto de um espectrógrafo de imagem e uma câmera (CCD  $\text{iDUS}^{\text{®}}$ , Andor Technology, , Belfast, Northern Ireland) “*back thinned, deep depletion*” 1024x128 pixels, refrigerada por *cooler* termoelétrico (Peltier-cooled,  $-70^{\circ}\text{C}$ ), atingindo uma temperatura de trabalho de  $-70^{\circ}\text{C}$  em cerca de 5 minutos após o início da operação do espectrômetro, e que dispersam e detectam a luz Raman espalhada.

O software SOLIS<sup>®</sup> (Andor Technology, Solis (i) software, Belfast, Northern Ireland), instalado em um computador com Windows<sup>®</sup> (Microsoft, Redmond, WA, USA), controla a câmera CCD e o espectrógrafo atuando nas funções de tempo de leitura, número de acumulações, calibração espectral e deslocamento Raman, e

promove o armazenamento e o pré-processamento dos espectros para posterior análise e interpretação (TIMLIN et al, 1999; CARVALHO et al, 2001; LOPES et al, 2010, PINHEIRO et al, 2010a, PINHEIRO et al, 2010b; PINHEIRO et al, 2013). A potência do laser medida na ponta de excitação do “Raman probe” foi de 300mW e o tempo de aquisição espectral para cada ponto de recolhimento foi de 20s.

A calibração da resposta espectral corrige a dependência da intensidade óptica de coleta do espectrômetro Raman (lentes/espectrógrafo/CCD) com relação ao comprimento de onda da radiação. Para tanto, foi usada uma lâmpada de tungstênio padrão de irradiância espectral de 50W (Oriel Instruments, Stratford, CT, USA, modelo 63358), rastreada pelo NIST (Nacional Institute of Standards and Technology), para obtenção da curva de correção da resposta espectral RE ( $\lambda$ ) do sistema, em função do comprimento de onda (TIMLIN et al, 1999; CARVALHO et al, 2001; LOPES et al, 2010; PINHEIRO et al, 2010a; PINHEIRO et al, 2010b; PINHEIRO et al, 2013). A calibração dos dados espectrais foi realizada usando uma rotina desenvolvida no Programa Matlab 5.1 (The Mathworks, Natick, MA, USA, versão 4.2) (**Fig. 10**).



**Figura 10 - Espectro Raman de osso basal sem tratamento com marcação dos picos (ROSA, 2014).**

Correção da intensidade e calibração do número da onda.

<sup>2</sup> Oriel Instruments, modelo 63358, Stratford, CT, EUA

Para maior confiabilidade dos resultados, foram realizadas em cada uma das 45 amostras, cinco leituras em um mesmo ponto na região de sutura imediatamente posterior aos incisivos superiores e cinco leituras num ponto no osso basal da maxila direita na mesma direção em relação ao ponto da sutura, resultando num total de 450 espectros. Cinco leituras de cada amostra foram realizadas a fim de se calcular a média e o desvio padrão. A escolha da região para obtenção dos espectros da sutura foi a mesma eleita para irradiação com laser ou LED, avaliação histológica e avaliação radiográfica. Todos os espectros foram obtidos no mesmo dia e com mesmas condições ambientais para evitar desalinhamentos ópticos e alterações na potência do laser.

As bandas Raman selecionadas para esta avaliação foram em  $\sim 960\text{ cm}^{-1}$ , relacionada com a HA fosfatada, e  $\sim 1454\text{ cm}^{-1}$  atribuída ao componente de colágeno (proteínas) da matriz óssea (TIMLIN, CARDEN, MORRIS, 1999; MORRIS, MANDAIR, 2011).

O processamento dos espectros Raman envolveu inicialmente a remoção da emissão de fluorescência de fundo (componente espectral de baixa frequência) e a filtragem do ruído eletrônico e de fóton (componente de alta frequência). Os programas usados para manejo dos espectros foram o Matlab<sup>®</sup> (The Mathworks, Natick, MA, USA, versão 4.2) e o Excel<sup>®</sup> (Microsoft, Redmond, WA, USA), ambos lendo arquivos do tipo ASCII formatados com separação de colunas por tabulação. A emissão fluorescente foi removida por um filtro passa-altas com ajuda do software Matlab<sup>®</sup>, já que não tinha importância em termos de características espectrais para o Raman (ROCHA et al., 2007a,b; SILVEIRA JR et al., 2002).

Os dados então obtidos foram submetidos à análise estatística ANOVA e teste *t* de Student ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4.6.3.2 - Avaliação histológica

As peças com parte média e superior da maxila foram fixadas em formaldeído a 10% por 3 dias e encaminhadas para processamento no Laboratório de Patologia Oral do Departamento de Propedêutica e Clínica Integrada da FOUBA. As peças foram descalcificadas em ácido fórmico a 5% por 24 a 48 horas. Em seguida, foram submetidas a processamento pela técnica histológica de rotina e incluídas na parafina. Os cortes de 4 $\mu$ m foram transversais seriados e as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) e Picrosírius para colágeno.

Os espécimes processados foram avaliados em microscopia de luz no Laboratório de Patologia Oral do Departamento de Propedêutica e Clínica Integrada da FOUBA. A análise histológica foi realizada por método semi-quantitativo utilizando os critérios descritos na **Tabela 03** (SOARES, 2006).

Foram analisados os cortes histológicos da sutura palatina mediana de todos os animais da amostra. A sutura palatina mediana aparecia em cada lâmina em toda a sua extensão, desde a região dos incisivos superiores até a região posterior aos molares. No entanto, como o dispositivo usado para a expansão abriu a sutura até a região média da maxila e a área de aplicação do laser também correspondeu a este local, a análise das lâminas se restringiu à área logo atrás da face palatina dos incisivos até a região média da sutura.



**Tabela 03 - Critérios utilizados para análise semi-quantitativa de microscopia de luz (ROSA, 2014).**

<b>Critérios</b>	<b>Ausente</b>	<b>Discreta</b>	<b>Moderada</b>	<b>Intensa</b>
Processo Inflamatório	-	Presença < 25% de mononucleares	25% - 50% de mononucleares	Presença > 50% de mononucleares
Fibras colágenas	-	Presença < 25% de colágeno	25% - 50% de colágeno	Presença > 50% de colágeno
Atividade osteoblástica	-	Presença < 25% de atividade osteoblástica	25% - 50% de atividade osteoblástica	Presença > 50% de atividade osteoblástica
Atividade osteoclástica	-	Presença < 25% de atividade osteoclástica	25% - 50% de atividade osteoclástica	Presença > 50% de atividade osteoclástica

Os dados foram tabulados e submetidos à análise estatística através do teste exato de Fischer ( $p \leq 0,05$ ) usando o programa Minitab<sup>®</sup> 14 Statistical Software (Minitab Inc., State Collage, Pennsylvania, USA, versão 14).

---

## 5. Resultados

---

### 5.1 - Radiografia digital direta

Foram analisadas 45 radiografias digitais dos 9 grupos avaliados nesta pesquisa (**Fig. 11**).

Os valores médios de pixels encontrados para cada grupo foram convertidos em valores médios de mmAL. Dentre os grupos de sete dias o maior valor médio encontrado foi o do grupo Controle ( $1,419 \pm 0,109$ ) e o menor valor foi o do grupo DISJ7d ( $0,855 \pm 0,187$ ). Nos grupos de 14 dias, o maior valor médio foi observado no grupo DISJ+LED14d1 ( $1,447 \pm 0,123$ ) e o menor no grupo DISJ+L14d2 ( $1,206 \pm 0,214$ ). Um resumo dos valores médios de pixels e seus desvios padrão se encontra na **Tabela 04**.

Foi encontrada diferença estatística significativa entre os grupos (ANOVA,  $p < 0,001$ ). Os grupos DISJ 7d e DISJ+L7d apresentaram, pelo pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), diferença estatística significativa em relação a todos os outros grupos, tendo as menores médias ( $0,855 \pm 0,187$  e  $0,976 \pm 0,044$ , respectivamente). Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os demais grupos.

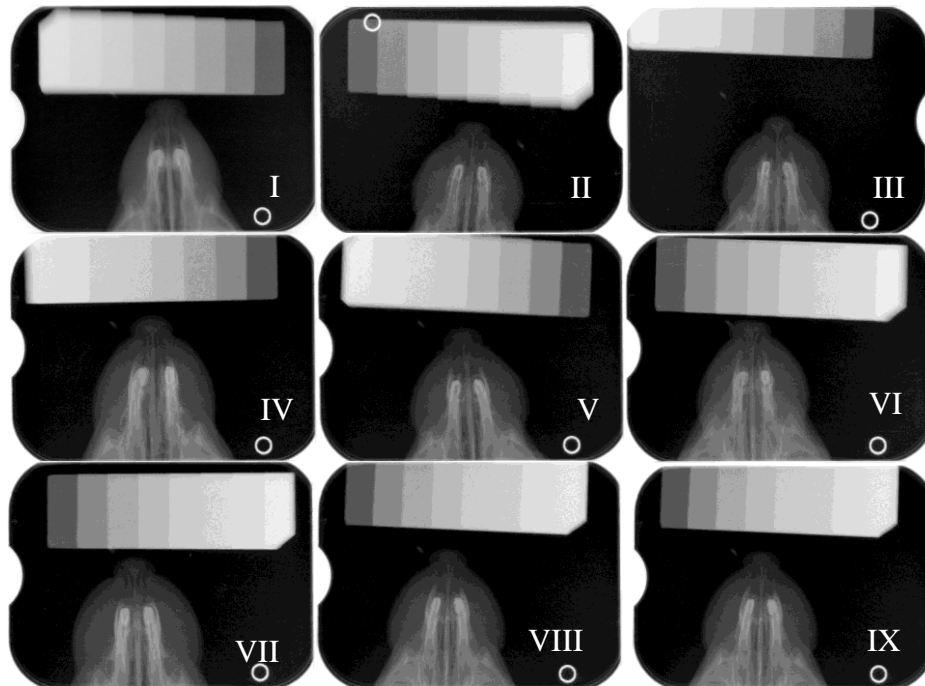


Figura 11 - Radiografias de cada grupo. I - Controle. II - DISJ 7d. III - DISJ + L7d. IV - DISJ + LED 7d. V - DISJ 14d. VI - DISJ + L14d1. VII - DISJ+LED 14d1. VIII - DISJ+L14d2. IX - DISJ + LED 14d2 (ROSA, 2014).

Tabela 04 - Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) em mmAL da área na sutura palatina mediana (n=5). (ROSA, 2014).

Grupos	Letra do grupo	Média $\pm$ DP
Controle	A	1,419 $\pm$ 0,109 <sup>b,c</sup>
DISJ 7d	B	0,855 $\pm$ 0,187 <sup>a,d,e,f,g,h,i</sup>
DISJ + L7d	C	0,976 $\pm$ 0,044 <sup>a,d,e,f,g,h,i</sup>
DISJ + LED 7d	D	1,274 $\pm$ 0,030 <sup>b,c</sup>
DISJ 14d	E	1,248 $\pm$ 0,084 <sup>b,c</sup>
DISJ + L14d1	F	1,401 $\pm$ 0,193 <sup>b,c</sup>
DISJ + LED 14d1	G	1,447 $\pm$ 0,123 <sup>b,c</sup>
DISJ + L14d2	H	1,206 $\pm$ 0,214 <sup>b,c</sup>
DISJ + LED 14d2	I	1,265 $\pm$ 0,197 <sup>b,c</sup>

As letras sobrescritas indicam que os valores são significativamente diferentes dos valores do grupo com a mesma letra (ANOVA,  $p \leq 0,05$ ).

## 5.2 - Espectroscopia Raman

### 5.2.1 - Sutura – Colágeno

A intensidade do Raman *Shift* em  $\sim 1454 \text{ cm}^{-1}$  (proteínas) representa a presença de colágeno. A medição das intensidades relacionadas aos grupos de sete dias mostrou uma maior média para o grupo DISJ+LED7d ( $8,410 \pm 1,777$ ) e uma menor para o grupo Controle ( $3,310 \pm 727$ ). Com 14 dias, a maior intensidade média foi observada para o grupo DISJ 14d ( $7,589 \pm 1,032$ ) e a menor para o grupo DISJ+LED14d1 ( $5,025 \pm 592$ ). Um resumo dos resultados das intensidades médias estudadas e seus desvios padrão podem ser vistos na **Tabela 05**.

No período de sete dias foi encontrada diferença estatística significativa nos picos de colágeno da região da sutura ao comparar os grupos Controle, DISJ 7d, DISJ+L7d e DISJ+LED7d (ANOVA,  $p < 0,001$ ). O grupo Controle comparado com os outros grupos tratados (DISJ 7d, DISJ+L7d e DISJ+LED7d), mostrou diferença estatística significativa em todos os casos (Teste *t* de Student,  $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$ ), e a menor média de pico entre os grupos ( $3,310 \pm 727$ ). Ao se analisar apenas os grupos DISJ 7d, DISJ+L7d e DISJ+LED7d nenhuma diferença foi encontrada pelo ANOVA ( $p = 0,383$ ), nem no teste *t* pareado de Student, apesar de o grupo DISJ+LED7d ter tido a maior média de pico ( $7,291 \pm 2,686$ ).

No período de 14 dias houve diferença estatística significativa entre o grupo Controle e os grupos tratados (ANOVA,  $p < 0,001$ ). No teste *t* de Student pareando o grupo Controle com cada grupo tratado (DISJ 14d, DISJ+L14d1, DISJ+LED14d1, DISJ+L14d2, DISJ+LED14d2), os valores de *p* encontrados foram respectivamente,  $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$ ,  $p = 0,004$  e  $p < 0,001$ , sendo que o grupo Controle

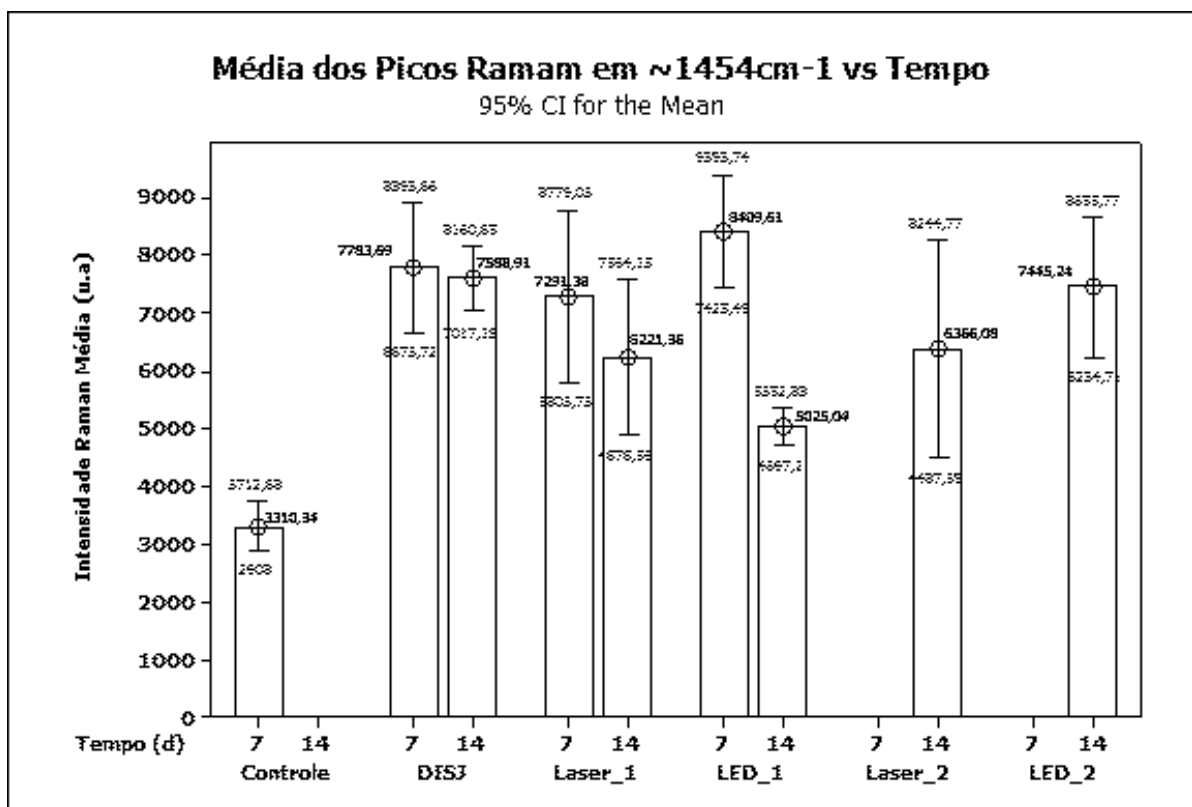
apresentou menor média de pico de colágeno ( $3,310 \pm 727$ ). Ao se comparar apenas os grupos tratados DISJ 14d, DISJ +L14d1, DISJ+LED14d1, DISJ+L14d2 e DISJ+LED14d2 diferença estatística foi encontrada (ANOVA,  $p=0,012$ ). No teste *t* de Student encontrou-se diferença estatística significativa entre o grupo DISJ 14d e o grupo DISJ+LED14d1 com  $p<0,001$  e menor média para o grupo DISJ+LED14d1 ( $5,025 \pm 592$ ). Houve também diferença entre o grupo DISJ+LED14d1 e o grupo DISJ+LED14d2, com  $p=0,003$  e menor média para o grupo DISJ+LED14d1.

