

LUIZ GUILHERME PINHEIRO SOARES

Avaliação da Fotobiomodulação LASER/LED em enxerto de Fosfocerâmica Bifásica de Hidroxiapatita e β -fosfato tricálcico em defeitos ósseos: estudo histológico 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
2013**

LUIZ GUILHERME PINHEIRO SOARES

Avaliação da Fotobiomodulação LASER/LED em enxerto de Fosfo-cerâmica Bifásica de Hidroxiapatita e β -Fosfato tricálcico em defeitos ósseos: estudo histológico e por espectroscopia Raman em modelo animal.

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

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

**Orientador: Prof^a. Dr. Aparecida Maria Cordeiro Marques
Co-orientador: Prof. Antônio Luiz Barbosa Pinheiro, PhD**

**SALVADOR
2013**

LUIZ GUILHERME PINHEIRO SOARES

Avaliação da Fotobiomodulação LASER/LED em enxerto de Fosfo-cerâmica Bifásica de Hidroxiapatita e β -Fosfato tricálcico em defeitos ósseos: estudo histológico e por espectroscopia Raman em modelo animal.

Salvador, 03 de Junho de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Doutor Aparecida M. C. Marques – Orientadora – UFBA

Prof. Doutor Jean Nunes dos Santos - UFBA

Prof. Doutor Manoel Damião Sousa Neto - FORP

Prof. Doutor Landulfo Silveira Júnior – Membro UNICASTELO

Prof^a. Doutor Marleny Elizabeth Marquez Martinez Gerbi – Membro FOP-UPE

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus avós, **Luiz Mário Pinheiro** (*in memoriam*) e **M^a de Lourdes Pinheiro** pelo seu exemplo de vida, amor e dedicação na criação de seus filhos e netos.

Aos meus pais **Paulo Soares e Ana Paula Pinheiro**, e a minha irmã **Amanda Pinheiro**, pela abnegação e apoio incondicional, indispensável para minha formação pessoal e profissional.

Ao meu grande mestre, **Antônio Pinheiro**, pela confiança no meu potencial, me guiando através de momentos difíceis com paciência e carinho.

À minha orientadora, **Aparecida Marques**, que me acolheu como aluno e como amigo, sempre disponível e dedicada aos nossos objetivos.

À **Milena Guarda**, minha companheira de todas as horas, pela dedicação, carinho e doação. Sempre ao meu lado, enfrentando as dificuldades e compartilhando as alegrias,

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Jean Nunes e Prof^a. Maria Cristina Cangussú**, pela ajuda na construção e execução deste trabalho, sempre disponíveis e atenciosos.

As pós-doutorandas **Nicole Ribeiro, Priscila Chagas, Ana Paula Cavalcanti e Carolina Montagn**, sempre ensinando e aconselhando.

Aos meus colegas de Doutorado, **Cristiane Becher, João Reis Júnior, Isabele de Castro, Fabiola Carvalho e Joubert Aciole**, que compartilharam comigo todos os desafios e alegrias vividos nesse período, sempre com muito companheirismo, amigos que levo para toda a vida.

Aos **estagiários do Centro de Biofotônica da FOUFBA**, pela imensa colaboração e apoio, imprescindíveis à realização das atividades.

A todos os **professores do Programa Integrado de Pós-Graduação UFPB-UFBA**, que colaboraram para formação acadêmica e profissional.

Aos **funcionários da FOUFBA**, que de maneira direta ou indireta contribuíram para realização deste trabalho.

A **BAUMER S.A**, por acreditar em nosso projeto e fornecer o biomaterial utilizado nesta pesquisa.

Ao **CNPq** pela colaboração científica e financeira, apoiando às atividades acadêmicas e o desenvolvimento de profissionais cada vez mais capacitados.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste trabalho. Muito Obrigado.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS E TABELAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	14
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1 Reparo Ósseo	16
2.2 Biomateriais	19
2.3 Fotobiomodulação Laser	22
2.4 Fotobiomodulação LED	24
2.5 Biomateriais x Fototerapias	26
2.6 Espectroscopia Raman	29
2.6.1 Aplicações biomédicas	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 Criação do defeito ósseo	36
4.6 Protocolo de Fototerapia	41
4.6.1 Laser	41
4.6.2 LED	42
4.7 Obtenção da amostra tecidual	44
4.8 Avaliação pela Espectroscopia Raman	45
4.8.1 Calibração do equipamento e filtragem dos espectros Raman	46
4.8.2 Obtenção e processamento dos Espectros Raman	46
4.9 Avaliação histológica por espectroscopia de luz	48
4.10 Análise estatística	49
5. RESULTADOS	50
5.1 Análise histológica	50
5.1.1 Grupo Coágulo	50
5.1.2 Grupo Biomaterial	52
5.1.3 Grupo LED	55
5.1.4 Grupo LED + Biomaterial	57
5.1.5 Grupo Laser	59
5.1.6 Grupo Laser + Biomaterial	62
5.2 Análise dos Espectros Raman	66
5.2.1 Análise estatística	72
6. DISCUSSÃO	75
7. CONCLUSÃO	88
REFERÊNCIAS	89
ANEXO 01	

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 01	Distribuição dos grupos de estudo (SOARES, 2013).	36
Tabela 02	Critérios utilizados para análise de microscopia de luz (SOARES, 2013).	48
Tabela 03	Sinopse descritiva da análise histológica, no período de 15 dias (SOARES, 2013).	65
Tabela 04	Sinopse descritiva da análise histológica, no período de 30 dias (SOARES, 2013).	65
Tabela 05	Valores médios (\pm desvio padrão) das intensidades dos picos Raman estudados, aos 15 dias (SOARES, 2013).	71
Tabela 06	Valores médios (\pm desvio padrão) das intensidades dos picos Raman estudados, aos 30 dias (SOARES, 2013).	71
Tabela 07	Resultados do teste ANOVA para cada pico nos períodos observacionais de 15 e 30 dias (UFPB-UFBA, 2013).	72
Tabela 08	Análise estatística entre os grupos, dois a dois, no período observacional de 15 dias (SOARES, 2013).	73
Tabela 09	Análise estatística entre os grupos, dois a dois, no período observacional de 30 dias (SOARES, 2013).	73
Tabela 10	Resumo da análise estatística (Teste t de Student) dos picos Raman dentro de cada grupo, em relação ao tempo (15 e 30 dias) (SOARES, 2013).	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Defeito ósseo confeccionado, preenchido pelo coágulo sanguíneo (SOARES, 2013).	40
Figura 02	Defeito ósseo preenchido com implante de fosfo-cerâmica bifásica (GenPhos [®]) (SOARES, 2013).	40
Figura 03	Aparelho utilizado no experimento para realização da fototerapia laser (Twinflex Evolution [®] , MMOptics, São Carlos, SP, Brasil).	43
Figura 04	Aparelho utilizado no experimento para realização da fototerapia LED (FisioLED [®] , MMOptics, São Carlos, SP, Brasil).	43
Figura 05	Fotomicrografia mostrando ferida completamente preenchida por osso neoformado espesso, maduro apresentando osteócitos no interior e linhas basofílicas paralelas entre si (30 dias – HE). (SOARES, 2013).	50
Figura 06	Fotomicrografia mostrando osso neoformado apresentando colágeno maduro em toda sua extensão. (30 dias – Picrosírius) (SOARES, 2013).	50
Figura 07	Fotomicrografia mostrando, no lado direito, osso remanescente do leito cirúrgico, do qual partem trabéculas ósseas delgadas e interconectantes, com osteócitos no interior, as quais aprisionam o biomaterial remanescente. (15 dias – HE) (SOARES, 2013).	52
Figura 08	Fotomicrografia mostrando osso neoformado caracterizado por trabéculas ósseas, predominantemente espessas, com osteócitos no interior e linhas basofílicas paralelas entre si. Note o remanescente do biomaterial ora aprisionado ora envolvido pelo osso neoformado, além de inflamação crônica. (30 dias – HE) (SOARES, 2013).	52
Figura 09	Fotomicrografia mostrando, no lado direito, osso do leito cirúrgico, do qual partem trabéculas ósseas neoformadas com colágeno semelhante ao do leito cirúrgico, mas pouco distribuído no biomaterial (30 dias – HE) (SOARES, 2013).	52
Figura 10	Fotomicrografia mostrando osso neoformado em pouca quantidade, caracterizado por trabéculas ósseas delgadas com osteócitos e linhas basofílicas no interior (15 dias – HE) (SOARES, 2013).	54
Figura 11	Fotomicrografia mostrando osso neoformado em pouca	54

quantidade, caracterizado por trabéculas ósseas delgadas com osteócitos, linhas basofílicas no interior, além de osteoblastos em superfície (30 dias – HE) (SOARES, 2013).

- Figura 12 Fotomicrografia mostrando osso neoformado apresentando colágeno maduro em toda a sua extensão (30 dias – Picrosírius) (SOARES, 2013). 54
- Figura 13 Fotomicrografia mostrando osso neoformado apresentando glóbulos ósseos com biomaterial aprisionado, em meio a inflamação crônica (15 dias – HE) (SOARES, 2013). 56
- Figura 14 Fotomicrografia mostrando osso neoformado sob a forma de trabéculas e glóbulos que exibem linhas basofílicas paralelas entre si, com osteócitos no interior. Destaca-se a presença de remanescente do biomaterial na região central, bem como remanescente de medula óssea vermelha (30 dias HE) (SOARES, 2013). 56
- Figura 15 Fotomicrografia evidenciando a presença de colágeno maduro representando por coloração vermelho intensa, ao contrário do remanescente do biomaterial envolvido pelo osso neoformado (30 dias – Picrosírius) (SOARES, 2013). 56
- Figura 16 Fotomicrografia mostrando, no lado direito, osso remanescente do leito cirúrgico e, a esquerda, pequenos glóbulos e trabéculas de osso neoformado com osteócitos no interior. Há sinais de reabsorção e também inflamação crônica de permeio (15 dias – HE) (SOARES, 2013). 58
- Figura 17 Fotomicrografia mostrando trabéculas ósseas neoformadas com osteoclastos em atividade (15 dias – HE) (SOARES, 2013). 58
- Figura 18 Fotomicrografia onde se observa osso neoformado lamelar espesso, com linhas basofílicas, apresentando osteócitos no interior, canais vasculares e remanescente de medula óssea vermelha (30 dias – HE) (SOARES, 2013). 59
- Figura 19 Fotomicrografia mostrando osso neoformado apresentando colágeno maduro em toda a sua extensão (30 dias – Picrosírius) (SOARES, 2013). 59
- Figura 20 Fotomicrografia mostrando, no lado direito, osso do leito cirúrgico, do qual partem trabéculas ósseas espessas, as quais mostram com frequência remanescente do biomaterial aprisionado. Há evidência de sinais de reabsorção e remanescente de medula óssea vermelha (15 dias – HE) 61

(SOARES, 2013).

- Figura 21 Fotomicrografia mostrando, no lado direito, osso do leito cirúrgico da qual parte osso neoformado maduro com trabéculas ósseas espessas, com remanescentes do biomaterial aprisionado. Há, também, remanescente de medula óssea vermelha (30 dias – HE) (SOARES, 2013). 61
- Figura 22 Fotomicrografia mostrando onde se pode notar osso neoformado com osteócitos no interior envolvendo remanescente do biomaterial (30 dias – HE) (SOARES, 2013). 62
- Figura 23 Fotomicrografia mostrando osso neoformado representado por trabéculas ósseas maduras e espessas contendo colágeno em sua extensão. Note, de permeio, biomaterial, com fraca marcação (30 dias – Picrosírius) (SOARES, 2013). 62
- Figura 24 Espectros Raman do osso cortical não tratado e do biomaterial utilizado (Genphos®), onde se observam os deslocamentos Raman estudados. Em destaque, sutil diferença é observada com relação ao pico de $\sim 960\text{cm}^{-1}$ (SOARES, 2013). 66
- Figura 25 Picos Raman de todos os grupos, aos 15 dias. Os espectros foram “deslocados” no eixo y de acordo com o pico de $\sim 960\text{cm}^{-1}$ (SOARES, 2013). 67
- Figura 26 Picos Raman de todos os grupos, aos 30 dias. Os espectros foram “deslocados” no eixo y de acordo com o pico de $\sim 960\text{cm}^{-1}$ (SOARES, 2013). 67
- Figura 27 Intensidades médias de todos os grupos para pico Raman $\sim 960\text{ cm}^{-1}$, nos períodos observacionais de 15 e 30 dias (SOARES, 2013). 68
- Figura 28 Intensidades médias de todos os grupos para o pico Raman de $\sim 1070\text{ cm}^{-1}$, nos períodos observacionais 15 e 30 dias (SOARES, 2013). 69
- Figura 29 Intensidades médias de todos os grupos para o pico Raman $\sim 1454\text{ cm}^{-1}$, nos períodos observacionais ds 15 e 30 dias (SOARES, 2013). 70

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AsGaAl	Arseneto de gálio e alumínio
ATP	Adenosina-trifosfato
BMPs	Proteínas morfogenéticas ósseas
β -TCP	β -fosfato tricálcico
Ca	Cálcio
CEEA	Comissão de Ética na Experimentação Animal
ER-IVP	Espectroscopia Raman no infravermelho próximo
DNA	Deoxyribonucleic acid – Ácido desoxirribonucléico
FBML	Fotobiomodulação Laser
FIR	Fixação Interna Rígida
FTL-IVP	Fototerapia laser na faixa do infravermelho próximo
g	Gramas
HA	Hidroxiapatita de cálcio
HE	Hematoxilina-eosina
J	Joules
Laser	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
LED	Light Emitting Diode
mL	Militros
mW	Miliwatts
N	Newtons
nm	Nanômetros
Pot	Potência
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i> – Fator de crescimento derivado de plaquetas
ROG	Regeneração óssea guiada
ROG	Regeneração Óssea Guiada
s	Segundos
SAEF	<i>Spatial average energy fluence</i>
t	Tempo
TGF- β	<i>Transformation growth factor beta</i> – Fator de crescimento e transformação beta
UV	Ultra Violeta
W	Watts
λ	Comprimento de onda
μ m	Micrometro
Φ	Spot

RESUMO

Ao lado dos biomateriais, as fototerapias laser e LED têm obtido resultados positivos como terapias auxiliares ao processo de reparação óssea, principalmente quando envolvem grandes perdas teciduais. O objetivo deste estudo foi avaliar, por meio de análise histológica através de microscopia de luz e espectroscopia Raman, a influência da fototerapia, laser ou LED, no processo de reparo de defeitos ósseos em fêmur de ratos, com ou sem implante de hidroxiapatita. Sessenta ratos Wistar *albinus* foram divididos em seis grupos, cada um deles subdividido em dois subgrupos de acordo com o período de sacrifício (15 e 30 dias). Sob anestesia geral, um defeito ósseo crítico com 2mm² foi criado no fêmur esquerdo de cada animal. No grupo Coágulo, o defeito foi preenchido apenas por coágulo sanguíneo, no grupo Biomaterial o defeito foi preenchido com o implante de HA + β -TCP, no grupo LED o defeito foi preenchido por coágulo sanguíneo e irradiado com LED ($\lambda = 850 \pm 10$ nm, P = 150 mW, CW, 20,4 J/cm² por sessão, 142,8 J/cm² por tratamento), no grupo LED + Biomaterial, o defeito foi preenchido com implante de HA + β -TCP e irradiado com LED, no grupo Laser, o defeito foi preenchido por coágulo sanguíneo e irradiado com laser ($\lambda = 780$ nm, P = 70 mW, CW, 20,4 J/cm² por sessão, divididos em 4 pontos NSLO de 5,1 j/cm², 142,8 J/cm² por tratamento), no grupo Laser + biomaterial, o defeito foi preenchido com implante de HA + β -TCP e irradiado com laser. Os protocolos de irradiação foram realizados a cada 48 horas durante 15 dias. A morte dos animais ocorreu após 15 e 30 dias. As amostras foram divididas em duas metades, 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⁻¹) e orgânico (~1454 cm⁻¹) do tecido ósseo. A outra metade foi processada e avaliada qualitativamente através de microscopia de luz. Histologicamente, a presença das linhas basofílicas, indicou que o grupo Laser + Biomaterial encontrava-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 ratos, submetidos ou não, a implante de fosfo-cerâmica bifásica de hidroxiapatita e β -Fosfato tricálcico.

Palavras-chave: Biomaterial; Reparo ósseo; Hidroxiapatita; Fototerapia Laser, Diodo emissor de luz.

ABSTRACT

Beside of biomaterials, laser and LED phototherapy has shown positive results as auxiliary therapies on bone repair process, especially when involving large tissue losses. The aim of this study was to evaluate, through histological analysis using light microscopy and Raman spectroscopy, the influence of laser or LED phototherapy in the process of bone repair of bone defects in the femur of rats, with or without Hydroxyapatite implant. 60 Wistar *Albinus* rats were divided into 6 groups each subdivided into 2 subgroups according to the time of sacrifice (15 and 30 days). After general anesthesia, a critical bone defect was created with 2mm² in the left femur of each animal. In Group Clot, the defect was filled only by blood clot, in group Biomaterial the defect was filled with the HA + β -TCP implant, in Group LED the defect was filled by blood clot and further irradiated with LED ($\lambda=850 \pm 10\text{nm}$, $P=150\text{mW}$, CW, 20,4 J/cm² per session, 142,8 J/cm² per treatment), in group LED + Biomaterial, the defect was filled with HA + β -TCP implant and further irradiated with LED, in group Laser, the defect was filled by blood clot and further irradiated with laser ($\lambda=780\text{nm}$, $P=70\text{mW}$, CW, 20,4 J/cm² divided into 4 points of 5,1 j/cm² per session, 142,8 J/cm² per treatment), in group Laser + Biomaterial, the defect was filled with HA + β -TCP implant and further irradiated with laser. The irradiation protocols were performed every 48 hours during for 15 days. Animal death occurred after 15 and 30 days. The specimens were divided into two halves; one was analyzed by Raman spectroscopy to assess the level of bone mineralization by using the intensities of the Raman peaks of both inorganic (~ 960 , $\sim 1070\text{ cm}^{-1}$) and organic ($\sim 1454\text{ cm}^{-1}$) contents of bone tissue were used. The other part was routinely processed and evaluated by light microscopy. Histologically, despite the similarity between the parameters, the presence of basophilic lines indicated that the group Laser + Biomaterial was in a more advanced stage of repair. Spectroscopically, laser and LED phototherapies increased deposition of HA and therefore the mineralization of new bone. It was concluded that the laser or LED photobiomodulation were effective in improving the process of bone repair of bone defects on femur of rats submitted or not to hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate implant.

Keywords: Biomaterial; Bone Repair; Hydroxyapatite; Laser Phototherapy, Light Emitting Diode.

1. INTRODUÇÃO

O osso é um tecido biológico dinâmico, altamente organizado e especializado composto por componentes orgânicos e inorgânicos integrados em uma estrutura rígida. Microscopicamente, apresenta poucas células metabolicamente ativas, elementos hematopoiéticos da medula óssea e uma grande quantidade de substância intercelular formada a partir de fibras colágenas e substâncias que conferem rigidez. O seu conteúdo inorgânico é composto principalmente por fosfato de cálcio e carbonato de cálcio, com pequenas quantidades de magnésio, fluoreto, e de sódio (KALFAS, 2001; PINHEIRO; GERBI, 2006).

