

JOUBER MATEUS DOS SANTOS ACIOLE

**Avaliação da fotobiomodulação Laser/LED em defeito ósseo no fêmur de ratas osteoporóticas: estudo histológico, histomorfométrico e por espectroscopia Raman em modelo animal.**



**PROGRAMA INTEGRADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
Área de Concentração: Laser em Odontologia**

**Salvador  
2014**

**JOUBER MATEUS DOS SANTOS ACIOLE**

**Avaliação da Fotobiomodulação Laser/LED em defeito ósseo no fêmur de ratas osteoporóticas: estudo histológico, histomorfométrico e por espectroscopia Raman em modelo animal.**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba e Universidade Federal da Bahia, em cumprimento às exigências para obtenção de título de Doutor em Odontologia.**

**Área de concentração: Laser em Odontologia  
Linha de pesquisa: Biomodulação do reparo ósseo**

**Orientadores: Prof. Antônio Luiz Barbosa Pinheiro, PhD  
Prof. Dr. Jean Nunes dos Santos**

**SALVADOR  
2014**

**JOUBER MATEUS DOS SANTOS ACIOLE**

**Avaliação da Fotobiomodulação Laser/LED em defeito ósseo no fêmur de ratas osteoporóticas: estudo histológico, histomorfométrico e por espectroscopia Raman em modelo animal.**

**Salvador, 11 de fevereiro de 2014.**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Marina Oliveira Ribas (PUCPR)

---

Prof. Dr. Landulfo Silveira Junior (UNICASTELO)

---

Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy (UEPB)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Aparecida Maria Cordeiro Marques (UFBA)

---

Prof. Dr. Antonio Luiz Barbosa Pinheiro (UFBA)

## DEDICATÓRIA

Dedico a **DEUS** e a **Nossa Senhora Aparecida**, por terem me guiado, protegido e socorrido em todas minhas necessidades durante esse longo caminho que percorri.

Aos meus exemplos de vida, meus pais, **Gilberto Aciole**, **Maria Umbelina**, por todo amor e dedicação e a minha vovó **Ernestina**, que até hoje se faz presente em minha vida, sei que ao lado de Deus está me protegendo e olhando por mim, livrando-me de todo mal. Obrigado por tudo que a senhora fez por mim. Amo vocês.

Ao meu irmão **Gilberth Tadeu**, escolhamos o mesmo caminho a seguir e por isso venceremos juntos abençoados por Deus. Obrigado Companheiro.

A minha namorada, **Natália Chagas**, agradeço por todo carinho e companheirismo que vêm me dando.

Ao professor, orientador e amigo Dr. **Antônio Luiz Barbosa Pinheiro**, por toda paciência e tranquilidade ao transmitir seus ensinamentos e pela confiança em mim depositada. Obrigado

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a **DEUS** por tudo que ele fez e fará por mim. Obrigado meu grande "**PAI DO CÉU**".

Ao Prof. **Jean Nunes dos Santos**, sempre se dispondo a me ajudar quando precisei.

Aos Professores **Aparecida Marques, Cristina Cangussu e Landulfo Silveira**, pela amizade e conhecimentos repassados.

A todos os professores do curso, que colaboraram na construção dos conhecimentos necessários para a concretização deste trabalho.

Aos colegas do doutorado: **Artur Felipe, Cristiane Becker, Fabíola de Carvalho, Isabele DeCastro, João Reis, Luiz Guilherme, Susana Sampaio**, pelos momentos de descontração, união e aprendizado ao longo destes anos.

Aos estagiários do Centro de Laser da FOUFBA, pela grande disponibilidade e ajuda durante a produção desse trabalho.

Aos funcionários da FOUFBA pelo apoio e colaboração, em especial, **Danielle Araújo, Edilson Amancio e Sueli Paixão**, por serem pessoas que demonstram muita simpatia e profissionalismo.

A todos os pacientes, que nos ajudaram nessa longa jornada, possibilitando o aprendizado.

Ao **CNPq** pela colaboração científica e financeira em busca do conhecimento científico e tecnológico, apoiando às atividades acadêmicas.

A todos aqueles, que de alguma forma contribuíram para concretizar este trabalho. Meu muito obrigado.

---

## SUMÁRIO

---

LISTA DE QUADROS E TABELAS	
LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS	
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	15
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1 TECIDO ÓSSEO	18
2.2 REPARO ÓSSEO	21
2.3 OSTEOPOROSE E DEFICIÊNCIA DE ESTRÓGENO	24
2.4 FOTOTERAPIAS	26
2.4.1 FOTOBIMODULAÇÃO LASER	26
2.4.2 FOTOBIMODULAÇÃO LED	28
2.5 ESPECTROSCOPIA RAMAN	30
3. PROPOSIÇÃO	34
3.1.OBJETIVO GERAL	34
3.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4. MATERIAS E MÉTODOS	35
4.1 RESPALDO ÉTICO DA PESQUISA	35
4.2 DELINEAMENTO	35
4.3 AMOSTRA	35
4.4 DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS	36
4.5 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	38
4.5.1 CIRURGIA DE OVARIECTOMIA	38
4.5.2 CRIAÇÃO DO DEFEITO ÓSSEO	39
4.6 PROTOCOLO DE FOTOTERAPIA	42
4.6.1 LASER	42
4.6.2 LED	43
4.7 MORTE DO ANIMAL E OBTENÇÃO DA AMOSTRA	44
4.8 EXAME ESPECTROSCÓPICO	46
4.9 EXAME HISTOLÓGICO	49
4.10 EXAME HISTOMORFOMÉTRICO	50
5. RESULTADOS	51
5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA	51
5.2 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	57
5.3 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA RAMAN	61
6. DISCUSSÃO	71
7. CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS	80
ANEXO	97

---

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

---

Quadro 01	Distribuição dos grupos de estudo (ACIOLE, 2014).	37
Quadro 02	Critérios utilizados para análise de microscopia de luz (UFBA-UFPB, 2014).	49
Tabela 01	Valores médios ( $\pm$ desvio padrão) das intensidades dos picos Raman estudados, aos 15 dias (ACIOLE, 2014).	67
Tabela 02	Valores médios ( $\pm$ desvio padrão) das intensidades dos picos Raman estudados, aos 30 dias (ACIOLE, 2014).	67
Tabela 03	Resultados do teste ANOVA para cada pico nos períodos observacionais de 15 e 30 dias (ACIOLE, 2014).	68
Tabela 04	Análise estatística entre os grupos, dois a dois, no período observacional de 15 dias (ACIOLE, 2014).	69
Tabela 05	Análise estatística entre os grupos, dois a dois, no período observacional de 30 dias (ACIOLE, 2014).	69
Tabela 06	Resumo da análise estatística (Teste t de Student) dos picos Raman dentro de cada grupo, em relação ao tempo (15 e 30 dias) (ACIOLE, 2014).	70

---

## LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

---

Figura 01	Fotomontagem representativa: A – Tricotomia e assepsia da região abdominal lateral para confecção da incisão longitudinal abaixo da última costela; B – Ovário identificado e exposto; C – Pinçamento para posterior ligação da parte superior da tropa com fio reabsorvível; D – Excisão ovariana juntamente com a gordura circundante; E – Sutura Interna com fio reabsorvível; F- Sutura externa final (ACIOLE, 2014).	39
Figura 02	Defeito ósseo confeccionado, preenchido pelo coágulo sanguíneo (ACIOLE, 2014).	41
Figura 03	Aparelho utilizado no experimento para realização da fototerapia laser (Twinflex Evolution <sup>®</sup> , MMOptics, São Carlos, SP, Brasil) (ACIOLE, 2014).	44
Figura 04	Aparelho utilizado no experimento para realização da fototerapia LED (FisioLED <sup>®</sup> , MMOptics, São Carlos, SP, Brasil) (ACIOLE, 2014).	44
Figura 05	Fotomicrografia do espécime do grupo Osteo mostrando osso neoformado espesso com osteócitos e linhas basofílicas e poucos canais medulares. Notar a presença de grandes espaços exibindo protuberâncias com poucos osteócitos no interior (HE) (ACIOLE, 2014).	54
Figura 06	Fotomicrografia do espécime do grupo Osteo mostrando, a presença moderada de colágeno (azul) no interior das trabéculas osseas neoformadas (TM) (ACIOLE, 2014).	54
Figura 07	Fotomicrografia do espécime do grupo Coágulo mostrando, trabéculas ósseas neoformadas, irregulares apresentando numerosos osteócitos também irregulares no interior em meio a tecido estromal ora frouxo ora fibroso. Notar a presença de células gigantes multicelulares em atividade (15 dias – HE) (ACIOLE, 2014).	54
Figura 08	Fotomicrografia do espécime do grupo Coágulo mostrando, a presença discreta de colágeno (azul) no interior das trabéculas osseas neoformadas (15 dias – TM) (ACIOLE, 2014).	54
Figura 09	Fotomicrografia do espécime do grupo Coágulo mostrando, a esquerda, osso remanescente do leito cirúrgico, do qual parte osso neoformado sob a forma de	54



trabéculas espessas e delgadas com osteócitos no interior e linhas basofílicas. Notar espaços medulares e presença de inflamação crônica. (30 dias – HE) (ACIOLE, 2014).

- |           |  |    |
|-----------|--|----|
| Figura 10 | Fotomicrografia do espécime do grupo Coágulo mostrando, discreta presença de fibras colagénas (azul) no tecido ósseo neoformado (30 dias – TM) (ACIOLE, 2014).   | 54 |
| Figura 11 | Fotomicrografia do espécime do grupo LED mostrando, tecido ósseo neoformado oriundo do remanescente ósseo do leito cirúrgico, caracterizado por numerosas trabéculas ósseas neoformadas com osteócitos por vezes irregulares e osteoblastos na superfície (15 dias – HE) (ACIOLE, 2014).   | 55 |
| Figura 12 | Fotomicrografia do espécime do grupo LED mostrando a similaridade da extensa quantidade de colágeno nas trabéculas ósseas neoformadas e osso remanescente do leito cirúrgico (15 dias – TM) (ACIOLE, 2014).  | 55 |
| Figura 13 | Fotomicrografia do espécime do grupo LED mostrando trabéculas ósseas neoformadas interconectantes com presença de poucos osteócitos no interior, mas com intensa presença de osteoblastos em superfície. Hávia uma discreta inflamação crônica. No canto inferior direito, observou-se foco cartilagenoso (30 dias – HE) (ACIOLE, 2014). | 55 |
| Figura 14 | Fotomicrografia do espécime do grupo LED mostrando presença intensa de colágeno (azul) no interior de numerosas trabéculas ósseas interconectantes (30 dias – TM) (ACIOLE, 2014).  | 55 |
| Figura 15 | Fotomicrografia do espécime do grupo Laser mostrando tecido ósseo neoformado caracterizado por trabéculas ósseas espessas com osteócitos regulares ou não no interior e osteoblastos em superfície. Notar área focal de reabsorção óssea e presença de inflamação crônica intensa (15 dias – HE) (ACIOLE, 2014).                         | 56 |
| Figura 16 | Fotomicrografia do espécime do grupo Laser mostrando a presença intensa de colágeno (azul) no interior das trabéculas ósseas neoformadas (15 dias – TM) (ACIOLE, 2014).  | 56 |
| Figura 17 | Fotomicrografia do espécime do grupo Laser mostrando   | 56 |

	superfície do leito cirúrgico completamente preenchida por osso neoformado não espesso, do qual partem trabéculas ósseas com osteócitos no interior e linhas basofílicas paralelas entre si (30 dias – HE) (ACIOLE, 2014).	
Figura 18	Fotomicrografia do espécime do grupo Laser mostrando uma quantidade moderada de colágeno (azul) no interior das trabéculas ósseas e na superfície óssea (30 dias – TM) (ACIOLE, 2014).	56
Gráfico 01	Resultado do exame histomorfométrico demonstrando os percentuais de inflamação crônica de todos os grupos experimentais. (ACIOLE, 2014).	57
Gráfico 02	Resultado do exame histomorfométrico demonstrando os percentuais de deposição de colágeno em todos os grupos experimentais. (ACIOLE, 2014).	58
Gráfico 03	Resultado do exame histomorfométrico demonstrando os percentuais de deposição de cartilagem em todos os grupos experimentais. (ACIOLE, 2014).	59
Gráfico 04	Resultado do exame histomorfométrico demonstrando o percentual de reabsorção óssea de todos os grupos experimentais (ACIOLE, 2014).	50
Gráfico 05	Resultado do exame histomorfométrico demonstrando os percentuais de neoformação óssea de todos os grupos experimentais (ACIOLE, 2014).	61
Figura 19	Espectros Raman do grupo Basal e Osteo não tratados, onde se observam uma menor intensidade do pico de $\sim 960\text{cm}^{-1}$ para o grupo Osteo. (ACIOLE, 2014).	62
Figura 20	Intensidades médias dos picos $\sim 960\text{cm}^{-1}$ , $\sim 1070\text{cm}^{-1}$ e $\sim 1454\text{cm}^{-1}$ dos grupos Basal e Osteo (ACIOLE, 2014).	62
Figura 21	Picos Raman de todos os grupos, aos 15 dias. Os espectros foram “deslocados” de acordo com o pico de $\sim 960\text{cm}^{-1}$ (ACIOLE, 2014)	63
Figura 22	Picos Raman de todos os grupos, aos 30 dias. Os espectros foram “deslocados” de acordo com o pico de $\sim 960\text{cm}^{-1}$ (ACIOLE, 2014).	63
Figura 23	Intensidades médias de todos os grupos para pico Raman $\sim 960\text{cm}^{-1}$ , nos períodos observacionais de 15 e 30 dias	65

(ACIOLE, 2014).

- Figura 24 Intensidades médias de todos os grupos para o pico Raman de  $\sim 1070 \text{ cm}^{-1}$ , nos períodos observacionais 15 e 30 dias (ACIOLE, 2014). 65
- Figura 25 Intensidades médias de todos os grupos para o pico Raman  $\sim 1454 \text{ cm}^{-1}$ , nos períodos observacionais ds 15 e 30 dias (ACIOLE, 2014). 66

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AsGaAl	Arseneto de Gálio e alumínio
ATP	Adenosina-trifosfato
BMPs	Proteínas morfogenéticas ósseas
Ca	Cálcio
CEEA	Comissão de Ética na Experimentação Animal
Cm	Centímetros
ER-IVP	Espectroscopia Raman no infravermelho próximo
DNA	Deoxyribonucleic acid – Ácido desoxirribonucléico
FBML	Fotobiomodulação Laser
FOUFBA	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia
FTL-IVP	Fototerapia laser na faixa do infravermelho próximo
G	Gramas
HÁ	Hidroxiapatita de cálcio
HE	Hematoxilina-eosina
J	Joules
Laser	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
LED	<i>Light Emitting Diode</i>
ml	Mililitros
Mm	Milímetros
Mw	Miliwatts
N	Newtons
N	Negativo
Nm	Nanômetros
OVX	Ovariectomia
Pot	Potência
P	Positivo
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i> – Fator de crescimento derivado de plaquetas
S	Segundos
SAEF	<i>Spatial average energy fluence</i>
T	Tempo
TM	Tricômico de Masson
TGF- $\beta$	<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
W	Watts
$\lambda$	Comprimento de onda
$\mu\text{m}$	Micrometro
$\Phi$	Spot

---

## RESUMO

---

A fotobiomodulação Laser/LED têm demonstrado resultados positivos na cicatrização de tecido ósseo, aumentando o aporte sanguíneo na área lesionada. O objetivo deste estudo foi de avaliar por meio de análise histológica, histomorfométrica e espectroscopia Raman, o efeito da fototerapia, laser ou LED, no processo de reparo de defeitos ósseos em fêmur de ratas osteoporóticas. Utilizaram-se 40 ratas Wistar igualmente divididas em 5 grupos. Com exceção do grupo basal normal, todos os grupos sofreram indução a osteoporose, através da ovariectomia (OVX). Após a anestesia geral, foi criado um defeito ósseo de 2 mm de diâmetro no fêmur direito de todos os animais com broca de titânio. No Grupo Osteo (osteoporótico): foram sacrificados 60 dias após a OVX; Grupo Basal normal: não houve OVX nem confecção de defeito ósseo, foram sacrificados juntamente com o grupo Osteo; Grupo Coágulo: 60 dias pós OVX, foi criado o defeito ósseo e submetidos à simulação de irradiação; Grupo LED: 60 dias pós OVX, foi criado o defeito ósseo sendo submetidos à irradiação com LED ( $\lambda = 850 \pm 10$  nm, P = 150 mW, CW, 20,4 J/cm<sup>2</sup> por sessão, 163,2 J/cm<sup>2</sup> por tratamento); Grupo Laser: 60 dias pós OVX, foi criado o defeito ósseo sendo submetidos à irradiação com laser ( $\lambda = 780$  nm, P = 70 mW, CW, 20,4 J/cm<sup>2</sup> por sessão, 163,2 J/cm<sup>2</sup> por tratamento). Os protocolos de irradiação foram executados imediatamente após a cirurgia, repetindo as sessões a cada 48 horas durante 15 dias, totalizando 08 irradiações. A morte dos animais ocorreu após 15 e 30 dias. As amostras foram divididas em duas partes, uma foi analisada por espectroscopia Raman, para avaliar o grau de mineralização óssea através das intensidades dos picos de Raman do conteúdo inorgânico (~960, ~1070 cm<sup>-1</sup>) e orgânico (~1454 cm<sup>-1</sup>) do tecido ósseo. A outra metade foi processada e corada com Hematoxilina-eosina (HE) e Tricômico de Masson (TM), sendo avaliada semi-quantitativamente através de microscopia de luz e comparado histomorfometricamente entre os grupos utilizando-se o teste exato de Fischer. Histologicamente e histomorfometricamente, os resultados indicaram que os grupos Irrradiados encontravam-se em estágio mais avançado de reparo. Espectroscopicamente, as fototerapias, laser e LED, aumentaram a deposição de HA e, conseqüentemente, a mineralização do osso neoformado. Concluiu-se que a fotobiomodulação Laser ou LED foram eficazes na melhora no processo de reparo ósseo de defeitos ósseos confeccionados em fêmur de ratas osteoporóticas.

**Palavras-chave:** Osteoporose; Reparo ósseo, Fototerapia Laser, Diodo emissor de luz.

---

## ABSTRACT

---

The photobiomodulation Laser / LED have shown positive results in the healing of bone tissue, increasing the blood supply to the injured area . The aim of this study was to evaluate through histological analysis, histomorphometric and Raman spectroscopy, the effect of phototherapy, laser or LED in the repair of bone defects in the femur of osteoporotic rats process. We used 40 Wistar rats were equally divided into 5 groups. With the exception of the normal basal group, all groups underwent osteoporosis induced by ovariectomy (OVX). After general anesthesia, a bone defect of 2 mm in diameter was created in the right femur of all animals with drill titanium. In Osteo Group ( osteoporotic ) were sacrificed 60 days after OVX ; Normal Basal Group : OVX or no preparation of the bone defect, were killed along with the Osteo group; Clot Group : 60 days after OVX , the bone defect was created and subjected to simulated irradiation; LED group : 60 days after OVX , bone defect being subjected to irradiation with LED (  $\lambda = 850 \pm 10$  nm , P = 150 mW , CW , 20.4 J/cm<sup>2</sup> per session , 163 was created 2 J/cm<sup>2</sup> per treatment) ; laser group : 60 days after OVX , the bone defect was created and submitted to irradiation with laser (  $\lambda = 780$  nm , E = 70 mW CW , 20.4 J/cm<sup>2</sup> per session , 163.2 J/cm<sup>2</sup> per treatment) . The irradiation protocols were implemented immediately after surgery, repeat sessions every 48 hours for 15 days, totaling 08 radiations. The death of the animals occurred after 15 and 30 days. The samples were divided into two parts, one was analyzed by Raman spectroscopy, to assess the degree of bone mineralization through the Raman peak intensities of the inorganic content (~ 960, ~ 1070 cm<sup>-1</sup>) and organic (~ 1454 cm<sup>-1</sup>) bone tissue. The other half was processed and stained with hematoxylin - eosin (HE) and Masson trichrome (TM), semi - quantitatively being evaluated by light microscopy and histomorphometric compared between groups using the Fisher exact test. Histological and histomorphometric results indicated that irradiated groups were in more advanced stages of repair. Spectroscopically the phototherapy, laser and LED, increased deposition of HA and therefore the mineralization of new bone. It was concluded that the laser or LED photobiomodulation were effective in improving bone repair of bone defects made in the femur of osteoporotic rats process.

Keywords: Osteoporosis, bone repair, Laser Phototherapy, Light emitting diode.

---

## 1 – INTRODUÇÃO

---

O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo altamente organizado que apresenta uma matriz orgânica intercelular mineralizada, células e líquido intersticial, sendo que a matriz mineralizada está em constante remodelação, possibilitando ao tecido regenerar-se após injúrias, patologias e transplantes. Isso é possível decorrente da atividade integrada dos osteoblastos, para produção de tecido neoformado e dos osteoclastos para destruição do tecido, ambos os eventos essenciais ao transcorrer do processo de crescimento ósseo normal, ou posteriormente a uma lesão. (LOPES et. al, 2005; PINHEIRO, 2006, ROBLING et al., 2006; DIMITRIOU et al., 2011)

Quando há um aumento na reabsorção em relação à deposição óssea causando um desequilíbrio, chamamos de Osteopenia, entretanto se a redução da massa óssea for suficiente para comprometer a função normal, denomina-se a patologia de osteoporose, ocasionada por um distúrbio osteometabólico, que pode ser de origem multifatorial, caracterizando-se pela diminuição de densidade mineral óssea e deteriorando de sua microarquitetura, com consequente aumento da fragilidade e susceptibilidade à fraturas. (MARTINI, 1998; SZEJNFELD, 2003; LELOVAS et al., 2008; MCNAMARA, 2010; MARCU et al., 2011)

A participação dos hormônios sobre os mecanismos bioquímicos no controle e ajuste da remodelação óssea já foi descrita em trabalhos anteriores. (RICKARD et al., 1999; NAKAMURA et al., 2007). A deficiência de estrógeno no organismo, observada frequentemente nas mulheres pós-menopausa,

promove um desequilíbrio entre os eventos envolvidos na remodelação do tecido ósseo (NAKAMURA et al., 2007).

