

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

LUIZ ALBERTO MASSAROTE

**EFEITO DO LASER ARSENIETO DE GÁLIO NA
REPARAÇÃO DE LESÃO ÓSSEA CIRÚRGICA NA
TÍBIA DO RATO**

**BAURU
2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

LUIZ ALBERTO MASSAROTE

**EFEITO DO LASER ARSENIETO DE GÁLIO NA REPARAÇÃO DE
LESÃO ÓSSEA CIRÚRGICA NA TÍBIA DO RATO**

Dissertação apresentada à Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, na Universidade do Sagrado Coração, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de mestre no Programa de Pós-graduação em Biologia Oral
Orientador: Prof. Dr. Sérgio Augusto Catanzaro Guimarães.

**BAURU
2007**



Universidade do Sagrado Coração

PRP
Pró-reitoria
de Pesquisa
e Pós-graduação

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Mestrado DE LUIZ ALBERTO MASSAROTE, ALUNO(A) DO PROGRAMA DE Mestrado EM BIOLOGIA ORAL, DA UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO, USC, BAURU.

No dia 28 de agosto de 2007, em sessão pública, na Universidade do Sagrado Coração, na presença da Banca Examinadora, composta pelos(as) docentes: **Prof. Dr. Sérgio Augusto Catanzaro Guimarães**, Professor(a) Doutor(a) da Universidade do Sagrado Coração; **Prof.ª Dr.ª Angela Mitie Otta Kinoshita**, Professor(a) Doutor(a) da Universidade do Sagrado Coração; e **Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo**, Professor(a) Doutor(a) do(a) FOB/USP - Faculdade de Odontologia de Bauru; tiveram início os trabalhos de julgamento da Prova de DISSERTAÇÃO de Mestrado para obtenção do Grau de Mestre em BIOLOGIA ORAL, pelo(a) mestrando(a) **LUIZ ALBERTO MASSAROTE**. Os(as) examinadores(as), observando o tempo regulamentar, argüíram o(a) candidato(a) sobre a DISSERTAÇÃO que o(a) mesmo(a) havia apresentado, intitulada "**EFEITO DO LASER ARSENIETO DE GÁLIO NA REPARAÇÃO DE LESÃO ÓSSEA CIRÚRGICA NA TÍBIA DO RATO**", tendo o(a) candidato(a) procurado explicar e/ou rebater as críticas formuladas pelos(as) argüidores(as). Após a conclusão da prova de DISSERTAÇÃO de Mestrado, foi suspensa a sessão pública e, em sessão secreta, os(as) argüidores(as) atribuíram seus conceitos. Reaberta a sessão pública, foram anunciados os resultados: **Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo**, aprovado; **Prof.ª Dr.ª Angela Mitie Otta Kinoshita**, aprovado; **Prof. Dr. Sérgio Augusto Catanzaro Guimarães**, aprovado. Conceito Final: aprovado, fazendo jus, portanto, ao título de Mestre em BIOLOGIA ORAL, de acordo com o artigo 43 do Regimento Geral da Pós-graduação da USC. Nada mais havendo a registrar, foi lavrada a presente ata, que vai por mim assinada, Angela Lemes de Moraes e pelos (as) Senhores (as) Membros da Comissão Examinadora. Universidade do Sagrado Coração – USC, ao(s) 28 de agosto de 2007.

Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo

Prof.ª Dr.ª Angela Mitie Otta Kinoshita

Prof. Dr. Sérgio Augusto Catanzaro Guimarães
(Presidente da Banca e Orientador)

Angela Lemes de Moraes
(Secretária *Stricto Sensu*)

DEDICATÓRIA

... A **Deus**,

Infinito, Onipotente, Onipresente, Criador e Provedor! Que deu-nos inteligência e criatividade para que enfrentássemos todos os desafios da vida. A Ele honra e glória!

Ao meu pai **Luiz Massarotte** (*in memoriam*),

além de pai amoroso, foi um amigo de todas as horas!

À minha mãe **Marcela**,

que nos seus 88 anos de vida, é para todos da família, exemplo de amor, compreensão, dedicação e perseverança!

À minha irmã **Magali**,

pelo amor, carinho, apoio e compreensão nos momentos difíceis. Eu te agradeço, mas, sobretudo te amo!