Um grave problema enfrentado pelos profissionais da área médica ou odontológica são os defeitos ósseos. As perdas ósseas possuem diversas etiologias, entre elas, patologias, traumas e cirurgias. Na tentativa de ajudar o organismo a suprir grandes perdas, incapazes de reparação fisiológica, a utilização de enxertos ósseos, principalmente autólogos, e terapias auxiliares devem ser consideradas. Assim, a busca por biomateriais é contínua, fornecendo várias opções aos profissionais. A hidroxiapatita de cálcio (HA) é um dos biomateriais mais utilizados, podendo ser produzida com composições e formas diferentes. Pode ser utilizada isoladamente, associada à utilização de uma membrana, através da regeneração óssea guiada (ROG), ou associada a um enxerto ósseo autólogo (TORRES *et al.*, 2008; PINHEIRO *et al.*, 2010, 2012a,b; WEBER *et al.*, 2006)

Outras técnicas têm obtido resultados positivos nesse processo, como as fototerapias. Recentemente, a fototerapia laser e LED, principalmente nos

comprimentos de onda no infravermelho próximo, estão sendo utilizadas em várias condições, tais como implantes dentários (LOPES *et al.*, 2007) associada à enxertos ósseos autólogos (TORRES *et al.*, 2008; WEBBER *et al.*, 2006) e vários tipos de defeitos ósseos (GERBI *et al.*, 2008a,b; PINHEIRO *et al.*, 2009, 2010, 2012a,b). Embora haja um crescente uso dessas técnicas, com vários estudos demonstrando resultados positivos, são escassos os relatos sobre a associação de fototerapias e biomateriais.

Uma possibilidade de avaliação, como as técnicas vibracionais, tais como a 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 e também do enxerto remanescente. O teor de minerais e composição da matriz óssea fornecerão indicações do sucesso ou falha do enxerto (PINHEIRO *et al.*, 2009, 2010, 2012a,b), através da identificação de alterações moleculares desses tecidos biológicos (KAVUKCUOGLU; PATTERSON-BUCKENDAHL; MANN, 2009).

O objetivo deste estudo foi avaliar, através de análise histológica e espectroscopia Raman, o efeito da fotobiomodulação laser ($\lambda 780\text{nm}$) e LED ($\lambda 850 \pm 10\text{nm}$) associada ou não à enxerto de Fosfocerâmica Bifásica de Hidroxiapatita e β -fosfato tricálcico (GenPhos®) em defeitos ósseos confeccionados em fêmur de ratos *Wistar albinus*.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 - Reparo Ósseo

A cicatrização de uma fratura é um dos mais notáveis processos de reparação do corpo humano, uma vez que resulta não em uma cicatriz, mas na reconstrução do tecido lesado quase idêntico à sua forma original. O reparo envolve problemas de homeostase celular que estão entre os mais fundamentais na biologia (PINHEIRO; GERBI, 2006).

Para que a reparação se inicie, o coágulo sanguíneo, inicialmente serve como fonte de células de sinalização que têm a capacidade de iniciar as cascatas de eventos celulares que são críticas ao processo de reparo. A degranulação de plaquetas no coágulo libera moléculas sinalizadoras, tais como fator de transformação de crescimento (*transformation growth factor beta* - TGF- β) e fator de crescimento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor* - PDGF), que são importantes na regulação da proliferação e diferenciação de células tronco mesenquimais (BOLANDER, 1992). Além disso, algumas destas citocinas ou moléculas de sinalização podem estar envolvidas em outros processos, tais como a quimiotaxia, a angiogênese, e podem também servir como fatores de competência e progressão de muitas das respostas celulares (PINHEIRO; GERBI, 2006).

O perióstio e o endóstio próximos à área fraturada respondem com uma intensa proliferação, formando um tecido muito rico em células osteoprogenitoras que constitui um colar em torno da fratura e penetra entre as

extremidades ósseas rompidas. Nesse anel ou colar conjuntivo, bem como no conjuntivo que se localiza entre as extremidades ósseas fraturadas, surge tecido ósseo imaturo, tanto pela ossificação endocondral de pequenos pedaços de cartilagem que aí se formam, como também por ossificação intramembranosa. Podem, pois, ser encontradas no local de reparação, ao mesmo tempo, áreas de cartilagem, áreas de ossificação intramembranosa e áreas de ossificação endocondral (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Para os ossos longos, assume-se que a ossificação endocondral seja o principal mecanismo responsável pela sua formação e crescimento. Nestes ossos, as células mesenquimatosas indiferenciadas iniciam um processo de proliferação, condensação e diferenciação em condroblastos que, sintetizam matriz cartilaginosa e evoluem para condrócitos, formando cartilagem hialina com o aspecto do futuro osso (PINHEIRO; GERBI, 2006).

Esse processo evolui de modo a aparecer, após algum tempo, um calo ósseo que envolve a extremidade dos ossos fraturados. O calo ósseo é constituído por tecido ósseo imaturo que une provisoriamente às extremidades do osso fraturado. Seja qual for o processo de ossificação de base, o tecido ósseo inicialmente resultante é sempre de tipo primário ou imaturo, sendo trabecular pouco organizado e irregular, contrariamente ao que se verifica no tecido ósseo, normalmente observado no osso maduro, caracterizado por uma estrutura lamelar organizada (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Nas fases mais tardias do reparo, sabe-se que na remodelação óssea fisiológica, a reabsorção osteoclástica precede a neoformação óssea osteoblástica, durante este processo, os mecanismos de formação óssea são ativados para substituir qualquer tecido ósseo que tenha sido reabsorvido. Assim, o processo de formação sempre segue o processo de reabsorção. Além disso, a formação de novo osso ocorre apenas nas áreas que se submetem a reabsorção prévia. Isto sugere que sinais que atuam localmente estão envolvidos no processo de remodelação. Alguns desses fatores podem ser identificados na junção onde a superfície reabsorvida encontra a superfície neoformada, uma linha de reversão, visualizadas histologicamente como linhas basofílicas. A formação dessas linhas ocorre de forma irregular no osso que sofreu neoformação óssea e de maneira regular no osso com aspecto normal (maduro), podendo ser característica importante para avaliar o grau de maturação óssea (ROMANO *et al.*, 1997).

Porém, devido à diversidade de fatores envolvidos, tanto locais quanto sistêmicos, celulares e moleculares, esse processo pode ser dificultado pela diminuição do suprimento sanguíneo, instabilidade mecânica, alta proliferação de outros tecidos locais, condição sistêmica do indivíduo, etc. Essas características tornam o processo de reparo objeto de estudos contínuos, na tentativa de superar as dificuldades naturais e, ainda, melhorar a qualidade do osso neoformado e acelerar a finalização do processo de reparo ósseo de fraturas (PINHEIRO *et al.*, 2003).

2.2 – Biomateriais

Como já visto, o processo de reparo ósseo é complexo e demorado, envolvendo uma cascata de reações que dependem do organismo, da condição do indivíduo e de fatores externos. Em alguns casos, algum desses fatores impede o correto reparo de uma fratura óssea, e o profissional, médico ou cirurgião-dentista, tem que utilizar técnicas e materiais que possam, respectivamente, devolver o reparo ao seu curso natural ou substituir o tecido ósseo em situações mais graves.

Os biomateriais são definidos como compostos ou substâncias de origem natural ou sintética, com exceção dos fármacos e quimioterápicos, biocompatíveis, que podem substituir, de forma transitória ou permanente, diversos tecidos que constituem os órgãos dos seres vivos, estimulando reações químicas e biológicas favoráveis à função deles (CARVALHO; BASSI; VIOLIN, 2004).

Atualmente, o tratamento desta condição possui como padrão-ouro os enxertos ósseos autólogos, baseado no enxerto de fragmentos ósseos próprios, metais como as ligas de titânio e as biocerâmicas. A principal vantagem do enxerto autólogo consiste na presença de células osteogênicas e fatores osteoindutores essenciais que estão presentes no osso humano. Porém, devido à dificuldade em obter este material, a quantidade limitada e alta morbidade do paciente, é necessário o desenvolvimento e utilização de outros materiais (SALGADO; COUTINHO; REIS, 2004).

A biologia dos enxertos ósseos e seus substitutos devem ser entendidos a partir da compreensão de algumas propriedades como a biocompatibilidade, capacidade de promover osteogênese, osteoindução e osteocondução. A osteogênese é a capacidade de, a partir de elementos celulares dentro do enxerto que sobrevive ao transplante, induzir a neoformação óssea no local enxertado. A osteoindução consiste na neoformação óssea através do recrutamento ativo de células-tronco mesenquimais do tecido adjacente, que se diferenciam em osteoblastos. Este processo é facilitado pela presença de fatores de crescimento no interior do enxerto, como as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs – Bone Morphogenetic Proteins). Na osteocondução, ocorre o enxerto de uma estrutura que serve como arcabouço para facilitar a revascularização da área receptora com consequente entrada de fatores celulares que desencadeiam a neoformação óssea. Fatores fisiológicos influenciam a taxa, quantidade e integridade de reparação óssea e incorporação do enxerto (BURCHARDT, 1983).

Uma variedade de materiais artificiais tem sido usada em substituição aos enxertos autólogos, visando minimizar a morbidade dos procedimentos e evitar dois procedimentos cirúrgicos simultâneos. Enxertos ósseos sintéticos possuem, no máximo, duas das quatro características de um material ideal do enxerto ósseo. Os substitutos sintéticos ou aloplásticos idealmente devem ser biocompatíveis, provocar pouca fibrose, sofrer remodelação e promover a formação de novo osso. De um ponto de vista mecânico, devem ter uma resistência e módulo de elasticidade semelhante a do osso cortical/esponjoso a ser substituído. Os materiais sintéticos que demonstram algumas destas

propriedades são compostos de cálcio, silício ou alumínio (MOORE; GRAVES; BAIN, 2001).

As biocerâmicas à base de fosfato de cálcio têm recebido muita atenção como substitutos ósseos, principalmente pela sua excelente biocompatibilidade, bioatividade e características de osteocondução. A mais amplamente utilizada biocerâmica de fosfato de cálcio são a hidroxiapatita e o β -fosfato tricálcico (β -TCP). HA é estável no fluido corporal, enquanto que o β -TCP é bastante solúvel. A dissolução, característica importante para a absorção/incorporação de materiais utilizados como substitutos ósseos, tanto *in vivo* e *in vitro* é dependente da composição, cristalinidade, e de seu pH. No entanto, muitos estudos têm indicado que a dissolução da HA no corpo humano após o enxerto é baixa para alcançar os resultados desejados na neoformação óssea. Alterando-se sua composição (como a adição de β -TCP) e seu método de fabricação, poderia ser modificada a velocidade de reabsorção da HA, que pode indicar uma otimização da incorporação do implante pelo organismo (STEIN; SILVA; SILVA, 2009).

A fosfocerâmica bifásica vem sendo bastante utilizada, uma vez que este tipo de implante pode ser produzido utilizando composição e forma diferentes. Além disso, pode ser utilizada isoladamente, associada à utilização de uma membrana (regeneração óssea guiada - ROG), ou associada a um enxerto ósseo autólogo (TORRES *et al.*, 2008).

A HA sintética é produzida em forma de cerâmica ou não cerâmica, porosa ou sólida, e disponibilizada em blocos ou grânulos. A forma cerâmica refere-se ao fato de os cristais de HA foram aquecidos entre 700 e 1300 °C

para formar uma estrutura altamente cristalina. Essas preparações cerâmicas de HA são resistentes à reabsorção *in vivo*, que ocorre a uma taxa de 1-2% por ano. Inversamente, a HA não-cerâmica é mais rapidamente reabsorvida. A HA sintética tem boa resistência à compressão, mas é fraca em relação à tensão e cisalhamento (MOORE; GRAVES; BAIN, 2001).

Além do tratamento de defeitos ósseos usando biomateriais na odontologia, outras técnicas estão sendo estudadas, combinando vários tipos de enxertos, membranas, a combinação de ambos e a associação com fototerapias (PINHEIRO; GERBI, 2006).

2.3- Fotobiomodulação Laser

A absorção da luz laser pelos tecidos biológicos pode resultar em quatro processos: fotoquímico, fototérmico, fotomecânico e fotoelétrico (PINHEIRO, 2010). Por causa do grande número 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, dependente do comprimento de onda da radiação incidente, de alterar o comportamento celular na ausência de aquecimento significativo. A dispersão da luz laser no tecido é muito

complexa, pois esse fenômeno é influenciado pelos componentes do tecido. 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 sobre o tempo e modo de irradiação (PINHEIRO; GERBI, 2006).

Foi demonstrado em vários estudos, *in vitro* e *in vivo*, que a fotobiomodulação laser (FBML) no nível celular estimula o fotorreceptor citocromo-C-oxidase, resultando no aumento do metabolismo e produção de energia, conseqüentemente aumentando o metabolismo oxidativo mitocondrial (KARU; PYATIBRAT; AFANASYEVA, 2005). 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 (LOPES *et al.*, 2010; TORRES *et al.*, 2008; 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 aumento da proliferação dos osteoblastos, deposição de colágeno e neoformação óssea (GERBI, 2004; GERBI *et al.*, 2007; GERBI *et al.*, 2008a,b; PINHEIRO; GERBI, 2006; 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 de colágenas vistas dentro do osso irradiado (GERBI, 2004; GERBI *et al.*, 2007; GERBI *et al.*, 2008a,b; PINHEIRO; GERBI, 2006; PINHEIRO *et al.*, 2011, 2012, 2013).

2.4- Fotobiomodulação 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 (WHELAN, *et al.*, 2003). Inicialmente, se atribuía os efeitos do laser à coerência, mas foi mostrado que fontes não coerentes como os LEDs também alcançavam resultados semelhantes (KARU *et al.*, 2008).

O uso da fototerapia LED cresceu após resultados positivos demonstrados pela fototerapia laser na melhora do reparo ósseo em vários modelos como defeitos ósseos críticos em fêmur de ratos (2mm), fraturas provocadas e associação com implantes de biomateriais (PINHEIRO *et al.*, 2012a,b, 2013), porém ainda há poucos relatos sobre o uso da fototerapia LED

neste processo, principalmente quando da sua associação aos biomateriais. 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; BAROLET *et al.*, 2009; KARU *et al.*, 2008; LOPES *et al.*, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2012a,b; TORRES *et al.*, 2008).

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 collagenase (BAROLET *et al.*, 2009) na cicatrização tecidual em modelos de queimadura de terceiro grau cicatrizantes modelos (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 acelerou o processo de reparo, com presença de osso neoformado maduro com a presença de trabeculado ósseo e intensa deposição colagênica. Essas características são observadas em diversos estudos onde foi utilizada fototerapia laser com parâmetros semelhantes e métodos de avaliação que incluíram a análise histológica por microscopia de luz e espectroscopia Raman (GERBI *et al.*, 2008; PINHEIRO *et al.*, 2009; 2010, 2011, 2012a,b, 2013). 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 (AL-WATBAN; ANDRES, 2006; WEISS, 2005). Apesar do crescimento das aplicações bem sucedidas da fototerapia LED em diversas áreas, seu uso no reparo ósseo e associado a enxerto de biomateriais precisa ser mais estudado (PINHEIRO *et al.*, 2012a,b, 2013).

2.5- Biomateriais x Fototerapias

O uso de biomateriais para melhorar a capacidade do organismo promover o reparo ósseo é bem fundamentado na literatura. O mesmo pode ser dito sobre a utilização das fototerapias, que possuem resultados positivos como terapia única ou associada a outras técnicas.

Weber e colaboradores (2006) estudaram os efeitos histológicos da Laserterapia de baixa intensidade associada a enxertos autógenos de osso sobre a regeneração de defeitos ósseos. Sessenta ratos Wistar foram utilizados em quatro grupos: G1, como grupo controle, G2, com aplicação de laser diretamente sobre a loja cirúrgica, G3, fototerapia laser sobre o enxerto, G4, com fototerapia laser sobre o enxerto e a loja cirúrgica. O protocolo utilizado para fototerapia laser ($\lambda 830\text{nm}$, $\Phi = 0.5\text{ cm}^2$, 50 mW, 10 J/cm²) foi de 10 J/cm² divididos em quatro pontos, aplicado em dias alternados por 15 dias. Os animais foram mortos com 15, 21, e 30 dias após as cirurgias. Nos grupos em que a fototerapia foi utilizada nos leitos cirúrgicos (G2/G4) durante o

transoperatório, a remodelação óssea foi quantitativa e qualitativamente mais evidente quando comparadas com os G1 e G3.

Pinheiro e colaboradores (2007), realizaram um estudo para avaliar o efeito de fotobiomodulação do laser infravermelho sobre a incorporação de hidroxiapatita (HA; $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$) e a qualidade do tecido ósseo neoformado ao redor de implantes dentários, através de espectroscopia Raman e Microscopia Eletrônica de Varredura, respectivamente. Foram utilizados 14 coelhos que receberam implantes de titânio na tíbia; oito deles foram irradiados com Laser de $\lambda 830 \text{ nm}$ (sete sessões a cada 48 horas de intervalo, $21,5 \text{ J/cm}^2$ por ponto, 10 mW , $\Phi = 0,0028 \text{ cm}^2$, 86 J por sessão) e seis serviram como grupo controle. Os animais foram sacrificados com 15, 30 e 45 dias após as cirurgias. Os espécimes foram preparados adequadamente para a espectroscopia Raman e a microscopia eletrônica de varredura e as devidas leituras do osso ao redor dos implantes foram realizadas. Os resultados mostraram aumento significativo na concentração de hidroxiapatita entre os espécimes do grupo irradiado e do grupo controle nos 30 e 45 dias após as cirurgias.

Gerbi e colaboradores (2008), realizaram um estudo para avaliar histologicamente o efeito da fotobiomodulação laser no reparo ósseo de defeitos criados em fêmur de ratos *Wistar albinus* tratados ou não com proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) e membranas bovinas orgânicas. A fototerapia laser ($\lambda 830 \text{ nm}$, 40 mW , $\Phi = 0,6 \text{ mm}$) totalizou 16 J/cm^2 por sessão. Os períodos experimentais foram 15, 21 e 30 dias. Os pesquisadores obtiveram resultados, referentes aos grupos irradiados em relação aos não irradiados, que evidenciaram, histologicamente, um incremento na deposição

de fibras colágenas (15 e 21 dias), bem como uma quantidade aumentada de osso trabeculado bem organizado no final do período experimental de 30 dias. Concluiu-se que o uso de BMPs e membranas bovinas possuem um efeito sinérgico aos efeitos fotobiomoduladores do laser no processo de reparo ósseo.

Em um estudo anterior utilizando um biomaterial diferente, Lopes e colaboradores em 2010, avaliaram a intensidade da HA fosfatada ($\sim 958 \text{ cm}^{-1}$) em animais tratados com fraturas completas tratados com fixação interna rígida (FIR) associados ou não com fototerapia laser e associada ou não a BMPs e regeneração óssea guiada (ROG). Para avaliação dos dados, foi utilizada análise por espectroscopia Raman, os autores concluíram que a utilização de fototerapia laser associada a BMPs e ROG foi eficaz na melhora da reparação óssea em ossos fraturados devido ao aumento dos níveis de HA observados.