Pareando os grupos tratados de sete dias com os de 14 dias, foi encontrada diferença estatística significativa somente entre o grupo DISJ+LED7d e o grupo DISJ+LED14d1 com  $p<0,001$  e menor média para o grupo DISJ+LED14d1 ( $5,025 \pm 592$ ) (**Tabela 05 e Fig. 12**).

**Tabela 05 - Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) dos picos do Raman para colágeno ( $\sim 1454 \text{ cm}^{-1}$ ) na sutura palatina mediana (n=5) (ROSA, 2014).**

Grupos	Letra do grupo	Média $\pm$ DP
Controle	A	3,310 $\pm$ 727 <sup>b,c,d,e,f,g,h,i</sup>
DISJ 7d	B	7,784 $\pm$ 2,004 <sup>a</sup>
DISJ + L7d	C	7,291 $\pm$ 2,686 <sup>a</sup>
DISJ + LED 7d	D	8,410 $\pm$ 1,777 <sup>a,g</sup>
DISJ 14d	E	7,589 $\pm$ 1,032 <sup>a,g</sup>
DISJ + L14d1	F	6,221 $\pm$ 2,425 <sup>a</sup>
DISJ + LED 14d1	G	5,025 $\pm$ 592 <sup>a,d,e,i</sup>
DISJ + L14d2	H	6,366 $\pm$ 3,392 <sup>a</sup>
DISJ + LED 14d2	I	7,445 $\pm$ 2,186 <sup>a,g</sup>

As letras sobrescritas indicam que os valores são significativamente diferentes dos valores do grupo com a mesma letra (Teste *t* de Student,  $p \leq 0,05$ ).



**Figura 12 – Demonstração gráfica das intensidades médias de todos os grupos para o pico Raman  $\sim 1454 \text{ cm}^{-1}$ , nos períodos observacionais de 7 e 14 dias (ROSA, 2014).**

Laser\_1 representa os grupos de disjunção com irradiação laser realizada na primeira semana do tempo experimental - Laser\_1 (7 dias) é o grupo DISJ+L7d e Laser\_1 (14 dias) é o grupo DISJ+L14d1. Laser\_2 representa o grupo DISJ+L14d2 que teve disjunção e irradiação laser na primeira e segunda semanas.

LED\_1 representa os grupos de disjunção com irradiação LED realizada na primeira semana do tempo experimental - LED\_1 (7 dias) é o grupo DISJ+LED7d e LED\_1 (14 dias) é o grupo DISJ+LED14d1. LED\_2 representa o grupo DISJ+LED14d2 que teve disjunção e irradiação LED na primeira e segunda semanas.

### 5.2.2 - Sutura – Hidroxiapatita

A intensidade do Raman *shift* em  $\sim 960\text{ cm}^{-1}$  (relativo ao fosfato) é diretamente relacionada com a concentração/incorporação de HA (hidroxiapatita) pelo osso. Maiores intensidades (picos) representam maiores concentrações de HA. A medição das intensidades relacionadas aos grupos de sete dias mostrou uma maior média para o grupo DISJ+LED7d ( $46,144\pm 17,704$ ) e uma menor para o grupo Controle ( $16,037\pm 2,613$ ). Com 14 dias, a maior intensidade média foi observada para o grupo DISJ+L14d2 ( $35,910\pm 1,504$ ) e a menor para o grupo DISJ 14 ( $23,433\pm 4,752$ ). Um resumo dos resultados das intensidades médias estudadas e seus desvios padrão podem ser vistos na **Tabela 06**.

No período de sete dias foi encontrada, na sutura palatina mediana, diferença estatística significativa nos picos de HA entre os grupos Controle, DISJ 7d, DISJ+L7d e DISJ+LED7d (ANOVA,  $p < 0,001$ ). Também foi observada diferença estatística significativa ao comparar somente os grupos que receberam tratamento, grupos DISJ 7d, DISJ+L7d e DISJ+LED7d (ANOVA,  $p = 0,019$ ). Ao parear individualmente o grupo Controle com cada um dos grupos tratados (DISJ 7d, DISJ+L7d e DISJ+LED7d), também foi encontrada diferença estatisticamente significativa (Teste *t* de Student,  $p = 0,012$ ,  $p = 0,002$ ,  $p < 0,001$ ). O grupo Controle apresentou a menor média de pico ( $16,037\pm 2,613$ ). A comparação do grupo DISJ 7d com os grupos DISJ+L7d e DISJ+LED 7d, individualmente, também apresentou diferença estatisticamente significativa (Teste *t* de Student,  $p = 0,04$ ,  $p = 0,009$ ), sendo o grupo DISJ 7d o de menor média ( $27,048\pm 15,834$ ). No entanto, não houve diferença na comparação entre os grupos DISJ+L7d e DISJ+LED7d (Teste *t* de Student,  $p = 0,169$ ), apesar de o grupo DISJ+LED 7d apresentar maior média de pico ( $46,144\pm 17,704$ ).

No período de 14 dias, ao comparar o grupo Controle com os grupos DISJ 14d, DISJ+L14d1, DISJ+LED14d1, DISJ+L14d2 e DISJ+LED14d2 diferença estatística significativa foi encontrada (ANOVA,  $p < 0,001$ ). Comparando individualmente o grupo Controle com cada um dos grupos de 14 dias, encontrou-se diferença estatística significativa com todos os grupos (Teste *t* de Student,  $p < 0,001$ ,  $p = 0,001$ ,  $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$ ). Ao retirar o grupo Controle da comparação, também foi encontrada uma diferença estatística significativa entre os grupos DISJ 14d, DISJ+L14d1, DISJ+LED14d1, DISJ+L14d2 e DISJ+LED14d2 (ANOVA,  $p = 0,005$ ). No entanto, ao se comparar de forma pareada cada um dos grupos tratados de 14 dias, as diferenças estatísticas foram encontradas apenas entre os grupos DISJ 14d e DISJ+L14d2, entre os grupos DISJ 14d e DISJ+LED14d2, entre os grupos DISJ+LED14d1 e DISJ+L14d2 e entre os grupos DISJ+L14d2 e DISJ+LED14d2 com os valores *p* do teste *t* de Student de, respectivamente,  $p < 0,001$ ,  $p = 0,010$ ,  $p = 0,009$  e  $p = 0,029$ . O grupo DISJ+L14d2 apresentou maior média de pico de HA ( $35,910 \pm 10,540$ ).

Pareando os grupos tratados de sete dias com os de 14 dias, foi encontrada diferença estatística significativa entre o grupo DISJ+LED7d e o grupo DISJ+LED 14d1 com  $p = 0,001$  e maior média para o grupo DISJ+LED7d ( $46,144 \pm 4,571$ ), assim como entre DISJ+LED7d e DISJ+LED14d2 com  $p < 0,001$  e maior média também para o grupo DISJ+LED7d (**Tabela 06 e Fig. 13**).



Tabela 06 - Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) dos picos do Raman para HA ( $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$ ) na sutura palatina mediana (n=5) (ROSA, 2014).

Grupos	Letra do grupo	Média $\pm$ DP
Controle	A	16,037 $\pm$ 2,613 <sup>b,c,d,e,f,g,h,i</sup>
DISJ 7d	B	27,048 $\pm$ 15,834 <sup>a,c,d</sup>
DISJ + L7d	C	34,479 $\pm$ 19,701 <sup>a,b</sup>
DISJ + LED7d	D	46,144 $\pm$ 17,704 <sup>a,b,g,i</sup>
DISJ 14d	E	23,433 $\pm$ 4,752 <sup>a,h,i</sup>
DISJ + L14d1	F	31,298 $\pm$ 14,526 <sup>a</sup>
DISJ + LED14d1	G	26,415 $\pm$ 7,072 <sup>a,d,h</sup>
DISJ + L14d2	H	35,910 $\pm$ 1,504 <sup>a,e,g,i</sup>
DISJ + LED14d2	I	27,938.8 $\pm$ 5,490 <sup>a,d,e,h</sup>

As letras sobrescritas indicam que os valores são significativamente diferentes dos valores do grupo com a mesma letra (Teste *t* de Student,  $p \leq 0,05$ ).

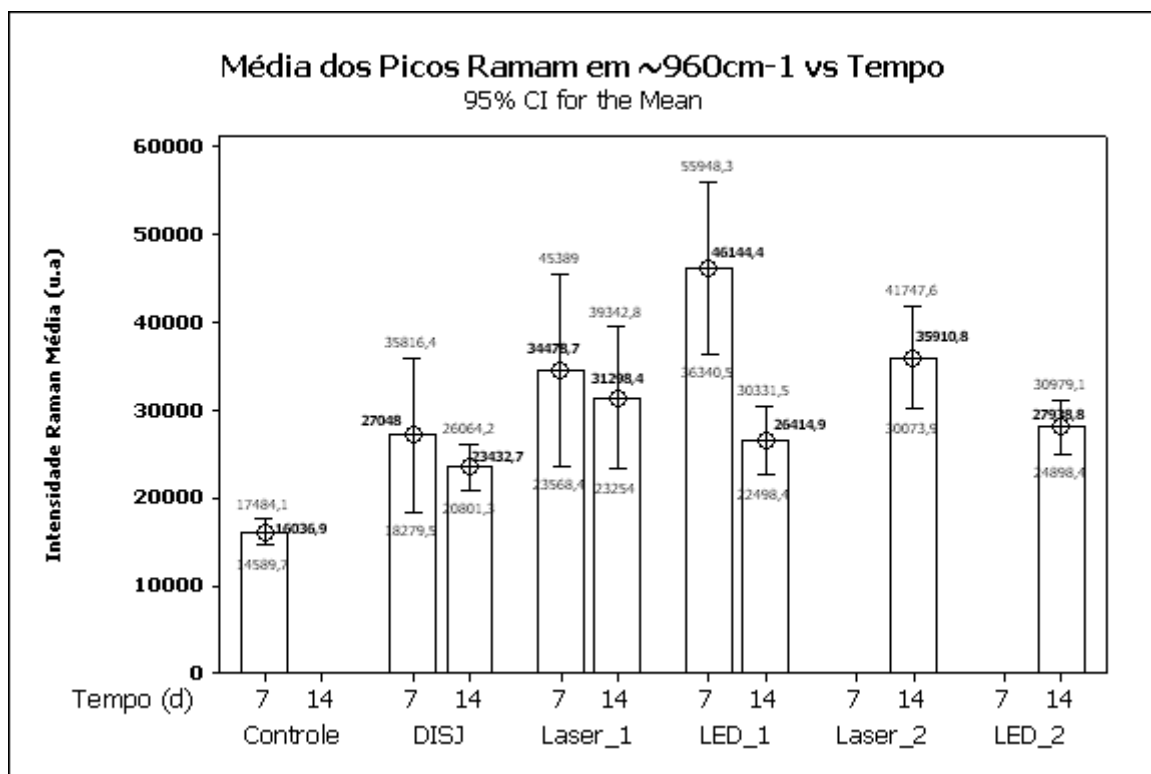


Figura 13 – Demonstração gráfica das intensidades médias de todos os grupos para o pico Raman  $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$ , nos períodos observacionais de 7 e 14 dias (ROSA, 2014).

Laser\_1 representa os grupos de disjunção com irradiação laser realizada na primeira semana do tempo experimental - Laser\_1 (7 dias) é o grupo DISJ+L7d e Laser\_1 (14 dias) é o grupo DISJ+L14d1. Laser\_2 representa o grupo DISJ+L14d2 que teve disjunção e irradiação laser na primeira e segunda semanas.

LED\_1 representa os grupos de disjunção com irradiação LED realizada na primeira semana do tempo experimental - LED\_1 (7 dias) é o grupo DISJ+LED7d e LED\_1 (14 dias) é o grupo DISJ+LED14d1. LED\_2 representa o grupo DISJ+LED14d2 que teve disjunção e irradiação LED na primeira e segunda semanas.

### 5.2.3 – Osso basal – Colágeno

Ao medir as intensidades no osso basal relacionadas aos grupos de sete dias para  $\sim 1454 \text{ cm}^{-1}$ , uma maior média foi encontrada para o grupo DISJ+L7d ( $7,030 \pm 3,573$ ) e uma menor para o grupo Controle ( $3,513 \pm 997$ ). Com 14 dias, a maior intensidade média foi observada para o grupo DISJ+LED14d2 ( $6,729 \pm 1,931$ ) e a menor para o grupo DISJ+L14d1 ( $4,742 \pm 801$ ). Um resumo dos resultados das intensidades médias estudadas e seus desvios padrão podem ser encontrados na **Tabela 07**.

Diferença estatística significativa foi encontrada entre os picos de colágeno dos grupos de sete dias (Controle, DISJ 7d, DISJ+L7d e DISJ+LED7d) no osso basal (ANOVA,  $p=0,001$ ), sendo que o grupo Controle apresentou a menor média de pico ( $3,513 \pm 997$ ). Ao comparar somente os grupos tratados, nenhuma diferença foi encontrada (ANOVA,  $p=0,313$ ). O grupo DISJ+LED7d, no entanto, apresentou menor média de pico ( $5,520 \pm 1,680$ ).

No período de 14 dias, entre o grupo Controle e os grupos tratados DISJ 14d, DISJ+L14d1, DISJ+LED14d1, DISJ+L14d2 e DISJ+LED14d2, foi encontrada diferença estatística significativa (ANOVA,  $p < 0,001$ ), com menor média para o grupo Controle ( $3,513 \pm 997$ ). Comparando de forma pareada o grupo Controle com cada grupo tratado também foi encontrada diferença (Teste  $t$  de Student,  $p < 0,001$ ,  $p=0,004$ ,  $p < 0,001$ ,  $p=0,015$ ,  $p < 0,001$ ). Entre os grupos que receberam tratamento (DISJ 14d, DISJ+L14d1, DISJ+LED14d1, DISJ+L14d2 e DISJ+LED14d2), diferença estatística significativa foi encontrada (ANOVA,  $p=0,009$ ). Pareando os grupos, diferença estatística significativa foi encontrada entre os grupos DISJ 14d e DISJ+L14d1 com  $p=0,001$  e menor média para o grupo DISJ+L14d1 ( $4,741 \pm 801$ ); entre os grupos DISJ 14d e DISJ+LED14d1 com  $p < 0,001$  e menor média para o

grupo DISJ+LED14d1 (5,146±514); entre os grupos DISJ+L14d1 e DISJ+LED14d2 com  $p < 0,001$  e menor média para grupo DISJ+L14d1 (4,742±801); e entre os grupos DISJ+LED14d1 e DISJ+LED14d2 com  $p = 0,002$  e menor média para o grupo DISJ+LED14d1.