Com o aumento da expectativa de vida, a ocorrência de fraturas osteoporóticas tornou-se mais prevalente na população mundial. Estima-se que para os próximos anos, 200 milhões de pessoas em todo o mundo sejam atingidas pela osteoporose, a mais importante doença músculo-esquelética, não-artrítica, que afeta não somente os idosos, mas também as mulheres de meia-idade, aumentando sensivelmente a morbimortalidade e a perda funcional do indivíduo, gerando custos sociais e econômicos. Exigindo, portanto, tratamentos que possam auxiliar na melhora do processo de remodelação e reparação ósseas (AMADEI et al., 2006; PINHEIRO, EIS, 2010; GIRO et al., 2011).

O modelo animal de rata ovariectomizada é comumente adotado para induzir a osteoporose pós-menopausa (KODAMA et al., 2004). Devido ao procedimento de ovariectomia, remoção dos ovários, ocorre deficiência de estrógeno no organismo do animal e conseqüente desequilíbrio no processo de remodelação óssea (KODAMA et al., 2004; LELOVAS et al. 2008; GIRO et al., 2011). Uma semana após a ovariectomia, os níveis de hormônios ovarianos já são indetectáveis no sangue (CHAKRABORTY e GORE, 2004).

A fototerapia Laser e LED estão sendo utilizadas em vários tipos de defeitos ósseos, demonstrando que a utilização de comprimentos de onda no infravermelho próximo são as mais adequadas para a reparação óssea, devido à sua maior penetração nos tecidos quando comparadas com os comprimentos de onda na faixa da luz visível (LOPES *et al.*, 2007; PINHEIRO *et al.*, 2012a,b,



2013). Apesar de existir um crescente uso da fototerapia Laser e LED em vários estudos demonstrando resultados positivos (PINHEIRO *et al.*, 2009, 2010;, 2012a,b) ainda são escassos os relatos sobre a associação de fototerapias e osteoporose, não existindo até o momento na literatura estudos que avaliem o efeito da fototerapia Laser e LED em defeito ósseo em ratas osteoporóticas.

Técnicas vibracionais, tais como espectroscopia Raman no infravermelho próximo, trazem informações sobre as ligações químicas entre moléculas, de maneira rápida e não destrutiva, sendo utilizadas a fim de fornecer informações sobre o estado metabólico do tecido ósseo neoformado. O teor de minerais e composição da matriz óssea fornecerão indicações do sucesso ou falha do tratamento (PINHEIRO *et al.*, 2009, 2010;, 2012a,b), através da identificação de alterações moleculares desses tecidos biológicos (KAVUKCUOGLU; PATTERSON-BUCKENDAHL; MANN, 2009).

Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo analisar histologicamente, histomorfometricamente e por espectroscopia Raman, o efeito da utilização da fototerapia Laser ( $\lambda 780\text{nm}$ ) e LED ( $\lambda 850 \pm 10\text{nm}$ ) nos defeitos ósseos realizados em fêmur de ratas Wistar *albinus* osteoporóticas.

---

## 2- FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

---

### 2.1- TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo e seus elementos esqueléticos apresentam importantes funções no organismo. Suporta estruturalmente todo o corpo, dando proteção para órgãos e tecidos moles, serve de depósito de minerais e lipídios, estocando cálcio, fósforo e íons inorgânicos que contribuem para a osmolaridade dos fluidos corporais. Ao armazenar lipídeos estoca energia nas áreas da medula óssea amarela, produz células sanguíneas, as células vermelhas e brancas do sangue, bem como outros elementos sanguíneos que são produzidos na medula óssea vermelha, preenchendo a cavidade interna de muitos ossos. Também age no sistema de movimentação corporal como alavancas que podem alterar a magnitude e direção das forças geradas durante as contrações musculares, transformando-as em movimentos precisos e controlados. (MARTINI, 1998; KATCHBURIAN; ARANA,1999; KESSEL, 2001).

É um tecido conjuntivo especializado, onde a matriz orgânica contribui com 30% do peso do osso e tem como principal componente a molécula de colágeno tipo I (95%), quando associada aos cristais de hidroxiapatita (componente mineral mais importante do osso – 65% do peso do osso) confere características ósseas de resistência, dureza e elasticidade (SOUSA, 2009; DOBLARÉ *et al.*, 2004).

Apesar da ossificação se completar ao 24<sup>o</sup> ano de idade, demonstrando um aspecto aparentemente inerte, o osso continua sofrendo remodelamento, e

se mantêm ativo durante toda a vida do indivíduo. Quando lesado, como em fraturas, é capaz de sofrer reparo, fenômeno que demonstra sua permanente vitalidade. Esse dinâmico processo se dá pela ação conjunta das células osteoblásticas, osteoclásticas e as células osteoprogenitoras (DUCY; SCHINKE; KARSENTY, 2000; BEZERRA, 2005).

Os osteoblastos são células responsáveis pela osteogênese, formação do osso, portanto, pela síntese da matriz óssea. Essa matriz vai sendo depositada ao redor do osteoblasto e assim o envolvendo, imediatamente o osteoblasto começa a desenvolver extensões longas e delgadas, diferenciando-se em osteócitos, localizados em cavidades ou lacunas no interior da própria matriz e assim cessando a síntese da mesma, entretanto, mantém comunicação entre si através dos longos prolongamentos citoplasmáticos, que se intercalam e estabelecem vias de transporte de nutrientes e metabólitos. Já os osteoclastos são as células responsáveis pela absorção óssea, devido a grande quantidade de enzimas digestivas, capazes de erodir o tecido ósseo ao atacar a matriz, e, desta forma, participam do processo de remodelação do tecido e da regulação dos níveis plasmáticos de cálcio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

As células osteoprogenitoras são consideradas células de reserva que permanecem em repouso até diferenciar-se, podendo se transformar em osteoblastos e produzir matriz óssea, derivam de células mesenquimais, são encontradas na superfície óssea durante o crescimento normal ou durante a remodelação óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Histologicamente existem dois tipos de tecido ósseo: imaturo (trabecular) e maduro (lamelar). Os dois tipos são muito parecidos possuem as mesmas células e os mesmos constituintes da matriz óssea, o que os diferencia são as organizações tridimensionais em suas fibras colágenas (FREITAS,2001).

O tecido ósseo a aparecer primeiro na formação da estrutura óssea é o trabecular. A matriz produzida pelos osteoblastos neste estágio não possui uma organização definida, apresentando feixes entrelaçados de fibras colágenas com grande número de osteócitos distribuídos de maneira irregular no interior das trabéculas ósseas neoformadas (YU *et al.*, 1997).

Ao ponto que os osteoblastos depositam camadas de matriz orgânica sobre o tecido trabecular, este por sua vez, é progressivamente substituído por osso maduro, tornando-se um osso lamelar. Suas fibras colágenas se organizam em lamelas, se dispendo paralelamente umas às outras de forma concêntrica, em torno de um canal central, denominado canal de *Havers*, por onde correm vasos sanguíneos e nervos (YU *et al.*, 1997).

Os canais medulares de *Havers comunicam-se* entre si com a cavidade medular, e com a parte externa do osso por canais transversais ou oblíquos, os canais de *Volkman* (KODAMA, 2003). Todas as lacunas do sistema haversiano estão interconectadas por finíssimos canais denominados canalículos, possibilitando o suprimento por fluidos nutritivos que provêm dos vasos do canal haversiano para os capilares (TORTORA, 2000).

## 2.2- REPARO ÓSSEO

A regeneração óssea é um dos processos de reparo mais importantes do corpo, porque o osso assim como o fígado, é um dos poucos órgãos aptos a sofrer regeneração espontânea em vez de apenas restaurar uma estrutura. Para que isso aconteça, há um envolvimento de uma série de eventos biológicos de recrutamento, proliferação e diferenciação celular induzidos por moléculas mediadoras, sinalizadoras e fatores de crescimento (DIMITRIOU et al., 2011; GIANNOUDIS; JONES; EINHORN, 2011)

A forma clínica mais comum de reparo ósseo é o processo de cicatrização de fraturas ósseas. Nele, os eventos que ocorrem são semelhantes ao processo contínuo de remodelação que acontece durante toda a vida do indivíduo, assim como durante o desenvolvimento ósseo embrionário (DIMITRIOU et al., 2011; MARSELL; EINHORN, 2011).

Após o trauma, quando ocorre ruptura do periósteo e endósteo, destruição da matriz, morte celular e deslocamento de fragmentos ósseos (SCHROEDER; MOSHEIFF, 2011), há um rompimento dos vasos sanguíneos, causando uma hemorragia local, desta forma, preenchendo a zona de fratura e originando um coágulo (MARSELL; EINHORN, 2011). O coágulo servirá como estrutura para o surgimento de um calo ósseo cicatricial, que irá circundar cada fragmento crescendo em direção ao fragmento oposto (GERSTENFELD et al., 2003).

Esse processo inflamatório local é necessário para a evolução do processo de cicatrização, iniciado em resposta à injúria (GERSTENFELD et al.,

2003; SCHROEDER; MOSHEIFF, 2011), promovendo angiogênese, estimulando a produção de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (YANG et al., 2007), produção primária de calo cartilaginoso (SFEIR et al., 2005) e osteogênese (MARSELL; EINHORN, 2011).

Iniciada após 48 horas, a proliferação dos osteoblastos, de origem subperiosteal e endosteal, irá formar trabéculas ósseas constituídas por osso imaturo. Nesse período, o tecido necrótico local é removido por células fagocitárias, brotando novos vasos sanguíneos, que irão suprir de nutrientes e células o local da fratura, originando a cascata de cicatrização (KHOSLA; WESTENDORF; MODER, 2010; SCHROEDER; MOSHEIFF, 2011).

Dentro do tecido de granulação, abundante em fibrina, formado após o coágulo, inicia-se a ossificação endocondral (RAHN, 2002; DIMITRIOU et al., 2005) concomitantemente, a ossificação intramembranosa ocorre na área subjacente ao periósteo, produzindo assim um calo ósseo (GERSTENFELD et al., 2006). Desde modo, a formação deste calo ósseo, depende do recrutamento, proliferação e diferenciação de células mesenquimais em células osteogênicas (MARSELL; EINHORN, 2011; SCHROEDER; MOSHEIFF, 2011). Tais células podem ser derivadas do periósteo no local da fratura, dos vasos sanguíneos por quimiotaxia, ou do sangue extravasado pelo coágulo (SCHROEDER; MOSHEIFF, 2011).

Um bom suprimento sanguíneo e a revascularização são de extrema importância para o êxito do reparo ósseo, no qual o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) participa diretamente neste processo, promovendo angiogênese (YANG et al., 2007) e a invasão de vasos sanguíneos,

possibilitando a substituição da matriz cartilaginosa avascular em matriz óssea vascularizada (KERAMARIS; CALORI; NIKOLAOU, 2008). Esta é a etapa final da ossificação endocondral no crescimento e desenvolvimento ósseo (GERBER et al., 1999; DAI; RABIE, 2007), no qual o tecido cartilaginoso apresenta uma zona de proliferação, hipertrofia e apoptose de condrócitos, enquanto é substituído por osso (GERBER et al., 1999). Com a invasão de vasos sanguíneos, a hipertrofia e a apoptose dos condrócitos, células especializadas alcançam a matriz extracelular agora mineralizada (GERBER et al., 1999).

Sendo observado, neste processo, que osteoblastos e as células osteoprogenitoras progridem simultaneamente com células endoteliais nas regiões onde está sendo formado um novo osso (DECKERS et al., 2000), apontando a relação da angiogênese com a osteogênese e que, provavelmente, estes eventos dividem de mediadores comuns (DAI; RABIE, 2007).

Durante o desenvolvimento do tecido ósseo ou no reparo do processo cicatricial de fraturas, uma matriz intercelular de colágeno e polissacarídeos é depositada, na qual sais de cálcio penetram, formando osso imaturo ou não lamelar. Gradualmente este osso vai sendo substituído por osso maduro com o transcorrer da remodelação óssea (BARON, 2002). Com essa progressão, o calo ósseo torna-se cada vez mais sólido e mecanicamente rígido (GERSTENFELD et al., 2006; MARSELL; EINHORN, 2011).

### 2.3- OSTEOPOROSE E DEFICIÊNCIA DE ESTRÓGENO

A osteoporose clinicamente pode ser classificada como primária e secundária (LELOVAS et al., 2008; SIPOS et al., 2009; RIGGS, 2002). A osteoporose primária tipo I, refere-se à doença desenvolvida nas mulheres pós-menopausa, a tipo II é desencadeada pela idade avançada, pode também ser chamada de osteoporose senil. Já a osteoporose secundária é a perda óssea desenvolvida em decorrência de processos inflamatórios, como a artrite reumatóide; alterações endócrinas, como o hipertireoidismo e desordens adrenais; mieloma múltiplo; por falta de exercício físico; por uso de álcool e/ou medicamentos, como os glicocorticoides e anticonvulsivos (RIGGS, 2002; CRUSOÉ-SOUZA et al., 2010).

A forma mais comum da doença é a osteoporose pós-menopausa (primária tipo I) que acomete o organismo feminino adulto na sua fase não reprodutiva. Nesta fase, em consequência da interrupção do ciclo menstrual, ocorre uma deficiência hormonal de estrógeno no organismo, tornando-se este, portanto, o principal fator patogênico da osteoporose (RIGGS, 2000; MANOLAGAS; KOUSTENI; JILKA, 2002; BALASCH, 2003; QUINN; GILLESPIE, 2005; LELOVAS et al., 2008; LIANG et al., 2008).

O estrógeno tem efeitos anti-apoptóticos sobre os osteoblastos e desencadeia a diferenciação e ativação destas células. Portanto, a sobrevivência e ativação das células responsáveis pela formação da matriz óssea são comprometidas pela deficiência do estrógeno. Além disso, este hormônio controla a produção de citocinas como interleucina-1(IL-1), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), fator estimulador de



colônias de macrófagos (M-CSF), prostaglandina (PGE2) e interleucina-11 (IL-11), que estimulam a proliferação, diferenciação e ativação de osteoclastos. Dessa maneira, o estrógeno também age indiretamente sobre a osteoclastogênese, e a sua deficiência promove o aumento de osteoclastos no tecido (PACIFICI, 1998; RICKARD et al., 1999; MANOLAGAS et al., 2000; RIGGS, 2000; MICHAEL et al., 2005).

Os osteoclastos também são controlados diretamente pelo estrógeno. Estas células possuem receptores de estrógeno na sua superfície e, dessa forma, o hormônio regula sua diferenciação, atividade e apoptose. Embora muitas pesquisas tenham evidenciado as complexas alterações moleculares, celulares, na composição, integridade e arquitetura tecidual da osteoporose, os múltiplos efeitos da deficiência de estrógeno no tecido ósseo e a sequência de eventos que promove a perda óssea nesta condição patológica ainda não são completamente esclarecidas (CRUSOÉ-SOUZA; SASSO-CERRI; CERRI, 2009; MCNAMARA, 2010).

Os estrogênios podem alterar a velocidade de crescimento osteoblástica, além, de inibir a PGE2 (prostaglandina E2) e alterar a síntese e secreção de proteínas responsáveis pela ativação de fatores que diminuem a reabsorção óssea (*TGF- $\beta$* , *Transforming growth factor Beta*). Os receptores E2 controlam 70% da reabsorção óssea (ARDILA, 2003).

Houve uma crescente demanda por cuidados com os pacientes osteoporóticos. Desta forma, buscar tratamentos mais avançados para as possíveis complicações da osteoporose, como é o caso da fratura, tornou-se

de vital importância, para que ocorra uma boa remodelação em tecido ósseo osteoporótico.

## **2.4- FOTOTERAPIAS**

### **2.4.1- FOTOBIMODULAÇÃO LASER**

A absorção da luz laser pelos tecidos pode resultar em quatro processos: fotoquímico, fototérmico, fotomecânico e fotoelétrico. Devido a variedade de efeitos clínicos que esses processos ocasionam, eles podem ser subdivididos de acordo com a sua manifestação clínica. Dentro do grupo dos efeitos fotoquímicos podemos incluir a biomodulação, que é o efeito da luz laser sobre processos moleculares e bioquímicos que normalmente ocorrem nos tecidos, como, por exemplo, na cicatrização de feridas e no reparo ósseo (PINHEIRO; BRUGNERA JR; ZANIN, 2010).

A fototerapia laser possui uma capacidade, comprimento de onda dependente, de alterar o comportamento celular na ausência de aquecimento significativo. A dispersão da luz laser no tecido é muito complexa, pois os componentes do tecido influenciam a dispersão da luz. Os efeitos da fototerapia laser no osso ainda são controversos, com estudos anteriores mostrando resultados diferentes ou conflitantes. É possível que o efeito da fototerapia laser sobre a regeneração óssea dependa, não só da dose total de irradiação, mas também do tempo e modo de irradiação (PINHEIRO; GERBI, 2006).

Vários estudos, *In Vitro* e *In Vivo*, demonstraram que a fotobiomodulação laser (FBML) no nível celular estimula o fotorreceptor citocromo-C-oxidase, ocasionando um aumento do metabolismo e produção de energia, conseqüentemente aumentando o metabolismo oxidativo mitocondrial. Iniciando uma cascata de reações celulares que modulam o comportamento biológico, modulando a angiogênese, macrófagos e linfócitos; a proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno; diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos, entre outros, acelerando assim o processo de reparação óssea (KARU; PYATIBRAT; AFANASYEVA, 2005; TORRES *et al.*, 2008; LOPES *et al.*, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2011).

No reparo ósseo, estudos demonstraram que a fototerapia laser na faixa do infravermelho próximo (FTL-IVP) é a mais adequada, devido a sua maior profundidade de penetração no tecido, quando comparada com fototerapia laser emitida no espectro visível da luz. Seus resultados indicam que a área óssea irradiada com FTL-IVP mostra um aumento na proliferação dos osteoblastos, deposição de colágeno e neoformação óssea (PINHEIRO *et al.*, 2011, 2012, 2013).

Sabe-se que esse efeito estimulador sobre o osso ocorre durante a fase inicial da proliferação de fibroblastos e osteoblastos, bem como durante a fase inicial de diferenciação de células mesenquimais. A proliferação fibroblástica e o aumento de sua atividade foram observados previamente em indivíduos irradiados e culturas de células, sendo este o fator responsável pela grande concentração de fibras colágenas vistas dentro do osso irradiado (GERBI,

2004; PINHEIRO; GERBI, 2006; GERBI *et al.*, 2007; GERBI *et al.*, 2008a,b; PINHEIRO *et al.*, 2011, 2012, 2013).

#### **2.4.2- FOTOBIMODULAÇÃO LED**

A terapia com luz é um dos métodos terapêuticos mais antigos utilizados pelos humanos. O uso dos LEDs como fontes de luz viria a ser o próximo passo no desenvolvimento tecnológico na terapia com luz (KARU, 2003).

LED é a sigla, em inglês, para *Light Emitting Diode*, que em português significa diodo emissor de luz. Este tipo de emissão é diferente dos Lasers, que produzem emissão estimulada e amplificada de radiação. Inicialmente, se atribuía os efeitos do laser à coerência, mas foi mostrado que fontes não coerentes como os LEDs também alcançavam bons resultados (KARU *et al.*, 2008; WHELAN, *et al.*, 2003).

O uso da fototerapia LED cresceu após resultados positivos demonstrados pela fototerapia laser na melhora do reparo ósseo em vários modelos (PINHEIRO *et al.*, 2012a,b, 2013), porém ainda há poucos relatos sobre o uso da fototerapia LED neste processo, principalmente quando da sua utilização em ossos osteoporóticos. Experimentos ao nível celular evidenciaram que tanto a luz coerente como a não coerente, nos mesmos comprimentos de onda, intensidade e tempo de irradiação, promovem efeitos biológicos semelhantes (KARU *et al.*, 1982, 1983). O sucesso do uso do LED em várias áreas confirma essa afirmação (BAROLET, 2008; TORRES *et al.*, 2008; KARU

*et al.*, 2008; BAROLET *et al.*, 2009; LOPES *et al.*, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2012a,b).

O aumento na deposição de colágeno após a irradiação com LED foi documentado em culturas de fibroblastos (HUANG *et al.*, 2007; WHELAN *et al.*, 2001), e em modelos humanos onde foi observado também a diminuição da colagenase (BAROLET, *et al.* 2009) na cicatrização tecidual em modelos de queimadura de terceiro grau (MEIRELES *et al.*, 2008), e em lesões bolhosas humanas (BAROLET *et al.*, 2005). Há evidências de que a luz produzida por LEDs, nos mesmos comprimentos de ondas bioestimulatórios de estudos anteriores com o laser tem efeitos bioquímicos similares (WHELAN *et al.*, 2002; SOUSA, *et al.*, 2009).

Estudos recentes mostram que a fototerapia LED induz um processo de reparo mais rápido, com presença de osso neoformado de boa qualidade. Essas características são observadas em diversos estudos onde foi utilizada fototerapia laser com parâmetros semelhantes. Parece provável que os efeitos benéficos do LED são similares àqueles do laser. É possível que o mecanismo envolvido seja similar, com a absorção da luz pelo citocromo-C-oxidase presente na membrana mitocondrial (WEISS, 2005; AL-WATBAN; ANDRES, 2006). Apesar do crescimento das aplicações bem sucedidas da fototerapia LED em diversas áreas, seu uso no reparo ósseo precisa ser melhor estudado (PINHEIRO *et al.*, 2012a,b, 2013).