Pinheiro et al. 2012, afirmaram que o uso da fototerapia LED associada ao MTA, BMPs e regeneração óssea guiada foi eficaz na melhoria do reparo ósseo, quando utilizados os parâmetros LED ($\lambda 850 \pm 10 \text{ nm}$, 150 mW , $\Phi = 0,5 \text{ cm}^2$, densidade de energia de 16 J/cm^2 , dose total do tratamento de 112 J/cm^2) com aplicações repetidas a cada 48 horas. Os resultados foram obtidos através de espectroscopia Raman, onde foram avaliados os picos referentes ao conteúdo inorgânico ($\sim 958 \text{ cm}^{-1}$) e ao conteúdo orgânico ($\sim 1447 \text{ cm}^{-1}$). Os autores afirmaram, ainda, que o avanço na maturação óssea visto nos grupos irradiados, está ligado ao aumento na deposição de colágeno. Esse fato está associado a habilidade dos osteoblastos irradiados em secretarem mais HAC.

Recentemente, Pinheiro e colaboradores (2013) avaliaram, através de

espectroscopia Raman, o reparo de fraturas cirurgicamente confeccionadas, tratadas com FIR, associadas ou não com fototerapia laser ($\lambda 780\text{nm}$, 50mW , $16\text{J}/\text{cm}^2$, $\varphi = 0,05\text{ cm}^2$, emissão contínua); associados ou não a enxerto de fosfo-cerâmica Bifásica e β -trifosfato de cálcio e ROG. A espectroscopia Raman mostrou diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,001$). Grupo FIR + enxerto + fototerapia laser mostrou valores mais elevados e o grupo de FIR + biomaterial, a menor. Em conclusão, os resultados da investigação foram clinicamente importantes, pois a análise espectral do componente ósseo ($\sim 958\text{ cm}^{-1}$) evidenciou aumento dos níveis de HA em locais fraturados usando a associação da luz de laser a um enxerto de cerâmica.

2.6 - 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 histopatologia, morfometria, microscopia eletrônica de varredura, Raio-X e tomografia. Atualmente, também pode ser utilizada a ER-IVP na avaliação tecidual.

A Espectroscopia Raman foi demonstrada experimentalmente criada por Chandrasekhara Venkata Raman, na Índia em 1928, através da observação do efeito Raman, recebendo o prêmio Nobel de Física em 1930. O efeito Raman é um processo fundamental de troca de energia entre a luz e a matéria. Essa técnica espectroscópica, de natureza vibracional e vem sendo intensamente estudada na última década. 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 ópticas (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 biológico normal, como em processos patológicos (SILVEIRA JUNIOR *et al.*, 2002).

2.6.1 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. Como a radiação luminosa pode ser enviada e coletada por meio de fibras ópticas, através da utilização de cabos especialmente projetados para serem inseridos em dispositivos clínicos, tais como laparoscópios, endoscópios, cateteres e agulhas, o espectro Raman pode ser usado para a caracterização remota das

amostras, e também para o estudo *in vivo* em tempo real dos tecidos biológicos (SILVEIRA JR *et al.*, 2002; GIANA *et al.*, 2003; NUNES *et al.*, 2003; NOGUEIRA *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2006; OTERO *et al.*, 2004; PAULA JR *et al.*, 2009; ROCHA, *et al.* 2007a,b, 2008).

Morris e colaboradores (2002), estudou a mineralização normal e patológica *in vivo* e *in vitro*, através da espectroscopia Raman. Relatou que através desta técnica pode-se observar os componentes orgânicos e inorgânicos do tecido ósseo e a sua relação com o estágio de mineralização óssea.

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 carbonato contra o teor de fosfato é

geralmente aceito como um regulador da homeostase mineral e do metabolismo ósseo (KOURKOUMELIS; TZAPHLIDOU, 2010).

Na avaliação da qualidade óssea, dois parâmetros distintos devem ser analisados, a maturidade mineral e o índice de cristalinidade. Considerando que esses dois parâmetros, muitas vezes evoluem concomitantemente, é comum a maturidade mineral/cristalinidade sejam considerados apenas um parâmetro. Por definição, eles não são equivalentes e correspondem a duas entidades diferentes. A maturidade está relacionada à transformação progressiva da superfície imatura em uma estrutura de apatita madura e mais estável e, índice de cristalinidade mineral que está relacionado ao tamanho e aos tipos de hidroxiapatita. Parece essencial separar a maturidade mineral e o índice de cristalinidade, porque eles não representam as mesmas características minerais (FARLAY *et al.*, 2010).

Substituições iônicas que ocorrem dentro dos cristais de apatita, podem influenciar a vibração das moléculas, resultando no alargamento das bandas relativas a estes cristais (FARLAY *et al.*, 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.

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. Porém, para a melhor exploração das informações presentes no espectro, a análise deve levar em conta todo o espectro, e não apenas bandas proeminentes. Diferenças relativas muito pequenas entre bandas e sobreposições podem passar despercebidas, porém com uma análise criteriosa de todo o espectro pode-se obter resultados interessantes.

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 a partir 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; NOGUEIRA *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2006; OTERO *et al.*, 2004; PAULA JR *et al.*, 2009; ROCHA, *et al.* 2007a,b, 2008).

3. PROPOSIÇÃO

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a influência da fotobiomodulação laser ($\lambda 780$ nm) ou LED ($\lambda 850 \pm 10$ nm) no processo de reparo ósseo de defeitos cirúrgicos confeccionados em fêmur de ratos, submetidos ou não, a implante de fosfocerâmica Bifásica de hidroxiapatita e β -Fosfato tricálcico.

3.2. Objetivos Específicos

- Descrever e comparar, histologicamente através de microscopia de luz, o processo de reparo ósseo de defeitos cirúrgicos confeccionados no fêmur de ratos *Wistar* submetidos ou não a fotobiomodulação laser ou LED, submetidos ou não a implante de fosfocerâmica bifásica de hidroxiapatita e β -Fosfato tricálcico, através da caracterização dos eventos envolvidos com o reparo: infiltrado inflamatório, deposição colagênica, reabsorção óssea e neoformação óssea.

- Avaliar através da espectroscopia Raman no infravermelho próximo, a mineralização óssea, utilizando como marcadores os picos de hidroxiapatita de cálcio fosfatada (~ 960 cm^{-1}), carbonatada (~ 1070 cm^{-1}) e o colágeno (~ 1454 cm^{-1}) presente na matriz óssea, no processo de reparação óssea em defeitos ósseos confeccionados no fêmur de ratos *Wistar*, submetidos ou não a fotobiomodulação laser ou LED, e, associados ou não, a implante de fosfocerâmica bifásica de hidroxiapatita e β -Fosfato tricálcico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Respaldo ético da pesquisa

Este experimento em animais 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 08.2010, de acordo com a LEI Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008.

4.2 - Delineamento

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

4.3 - Amostra

Nesta pesquisa foram utilizados 60 ratos albinos da espécie *Rattus norvegicus*, classe *Mammalia*, ordem *Roedentia*, da linhagem *Wistar*, adultos jovens, machos, com idade aproximada de dois meses, pesando entre 200 e 250 gramas cada um, obtidos 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[®] (Purina, São Paulo, Brasil) e água *ad libitum*.

4.4 - Distribuição dos grupos

Os animais foram aleatoriamente divididos em seis grupos com 10 animais e, subdivididos em grupos de cinco animais de acordo com o período observacional de 15 e 30 dias. A distribuição dos Grupos pode ser vista na **Tabela 01**.

Tabela 01 - Distribuição dos grupos de estudo (UFPB-UFBA, 2013).

Grupos	Morte (dias)	Fototerapia	Biomaterial	n=animais
Coágulo	15 ou 30	-	-	10
Biomaterial	15 ou 30	-	X	10
LED	15 ou 30	LED	-	10
LED + Biomaterial	15 ou 30	LED	X	10
Laser	15 ou 30	Laser	-	10
Laser + Biomaterial	15 ou 30	Laser	X	10

TOTAL: 60 animais.

4.5 - Criação do defeito ósseo

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados utilizando o 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[®], Syntec, Cotia, SP, Brasil), na posologia de 0,12ml/100g e Cloridrato de Xilazina 2% (Xilazina[®], 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 periósteo. Em seguida, o periósteo foi incisado e posteriormente descolado, com a utilização de descolador de periósteo tipo Molt, para exposição da área óssea.

Em seguida, a fim de padronizar a área operada, todas as cavidades ósseas foram confeccionadas no terço superior, da face lateral do fêmur esquerdo. A perfuração foi realizada através da utilização de broca tipo trefina (SIN – Sistema de Implantantes, 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 e após o rompimento da cortical e acesso à região medular do osso. Uma sondagem foi realizada por meio de uma sonda milimetrada 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 (NSK, Nakanishi Inc. – Tochigi, Japão) (**Fig. 01**).

Após a confecção do defeito ósseo, os animais dos grupos experimentais, que utilizariam biomaterial, receberam o implante da fosfo-cerâmica bifásica (GenPhos[®], BAUMER, Mogi Mirim, SP, Brasil) composta de 70% de hidroxiapatita e 30% de β -fosfato tricálcico, tendo de 1 a 60% de porosidade com propriedade osteocondutora (**Fig. 02**). Para isso, o material foi depositado em pote de vidro tipo *Dappen*, devidamente esterilizado, e embebido em soro fisiológico a 0,9% para facilitar a manipulação/aglutinação. A inserção do material foi realizada com o auxílio de espátula metálica n°07.

O procedimento de sutura, em todos os animais, foi realizado 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.

No pós-operatório, foi ministrada medicação analgésica Buprenorfina (Bupaq[®] Multidose 0,3 mg/ml, dose=0,01-0,05 mg/kg, pela via sub-cutânea), dose única em todos os animais. Não foi ministrada medicação anti-inflamatória ou antibiótica, no pré ou pós-operatório, a fim de que o processo de cicatrização seguisse o seu curso natural.

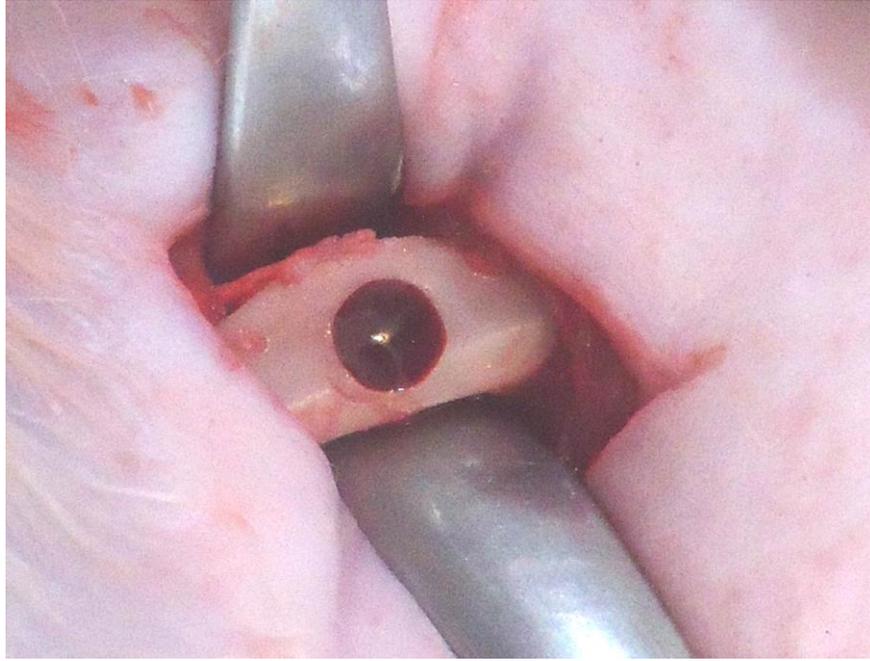


Figura 01 – Defeito ósseo confeccionado, preenchido pelo coágulo sanguíneo (SOARES, 2013).

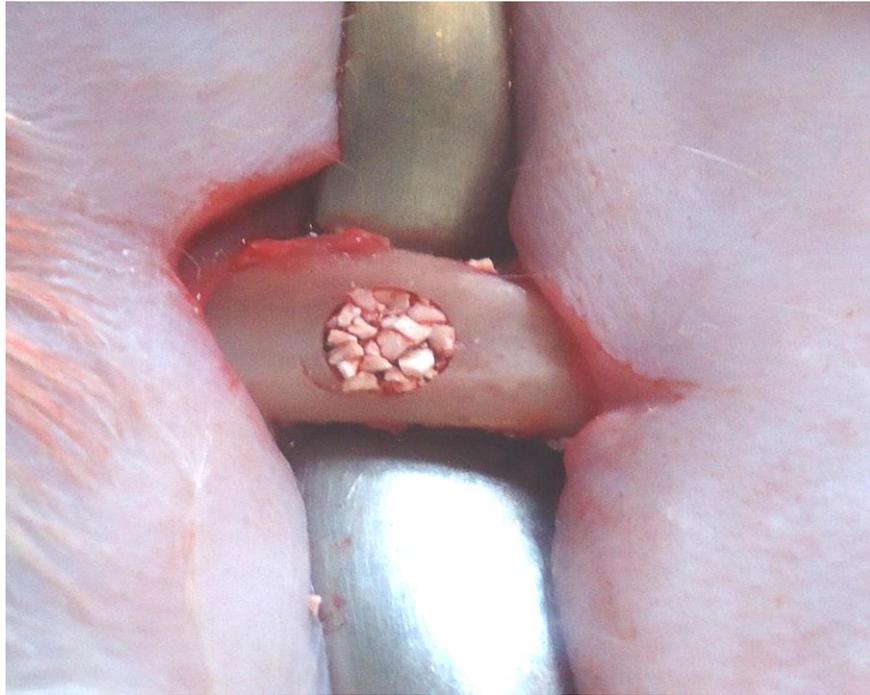


Figura 02 – Defeito ósseo preenchido com implante de fosfo-cerâmica bifásica (GenPhos[®]) (SOARES, 2013).

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 (GERBI, 2004).

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

Neste trabalho utilizou-se o SAEF (*spatial average energy fluence*) de 20,4 J/cm² 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 – Laser

Os animais dos grupos experimentais receberam irradiação com laser de Arseneto de Gálio e Alumínio (Twinflex Evolution[®], MMOptics, São Carlos, SP, Brasil) (**Fig. 03**) seguindo o protocolo (λ 780 nm, P = 70 mW, emissão contínua, Φ = 0,04 cm², 20,4 J/cm² por sessão, t= 299 s, 142,8 J/cm² 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/cm² cada ponto) ao redor do defeito ósseo. As sessões foram repetidas a cada 48 horas durante 15 dias, totalizando 8 aplicações (ACIOLE, 2010; GERBI, 2004).

4.6.2 – LED

Os animais dos grupos experimentais que previam fototerapia LED, receberam o tratamento com LED (FisioLED[®], MMOptics, São Carlos, SP, Brasil) (**Fig. 04**) seguindo o protocolo (λ 850 \pm 10 nm, 150 mW, emissão contínua, Φ = 0,5 cm², 20,4 J/cm² por sessão, t = 128 s, 142,8 J/cm² 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 (ACIOLE, 2010; GERBI, 2004).



Figura 03 – Aparelho utilizado no experimento para realização da fototerapia laser (Twinflex Evolution[®], MMOptics, São Carlos, SP, Brasil).



Figura 04 – Aparelho utilizado no experimento para realização da fototerapia LED (FizioLED[®], MMOptics, São Carlos, SP, Brasil).

4.7 - Obtenção da amostra tecidual

Para a obtenção das amostras teciduais, os animais foram mortos de acordo com os períodos experimentais de 15 ou 30 dias após as cirurgias. Os indicativos de morte são 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 de sua 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 5 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. A peça foi dividida longitudinalmente com auxílio de motor de baixa rotação com resfriamento contínuo e disco de *carborundum*.

Parte 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. Cortes de 1/5

4.8 – Avaliação pela Espectroscopia Raman

Foi utilizado o sistema de Espectroscopia Raman Dispersivo no Laboratório de Espectroscopia Raman do Centro de Biofotônica da FOUFBA.

O espectrômetro Raman dispersivo, que utiliza um espectrofotômetro Andor Shamrock SR-303i[®] (ANDOR Technology, Belfast, Irlanda do Norte. Também utiliza um laser de diodo estabilizado, sintonizado em λ 785 nm (infravermelho próximo) (B&WTEK, Newark, NJ, USA) para excitação da amostra, obtendo-se na saída da fibra óptica uma potência total de 300 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[®], Newark, NJ, EUA). O “Raman probe” possui uma fibra de excitação de 1005 μ m, e uma fibra de coleta do sinal Raman de 200 μ m. A fibra de coleta é acoplada a um espectrômetro dispersivo SR-303i,

composto por um espectrógrafo de imagem e uma câmera CCD *iDUS* (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 4 cm⁻¹. A potência do laser na extremidade de excitação do “probe” é de 300 mW.

4.8.1 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).

4.8.2 Obtenção e processamento dos Espectros Raman

O sistema Raman, controlado por um microcomputador executando o programa Windows[®] (Microsoft, Redmond, WA, EUA), onde foi realizado o armazenamento e pré-processamento dos dados espectrais.

O tempo de aquisição espectral para cada ponto de recolhimento foi de 20 segundos. Para maior confiabilidade dos resultados, cinco pontos foram medidos na superfície da área cortical do defeito em cada uma das 60 amostras, o que resultou num total de 300 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 ~ 960 e ~ 1070 cm^{-1} são atribuídas à HA fosfatada e HA carbonatada, respectivamente. A banda ~ 1454 cm^{-1} é atribuída ao componente de colágeno da matriz óssea (MORRIS; MANDAIR, 2011; TIMLIN; CARDEN; MORRIS, 1999; PENEL *et al.*, 1998).

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[®] (The Mathworks, MA, USA, versão 4.2) e o Excel[®] (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[®] (SILVEIRA JR *et al.*, 2002; ROCHA *et al.*, 2007a,b, 2008).

4.9 – Avaliação histológica por espectroscopia de luz

Após o período de fixação (72 horas), 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 μm , semi-seriados de 1/5, corados por hematoxilina-eosina (HE), Picosírius para colágeno, 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 na **Tabela 02**.

Tabela 02 – Critérios semi-quantitativos utilizados para análise através de microscopia de luz (UFPB-UFBA, 2013).

Critérios	Discreto	Moderado	Intenso
Reabsorção óssea	Presença <25% de reabsorção de osso remanescente e/ou leito cirúrgico	25-50% de reabsorção de osso remanescente e/ou leito cirúrgico	>75% 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 céls. mononucleares	25-50% de céls. mononucleares	>50% de céls. mononucleares
Deposição Colagênica	<25% de deposição colagênica	25-50% de deposição colagênica	>50% de deposição colagênica

4.10 Análise estatística

Foram obtidas as intensidades dos picos Raman em cm^{-1} . 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 de Student (pareado e não pareado).

5. RESULTADOS

5.1 – Análise histológica

Os resultados foram obtidos através da microscopia de luz, para os grupos controle e experimentais como descrito anteriormente.