Pareando os grupos tratados de sete dias com os de 14 dias, foi encontrada diferença estatística significativa entre o grupo DISJ+L7d e o grupo DISJ+L14d1 com  $p = 0,013$  e menor média para o grupo DISJ+L14d1 (4,742±801), assim como entre os grupos DISJ+LED7d e DISJ+LED14d2 com  $p = 0,055$  e menor média para o grupo DISJ+LED7d (5,520±1,680).

**Tabela 07 - Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) dos picos do Raman para colágeno ( $1454 \text{ cm}^{-1}$ ) no osso basal (n=5) (ROSA, 2014).**

Grupos	Letra do grupo	Média $\pm$ DP
Controle	A	3,513±997 <sup>b,c,d,e,f,g,h,i</sup>
DISJ 7d	B	6,503±2,559 <sup>a</sup>
DISJ + L7d	C	7,030±3,573 <sup>a,f</sup>
DISJ + LED7d	D	5,520±1,680 <sup>a,i</sup>
DISJ 14d	E	6,699±1,376 <sup>a,f,g</sup>
DISJ + L14d1	F	4,742±801 <sup>a,c,e,i</sup>
DISJ + LED14d1	G	5,147±515 <sup>a,e,i</sup>
DISJ + L14d2	H	5,875±3,158 <sup>a</sup>
DISJ + LED14d2	I	6,729±1,931 <sup>a,d,f,g</sup>

As letras sobrescritas indicam que os valores são significativamente diferentes dos valores do grupo com a mesma letra (Teste *t* de Student,  $p \leq 0,05$ ).

#### 5.2.4 – Osso basal – Hidroxiapatita

A medição das intensidades, no osso basal, relacionadas com os grupos de sete dias mostrou para  $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$  uma maior média para o grupo DISJ+LED7d (30,731±2,613) e uma menor para o grupo Controle (19,920±6,196). Com 14 dias, a maior intensidade média foi observada para o grupo DISJ + L14d2 (35,121±26,724) e a menor para o grupo DISJ 14d (21,145±6,110). Um resumo dos resultados das

intensidades médias estudadas e seus desvios padrão podem ser encontrados na **Tabela 08**.

Nos grupos de sete dias, diferença estatística significativa foi encontrada ao comparar os picos de HA entre os grupos Controle, DISJ 7d, DISJ+L7d e DISJ+LED7d, no osso basal (ANOVA,  $p=0,010$ ), com o grupo Controle apresentando a menor média de pico ( $19,920\pm6,196$ ). Nenhuma diferença estatística foi encontrada ao comparar somente os grupos tratados DISJ 7d, DISJ+L7d e DISJ+LED7d (ANOVA,  $p=0,189$ ), apesar de o grupo DISJ+LED7d ter apresentado a maior média ( $30,731\pm2,613$ ).

Ao comparar o grupo Controle com os grupos do período de 14 dias, DISJ 14d, DISJ+L14d1, DISJ+LED14d1, DISJ+L14d2 e DISJ+LED14d2, diferença estatística significativa foi encontrada (ANOVA,  $p=0,014$ ). Já ao se retirar o grupo Controle da comparação, nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos DISJ 14d, DISJ+L14d1, DISJ+LED14d1, DISJ+L14d2 e DISJ+LED14d2 (ANOVA,  $p=0,115$ ), apesar de o grupo DISJ+L14d2 apresentar maior média (média  $35,121\pm26,724$ ).

**Tabela 08 - Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) dos picos do Raman para HA ( $960\text{ cm}^{-1}$ ) no osso basal ( $n=5$ ) (ROSA, 2014).**

Grupos	Letra do grupo	Média $\pm$ DP
Controle	a	$19,920\pm6,196$ <sup>b,c,d,e,f,g,h,i</sup>
DISJ 7d	b	$24,101\pm11,325$ <sup>a</sup>
DISJ + L7d	c	$28,682\pm12,822$ <sup>a</sup>
DISJ + LED7d	d	$30,731\pm2,613$ <sup>a</sup>
DISJ 14d	e	$21,145\pm6,110$ <sup>a</sup>
DISJ + L14d1	f	$29,868\pm10,725$ <sup>a</sup>
DISJ + LED 14d1	g	$31,414\pm10,599$ <sup>a</sup>
DISJ + L14d2	h	$35,121\pm26,724$ <sup>a</sup>
DISJ + LED14d2	i	$29,333\pm6,416$ <sup>a</sup>

As letras sobrescritas indicam que os valores são significativamente diferentes dos valores do grupo com a mesma letra (Teste  $t$  de Student,  $p\leq 0,05$ ).

### 5.3. – Histologia

#### 5.3.1 – Inflamação

A inflamação na sutura palatina mediana foi avaliada entre os grupos e os resultados são apresentados na **Fig. 14**. No grupo Controle observa-se que em 60% dos casos a inflamação era moderada. No grupo DISJ 7d, em 60% dos casos foi intensa. O grupo DISJ+L7d teve inflamação moderada em 60% dos casos. No grupo DISJ+LED7d, em 80% dos casos foi moderada. O grupo DISJ 14d apresentou, em 100% dos casos, inflamação discreta. No grupo DISJ+L14d1, em 40% foi discreta, em 20% moderada e em 40% intensa. No grupo DISJ+LED14d1, houve inflamação intensa em 60% dos casos. No grupo DISJ+L14d2, foi moderada em 60%. O grupo DISJ+LED14d2 obteve 40% dos casos com inflamação discreta, 20% moderada e 40% intensa. A presença do processo inflamatório pode ser observada nas **Figs. 15 a 17**.

Análise estatística foi realizada usando o teste exato de Fischer ( $p \leq 0,005$ ). Houve diferença significativa entre o grupo DISJ 14d e todos os outros grupos da pesquisa. O grupo DISJ 14d comparado com os grupos Controle, DISJ+L7d, DISJ+L14d1, DISJ+L14d2 e DISJ+LED14d2, apresentou diferença estatística com  $p=0,03$ . Ao comparar o grupo DISJ 14d com o grupo DISJ 7d diferença estatística significativa foi obtida com  $p=0,047$ . A comparação do grupo DISJ 14d com os grupos DISJ+LED7d e DISJ+LED14d1 apresentou  $p=0,00$ .

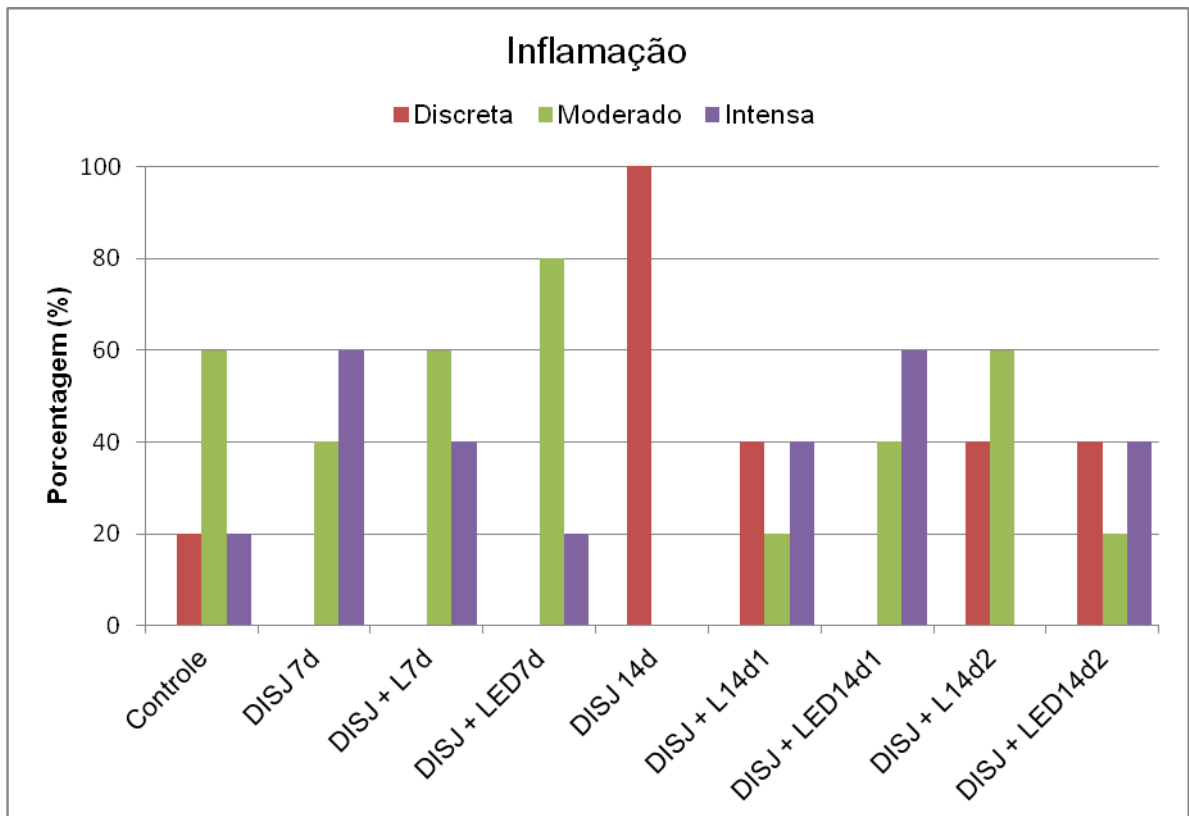
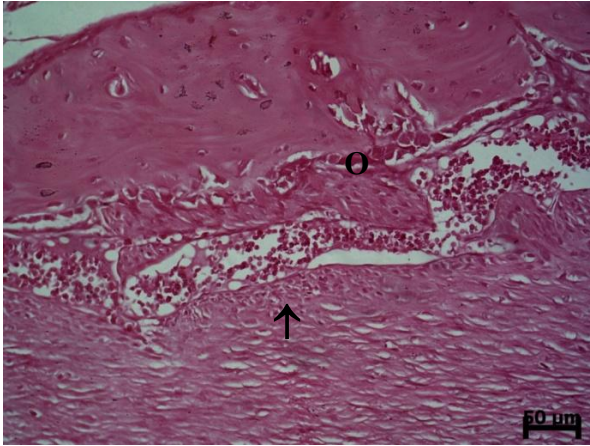
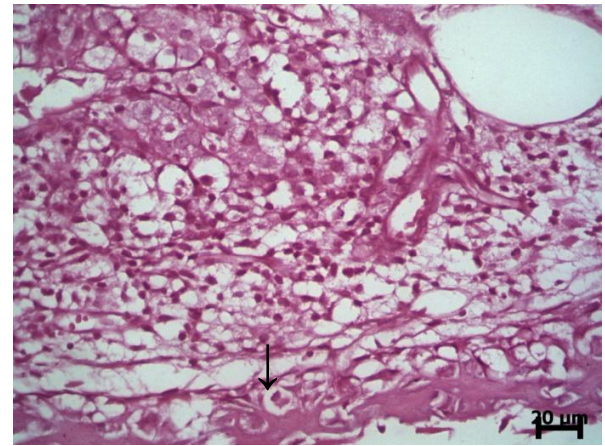


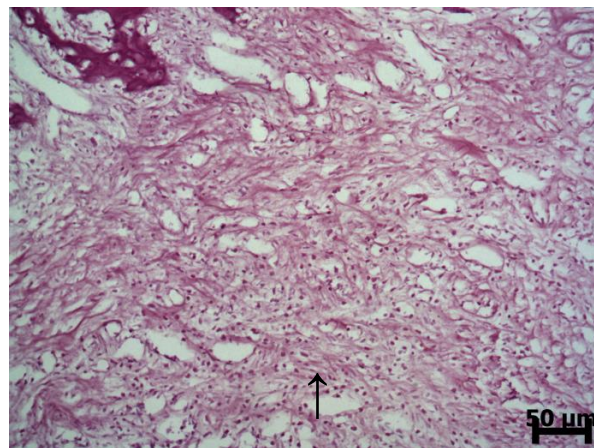
Figura 14 - Demonstração gráfica da presença de inflamação (ROSA, 2014).



**Figura 15** - Fotomicrografia mostrando osso neoformado com atividade osteoblástica (O), células inflamatórias (seta) e hemorragia. (Controle - HE) (ROSA, 2014).



**Figura 16** - Fotomicrografia mostrando inflamação crônica marcante, macrófagos em atividade (seta) e osso remanescente (DISJ+LED7d - HE) (ROSA, 2014).



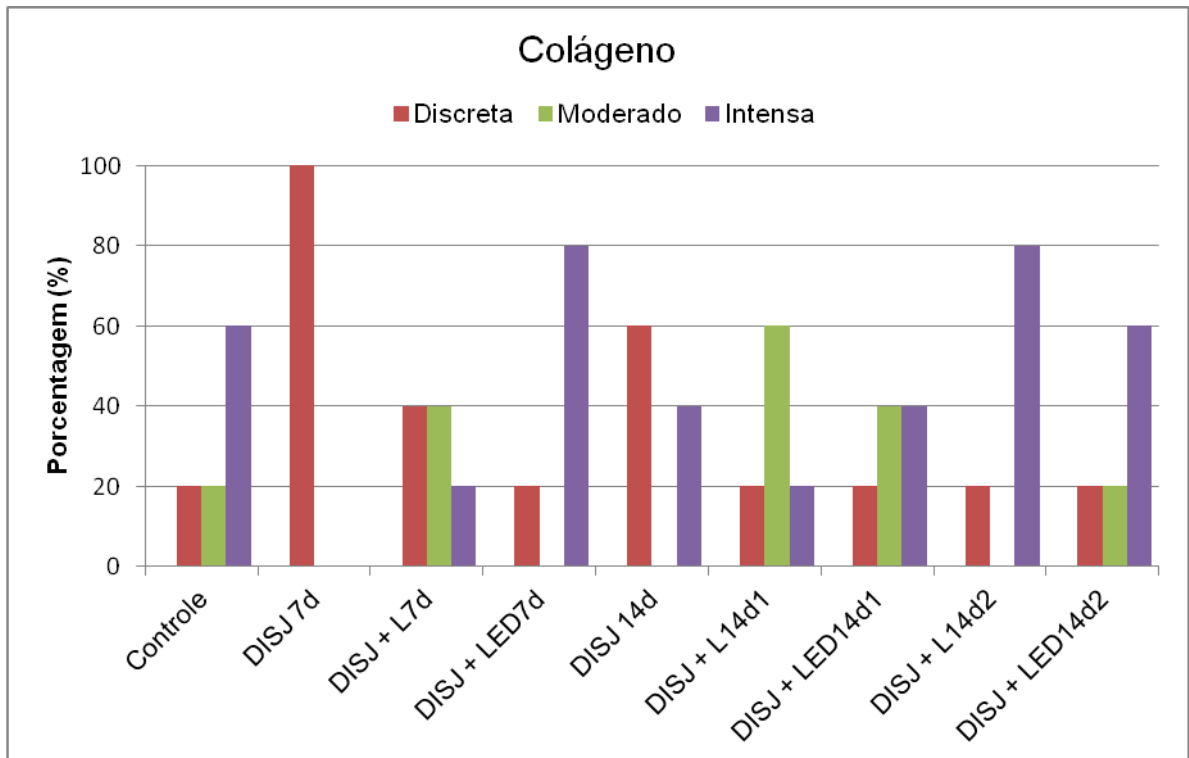
**Figura 17** - Fotomicrografia mostrando inflamação crônica (seta), tecido de granulação e vasos neoformados (DISJ+L14d1 - HE) (ROSA, 2014).