## 2.5- ESPECTROSCOPIA RAMAN

A qualidade da cicatrização do reparo ósseo pode ser avaliada através de diferentes formas, ou seja, além dos exames e técnicas tradicionais como a histologia, morfometria, microscopia eletrônica de varredura, Raio-X e tomografia. Atualmente também pode ser utilizada a ER-IVP na avaliação tecidual.

A Espectroscopia Raman foi criada por Chandrasekhara Venkata Raman, na Índia em 1928, através da observação do efeito Raman. Esse efeito é um processo fundamental de troca de energia entre a luz e a matéria. Essa técnica espectroscópica vem sendo intensamente estudada na última década e de natureza vibracional. O espectro Raman traz informações das vibrações entre as ligações químicas dos diversos grupos moleculares. Como as bandas de vibração molecular são únicas e específicas, estreitas e sensíveis à variação da estrutura molecular, diferenças que dependem do grupo molecular analisado podem ser facilmente identificadas, funcionando como impressão digital da molécula, fornecendo informação bioquímica específica, não encontrada em outras técnicas óptica (HANLON *et al.*, 2000; SILVEIRA JUNIOR, 2001).

Pode-se utilizar um aparato que forneça radiação monocromática para a excitação do material (como o raio laser, por exemplo) um espectrógrafo que faça a dispersão da luz e um detector que converta este sinal luminoso em elétrico, e estudar os movimentos vibracionais das moléculas dos diferentes materiais, permitindo a sua identificação. Portanto, através desta técnica, é

possível determinar as substâncias presentes tanto no tecido normal, como em processos patológicos (SILVEIRA JUNIOR *et al.*, 2002).

#### Aplicações Biomédicas

A espectroscopia Raman vem sendo usada como método de identificação de alterações bioquímicas em diversas doenças humanas, oferecendo possibilidades de diagnóstico clínico e ação terapêutica (SILVEIRA JR *et al.*, 2002; GIANA *et al.*, 2003; NUNES *et al.*, 2003; OTERO *et al.*, 2004; NOGUEIRA *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2006; ROCHA, *et al.* 2007a,b, 2008; PAULA JR *et al.*, 2009;).

Estudo avaliando a mineralização normal e patológica *In Vivo* e *In Vitro*, através da espectroscopia Raman, demonstrou que através desta técnica podemos observar os componentes orgânicos e inorgânicos do tecido ósseo e a sua relação com o estágio de mineralização óssea (MORRIS *et al.*, 2002).

Além de avaliar a neoformação óssea, a espectroscopia Raman possibilita o estudo de outras características do osso, como sua resistência e propriedades mecânicas, através dos picos Raman, referentes aos diversos constituintes da matriz orgânica e conteúdo inorgânico do osso. Sua resistência não depende apenas da quantidade de mineralização, mas também do grau de cristalinidade, da distribuição ótima dos diferentes tamanhos e formas dos cristais (MORRIS; MANDAIR, 2011). O pico Raman mais utilizado experimentalmente para verificar a cristalinidade mineral é a banda primária do fosfato em torno de  $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$  (AKKUS *et al.*, 2004; AWONUSI *et al.*, 2007; MORRIS; MANDAIR, 2011).

Os íons fosfato e carbonato possuem um efeito importante sobre a formação e maturação do osso, uma vez que a sua concentração relativa indica a evolução estequiométrica da baixa cristalinidade da HA. Esta evolução prossegue pela transformação da fase inicial, pobre em HA, em uma fase estável e mais cristalina. O teor relativo de cálcio contra o fosfato é geralmente aceito como um regulador da homeostase mineral e do metabolismo ósseo (KOURKOUVELIS; TZAPHLIDOU, 2010).

O pico Raman  $\sim 960\text{ cm}^{-1}$  refere-se à hidroxiapatita fosfatada, enquanto o pico  $\sim 1070\text{ cm}^{-1}$  refere-se à substituição do fosfato pelo carbonato na molécula da hidroxiapatita. A espectroscopia Raman é sensível a esta mudança, permitindo sua distinção, ao analisar bandas espectrais específicas da hidroxiapatita, e assim pode ser utilizada para determinar a cristalinidade óssea (FARLAY *et al.*, 2010).

A potencialidade da técnica Raman está fortemente relacionada à correta análise e interpretação da informação espectral. A posição, largura, 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 (FARLAY *et al.*, 2010).

Atualmente, as formas de análise do conteúdo espectral estão separadas em três classes: análise estatística, análise química e análise morfológica. Na análise estatística, a informação espectral mais relevante de um conjunto de dados é obtida matematicamente, utilizando principalmente as



intensidades dos picos Raman ou a análise dos Componentes Principais (PCA - *Principal Components Analysis*).

Por fim, o uso desta técnica fornece diversos tipos de informações extraídas do espectro Raman, em tempo real, de maneira não invasiva, sem a necessidade de preparação de amostra, sendo possível a realização até mesmo *in vivo*, não sendo necessária remoção do tecido (SILVEIRA JUNIOR *et al.*, 2002; GIANA *et al.*, 2003; NUNES *et al.*, 2003; OTERO *et al.*, 2004; NOGUEIRA *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2006; ROCHA, *et al.* 2007a,b, 2008; PAULA JR *et al.*, 2009).

---

### 3. PROPOSIÇÃO

---

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da fotobiomodulação Laser ( $\lambda 780\text{nm}$ ) ou LED ( $\lambda 850 \pm 10$ ) no processo de reparo ósseo de defeitos cirúrgicos confeccionados em fêmur de ratas osteoporóticas.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever e comparar, histologicamente, o processo de reparo ósseo de defeitos cirúrgicos confeccionados no fêmur de ratas osteoporóticas *Wistar* submetidas ou não a fotobiomodulação Laser ou LED.

- Avaliar histomorfometricamente, o processo de reparo ósseo de defeitos cirúrgicos confeccionados no fêmur de ratas osteoporóticas *Wistar* submetidas ou não a fotobiomodulação Laser ou LED.

- Avaliar através da espectroscopia Raman no infravermelho próximo, a mineralização óssea, utilizando como marcadores os picos de hidroxiapatita de cálcio fosfatada ( $\sim 960\text{ cm}^{-1}$ ), carbonatada ( $\sim 1070\text{ cm}^{-1}$ ) e o colágeno ( $\sim 1454\text{ cm}^{-1}$ ) presente na matriz óssea, no processo de reparação óssea em defeitos ósseos confeccionados no fêmur de ratas osteoporóticas *Wistar*, submetidas ou não a fotobiomodulação Laser ou LED.

---

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 4.1 - RESPALDO ÉTICO DA PESQUISA

Este estudo seguiu as normas de conduta de experimentação animal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (FOUFBA) e foi realizado após a aprovação pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) desta Instituição (**Anexo 01**), sob o protocolo de número 07.10, de acordo com a LEI Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008.

### 4.2 - DELINEAMENTO

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

### 4.3 - AMOSTRA

Nesta pesquisa foram utilizados 40 ratas albinas da espécie *Rattus norvegicus*, classe *Mammalia*, ordem *Roedentia*, da linhagem *Wistar*, adultas jovens, fêmeas, com idade aproximada de dois meses, pesando entre 200 e 250 gramas cada, obtidas do Centro de Criação de animais da Faculdade de Medicina Veterinária da UFBA. Os animais foram mantidos no Laboratório de Experimentação Animal da FOUFBA em micro-isoladores de policarbonato individuais, forrados com maravalha autoclavada trocada diariamente, com temperatura de 22°C e luminosidade ambiente, acomodados em estante

ventilada (INSIGHT Equipamentos Ltda. – Monte Alegre, Ribeirão Preto – São Paulo) com injeção direta de ar através de válvulas de aço inoxidável que possuem fechamento automático. O equipamento possui painel com comando por teclado, tipo membrana, com sensor de pressão diferencial, indicador de alarme luminoso da troca de filtros e problemas de pressão e vazão. Além disso, possui sistemas independentes de insuflamento e exaustão de ar, que proporciona um baixo índice de infecções, eliminação de odores provenientes das excreções, e baixo volume de ruídos. A alimentação dos animais foi realizada com a ração Labina<sup>®</sup> (Purina, São Paulo, Brasil) e água *ad libitum*.

#### **4.4 - DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS**

Com exceção de cinco animais, que fizeram parte do grupo Basal, todos os animais foram submetidos ao primeiro procedimento cirúrgico (Ovariectomia) e posteriormente divididos em quatro grupos de forma aleatória, sendo que, três grupos subdividiram-se de acordo com o período observacional de 15 e 30 dias, com cinco animais cada.

Descrição dos grupos:

- a) Grupo Basal: Os animais deste grupo eram saudáveis e não foram submetidas a nenhum procedimento cirúrgico e, decorridos 60 dias, foi realizado o sacrifício.
- b) Grupo Osteo: Os animais deste grupo foram submetidos à ovariectomia e, decorridos 60 dias, foi realizado o sacrifício.

- c) Grupo Coágulo: Os animais deste grupo foram submetidos à ovariectomia e, decorridos 60 dias da cirurgia, foi criado um defeito ósseo no fêmur direito. Os animais foram submetidos à simulação de irradiação.
- d) Grupo LED: Os animais deste grupo foram submetidos a ovariectomia e, decorridos 60 dias da cirurgia, foi criado um defeito ósseo no fêmur direito, sendo os animais submetidos a irradiação com LED.
- e) Grupo Laser: Os animais deste grupo foram submetidos a ovariectomia e, decorridos 60 dias da cirurgia, foi criado um defeito ósseo no fêmur direito, sendo os animais submetidos a irradiação com Laser. A distribuição dos grupos pode ser vista no **Quadro 01**.

**Quadro 01 - Distribuição dos grupos de estudo (ACIOLE, 2014).**

<i>Grupos</i>	<i>N=animais</i>	<i>Descrição</i>	<i>Período (dias)</i>
BASAL	n=5	Animal saudável, não submetido a nenhum procedimento cirúrgico.	60
OSTEO	n=5	Animal osteoporótico, não submetido a confecção do defeito ósseo.	60
COÁGULO*	n=5	Animal osteoporótico +	60 + 15
	n=5	Confecção do Defeito ósseo	60 + 30
LED*	n=5	Animal Osteoporótico +	60 + 15
	n=5	Confecção do defeito ósseo +	60 + 30
LASER*	n=5	Animal Osteoporótico +	60 + 15
	n=5	Confecção do defeito ósseo +	60 + 30
		Irradiação Laser	

\*Após os 60 dias de indução à osteoporose, os grupos foram avaliados experimentalmente durante o período observacional de 15 e 30 dias.

## 4.5 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

### 4.5.1 CIRURGIA DE OVARIECTOMIA

As ratas foram anestesiadas (Ketalar<sup>®</sup> 50mg/Kg, Lab. Parke Davis Ltda.) e após a tricotomia e assepsia da região abdominal lateral, a pele e musculatura foram incisadas longitudinalmente, abaixo da costela na linha média, próximo ao nível dos rins.

A pele foi retraída lateralmente permitindo a identificação e exposição do ovário através da fina parede de músculos, abaixo da massa muscular dorsal. A incisão de 1 cm permitiu somente a extrusão do ovário, sendo então realizada a ligadura, através da ligação da parte superior da trompa com fio de sutura.

O ovário juntamente com a gordura circundante, o oviduto e uma pequena porção do útero foram excisados, sendo este procedimento realizado bilateralmente. Em sequência, foram suturadas as camadas musculares e a pele com fio reabsorvível *catgut* simples, 2.0, agulhado, com 75 cm de comprimento, montado em agulha atraumática 3/8, circular/cilíndrica com 3 cm (Catgut<sup>®</sup>, Technofio, Goiânia, GO, Brasil) nos planos internos (muscular e fascial). Para a sutura da pele, utilizou-se fio seda preto, trançado 3.0, com 45 cm de comprimento, montado em agulha de 1,7 cm, 3/8 circular/triangular (Seda<sup>®</sup>, Technofio, Goiânia, GO, Brasil), em pontos interrompidos. Realizada a assepsia do corte com álcool iodado, e posteriormente cada animal foi então medicado com uma dose de 1ml de Pentabiótico (Fort-Dodge, Brasil) para cada 100 gramas de peso (SENRA, 2006) (**Fig. 01**).

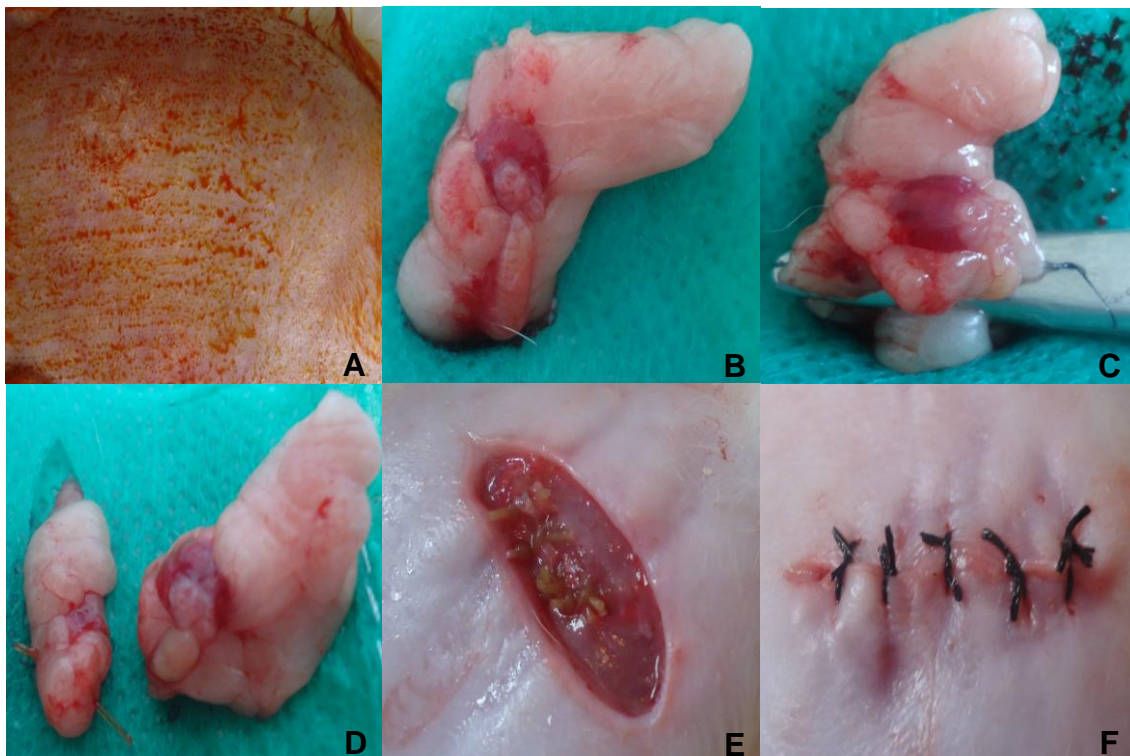


Figura 01 - Fotomontagem representativa: A – Tricotomia e assepsia da região abdominal lateral para confecção da incisão longitudinal abaixo da última costela; B – Ovário identificado e exposto; C – Pinçamento para posterior ligação da parte superior da tropa com fio reabsorvível; D – Excisão ovariana juntamente com a gordura circundante; E – Sutura Interna com fio reabsorvível; F- Sutura externa final (ACIOLE, 2014).

#### 4.5.2 CRIAÇÃO DO DEFEITO ÓSSEO

A criação do defeito ósseo foi realizada 60 dias após a ovariectomia, utilizando-se instrumental cirúrgico, organizado em conjuntos individuais, esterilizados em autoclave, bem como, equipamentos de proteção individual, observando-se todos os princípios de rotina de assepsia.

Os animais foram submetidos à anestesia geral, com injeção intraperitoneal de Cloridrato de Quetamina 10% (Cetamin<sup>®</sup>, Syntec, Cotia, SP, Brasil), na posologia de 0,12ml/100g e Cloridrato de Xilazina 2% (Xilazina<sup>®</sup>, Syntec, Cotia, SP, Brasil) na posologia de 0,06ml/100g. Em seguida, foram

posicionados em decúbito lateral direito para realização da tricotomia da região coxofemoral esquerda, seguida de antissepsia do campo operatório com clorexidina a 0,12%. Para o isolamento da região, utilizou-se campo fenestrado estéril.

O acesso cirúrgico ao fêmur foi obtido por meio de uma incisão na pele e tecido subcutâneo, com utilização de bisturi tipo *Bard Parker* montado com lâmina nº15, seguindo o longo eixo do osso, com extensão aproximada de 2 cm. Após incisão da fáscia muscular, a musculatura da região foi divulsionada, com auxílio de uma tesoura tipo *Metzemaum* e uma pinça de dissecação, até a exposição do perióstio. Em seguida, o perióstio foi incisado e posteriormente descolado, com a utilização de descolador de perióstio tipo Molt, para exposição da área óssea.

Em seguida, a fim de padronizar a área operada, todos os defeitos ósseos foram confeccionados no terço superior, da face lateral do fêmur esquerdo. A perfuração foi realizada através da utilização de broca tipo trefina (SIN – Sistema de Implantes, São Paulo, SP, Brasil) com 2 mm de diâmetro, montada em contra-ângulo com redução de 16:1, resistência máxima de 35N (NSK, Nakanishi Inc. – Tochigi, Japão) em ângulo reto com a cortical óssea. O diâmetro foi obtido em virtude do diâmetro da própria broca (2 mm) e após o rompimento da cortical e acesso à região medular do osso. Uma sondagem foi realizada por meio de uma sonda milimetrada para implante (sonda periodontal de Williams) para constatar a profundidade de 3 mm da cavidade. Todas as perfurações ocorreram sob refrigeração constante com solução fisiológica estéril de cloreto de Sódio a 0,9%, com auxílio de um motor cirúrgico para



implantes, com redução de velocidade de 1/16 (Driller 600 BML, Jaguaré, São Paulo, Brasil) (**Fig. 02**).



**Figura 02 – Defeito ósseo confeccionado, preenchido pelo coágulo sanguíneo (ACIOLE, 2014).**

Após a criação do defeito ósseo, os tecidos foram suturados por planos, utilizando-se fio reabsorvível *catgut* simples, 2.0, agulhado, com 75 cm de comprimento, montado em agulha atraumática 3/8, circular/cilíndrica com 3 cm (Catgut®, Technofio, Goiânia, GO, Brasil) nos planos internos (muscular e fascial). Para a sutura da pele, utilizou-se fio seda preto, trançado 3.0, com 45 cm de comprimento, montado em agulha de 1,7 cm, 3/8 circular/triangular (Seda®, Technofio, Goiânia, GO, Brasil), em pontos interrompidos.

Após o procedimento cirúrgico, os animais foram acondicionados nos micro-isoladores individuais, devidamente identificados, e mantidos em observação constante e diária por todo o período de estudo.

## 4.6 - PROTOCOLO DE FOTOTERAPIA

Para contenção dos animais foi desenvolvido um dispositivo baseado em garrafas tipo PET, que foram devidamente higienizadas com Clorexidina 0,2% e, em seguida, removido seu fundo. Os animais foram então posicionados no interior da garrafa de maneira que a parte posterior ficou fora do dispositivo, possibilitando acesso ao fêmur dos animais.

Os grupos que não receberam fototerapia foram manipulados de forma semelhante aos que a receberam, para que fosse submetido ao mesmo *stress* e conseqüentemente, possuírem as mesmas interferências no período de cicatrização.

Neste trabalho utilizou-se o SAEF (*spatial average energy fluence*) de 20,4 J/cm<sup>2</sup> no intuito de equalizar a densidade de energia das fototerapias laser e LED sobre a área de tecido irradiado, em observância as diferenças no modo de aplicação das duas fototerapias, pelo tamanho dos *spots* (SOUSA, 2009).

### 4.6.1 – FOTOTERAPIA LASER

Os animais dos grupos experimentais que previam fototerapia Laser receberam irradiação com laser de Arseneto de Gálio e Alumínio (Twinflex Evolution<sup>®</sup>, MMOptics, São Carlos, SP, Brasil) (**Fig. 03**) seguindo o protocolo ( $\lambda$ 780 nm, P = 70 mW, emissão contínua,  $\Phi$  = 0,04 cm<sup>2</sup>, 20,4 J/cm<sup>2</sup> por sessão, t= 300 s, 163,2 J/cm<sup>2</sup> por tratamento). O protocolo foi iniciado imediatamente após o procedimento cirúrgico, sendo aplicado com a ponteira do equipamento

posicionada em contato com a pele do animal e perpendicular ao osso fêmur, dividido em quatro pontos (NSLO – 5,1 J/cm<sup>2</sup> cada ponto) ao redor do defeito ósseo. As sessões foram repetidas a cada 48 horas durante 15 dias, totalizando 8 aplicações, em ambos grupos experimentais. (ACIOLE, 2010).

#### 4.6.2 – FOTOTERAPIA LED

Os animais dos grupos experimentais que previam fototerapia LED, receberam o tratamento com LED (FisioLED<sup>®</sup>, MMOptics, São Carlos, SP, Brasil) (**Fig. 04**) seguindo o protocolo ( $\lambda$ 850  $\pm$  10 nm, 150 mW, emissão contínua,  $\Phi$ = 0.5 cm<sup>2</sup>, 20,4 J/cm<sup>2</sup> por sessão, t = 128 s, 163,2 J/cm<sup>2</sup> por tratamento) O protocolo foi iniciado imediatamente após o procedimento cirúrgico, sendo aplicado com a ponteira do equipamento posicionada em contato com a pele do animal e perpendicular ao osso fêmur, em apenas um ponto sobre o defeito ósseo devido ao tamanho da ponteira. As sessões foram repetidas a cada 48 horas durante 15 dias, totalizando 8 aplicações, em ambos grupos experimentais (PINHEIRO e GERBI, 2006; ACIOLE, 2010).