À minha amiga, mais que amiga, uma irmã, **Maria Cecília**,

colega de todas as horas, que foi um apoio e incentivo nos percalços e dificuldades enfrentados na realização deste mestrado. Pelo mútuo apoio que tivemos um do outro. Conseguimos vencer!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Doutor **Sérgio Augusto Catanzaro Guimarães**, por sua capacidade, sabedoria, dedicação e confiança depositada em mim. Registro aqui todo o meu respeito e admiração.

À Professora Doutora **Ângela Mitie Otta Kinoshita**, por sua disponibilidade, atenção, incentivo, dedicação e capacidade na análise dos resultados. Agradeço sua inestimável colaboração.

Ao Professor Doutor **Jesus Carlos Andreo**, pela atenção e respeito com que me tratou na banca de qualificação e, pelas ótimas sugestões no sentido de enriquecer este trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

À técnica em histologia **Maira Cristina Rondina Couto**, pela atenção, dedicação e disponibilidade no preparo, corte e coloração das lâminas.

Ao técnico especializado em Biologia Molecular **Wilson Aparecido Orcini** pela colaboração nas fotos das lâminas e dados histométricos.

À **Lídia Helena Gomes de Oliveira**, pela sua atenção, colaboração e auxílio no “abstract” deste trabalho.

Ao meu amigo e afilhado, **Guilherme Senhorine Ferretti**, pela inestimável colaboração em informática.

Ao **Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium de Lins – SP**, pela bolsa que me foi concedida para a realização deste mestrado.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Lesões ósseas são fatores limitantes dos indivíduos. Acarretam danos à saúde, assim como problemas de ordem sócio-econômica. Se o período da reparação da lesão for longo, as conseqüências serão proporcionalmente maiores. Portanto, a preocupação em se abreviar o período da consolidação óssea torna-se importante. A busca e desenvolvimento de técnicas que objetivem abreviar o período regenerativo da lesão óssea tornam-se necessárias. Nossa proposta é estudar experimentalmente, em modelo animal, o processo de regeneração óssea sob estimulação da irradiação por laser Arsenieto de Gálio (GaAs) de baixa intensidade. Para tanto, foram produzidas, lesões de 3 mm de diâmetro, cirurgicamente, na tíbia de ratos. Após 24 horas da cirurgia, o grupo experimental foi tratado com uma dose de 3 Joules/cm², em aplicações pontuais, por dez dias consecutivos. A experimentação foi realizada no biotério do Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium de Lins, SP (Unisaesiano), com um total 42 ratos da linhagem *Albinus wistar*, machos, pesando entre 200 e 250 gramas, com aproximadamente três meses de idade. O período de experimentação teve a duração de 14, 28 e 56 dias, a partir da cirurgia. Para cada período foram utilizados 14 ratos, onde 7 foram tratados com laser (grupo estimulado - GE) e 7 não foram tratados (grupo controle - GC). A verificação dos resultados foi feita mediante uma leitura histológica e histométrica comparativas dos GE com os GC, em cada período. Este estudo sugere que a terapia a laser acelera a reparação óssea no início de sua aplicação, pelo aumento das células osteoprogenitoras do periósteo, formação de cartilagem hialina em processo de ossificação endocondral e, conseqüentemente, de osteoblastos, células importantes no processo de reparo ósseo. Os resultados indicam um aumento de trabéculas ósseas, do osso compacto e do osso esponjoso, com a correspondente diminuição da cartilagem hialina formada inicialmente no reparo da lesão.

Palavras-chave: Laser, reparação óssea, trabécula óssea, cartilagem, osso compacto, osso esponjoso.