5.1.1 Grupo Coágulo

Aos 15 dias, os espécimes desse grupo mostraram a ferida cirúrgica parcialmente preenchida por osso neoformado caracterizado por trabéculas ósseas delgadas e interconectantes ou não, com osteócitos no interior, osteoblastos na superfície e linhas basofílicas irregulares. De permeio, havia uma inflamação crônica moderada e diferenciação cartilaginosa. Ao final do período experimental, os espécimes desse grupo mostraram a ferida cirúrgica completamente preenchida por osso neoformado, mas diferentemente do período anterior, as trabéculas ósseas eram espessas e com linhas basófilas paralelas entre si (**Fig. 05**). Osteócitos no interior eram frequentes e também, por vezes, osteoblastos em superfície. A inflamação era crônica e variou de moderada a intensa em ambos os períodos experimentais, o colágeno era intenso e maduro (**Fig. 06**).

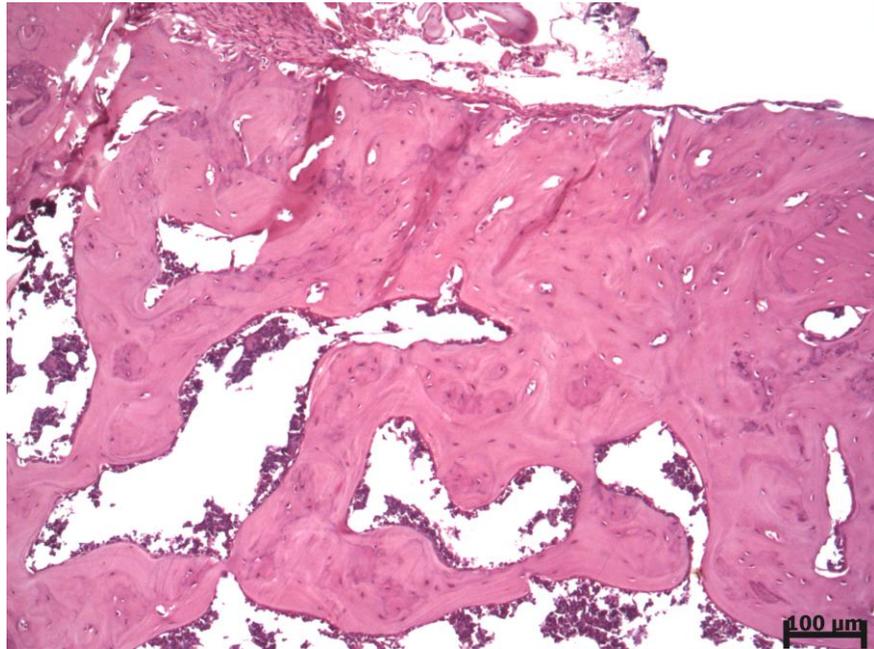


Figura 05 - Fotomicrografia mostrando ferida completamente preenchida por osso neoformado espesso, maduro apresentando osteócitos no interior e linhas basofílicas paralelas entre si (30 dias - HE) (SOARES, 2013).

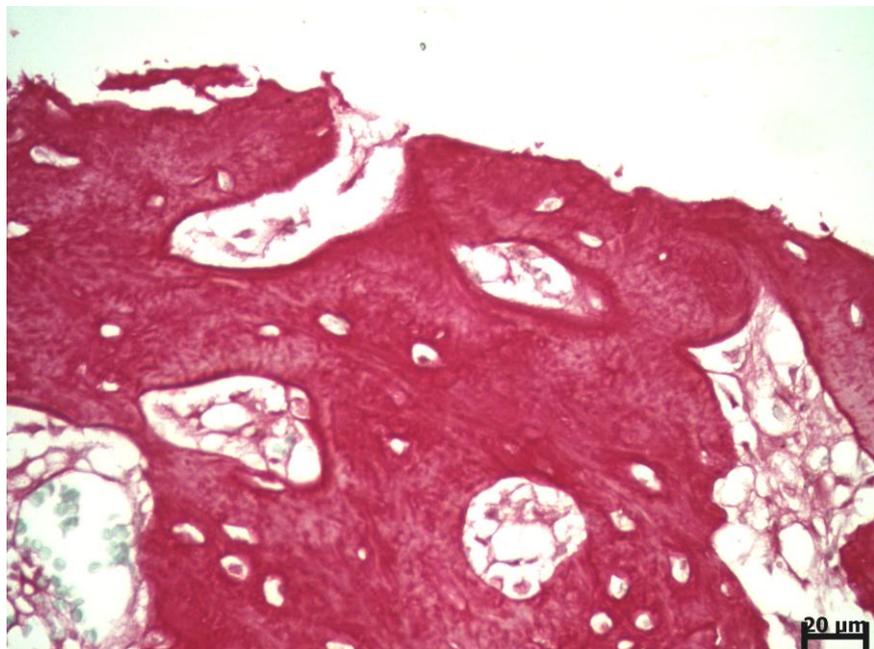


Figura 06 - Fotomicrografia mostrando osso neoformado apresentando colágeno maduro em toda sua extensão. (30 dias - Picosírius) (SOARES, 2013).

5.1.2 Grupo Biomaterial

Aos 15 dias, os espécimes desse grupo apresentaram ferida cirúrgica completamente preenchida por osso neoformado caracterizado por trabéculas ósseas de formato variado, por vezes mostrando osteócitos irregulares no seu interior e osteoblastos na superfície. Frequentemente, estas trabéculas circundavam ou aprisionavam um material anfofílico, em pequenas ou grandes quantidades, o qual foi interpretado como sendo remanescente do biomaterial (**Fig. 07**). Na área correspondente ao biomaterial, poucos osteoblastos em superfície eram vistos, sendo também observada a presença de reação gigantocelular tipo corpo estranho em torno do remanescente. Discreta ou moderada inflamação mista permeava todo o espécime. O colágeno maduro foi observado no tecido ósseo neoformado, mas ausente no remanescente do biomaterial. Ao final do período experimental, a maioria dos espécimes desse grupo, de maneira similar ao período anterior, mostrou ferida cirúrgica completamente reparada por neoformação óssea apresentando trabéculas ósseas interconectantes, espessas, de formato variado. Também, por vezes, sob a forma de glóbulos, muitas dessas trabéculas encontravam-se circundando material anfofílico, interpretado como sendo remanescente do biomaterial (**Fig. 08**). O colágeno era intenso e maduro na maioria dos espécimes (**Fig. 09**).

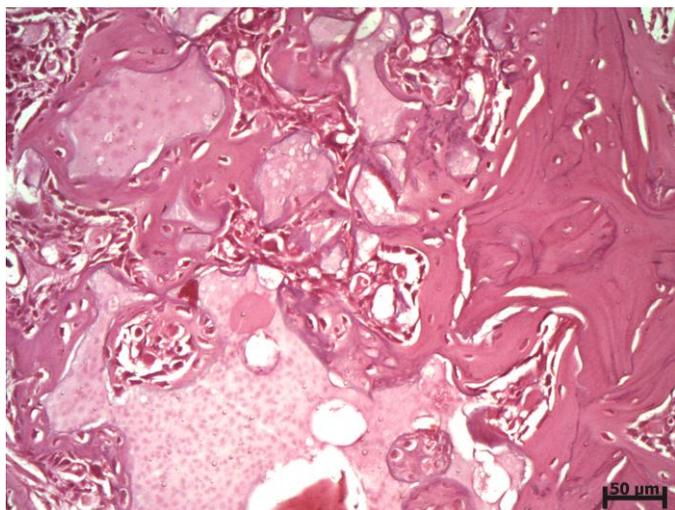


Figura 07 — Fotomicrografia mostrando, no lado direito, osso remanescente do leito cirúrgico, do qual partem trabéculas ósseas delgadas e interconectantes, com osteócitos no interior, as quais aprisionam o biomaterial remanescente. (15 dias – HE) (SOARES, 2013).

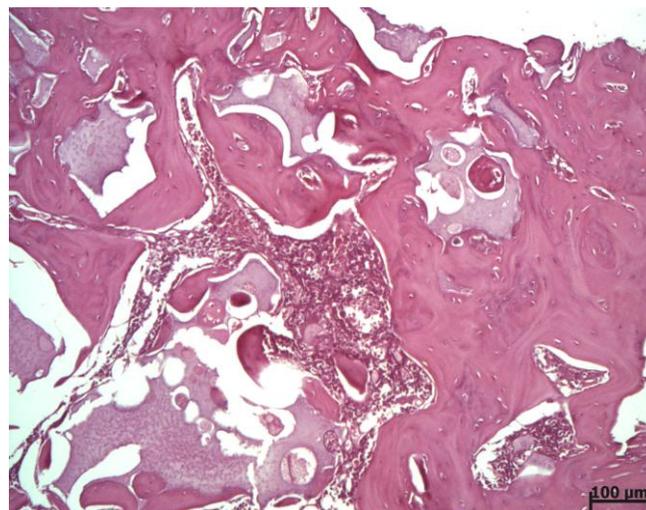


Figura 08 – Fotomicrografia mostrando osso neoformado caracterizado por trabéculas ósseas, predominantemente espessas, com osteócitos no interior e linhas basofílicas paralelas entre si. Note o remanescente do biomaterial ora aprisionado ora envolvido pelo osso neoformado, além de inflamação crônica. (30 dias – HE) (SOARES, 2013).

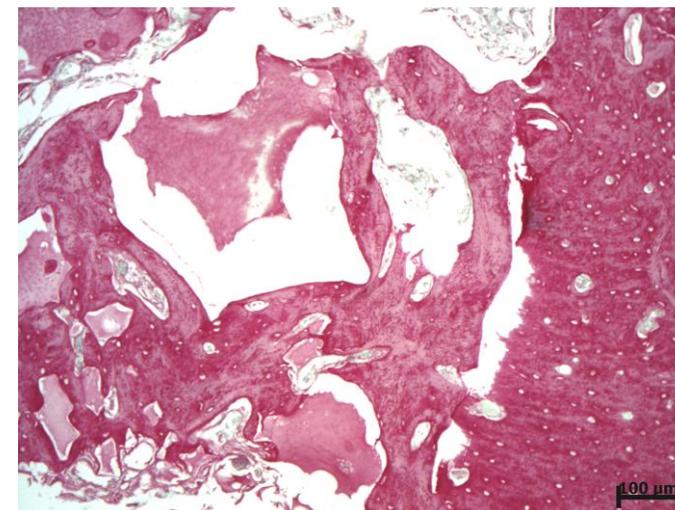


Figura 09 - Fotomicrografia mostrando, no lado direito, osso do leito cirúrgico, do qual partem trabéculas ósseas neoformadas com colágeno semelhante ao do leito cirúrgico, mas pouco distribuído no biomaterial (30 dias – HE) (SOARES, 2013).

5.1.3 Grupo LED

No 15º dia, os espécimes desse grupo mostraram a ferida cirúrgica parcialmente preenchida por osso neoformado caracterizado por trabéculas ósseas delgadas e interconectantes, com osteócitos no interior, preenchidas por medula óssea vermelha (**Fig. 10**). Não havia sinais de reabsorção, mas inflamação discreta e moderada foi observada. O colágeno estava presente de forma intensa e maduro por entre o osso neoformado. Aos 30 dias, os espécimes desse grupo mostraram a ferida cirúrgica ora completa ora parcialmente completa, onde foi observado osso neoformado, caracterizado por trabéculas ósseas interconectantes não tão espessas, mostrando osteócitos no interior e linhas basofílicas não paralelas entre si. Por vezes, foram vistas trabéculas com osteoblastos na superfície (**Fig. 11**). Não foram observadas áreas de reabsorção óssea. Diferenciação condroblástica também foi evidente bem como uma inflamação crônica que variou de discreta a moderada. O colágeno presente nas trabéculas ósseas apresentou-se de forma intensa e madura (**Fig. 12**).

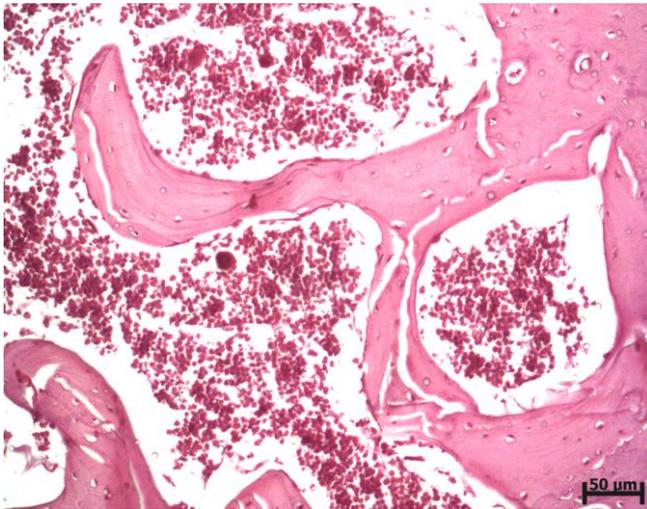


Figura 10 - Fotomicrografia mostrando osso neorformado em pouca quantidade, caracterizado por trabéculas ósseas delgadas com osteócitos e linhas basofílicas no interior. (15 dias – HE) (SOARES, 2013).

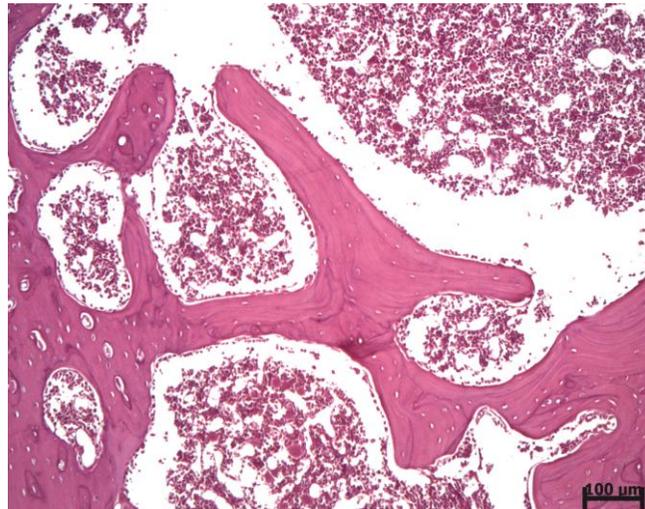


Figura 11 - Fotomicrografia mostrando osso neorformado em pouca quantidade, caracterizado por trabéculas ósseas delgadas com osteócitos, linhas basofílicas no interior, além de osteoblastos em superfície (30 dias – HE) (SOARES, 2013).

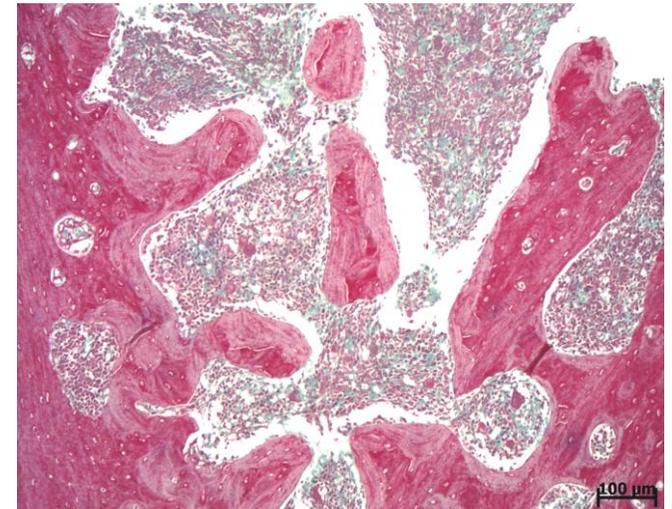


Figura 12 - Fotomicrografia mostrando osso neorformado apresentando colágeno maduro em toda a sua extensão (30 dias – Picrosírius) (SOARES, 2013).

5.1.4 Grupo LED + Biomaterial

Nos primeiros 15 dias, os espécimes desse grupo mostraram feridas cirúrgicas pouco preenchidas por osso neoformado, caracterizado por glóbulos ou trabéculas ósseas delgadas e interconectantes com linhas basofílicas paralelas entre si e osteócitos no interior, permeada por inflamação crônica moderada (**Fig. 13**). Diferenciação condroblástica também esteve presente, bem como raras áreas focais com material anfófilico, interpretado como remanescente do biomaterial, e reação gigantocelular tipo corpo estranho. O colágeno estava presente de forma moderada e era maduro. Ao término do período experimental, os espécimes desse grupo mostraram ferida cirúrgica completamente reparada na qual foi observada osso neoformado com trabéculas ósseas de formato e espessura variável, por vezes sob a forma de glóbulos, exibindo poucos osteócitos e linhas basofílicas paralelas entre si. Muitas dessas trabéculas encontram-se circundando material anfófilico interpretado como sendo remanescentes do biomaterial. Inflamação crônica foi observada e variou de discreta a moderada (**Fig. 14**) Reabsorção foi observada em apenas um espécime. O colágeno era maduro foi observado de forma intensa em todos os espécimes (**Fig. 15**).

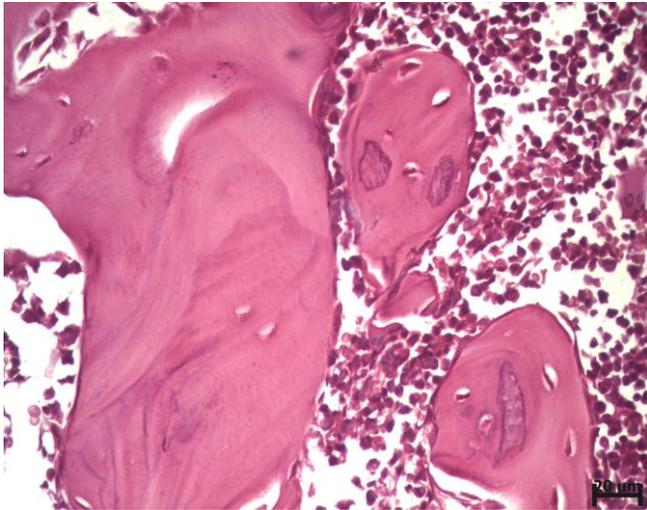


Figura 13 - Fotomicrografia mostrando osso neoformado apresentando glóbulos ósseos com biomaterial aprisionado, em meio a inflamação crônica (15 dias - HE) (SOARES, 2013).

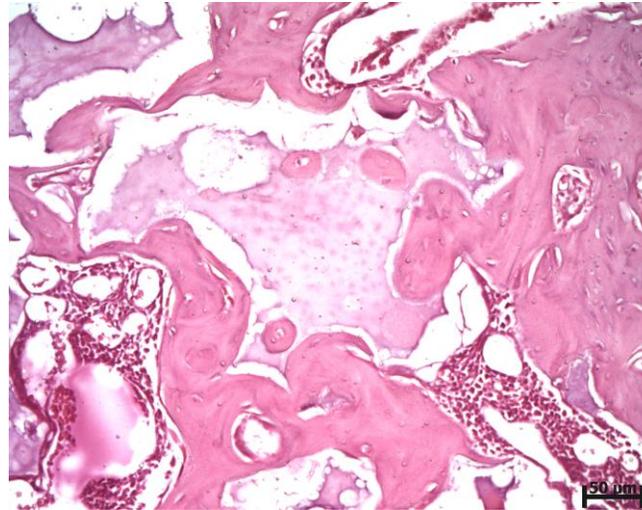


Figura 14 - Fotomicrografia mostrando osso neoformado sob a forma de trabéculas e glóbulos que exibem linhas basofílicas paralelas entre si, com osteócitos no interior. Destaca-se a presença de remanescente do biomaterial na região central, bem como remanescente de medula óssea vermelha (30 dias HE) (SOARES, 2013).