Figura 03 – Aparelho utilizado no experimento para realização da fototerapia laser (Twinflex Evolution<sup>®</sup>, MMOptics, São Carlos, SP, Brasil) (ACIOLE, 2014).



Figura 04 – Aparelho utilizado no experimento para realização da fototerapia LED (FisioLED<sup>®</sup>, MMOptics, São Carlos, SP, Brasil) (ACIOLE, 2014).

#### 4.7 – MORTE DO ANIMAL E OBTENÇÃO DA AMOSTRA

Para a obtenção das amostras teciduais, os animais foram mortos de acordo com os períodos experimentais de 15 ou 30 dias após a criação do

defeito. Os indicativos de morte foram a ausência de movimentos respiratórios, batimentos cardíacos e perda dos reflexos. Para a morte dos animais utilizou-se câmara de gás dióxido de Carbono (EB 248, Insight Equipamentos, Ribeirão Preto, SP, Brasil), recomendada para esse fim pela legislação vigente, que dispõe de uma câmara dimensionada e ambiente condizente para evitar a inalação por pessoas. Este gás tem rápida ação letal por provocar depressão do sistema nervoso central, mas ainda assim, após detecção de parada respiratória, recomenda-se manter os animais na câmara por mais 10 minutos, para confirmação da morte.

Após a constatação da morte do animal, foi realizada uma incisão longitudinal, acompanhando a cicatriz cutânea existente ao longo do fêmur operado. Após exposição óssea e localização da ferida cirúrgica, a peça foi removida, recortando o osso a aproximadamente 3 mm de cada lado da ferida, com auxílio de motor cirúrgico de baixa rotação com irrigação externa profusa, com disco diamantado montado em peça reta. Posteriormente o defeito foi dividido ao meio longitudinalmente com auxílio de motor de baixa rotação com resfriamento contínuo e disco de *carborundum*.

A primeira metade do defeito dos espécimes foi armazenada em nitrogênio líquido (-196°C), para análise através da espectroscopia Raman no infravermelho próximo (ER-IVP). Para a análise de todos os espécimes através da espectroscopia Raman é necessário o alinhamento único do sistema, para diminuir erros de calibração no sistema óptico e minimizar o crescimento de bactérias aeróbias. A fixação química não é aconselhável para este sistema

devido à emissão de fluorescência das substâncias fixadoras (TIMLIN *et al.*, 1999).

A outra metade das peças foi colocada em frascos previamente preparados e etiquetados, contendo solução de paraformaldeído tamponado 4%, sendo fixados por três dias (ACIOLE, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2013) e em seguida encaminhados ao Laboratório de Patologia Oral do Departamento de Propedêutica e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (FOUFBA), onde foram processados e corados com Hematoxilina-Eosina e Tricômico de Masson.

#### **4.8 - EXAME ESPECTROSCÓPICO RAMAN**

Foi utilizado o sistema de Espectroscopia Raman Dispersivo no Laboratório de Espectroscopia Raman do Centro de Biofotônica da FOUFBA. O espectrofotômetro Raman dispersivo Andor Shamrock SR-303i<sup>®</sup> (ANDOR Technology, Belfast, Irlanda do Norte). Esse equipamento utiliza um laser de diodo estabilizado, sintonizado em  $\lambda 785$  nm (infravermelho próximo) (B&WTEK, Newark, NJ, USA), obtendo-se na saída da fibra óptica uma potência total de 500 mW. A excitação da amostra e coleta dos espectros Raman foi realizada por um sistema de cabos de fibra óptica denominado “Raman Probe” (modelo BRM- 785-0.30-100-0.22.s BWTEK<sup>®</sup>, Newark, NJ, EUA). O “Raman probe” possui uma fibra de excitação de 1005  $\mu$ m, e uma fibra de coleta do sinal Raman de 200  $\mu$ m. A fibra de coleta é acoplada a um espectrômetro dispersivo SR-303i, composto por um espectrógrafo de imagem e uma câmera CCD  $\pi$ DUS

(ANDOR Technology, Belfast, Irlanda do Norte) ‘*back thinned, deep depletion*’ 1024x128 pixels, refrigerada por *Peltier*, que dispersam e capturam a luz Raman espalhada. O software SOLIS® (Andor- Newark, NJ, EUA) controla a câmera CCD e espectrógrafo nas funções de tempo de leitura, número de acumulações e calibração espectral e do deslocamento Raman, fornecendo uma resolução espectral de  $\sim 4 \text{ cm}^{-1}$ . A potência do laser na extremidade de excitação do “probe” é de 200 mW.

#### Calibração do equipamento e filtragem dos espectros Raman

A calibração da resposta espectral corrige a dependência da intensidade da óptica de coleta do espectrômetro Raman (lentes/espectrógrafo/CCD) com relação ao comprimento de onda da radiação. Utilizou-se uma lâmpada de tungstênio, padrão de irradiância espectral de 50 W (Oriel Instruments, CT, USA, modelo 63358), rastreada pelo NIST (“National Institute of Standards and Technology”), para a obtenção da curva de correção da resposta espectral  $RE(\lambda)$  do sistema em função do comprimento de onda (SILVEIRA JR *et al.* 2000; ROCHA *et al.*, 2007a,b; ROCHA *et al.*, 2008).

#### Obtenção e processamento dos Espectros Raman

O sistema Raman foi controlado por um microcomputador, executando o software SOLIS® (Andor - Newark, NJ, EUA), onde foi realizado o armazenamento e pré-processamento dos dados espectrais.

O tempo de aquisição espectral para cada ponto de recolhimento do sinal Raman foi de 20s. Para maior confiabilidade dos resultados, cinco pontos foram medidos na superfície da área cortical do defeito em cada uma das 40 amostras, o que resultou num total de 200 espectros. A escolha da área cortical do defeito, para obtenção dos espectros, baseou-se em estudos anteriores que utilizaram o mesmo protocolo (CARVALHO *et al.* 2011; PINHEIRO *et al.* 2010, 2012a,b, 2013). Todos os espectros foram adquiridos no mesmo dia e, sob condições ambientais, para evitar desalinhamentos ópticos e alterações na potência do laser.

As bandas Raman selecionadas para avaliação foram em  $\sim 960$  e  $\sim 1070$   $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas à Hidroxiapatita fosfatada e carbonatada, respectivamente. A banda  $\sim 1454$   $\text{cm}^{-1}$  é atribuída ao componente de colágeno da matriz óssea (PENEL *et al.*, 1998; TIMLIN; CARDEN; MORRIS, 1999; MORRIS; MANDAIR, 2011).

O processamento dos espectros Raman envolveu na primeira etapa a remoção da emissão de fluorescência de fundo (componente espectral de baixa frequência) e a filtragem do ruído eletrônico e ruído de fóton (componente de alta frequência). Os programas utilizados para o manejo dos espectros foram o Matlab<sup>®</sup> (The Mathworks, MA, USA, versão 4.2) e o Excel<sup>®</sup> (Microsoft Corporation, WA, USA), ambos lendo arquivos do tipo ASCII formatados com separação de colunas por tabulação. A emissão fluorescente, sem importância em termos de características espectrais para o Raman, foi removida por meio de um filtro passa-altas com a ajuda do software Matlab<sup>®</sup> (SILVEIRA JR *et al.*, 2002; ROCHA *et al.*, 2007a,b, 2008).



#### 4.9 – EXAME HISTOLÓGICO

Após o período de fixação (3 dias), as amostras foram descalcificadas em solução de ácido fórmico 5% por um período de 48 horas e, em seguida submetidas ao processamento pela técnica histológica de rotina e incluídas em parafina. Os cortes foram realizados em micrótomo com espessura de 5  $\mu\text{m}$ , semi-seriados de 1/5, corados por hematoxilina-eosina (HE), Tricrômico de Masson (TM), e, examinados em microscopia de luz.

Os espécimes processados foram avaliados através de análise descritiva comparativa, no Laboratório de Patologia Oral do Departamento de Propedêutica e Clínica Integrada da FOUFBA, utilizando os critérios descritos no **Quadro 02**.

**Quadro 02 – Critérios semi-quantitativos usado para análise de microscopia de luz (UFPB-UFBA, 2014).**

<b>Critérios</b>	<b>Discreto</b>	<b>Moderado</b>	<b>Intenso</b>
Reabsorção óssea	Presença <25% de reabsorção de osso remanescente e/ou leito cirúrgico	25-50% de reabsorção de osso remanescente e/ou leito cirúrgico	>50% de reabsorção de osso remanescente e/ou leito cirúrgico
Neoformação óssea	<25% de neoformação de osso similar ao adjacente não tratado	25-50% de formação de osso similar ao adjacente não tratado	>50% de formação de osso similar ao adjacente não tratado
Infiltrado Inflamatório	<25% de neutrófilos	25-50% de neutrófilos	>50% de neutrófilos
Deposição Colagênica	<25% de deposição colagênica	25-50% de deposição colagênica	>50% de deposição colagênica
Deposição Cartilaginosa	<b>PRESENTE</b>		<b>AUSENTE</b>

#### **4.10- EXAME HISTOMORFOMÉTRICO**

Cada animal foi classificado de acordo com os critérios do **quadro 02**. Com os dados construiu uma planilha descritiva no Excel® (Microsoft Corporation, WA, USA). Foi calculada em cada categoria a frequência absoluta e relativa. Para a comparação entre os grupos utilizou-se o teste exato de Fischer com um nível de significância de 5%, utilizando a análise de tendência para identificar a direcionalidade da associação estatística. Todos os testes foram realizados no programa estatístico STATA, versão 11.

---

## 5. RESULTADOS

---

### 5.1 – ANÁLISE HISTOLÓGICA

#### GRUPO OSTEIO

Os espécimes desse grupo mostraram trabéculas ósseas delgadas, exibindo numerosas linhas basofílicas paralelas ou não entre si, bem como osteócitos dentro de grandes lacunas. De permeio, era comum observar numerosos espaços contendo superfícies ósseas exibindo pequenas protuberâncias, as quais continham um a dois osteócitos irregulares (ou superfícies ósseas em formato de taça). O colágeno foi mais evidente por entre as superfícies ósseas irregulares de forma moderada (**Fig. 05 e 06**, pág. 54).

#### GRUPO COÁGULO

No 15° dia, os espécimes desse grupo mostraram o defeito cirúrgico parcialmente preenchido por osso neoformado caracterizado por trabéculas ósseas delgadas, interconectantes ou não, exibindo por vezes osteoblastos na superfície bem como osteócitos irregulares dentro de grandes lacunas. De permeio, havia a presença de células inflamatórias crônicas no tecido medular que variou de moderada a intensa (**Figs. 07, pág. 54**). Áreas com reabsorção óssea foram observadas com frequência e variou de moderada a intensa. A presença do colágeno foi evidente no osso neoformado, porém de forma discreta, apresentando ausência de tecido cartilaginoso (**Fig. 08, pág. 54**). Aos

30 dias, os espécimes desse grupo mostraram o defeito cirúrgico quase que completamente preenchido por trabéculas ósseas, ora delgadas, ora espessas, interconectantes ou não, exibindo linhas basofílicas não paralelas entre si, bem como osteócitos dentro de grandes lacunas. Por vezes, observou-se atividade osteoblástica bem como áreas mostrando espaços com superfícies ósseas exibindo poucos osteócitos no interior (**Fig. 09, pág. 54**). Áreas de reabsorção óssea estiveram presentes com frequência de forma moderada, a presença do colágeno no osso neoformado foi discreta (**Fig. 10, pág. 54**). A Inflamação era crônica e variou de moderada a intensa, mantendo a ausência de cartilagem.

### **GRUPO LED**

Nos primeiros 15 dias, os espécimes desse grupo mostraram defeitos cirúrgicos completamente preenchidos por osso neoformado, de espessura mais uniforme, em toda extensão do defeito, com osteócitos irregulares e linhas basofílicas por vezes interconectantes preenchidas por tecido medular. Atividade osteoblástica foi um achado frequente. Áreas de reabsorção e focos cartilagosos também foram observadas (**Fig. 11, pág. 55**). Em todos os casos houve deposição de colágeno no tecido ósseo neoformado de forma intensa (**Fig. 12**). Ao trigésimo dia experimental, os espécimes desse grupo mostraram o defeito cirúrgico completamente preenchido por trabéculas ósseas ora espessas ora delgadas e interconectantes exibindo linhas basofílicas e osteócitos no interior bem como atividade osteoblástica (**Fig. 13, pág. 55**). Em um espécime desse grupo a atividade osteoblástica foi intensa por toda a

extensão e a reabsorção esteve presente, mas de forma discreta. A deposição colagênica foi observada na maioria dos espécimes por entre o osso neoformado de forma intensa (**Fig. 14, pág. 55**). Focos de cartilagem e de inflamação crônica foram vistos em ambos os períodos experimentais.

### **GRUPO LASER**

Aos 15 dias, os espécimes desse grupo mostraram defeito cirúrgico completamente preenchido por trabéculas ósseas ora delgadas ora espessas, exibindo osteoblastos na superfície, osteócitos no interior e linhas basofílicas paralelas ou não, permeadas por inflamação crônica intensa. Áreas focais de discreta reabsorção óssea, bem como remanescente de cartilagem também foram vistas (**Figs. 15, pág. 56**). Por entre o osso neoformado, a presença do colágeno variou de forma moderada a intensa (**Fig. 16, pág. 56**). No trigésimo dia, os espécimes desse grupo mostraram os defeitos completamente preenchidos por osso neoformado caracterizado por um osso trabecular ora delgado ora espesso, com osteoblastos em superfície, linhas basofílicas paralelas entre si e osteócitos regulares. De permeio observou-se inflamação crônica, que variou de moderada a intensa. A reabsorção óssea discreta e presença moderada a intensa de colágeno estiveram presentes (**Figs. 17 e 18, pág. 56**). Não houve presença de cartilagem.

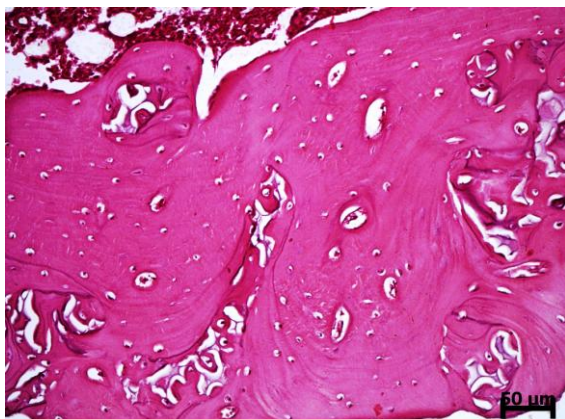


Figura 05 - Fotomicrografia do espécime do grupo Osteo mostrando osso neoformado espesso com osteócitos e linhas basofílicas e poucos canais medulares. Notar a presença de grandes espaços exibindo protuberâncias com poucos osteócitos no interior (HE) (ACIOLE, 2014).

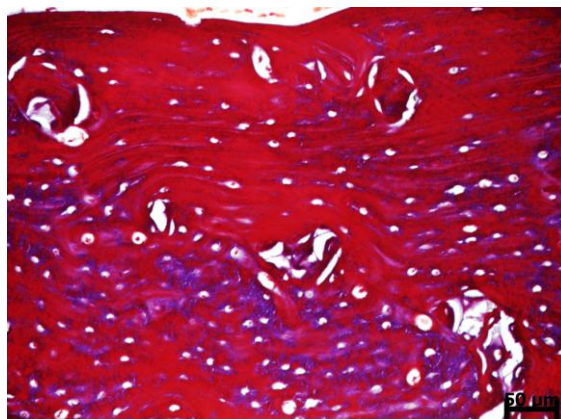


Figura 06 - Fotomicrografia do espécime do grupo Osteo mostrando a presença moderada de colágeno (azul) no interior das trabéculas ósseas neoformadas (TM) (ACIOLE, 2014).

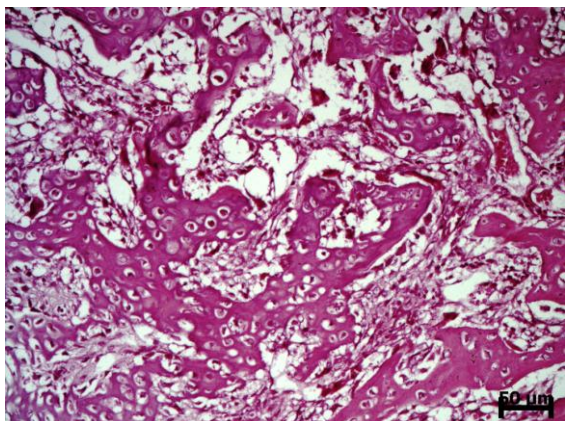


Figura 07 - Fotomicrografia do espécime do grupo Coágulo mostrando trabéculas ósseas neoformadas, irregulares apresentando numerosos osteócitos também irregulares no interior em meio a tecido estromal ora frouxo ora fibroso. Notar a presença de células gigantes multicelulares em atividade (15 dias - HE) (ACIOLE, 2014).

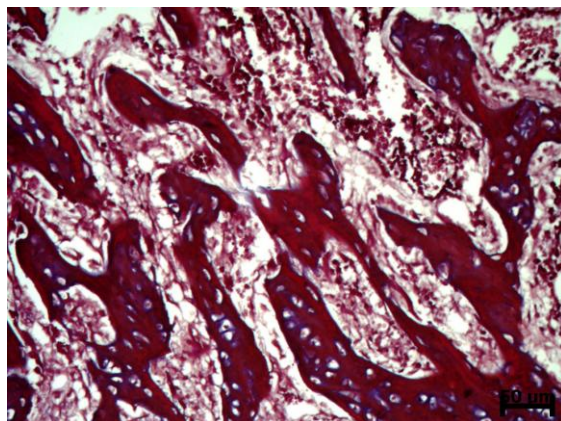


Figura 08 - Fotomicrografia do espécime do grupo Coágulo mostrando a presença discreta de colágeno (azul) no interior das trabéculas ósseas neoformadas (15 dias - TM) (ACIOLE, 2014).

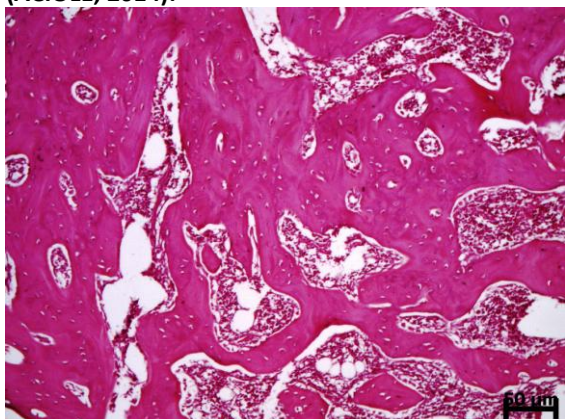


Figura 09 - Fotomicrografia do espécime do grupo Coágulo mostrando a esquerda, osso

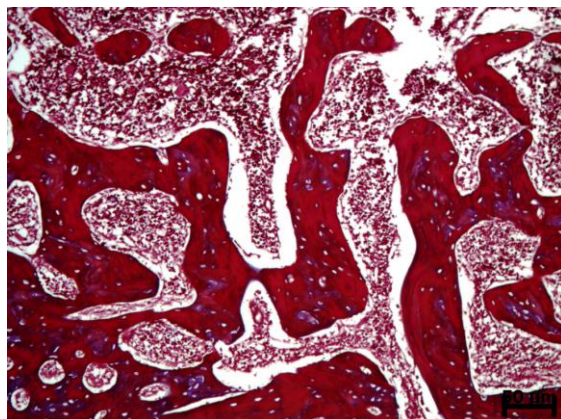


Figura 10- Fotomicrografia do espécime do grupo Coágulo mostrando discreta presença de fibras



remanescente do leito cirúrgico, do qual parte osso neoformado sob a forma de trabéculas espessas e delgadas com osteócitos no interior e linhas basofílicas. Notar espaços medulares e presença de inflamação crônica. (30 dias – HE) (ACIOLE, 2014).

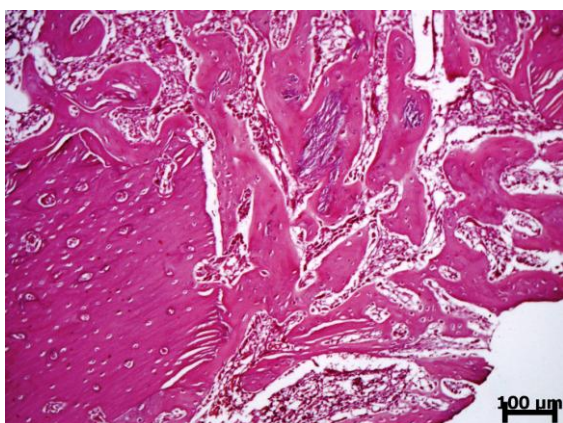


Figura 11 - Fotomicrografia do espécime do grupo LED mostrando tecido ósseo neoformado oriundo do remanescente ósseo do leito cirúrgico, caracterizado por numerosas trabéculas ósseas neoformadas com osteócitos por vezes irregulares e osteoblastos na superfície (15 dias – HE) (ACIOLE, 2014).

colagénas (azul) no tecido ósseo neoformado (30 dias – TM) (ACIOLE, 2014).