### 5.3.2 - Colágeno

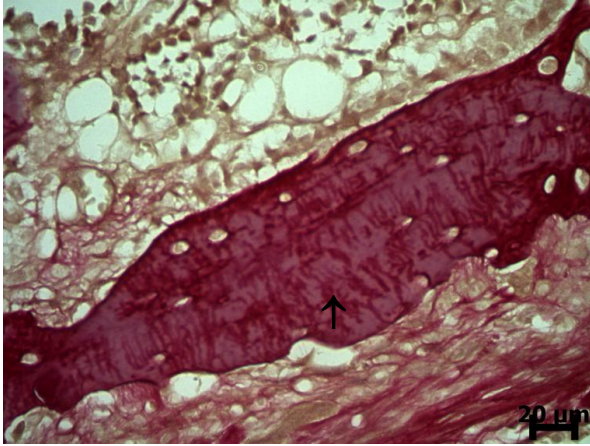
A presença de colágeno foi avaliada nas lâminas coradas com picrossírius e os resultados apresentados na **Fig. 18**. No grupo Controle, 60% das áreas observadas tinham presença intensa de colágeno. Para o grupo DISJ 7d, foi discreta em 100% dos casos. No grupo DISJ+L7d, 80% dos casos obtiveram presença de discreta a moderada e 20% intensa. O grupo DISJ+LED7d apresentou em 80% dos casos presença intensa. No grupo DISJ 14d, em 60% dos casos foi discreta. No grupo DISJ+L14d1, em 60% dos casos foi moderada. O grupo DISJ+LED14d1 obteve, em 20% dos casos presença discreta de colágeno, em 80% foi entre moderada e intensa. No grupo DISJ+L14d2, em 80% dos casos foi intensa. O grupo DISJ+LED14d2 obteve 40% dos casos com presença de colágeno discreta a moderada e 60% dos casos intensa. A presença de colágeno pode ser observada nas **Figs. 19 a 21**.

Diferença estatística significativa quanto ao colágeno, foi encontrada na comparação do grupo DISJ 7d com praticamente todos os outros grupos exceto o grupo DISJ 14d. Entre o grupo DISJ 7d e o grupo Controle diferença estatística foi obtida com  $p=0,00$ , entre os grupos DISJ 7d e DISJ+L7d com  $p=0,047$ , e entre o grupo DISJ 7d e os grupos DISJ+LED7d, DISJ+L14d1, DISJ+LED14d1, DISJ+L14d2 e DISJ+LED14d2, com  $p=0,00$ .

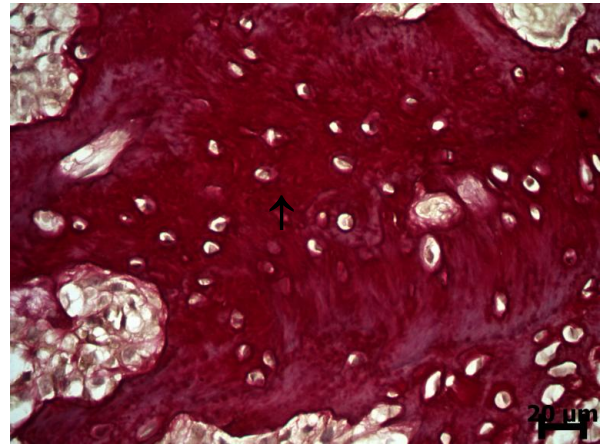




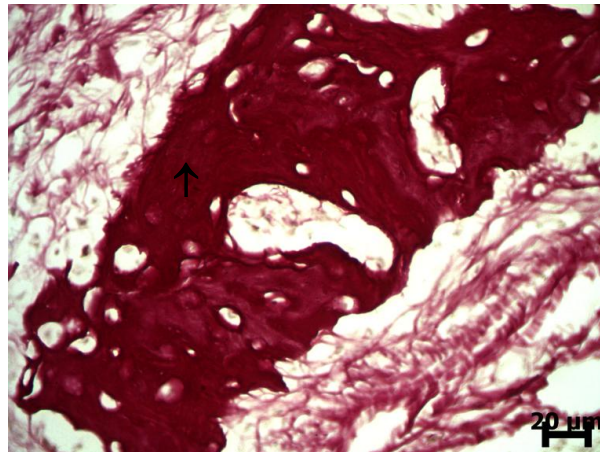
**Figura 18 - Demonstração gráfica da presença de colágeno (ROSA, 2014).**



**Figura 19** – Fotomicrografia mostrando osso neoformado com presença discreta de colágeno (seta). (DISJ 7d - Picrosirius). (ROSA, 2014).



**Figura 20** – Fotomicrografia mostrando osso neoformado maduro com moderada presença de fibras colágenas (seta). (DISJ+L14d1 - Picrosirius). (ROSA, 2014).

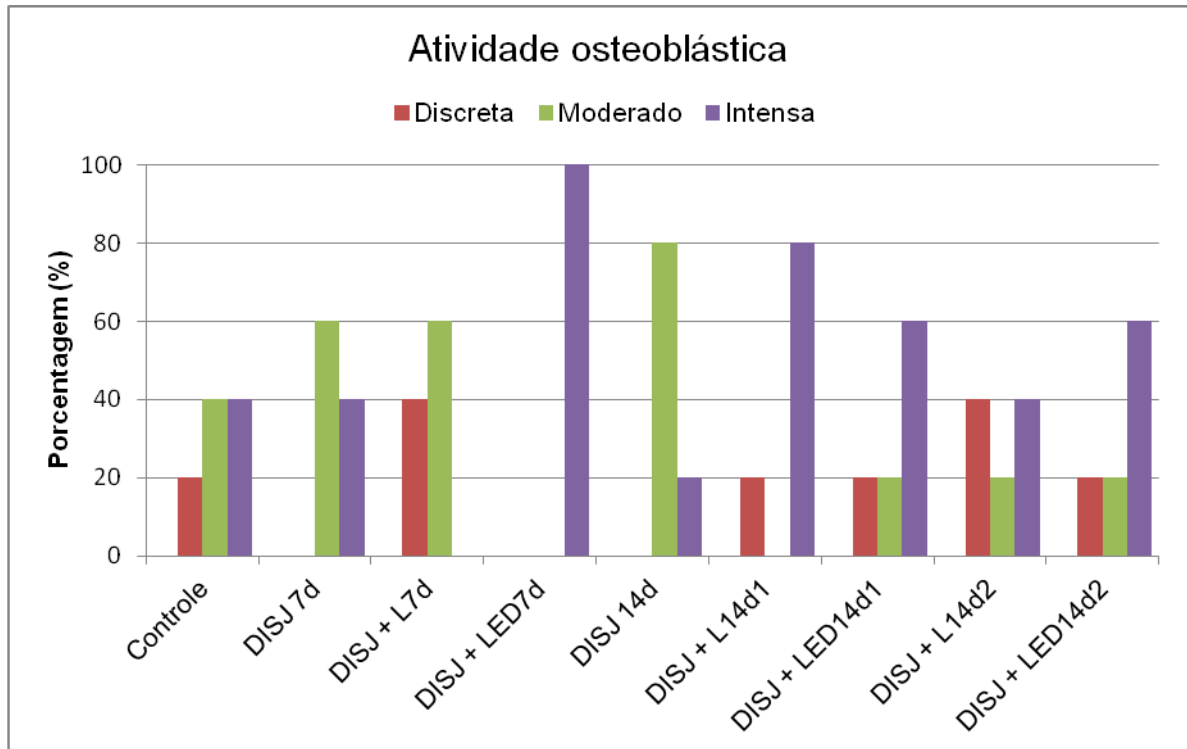


**Figura 21** – Fotomicrografia mostrando osso neoformado maduro com muita colagenização (seta) (DIS+LED14d2 - Picrosirius). (ROSA, 2014).

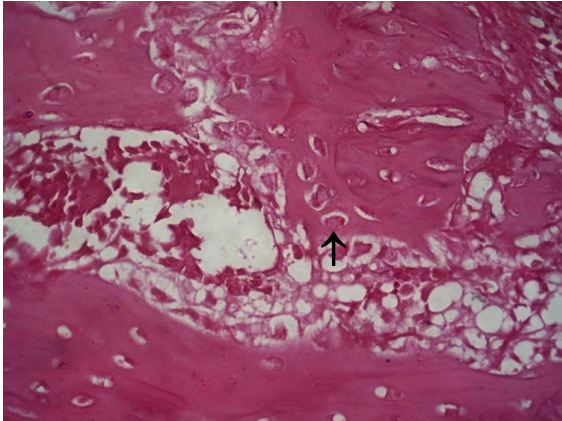
### 5.3.3 – Atividade osteoblástica

Em relação à atividade osteoblástica, como pode ser visto na **Fig. 22**, o grupo Controle, apresentou 60% das áreas observadas com atividade osteoblástica de discreta a moderada e 40% intensa. No grupo DISJ 7d foi moderada em 60% dos casos. No grupo DISJ+L7d 60% dos casos obtiveram atividade osteoblástica moderada. O grupo DISJ+LED7d foi o grupo que apresentou maior atividade osteoblástica da área observada com 100% dos casos tendo atividade intensa. No grupo DISJ 14d em 80% dos casos foi moderada. No grupo DISJ+L14d1 em 80% dos casos foi intensa. O grupo DISJ+LED14d1 obteve em 60% dos casos atividade osteoblástica intensa. No grupo DISJ+L14d2, em 60% dos casos foi entre discreta e moderada e em 40% intensa. O grupo DISJ+LED 14d2 obteve 60% dos casos com atividade osteoblástica intensa. A presença da atividade osteoblástica pode ser observada nas **Figs. 23 a 25**.

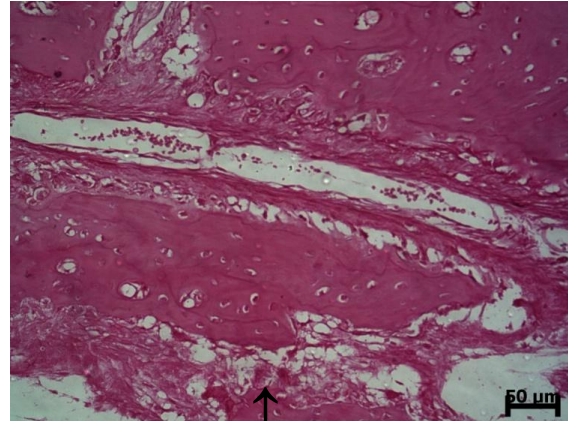
Foi encontrada diferença estatística significativa para atividade osteoblástica entre o grupo DISJ+LED7d e os grupos Controle e DISJ 7d, ambos com  $p = 0,047$ , com o grupo DISJ+L7d, com  $p = 0,000$ , com o grupo DISJ 14d, com  $p=0,03$  e com o grupo DISJ+L14d2 com  $p=0,047$ . O grupo DISJ 14d também apresentou diferença estatística em relação ao grupo DISJ+L14d1, com  $p =0,047$ .



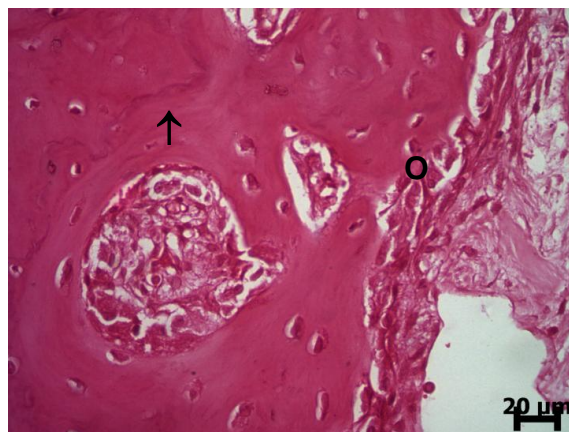
**Figura 22 - Demonstração gráfica da atividade osteoblástica (ROSA, 2014).**



**Figura 23** – Fotomicrografia mostrando osso neoformado com osteócitos irregulares (seta) e atividade osteoblástica. (DISJ 7d - HE) (ROSA, 2014).



**Figura 24** – Fotomicrografia mostrando osso neoformado com osteócitos e células gigantes (macrófagos) em atividade (seta). (DISJ 14d - HE). (ROSA, 2014).

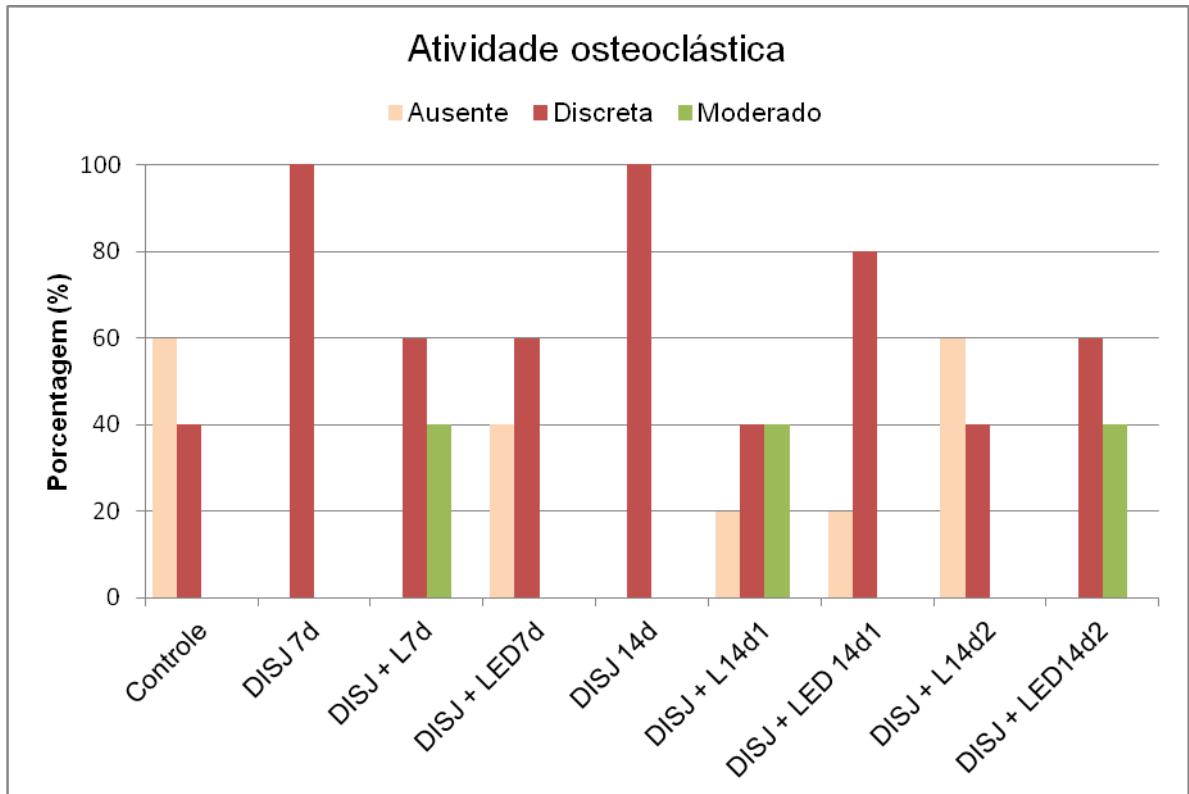


**Figura 25** – Fotomicrografia mostrando osso neoformado com osteócitos irregulares, linhas basofílicas (seta) e osteoblastos (O) em atividade (DISJ+LED14d1 - HE) (ROSA, 2014).

#### 5.3.4 – Atividade osteoclástica

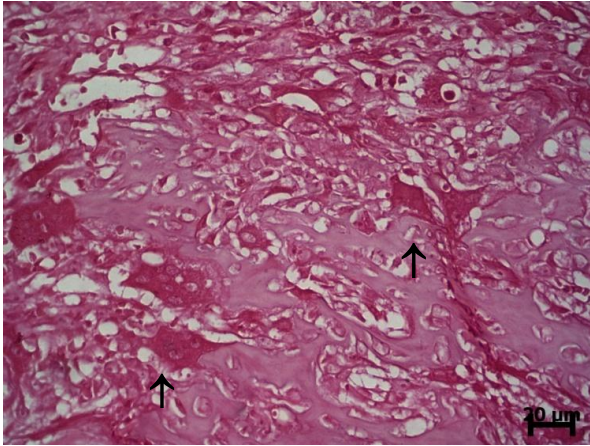
Quanto à atividade osteoclástica, observa-se na **Fig. 26**, que o Controle, apresentou ausência da mesma em 60% dos casos. No grupo DISJ 7d em 100% dos casos foi discreta. No grupo DISJ+L7d, em 60% dos casos foi discreta. No grupo DISJ+LED7d houve atividade osteoclástica em 60% dos casos. O grupo DISJ 14d também apresentou em 100% dos casos atividade osteoclástica discreta. No grupo DISJ+L14d1 em 20% dos casos foi ausente, em 80% foi de discreta a moderada. No grupo DISJ+LED14d1 a atividade osteoclástica foi discreta em 80% dos casos. O grupo DISJ+L14d2 obteve ausência em 60% dos casos. No grupo DISJ+LED14d2 em 60% dos casos foi discreta. A presença da atividade osteoclástica pode ser observada nas **Figs. 27 a 29**.