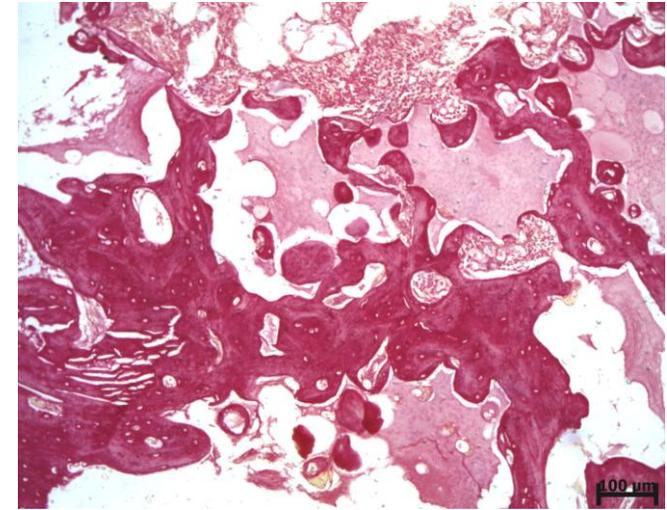


Figura 15 - Fotomicrografia evidenciando a presença de colágeno maduro representando por coloração vermelho intensa, ao contrário do remanescente do biomaterial envolvido pelo osso neoformado (30 dias - Picosírius) (SOARES, 2013).

5.1.5 Grupo Laser

Aos 15 dias, os espécimes desse grupo mostraram ferida cirúrgica completamente preenchida por osso neoformado composto por glóbulos ou trabéculas ósseas de espessura variável, interconectantes ou não, com osteócitos no interior e por vezes osteoblastos em superfície. Inflamação crônica variou de discreta a moderada e áreas focais de reabsorção foram também observadas (**Figs. 16 e 17**). O colágeno era intenso e maduro por entre o osso neoformado. No trigésimo dia, os espécimes desse grupo mostraram feridas completamente preenchidas por osso neoformado caracterizado por um trabecular mais espesso e organizado, apresentando osteócitos no interior e linhas basofílicas não paralelas entre si (**Fig. 18**).

Havia intensa inflamação crônica. Não foram vistos sinais de reabsorção. O colágeno presente no osso neoformado era maduro e intenso (**Fig. 19**).

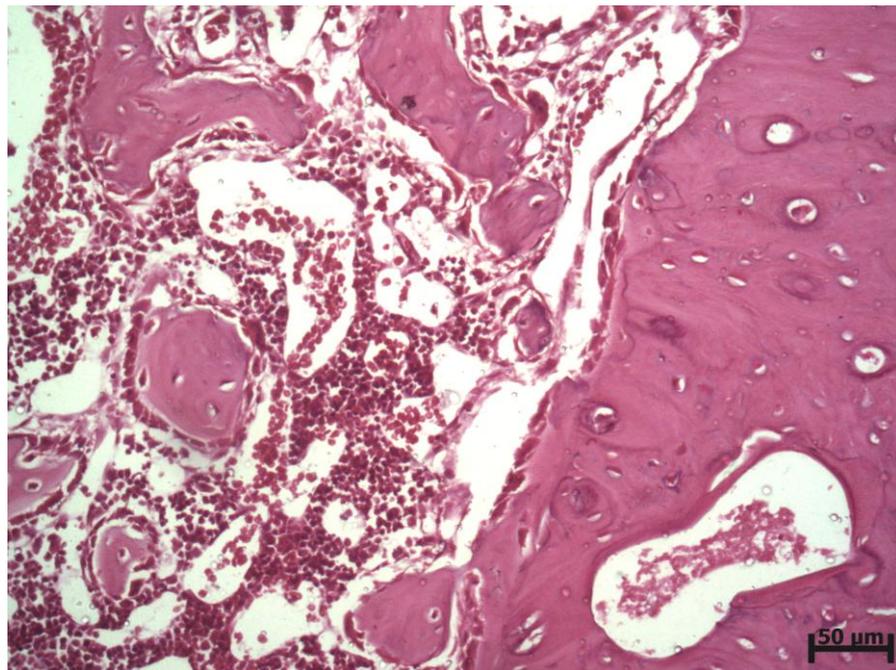


Figura 16 - Fotomicrografia mostrando, no lado direito, osso remanescente do leito cirúrgico e, a esquerda, pequenos glóbulos e trabéculas de osso neoformado com osteócitos no interior. Há sinais de reabsorção e também inflamação crônica de permeio (15 dias – HE) (SOARES, 2013).

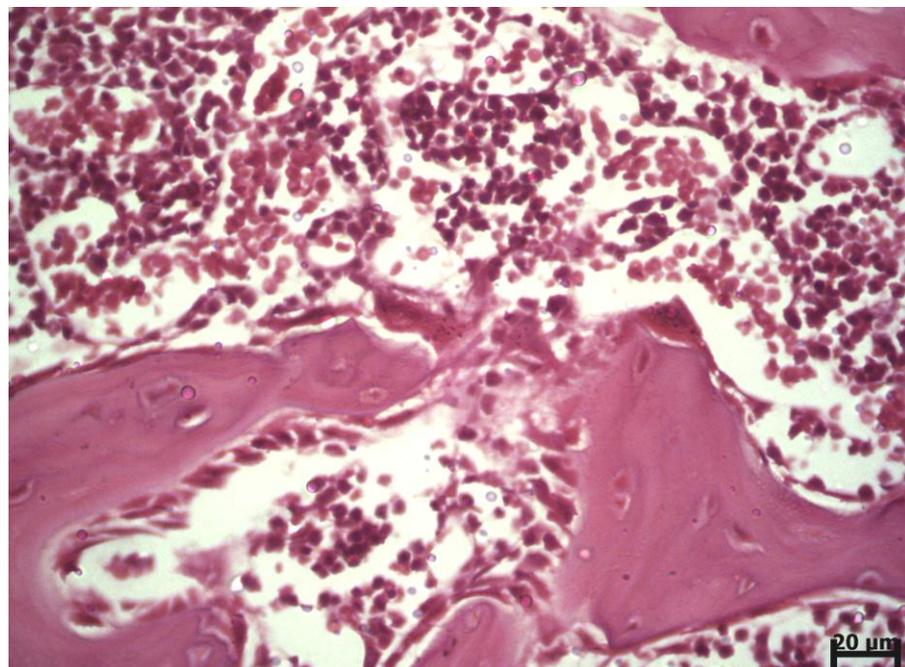


Figura 17 - Fotomicrografia mostrando trabéculas ósseas neoformadas com áreas de reabsorção (15 dias – HE) (SOARES, 2013).

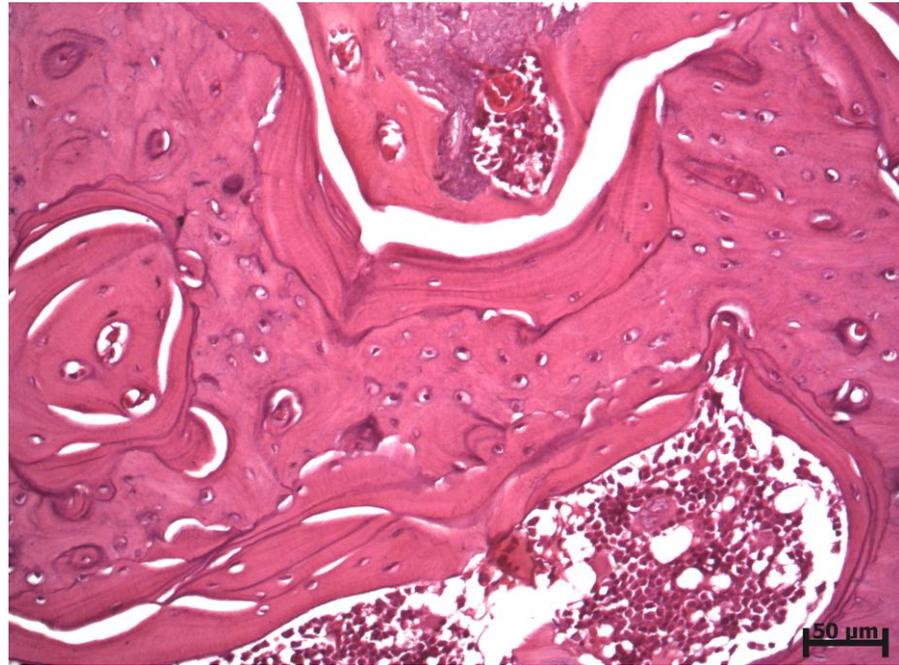


Figura 18 – Fotomicrografia onde se observa osso neoformado lamelar espesso, com linhas basofílicas, apresentando osteócitos no interior, canais vasculares e remanescente de medula óssea vermelha (30 dias – HE) (SOARES, 2013).

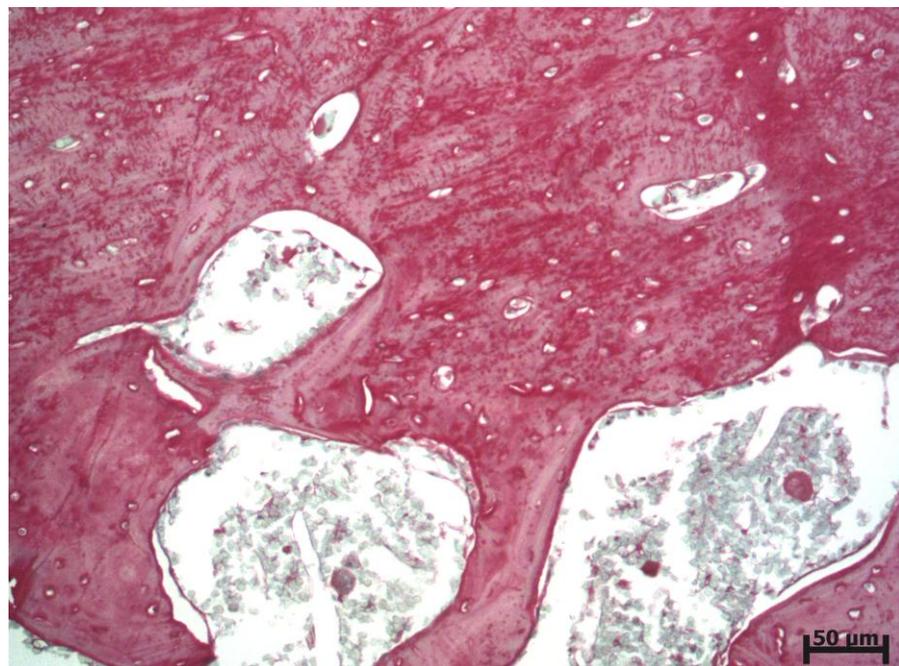


Figura 19 - Fotomicrografia mostrando osso neoformado apresentando colágeno maduro em toda a sua extensão (30 dias – Picosírius) (SOARES, 2013).

5.1.6 Grupo Laser + Biomaterial

No 15º dia, os espécimes desse grupo mostraram feridas cirúrgicas preenchidas completamente por osso neoformado representado por trabéculas ósseas de espessura não variável, as quais, mostram aprisionamento de material anfófilico em toda extensão, interpretado como sendo remanescente do biomaterial (**Fig. 20**). Embora não frequentemente, osteoblastos foram vistos na superfície bem como áreas focais de reabsorção óssea (**Fig. 20**). Diferenciação cartilaginosa também estava presente. Por entre o osso neoformado o colágeno era intenso e maduro. Ao término do estudo, os espécimes desse grupo mostram ferida cirúrgica completamente preenchida por trabéculas ósseas de espessura variável e interconectantes, com osteócitos no interior, apresentando também linhas basofílicas. O osso neoformado frequentemente envolvia ou aprisionava material anfófilico inerte interpretado como sendo remanescente do biomaterial (**Fig. 21**). Por vezes, o osso neoformado e o biomaterial depositado formavam uma massa sólida onde poucos espaços medulares foram observados (**Fig. 22**). A inflamação crônica variou de ausente à moderada. Osteoblastos em superfície foram observados, mas não frequentemente, não havendo sinais de reabsorção. O colágeno, de um modo geral, era maduro e intenso, embora, nas áreas correspondentes ao remanescente do biomaterial nem sempre fosse encontrado (**Fig. 23**).

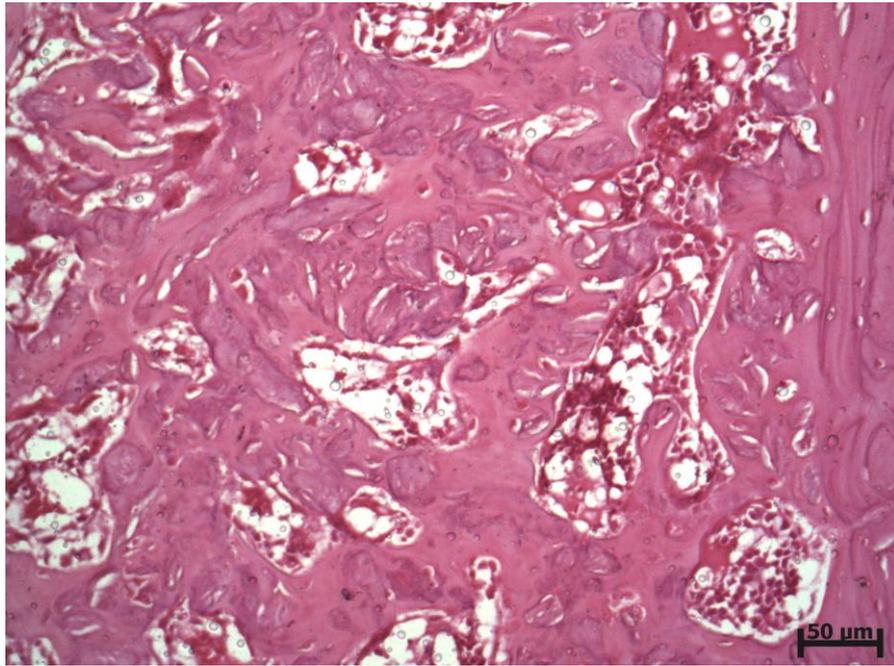


Figura 20 – Fotomicrografia mostrando, no lado direito, osso do leito cirúrgico, do qual partem trabéculas ósseas espessas, as quais mostram com frequência remanescente do biomaterial aprisionado. Há evidência de sinais de reabsorção e remanescente de medula óssea vermelha (15 dias – HE) (SOARES, 2013).

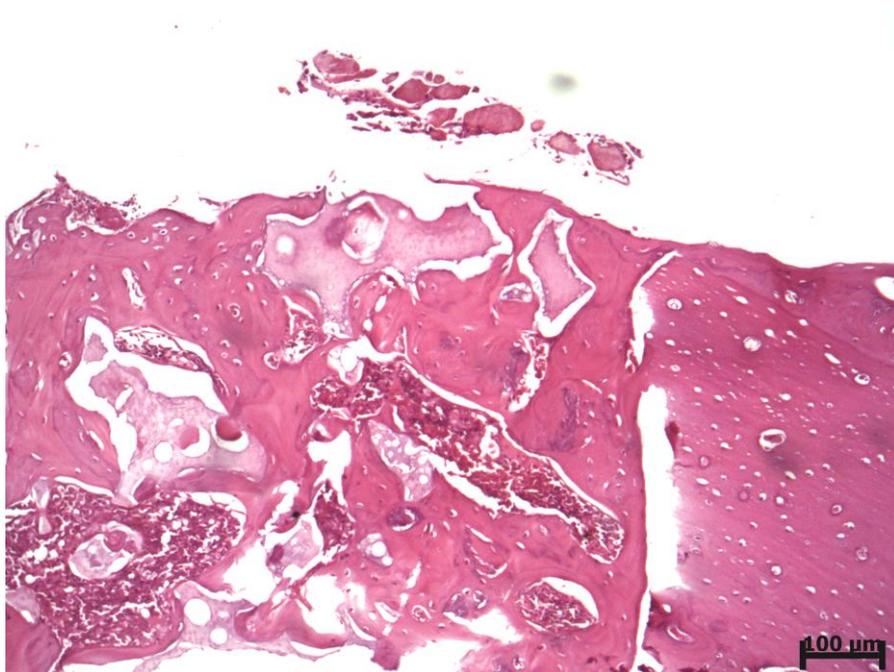


Figura 21 - Fotomicrografia mostrando, no lado direito, osso do leito cirúrgico da qual parte osso neoformado maduro com trabéculas ósseas espessas, com remanescentes do biomaterial aprisionado. Há, também, remanescente de medula óssea vermelha (30 dias – HE) (UFPB-UFBA, 2013).

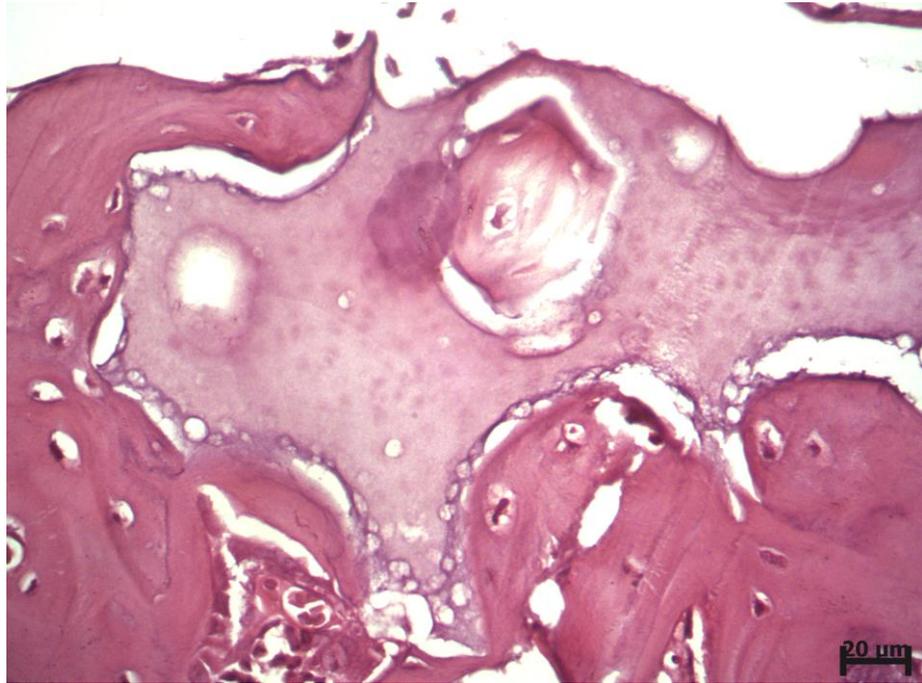


Figura 22 - Fotomicrografia mostrando onde se pode notar osso neoformado com osteócitos no interior envolvendo remanescente do biomaterial (30 dias - HE) (SOARES, 2013).