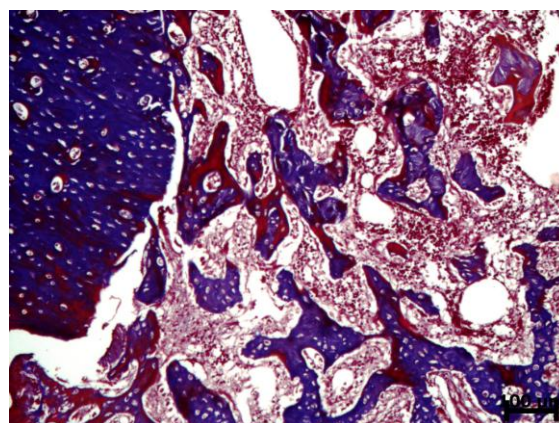


Figura 12 – Fotomicrografia do espécime do grupo LED mostrando a similaridade da extensa quantidade de colágeno nas trabéculas ósseas neoformadas e osso remanescente do leito cirúrgico (15 dias – TM) (ACIOLE, 2014).

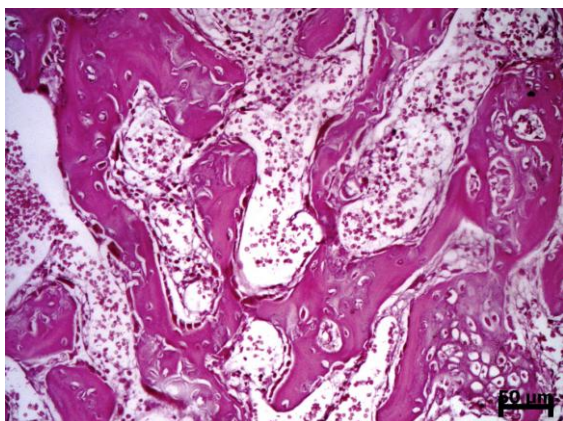


Figura 13 – Fotomicrografia do espécime do grupo LED mostrando trabéculas ósseas neoformadas interconectantes com presença de poucos osteócitos no interior, mas com intensa presença de osteoblastos em superfície. Notar uma discreta inflamação crônica. No canto inferior direito, observou-se foco cartilaginoso (30 dias – HE) (ACIOLE, 2014).

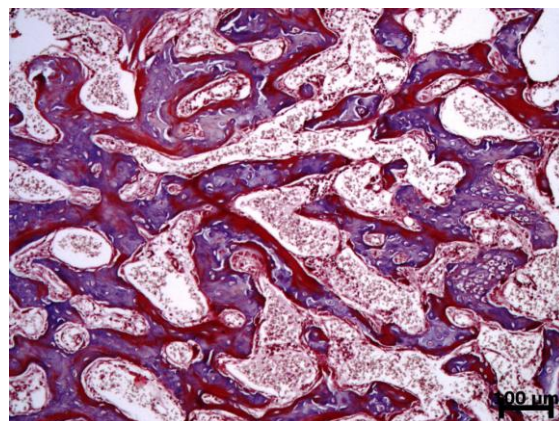


Figura 14 - Fotomicrografia do espécime do grupo LED mostrando presença intensa de colágeno (azul) no interior de numerosas trabéculas ósseas interconectantes (30 dias – TM) (ACIOLE, 2014).



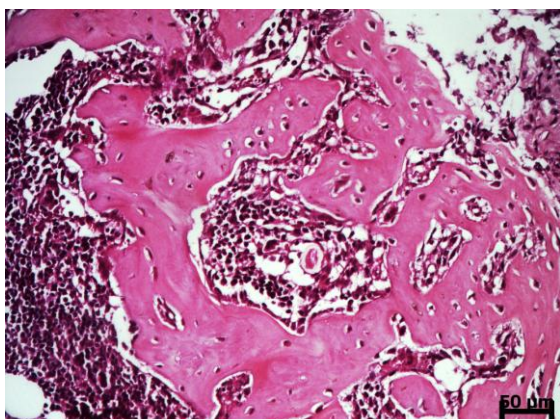


Figura 15 - Fotomicrografia do espécime do grupo Laser mostrando tecido ósseo neoformado caracterizado por trabéculas ósseas espessas com osteócitos regulares ou não no interior e osteoblastos em superfície. Notar área focal de reabsorção óssea e presença de inflamação crônica intensa (15 dias – HE) (ACIOLE, 2014).

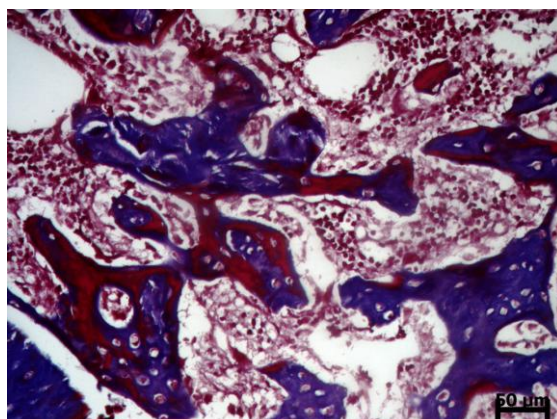


Figura 16 – Fotomicrografia do espécime do grupo Laser mostrando a presença intensa de colágeno (azul) no interior das trabéculas ósseas neoformadas (15 dias – TM) (ACIOLE, 2014).

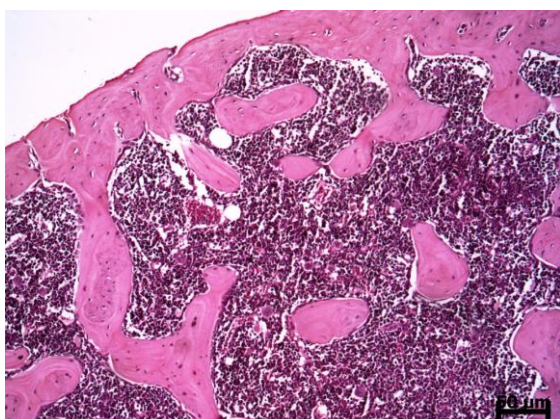


Figura 17 - Fotomicrografia do espécime do grupo Laser mostrando superfície do leito cirúrgico completamente preenchida por osso neoformado não espesso, do qual partem trabéculas ósseas com osteócitos no interior e linhas basofílicas paralelas entre si (30 dias – HE) (ACIOLE, 2014).

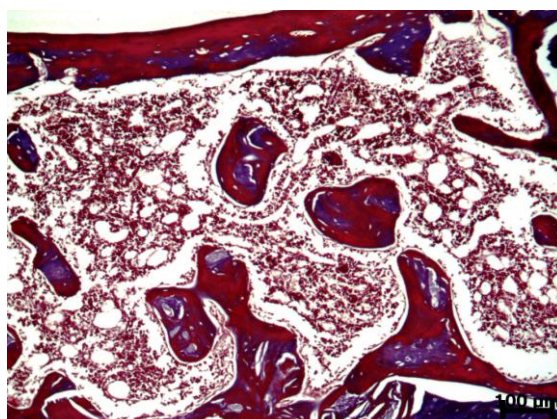


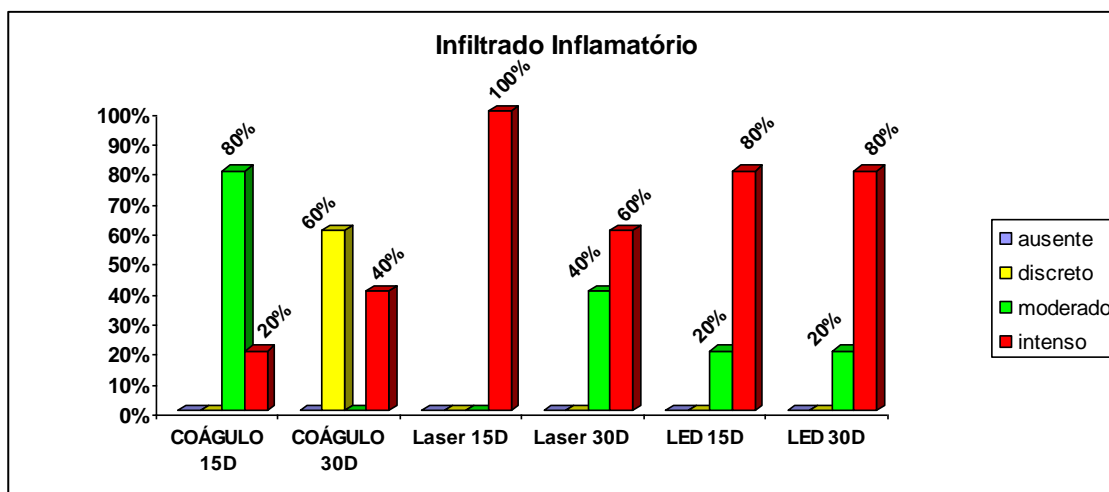
Figura 18- Fotomicrografia do espécime do grupo Laser mostrando uma quantidade moderada de colágeno (azul) no interior das trabéculas ósseas e na superfície óssea (30 dias – TM) (ACIOLE, 2014).



## 5.2- ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

### INFILTRADO INFLAMATÓRIO

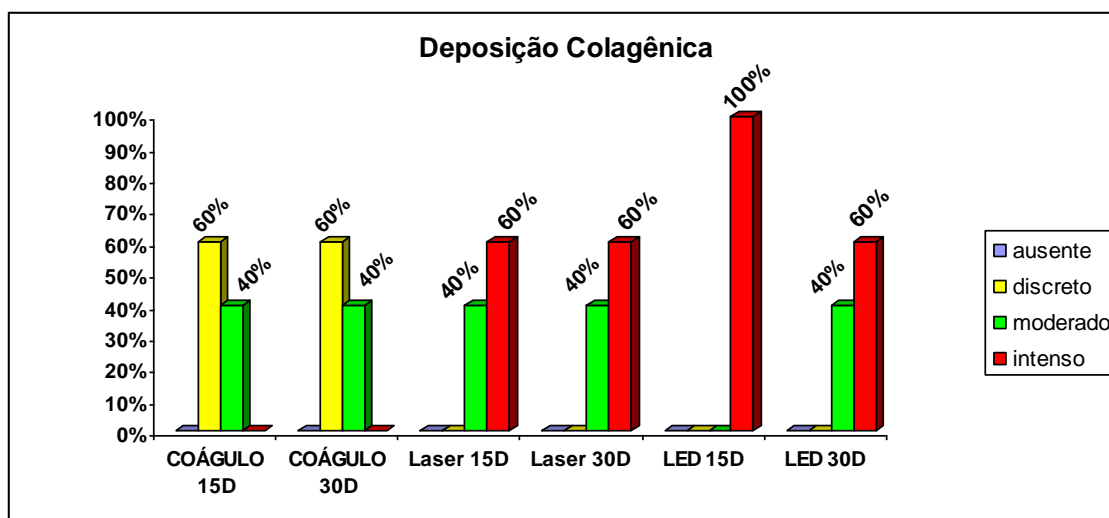
A análise histomorfométrica mostrou com relação à resposta inflamatória, que maiores intensidades de infiltrado inflamatório crônico foram encontradas nos grupos irradiados com Laser e LED, variando de moderado a intenso. Ressalta-se que no grupo Laser o infiltrado foi intenso em todos os espécimes (**Gráf. 01**). A análise estatística aos 15 dias mostrou diferença significativa dos grupos Laser e LED em relação ao grupo coágulo ( $p=0,01$ ) e ( $p=0,03$ ), respectivamente. Não houve diferença estatística entre os grupos ao final do período experimental de 30 dias, nem entre os tempos.



**Gráfico 01:** Resultado do exame histomorfométrico demonstrando os percentuais de inflamação crônica de todos os grupos experimentais. (ACIOLE, 2014).

## DEPOSIÇÃO COLAGÊNICA

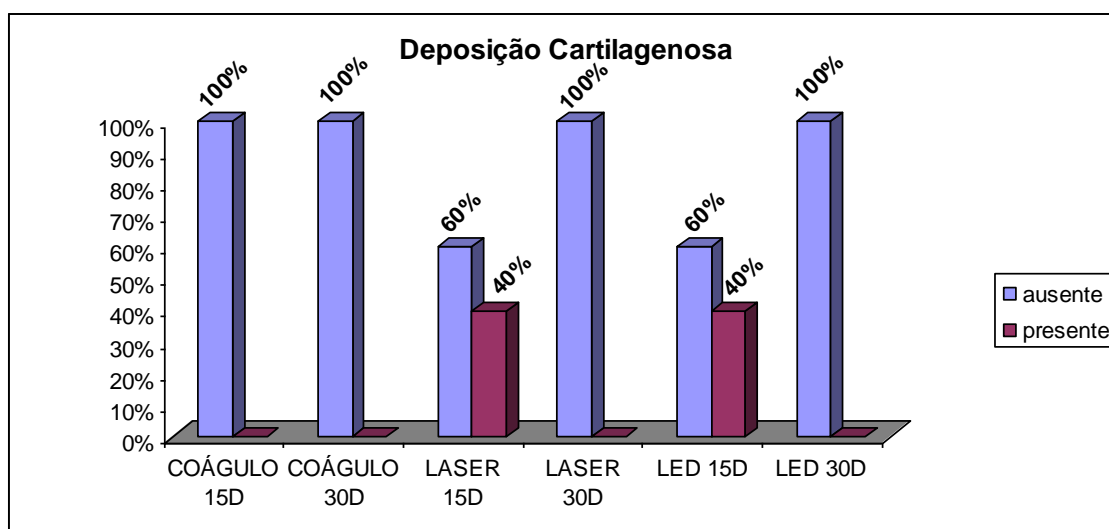
Nos grupos submetidos à irradiação Laser e LED, foi observado um aumento dos percentuais para o critério intenso com relação à deposição colagênica (**Gráf. 02**). Os grupos Laser e o LED, aos 15 dias, apresentaram diferença significativa em relação ao grupo Coágulo ( $p \leq 0,05$ ) e ( $p < 0,00$ ), respectivamente, sendo que o grupo LED foi o de maior intensidade. Ao trigésimo dia, os grupos Laser e LED se comportaram de forma semelhante e foram significativamente diferentes em relação ao grupo coágulo ( $p \leq 0,05$ ). Contudo, não houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos, nem entre os tratamentos.



**Gráfico 02:** Resultado do exame histomorfométrico demonstrando os percentuais de deposição de colágeno em todos os grupos experimentais. (ACIOLE, 2014).

## DEPOSIÇÃO CARTILAGENOSA

Com relação a deposição Cartilagenosa, o critério de avaliação foi de acordo com sua presença ou ausência na região do defeito. Sendo assim, observamos que apenas os grupos irradiados demonstraram sua presença (**Gráf. 03**). Estatisticamente não houve nenhuma diferença significativa entre os grupos, nem entre os tempos.



**Gráfico 03: Resultado do exame histomorfométrico demonstrando os percentuais de deposição cartilagenosa em todos os grupos experimentais. (ACIOLE, 2014).**

## REABSORÇÃO ÓSSEA

O Gráfico 04 mostra os percentuais apresentados em relação à reabsorção óssea, observou-se que a reabsorção nos grupos irradiados se fez de forma discreta. Estatisticamente evidenciou uma diferença significativa aos 15 dias dos grupos Laser e LED quando comparado ao grupo Coágulo

( $p < 0,01$ ) e ( $p = 0,01$ ), respectivamente. Ao final do período experimental os Laser e LED foram significativamente diferentes em relação ao grupo coágulo ( $p = 0,01$ ). Não houve diferença significativa entre os tratamentos e nem entre seus períodos experimentais.

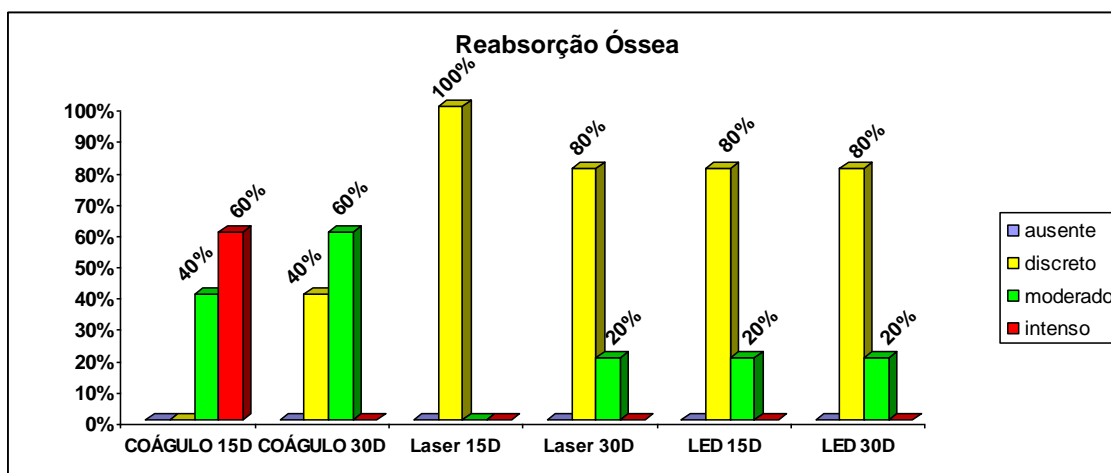


Gráfico 04: Resultado do exame histomorfométrico demonstrando o percentual de reabsorção óssea de todos os grupos experimentais (ACIOLE, 2014).

## NEOFORMAÇÃO ÓSSEA

No comparativo da neoformação óssea (**Gráf. 05**), pôde-se observar melhores resultados nos grupos irradiados, onde a mesma foi intensa. A análise histomorfométrica utilizada permitiu detectar diferença estatística aos 15 e 30 dias dos grupos Laser e LED em relação ao grupo Coágulo ( $p = 0,03$ ) e ( $p = 0,05$ ), respectivamente. Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos e seus períodos experimentais em ambos os tratamentos.

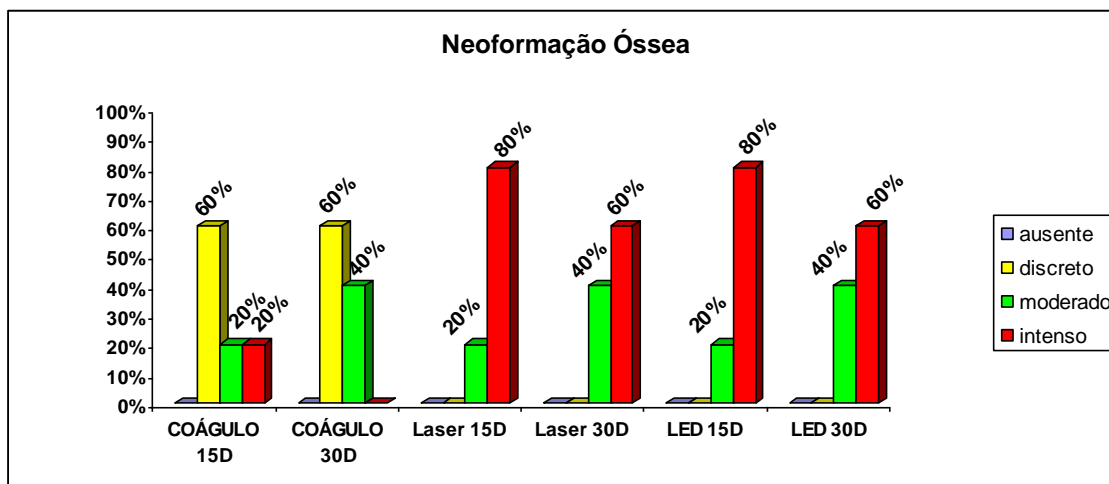


Gráfico 05: Resultado do exame histomorfométrico demonstrando os percentuais de neoformação óssea de todos os grupos experimentais (ACIOLE, 2014).

### 5.3- ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA RAMAN

O Espectro Raman do osso mostrou bandas vibracionais proeminentes relacionadas à sua composição tecidual. Inicialmente o pico da hidroxiapatita (HAC,  $\sim 960\text{cm}^{-1}$ ) foi identificado nos espectros médios dos grupos basal e Osteo, não tratados, observando uma menor intensidade para o grupo Osteo (Fig. 19). Desta forma, intensidades baixas representam menores concentrações de HAC no tecido, verificando também intensidades baixas dos picos  $\sim 1070\text{cm}^{-1}$  e  $\sim 1454\text{cm}^{-1}$  do grupo Osteo em relação ao Basal (Fig. 20). Espectros de todas as amostras foram obtidos conforme a metodologia descrita anteriormente.

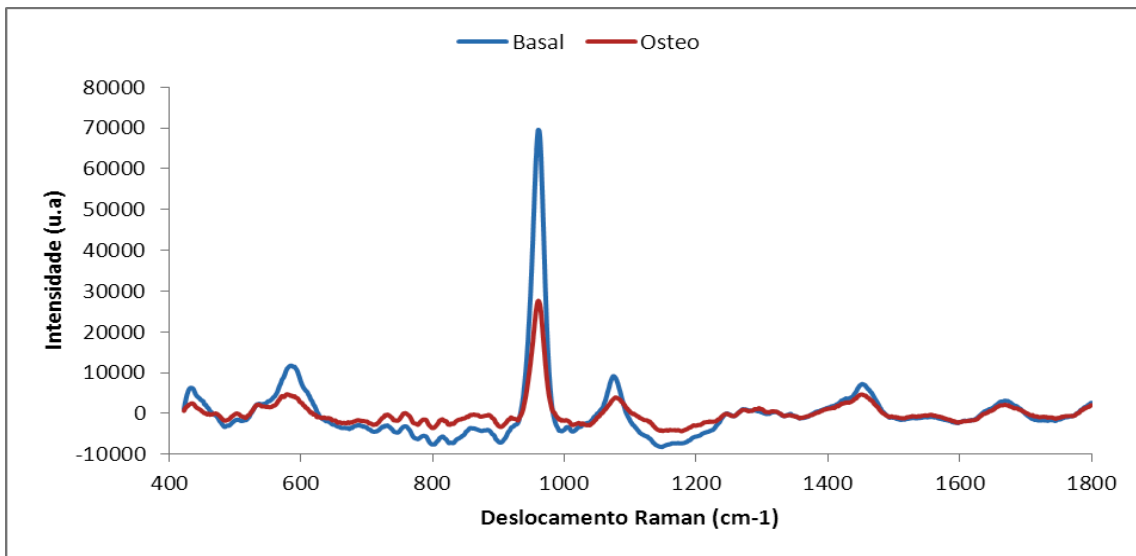


Figura 19 – Espectros Raman do grupo Basal e Osteo não tratados, onde se observam uma menor intensidade do pico de  $\sim 960\text{cm}^{-1}$  para o grupo Osteo. (ACIOLE, 2014).