ABSTRACT

Bony injuries are limited factors of individuals. They involve damages to health, together with economic-social order's problems. If the period of reparation of injury be long, the consequences will be proportionally major. However, the preoccupation in to abbreviate the period of bony consolidation becomes important. The search and development of techniques that objective to abbreviate the regenerative period of bony injury become necessary. Our propose is to study experimently, in animal model, the process of bony regeneration on stimulation of radiation by Arsenieto of Galio (GaAs) laser of low intensity. For so much, were produced injuries of 3mm de diameter, surgically, in the rats` tibia. Later 24 hours of surgery, the experimental group was treated with a dose of 3 Joules/cm², in pontual applications, by ten consecutive days. The experimentation was achieved on the "biotério" from Lins Auxilium Salesiano Catholic University Center, SP (Unisalesiano), with a total 42 rats of lineage Albinus wistar, males, weighting between 200 and 250 grams, with about three months of age. The period of experimentation had have the duration of 14,28 and 56 days, since the surgery. To each period were used 14 rats, where 7 were treated with laser (experimental group - EG) and 7 weren't treated (control group - CG). The verification of outcomes was made through an comparative histological and histometric reading of EG with the CG, in each period.. This study suggests that the therapy the laser accelerates the bony reparation in beginning of your application, by increase of osteoprogenitors cells of "periósteo", formation of cartilage in process of endocondral bonification and, consequently, of osteoblastos, important cells in the process of bony repair. The outcomes indicate an increase of bony trabeculs, of compact bony and of spongy bony, with the corresponding diminiution of hialina cartilage formed initially in the injury`s repair.

Key' Words: Laser; Bony Reparation; Bony Trabeculs; Compact Bony; Spongy Bony; Cartilage

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 Tecido Ósseo.....	11
2.2 Tipos de Tecido Ósseo.....	14
2.3 Tipos de Ossificação.....	17
2.4 Processo de Reparo Ósseo e Uso do Laser de Baixa Intensidade.....	19
2.5 O Laser Terapêutico.....	23
2.6 Efeitos Fotobiológicos do Laser.....	24
2.6.1 Efeitos Primários do Laser.....	24
2.6.2 Efeitos Indiretos do Laser.....	25
2.6.3 Efeitos Terapêuticos Gerais.....	26
2.6.4 Efeito Antiinflamatório, Anti-edematoso e Normalizador.....	27
2.7 Absorção da Radiação Laser nos Tecidos.....	28
2.8 O Laser GaAs.....	29
2.9 Dosimetria.....	31
2.10 Formas de Aplicação do Laser.....	32
2.11 Indicações no Tratamento com Laser.....	32
2.12 Contra-indicações no Tratamento com Laser.....	33
3 OBJETIVOS DESTE ESTUDO.....	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1 Local.....	36
4.2 Procedimentos Cirúrgicos e Lesão.....	37
5 RESULTADOS.....	44
5.1 Análises Histométricas.....	47
6 DISCUSSÃO.....	53
7 CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS.....	58
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.....	61
ANEXO.....	62

1 INTRODUÇÃO

Lesões ósseas são fatores limitantes dos indivíduos. Acarretam danos à saúde, assim como problemas de ordem sócio-econômica. Se o período da reparação da lesão for prolongado, as conseqüências serão proporcionalmente maiores. Portanto, a preocupação em se abreviar o período da consolidação óssea torna-se importante. A busca e desenvolvimento de técnicas que visem abreviar o período regenerativo da lesão óssea tornam-se necessárias.

A presença de uma lesão no tecido acarreta a baixa taxa de oxigênio no local e também a falta de nutrientes, dificultando sobremaneira a divisão celular. BONNARENS & EINHORN em 1991 demonstrou que a exposição dos tecidos à radiação laser de baixa potência (faixa do vermelho), estimula a formação do retículo endoplasmático e do aparelho de Golgi assim como, aumentava o tamanho e o número de mitocôndrias. Dessa forma, essas mudanças estão associadas à ativação do metabolismo e a síntese de proteínas, acelerando a regeneração e cicatrização de tecidos. Observou-se experimentalmente, que a produção de colágeno melhora significativamente as condições de diversas lesões. A produção de colágeno aumenta em tecidos expostos à radiação laser de baixa potência, principalmente na faixa do vermelho. Verificou-se também que essa síntese mantinha-se elevada mesmo após dois meses da aplicação do laser (MESTER, 1985).

A terapia com laser de baixa potência tem fundamento no efeito fotoquímico ao nível celular. A energia laser fornecida ao tecido provoca alterações, por meio de diversas reações bioquímicas, ao metabolismo normal da região tratada. O processo de respiração celular é acelerado pela radiação laser de baixa potência, estimulando

assim, a divisão celular, acelerando a renovação do tecido (TIPHLOVA, 1989). A radiação laser de baixa potência é absorvida pelos citocromos das mitocôndrias, o que estimula a oxigenação do NADH que, por sua vez, estimula a cadeia de elétrons, aumentando dessa forma, a produção de ATP, este, permitindo a passagem de energia para a célula, oferecendo condições propícias para a multiplicação celular (KARU, 1989).