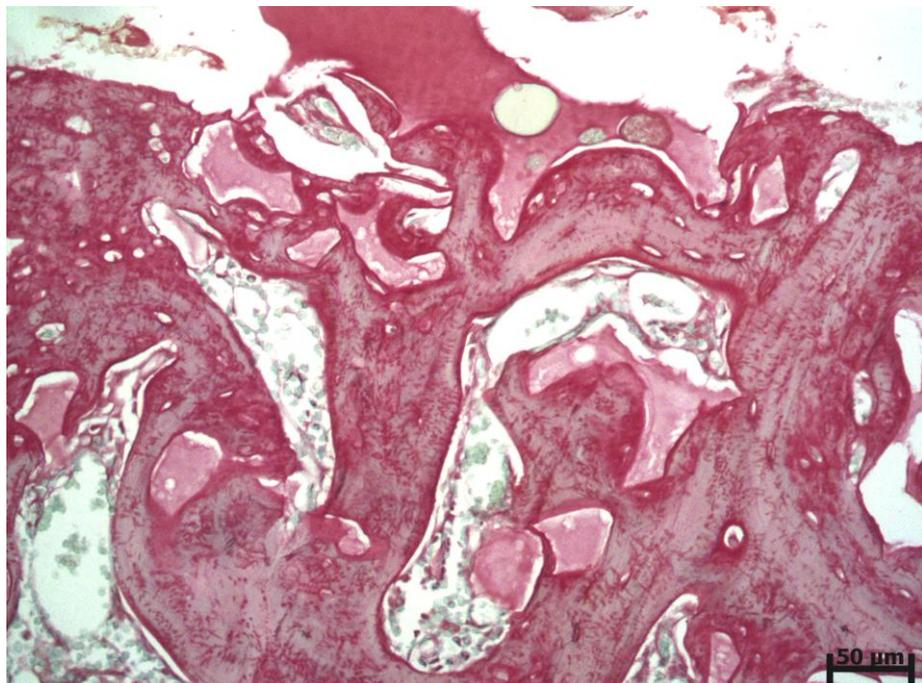


Figura 23 - Fotomicrografia mostrando osso neoformado representado por trabéculas ósseas maduras e espessas contendo colágeno em sua extensão. Note, de permeio, biomaterial, com fraca marcação (30 dias - Picosírius) (SOARES, 2013).

A fim de facilitar a compreensão dos diversos critérios utilizados para descrição histológica das lâminas, foi realizada uma sumarização dos dados obtidos.

Aos 15 dias, a inflamação variou de discreta a moderada em todos os grupos, a deposição de colágeno foi intensa em todos os grupos, com exceção do grupo LED + Biomaterial onde a deposição foi moderada. A reabsorção óssea foi observada apenas nos grupos Laser e Laser + Biomaterial. Em relação à neoformação óssea, o preenchimento do defeito foi completo, ou seja, houve intensa deposição de osso novo, nos grupos Biomaterial, Laser e Laser + Biomaterial, moderado nos grupos Coágulo e LED e, discreta, no grupo LED + Biomaterial. Nesse período experimental, a presença de remanescentes cartilagosos no defeito foi utilizada com o intuito de estabelecer um estágio mais avançado de maturação óssea entre os grupos que apresentaram preenchimento completo do defeito ósseo. Nesses grupos, os remanescentes estavam presentes apenas no grupo Laser + Biomaterial, o que pode indicar que esse grupo encontrava-se em estágio mais avançado do reparo. O resumo da descrição pode ser visto na **Tabela 03**.

No final do período experimental, a inflamação variou de discreta a moderada nos grupos Coágulo, Biomaterial, LED e LED + Biomaterial, no grupo Laser + Biomaterial variou de ausente à moderada, e no grupo Laser foi intensa. A deposição de colágeno foi intensa em todos os grupos. Em relação à reabsorção óssea, foi ausente em todos os grupos, com exceção do grupo LED + Biomaterial, onde estava presente. A neoformação óssea observada foi intensa em todos os grupos com preenchimento completo do defeito em todos

os grupos, com exceção do grupo LED, onde foram observados alguns espécimes com fechamento parcialmente completo (neoformação óssea moderada). Com o intuito de diferenciar o grau de maturação óssea desses grupos que obtiveram descrição semelhante do processo de reparo, foi utilizada a deposição/organização de linhas basofílicas no tecido ósseo neoformado, estando elas, presentes e paralelas entre si apenas no grupo Laser + Biomaterial, o que pode indicar que esse grupo encontrava-se em estágio mais avançado do processo de reparo ósseo (**Tab. 04**).

Tabela 03 – Sinopse descritiva da análise histológica, no período de 15 dias (SOARES, 2013).

Crítérios / Grupos	Inflamação	Colágeno	Reabsorção Óssea	Neoformação óssea (preenchimento)	Remanescentes cartilagosos
Coágulo	Moderada	Intenso	Ausente	Moderado	Presente
Biomaterial	Discreta/Moderada	Intenso	Ausente	Completo (intenso)	Ausentes
LED	Discreta/Moderada	Intenso	Ausente	Moderado	Ausentes
LED + Biomaterial	Moderada	Moderado	Ausente	Discreto	Presentes
Laser	Discreta/Moderada	Intenso	Presente	Completo (intenso)	Ausentes
Laser + Biomaterial	Discreta/Moderada	Intenso	Presente	Completo (intenso)	Presentes

Tabela 04 – Sinopse descritiva da análise histológica, no período de 30 dias (SOARES, 2013).

Crítérios / Grupos	Inflamação	Colágeno	Reabsorção Óssea	Neoformação óssea (preenchimento)	Linhas Basofílicas
Coágulo	Discreta/Moderada	Intenso	Ausente	Completo (intenso)	Paralelas
Biomaterial	Discreta/Moderada	Intenso	Ausente	Completo (intenso)	Ausentes
LED	Discreta/Moderada	Intenso	Ausente	Moderado/Completo	Irregulares
LED + Biomaterial	Discreta/Moderada	Intenso	Presente	Completo (intenso)	Paralelas
Laser	Intensa	Intenso	Ausente	Completo (intenso)	Irregulares
Laser + Biomaterial	Ausente/Moderada	Intenso	Ausente	Completo (intenso)	Paralelas

5.2 – Análise dos Espectros Raman

O Espectro Raman do osso mostrou bandas vibracionais proeminentes relacionadas à sua composição tecidual. Inicialmente espectros de osso não tratado e do biomaterial utilizado foram produzidos, e os picos de interesse especificados (**Fig. 24**). Espectros de todas as amostras foram obtidos conforme a metodologia descrita anteriormente (**Seção 4.8**)

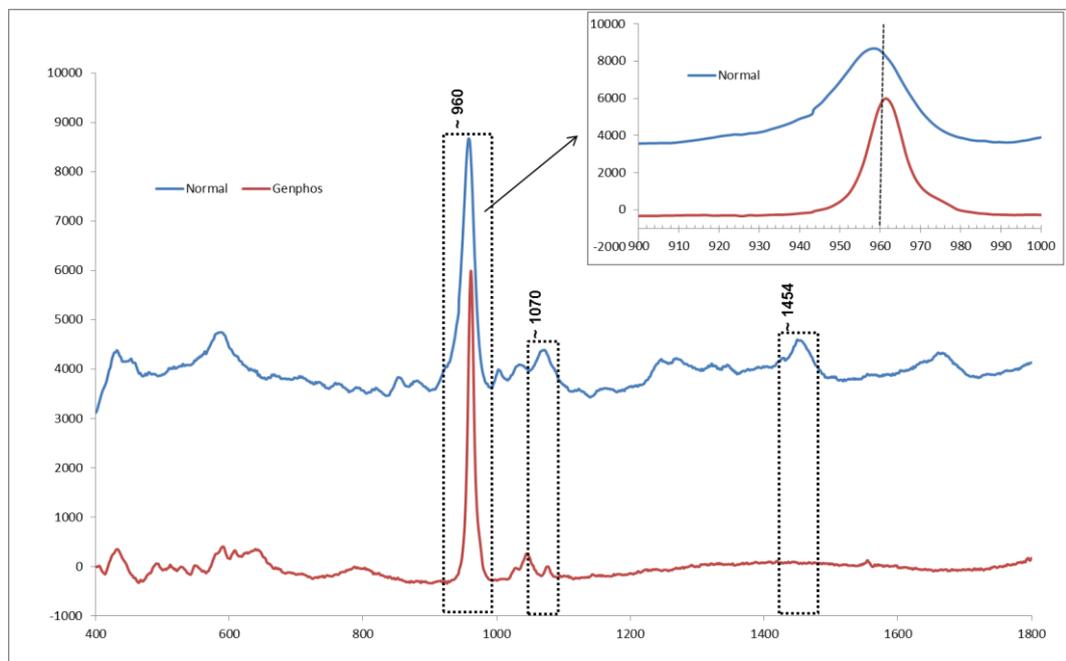


Figura 24 – Espectros Raman do osso cortical não tratado e do biomaterial utilizado (Genphos[®]), onde se observam os deslocamentos Raman estudados. Em destaque, sutil diferença é observada com relação ao pico de $\sim 960\text{cm}^{-1}$ (SOARES, 2013).

A média espectral “deslocada” no eixo y e de cada grupo em cada tempo experimental (15 e 30 dias) pode ser vista nas **Figuras 25 e 26**.

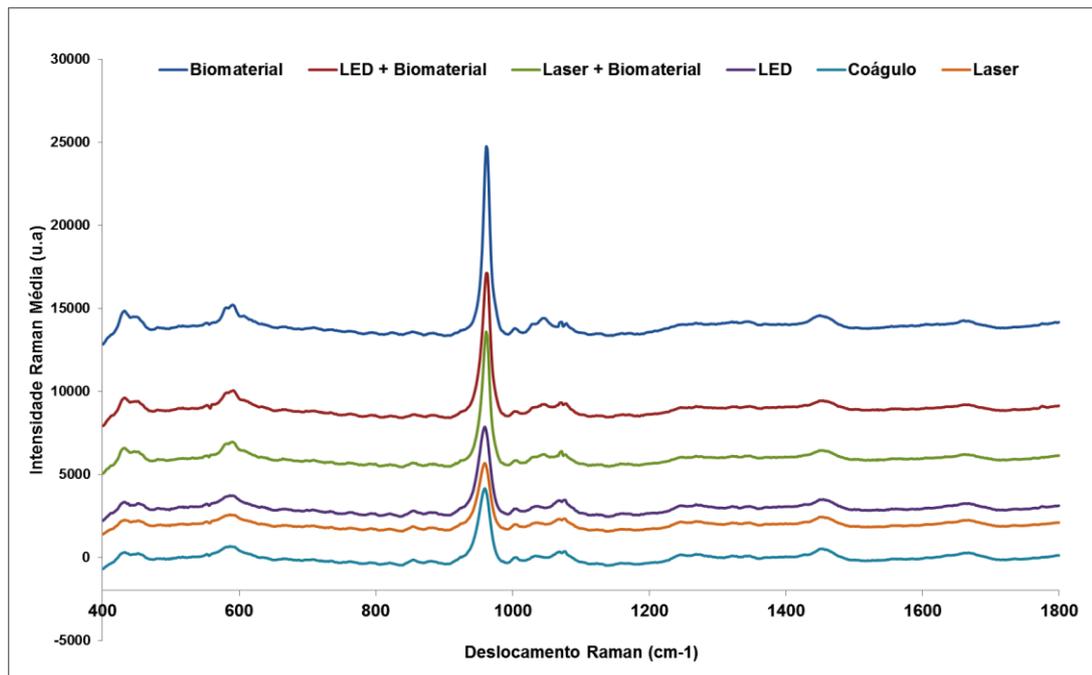


Figura 25 – Picos Raman de todos os grupos, aos 15 dias. Os espectros foram “deslocados” no eixo y de acordo com o pico de $\sim 960\text{cm}^{-1}$ (SOARES, 2013).

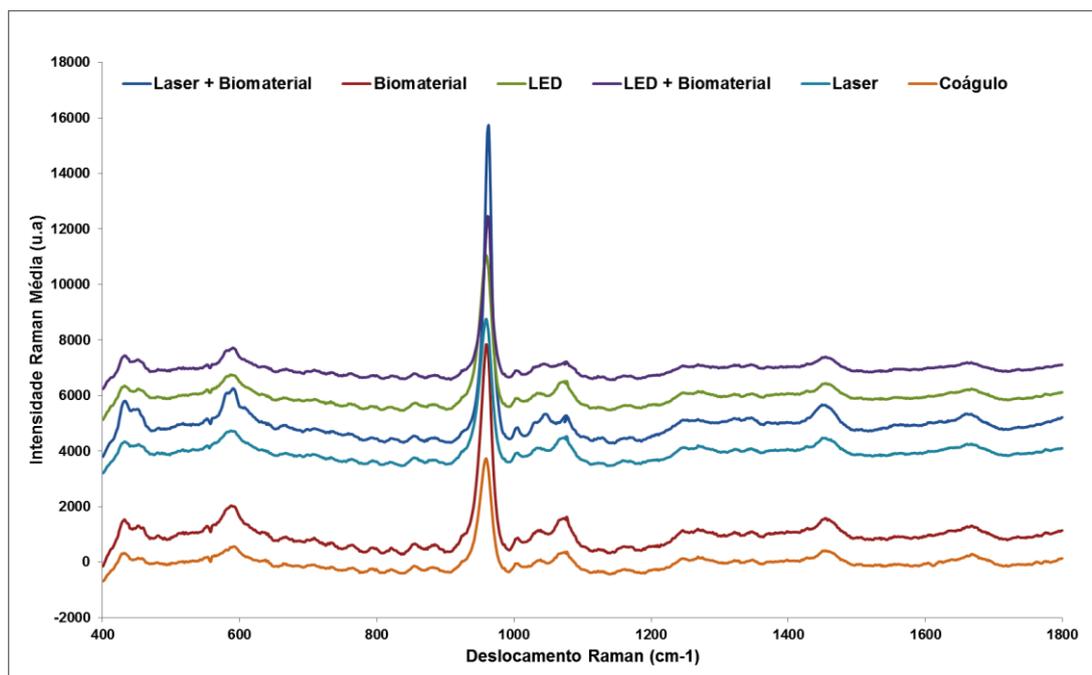


Figura 26 – Picos Raman de todos os grupos, aos 30 dias. Os espectros foram “deslocados” no eixo y de acordo com o pico de $\sim 960\text{cm}^{-1}$ (SOARES, 2013).

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 ~ 960 e ~ 1070 cm^{-1} . No segundo grupo, foi analisado o pico referente ao conteúdo orgânico (lipídeos e proteínas) da matriz óssea, representado pelo pico de ~ 1454 cm^{-1} .

A medição das intensidades dos picos relacionados ao conteúdo inorgânico (HA) aos 15 dias mostrou para ~ 960 cm^{-1} , uma maior média no grupo Biomaterial (9392 ± 4287) e a menor no grupo Laser ($3345,6 \pm 1290,3$) (**Fig. 27**). Aos 30 dias a maior intensidade média foi observada no grupo Laser + Biomaterial (15177 ± 8193) e a menor no grupo Coágulo (3949 ± 1522) (**Fig. 27**). Para o pico ~ 1070 cm^{-1} , aos 15 dias, o maior valor médio foi detectado no grupo LED ($559,9 \pm 207,3$), e o menor no grupo Laser ($338,8 \pm 124,1$) (**Fig. 28**). Aos 30 dias a maior intensidade média foi observada no grupo Laser + Biomaterial ($789,2 \pm 314,7$), e a menor no grupo Coágulo ($488,3 \pm 174,9$) (**Fig. 28**).

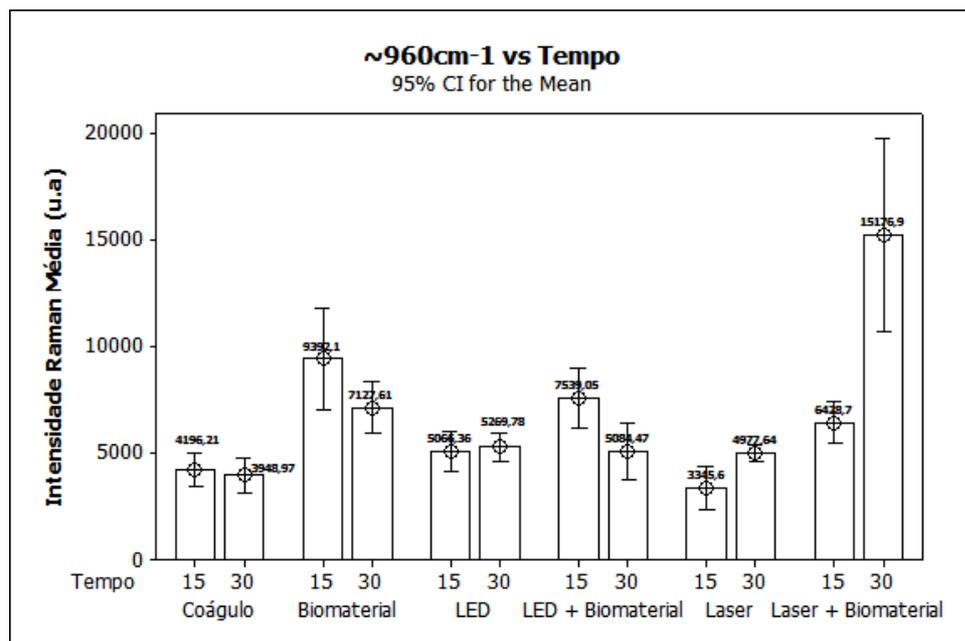


Figura 27 – Intensidades médias de todos os grupos para pico Raman ~ 960 cm^{-1} , nos períodos observacionais de 15 e 30 dias (SOARES, 2013).

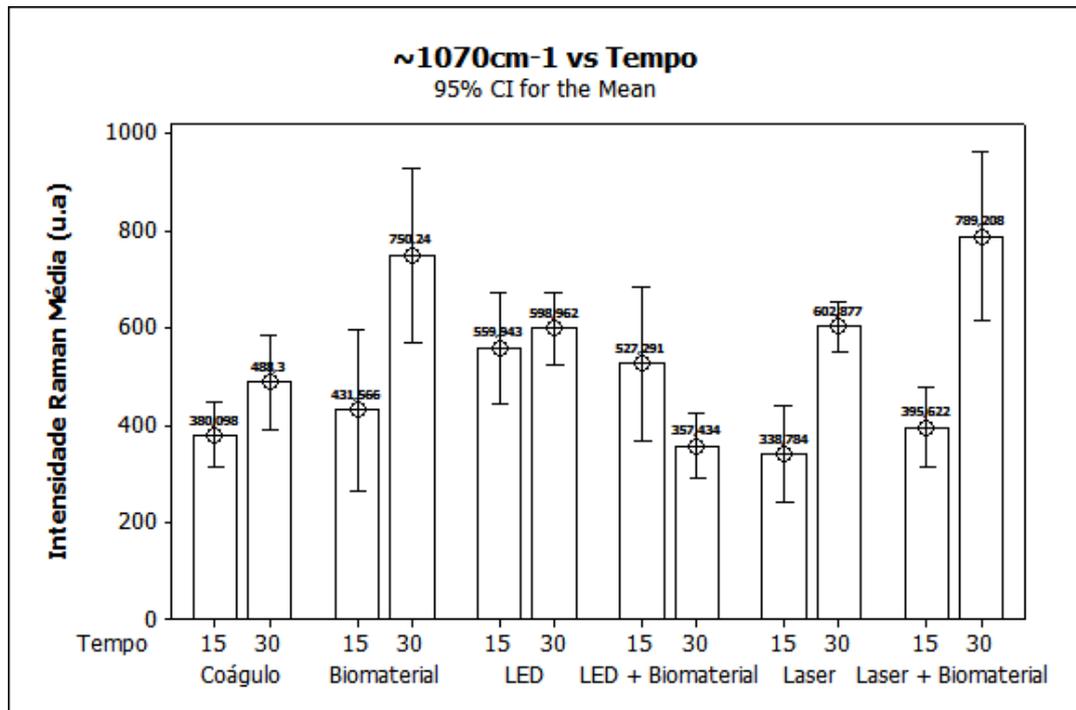


Figura 28 – Intensidades médias de todos os grupos para o pico Raman de $\sim 1070\text{ cm}^{-1}$, nos períodos observacionais 15 e 30 dias (SOARES, 2013).