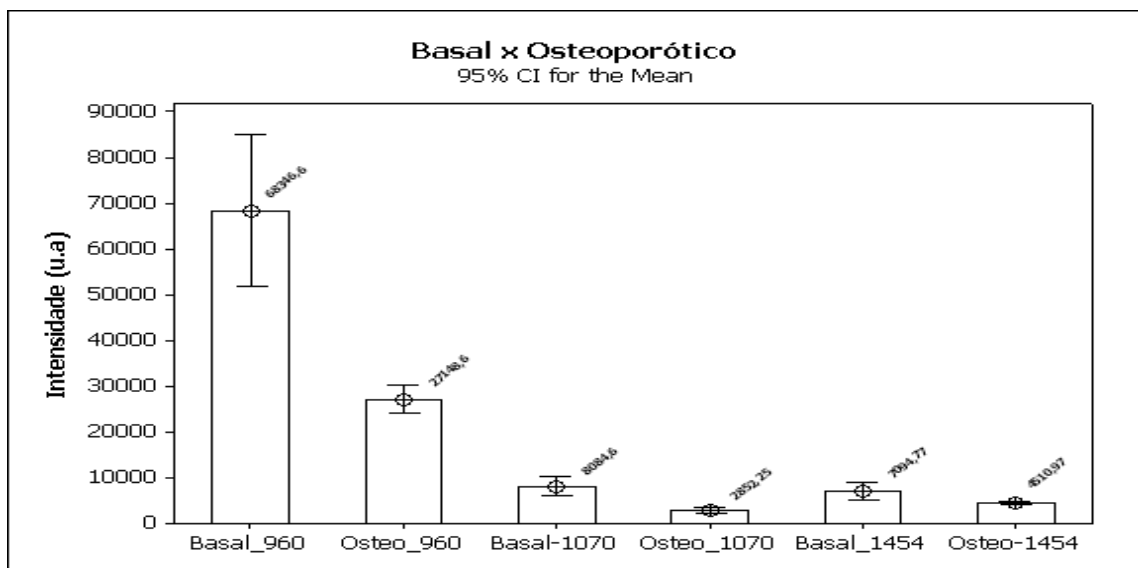


Figura 20 – Intensidades médias dos picos  $\sim 960\text{cm}^{-1}$ ,  $\sim 1070\text{cm}^{-1}$  e  $\sim 1454\text{cm}^{-1}$  dos grupos Basal e Osteo (ACIOLE, 2014).

A média espectral deslocada de cada grupo em cada tempo experimental (15 e 30 dias) pode ser vista nas **Figuras 21 e 22**.

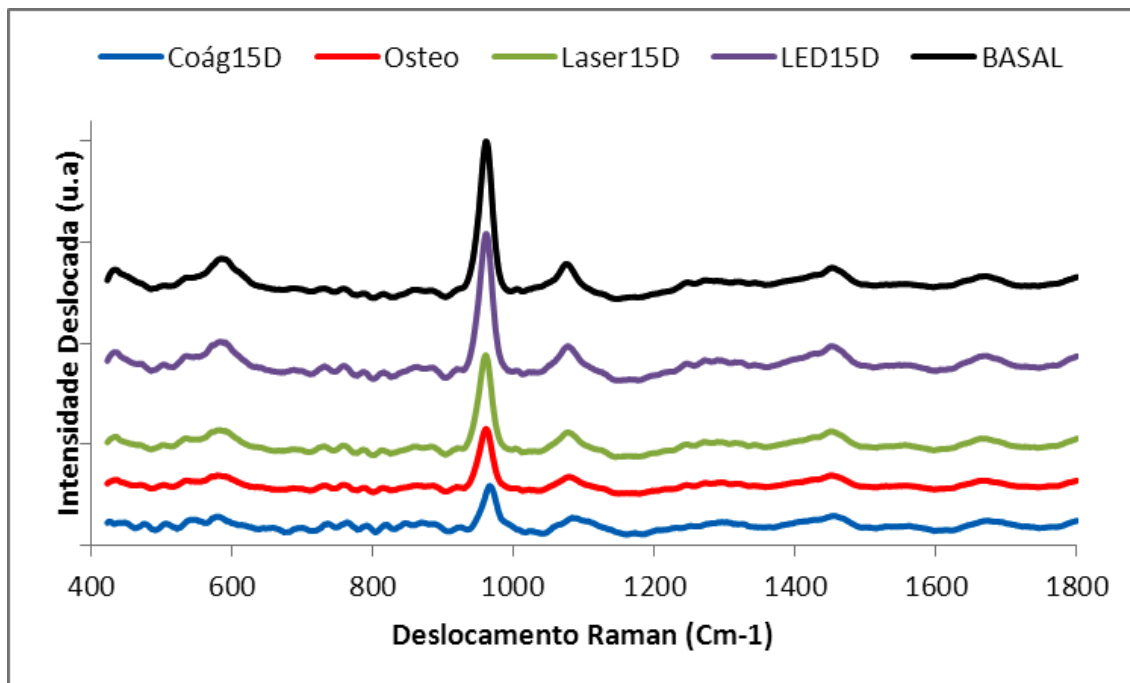


Figura 21 – Picos Raman de todos os grupos, aos 15 dias. Os espectros foram deslocados de acordo com o pico de  $\sim 960\text{cm}^{-1}$  (ACIOLE, 2014).

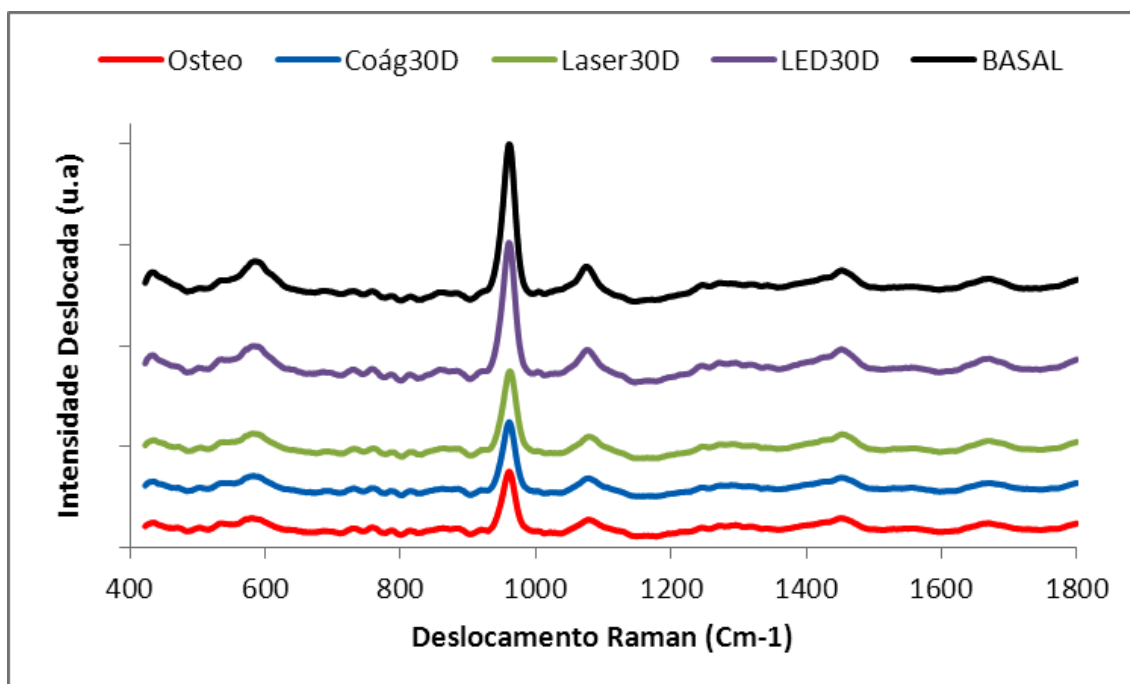


Figura 22 – Picos Raman de todos os grupos, aos 30 dias. Os espectros foram deslocados de acordo com o pico de  $\sim 960\text{cm}^{-1}$  (ACIOLE, 2014).

Os picos estudados foram divididos em dois grupos. No primeiro grupo foram analisados os picos relacionados aos componentes inorgânicos (HA fosfatada e carbonatada), representados pelos picos de  $\sim 960$  e  $\sim 1070$   $\text{cm}^{-1}$ . No segundo grupo, foi analisado o pico referente ao conteúdo orgânico (lipídeos e proteínas) da matriz óssea, representado pelo pico de  $\sim 1454$   $\text{cm}^{-1}$ .

Na medição das intensidades dos picos relacionados ao conteúdo inorgânico (HA) aos 15 dias mostrou para  $\sim 960$   $\text{cm}^{-1}$ , observou-se que o osso basal apresentou um valor médio de  $(68347 \pm 30006)$ , enquanto que de todos grupos experimentais, o grupo LED foi aquele que apresentou um melhor desempenho  $(62880 \pm 4361)$ , sendo o menor valor observado no grupo Coágulo  $(14900 \pm 6542)$  (**Fig. 23**). Para o pico  $\sim 1070$   $\text{cm}^{-1}$ , o maior valor médio foi detectado no grupo LED  $(6798 \pm 999)$ , e o menor no grupo Coágulo  $(1267 \pm 592)$  (**Fig. 24**). Aos 30 dias para o pico de  $\sim 960$   $\text{cm}^{-1}$  nos grupos experimentais a maior intensidade média foi observada no grupo LED  $(59798 \pm 18087)$ , e a menor no grupo Coágulo  $(31556 \pm 20012)$  (**Fig. 23**). Para o pico de  $\sim 1070$   $\text{cm}^{-1}$ , o maior valor médio foi observado no grupo LED  $(6601 \pm 2189)$  e o menor no grupo Laser  $(3484 \pm 1010)$  (**Fig. 24**).



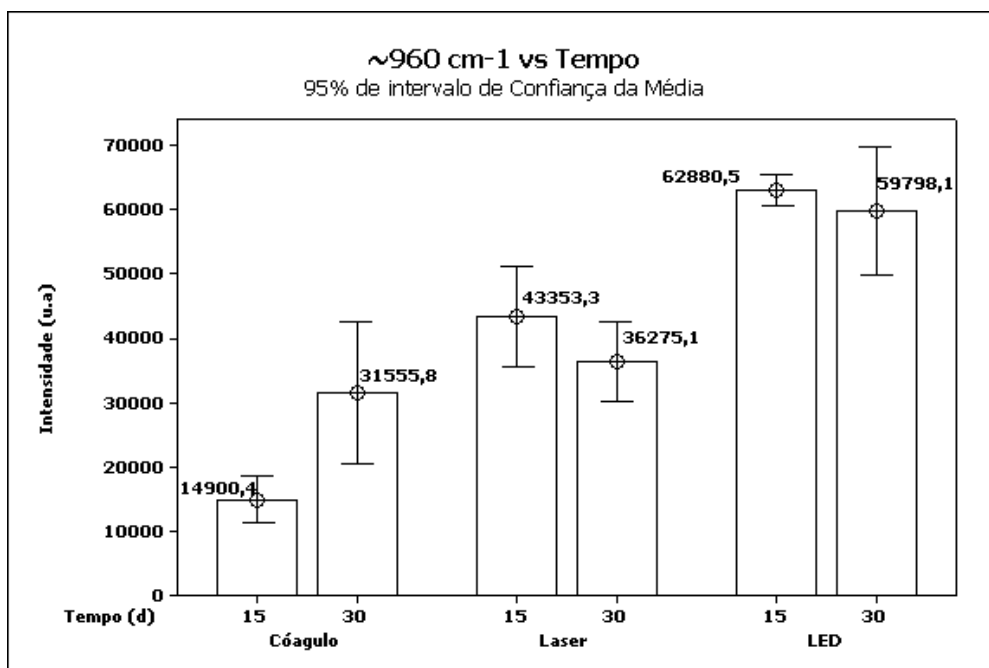


Figura 23 – Intensidades m6dias de todos os grupos para pico Raman ~960 cm<sup>-1</sup>, nos per6odos observacionais de 15 e 30 dias (ACIOLE, 2014).

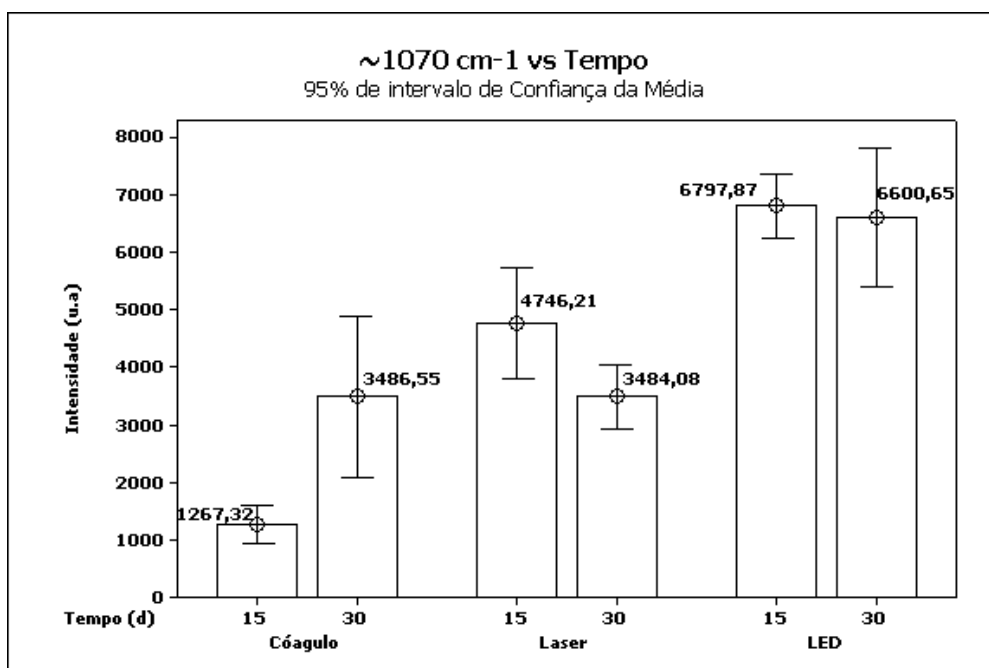


Figura 24 – Intensidades m6dias de todos os grupos para o pico Raman de ~1070 cm<sup>-1</sup>, nos per6odos observacionais 15 e 30 dias (ACIOLE, 2014).

Com relação ao conteúdo orgânico presente no tecido ósseo ( $\sim 1454$   $\text{cm}^{-1}$ ) aos 15 dias, a maior intensidade média foi vista no grupo LED ( $8326 \pm 1802$ ), e a menor no grupo Coágulo ( $4633 \pm 2651$ ) (**Fig. 25**). Aos 30 dias, a maior intensidade média foi observada no grupo LED ( $7951 \pm 2518$ ) e a menor no grupo Coágulo ( $4602 \pm 2125$ ) (**Fig. 25**).

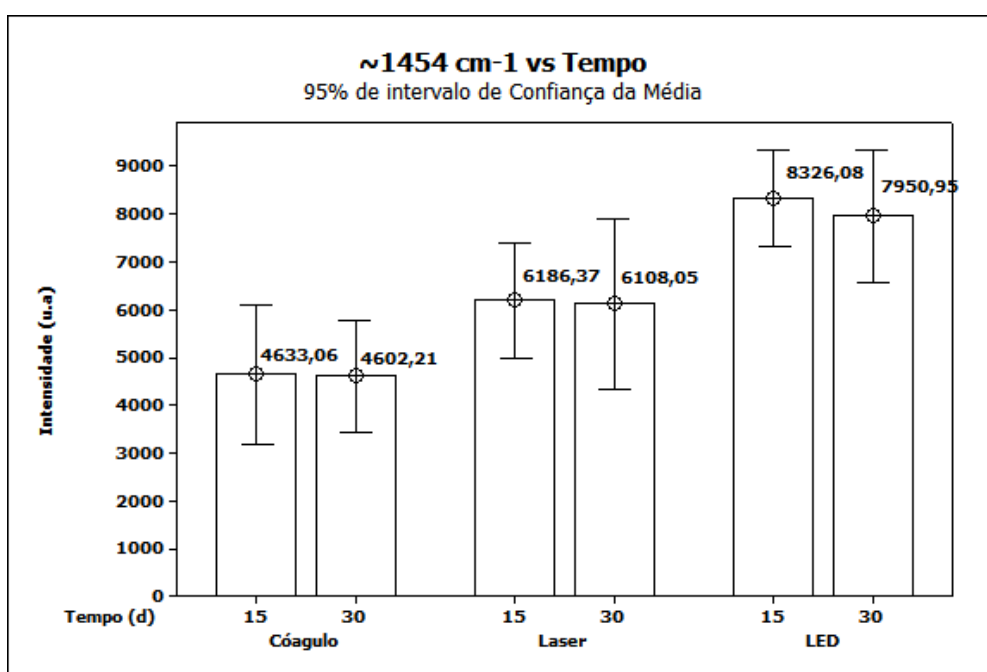


Figura 25 - Intensidades médias de todos os grupos para o pico Raman  $\sim 1454$   $\text{cm}^{-1}$ , nos períodos observacionais de 15 e 30 dias (ACIOLE, 2014).

Um resumo dos resultados das intensidades médias estudadas e seus desvios-padrão podem ser vistos nas **Tabelas 1 e 2**.

Tabela 1 – Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) das intensidades dos picos Raman estudados, aos 15 dias (ACIOLE, 2014).

<b>Group Raman Shift (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>BASAL</b>	<b>OSTEO</b>	<b>COÁGULO 15D</b>	<b>LASER 15D</b>	<b>LED 15D</b>
<b>~960</b>	68347 $\pm$ 30006	27149 $\pm$ 5721	14900 $\pm$ 6542	43353 $\pm$ 14173	62880 $\pm$ 4361
<b>~1070</b>	8085 $\pm$ 3824	2852 $\pm$ 982	1267 $\pm$ 592	4746 $\pm$ 1741	6798 $\pm$ 999
<b>~1454</b>	7095 $\pm$ 3323	4511 $\pm$ 615	4633 $\pm$ 2651	6186 $\pm$ 2180	8326 $\pm$ 1802

Tabela 2 – Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) das intensidades dos picos Raman estudados, aos 30 dias (ACIOLE, 2014).

<b>Group Raman Shift (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>BASAL</b>	<b>OSTEO</b>	<b>COÁGULO 30D</b>	<b>LASER 30D</b>	<b>LED 30D</b>
<b>~960</b>	68347 $\pm$ 30006	27149 $\pm$ 5721	31556 $\pm$ 20012	36275 $\pm$ 11054	59798 $\pm$ 18087
<b>~1070</b>	8085 $\pm$ 3824	2852 $\pm$ 982	3487 $\pm$ 2525	3484 $\pm$ 1010	6601 $\pm$ 2189
<b>~1454</b>	7095 $\pm$ 3323	4511 $\pm$ 615	4602 $\pm$ 2125	6108 $\pm$ 3199	7951 $\pm$ 2518

### Análise estatística

Os dados foram inicialmente analisados para verificar sua distribuição, tendo sido constatada sua normalidade. Por isso, foram escolhidos os testes estatísticos paramétricos ANOVA e teste T (pareado e não-pareado).

A primeira fase da análise constou da verificação de possíveis diferenças entre os grupos nos dois tempos experimentais (**Tab. 1 e 2**). Para tal, os dados foram avaliados através de ANOVA, cujos resultados podem ser vistos na **Tabela 3**. Na segunda fase foi realizada, quando apropriado, análise comparativa entre os grupos dois a dois, cujos resultados podem ser vistos nas **Tabelas 4 e 5**. Em seguida, foi feita a avaliação de possível influência do tempo nos resultados (**Tab. 6**).

**Tabela 3 - Resultados do teste ANOVA para cada pico nos períodos de 15 e 30 dias (ACIOLE, 2014).**

<b>Raman Shift (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>15 dias</b>	<b>30 dias</b>
<b>~960</b>	p < 0.001	p < 0.001
<b>~1070</b>	p < 0.001	p < 0.001
<b>~1454</b>	p < 0.001	p < 0.001

Tabela 04 – Análise estatística entre os grupos, dois a dois, aos 15 dias (ACIOLE, 2014).

Grupo Raman Shift (cm <sup>-1</sup> )	BASAL <sup>a</sup>	OSTEO <sup>b</sup>	COÁGULO <sup>c</sup>	LASER <sup>d</sup>	LED <sup>e</sup>
~960	68347 ± 30006 <sup>c,d</sup>	27149 ± 5721 <sup>c,d,e</sup>	14900 ± 6542 <sup>a,b,d,e</sup>	43353 ± 14173 <sup>a,b,c,e</sup>	62880 ± 4361 <sup>b,c,d</sup>
~1070	8085 ± 3824 <sup>c,d</sup>	2852 ± 982 <sup>c,e</sup>	1267 ± 592 <sup>a,b,d,e</sup>	4746 ± 1741 <sup>a,c,e</sup>	6798 ± 999 <sup>b,c,d</sup>
~1454	7095 ± 3323	4511 ± 615 <sup>e</sup>	4633 ± 2651 <sup>e</sup>	6186 ± 2180 <sup>e</sup>	8326 ± 1802 <sup>b,d,c</sup>

\*As letras indicam as diferenças observadas utilizando-se os resultados do Teste T.