Dentre os efeitos da laserterapia que a literatura indica, tem-se o estímulo da osteogênese em casos de atrasos de ossificação que não respondem a tratamentos convencionais; estímulo à microcirculação e neoformação vascular (PIMENTA,2005). O laser melhora o processo de reparação, isso é devido ao estímulo da capacidade de cicatrização do tecido conjuntivo. No caso da reparação óssea, a neoformação de vasos sanguíneos a partir dos já existentes, estimula as células mesenquimais a diferenciarem-se em osteoblastos. Estes sintetizam a parte orgânica da matriz óssea, auxiliando assim, a reparação da lesão óssea (CORMACK, 2003).

Esses fatos demonstram que o tratamento com laser garante um efeito duradouro devido à sua atuação em todo o processo metabólico da região tratada. A análise dos tecidos submetidos à irradiação laser mostrou o aumento da prolina, um importante aminoácido na síntese do colágeno. Conclui-se, portanto, que a síntese de colágeno está ligada à irradiação do tecido pelo laser de baixa potência (YEW, 1989). A síntese de colágeno estimulada pelo laser propicia possivelmente uma reparação mais rápida da lesão, é o que esperamos encontrar em nosso experimento.

Nosso trabalho estudou experimentalmente, em modelo animal, o processo de regeneração óssea sob estimulação do Laser Arsenieto de Gálio (GaAs)

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tecido ósseo

O tecido ósseo é o principal componente do esqueleto, todas as partes moles do corpo têm suporte e apoio nele, aloja e protege a medula óssea, forma caixas protetoras de órgãos vitais, tais como a caixa craniana, caixa torácica e canal raquidiano. Além de dar apoio aos músculos esqueléticos, propicia um sistema de alavancas capaz de ampliar as forças geradas pela contração muscular (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

É constituído de um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células, osteoblasto, osteócito, osteoclasto e material extracelular calcificado, a matriz óssea (CORMACK, 2003).

Os osteoblastos são produtores da parte orgânica da matriz (colágeno tipo I, proteoglicanas e glicoproteínas), estão sempre localizados nas superfícies ósseas, um ao lado do outro (como um epitélio simples), são capazes de concentrar fosfato de cálcio, por essa razão, participam também da mineralização da matriz óssea. Quando aprisionados pela matriz recém-sintetizada passam a chamar-se osteócitos; a matriz recém-formada próxima ao osteoblasto recebe o nome de osteóide (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

Os osteócitos, localizados em lacunas (cavidades) no interior da matriz, das quais partem canálculos em cujo interior há prolongamentos destas células comunicando-se, umas com as outras, por meio de junções comunicantes, tais canálculos são vitais como via de transporte de nutrientes e metabólitos entre a matriz, vasos sangüíneos e o osteócito (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

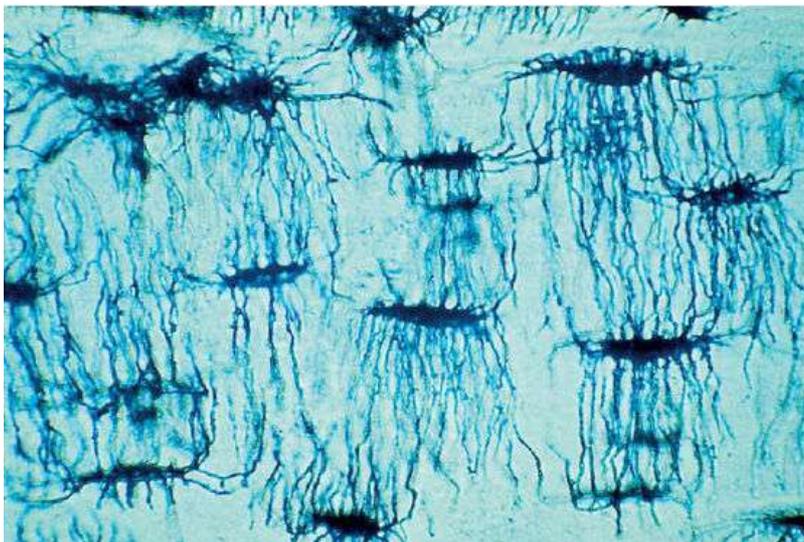


Figura 1: Tecido ósseo seco e desgastado mostrando os canalículos que constituem a via de intercâmbio entre os osteócitos e o sangue dos capilares do perióstio e do endóstio – adaptado de Junqueira & Carneiro, 2004.