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 Biomaterial ($548,9 \pm 268,6$), e a menor no grupo Laser ($330,6 \pm 491$) (Fig. 29). Aos 30 dias, a maior intensidade média foi observada no grupo Laser + Biomaterial ($711,1 \pm 247,1$) e a menor no grupo LED + Biomaterial ($362,48 \pm 99,4$) (Fig. 29).

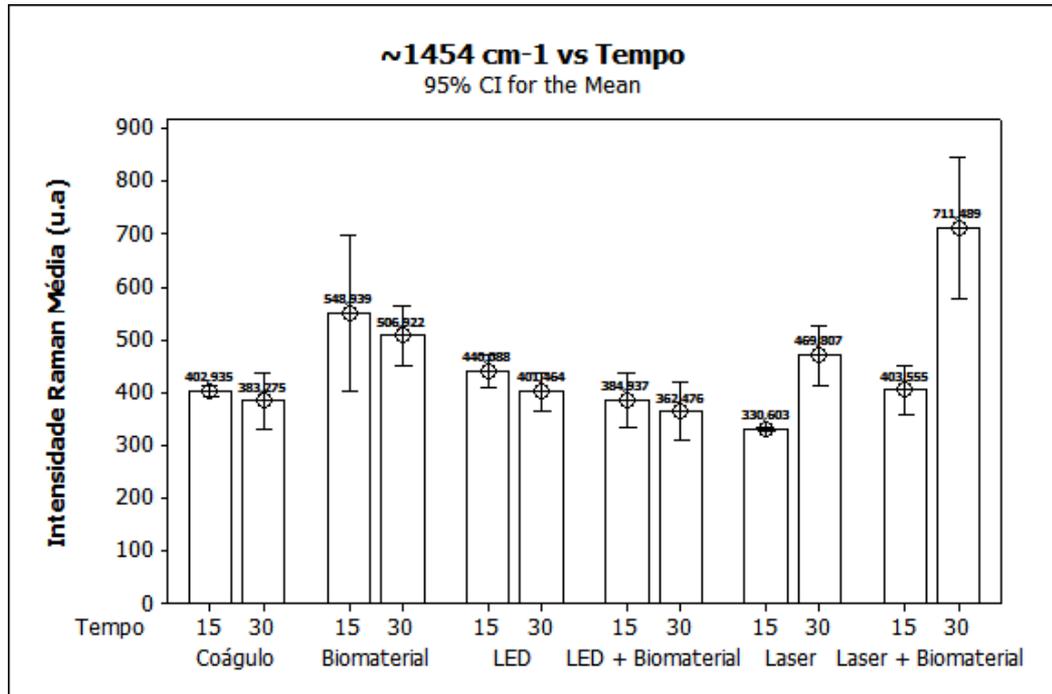


Figura 29 - Intensidades médias de todos os grupos para o pico Raman $\sim 1454 \text{ cm}^{-1}$, nos períodos observacionais de 15 e 30 dias (SOARES, 2013).

Um resumo dos resultados das intensidades médias estudadas e seus desvios-padrão podem ser vistos nas **Tabelas 05 e 06**.

Tabela 05 – Valores médios (\pm desvio padrão) das intensidades dos picos Raman estudados, aos 15 dias (SOARES, 2013).

Grupo Raman Shift (cm⁻¹)	Coágulo	Biomaterial	LED	LED+Biomaterial	Laser	Laser+Biomaterial
960	4196 \pm 1047	9392 \pm 4287	5066 \pm 1695	7539 \pm 2518	3345,6 \pm 1290,3	6429 \pm 1558
1070	380,1 \pm 85,4	431,6 \pm 301,1	559,9 \pm 207,3	527,3 \pm 285,9	338,8 \pm 124,1	395,6 \pm 129,3
1454	402,94 \pm 13,86	548,9 \pm 268,6	440,09 \pm 55,2	384,94 \pm 91,6	330,6 \pm 491	403,6 \pm 70,5

Tabela 06 – Valores médios (\pm desvio padrão) das intensidades dos picos Raman estudados, aos 30 dias (SOARES, 2013).

Grupo Raman Shift (cm⁻¹)	Coágulo	Biomaterial	LED	LED+Biomaterial	Laser	Laser+Biomaterial
960	3949 \pm 1522	7128 \pm 2117	5270 \pm 1159	5084 \pm 2373	4977,6 \pm 654,3	15177 \pm 8193
1070	488,3 \pm 174,9	750,2 \pm 324,3	599 \pm 133,2	357,4 \pm 122	602,9 \pm 94,1	789,2 \pm 314,7
1454	383,2 \pm 95,1	506,9 \pm 101,4	401,46 \pm 65,2	362,48 \pm 99,4	469,8 \pm 102,3	711,1 \pm 247,1

5.2.1 Análise estatística

A primeira fase da análise constou da verificação de possíveis diferenças entre todos os grupos nos dois tempos experimentais (**Tab. 05 e 06**). Para tal, os dados foram avaliados através de ANOVA, cujos resultados podem ser vistos na **Tabela 07**. Na segunda fase foi realizada, quando apropriado, análise comparativa entre os grupos dois a dois, cujos resultados podem ser vistos nas **Tabelas 08 e 09**. Em seguida, foi feita a avaliação de possível influência do tempo nos resultados (**Tab. 10**).

Tabela 07 - Resultados do teste ANOVA para cada pico nos períodos de 15 e 30 dias (SOARES, 2013).

Raman Shift (cm⁻¹)	15 dias	30 dias
~960	p < 0.001	p < 0.001
~1070	NS	p < 0.001
~1454	p = 0.03	p < 0.001

NS – não significativo

Tabela 08 – Análise estatística entre os grupos, dois a dois, aos 15 dias (SOARES, 2013).

Grupo Raman Shift (cm⁻¹)	Coágulo^a	Biomaterial^b	LED^c	LED+Biomaterial^d	Laser^e	Laser+Biomaterial^f
~960	4196 ± 1047 ^{b,d,f}	9392 ± 4287 ^{a,e,f}	5066 ± 1695 ^{d,e,f}	7539 ± 2518 ^{a,c,e}	3345,6 ± 1290,3 ^{b,c,d,f}	6429 ± 1558 ^{a,b,c,e}
~1070	380,1 ± 85,4	431,6 ± 301,1	559,9 ± 207,3	527,3 ± 285,9	338,8 ± 124,1	395,6 ± 129,3
~1454	402,94 ± 13,86 ^{b,c,e}	548,9 ± 268,6 ^{a,d,e}	440,09 ± 55,2 ^{a,e}	384,94 ± 91,6 ^{e,b}	330,6 ± 491 ^{a,b,c,d,f}	403,6 ± 70,5 ^e

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

Tabela 09 – Análise estatística entre os grupos, dois a dois, no período observacional de 30 dias (SOARES, 2013).

Grupo Raman Shift (cm⁻¹)	Coágulo^a	Biomaterial^b	LED^c	LED + Biomaterial^d	Laser^e	Laser + Biomaterial^f
~960	3949 ± 1522 ^{b,c,d,e,f}	7128 ± 2117 ^{a,c,d,e,f}	5270 ± 1159 ^{a,b,f}	5084 ± 2373 ^{a,b,f}	4977,6 ± 654,3 ^{a,b,f}	15177 ± 8193 ^{a,b,c,d,e}
~1070	488,3 ± 174,9 ^{b,c,d,e,f}	750,2 ± 324,3 ^{a,d}	599 ± 133,2 ^{a,d,f}	357,4 ± 122 ^{a,b,c,e,f}	602,9 ± 94,1 ^d	789,2 ± 314,7 ^{a,c,d}
~1454	383,2 ± 95,1 ^{b,e,f}	506,9 ± 101,4 ^{a,c,d,f}	401,46 ± 65,2 ^{b,f}	362,48 ± 99,4 ^{b,e,f}	469,8 ± 102,3 ^{a,d,f}	711,1 ± 247,1 ^{a,b,c,d,e}

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

Tabela 10 - Resumo da análise estatística (Teste t de Student) dos picos Raman dentro de cada grupo, em relação ao tempo (15 e 30 dias) (SOARES, 2013).

Grupo Raman Shift (cm ⁻¹)	Tempo (d)	Coágulo	Biomaterial	LED	LED + Biomaterial	Laser	Laser + Biomaterial
~960	15d ¹	4196 ± 1047	9392 ± 4287	5066 ± 1695	7539 ± 2518 ²	3345,6 ± 1290,3 ²	6429 ± 1558 ²
	30d ²	3949 ± 1522	7128 ± 2117	5270 ± 1159	5084 ± 2764 ¹	4977,6 ± 654,3 ¹	15177 ± 8193 ¹
~1070	15d ¹	380,1 ± 85,4	431,6 ± 301,1 ²	559,9 ± 207,3	527,3 ± 285,9 ²	338,8 ± 124,1 ²	395,6 ± 129,3 ²
	30d ²	380,1 ± 174,9	750,2 ± 324,3 ¹	599 ± 133,2	357,4 ± 122 ¹	602,9 ± 94,1 ¹	789,2 ± 314,7 ¹
~1454	15d ¹	402,94 ± 13,86	548,9 ± 268,6	440,09 ± 55,22	384,94 ± 91,65	330,6 ± 491 ²	403,6 ± 70,5 ²
	30d ²	383,27 ± 95,12	506,9 ± 101,4	401,46 ± 65,20	362,48 ± 99,39	469,8 ± 102,3 ¹	711,15 ± 247,1 ¹

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

6. DISCUSSÃO

Os defeitos ósseos são bons modelos para o estudo do processo de reparo tecidual. Ao contrário das fraturas, os defeitos são menos propensos a influencia 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 o DNA dos ratos homólogos com o 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).

O biomaterial de enxerto utilizado neste estudo (fosfocerâmica bifásica) foi escolhido devido a sua biocompatibilidade, não toxicidade, incorporação lenta, osteocondutividade, por possuir uma estreita semelhança mineral, estrutural e química, com o osso humano. A hidroxiapatita, constituinte da fosfocerâmica bifásica, que apresenta uma ação osteocondutora muito eficaz na formação de um novo tecido ósseo, sendo por isso um biomaterial bastante estudado atualmente. Outro fator importante foi a confecção da HA com adição β -fosfato de tricálcio, uma alteração no processo de sinterização que modifica a relação P/Ca da molécula, alterando sua dissolução no tecido ósseo, esse fator está diretamente relacionado com a modulação na taxa de incorporação do enxerto, uma vez que, na HA sintética a dissolução é muito lenta, e em alguns tipos de cerâmicas é muito rápida, o que em ambos os casos é desfavorável ao processo de reparo ósseo (CARVALHO *et al.* 2011; PINHEIRO *et al.* 2009, 2013; WEBER, *et al.* 2006; TORRES, *et al.* 2007).

O protocolo de fototerapia laser/LED utilizado neste estudo é semelhante aos utilizados em estudos anteriores e, em todos os protocolos, modelos e parâmetros utilizados anteriormente ficou demonstrado que o uso das fototerapias no IV-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 de diferentes fontes de luz sobre a regeneração óssea dependa não só do comprimento de onda e da dose total de irradiação, mas também sobre o tempo de irradiação e o modo de irradiação e mais importante ainda da fonte de luz utilizada (PINHEIRO, *et al.* 2009, 2011, 2012a,b, 2013).

A ideia para a combinação de enxerto de HA + β -TCP e as fototerapias laser/LED neste estudo, foi baseada no fato da substância enxertada possuir propriedades osteocondutoras e as fototerapias utilizadas possuírem 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- β . Esses fatores utilizados isoladamente foram eficazes na aceleração do processo de reparo em vários modelos experimentais. Justificando assim sua associação com o uso de biomateriais como a HA. Essa associação pode modular a reparação de defeitos ósseos de uma forma semelhante ao que ocorre após enxerto de osso autógeno, evitando apenas suas complicações e limitações. O enxerto autógeno continua a ser o padrão-ouro para o tratamento de defeitos ósseos (PINHEIRO *et al.* 2012a,b, 2013).

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 bastante utilizado para avaliação do reparo ósseo em diversos estudos já publicados (CARVALHO *et al.*, 2011; GERBI *et al.* 2008; PINHEIRO *et al.*, 2012a,b, 2013; TORRES *et al.*, 2007; WEBER *et al.*, 2006).

Tendo em vista a complexidade do desenho experimental do presente estudo, optou-se por uma discussão por fonte de luz e posteriormente a comparação entre ambos. Inicialmente foram discutidos os achados histológicos, em seguida, os achados obtidos através da espectroscopia Raman.

No presente estudo, optou-se por realizar uma análise histológica qualitativa, para descrever os mecanismos envolvidos no processo de reparo ósseo de defeitos tratados ou não com fototerapia laser ou LED, isoladamente ou associada ou não à fosfo-cerâmica bifásica de HA + β -TCP. A descrição seguiu os parâmetros estabelecidos na metodologia (**Seção 4.9**).

Os fenômenos observados nos grupos não submetidos ao uso do biomaterial foram similares a relatados anteriores conforme a metodologia utilizada. Assim sendo, diferenças maiores não foram observadas histologicamente no processo de reparo dos grupos, Coágulo, Laser e LED em ambos os períodos experimentais. Portanto, depreende-se desses achados que, os grupos irradiados, apresentaram um processo de reparo mais avançado e de qualidade que o grupo não irradiado (Coágulo) (PINHEIRO *et al.*, 2009, 2011, 2012a).

Para todos os parâmetros utilizados no presente estudo, a utilização do biomaterial + Laser / LED mostraram melhores resultados. Este aspecto tem sido descrito em estudos anteriores nos quais a utilização de luz laser/LED estaria associada a um aumento da proliferação de fibroblastos, condroblastos e osteoblastos e consequente aumento da deposição de colágeno, importante precursor da deposição da matriz mineral (PINHEIRO *et al.*, 2009, 2011, 2012a). Dessa forma, o aumento da neoformação óssea está intimamente relacionado, com ambos, aumento do número de osteoblastos e de sua atividade secretora.

A presença de um precursor cartilaginoso foi observada apenas, aos 15 dias, nos grupos Coágulo, LED + Biomaterial e LASER + Biomaterial, o que denotaria um processo reparativo em um estágio mais avançado que nos demais grupos. Interessante se observar que ao término do período experimental apenas o grupo LED apresentou este tecido.

O aspecto trabecular variou também entre os grupos estudados. No período inicial do reparo, as trabéculas eram delgadas nos grupos Coágulo, LED, LED + Biomaterial e apresentavam-se de forma variável nos demais grupos. Ao término do período experimental, a espessura trabecular foi espessa nos grupos Coágulo, Biomaterial e Laser + Biomaterial, e, variavam de espessura nos demais grupos. Ressalta-se que no grupo Laser as trabéculas além de espessas eram de certa forma mais organizadas no tecido. Interessante foi a observação da atividade remodelativa ainda presente, evidenciada pela presença das linhas basofílicas. Estas linhas foram observadas na maioria dos grupos ao final do tempo experimental e se

mostraram ora paralelas ora não paralelas. Estas linhas não foram observadas no grupo Biomaterial. De fato, este aspecto foi observado apenas no grupo Coágulo, no qual a presença cartilaginosa parece ter tido influência no resultado uma vez que foi o grupo no qual a cartilagem aparentemente progrediu para um trabecular delgado aos 15 dias e espesso aos 30 dias. A razão para tal necessita clarificação futura e pode estar relacionado com o biomaterial ou com a fonte de luz, que podem ter, de alguma forma, acelerado ou atrasado a diferenciação cartilaginosa, fato que poderia ser evidenciado em estudo utilizando tempos intermediários entre os dois usados neste trabalho bem como no uso de marcadores específicos para este tecido.

Em relação às linhas basofílicas presentes no tecido ósseo, foram observadas inicialmente (15 dias) em todos os grupos, exceto o Biomaterial. Porém, apenas no grupo LED + Biomaterial as linhas encontravam-se depositadas de forma regular, paralelas entre si, o que pode ser indicativo de um osso mais maduro já nos períodos iniciais do reparo. Ao final do período experimental o padrão observado anteriormente se manteve. O fato de que no grupo Biomaterial elas ainda não foram detectadas pode ser indicativo de um processo de remodelação mais lento ou até mesmo mais tardio.

O fato de ter sido observada resposta inflamatória e, em alguns casos, reação de corpo estranho ao redor do biomaterial é um achado esperado. Não importa quão biocompatível seja o biomaterial, este continuará sendo um agente ou material estranho. É interessante se observar que, em estudo anterior usando outro biomaterial (MTA), esta reação foi detectada de forma mais marcante e intensa que no presente estudo. Este aspecto pode ser

indicativo de que o material usado no presente trabalho é menos irritante ao tecido que o MTA (PINHEIRO *et al.*, 2012a).

Ao final do período experimental, foi observada uma resposta inflamatória intensa no grupo Coágulo, onde não foi realizado enxerto de biomaterial, diferentemente do observado em todos os demais grupos. Isto pode ser explicado por resultados obtidos em estudos anteriores que indicaram que a persistência da resposta inflamatória nas fases posteriores da reparação óssea pode ser resultado de atividade flogística provocada pelos coágulos de sangue residual (CONEGLIAN, 2007; PINHEIRO *et al.*, 2011).

O processo de reparo ósseo foi avaliado também, por espectroscopia Raman, através do estudo de picos que identificaram a HA fosfatada e carbonatada e o colágeno, na avaliação da qualidade óssea. A espectroscopia Raman foi utilizada para avaliar a constituição molecular do tecido e, em seguida, classificá-los de acordo com as diferenças observadas nos espectros. Estudos anteriores mostraram o uso da espectroscopia Raman como uma ferramenta de diagnóstico para ossos saudáveis, patológicos ou em processo de reparo. Este método de avaliação é considerado como padrão-ouro para estudar componentes ósseos e sua constituição, revelando alterações bioquímicas associadas ao processo de reparo (ACIOLE, 2010; LOPES *et al.*, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2010, 2012)

A análise dos componentes ósseos através da espectroscopia Raman, fornece informações a respeito do estado metabólico da célula (CARVALHO *et al.*, 2011; PINHEIRO *et al.*, 2012a,b, 2013). Estudos recentes, utilizando esse método de análise, 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 ($\sim 1454\text{ cm}^{-1}$), justificando sua escolha como marcador ósseo neste trabalho (MORRIS, MANDAIR, 2011; PINHEIRO *et al.*, 2013).