Tabela 05 – Análise estatística entre os grupos, dois a dois, no período observacional de 30 dias (ACIOLE, 2014).

Grupo Raman Shift (cm <sup>-1</sup> )	BASAL <sup>a</sup>	OSTEO <sup>b</sup>	COÁGULO <sup>c</sup>	LASER <sup>d</sup>	LED <sup>e</sup>
~960	68347 ± 30006 <sup>c,d</sup>	27149 ± 5721 <sup>d,e</sup>	31556 ± 20012 <sup>a,e</sup>	36275 ± 11054 <sup>a,b,e</sup>	59798 ± 18087 <sup>b,c,d</sup>
~1070	8085 ± 3824 <sup>c,d</sup>	2852 ± 982 <sup>e</sup>	3487 ± 2525 <sup>a,e</sup>	3484 ± 1010 <sup>a,e</sup>	6601 ± 2189 <sup>b,c,d</sup>
~1454	7095 ± 3323 <sup>c</sup>	4511 ± 615 <sup>e</sup>	4602 ± 2125 <sup>a,e</sup>	6108 ± 3199	7951 ± 2518 <sup>b,c</sup>

\* As letras indicam as diferenças observadas utilizando-se os resultados do Teste T.

Tabela 06 - Resumo da análise estatística (teste-T) dos picos Raman dentro de cada grupo, em relação ao tempo (15 e 30 dias) (ACIOLE, 2014).

Grupo Raman Shift (cm <sup>-1</sup> )		BASAL	OSTEO	COÁGULO	LASER	LED
Tempo(d)						
~960	15d <sup>1</sup>	68347 ± 30006	27149 ± 5721	14900 ± 6542 <sup>2</sup>	43353 ± 14173	62880 ± 4361
	30d <sup>2</sup>			31556 ± 20012 <sup>1</sup>	36275 ± 11054	59798 ± 18087
~1070	15d <sup>1</sup>	8085 ± 3824	2852 ± 982	1267 ± 592 <sup>2</sup>	4746 ± 1741 <sup>2</sup>	6798 ± 999
	30d <sup>2</sup>			3487 ± 2525 <sup>1</sup>	3484 ± 1010 <sup>1</sup>	6601 ± 2189
~1454	15d <sup>1</sup>	7095 ± 3323	4511 ± 615	4633 ± 2651	6186 ± 2180	8326 ± 1802
	30d <sup>2</sup>			4602 ± 2125	6108 ± 3199	7951 ± 2518

\*Os números em sobrescrito indicam as diferenças entre os tempos (Teste T).

---

## 6. DISCUSSÃO

---

Devido à procura de novas terapias que auxiliem tanto no tratamento para a osteoporose como na reparação de fratura osteoporótica, foi que surgiu a ideia deste estudo, buscando uma melhora na qualidade de vida do indivíduo. As fototerapias Laser/LED possuem efeitos positivos, já descritos na literatura, sobre a função e a proliferação de células, e secreção de fatores de crescimento como BMPs, PDGF e TGF- $\beta$  (CARVALHO *et al.*, 2011; PINHEIRO *et al.*, 2012a,b, 2013). Esses fatores utilizados isoladamente foram eficazes na aceleração do processo de reparo ósseo em vários modelos experimentais. Entretanto, não possui trabalhos na literatura com a utilização das fototerapias Laser/LED na osteogênese em ratas osteoporóticas.

No presente estudo foram utilizadas ratas da linhagem Wistar, submetidas à ovariectomia bilateral. A retirada de ambos os ovários acarreta em diminuição dos níveis de estrógeno, onde após 60 dias da indução, o tecido ósseo já demonstra diminuição da massa óssea. O modelo de ratas ovariectomizadas para estudos da perda de massa óssea pós-menopausa é bem aceito, sendo o modelo preconizado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para estudos pré-clínicos de drogas para prevenção e intervenção da osteoporose (KALU, 1991; KODAMA, 2003; MELLO; GOMIDE, 2005; CANETTIERI, 2006; RENNO, 2006; RENNO, 2006; CANETTIERI, 2006; AMADEI *et al.*, 2006; DINIZ *et al.*, 2009).

Os defeitos ósseos são bons modelos para o estudo do processo de reparo tecidual. Ao contrario das fraturas, os defeitos são menos propensos a influência de fatores mecânicos e influências maiores do suprimento

sanguíneo. O rato é amplamente utilizado como modelo experimental por pesquisadores para avaliar o reparo ósseo, devido ao fato do processo de reparo ser similar ao observado em humanos, inclusive sendo homólogo o DNA dos ratos com o do humano, desta forma a resposta reparativa, sob uma variedade de condições, tem sido bem documentada justificando a nossa escolha pelo referido modelo animal (PINHEIRO *et al.*, 2011, 2012a,b, 2013).

Elegeu-se por confeccionar o defeito na diáfise proximal do fêmur, por se tratar de uma região metabolicamente mais ativa e assim mais susceptível a ação de estímulos mecânicos e fisiológicos, sendo uma das regiões de maior incidência de alterações causadas pela osteoporose em humanos (BRAZ *et al.*, 2003; PEREIRA, 2004; FERNANDES, 2005; JAIME *et al.*, 2005; CANETTIERI, 2006; DINIZ *et al.*, 2009).

Optou-se por utilizar no presente estudo um grupo controle osteoporótico, de forma que os animais de todos os grupos estariam num mesmo nível biológico, evitando desta forma utilizar como controle a área contralateral, o que poderia levar a resultados imprecisos, justificado pelo efeito sistêmico gerado pela fototerapia Laser/LED (PINHEIRO *et al.*, 2011, 2012a,b, 2013).

O protocolo de fototerapia Laser/LED utilizado neste estudo é semelhante aos utilizados em estudos anteriores (ACIOLE, 2010; SOARES, 2013) e, em todos os protocolos, modelos e parâmetros utilizados anteriormente ficou demonstrado que o uso das fototerapias no infravermelho próximo causa respostas teciduais importantes durante o reparo e que estas causam um processo de reparação mais rápido, bem como ocasiona uma melhoria da qualidade do osso recém-formado. É possível que o efeito da fonte



de luz sobre a regeneração óssea dependa não só da dose total de irradiação, mas também sobre o tempo de irradiação e o modo de irradiação e principalmente da fonte de luz utilizada (PINHEIRO, *et al.* 2009, 2011, 2012a,b, 2013).

A irradiação ocorreu de forma pontual, onde a caneta Laser e LED foram posicionadas numa angulação de 90° em relação ao longo eixo do osso em contato com a pele do animal (transcutaneamente). Estes cuidados permitem que a energia depositada penetre no tecido com menos perda por reflexão especular (ACIOLE, 2010).

Para avaliação do reparo ósseo, foram escolhidos dois períodos experimentais, 15 e 30 dias. Durante as fases iniciais do reparo ósseo, o componente celular (principalmente fibroblastos e osteoblastos) é mais proeminente e mais propenso a ser afetado pela luz. Aos 30 dias, o processo de reparo encontra-se em um estágio mais avançado, sendo esse período observacional bastante utilizado para avaliação do reparo ósseo em diversos estudos já publicados (WEBER *et al.*, 2006; TORRES *et al.*, 2007; CARVALHO *et al.*, 2011; PINHEIRO *et al.*, 2012a,b, 2013).

No presente estudo, optou-se por realizar uma análise histológica dos eventos ocorridos no local do defeito ósseo durante os períodos observados de 15 e 30 dias de forma descritiva, utilizando-se de um método semi-quantitativo baseado no conhecimento dos aspectos relacionados à normalidade. Estes se basearam nos parâmetros estabelecidos na metodologia.

As principais alterações histológicas observadas em todos os espécimes osteoporóticos foram trabéculas ósseas delgadas e mais afastadas, com suas conectividades reduzidas, alterações estas que são pertinentes da

osteoporose, características essas também observadas anteriormente por CARVALHO E CLIQUET em 2003.

Uma vez que o efeito anti-apoptótico do estrógeno sobre osteoblastos e osteócitos, não estava presente, atribui-se aos efeitos positivos da fototerapia a estimulação dessas células, visto que se observou uma atividade osteoblástica marcante e presença de osteócitos nos grupos tratados com Laser e LED em relação aos grupos Coágulo. Dessa forma, o aumento da neoformação óssea está intimamente relacionado, com ambos, aumento do número de osteoblastos e de sua atividade secretora, acelerando o processo de formação da matriz óssea e tornando-a mais resistente.

O tricrômico de Masson identificou presença de colágeno (importante precursor da deposição da hidroxiapatita), que se cora em azul no processo fibro-reparativo, onde os resultados demonstraram uma maior quantidade das fibras de colágeno em animais irradiados com Laser ou LED em comparação com os não irradiados, demonstrando assim que as fototerapias estimularam a proliferação de colágeno nos dois períodos experimentais. Este aspecto tem sido descrito em estudos anteriores que utilizaram luz Laser/LED (PINHEIRO *et al.*, 2009, 2011, 2012a).

A presença de um precursor cartilaginoso foi observada apenas, aos 15 dias, nos grupos LED e Laser, o que denotaria um processo reparativo em um estágio mais avançado que nos demais grupos.

O aspecto trabecular também variou entre os grupos experimentais. As trabéculas eram delgadas nos grupos Coágulo, entretanto nos grupos LED e Laser apresentaram-se de forma espessa e interconectantes. Ao final do período experimental, tanto no LED como no Laser as linhas basofílicas

encontravam-se depositadas de forma regular, paralelas entre si, o que pode ser indicativo da formação de um osso mais maduro no reparo.

Foi observada em ambos períodos experimentais uma resposta inflamatória moderada à intensa em todos os grupos estudados. Isto pode ser explicado por resultados obtidos em estudos anteriores que indicaram que a persistência da resposta inflamatória na reparação óssea pode ser resultado de atividade flogística provocada pelos coágulos de sangue residual (CONEGLIAN, 2007; PINHEIRO *et al.*, 2011).

Os resultados obtidos no presente estudo, no que se refere à comparação entre os grupos Irrradiados e não Irrradiados em relação à neoformação óssea, reabsorção óssea, resposta inflamatória e deposição de colágeno, evidenciou-se que os grupos tratados com Laser ou LED demonstraram melhores resultados histomorfométricos quando comparados com os grupos coágulo. Comparando os grupos irradiados entre si, em relação à análise histomorfométrica, observou-se que o grupo tratado com LED apresentou um melhor desempenho tanto na qualidade quanto a quantidade óssea.

Estudos recentes, utilizando espectroscopia Raman, encontraram aumento nos picos referentes a HA durante o processo de reparo, constatando que o método é eficaz na análise dos componentes minerais do tecido ósseo através da HA fosfatada ( $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$ ) e dos estágios transicionais, através da HA carbonatada ( $\sim 1070 \text{ cm}^{-1}$ ), e também dos componentes orgânicos, como o colágeno ( $\sim 1454 \text{ cm}^{-1}$ ), sendo considerado como padrão-ouro para estudar componentes ósseos e sua constituição, revelando alterações bioquímicas associadas ao processo de reparo, justificando sua escolha como marcador

ósseo neste trabalho (ACIOLE, 2010; LOPES *et al.*, 2010; MORRIS, MANDAIR, 2011; PINHEIRO *et al.*, 2010, 2012, 2013).

Utilizando a espectroscopia Raman neste trabalho pôde-se observar que a ovariectomia bilateral demonstrou-se eficaz, induzindo a diminuição da densidade óssea uma vez que os espectros obtidos do grupo Osteo apresentaram parâmetros (intensidade) significativamente menores quando comparados aos espectros obtidos do grupo Basal. Corroborando com os achados histológicos, que demonstraram nos grupos osteoporóticos, uma deposição das fibras colágenas de forma anômala com trabéculas adelgadas e não de modo lamelar como no osso saudável.

A intensidade do pico Raman da HA fosfatada ( $\sim 960\text{ cm}^{-1}$ ) está diretamente relacionada com a concentração/incorporação de HA pelo osso. O aumento da quantidade de HA no osso é indicativo de um osso mais resistente. Como demonstrado na **Figura 23**, a maior intensidade para esse pico, ao final do período experimental, foi observada no grupo LED, sendo o valor estatisticamente significativo quando comparado com todos os demais grupos. O pico de HA fosfatada ( $\sim 960\text{ cm}^{-1}$ ) é proeminente no tecido ósseo maduro, assim, seu aumento indica uma maior mineralização. O pico  $\sim 1070\text{ cm}^{-1}$  representa a HA carbonatada, que se origina através da substituição do grupo fosfato pelo grupo carbonato na estrutura molecular da HA, essa substituição provoca alteração no tamanho e organização dos cristais e caracteriza um osso transicional (imaturo), com propriedades diminuídas. Para este pico, o maior valor médio foi observado no grupo LED, sendo estatisticamente diferente de todos os grupos, sendo que o menor valor médio foi visto no grupo coágulo.

Mineralização pode também ser medida pela presença da matriz orgânica do osso em reparo. A matriz orgânica é principalmente composta por diferentes tipos de colágeno. No que diz respeito ao teor de matriz orgânica, tal como indicada por picos Raman na faixa entre  $\sim 1400 - \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ , as diferenças de intensidade observadas para o pico de  $\sim 1454 \text{ cm}^{-1}$ , mostraram um aumento significativo de intensidade nos grupos irradiados em relação ao grupo coágulo. Este pico está relacionado com a quantidade de colágeno depositado ao longo do reparo, e que a intensidade é aumentada no osso mais maduro, cuja matriz estaria mais organizada e onde a HA poderia ser incorporada. Assim, isto pode ser indicativo da presença de um tecido ósseo em um reparo mais avançado e maduro em indivíduos irradiados. No entanto, quando comparados os dois grupos irradiados, este fenômeno foi mais intenso no grupo LED em ambos períodos.

Especificamente em relação à utilização da fototerapia laser, os efeitos sobre as reações celulares tais como um aumento da síntese de ATP, a estimulação da cadeia de transporte de elétrons, e a redução do pH celular (KARU, *et al.* 2005a) e alterações bioquímicas outras e da condutividade da membrana celular, podem aumentar a atividade de macrófagos, fibroblastos, linfócitos, e de outras células envolvidas no reparo. O aumento da síntese de DNA e de colágeno, aumento da deposição de Ca (YAMADA, 1991), aumento da função de células do perióstio (TRELLES, 1987), o aumento da função de osteoblastos e osteócitos (MORRIS; MANDAIR, 2011; PENEL, *et al.* 2003), neovascularização melhorada (TANG, 1986), são alguns dos efeitos positivos da fototerapia laser na reparação óssea relatados anteriormente e que podem explicar os resultados deste estudo.

Quando da utilização da fototerapia LED, os resultados da presente investigação demonstraram que o uso da luz mostrou melhores resultados no que diz respeito à mineralização. Este aspecto tem sido descrito em estudos anteriores nos quais a utilização da luz LED, apresenta efeitos semelhantes aos do Laser, causando um aumento da proliferação de fibroblastos e também na sua secreção de colágeno, importante precursor da matriz óssea. O aumento da formação de osso neoformado está intimamente relacionado com aumento, tanto do número de osteoblastos como da sua capacidade de secreção (CARVALHO *et al.*, 2011; PINHEIRO; PINHEIRO *et al.*, 2012b, 2013).

As análises histológicas, histomorfométricas e espectroscópicas Raman dos grupos Laser e LED, mostraram que no período experimental inicial apresentaram melhor desempenho. Esses achados provavelmente se devem a uma característica da osteoporose pós-menopausa, que seria o fato de uma maior atividade osteoblástica nos primeiros 15 dias após supressão de estrogênio, que ocorre na tentativa de reverter o aumento acelerado da perda de massa óssea, corroborando com os achados na literatura (SARTORI *et al.*, 2008; CARVALHO e CLIQUET, 2003; TANIZAWA *et al.*, 2000). Esse fato associado aos efeitos da fototerapia favoreceu uma maior formação óssea.

Portanto, é importante se considerar que, os resultados deste estudo indicam que a fototerapia com laser e LED melhoraram o reparo ósseo em um modelo animal osteoporótico.

---

## 7. CONCLUSÃO

---

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, baseado na metodologia utilizada parece-nos lícito concluir que:

- Espectroscopicamente, utilizando-se o grau de mineralização óssea através dos picos Raman da HA fosfatada ( $\sim 960\text{ cm}^{-1}$ ), carbonatada ( $\sim 1070\text{ cm}^{-1}$ ) e do colágeno ( $\sim 1454\text{ cm}^{-1}$ ), os resultados obtidos indicaram que ambas as fototerapias, laser e LED, melhoraram a mineralização do osso neoformado.
- Histologicamente e histomorfometricamente, de acordo com os resultados obtidos nos grupos irradiados, evidenciou-se que ambas as terapias aplicadas no estudo, causaram um maior preenchimento pelo trabeculado ósseo, devido uma maior quantidade de osteoblastos e colágeno, observando sinais de diminuição da reabsorção óssea.
- A fotobiomodulação Laser ( $\lambda 780\text{nm}$ ) ou LED ( $\lambda 850 \pm 10\text{nm}$ ) foram eficazes na melhora do processo de reparo ósseo de defeitos ósseos confeccionados em fêmur de ratas osteoporóticas, submetidos à ovariectomia.

## REFERÊNCIAS

ACIOLE, G. T. S. **Avaliação da cicatrização óssea em fraturas cirúrgicas, provocadas em tibia de coelhos e mantidas com fixação rígida ou semi-rígida tratadas com ou sem laser e enxerto ósseo cerâmico bifásico.** Tese (Doutorado em Odontologia - Área de concentração: Laser em Odontologia). Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia – UFBA, Salvador, 2010.

AKKUS, O.; ADAR, F.; SCHAFFLER, M. B. Age-related changes in physicochemical properties of mineral crystals are related to impaired mechanical function of cortical bone. **Bone**, v. 34, n. 3, p. 443–453. 2004.

AL-WATBAN, F. A.; ANDRES, B. L. Polychromatic LED in Oval Full-Thickness Wound Healing in Non-Diabetic and Diabetic Rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, n. 1, p.10-16, 2006.

AMADEI, S.U.; SILVEIRA, V. A. S.; PEREIRA A. C.; et al. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **Journal Brasilian Pathology Medicine and Laboratory**, v.42, n.1, p. 5-12, 2006.

ARANHA, L. L. M.; CANELO, M. J. A.; SARDÓN, A. M.; et al. Qualidade de vida relacionada à saúde em espanholas com osteoporose. **Revista Saúde Pública**, v. 40, n. 2, p. 298-303, 2006.

ARAUJO, D. V.; OLIVEIRA, J. H. A. de and BRACCO, O. L. Custo da fratura osteoporótica de fêmur no sistema suplementar de saúde brasileiro. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.49, n.6, p. 897-901, 2005.



AWONUSI, A.; MORRIS, M. D; TECKLENBURG, M. M. J. Carbonate Assignment and Calibration in the Raman Spectrum of Apatite. **Calcified Tissue International**, v. 81, n.1, p. 46-52, 2007.

BALASCH, J. Sex steroids and bone: current perspectives. **Human Reproduction Update**, v. 9, n. 3, p. 207-22, 2003.

BAROLET, D. Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v.27, n.4, p.227–38, 2008.

BAROLET, D.; ROBERGE, C. J.; AUGER, F. A.; et al. Regulation of Skin Collagen Metabolism In Vitro Using a Pulsed 660nm LED Light Source: Clinical Correlation with a Single-Blinded Study. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 129, n. 12, p. 2751-2759, 2009.

BEZERRA J. B. **Estudo dos efeitos do ultra-som de baixa intensidade e do exercício físico sobre a consolidação de fraturas em ratos diabéticos.** [Dissertação]. Escola de Engenharia de São Carlos, 2005.

CARVALHO, D. C. **Ação do Ultra-som de baixa Intensidade em ossos de ratos Osteopenicas** [Dissertação]. São Carlos: Universidade de São Paulo; 2001.

CARVALHO, D. C. L.; CLIQUET, A. J. Ação do ultra-som de baixa intensidade sobre ossos de ratas osteopênicas. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.11, n. 1, p. 17-24, 2003.

CHAKRABORTY, T. R.; GORE, A. C. Aging-related changes in ovarian hormones, their receptors, and neuroendocrine function. **Experimental Biology and Medicine**, v. 229, n. 10, p. 977-87, 2004.

CORTET, B.; ORCEL, P.; ROUX, C. Que faire devant une ostéoporose post-ménopausique? Assessment and treatment of post-menopausal osteoporosis.

**Revue du Rhumatisme**, v. 73, n.8, p. 863–868, 2006.

CRANNEY, A. Treatment of postmenopausal osteoporosis. **British Medical Journal**, v. 327, n.16, p. 355-6, 2003.

CRUSOÉ-SOUZA, M.; ASSEMANY F. S.; LIMA A. T. C.; et al. Glicocorticoides e osteoporose - artigo de revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 9, Supl. 1, p. 57-64, 2010.

CRUSOÉ-SOUZA, M.; SASSO-CERRI, E.; CERRI, P. Immunohistochemical detection of estrogen receptor beta in alveolar bone cells of estradiol-treated female rats: possible direct action of estrogen on osteoclast life span. **Journal of Anatomy**. Araraquara, v. 215, n. 6, p. 273-81, 2009.

CVIJETIC S.; MESTROVIC T.; CRKVENAC A.; et al. Quality of life in osteoporotic patients with hip fracture and without fracture. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v, 53, n. 4, p. 257- 62, 2002.