Na análise estatística, diferença significativa para atividade osteoclástica foi encontrada na comparação do grupo DISJ 7d com os grupos Controle, DISJ+L14d1 e DISJ+L14d2, todos com  $p=0,047$ . Também foi encontrada diferença estatística do grupo DISJ 14d com os grupos DISJ+L14d1 e DISJ+L14d2, com  $p=0,047$ .

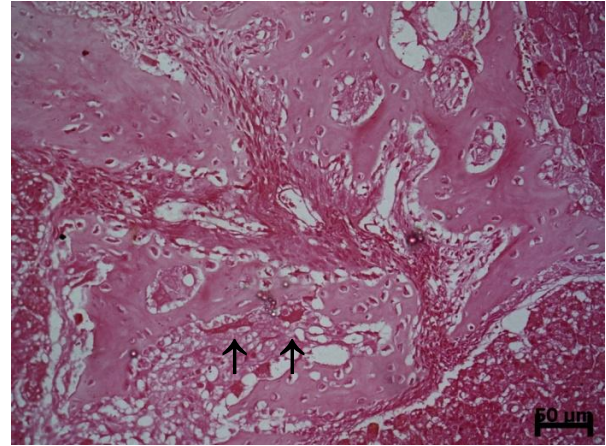


**Figura 26 - Demonstração gráfica da atividade osteoclástica (ROSA, 2014).**

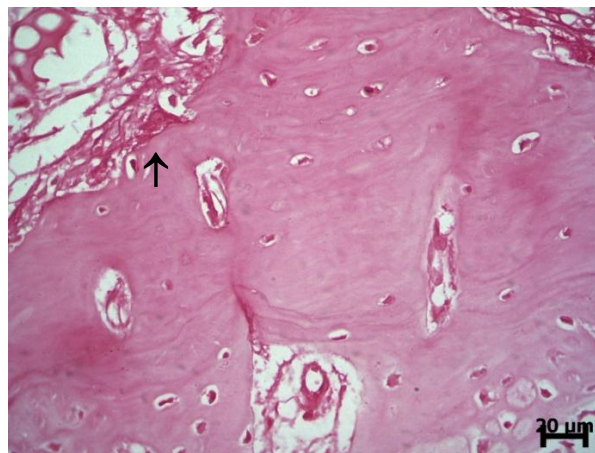




**Figura 27** – Fotomicrografia mostrando presença de numerosas células gigantes multinucleadas (setas) e inflamação crônica severa. (DISJ 7d - HE). (ROSA, 2014).



**Figura 28** – Fotomicrografia mostrando osteócitos irregulares, tecido estromal com inflamação crônica e numerosas células gigantes em atividade (setas) (DISJ+L7d - HE) (ROSA, 2014).



**Figura 29** – Fotomicrografia mostrando osso neoformado com osteócitos no interior, linhas basofílicas e presença de célula osteoclástica (seta). (DIS+LED7d - HE). (ROSA, 2014).



---

## 6. Discussão

---

No presente estudo foram usados ratos machos jovens para que fosse possível se conseguir a abertura da sutura e também não haver interferências de fatores hormonais (FRIESEN et al., 1999; SIMÕES, 2008; STUANI 2008). Estudos têm mostrado que os ratos atingem maturidade sexual com 12 semanas, sendo que avaliação com histomorfometria óssea demonstrou picos de deposição mineral com oito semanas, com intensidade aumentando ainda mais com 12 semanas e finalmente reduzindo significativamente até 52 semanas (KANEKAWA, SHIMIZU, 1998). Os ratos usados na presente pesquisa apresentavam seis semanas no início do experimento e oito semanas no fim, condizendo com o primeiro pico de deposição, sem ainda ter atingido maturidade sexual. Haveria possibilidade de se obter resposta favorável à disjunção além do período puberal até 15 semanas de idade. No entanto, como a idade tem relação de efeito inibitório na abertura da sutura e na mineralização da matriz óssea (KANEKAWA, SHIMIZU, 1998), preferiu-se utilizar ratos com seis semanas assim como já havia sido feito em outros estudos (SAITO, SHIMIZU, 1998; HOU, FUKAI & OLSEN, 2007; STUANI, 2008).

Em relação à avaliação radiográfica, o objetivo foi analisar a densidade óssea da região anterior da sutura com a radiografia oclusal, que é comumente usada no dia a dia da prática clínica para avaliar a formação óssea do local, servindo como referência para determinar o momento da remoção do aparelho disjuntor e contenção (GURGEL, MALMSTROM, PINZAN-VERCELINO, 2012). Assim, a avaliação da densidade óssea foi realizada nesta pesquisa para verificar se os dados encontrados pela espectroscopia e pela histologia são refletidos nas radiografias usadas na clínica.

Salienta-se, no entanto, que é difícil padronizar as tomadas radiográficas em animais, uma vez que, apesar de estarem anestesiados, o uso de posicionadores radiográficos é, muitas vezes, inviável devido ao tamanho e anatomia da cavidade oral do animal, e que, para a realização das imagens, também seria necessário uso de filmes radiográficos menores. Além disso, como as imagens radiográficas correspondem a projeções em duas dimensões de estruturas tridimensionais, quando essa avaliação é realizada in vivo, pequenas alterações na angulação do animal, no filme ou no aparelho de radiação X podem levar a uma imagem final com sobreposições (OLIVEIRA, 2010).

Devido à necessidade de se colocar as peças no nitrogênio líquido imediatamente após a dissecação, as radiografias precisaram ser obtidas in vivo com o animal anestesiado. A dificuldade em posicionar o filme radiográfico na cavidade bucal do animal e conseguir uma padronização neste posicionamento, devido à presença dos incisivos superiores e inferiores alongados, acarretou a necessidade de seccionar estas unidades previamente à tomada radiográfica. Como os incisivos superiores não poderiam ser seccionados antes do fim do período experimental, pois serviriam de apoio para disjunção e alimentação do animal, não foi possível a execução de uma radiografia oclusal pré-disjunção de cada animal ou radiografias sequenciais para permitir avaliar a evolução da densidade óssea ao longo do tempo experimental. Desta forma, o grupo controle serviu como referência para a avaliação, representando uma sutura normal como a encontrada antes do procedimento de disjunção.

Dentre os métodos radiográficos disponíveis, optou-se por utilizar radiografias convencionais digitais na avaliação da formação óssea, já que é possível empregar

ferramentas de manipulação de imagem (OLIVEIRA, 2010) facilitando a avaliação da área da sutura do animal que se apresentava pequena na radiografia.

A seleção da área anterior da sutura para leitura da densidade óssea neste estudo baseou-se na característica de abertura desta considerando que a literatura relata a região anterior como a última a completar o processo de ossificação (ANGELLETTI et al., 2010) e, portanto, a mais necessitada de contenção. Além disso, a região anterior foi eleita no presente estudo como área para avaliação radiográfica por ter sido o local de aplicação do laser e LED e também o mesmo local usado na avaliação da espectroscopia Raman e na análise histológica.

Nesta pesquisa, verificou-se radiograficamente que com sete dias a disjunção isolada e a disjunção associada ao laser proporcionaram os menores valores médios de mmAL, ou seja, a menor densidade óssea, com diferença estatística em relação a todos os demais grupos avaliados. O restante dos grupos, porém, não apresentou diferença estatística entre si.

Da mesma forma, outro estudo avaliando, através de radiografias, a densidade óssea da sutura em ratos pós-disjunção associada ou não ao laser, também encontrou uma menor densidade com sete dias, apesar de através da análise histológica a neoformação óssea já poder ser vista neste estágio, e maior densidade no 14<sup>o</sup> dia (STUANI, 2008). Esse fato também foi observado nesta pesquisa pela atividade osteoblástica e pela deposição de HA que ocorreu nestes grupos.

Apesar de radiograficamente os grupos restantes não apresentarem, nesta pesquisa, diferença estatística entre si, as outras análises comprovaram diferenças significativas na formação óssea. Possivelmente uma avaliação radiográfica realizada posteriormente ao tempo experimental de 14 dias estudado apresentasse

um resultado com diferença significativa entre os grupos e indicasse clinicamente em qual há uma neoformação mais acentuada.

Clinicamente, estudos relatam que nos pacientes submetidos à disjunção, associada à irradiação laser, uma maior densidade óssea pode ser observada nas radiografias com 30, 60 (CEPERA et al., 2012), 90, 120 e 210 dias pós-disjunção (ANGELLETI et al., 2010). No entanto, um acompanhamento dos pacientes ao longo de sete meses em um dos estudos, mostrou que, mesmo no grupo laser, este período ainda não foi suficiente para total regeneração óssea da área (ANGELLETI et al., 2010).

Deve-se lembrar de que a idade do paciente precisa ser considerada em relação ao grau de ossificação e ao período de contenção necessário para se restabelecer a configuração inicial da sutura palatina mediana. O período de contenção adequado para um jovem submetido à disjunção em geral não é o suficiente para um adulto submetido a uma disjunção cirúrgica (GURGEL, MALMSTROM, PINZAN-VERCELINO, 2012).

Pesquisas prévias relataram um ciclo de remodelação óssea alveolar de seis dias, para ratos, comparados aos 60 a 120 dias para humanos adultos (FRIESEN et al., 1999; STUANI 2008). Já quanto à sutura, tem sido observado em ratos que, após expansão, esta se restabelece completamente, retornando a um aspecto semelhante ao anterior ao procedimento, num período de aproximadamente quatro semanas (HOU, FUKAI, OLSEN, 2007). Desta forma um acompanhamento por um período mais extenso que o realizado nesta pesquisa poderia dar uma maior precisão sobre o tempo ideal para remoção de uma contenção pós-tratamento de disjunção a depender do tipo de luz utilizada e do período de irradiação.

Tem sido observado que com o procedimento da disjunção, há um aumento da largura da sutura palatina mediana quando comparada com a largura da sutura de grupos não tratados, ocasionando também um aumento significativo de osso neoformado na área. Isto sugere que o potencial para formação óssea em resposta ao estímulo mecânico existe quando a sutura é expandida (KANEKAWA, SHIMIZU 1998). Depois da expansão, a sutura começa um processo de remodelação que pode incluir reabsorção e neoformação óssea com rearranjo das fibras colágenas. Simultaneamente, o número de células osteoprogenitoras aumenta para obtenção da neoformação óssea até quando a região da sutura alcança um equilíbrio estrutural, com aspecto semelhante ao da sutura previamente à expansão (LEE et al., 2001; HOU, FUKAI, OLSEN, 2007; SANTIAGO, PIRAM, FUZIY, 2012). A estabilização maxilar ocorre assim que a sutura é preenchida com osso neoformado (ZAHROWSKI et al., 1992).

Essa deposição de fibras colágenas presente no processo de remodelação pode ser observada neste estudo através da média de pico de colágeno avaliada pela espectroscopia Raman. Todos os grupos de sete e 14 dias com disjunção associada ou não à irradiação laser e LED apresentaram diferença estatística e maior média em relação ao grupo Controle. Este último não foi submetido a nenhum tratamento, conseqüentemente não teve estímulo externo para acelerar a deposição de colágeno, e posterior mineralização, além do previsto no processo de fechamento normal da sutura ao longo do desenvolvimento do animal. Na literatura há relato de que em animais usados como controle, não submetidos a nenhum tratamento, tal como no grupo Controle, somente mudanças relacionadas ao crescimento normal irão ocorrer na sutura e a largura desta permanece a mesma (HOU, FUKAI, OLSEN, 2007).

Por outro lado, todos os demais grupos da pesquisa foram submetidos ao procedimento de disjunção apresentando maior concentração de colágeno que o grupo Controle. A expansão por si só é um estímulo à deposição de colágeno na sutura palatina mediana, pois a formação óssea se inicia com uma matriz orgânica não mineralizada (ZAHROWSKI et al., 1992; ALQEEL, HINTON, OPPERMAN, 2006; SIMÕES, 2008). Em uma sutura sobre tensão, matriz extracelular a mais é adicionada nas bordas da sutura (ALQEEL, HINTON, OPPERMAN, 2006). Da mesma forma, a irradiação laser ou LED também é conhecida por estimular a proliferação de fibroblastos e intensificar a deposição destas fibras (HUANG et al., 2007; PINHEIRO et al., 2012).

Apesar de nesta pesquisa no período de sete dias não ter sido encontrada diferença estatística entre os grupos laser e LED em relação à deposição de colágeno através da espectroscopia Raman, a irradiação com LED resultou em maior média de pico. Este achado pode ser relacionado com estudos prévios, que indicam que ossos irradiados com LED apresentam maior quantidade de colágeno que osso não irradiado, sendo isto provavelmente associado com um aumento na deposição dos mesmos pelos fibroblastos estimulados por esta luz, semelhante ao que ocorre ao se for utilizado o laser (LOPES et al., 2010; PINHEIRO et al., 2012).

Já no período de 14 dias, ao comparar os grupos tratados, uma diferença estatística significativa foi encontrada entre os grupos DISJ 14d e DISJ+LED14d1, com menor média de pico para colágeno para o grupo DISJ+LED14d1. Este resultado pode estar relacionado com uma maior substituição de colágeno pela deposição de hidroxiapatita no grupo com LED, pois, como observado nos resultados, todos os grupos irradiados com esta luz, apresentaram maior concentração de hidroxiapatita que os grupos tratados apenas com disjunção. Em

situações de reparo ósseo, a concentração de colágeno diminui à medida que a maturação óssea avança, com um aumento na razão mineral-matriz orgânica (MORRIS, MANDAIR, 2011).

Por outro lado, entre os grupos LED de 14 dias (DISJ+LED14d1 e DISJ+LED14d2), verificou-se uma maior deposição de colágeno no grupo DISJ+LED14d2. Neste último, o estímulo da luz mantida ao longo dos 14 dias do período experimental, possivelmente, induziu uma produção de colágeno mais intensa do que no grupo DISJ+LED14d1, onde o estímulo da luz foi retirado após sete dias. Relato em estudo prévio também sugere que prolongar a irradiação além dos estágios iniciais da disjunção mantém a atividade regeneradora na sutura (SAITO, SHIMIZU, 1997).

Da mesma forma, comparando os grupos de sete dias com os de 14 dias, foi encontrada diferença estatística significativa apenas entre o grupo DISJ+LED7d e o grupo DISJ+LED14d1, tendo o grupo DISJ+LED7d a maior média de pico para colágeno. No grupo DISJ+LED7d o LED foi aplicado ao longo de uma semana e o estímulo da luz na produção de colágeno se manteve até o final do período experimental, enquanto no grupo DISJ+LED14d1 o estímulo não esteve presente durante todo o período experimental de 14 dias.

Os grupos irradiados com laser não apresentaram, porém, diferença estatística entre si e nem em relação aos grupos irradiados com LED quanto à deposição de colágeno, independentemente do período experimental. Apesar de também não ter sido encontrada diferença estatística em relação aos grupos submetidos à disjunção isolada (DISJ 7d e DISJ 14d), observa-se que os grupos irradiados com laser apresentaram sempre maior concentração de HA fosfatada que

os grupos com apenas disjunção, indicando já uma aceleração do processo de formação óssea com substituição da matriz orgânica por mineral.