Como mostrado (**Fig. 25**), a maior parte das bandas de um espectro de Raman do osso pode ser atribuída à HA fosfatada, carbonatada, ou matriz colágena. Esses espectros dos constituintes inorgânicos e orgânicos estão correlacionados com a rigidez do osso cortical, módulo de flexão, resistência à tração (MORRIS; MANDAIR, 2011). A relação mineral ($\sim 960\text{ cm}^{-1}$) / matriz ($\sim 1454\text{ cm}^{-1}$); relação carbonato ($\sim 1070\text{ cm}^{-1}$) / matriz ($\sim 1454\text{ cm}^{-1}$) é o mais forte indicador das propriedades mecânicas do osso. A cristalinidade, que também está correlacionada tanto com a relação mineral/matriz quanto à relação mineral entre a HA carbonatada ($\sim 1070\text{ cm}^{-1}$) / fosfatada ($\sim 960\text{ cm}^{-1}$) (YERRAMSHETTY, J. S.; AKKUS, 2008).

Quando da utilização da fototerapia laser, os resultados da presente investigação demonstraram que o uso da luz laser associado ao biomaterial mostrou melhores resultados no que diz respeito à mineralização (**Fig. 28**). Este aspecto tem sido descrito em estudos anteriores nos quais a utilização da luz laser associada à hidroxiapatita causou um aumento da proliferação de fibroblastos e também na sua secreção de colágeno (**Fig. 30**), 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; GERBI, 2006; PINHEIRO *et al.*, 2012b, 2013).

Os resultados do presente estudo estão alinhados com relatos anteriores e indicam que a associação de luz laser com enxerto de fosfo-cerâmica bifásica melhora a reparação de defeitos ósseos, onde foi observada uma maior deposição de tecido ósseo maduro, medida através do pico $\sim 960\text{ cm}^{-1}$ (CARVALHO *et al.*, 2011; PINHEIRO *et al.*, 2011, 2013). A análise global dos resultados indica que as diferenças estatisticamente significativas entre os picos estudados foram principalmente detectáveis no final do período experimental (picos de HA em ~ 960 e ~ 1070 e o colágeno em $\sim 1454\text{ cm}^{-1}$).

Durante as fases iniciais do reparo, a atividade osteoblástica é principalmente proliferativa e deposição da matriz começa mais tarde, isto resulta na formação de osso imaturo, ainda pobre em HA. Esta posterior maturação representa uma melhor capacidade de osteoblastos maduros em secretar HA em animais irradiados (CARVALHO *et al.*, 2011; PINHEIRO *et al.*, 2011, 2013).

O presente trabalho mostrou que, no fim do tempo experimental, a medição dos componentes relacionados com a mineralização, picos em ~ 960 e $\sim 1070\text{ cm}^{-1}$) foram mais elevados no grupo Laser + Biomaterial. A partir destes resultados, é possível notar que a intensidade destes picos aumentou em todos os grupos e que este seria indicativo do aumento da deposição de HA ao longo do tempo de reparação e de aumento da mineralização do osso recentemente formado. O tempo influenciou significativamente estes picos quando o

biomaterial, o laser ou a associação de ambos foi utilizada (CARVALHO *et al.*, 2011; PINHEIRO *et al.*, 2011, 2013). Observações semelhantes foram relatadas anteriormente, utilizando outros tipos de enxertos, como BMPs (GERBI *et al.*, 2008; LOPES *et al.*, 2010) e MTA (PINHEIRO *et al.*, 2010, 2012a,b). O que pode representar uma maior capacidade dos osteoblastos maduros de secretarem HA em tecidos ósseos irradiados, enquanto que em grupos não irradiados, a proliferação celular ainda estava ocorrendo (TORRES, *et al.*, 2008; WEBER *et al.*, 2006).

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 29**, a maior intensidade para esse pico, ao final do período experimental, foi observada no grupo Laser + Biomaterial, sendo o valor estatisticamente significativo ($p < 0.001$) quando comparado com todos os demais grupos (**Teste-T**) (**Tab. 09**). 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 Laser + Biomaterial, sendo estatisticamente diferente dos grupos Coágulo, LED e LED + Biomaterial. O menor valor médio foi visto no grupo LED + Biomaterial, que foi estatisticamente significativo quando comparado a

todos os demais grupos. Essas leituras podem indicar que esse grupo possuía menor quantidade de osso transicional (imaturo), e que o osso presente, independente da quantidade, era maduro.

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 dependeram do fator tempo de maturação do tecido para o pico de $\sim 1454 \text{ cm}^{-1}$, vistos na **Tabelas 05 e 06**, nos grupos Laser e Laser + Biomaterial, essa diferença parece estar relacionada com alterações no conteúdo orgânico. É importante observar que a intensidade do pico de $\sim 1454 \text{ cm}^{-1}$ foi reduzida ao longo do tempo de reparação em grupos não irradiados e aumentou nos grupos Laser e Laser + Biomaterial (**Fig. 30**), sendo esta diferença significativa com todos os grupos ($p < 0.001$). 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, é claro que este fenômeno foi mais intenso no grupo Laser + Biomaterial, ou seja, havia uma maior quantidade de colágeno tipo I, cicatricial, devido a presença do enxerto.

Finalmente, é importante se considerar que, a maior deposição de osso maduro e organizado, em um modelo animal, com o uso de fototerapia laser

associada ou não ao uso de diferentes tipos de biomateriais, como observado neste estudo, é consistente com estudos anteriores que mostraram efeitos positivos quando do uso isolado de cada um (CARVALHO *et al.*, 2011; GERBI, 2004; GERBI *et al.*, 2008, LOPES *et al.*, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2009, 2012a,b, 2013).

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 periósteo (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.

Com relação aos grupos tratados com fototerapia LED, os resultados do presente estudo demonstraram que, na fase inicial (15 dias), o nível de mineralização variou entre os grupos. Isto foi claramente observado quando se analisou o pico em $\sim 960\text{ cm}^{-1}$ (HA fosfatada), que foi mais elevado em defeitos enxertados irradiados ou não quais não foram significativamente diferentes nesta fase. Isso provavelmente ocorreu devido à presença do biomaterial rico em HA fosfatada. Isto pode ter sido causado pelo fato de que a utilização do

biomaterial resultou em altos níveis de HA no osso até o fim do tempo experimental. É importante notar que a HA do biomaterial e a do osso são indistinguíveis uma da outra. Infelizmente, isto é uma limitação da técnica quando usada em tecidos biológicos. Outro aspecto é que o nível de HA carbonatada não variou entre os grupos neste tempo. Isto é indicativo de que a presença de osso (imaturo) de transição não era muito detectável neste tempo.

É interessante se notar que, no fim do tempo experimental, foram detectadas diferenças significativas no que diz respeito aos picos de HA fosfatada; sendo o grupo biomaterial o que mostrou valores mais elevados. No entanto, o nível de HA carbonatada também variou entre os grupos, sendo a leitura mais baixa vista no Grupo LED + biomaterial. A presença de HA carbonatada denota a presença de um osso de transição (imaturo) e, em ambos os grupos irradiados, os níveis deste componente foi menor do que nos grupos Coágulo e Biomaterial. Isto é indicativo de que a irradiação LED resultou em uma maturação da matriz óssea mais rápida do que quando a luz não foi utilizada. Isto é corroborado por diversos estudos que mostraram fototerapias aceleraram a mineralização do osso (PINHEIRO *et al.*, 2012a,b).

Em relação ao pico de $\sim 1454 \text{ cm}^{-1}$ foi utilizado para avaliar os níveis de colágeno. É interessante notar que, em ambos tempos, os níveis de colágeno no defeito variou entre os grupos, sendo níveis menores encontrados nos grupos irradiados, enxertados ou não, e maiores no grupo Biomaterial. Como o colágeno é importante para a mineralização, é esperado que seu nível influenciasse o a reparação. Os resultados desta análise indicam que, no fim do tempo experimental, defeitos enxertados e irradiados com LED mostraram

menor quantidade de matriz orgânica, o que pode indicar uma possível diferença dos efeitos dessa luz no tecido ósseo.

Através da comparação entre a avaliação dos componentes inorgânicos e orgânicos durante a reparação, é possível observar que o grupo LED + Biomaterial apresentou os melhores resultados, uma vez que revelou pico mais intenso de HA fosfatada, e picos menores de HA carbonatada e de matriz orgânica, portanto, no fim do tempo experimental, estes defeitos estavam em uma fase mais avançada do reparo.

Como visto as possibilidades de aplicações para uma série de problemas na biologia óssea básica, biomecânica e doenças podem ser usadas, como por exemplo, para identificação de riscos de fratura obtido através da composição do osso avaliado, avaliação do estado metabólico do enxerto, enfatizam os pontos fortes de espectroscopia Raman como uma ferramenta de medição de qualidade óssea, especialmente sua aplicabilidade para o tecido fresco, animais vivos e até mesmo seres humanos (MORRIS; MANDAIR, 2011).

Os resultados deste estudo indicam que a fototerapia com laser e LED associadas ao enxerto de Fosfo-cerâmica Bifásica de Hidroxiapatita e β -Fosfato tricálcico, aumentou a concentração de HA.

7. CONCLUSÃO

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

- A fotobiomodulação Laser ($\lambda 780\text{nm}$) ou LED ($\lambda 850 \pm 10\text{nm}$) foram eficazes na modulação do processo de reparo ósseo de defeitos ósseos confeccionados em fêmur de ratos, submetidos ou não, a enxerto de fosfo-cerâmica bifásica de hidroxiapatita e β -Fosfato tricálcico.

- Histologicamente, utilizando-se o grau de maturação óssea através da deposição/organização de linhas basofílicas no tecido ósseo neoformado, o grupo Laser + Biomaterial foi o que se encontrava em estágio mais avançado do processo de reparo ósseo ao término do experimento.

- 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 indicam que ambas as fototerapias, laser e LED, quando associadas ao enxerto de Fosfo-cerâmica Bifásica de Hidroxiapatita e β -fosfato tricálcico promoveram a deposição de tecido ósseo maduro e organizado ao final do período experimental.

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.
- AWONUSI, A.; MORRIS, M. D; TECKLENBURG, M. M. J. Carbonate Assignment and Calibration in the Raman Spectrum of Apatite. **Calcified Tissue International**, v. 81, p. 46-52, 2007.
- BAROLET, D. Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v.27, p.227–38, 2008.
- BAROLET, D.; ROBERGE, C. J.; AUGER, F. A.; BOUCHER, A.; GERMAIN, L. 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.

BOLANDER, M. E. Regulation of fracture repair by growth factors. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 200, n. 2, p.165-170, 1992.

BURCHARDT, H. The biology of bone graft repair. **Clinical Orthopaedics and Related Research** v. 174, p. 28-42, 1983.

CARVALHO, F. B.; ACIOLE, G. T. S.; ACIOLE, J. M. S.; SILVEIRA JR, L.; SANTOS, J. N.; PINHEIRO, A. L. B. Assessment of bone healing on tibial fractures treated with wire osteosynthesis associated or not with infrared laser light and biphasic ceramic bone graft (HATCP) and guided bone regeneration (GBR): Raman spectroscopy study. **Proceedings — SPIE**, v. 7887, p. 7887OT-1-7887OT-6, 2011.

CARVALHO, P.S.P; BASSI, A.P.F; VIOLIN, L.A. Revisão e proposta de nomenclatura para os biomateriais. **Revista Implant News**, v. 1, n. 3, p. 255-259, 2004.

CHAVANTES, M. C.; SATHAIAH, S.; PACHECO, M. T. T. *et al.* Less invasive technique for diagnosis of coronary pathology: Raman spectroscopy. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THORASCOSCOPY AND VIDEO ASSISTED THORACIC SURGERY, 4, 1997, São Paulo, **Proceedings**. Bologna, 1997, p.89-92.

CONEGLIAN, P. Z. A. **Avaliação do processo evolutivo do reparo ósseo frente ao sulfato de cálcio e à hidroxiapatita. Estudo microscópico em alvéolos dentaários de ratos.** Dissertação (Mestrado) Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, 2007.

DAVIS, K. L.; TEDESCO, J. M.; SHAVER, J. Advances in fiber optic Raman instrumentation. **SPIE Biomedical Applications of Raman Spectroscopy**, v. 3608, p. 148-156, 1999.

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.

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, 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.

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.

HANLON, E. B.; MANOHARAN, R.; KOO, T. W.; *et al.* Prospects for in vivo Raman spectroscopy. **Physics in Medicine and Biology**, v. 45, n. 2, p. R1-R59, 2000.

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.

KALFAS, I. H. Principles of bone healing. **Neurosurgery Focus**, v. 10, n. 4, p. 7-10, 2001.

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

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

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

KAVUKCUOGLU, N. B.; PATTERSON-BUCKENDAHL, P.; MANN, A. Effect of

osteocalcin deficiency on the nanomechanics and chemistry of mouse bones.

Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, v. 2, n. 4, p. 254–348, 2009.

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

LEWIS, I. R.; GRIFFITHS, P. R. Raman spectroscopy with fiber optic sampling. **Applied Spectroscopy**, v. 50, n. 10, p. 12A-30A, 1996.

LI, Y. S.; MA, J. Y. Optical-fiber Raman probe with tilted-end fibers. **Applied Spectroscopy**, v. 51, n. 2, p. 277-279, 1997.

LIMA, C. J.; SATHAIAH, S.; SILVEIRA JR., L.; *et al.* Development of catheters with low fiber background signals for Raman spectroscopic diagnosis applications. **Artificial Organs**, v. 24, n. 3, p. 231-234, 2000.

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.

MANOHARAN, R.; WANG, Y.; FELD, M. S. Histochemical analysis of biological tissues using Raman spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 52, p. 215-249, 1996.

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.

MOORE, W. R.; GRAVES, S. E.; BAIN, G. I.; Synthetic bone graft substitutes. **ANZ Journal of Surgery**. V. 71, p. 354–361, 2001.

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

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, 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.

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.

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.

PENEL, G.; LEROY, G.; REY, C.; BRES, E. MicroRaman Spectral Study of the PO₄ and CO₃ Vibrational Modes in Synthetic and Biological Apatites. **Calcified Tissue International**, v. 63, n. 6, p. 475-481, 1998.

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

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, p. 234-240, 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.; 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.; 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.; 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, 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.

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.

ROMANO, P. R.; CATON, J. G.; PUZAS, J. E. The reversal line may be a key modulator of osteoblast function: observations from an alveolar bone wound-healing model. **Journal of Periodontal Research**, v. 32, p. 143-147, 1997.

ROMER, T. J.; BRENNAN III, J. F.; FITZMAURICE, M.; *et al.* Histopathology of human coronary atherosclerosis by quantifying its chemical composition with Raman spectroscopy. **Circulation**, v. 97, n. 9, p. 878-885, 1998a.

ROMER, T. J.; BRENNAN, J. F.; SCHUT, T. C. B.; *et al.* Raman spectroscopy for quantifying cholesterol in intact coronary artery wall. **Atherosclerosis**, v. 141, n. 1, p. 117-124, 1998b.

SALGADO, A. J.; COUTINHO, O. P.; REIS, R. L. Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends. **Macromolecular Bioscience**, v. 4, n. 8, p. 4, 743–765, 2004.

SATHAIAH, S.; SILVEIRA JR, L.; PASQUALUCCI, C. A.; *et al.* Diagnosis of human coronary artery with near-infrared Raman spectroscopy. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON RAMAN SPECTROSCOPY, 15, 1996, Pittsburgh. **Proceedings**. Chichester: John Wiley & Sons, 1996, p.1120-1121.

SHIM, M. G.; WILSON, B. C.; MARPLE, E.; *et al.* Study of fiber-optic probes for in vivo medical Raman spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v. 53, n. 6, p. 619-627, 1999.

SILVEIRA JR., L.; DUARTE, J.; NICOLAU, R. A.; *et al.* Dosagem de diclofenaco sódico por espectroscopia Raman: novas perspectivas em farmacologia clínica. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária de Valena**, v. 1, n. 2, p. 15-19, 2000.

SILVEIRA JR., L.; SATHIAH, 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 coronárias humanas**. Tese (Doutorado em Ciências - Área de concentração de Fisiopatologia experimental) Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, 2001.

SOUSA, A. P. C.; **Efeitos das radiações Laser e LED associadas ou não no reparo de feridas cutâneas em dorso de ratos: Estudo histológico**. Tese (Doutorado em Odontologia – Área de Concentração: Laser em Odontologia) Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia – UFBA, Salvador 2009.

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. 00, p. 1–6, 2009.

STEIN, R. S.; SILVA, J. S.; SILVA, V. D. Comparative Study Of Bone Neof ormation Using Autologous Grafting And Three Replacements: Bone Defects In Rats. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 44, n. 4, p. 330-5, 2009.

TANG, X. M.; CHAI, B. P. Effect of CO₂ Laser irradiation on experimental fracture healing: A transmission electron microscopic study. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 6, n. 3, 346-352, 1986.

TIMLIN, J. A.; CARDEN, A.; MORRIS, M. D. Chemical Microstructure of Cortical Bone Probed by Raman Transects. **Applied Spectroscopy**, v. 53, n. 11, p. 1429-1435, 1999.

TORRES, C. S.; SANTOS, J. N.; MONTEIRO, J. S. C.; *et al.* Does the Use of Laser Photobiomodulation, Bone Morphogenetic Proteins, and Guided Bone Regeneration Improve the Outcome of Autologous Bone Grafts? An in Vivo Study in a Rodent Model. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 26, n. 4, p. 371-377, 2008.

TRELLES, M. A.; MAYAYO, E. Bone fracture consolidate faster with low power Laser. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 7, p. 36-45, 1987.

WEBER, J. B. B.; PINHEIRO, A. L. B.; OLIVEIRA, M. G.; *et al.* Laser therapy improves healing of bone defects submitted to autogenous bone graft. **Photomedicine and Laser Surgery**, n. 24, n. 1, p. 38-44, 2006.

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, HT; CONNELLY, MD; HODGSON, BD.; *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.

YAMADA, K. Biological effects of low power Laser irradiation on clonal osteoblastic cells (MC3T3-E1). **Journal of the Japanese Orthopaedic Association**, v. 65, p. 101-114, 1991.

YERRAMSHETTY, J. S.; AKKUS, O. The associations between mineral crystallinity and the mechanical properties of human cortical bone. **Bone**, v. 42, n. 3, p. 476–482, 2008.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

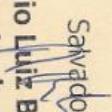
Comissão de Ética na Experimentação Animal

UFBA - Faculdade de Odontologia - Av. Araújo Pinho, 62 - Canela
CEP: 40.140-110 - Salvador - BA - Tel: (71) 3283-8966
Home-page: www.ufba.br

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa n.º 08.10 "AVALIAÇÃO DO EFEITO DA UTILIZAÇÃO DA FOTOBIMODULAÇÃO LASER/LED EM IMPLANTE DE FOSFOCERÂMICA BIFÁSICA DE HIDROXIAPATITA E β - TRISFOSFATO DE CÁLCIO EM DEFEITOS ÓSSEOS: ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO E ESPECTROSCÓPICO EM MODELO ANIMAL" de autoria de APARECIDA MARIA CORDEIRO MARQUES, foi analisado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal e considerado **APROVADO** em reunião ordinária realizada nesta data.

Salvador, 31 de maio de 2011


Prof. Antonio Luiz B. Pinheiro
Presidente da CEEA