DAI, J.; RABIE, A. B. VEGF: An essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification. **Journal of Dental Research**, v. 86, n. 10, p. 937-50, 2007.

DECKERS, M. KARPERIEN, M.; VAN DER BENT, C.; et al. Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. **Endocrinology**, Takasaki, v. 141, n. 5, p. 1667-74, 2000.

DIMITRIOU, R. JONES, E.; MCGONAGLE, D.; et al. Bone regeneration: current concepts and future directions. **BMC Medicine**. v. 9, n. 66, p. 2-10, 2011.

DINIZ J. S. **Efeito do laser de baixa potência (GaAIs) associado ao uso do Biofosfonato em tecidos ósseos de ratas ovariectomizadas, analisado por Espectroscopia Raman e Histomorfometria** [Dissertação]. São José dos Campos, SP: Faculdade de Bioengenharia da Universidade do Vale do Paraíba; 2006.

DOBLARÉ, M.; GARCÍA, J. M.; GÓMES, M. J. Modeling bone tissue fracture and healing: a review. **Engineering Fracture Mechanics**, v.71, n. 13, p. 1809-1840, 2004.

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

EDDY, D. M.; JOHNSTON, C. C. JR.; CUMMINGS, S. R. Osteoporosis: Review of the evidence for prevention, diagnosis, and treatment and cost-effectiveness analysis. **Osteoporosis International**, v. 8, n.4 p.1-88, 1998.

EIS, S. R. Diagnostico da Osteoporose: Recursos e Otimização da Pratica Clinica. **Clinica Ortopédica**, v. 4, n. 2, p.283-315, 2003.

FARLAY, D.; PANCZER, G.; REY, C. Mineral maturity and crystallinity index are distinct characteristics of bone mineral. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 28, n. 4, p. 433-45, 2010.

FREITAS I. G. F. **Ação do laser de HeNe na osteogênese** [Tese]. Campinas Faculdade de Engenharia Elétrica e Computação da Universidade Estadual de Campinas; 2001.

GARDNER, M. J.; BROPHY, R. H.; DEMETRAKOPOULOS, D.; et al. Intervenção para Reforçar o Tratamento da Osteoporose após Fratura do

Quadril. **The Journal of Bone and Joint Surgery (American)**, v. 87, p. 3-7, 2005.

GERBER, H. P.; VU, T. H.; RYAN, A. M.; et al. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. **Nature Medicine**, San Francisco, v. 5, n. 6, p. 623-81, 1999.

GERBI, M. E. M. M. **Avaliação da eficácia do laser de 830-nm no reparo ósseo de feridas cirúrgicas associadas ou não a implante de proteínas morfogenéticas ósseas e membrana biológica**. Tese (Doutorado em Odontologia – Área de concentração: Laser em Odontologia). Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia – UFBA, Salvador, 2004.

GERBI, M. E. M. M.; MARQUES, A. M. C.; RAMALHO, L. M. P.; et al. Infrared Laser Light Further Improves Bone Healing When Associated with Bone Morphogenic Proteins: An in Vivo Study in a Rodent Model. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 26, n.1. p. 55-60, 2008a.

GERBI, M. E. M. M.; PINHEIRO, A. L. B.; RAMALHO, L. M. P. Effect of IR laser photobiomodulation on the repair of bone defects grafted with organic bovine bone. **Lasers in Medical Science**, v. 23, n. 3, p. 313-317, 2008b.

GERSTENFELD, L. C.; CHO, T.J.; KON, T.; et al. Impaired fracture healing in the absence of TNF-alpha signaling: the role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption. **Journal of Bone and Mineral Research**, Boston, v.18, n. 9, p. 1584-92, 2003.

GIANA, H. E. ; SILVEIRA JR., L.; ZÂNGARO, R. A.; et al. Rapid Identification of Bacterial Species by Fluorescence Spectroscopy and Classification Through

Principal Components Analysis. **Journal of Fluorescence**, v. 13, n. 6, p. 489-493, 2003.

GIANNOUDIS, P.; JONES, E.; EINHORN, T. Fracture healing and bone repair. *Injury*, **International Journal Care Injured**, v. 42, p. 549-50. 2011.

GIANNOUDIS, P.; JONES, E.; EINHORN, T. Fracture healing and bone repair. **Injury, International Journal Care Injured**, Boston, v. 42, p. 549-50. 2011.

GIRO, G. COELHO, P. G.; SALES-PESSOA, R.; et al. Influence of estrogen deficiency on bone around osseointegrated dental implants: an experimental study in the rat jaw model. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 69, n. 7, p. 1911-8, 2011.

HAACH L. C. A. **Utilização do exercício físico versus ultra-som pulsado de baixa intensidade na manutenção de massa óssea**. Dissertação de Mestrado Programa de Pós Graduação Interunidades em Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos. 2006.

HUANG, P. J.; HUANG, Y. C.; SU, M. F.; et al. In vitro observations on the influence of copper peptide aids for the LED photoirradiation of fibroblast collagen synthesis. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 25, n. 3, p. 183–90, 2007.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**, 11. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 542p.

KALU, D. N.; The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone Mineral Limerick**, v.15, n.3, p.175-91, Dec. 1991.

KARU, T. I.; KALENDO, G. S.; LETOKHOV, V. S.; *et al.* Biostimulation of HeLa cells by low intensity visible light. **Il Nuovo Cimento D**, v. 1, n. 6, p. 828, 1982.

KARU, T. I.; PYATIBRAT, L. V.; AFANASYEVA, N. I. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. **Lasers Surgery Medicine**, v. 36, n. 4 p. 307–14, 2005b.

KARU, T. I.; PYATIBRAT, L. V.; MOSKVIN, S.V. Elementary Processes in Cells after Light Absorption Do Not Depend on the Degree of Polarization: Implications for the Mechanisms of Laser Phototherapy. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 26, n. 2, p. 77–82, 2008.

KARU, T. I.; TIPHLOVA, O. A.; LETOKHOV, V. S.; *et al.* Stimulation of E. coli growth by laser and incoherent red light, **Il Nuovo Cimento D**, v. 2, n.4, p. 1138, 1983.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. Tecido ósseo. In: Histologia e embriologia oral. São Paulo: **Panamericana**, cap 3, p. 40-75, 1999.

KERAMARIS, N.C.; CALORI, G.M.; NIKOLAOU, V. S. Fracture va scularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF. **Injury**, v. 39, n. 2, p.45 – 57, 2008.

KESSEL R. G. Tecido conjuntivo: osso e formação óssea. In: Histologia médica básica: a biologia das células, tecidos e órgãos. Trad. M.c. Engelhardt. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001; cap.7:129-45.

KHOSLA, S.; WESTENDORF, J.J.; MODER, U.I. Concise review: Insights from normal bone remodeling and stem cell-based therapies for bone repair. **Stem Cells**, v. 28, n. 12, p. 2124-8, 2010.

KHOSLA, S.; WESTENDORF, J. J.; MODER, U. I. Concise review: Insights from normal bone remodeling and stem cell-based therapies for bone repair. **Stem Cells**, v. 28, n. 12, p. 2124-8, 2010.

KODAMA, A. C. **Efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade em um modelo ósseo de ratas ovariectomizadas analisados por meio do ensaio de flexo-compressão**. 77p. [Dissertação]. Programa de Pós-graduação Interunidades em Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

KOURKOUMELIS, N.; TZAPHLIDOU, M. Spectroscopic Assessment of Normal Cortical Bone: Differences in Relation to Bone Site and Sex. **The Scientific World Journal** , v. 5, n. 10,p. 402–412, 2010.

LELOVAS, P.P. XANTHOS, T. T.; THOMA, S. E.; et al., The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. **Comparative Medicine**. v. 58, n. 5, p. 424-30. 2008.

LIANG, L.; YU, J. F.; WANG, Y.; et al. Estrogen regulates expression of osteoprotegerin and RANKL in human periodontal ligament cells through estrogen receptor beta. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 9, p. 1745-51, 2008.

LIPS, P.; VAN SCHOOR, N. M. Quality of life in patients with osteoporosis. **Osteoporosis International**, v. 16, p.447-455, 2005.

LOPES, C. B.; PACHECO, M. T. T.; SILVEIRA JUNIOR, L.; 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. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v. 4, n. 4, p. 1257-63, 2010.

LOPES, C. B.; PINHEIRO, A. L. B.; SATHAIAH, S.; *et al.* Infrared laser photobiomodulation (830nm) on bone tissue around dental implants: A raman spectroscopy and Scanning Eletronic Microscopy study in rabbits. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 25, n. 2, p. 96-101, 2007.

MANOLAGAS, S. C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. **Endocrine reviews**, v. 21, n. 2, p. 115-37, 2000.

MANOLAGAS, S. C.; KOUSTENI, S.; JILKA, R.L. Sex steroids and bone. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 57, p. 385-409, 2002.

MARCU, F.; BOGDAN, F.; MUȚIU, G.; *et al.* The histopathological study of osteoporosis. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**. v. 52, n. 1, p. 321-5, 2011.

MARSELL, R.; EINHORN, T.A. The biology of fracture healing. **Injury**, v. 42, n. 6, p. 551-5, 2011.

MARTINI, F. H. Fundamentals of anatomy and physiology. 4th ed. New Jersey: Prentice Hall, 1998.

MCNAMARA, L. M. Perspective on post-menopausal osteoporosis: establishing an interdisciplinary understanding of the sequence of events from the molecular level to whole bone fractures. **Journal of the Royal Society**, v. 7, n. 44, p. 353-72, 2010.

MEIRELLES, G. C.; SANTOS, J. N.; CHAGAS, P. O.; *et al.* A comparative study of the effects of laser photobiomodulation on the healing of third-degree



burns: a histological study in rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 26, n. 2, p. 159-66, 2008.

MENDONÇA, R. N. S.; ALVES, J. G. B. Custos hospitalares com crianças e adolescentes vítimas de traumatismos no Estado de Pernambuco em 1999, **Acta Ortopédica Brasileira**, v.12, n.3, p.141-145, 2004.

MICHAEL, H. HÄRKÖNEN, P.L.; VÄÄNÄNEN, H. K.; et al. Estrogen and testosterone use different cellular pathways to inhibit osteoclastogenesis and bone resorption. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 20, n. 12, p. 2224-32, 2005.

MORRIS, M. D.; MANDAIR, G. S. Raman Assessment of Bone Quality. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 469, n. 8, p. 2160-2169, 2011.

NAKAMURA, T.; IMAI, Y.; MATSUMOTO, T.; et al. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of fas ligand in osteoclasts. **Cell**, v. 130, n. 5, p. 811-23, 2007.

NASCIMENTO, S. B. **Estudo densitométrico comparativo da ação da calcitonina e laserterapia em reparação de defeitos ósseos em fêmures de ratos castrados** [dissertação]. São José dos Campos, SP: Faculdade de Engenharia Biomédica Universidade do vale do Paraíba; 2003.

NOGUEIRA, G. V.; SILVEIRA JR., L.; MARTIN, A. A. *et al.* Raman spectroscopy study of atherosclerosis in human carotid artery. **Journal of Biomedical Optics**, v. 10, n. 3, p. 171-178, 2005.

NUNES, L. O.; MARTIN, A. A.; SILVEIRA JR., L.; *et al.* FT-Raman Spectroscopy Study of Skin Cancer diagnosis. **Spectroscopy**, v. 17, n. 3, p. 597-602, 2003.

OLIVEIRA, L. G. Osteoporose – Conduta Prática para o Diagnostico e Tratamento. Atualização em Ortopedia, **SBOT**, v. 3, p.7-18, 2003.

OLIVEIRA, A. P.; BITAR, R. A.; SILVEIRA JR., L.; *et al.* Near-infrared Raman spectroscopy for oral carcinoma diagnosis. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, n. 3, p. 348-353, 2006.

Organización Mundial de la Salud - OMS. Informe preliminar y recomendaciones de una comisión de expertos de la Organización Mundial de la Salud sobre una estrategia global para la osteoporosis. **Rev Esp Enfer Metab Óseas**, v.9, n. 2, p. 78-83, 2000.

OTERO, E. U.; SATHAIAH, S.; SILVEIRA JR., L.; *et al.* Raman spectroscopy for diagnosis of calcification in human heart valves. **Spectroscopy**, v. 18, n. 1, p. 75-84, 2004.

OURSLER, M. J.; PEDERSON, L.; PYFFEROEN, J.; *et al.* Estrogen modulation of avian osteoclast lysosomal gene expression. **Endocrinology**, v. 132, n. 3, p.1373-80, 1993.

PACIFICI, R. Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis - the second decade. **Endocrinology**, v. 139, n. 6, p. 2659-61, 1998.

PARKER, M. J.; PALMER, C. R. Prediction of rehabilitation after hip fracture. **Age Ageing**, v. 24, n.2, p.60-7, 1995.

PAULA, JR. A. R.; SILVEIRA, JR., L.; PACHECO, M. T. T. ProRaman: a program to classify Raman spectra. **Analyst**, v. 134, n. 6, p. 1203-1207, 2009.

PINHEIRO, A. L. B.; ACIOLE, G. T. S.; CANGUSSÚ, M. C. T.; *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. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v. 95, n. 4, p. 1041-1047, 2010.

PINHEIRO, A. L. B.; BRUGNERA JR, A.; ZANIN, F. A. A. **Aplicação do Laser na Odontologia**. Paulo: Santos, 2010. 428 p.

PINHEIRO, A. L. B.; GERBI, M. E. M. M. Photoengineering of bone repair processes. **Photomedicine Laser Surgery**, v. 24, n. 2, p. 69–178, 2006.

PINHEIRO, A. L. B.; GERBI, M. E. M. M.; LIMEIRA JUNIOR, F. A.; *et al.* Bone repair following bone grafting hydroxyapatite, guided bone regeneration and infrared laser photobiomodulation: a histological study in a rodent model. **Lasers in Medical Science**, v. 24, n.2, p. 234-240, 2009.

PINHEIRO, A. L. B.; GERBI, M. E. M.; PONZI, E. A. C.; *et al.* Infrared Laser Light Further Improves Bone Healing When Associated with Bone Morphogenetic Proteins and Guided Bone Regeneration: An in Vivo Study in a Rodent Model. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 26, n. 2, p. 167-174, 2008.

PINHEIRO, A. L. B.; SANTOS, N. R. S.; OLIVEIRA, P. C.; *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 in Medical Science**, v. 28, n. 2, p. 513–518, 2013.

PINHEIRO, A. L. B.; SOARES, L. G. P.; ACIOLE, G. T. S.; *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. **Journal of Biomedical Material Research part A**, v. 98, n. 2, p. 212-21, 2011.

PINHEIRO, A. L. B.; SOARES, L. G. P.; BARBOSA, A. F. S. *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 in Medical Science**, v. 27, n. 5, p. 1013-24, 2012a.

PINHEIRO, A. L. B.; SOARES, L. G. P.; CANGUSSU, M. C. T.; *et al.* Effects of LED phototherapy on bone defects grafted with MTA, bone morphogenetic proteins and guided bone regeneration: a Raman spectroscopic study. **Lasers in Medical Science**, v. 27, n. 5, p. 903-16, 2012b.

PINHEIRO, M.; EIS, S.R. Epidemiology of osteoporotic fractures in Brazil: what we have and what we need. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. v.54, n. 2, p. 164-70, 2010.

PIPPA, M. G. B. Densitometria óssea e osteoporose: importância na clínica médica. **Músculos, movimentos & ossos**, v.11, p.14-18, 1996.

QUINN, J. M.; GILLESPIE, M. T. Modulation of osteoclast formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Fitzroy, v. 328 n. 3, p. 739-45, 2005.

RAHN, B.A. Bone healing: histologic and physiologic concepts. In: Fackelman GE, editor. **Bone in clinical orthopedics**, p. 287–326, 2002.

RENNO, A. C. M. **Efeito de um programa de atividade física e do laser de baixa intensidade no fêmur de ratas osteopênicas** [Tese]. São Carlos: Faculdade de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos; 2006.

RICKARD, D.J.; Subramaniam, M.; Spelsberg, T. C. Molecular and cellular mechanisms of estrogen action on the skeleton. Rochester: **Journal of Cellular Biochemistry Supplements**, v. 32/33, p. 123- 32, 1999.

RIGGS, B. L. Endocrine causes of age-related bone loss and osteoporosis. **Novartis Foundation symposium**, Rochester, v. 242, p. 247-59, d. 260-4, 2002.

RIGGS, B. L. The mechanism of estrogen regulation of bone resorption. **Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 10, p. 1203-04, 2000.

ROBLING, A. G. CASTILLO A. B.; TURNER, C. H. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. Indianapolis: **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 8, p. 455-98, 2006.

ROCHA, R.; VILLAVERDE, A. B.; SILVEIRA JR., L.; *et al.* Fluorescence and Reflectance Spectroscopy for Identification of Atherosclerosis in Human Carotid Arteries Using Principal Components Analysis. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 26, n. 4, p. 329-335, 2008.

ROCHA, R.; SILVEIRA JR., L.; VILLAVERDE, A. B.; *et al.* Use of near-infrared Raman spectroscopy for identification of atherosclerotic plaques in the carotid artery. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 25, n. 6, p. 482-486, 2007a.

ROCHA, R.; VILLAVERDE, A. B.; PASQUALUCCI, C. A.; *et al.* Identification of Calcifications in Cardiac Valves by Near Infrared Raman Spectroscopy. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 25, n. 4, p. 287-290, 2007b.

SCHROEDER, J. E.; MOSHEIFF, R. Tissue engineering approaches for bone repair: concepts and evidence. **Injury**, v. 42, n. 6, p. 609-13. 2011.

SFEIR, C. Fracture Repair. **Bone regeneration and repair**. Lieberman JR, Friedlaender GE, editors. Totowa, 2005.

SHARP M. D. Consenso Mexicano de Osteoporosis. **La Revista de Investigación Clínica**, v. 53, n.5, p.469-95, 2001.

SILVEIRA, JR. L.; SATHAIAH, S.; ZÂNGARO, R. A.; *et al.* Correlation Between Near-Infrared Raman Spectroscopy and the Histopathological Analysis of Atherosclerosis in Human Coronary Arteries. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 30, n. 4, p. 290-297, 2002.

SILVEIRA JUNIOR, L. **Correlação entre a técnica de Espectroscopia Raman e a Análise Histológica das placas ateromatosas em artérias mcoronárias humanas**. Tese (Doutorado em Ciências - Área de concentração de Fisiopatologia experimental) Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, 2001.

SIMON, L. S. Osteoporosis. **Clinics in Geriatric Medicine**, v. 21, n. 3, p. 603-29, 2005.

SOARES, L. G. P. **Avaliação da Fotobiomodulação LASER/LED em enxerto de Fosfocerâmica Bifásica de Hidroxiapatita e  $\beta$ -Trifosfato de cálcio em defeitos ósseos: estudo histológico e por espectroscopia Raman em modelo animal**. Tese (Doutorado em Odontologia - Área de concentração: Laser em Odontologia). Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia – UFBA, Salvador, 2013.

SOUSA, A. P. C.; SANTOS, J. N.; REIS JR, J. A.; *et al.* Effect of LED Phototherapy of Three Distinct Wavelengths on Fibroblasts on Wound Healing:

A Histological Study in a Rodent Model. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28, n.4 p. 547-52, 2010.

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. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 26, n. 4, p. 371-377, 2008.

TORTORA, G. J. O sistema esquelético. In: Corpo humano: fundamentos de anatomia e fisiologia. 4.ed. Trad. de Cláudia L. Zimmer et al. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, cap.6, p.98-139, 2000.

WEISS, R. A.; McDANIEL, D. H.; GERONEMUS, R. G.; *et al.* Clinical Experience with Light Emitting Diode (LED) Photomodulation. **Dermatologic Surgery**, v. 31, n. 9, p. 1199-1205, 2005.

WHELAN, H. T.; SMITS, T. L.; BUCHMAN, E. V.; *et al.* Effect of NASA Light-Emitting Diode Irradiation on Wound Healing. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, v. 19, n. 6, p.305-314, 2001.

WHELAN, H. T.; BUCHMANN, E. V.; DHOKALIA, A.; *et al.* Effect of NASA Light Emitting Diode Irradiation on Molecular Changes for Wound Healing in Diabetic Mice. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, v. 21, n. 2, p. 67-74, 2003.

WHELAN, H. T.; CONNELLY, M. D.; HODGSON, B. D.; *et al.* NASA Light Emitting Diodes for the Prevention of Oral Mucositis in Pediatric Bone Marrow Transplant Patients. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, v. 20, n. 6, p. 319-324, 2002.

YANG, X. RICCIARDI, B. F., HERNANDEZ-SORIA, A. et al. Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. **Bone**, v. 41, n. 6, p. 928–36, 2007.

YOH, K.; TANAKA, K.; ISHIKAWA, A.; et al. Health-related quality of life (HRQOL) in japanese osteoporotic patients and its improvement by elcatonin treatment. **J Bone Miner Metab.** V. 23, n. 2, p.167-73, 2005.

YU, W.; NAIM, JO.; LANZAFAME, RJ. Effects of photostimulation on wound healing in diabetic mice. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 20, n.1, p. 56–63, 1997.





**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

**Comissão de Ética na Experimentação Animal**

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

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

Home-page: [www.ufba.br](http://www.ufba.br)

## **CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto de Pesquisa n.º 07.10 "AVALIAÇÃO DO EFEITO DA FOTOTERAPIA LED EM DEFEITO ÓSSEO NO FÊMUR DE RÁTAS OVARIECTOMIZADAS: ESTUDO HISTOLÓGICO E IMAGINOLÓGICO" 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, 31 de maio de 2011

*Maria José P. Ramalho*  
**Profa. Maria José P. Ramalho**  
**Vice-Presidente da CEEA**

**ANEXO 01**