Os osteoclastos são células grandes, muito ramificadas com seis a cinquenta núcleos ou mais, suas ramificações são bastante irregulares e possuem forma e espessura variáveis. Localizam-se freqüentemente nas áreas de reabsorção de tecido ósseo, apresentando-se em depressões da matriz escavadas pela atividade de reabsorção, tais depressões são as chamadas lacunas de Howship. A parte ativa dos osteoclastos está voltada para a matriz óssea, nesse local apresenta prolongamentos vilosos irregulares, a maioria com a forma de folhas ou pregas que se subdividem. Em torno desta área com prolongamentos vilosos há uma zona citoplasmática denominada zona clara contendo muitos filamentos de actina. A zona clara corresponde ao local de adesão do osteoclasto com a matriz óssea, neste local ocorre reabsorção óssea. A zona clara é um microambiente fechado, ácido (H^+). Aí são secretadas collagenases e outras hidrolases que digerem a matriz orgânica e dissolvem os cristais de sais de cálcio. A coordenação da atividade dos osteoclastos é feita por citocinas (moléculas sinalizadoras), por hormônios como calcitonina,

produzido pela glândula tireóide e paratormônio, produzido pelas glândulas paratireóides (GARTNER & HIAT, 1999).

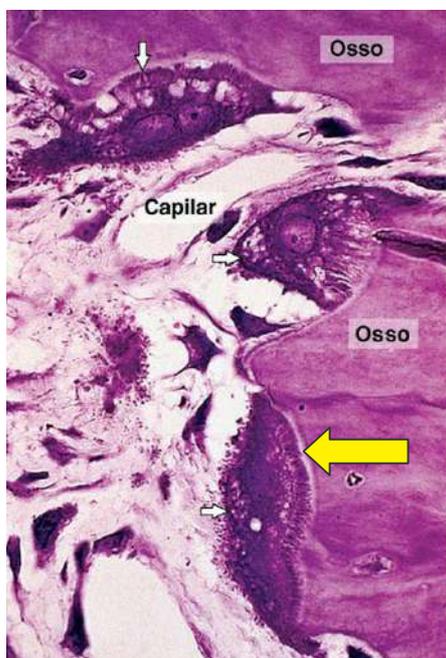


Figura 2: As setas brancas indicam 3 osteoclastos digerindo matriz óssea. Na seta amarela nota-se o compartimento claro onde tem lugar a erosão da matriz – adaptado de Junqueira & Carneiro, 2004.

A matriz óssea, é constituída por parte inorgânica e orgânica. Na parte inorgânica os íons mais comuns são o fosfato e o cálcio. Ocorrem também o bicarbonato, o magnésio, o potássio e o sódio, assim como o citrato, todos em pequena quantidade. O cálcio e o fósforo formam os cristais de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. Os cristais de hidroxiapatita possuem uma capa de hidratação que facilita as trocas entre o cristal e o líquido intersticial. A parte orgânica da matriz é constituída por fibras colágenas (95%), colágeno tipo I, pequena quantidade de proteoglicana e glicoproteínas. A associação dos cristais de hidroxiapatita com as fibras colágenas conferem a dureza e resistência do tecido ósseo (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

O perióstio e o endóstio são as superfícies externa e interna do osso, respectivamente. No perióstio, mais superficialmente, estão presentes fibras

colágenas e fibroblastos; mais internamente apresenta as chamadas fibras de Sharpey, são feixes de fibras colágenas que penetram no tecido ósseo prendendo-se firmemente ao osso. Na sua região mais profunda, próxima ao tecido ósseo, possui células osteoprogenitoras capazes de multiplicar-se por mitose e diferenciarem-se em osteoblastos, correspondendo a uma importante função no crescimento do osso e na reparação de fraturas ósseas. O endóstio é freqüentemente constituído por uma camada de células osteogênicas achatadas que revestem as cavidades dos ossos esponjosos; revestem também o canal medular, os canais de Havers e os de Volkmann. Tanto o perióstio como o endóstio têm função de nutrir o tecido ósseo, assim como fornecer novos osteoblastos no processo de crescimento e regeneração do osso (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