Cálcio e fosfato são componentes da hidroxiapatita e encontrados no osso sob a forma de pequenos cristais (HUBLER et al., 2010). A mineralização se inicia quando altas concentrações de  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  são atingidas e ocorre sua precipitação, levando a formação de cristais de hidroxiapatita (HA) (LOPES et al., 2005). Na matriz, os cristais de hidroxiapatita crescem em grupos, que depois coalescem para calcificá-la completamente, preenchendo os espaços entre e dentro das fibras colágenas (LOPES et al., 2005; PINHEIRO et al., 2011).

Essa mineralização pode ser observada no presente estudo através da média de pico de hidroxiapatita (HA) fosfatada avaliada pela espectroscopia Raman. Uma deposição de HA mais intensa que a obtida no grupo Controle pode ser observada em todos os grupos de sete e 14 dias com disjunção, associada ou não à irradiação laser e LED. Isto se relaciona com o fato de que a formação óssea com deposição de uma matriz mineralizada ocorre frente a estímulos mecânicos (ALAQEEL, HINTON, OPPERMAN, 2006).

Forças de tensão, como na disjunção da sutura palatina mediana, geram um sítio ativo, propiciando a liberação de fatores de crescimento que estimulam a migração de células osteoprogenitoras e regulam a proliferação e diferenciação celular assim como a síntese de matriz extracelular (SWADA, SHIMIZU, 1996; ALAQEEL, HINTON, OPPERMAN, 2006). Altos níveis da forma ativa de fator de transformação de crescimento ( $\text{TGF-}\beta 1$ ) foram verificados em osteoblastos, fibroblastos e células endoteliais nos estágios iniciais da disjunção (SWADA, SHIMIZU, 1996). O  $\text{TGF-}\beta 1$  é um dos reguladores locais da formação óssea, influenciando osteoblastos e fibroblastos a depositarem matriz óssea e colágena,



respectivamente (PINHEIRO, BRUGNERA JUNIOR, ZANIN, 2010; PINHEIRO et al., 2012). Desta forma, era de se esperar que os grupos submetidos à disjunção apresentassem maior deposição de HA que o grupo Controle que não foi submetido a nenhum estímulo externo, como aconteceu no presente estudo.

Por outro lado, a irradiação laser também aumenta o número e a atividade de osteoblastos (PINHEIRO, GERBI, 2006). A maior proliferação e diferenciação de osteoblastos, quando comparado a células não irradiadas, levam a uma maior taxa de acúmulo de cálcio e reparo ósseo (STEIN et al., 2005). Há também evidência na literatura de que a luz laser e LED afetam positivamente a liberação de TGF- $\beta$ 1 e diversos outros mediadores (PINHEIRO et al., 2012; PYO et al., 2012). Com sete dias, o uso do laser e LED resultou realmente em maior mineralização da sutura palatina mediana do que o grupo onde houve somente a disjunção. Porém, apesar de não ter havido diferença significativa entre os grupos de laser e LED neste período, a utilização do LED proporcionou maiores médias de HA fosfatada, conseqüentemente indicando maior tendência de mineralização da área neste estágio inicial.

Ao usar este mesmo protocolo por sete dias, mas avaliando a deposição de HA fosfatada em 14 dias, não se observou diferença entre os grupos com disjunção associada ou não ao laser e LED (DISJ 14d, DISJ+L14d1 e DISJ+LED14d1). Ao realizar irradiação apenas na primeira semana, nota-se redução na concentração de HA fosfatada com o passar do tempo, tornando essa deposição ao final dos 14 dias equivalente à obtida no grupo tratado apenas com a disjunção. Este resultado está condizente com outro estudo que indicou que o uso do laser, nos estágios iniciais pós-disjunção, ativa a regeneração óssea da sutura expandida, mas é o prolongamento da irradiação em estágios posteriores, além dos primeiros dias pós

início da disjunção, que mantém esta atividade regeneradora (SAITO, SHIMIZU, 1997).

Isso pode ser observado nesta pesquisa ao se manter a aplicação da luz laser ou LED, prolongando o período de irradiação ao longo das duas semanas, tendo os grupos irradiados apresentado melhores resultados quanto à concentração de HA fosfatada que o grupo onde foi realizada apenas a disjunção, como observado em relação aos grupos DISJ+L14d2 e DISJ+LED 14d2 com o grupo DISJ 14d. Assim, pode-se dizer que manter a irradiação com laser ou LED ao longo de 14 dias constitui um estímulo à deposição de HA.

Apesar de o laser e LED associados à disjunção produzirem melhores resultados do que a disjunção isolada, o laser aparentemente mantém um nível de deposição de HA mais constante e sem grandes variações. Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os grupos laser, independentemente do tempo experimental avaliado (DIS+L7d, DISJ+L14d1 e DISJ+L14d2). Outros estudos também têm relatado que o uso do laser associado à disjunção é efetivo na regeneração óssea, acelerando a velocidade da aposição mineral, e produzindo assim um reparo mais rápido na área (SAITO, SHIMIZU, 1997; MERLI et al., 2005; SANTIAGO, 2007; ANGELETI et al., 2010; CEPERA et al., 2012; SANTIAGO, PIRAM, FUZIY, 2012). O uso do laser em feridas ósseas, da mesma forma, tem resultado em neoformação e maturação óssea associada com aumento da deposição de cálcio hidroxiapatita durante os estágios iniciais de cicatrização (PINHEIRO et al., 2011; PINHEIRO et al., 2012c).

Por outro lado, com o uso do LED verificou-se uma deposição maior nos primeiros sete dias e depois uma redução desta com o passar do tempo. Isto pode

ser observado ao comparar o grupo LED de sete dias com os de 14 dias, com a maior média de pico de HA fosfatada encontrada para o grupo DISJ+LED7d.

Como não foi encontrado nenhum estudo anterior na literatura relacionado com o uso de LED associado à disjunção da sutura palatina mediana, e visto que o reparo da sutura palatina mediana pode ser comparado, histologicamente, ao reparo de uma fratura óssea (STUANI, 2008), as pesquisas que usaram LED em cicatrização de defeitos ósseos serviram como base para comparação dos resultados.

O osso irradiado por LED parece aumentar a proliferação osteoblástica, a deposição de colágeno e a neoformação óssea (PINHEIRO, GERBI, 2006; PINHEIRO et al., 2012a). Aprimora também a qualidade do osso neoformado devido a maior deposição de HA, quando comparado com osso não irradiado, como foi observado em outra pesquisa com análise Raman (PINHEIRO et al., 2012).

O protocolo do LED usado neste estudo é semelhante ao protocolo do laser usado no Centro de Biofotônica da FOUFBA em estudos prévios em osso (PINHEIRO et al., 2011; PINHEIRO et al., 2012b; PINHEIRO et al., 2012c) e também semelhante ao protocolo do laser usado nesta mesma pesquisa. Estudos recentes indicam que o LED operando em diversos comprimentos de onda tem efeitos benéficos e mecanismos similares aos observados quando o laser é usado (PINHEIRO et al., 2012), tanto *in vitro* quanto *in vivo*, em condições patológicas ou normais (DESMET et al., 2006; SOUZA, NETO, MARCHIONI, 2011).

Para efeito comparativo, como o osso avaliado na sutura palatina mediana era recém-formado devido ao efeito ortopédico ativo direto da disjunção, o osso basal maxilar dos ratos usados nesta pesquisa serviu como referência na análise da espectroscopia Raman.

Quanto ao colágeno no osso basal, o grupo Controle apresentou menor média de pico que todos os grupos tratados tanto de sete quanto de 14 dias. No entanto, neste caso, esta menor quantidade de colágeno relaciona-se com o fato do osso basal ser mais maduro, compatível com uma menor intensidade de colágeno (MORRIS, MANDAIR, 2011). Assim como na sutura, não foi encontrada diferença ao comparar os grupos tratados de sete dias entre si. Já entre os grupos de 14 dias, também foi encontrada uma maior média para o grupo DISJ+LED14d2 do que para o grupo DISJ+LED14d1, indicando que ao se prolongar a irradiação ao longo do período de 14 dias há maior estímulo aos fibroblastos e a produção de fibras colágenas se intensifica.

Em relação à deposição de hidroxiapatita no osso basal, diferença estatística significativa foi encontrada no grupo Controle em relação aos demais grupos tratados de sete e 14 dias. Esses resultados são semelhantes aos obtidos quando da avaliação da sutura, onde o grupo Controle também teve menor média de pico. Deve-se lembrar de que o osso basal maxilar não foi um sítio direto do efeito ortopédico da disjunção, pois o aparelho utilizado não era ancorado na mucosa palatina. Por outro lado, todos os grupos submetidos à disjunção tiveram maiores médias de HA com nenhuma diferença estatística encontrada entre eles. Com a abertura da sutura, forças dissipadas podem ter ocasionado um efeito indireto na área culminando com uma deposição mais intensa de hidroxiapatita nos grupos tratados do que no grupo Controle.

Ademais, o recrutamento de células osteoblásticas para a área da disjunção pode ter ocasionado um efeito no osso basal aumentando a deposição mineral nesta região. Outro possível fator contribuinte foi que a área do spot de ambos os aparelhos de luz era maior que a área da sutura palatina mediana, implicando em

um efeito do laser e LED no osso basal adjacente à sutura. Salieta-se que a fotoativação não ocorre somente na área de incidência do feixe, mas também em área igualmente distribuída ao seu redor de forma tridimensional (STUANI, 2008; BAXTER, 1997). Baseado nos princípios da difusão, transmissão e reflexão do feixe de laser no tecido, dependendo do comprimento de onda, a eficiência do laser estende-se cerca de 1 cm de diâmetro, tendo como centro o ponto de incidência do feixe (STUANI, 2008).

Ao avaliar os resultados histológicos obtidos nesta pesquisa, em comparação com os dados obtidos através da espectroscopia Raman, algumas considerações precisam ser feitas.

Como as peças necessitavam ser armazenadas em meios diferentes de conservação para que na presente pesquisa as duas análises fossem possíveis, optou-se por seccionar a maxila de cada espécime no plano transversal, dividindo-a em duas partes: uma englobando o terço inferior da maxila e a outra contendo os terços médio e superior.

É importante salientar que assim como ocorre em humanos, na sutura dos ratos observa-se, durante o procedimento de disjunção, que o grau de abertura da sutura palatina mediana não é uniforme em toda a sua extensão, tanto no plano frontal quanto no transversal (STUANI, 2008). Considerando o plano frontal, durante a disjunção tem-se uma abertura com proporções desiguais entre o terço inferior, médio e superior, com uma maior largura no terço inferior e menor no superior, semelhante à forma de triângulo com base voltada para cavidade oral e vértice para cavidade nasal (HOU, FUKAI, OLSEN, 2007; MOORE, 1997). Da mesma forma, no plano transversal também se observa uma abertura da sutura em forma de triângulo sendo esta maior na região anterior (pré-maxila) que na posterior (MOORE, 1997;

STUANI, 2008; DAVID et al., 2009). O tecido conjuntivo entre as bordas ósseas da sutura pré-maxilar oferece menos resistência às forças de expansão do que na área posterior, e, principalmente ao se aplicar uma força diretamente sobre os incisivos na região da pré-maxila, como nesta pesquisa, verifica-se maior abertura anterior (VARDIMON et al., 1998; STUANI, 2008). Desta forma, as peças usadas para análise Raman e avaliação histológica, neste estudo, apresentaram regiões da sutura palatina com larguras distintas de acordo com o terço em que cada peça englobava.

Outro ponto a ser ressaltado é que a espectroscopia Raman é uma análise quantitativa de componentes específicos, enquanto na avaliação histológica foi feita uma análise semi-quantitativa baseada em porcentagens por área e foram analisados outros aspectos como a inflamação e a atividade osteoclástica. Apesar de ambas as análises complementarem as informações e os resultados obtidos, proporcionando uma visão panorâmica dos eventos em diferentes áreas da sutura, e terem se mostrado alinhadas quanto aos resultados, estas variações quanto ao corte da peça e ao tipo de análise foram consideradas quando da avaliação dos dados.

Na análise histológica foi avaliada a inflamação presente. O procedimento isolado de disjunção após sete dias resultou em uma inflamação de moderada a intensa, que com 14 dias regrediu totalmente para um nível discreto de inflamação, apresentando diferença estatística significativa em relação aos demais grupos da pesquisa. Esta presença de infiltrado inflamatório após procedimento de disjunção foi anteriormente relatada (SIMÕES, 2008; STUANI, 2008). O predomínio do processo inflamatório em resposta à ação traumática da força aplicada na sutura palatina mediana nos períodos iniciais pós-tratamento, com posterior

restabelecimento da sutura e diminuição da inflamação foi encontrado em outro estudo (STUANI, 2008).

O uso do LED com sete dias mostrou uma prevalência de inflamação moderada. Com 14 dias, uma redução desta foi obtida somente no grupo onde se realizou a irradiação de 48 em 48 horas ao longo de todo o período experimental (DISJ+LED14d2). Já o uso do laser com sete dias resultou em inflamação intensa e moderada, enquanto nos grupos de 14 dias houve uma redução da inflamação para ambos os grupos (DISJ+L14d1 e DISJ+L14d2), com observação de um nível discreto de inflamação já presente em alguns animais. No entanto, nenhum dos grupos irradiados apresentou resultado similar ao grupo DISJ 14d que teve inflamação discreta observada em todos os animais.

Resultados com uso da luz LED em feridas ósseas mostram presença de inflamação com 15 dias e ausência de processo inflamatório aos 21 dias (PINHEIRO et al., 2012a). Da mesma forma, foi observada uma regressão do processo inflamatório com o passar do tempo na sutura pós-disjunção ao se usar o LED. Com relação ao laser, há relatos de que o mesmo acelera o estágio exsudativo da inflamação tendo um intenso efeito pró-inflamatório durante os períodos iniciais depois de ocorrida uma lesão em um tecido (MENDEZ et al., 2004; PEREIRA et al., 2010), o que justificaria a maior concentração de células inflamatórias encontradas no estudo nos grupos de sete dias. Outra pesquisa também mostrou um aumento da reação inflamatória nos períodos iniciais pós-disjunção associada ao laser, com um processo inflamatório agudo de até sete dias de duração e diminuição deste quadro posteriormente. Sugeriu-se no respectivo estudo que prolongar o número de aplicações do laser auxiliaria para uma menor presença inflamatória (SIMÕES,

2008), o que foi observado na presente pesquisa ao se estender a irradiação por 14 dias.

A presença de colágeno também foi observada através da histologia com a coloração picrossírius e em geral mostrou-se discreta para os grupos tratados somente com disjunção. Resultado similar também foi relatado em outro trabalho que apresentou menor número de fibroblastos no grupo de sete dias com o tecido sutural tornando-se mais fibroso por volta do 14<sup>o</sup> dia pós-disjunção (STUANI, 2008). Já nos grupos com irradiação laser e LED, verificou-se na presente pesquisa um nível de colágeno variando prevalentemente entre moderado e severo, condizendo com o explicitado anteriormente a respeito da estimulação à proliferação de fibroblastos e produção de colágeno, proporcionadas pelo laser e LED (PINHEIRO, GERBI, 2006; HUANG et al, 2007; STUANI, 2008; SOUZA, 2008; LOPES et al., 2010; PINHEIRO et al., 2011; PINHEIRO et al., 2012), e observado em especial, neste estudo, para os grupos DISJ+LED7d e DISJ+L14d2. Novamente, o grupo DISJ+LED7d apresentou maior presença de colágeno como visto nas médias de pico obtidas pela espectroscopia Raman.

Da mesma forma, a atividade osteoblástica por área estudada foi mais intensa entre os grupos irradiados com laser e LED. O uso do LED nos primeiros sete dias, teve o melhor resultado quanto à atividade osteoblástica em todos os grupos avaliados nesta pesquisa, apresentando-se esta como intensa em todos os animais. Já ao observar os grupos LED com 14 dias, nota-se uma redução na atividade osteoblástica, apesar de esta ainda estar presente de forma significativa. Considerando que em feridas ósseas o uso da luz LED tem mostrado um aumento considerável na proliferação celular em uma variedade de linhagem de células, incluindo fibroblastos e osteoblastos (DESMET et al., 2006; PINHEIRO, GERBI,



2006; PINHEIRO et al., 2012a), o presente trabalho também observou que na sutura este estímulo proporcionado pela luz LED também pode ser verificado.

Quanto ao laser, seu uso por sete dias causou uma atividade que variou de moderada a discreta se intensificando com o passar do tempo e atingindo com 14 dias uma atividade osteoblástica mais intensa. Estes resultados histológicos para o LED e laser são compatíveis com os resultados das médias de picos de HA fosfatada encontradas na análise Raman, já que a presença de osteoblastos ativos está intimamente ligada à formação óssea e consequente mineralização. Estes achados são condizentes com a literatura que diz que a irradiação influencia na proliferação e na diferenciação de osteoblastos, e que uma maior atividade osteoblástica pode representar uma maior capacidade de osteoblastos maduros secretarem HA (WEBER et al., 2006; TORRES et al, 2008).

Dados semelhantes aos resultados da presente pesquisa foram observados em outros estudos associando disjunção à irradiação com laser, onde foi encontrada em sete dias uma atividade de regeneração óssea intensa com efeito estimulante na mineralização e apresentando uma neoformação óssea mais pronunciada que a verificada em grupos não irradiados (SAITO, SHIMIZU, 1997; STUANI, 2008; SILVA, 2012), e, ademais, uma quantidade de tecido ainda mais evidente no 14<sup>o</sup> dia nos grupos irradiados (STUANI, 2008).

A osteogênese, no entanto, resulta de uma mudança no equilíbrio entre osteoclastos e osteoblastos e em várias circunstâncias a neoformação óssea é acompanhada de reabsorção óssea (MA et al., 2008), conforme observado na região da sutura do presente estudo.

Quanto à atividade osteoclástica, esta se apresentou discreta em todos os animais dos grupos submetidos à disjunção isolada, tanto em sete quanto em 14

dias. Contrariamente, outros estudos têm indicado um predomínio de reabsorção óssea nos estágios iniciais da disjunção (MA et al., 2008; STUANI, 2008), podendo esta se manter intensa até mesmo em estágios mais tardios (STUANI, 2008). Nos demais grupos tratados desta pesquisa observou-se sempre uma porcentagem de ausência de atividade osteoclástica. A irradiação com LED nos sete primeiros dias proporcionou um nível de atividade entre discreto e ausente, chegando a moderada em alguns animais aos 14 dias. Esta variação encontrada pode ser relacionada com certo aumento de reabsorção óssea local e isto é compatível com a redução na concentração de HA presente nos grupos de 14 dias observados pela avaliação com a espectroscopia Raman. O uso do LED em feridas ósseas também apresentou evidências de reabsorção óssea com 15 dias, com ausência de reabsorção sendo encontrada somente ao 21<sup>o</sup> dia pós-tratamento (PINHEIRO et al., 2012a).

Com a irradiação laser por sete dias, verificou-se atividade osteoclástica variando, em geral, entre discreta e moderada. Já a irradiação prolongada ao longo dos 14 dias (grupo DISJ+L14d2) resultou em um nível de atividade semelhante ao encontrado no grupo Controle, onde nenhum tratamento foi realizado, com maior porcentagem de animais apresentando ausência de atividade osteoclástica, o que seria considerado o ideal. Salienta-se que estas variações encontradas, quando do uso do laser, acompanharam de forma compatível as pequenas alterações de médias de pico de HA obtidas.

Esta ausência de reabsorção óssea em grupos irradiados com laser foi observada durante o período experimental de 15 a 21 dias em um estudo com feridas ósseas, tendo sido constatada apenas a presença de formação óssea regularmente distribuída (PINHEIRO et al., 2011). Como o objetivo após a disjunção é uma formação óssea na sutura palatina mediana concretizada o mais rápido

possível, o ideal seria manter um nível baixo de reabsorção e maior de neoformação, e desta forma, a ausência de atividade osteoclástica seria um achado preferível.

A diversidade nos parâmetros encontrados na literatura quanto ao uso do laser e a falta de relatos quanto ao uso do LED na sutura influenciam no momento de comparação dos resultados obtidos neste estudo com estudos prévios. Sabe-se que fatores como comprimento de onda, potência ( $W$ ), densidade de potência ( $W/cm^2$ ), modo de operação (contínuo ou pulsado), dosagem ( $J/cm^2$ ), técnica de tratamento e intervalos de tratamento (BOURGUIGNON-FILHO et al., 2005; POSTEN et al., 2005; STUANI, 2008) podem resultar em achados diferentes entre os autores (SANTIAGO, 2007; PINHEIRO et al., 2012c). O número de combinações desses parâmetros é muito grande e provavelmente determina resultados tão discrepantes na literatura (SANTAGO, 2007; SANTIAGO, PIRAM, FUZIY, 2012). Os parâmetros adotados nesta pesquisa foram baseados em resultados promissores obtidos em estudos anteriores do Centro de Biofotônica da FOUFBA (PINHEIRO et al., 2011; 2012; 2012a; 2012b; 2012c).

A espectroscopia Raman, como usada neste estudo para analisar os componentes orgânicos e minerais do osso, é considerada uma técnica padrão ouro (PINHEIRO et al., 2012). Nenhum outro estudo avaliou a concentração de HA fosfatada e colágeno na sutura palatina mediana associada à irradiação com laser ou LED. Ademais, apesar de ter se demonstrado um aprimoramento na cicatrização de feridas ósseas com uso do LED, até o momento não havia relato na literatura da influência desta luz na formação óssea após a disjunção da sutura.

Nesta pesquisa observaram-se resultados positivos para ambos os tipos de luz estudados apontando para uma aceleração da maturação óssea na área, que é

favorável por possivelmente reduzir o período de contenção e, conseqüentemente, reduzir o tempo de tratamento ortodôntico. Desta forma, algumas visitas ao consultório para irradiação na área da sutura quando realizada a disjunção podem conduzir a uma resposta mais rápida sendo benéficas para o paciente.

De acordo com os resultados, pode-se observar que a irradiação LED também pode ser uma alternativa ao uso do laser na aceleração da formação óssea na sutura palatina mediana. Os aparelhos LED têm a vantagem de apresentar menor custo quando comparados aos aparelhos laser (SMITH, 2006; UYSAL et al., 2012), sendo mais acessíveis para uso em consultório ortodôntico. No entanto, apesar de ter sido observado um resultado favorável ao se usar as diferentes fontes de luz, os conhecimentos sobre formação óssea e a interação da luz ainda são limitados. Mais estudos, especialmente usando a luz LED, são necessários para confirmar os achados desta pesquisa e possibilitar uma aplicação clínica segura do procedimento.

---

## 7. Conclusão

---

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, e com base na metodologia utilizada, parece lícito concluir que a fotobiomodulação laser e LED acelerou a formação óssea após a disjunção da sutura palatina mediana em ratos. Ainda diante do proposto no início do trabalho, pode-se afirmar que:

- Nas análises radiográficas, os grupos irradiados com laser e LED em geral apresentaram densidades ósseas na região da sutura palatina mediana semelhantes à do grupo controle.

- Através da espectroscopia Raman foi observada maior deposição de HA fosfatada ( $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$ ) e deposição de colágeno ( $\sim 1454 \text{ cm}^{-1}$ ; proteínas) nos grupos irradiados com laser e LED.

- Histologicamente, com o uso do laser e LED a inflamação mostrou-se variável, houve aumento da produção de colágeno e da atividade osteoblástica e diminuição da atividade osteoclástica.

## Referências

ALAQEEL, S.M.; HINTON, R.J.; OPPERMAN, L.A. Cellular response to force application at craniofacial sutures. **Orthod Craniofacial Res**, v.9, n.3, p.111–122, ago. 2006.

ANGELETTI, P. et al. Effect of low-laser therapy (GaAIIAs) on bone regeneration in midpalatal anterior suture after surgically assisted rapid maxillary expansion. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 109, n.3, p.38-46, Mar. 2010.

ARAT, Z.M. et al. <sup>99m</sup>Techneium-labeled methylene diphosphonate uptake in maxillary bone during and after rapid maxillary expansion. **Angle Orthod**, v. 73, n.5, p.545-549, Oct. 2003.

BAXTER, G.D. Bioenergetics and tissue optics. In: \_\_\_\_\_ **Therapeutic lasers theory and practice**. 3. ed. New York: Churchill Livingstone, 1997. pp. 67-88.

BENFICA, E. et al. Digital subtraction radiography evaluation of the bone repair process of chronic apical periodontitis after root canal treatment. **Int Endo J**, v. 43, n.8, p. 673–680, Aug. 2010.

BOURGUIGNON-FILHO, A.M. et al. Utilização do Laser de Baixa Intensidade no Processo de Cicatrização Tecidual. Revisão da Literatura. **Rev Port Estomatol Cir Maxilofac**, v.46, n.1, p.37-43. 2005.

BOZZO, R.O. et al. Linear density analysis of bone repair in rats using digital direct radiograph. **J Appl Oral Sci**, Bauru, v.12, n.4, p. 317-321, 2004.

BRAUN, S. et al. The biomechanics of rapid maxillary sutural expansion. **Am J Orthod Dentofac Orthop**, v.118, n.3, p. 257-261, Sept. 2000.

BROSH, T. et al. Rapid palatal expansion. Parte 3: strains developed during active and retention phases. **Am J Orthod Dentofac Orthop**, v.114, n.2, p.123-133, Aug. 1998.

CAPELOZZA FILHO, L.; SILVA FILHO, O.G. Expansão rápida de maxila. In: INTERLANDI, S. **Ortodontia – Bases para iniciação**. São Paulo: Artes Médicas, 2002, cap. 10, p. 251-294.

CAPELOZZA FILHO, L.; SILVA FILHO, O.G. Expansão rápida de maxila: considerações gerais e aplicação clínica. Parte I. **Rev Dent Press Ortod Ortop Maxilofac**, v.2, n.3, p.88-102. maio/jun.1997.

CARNEIRO, L.S. et al. In vivo study of pixel grey-measurement in digital subtraction radiography for monitoring caries remineralization. **Dentomaxillofac Radiol**, Houndsmills, v.38, n.2, p. 73-78, Feb. 2009.

CARVALHO, F.B. et al. Evaluation of periapical changes following endodontic therapy: digital subtraction technique compared with computerized morphometric analysis. **Dentomaxillofac Radiol**, Houndsmills, v. 38, p. 438–444. 2009.

CARVALHO, F.B. et al. Assessment of bone healing on tibial fractures treated with wire osteosynthesis associated or not with infrared laser light and biphasic ceramic bone graft (HATCP) and guided bone regeneration (GBR): Raman spectroscopy study. **Proceedings – SPIE**, 7887:7887OT-1-7887OT-6, 2001.

CEPERA, F. et al. Effect of a low-level laser on bone regeneration after rapid maxillary expansion. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v.141, n.4, p.444-50, Apr. 2012.

CEPERA, F. et al. Efeito do laser de baixa intensidade na expansão rápida de maxila. **OrtodontiaSPO**, v. 41, n.3, p. 222-226. 2008.

DAVID, S.M.N. et al. Avaliação e mensuração da sutura palatina mediana por meio da radiografia oclusal total digitalizada em pacientes submetidos à

expansão rápida maxilar. **Rev Dent Press Ortodon Ortop Facial**, Maringá, v.14, n.5, p.62-68, set./out. 2009.

DESMET, K.D. et al. Clinical and Experimental Applications of NIR-LED Photobiomodulation. **Photomed Laser Surg**, v.24, n.2, p.121-128, Apr. 2006

ESPER MALR. **Análise comparativa do efeito da terapia com laser ou LED de baixa potência durante o movimento ortodôntico – estudo clínico**. 2010. 78 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica, Universidade do Vale do Paraíba, Paraíba, 2010.

FRIESEN, L.R. et al. Laser irradiation of bone:II. Healing response following treatment by CO<sub>2</sub> and NdYAG Lasers. **J Periodontol**, v.70, n.1, p.75-83, 1999.

GENOVESE, W.J.; ANGELLETTI, P. Perspectivas das aplicações clínicas dos lasers terapêuticos In: GENOVESE, W.J. **Laser de baixa intensidade – aplicações terapêuticas em odontologia**. São Paulo: Santos, 2007, cap. 8, p 109-111.

GERBI, M.E. et al. Assessment of bone repair associated to the use of organic bone graft and membrane with 830nm. **Photomed Laser Surg**, v. 23, n.4, p.382-388. 2005.

GRABER, T.M.; VANARSDALL, R.L. **Ortodontia – Princípios e Técnicas Atuais**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

GURGEL, J.A; MALMSTROM, M.F.; PINZAN-VERCELINO, C.R.M. Ossification of the midpalatal suture after surgically assisted rapid maxillary expansion. **European Journal of Orthodontics**, v.34, n.1, p. 39–43, Feb. 2012.

HABIB, F.A.L. et al. Effect of Laser Phototherapy on the hyalinization following orthodontic tooth movement in rats. **Photomed Laser Surg**, v.30, n.3, p.179-185, 2012.



HABIB, F.A.L. **Alterações teciduais decorrentes da fotobiomodulação laser no movimento dentário induzido em ratos.** 2008. 95 f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Programa Integrado de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal da Paraíba e Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2008.

HANLON, E.B. et al. Prospects for in vivo Raman spectroscopy. **Phys Med Biol**, v.45, n.2, R1-59, 2000.

HOU, B. et al. The polycystic kidney disease 1 (Pkd1) gene is required for the response of osteochondroprogenitor cells to midpalatal suture expansion in mice. **Bone**, v.44, n.6, p.1121-1133, Jun. 2009.

HOU, B.; FUKAI, N.; OLSEN, B.R. Mechanical force-induced midpalatal suture remodeling in mice. **Bone**, v. 40, p.1483-1493, Feb. 2007.

HUANG, P. et al. In Vitro Observations on the Influence of Copper Peptide Aids for the LED Photoirradiation of Fibroblast Collagen Synthesis. **Photomed Laser Surg**, v. 25, n.3, p.183-190, 2007.

HUBLER, R. et al. Effects of low-level laser therapy on bone formed after distraction osteogenesis. **Lasers Med Sci**, v. 25, n.2, p.213-219, Mar. 2010.

HUNGRIA, V.T.M. Doença óssea em mieloma múltiplo. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v.29, n.1, p.60-66, 2007.

KANEKAWA, M.; SHIMIZU N. Age-related Changes on bone regeneration in midpalatal suture during maxillary expansion in the rat. **Am J Orthod Dentofac Orthop**, v.114, n.6, p. 646-653, Dez. 1998.

KARU, T.I. Photobiological fundamentals of low level laser therapy. **IEEE Journal Quantum Electronics**, v.10, p.1703-17, 1987.

KOBAYASHI, E.T. et al. Force-induced Rapid Changes in Cell Fate at Midpalatal Suture Cartilage of Growing Rats. **J Dent Res**, v.78, n.9, p.1495-1504. 1999.

LEE, K. et al. Effects of Biphosphonate on the remodeling of rat sagittal suture after rapid expansion. **Angle Orthod**, v.71, n.4, p.265-273. 2001.

LOPES, C.B. et al. The effect of the association of near infrared laser therapy, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration on tibial fractures treated with internal rigid fixation: A Raman spectroscopic study. **J Biomed Mater Res A**, v.94, n.4, p.1257- 1263, Sept. 2010.

LOPES, C.B. et al. Infrared laser light reduces loading time of dental implants: A Raman spectroscopic study. **Photomed Laser Surg**, v. 23, n.1, p. 27-31. 2005.

LOPES, C.B. et al. Infrared Laser Photobiomodulation ( $\lambda$ 830 nm) on bone tissue around dental implants: a Raman spectroscopy and scanning electronic microscopy study in rabbits. **Photomed Laser Surg**, v. 25, n.2, p. 96-101. 2007.