2.2 Tipos de tecido ósseo

a) Osso compacto e osso esponjoso

A olho nu, quando se observa a superfície de um osso serrado, nota-se que ele é formado por partes sem cavidades visíveis, portanto, macroscopicamente, diz-se que é osso compacto; a parte com muitas cavidades intercomunicantes, denominamos osso esponjoso. Nas epífises dos ossos longos (por ex.: tíbia), encontra-se osso esponjoso com uma delgada camada superficial de osso compacto; na diáfise (parte cilíndrica) é quase que totalmente compacta com pouca quantidade de osso esponjoso na sua parte mais profunda. Ossos curtos (por ex.: ossos do carpo), são constituídos por osso esponjoso no centro e recobertos por

superfície compacta. Nos ossos chatos (por ex.: abóbada craniana), há duas camadas de osso compacto externamente, denominadas tábuas interna e externa; essa duas camadas são separadas por osso esponjoso, que aqui recebe o nome de díploe (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004; CORMACK, 2003).

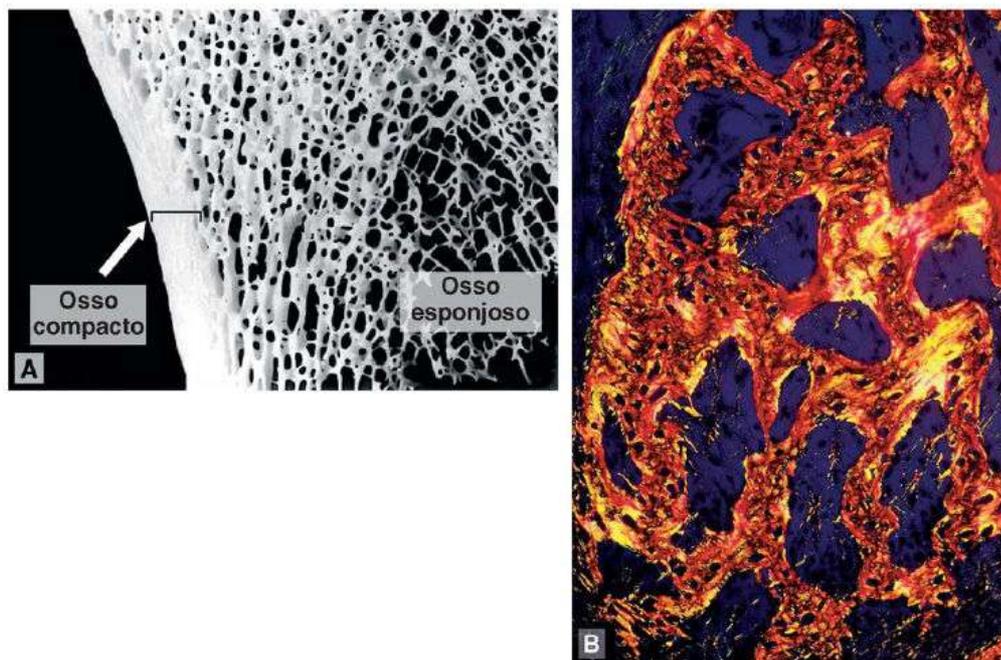


Figura 3 A e B: Em A corte grosso de um osso seco mostrando o osso cortical compacto (seta) e o osso esponjoso. Em B osso esponjoso em corte histológico com distribuição irregular de fibras colágenas (coloração pelo picro-sirius) – adaptado de Junqueira & Carneiro, 2004.

b) Osso primário (ou imaturo) e osso secundário (trabecular, maduro ou lamelar)

Microscopicamente, há dois tipos de tecidos ósseos: osso primário (imaturo) e osso secundário (maduro, trabecular ou lamelar). O osso imaturo (primário) é o primeiro a se formar durante o desenvolvimento fetal e também na reparação óssea. Possui grande quantidade de osteócitos e feixes irregulares de colágeno, mais tarde, tais feixes são substituídos e organizados como osso secundário (exceto nas suturas

da abóbada craniana, locais de inserção dos tendões e alvéolo dos dentes). A presença de conteúdo mineral no osso imaturo é muito menor do que no osso maduro (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