LOUZADA, M.J.Q. **Otimização da técnica de densitometria óptica em imagens radiográficas de peças ósseas. Estudo in vitro**. 1994. 213f. Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Elétrica, Campinas, 1994.

MA, J. et al. Up-regulation of multiple proteins and biological processes during maxillary expansion in rats. **BMC Musculoskeletal Disorders** v.9, n. 37, p 1-11, Mar. 2008.

MALMSTRÖM, M.F.V.; GURGEL, J.A. Avaliação da neoformação na sutura palatina mediana por meio de radiografia digitalizada após a expansão assistida cirurgicamente. **Rev Dent Press Ortodon Ortop Facial**, v. 12, n.3, p. 82-93. 2007.

MARINI, I. et al. A photogrammetric technique for the analysis of palatal three-dimensional changes during rapid maxillary expansion. **Eur J Orthod**, v. 29, p. 26-30, Fev. 2007.

MARTINS, M.C.F. et al. Expansão rápida de maxila: análise da densidade radiográfica da sutura palatina mediana e a sua correlação nos estágios de neoformação óssea, por meio de imagem digitalizada. **Rev Dent Press Ortodon Ortop Facial**, v. 14, n.5, p. 170-178. 2009.

MCNAMARA, J.A. Tratamento de Crianças na fase de dentição mista. In: MCNAMARA JA; BRUDON WL. **Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**. 2 ed. Ann Arbor: Needham Press, 2002. cap. 7, p. 97-110.

MEDEIROS, P.J.; MEDEIROS, P.P. Deficiência maxilar transversa. In: \_\_\_\_\_. **Cirurgia Ortognática para o Ortodontista**. São Paulo: Livraria Santos, 2004. cap. 27, 207-214.

MENDEZ, T.M.T.V. et al. Dose and wavelength of laser light have influence on the repair of cutaneous wounds, **J Clin Laser Med Surg**, v.22, n.1, p. 19–25. 2004.

MELO, M.F.B. **Avaliação da densidade óptica da sutura palatina mediana por meio do sistema de radiografia digital por placa fotoativada em pacientes submetidos à disjunção palatina**. 2003. 113 f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

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

MEYER, P.F. et al. Avaliação dos efeitos do LED na cicatrização de feridas cutâneas em ratos Wistar. **Fisioterapia Brasil**, v.11, n.6, p.428-431, nov./dez. 2010.

MOORE, R.N. Principles of Dentofacial Orthopedics. **Semin Orthod**, v.3, n.4, p.212-221. 1997.

MORAIS, N.C.R. et al. Anti-Inflammatory Effect of Low-Level Laser and Light-Emitting Diode in Zymosan-Induced Arthritis. **Photomed Laser Surg**, v.28, n.2, p.227-232, Apr. 2010.

MORRIS, M.D.; MANDAIR, G.S. Raman assessment of bone quality. **Clin Orthop Relat Res**, v.469, n.8, p.2160-2169, Aug. 2011.

NEVES, L.S. et al. A utilização do laser na Ortodontia. **Rev Dent Press Ortodon Ortop Facial**, v.10, n.5, p. 149-156. 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**, v.18, n.2, p. 89-94. 2003.

OLIVEIRA, L.S.A. **Estudo comparativo entre radiografia digitalizada e digital na avaliação de reparo de defeito ósseo crítico com biomateriais**. 2010. 105f. Dissertação (Mestrado Interdisciplinar) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

PASHALIS, E.P.; MENDELSON, R.; BOSKEY A.L. Infrared assessment of bone quality. **Clin Orthop Relat Res**, v.469, p.2170-2178. 2011.

PEREIRA, M.C.M.C. et al. Influence of 670 nm low-level laser therapy on mast cells and vascular response of cutaneous injuries. **J Photochemistry Photobiol B: Biol**, v.98, n.3, p.188–192, Mar. 2010.

PETRICK, S. et al. Bone density of the midpalatal suture 7 months after surgically assisted rapid palatal expansion in adults. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 139, p.S109-16. 2011.

PINHEIRO, A.L.B. et al. The efficacy of the use of IR laser phototherapy associated to biphasic ceramic graft and guided bone regeneration on surgical fractures treated with miniplates: a Raman spectral study on rabbits. **Lasers Med Sci**, v.28, p.513-518, 2013.

PINHEIRO, A.L.B et al. Effects of LED phototherapy on bone defects grafted with MTA, bone morphogenetic proteins and guided bone regeneration: a Raman spectroscopic study. **Lasers Med Sci**, v.27, n.5, p. 903-916, Sept. 2012.

PINHEIRO, A.L.B. et al. Does LED phototherapy influence the repair of bone defects grafted with MTA, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration? A description of the repair process on rodents. **Lasers Med Sci**, v.27, n.5, p.1013-24, Sept. 2012a.

PINHEIRO, A.L.B. et al. The efficacy of the use of IR laser phototherapy associated to biphasic ceramic graft and guided bone regeneration on surgical fractures treated with wire osteosynthesis: a comparative laser fluorescence and Raman spectral study on rabbits. **Lasers Med Sci**, v. 26, July. 2012b. [Epub ahead print]

PINHEIRO, A.L.B. et al. The efficacy of the use of IR laser phototherapy associated to biphasic ceramic graft and guided bone regeneration on surgical fractures treated with miniplates: a Raman spectral study on rabbits. **Lasers Med Sci**, v. 24, Apr. 2012c. [Epub ahead print]

PINHEIRO, A.L.B. et al.. Light microscopic description of the effects of laser phototherapy on bone defects grafted with mineral trioxide aggregate, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration in a rodent model. **J Biomed Mater Res**, v.98A, n.2, p. 212-221.2011.

PINHEIRO, A.L.B., BRUGNERA JÚNIOR, A., ZANIN, F.A.A. **Aplicação do Laser na Odontologia**. 1 ed. São Paulo: Livraria Santos, 2010.

PINHEIRO, A.L.B., et al. Raman spectroscopy validation of DIAGNOdent-assisted fluorescence readings on tibial fractures treated with laser phototherapy, BMPs, guided bone regeneration and miniplates. **Photomed Laser Surg**, v.28, p.89-97, 2010a.

PINHEIRO, A.L.B. et al. Effects of laser phototherapy on bone defects grafted with mineral trioxide aggregate, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration: A Raman spectroscopic study. **J Biomed Mater Res A**, v.95, n.4, p.1041-1047, 2010b.

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

PIRES-SANTOS, G.M. et al. Efficacy of the Photodynamic Antimicrobial Therapy (PACT) with the use of Methylene Blue Associated with the  $\lambda 660\text{nm}$  laser in Leishmania (*Leishmania*) amazonensis: In Vitro Study. **Proc. of SPIE**, v. 8211, 2012.

POSTEN, W. et al. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. **Dermatol Surg**, v.31, n.3, p.334-340. 2005.

PROFFIT, W.R; FIELDS, H.W. **Ortodontia Contemporânea**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

PRICE, D.P. Developmental Anatomy of Craniofacial Sutures. In: \_\_\_\_\_. **Craniofacial Sutures – Development, Disease and Treatment**. 1 ed. Basel: Karger, 2008. v.12, p.1-21.

PRETEL H, LIZARELLI R.F.; RAMALHO L.T. Effect of low-level laser therapy on bone repair: histological study in rats. **Lasers Surg Med**, v.39, n.10,p.788-96. 2007.

PYO, S.J. et al. Low-level laser therapy induces the expressions of BMP-2, osteocalcin, and TGF- $\beta$ 1 in hypoxic-cultured human osteoblasts. **Lasers in Med**, v.3, 2012 [Epub ahead print].

RIBEIRO, M.F.; SATHAIAH, S.; PACHECO, M.T. Diagnóstico não invasivo de tecidos dentários através da utilização da espectroscopia Raman. In: Memórias II Congresso Latinoamericano de Ingeniería Biomédica. 2001. Cuba. Sociedad Cubana de Bioingeniería. Habana, Cuba. 2001.

ROCHA, R. et al. Use of near-infrared Raman spectroscopy for identification of atherosclerotic plaques in the carotid artery. **Photomed Laser Surg**, v.25, n.6, p.482-486, 2007a.

ROCHA, R. et al. Identification of calcifications in cardiac valves by near infrared Raman spectroscopy. **Photomed Laser Surg**, v.25, n.4, p.287-290, 2007b.

ROSA, C.B. et al. Influence of Laser and LED irradiation on mast cells of cutaneous wounds of rats with iron deficiency anemia. **Proc. of SPIE**, v.7887, 2011.

SAITO, S.; SHIMIZU, N. Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat. **Am J Orthod Dentofac Orthop**, v.111, n.5, p.525-532, May. 1997.

SAMPAIO, S.C.P. et al. Effect of laser and LED phototherapies on the healing of cutaneous wound on healthy and iron-deficient Wistar rats and their impact on fibroblastic activity during wound healing. **Lasers in Med**, v.20. 2012. [Epub ahead of print]

SANTIAGO, V.C.C.E; PIRAM, A.; FUZIY, A. Effect of soft laser in bone repair after expansion of the midpalatal suture in dogs. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v.142, p. 615-24. 2012.

SANTIAGO, V.C.C.E. **Avaliação do efeito do soft laser no processo de reparo ósseo pós-disjunção da sutura palatina mediana em cães**. 2007. 191f. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica, área de concentração em Ortodontia) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Marília, Marília, 2007.

SARI, Z. et al. Rapid Maxillary Expansion. Is it better in the mixed or in the permanent dentition? **Angle Orthod**, v.73, n.6, p. 654-661, Apr. 2003.

SAWADA, M.; SHIMIZU, S. Stimulation of bone formation in the expanding mid-palatal suture by transforming growth factor-beta 1 in the rat. **Eur J Orthod**, v.18, n.2, p.169-179. 1996.

SEEGER, K. **Semiconductor Physics – An introduction**. 6 ed. Austria: Springer, 1997.

SILVA, A.P.R.B. et al. Effect of low-level laser therapy after rapid maxillary expansion on proliferation and differentiation of osteoblastic cells. **Lasers Med Sci**, v.27, n.4, p.777–783. 2012.

SILVA, J.P. et al. Laser therapy in the tissue repair process: a literature review. **Photomed Laser Surg**, v.28, n.1, p.17-22, fev. 2010.

SILVA, A.P.R.B. **Estudo in vitro dos efeitos do laser de baixa potência nas células osteoblásticas derivadas da sutura palatina de ratos após a expansão rápida da maxila**. 2009. 65f. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SILVA FILHO, O.G. et al. Ossificação da sutura palatina mediana após o procedimento de expansão rápida de maxila: estudo radiográfico. **R Dental Press Ortodon Ortop Facial**, v.13, n.2, p.124-131. 2008.



SILVEIRA JR., et al. Correlation between near-infrared Raman Spectroscopy and the histopathological analysis of atherosclerosis in human coronary arteries. **Lasers Med Sci**, v.30, n.4, p.290–297. 2002.

SIMÕES, F.X.P.C. **Avaliação da regeneração óssea, sob a influência do laser de baixa intensidade, na região da sutura palatina de ratos após expansão da maxila**. 2008. 73 f. Tese (Doutorado em Ciências Odontológicas) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SMITH, K.C. Laser (and LED) Therapy Is Phototherapy. **Photomed Laser Surg**, v.24, p.78-80. 2006.

SOARES, E.S. **Efeitos da laserterapia de 660nm na cicatrização de feridas cirúrgicas: estudo histológico e imunocitoquímico**. 2006. 128f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Paraíba, 2006.

SOUTHARD, T.E. et al. Geometric and densitometric standardization of intraoral radiography through use of a modified XCP system. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v.87, n.2, p.253-257. 1999.

SOUZA, A.P.C. et al Effect of LED Phototherapy (170020 nm) on TGF-b Expression During Wound Healing: An Immunohistochemical Study in a Rodent Model. **Photomed Laser Surg**, v.29, n.9, p.605-6011. 2011.

SOUZA, A.P.C. **Efeito das radiações laser e LED associadas ou não no reparo de feridas cutâneas em dorso de ratos: Estudo histológico**. 2008. 142 f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Programa Integrado de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal da Paraíba e Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2008.

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

STEIN, E. et al. Initial effects of low-level laser therapy on growth and differentiation of human osteoblastic-like cells. **Medium Eur Journal Med**, v.120, n.3-4, p.112-117. 2008.

STUANI, A.S. **Avaliação do laser de baixa potência (GaAIs) na remodelação óssea, após a disjunção palatina mediana em ratos Wistar**. 2008. 167f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

TACHIAHRA R.; FARINELLI W.A.; ANDERSON R. Low intensity light-induced vasodilation in vivo. **Lasers Surg Med**, v.30, p.11, 2002. Suplemento.

TAKAHASHI, I. et al. Effects of expansive force on the differentiation of midpalatal suture cartilage in rats. **Bone**, v.18, n.4, p.341-348, abr. 1996.

TIMLIN, J.A.; CARDEN, A.; MORRIS, M.D. Chemical microstructure of cortical bone probed by Raman transects. **Appl Spectrosc**, v.53, n.11, p.1429-1435, 1999.

TORRES, C.S.; SANTOS, J.N.; MONTEIRO, J.S.C. et al. Does the use of laser photobiomodulation, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration improve the outcome of autologous bone grafts? An in vivo study in a rodent model. **Photomed Laser Surg**, v.26, n.4, p.371-377. 2018.

TRÉ, F.D. et al. Development of a novel digital subtraction technique for detecting subtle changes in jawbone density. **Clin Oral Investig**, v.10, n.3, p.235-248. 2006.

UYSAL, T. et al Resonance frequency analysis of orthodontic miniscrews subjected to light-emitting diode photobiomodulation therapy. **Eur J Orthod**, v. 34, n.1, p.44–5. 2012.

VARDIMON, A.D. et al. Rapid palatal expansion: part 1. Mineralization pattern of the midpalatal suture in cats. **Am J Orthod**, v.113, n.4, p.371-378, abr. 1998.

WEBER, J.B.B.; PINHEIRO, A.L.B.; OLIVEIRA, M.G. et al. Laser therapy improves healing of bone defects submitted to autogenous bone graft. **Photomed Laser Surg**, v.24, n.1, p.38-44. 2016.

WERTZ, R.A. Midpalatal suture opening. In: SALZMANN JA. **Orthodontics in Daily Practice**. Philadelphia: JB Lippincott, 1974. cap. 33, p. 542-554.

XAVIER, M. et al. Anti-Inflammatory Effects of Low-Level Light Emitting Diode Therapy on Achilles Tendinitis in Rats. **Lasers Surg Med**, v.42, n.6, p.553–558. 2010.

XU, M. et al. Low-intensity pulsed laser irradiation affects RANKL and OPG mRNA expression in rat calvarial cells. **Photomed Laser Surg**, v.27, n.2, p. 309-315, abr. 2009.

ZAHROWSKI, J.J.; TURLEY, P.K. Force magnitude effects upon osteoprogenitor cells during premaxillary expansion in rats. **Angle Orthod**, v.62, n.3, p.197-202, ago. 1992.

## ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comissão de Ética na Experimentação Animal

UFBA - Faculdade de Odontologia - Av. Araújo Pinho, 62 - Camela

CEP: 40.140-110 - Salvador - BA - Tel: (71) 3283-8966

Home-page: www.ufba.br

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa nº 03/10 "EFEITO DA FOTOBIOMODULAÇÃO LASER NA FORMAÇÃO ÓSSEA DA SUTURA PALATINA MEDIANA APÓS EXPANSÃO RÁPIDA DE MAXILA COM OU SEM O USO DE CONTENÇÃO" de autoria de ANTONIO LUIZ BARBOSA PINHEIRO, foi analisado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal e considerado **APPROVADO** em reunião ordinária realizada nesta data.

Salvador, 25 de maio de 2010

*Prof.ª Maria José P. Ramalho*  
 Vice-Presidente da CE EA