O osso secundário (trabecular, maduro ou lamelar – Figura 4), constitui-se de lamelas concêntricas ou paralelas de 3 a 7 μm de espessura. Apresenta osteócitos espalhados a intervalos regulares entre, ou, ocasionalmente, dentro das lamelas. Os canalículos dos osteócitos conectam-se com as lacunas vizinhas uma com a outra, assim, formam uma rede de canalículos intercomunicantes (Figura 5), permitindo o fluxo de nutrientes, hormônios e produtos de excreção dos e para os osteócitos. Por ser mais mineralizada (calcificada), a matriz do osso secundário é mais resistente que a do osso primário. As fibras colágenas do osso secundário estão arrumadas paralelamente umas às outras no interior de uma mesma lamela. (GARTNER & HIATT, 1997).

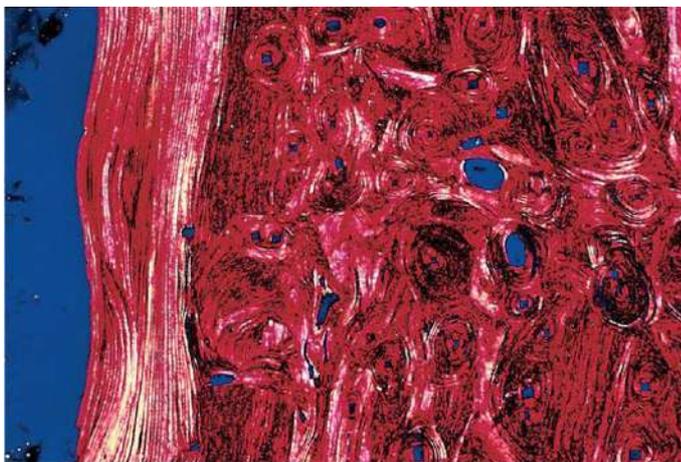


Figura 4: Tecido ósseo secundário (lamelar) mostrando as fibras colágenas paralelas umas as outras (a esquerda) e lamelas concêntricas que constituem os sistemas harvesianos – adaptado de Junqueira & Carneiro, 2004.



Figura 5: Osso descalsificado onde se observa o sistema de Havers e o canal de Havers (C). Observa-se lamelas concêntricas e lacunas com seus canaliculos – Adaptado de Gartner & Hiatt, 1997.

2.3 Tipos de ossificação

A histogênese do tecido ósseo se dá por dois processos: ossificação intramembranosa e por ossificação endocondral.

a) Ossificação intramembranosa

A ossificação intramembranosa ocorre no interior de uma membrana conjuntiva. Por esse processo formam-se os ossos frontal, parietal e de partes do occipital, do temporal e dos maxilares superior e inferior. O crescimento dos ossos curtos e o crescimento em espessura dos ossos longos, ocorrem por esse processo.

Na membrana conjuntiva, o local onde a ossificação inicia-se denomina-se centro de ossificação primária. Aí, células mesenquimatosas diferenciam-se em grupos de osteoblastos. Estes, por sua vez, sintetizam o osteóide (matriz óssea ainda não mineralizada). Quando a matriz mineraliza-se, esta engloba alguns osteoblastos que se transformam em osteócitos. Surgem vários grupos de osteócitos simultaneamente com a confluência de traves ósseas, dando ao osso o aspecto de osso esponjoso. Os vasos sangüíneos penetram entre as traves, trazendo células mesenquimatosas indiferenciadas que darão origem à medula óssea. Como surgem vários centros de ossificação que crescem radialmente, eles acabam por substituir a membrana conjuntiva pré-existente, dando origem ao osso (CORMACK, 2003).

b) Ossificação endocondral

A ossificação endocondral tem início sobre uma peça de cartilagem hialina já com a forma parecida à do osso que vai originar, porém de tamanho menor. Esse processo é responsável pela formação dos ossos curtos e longos. A ossificação endocondral apresenta duas etapas: na primeira, a cartilagem hialina sofre modificações importantes como, hipertrofia dos condrócitos, redução da matriz cartilaginosa formando finos tabiques, mineralização desses tabiques e morte dos condrócitos por apoptose. As cavidades antes ocupadas pelos condrócitos são invadidas por capilares sangüíneos e células osteogênicas vindas do tecido conjuntivo adjacente. As células osteogênicas diferenciam-se em osteoblastos que passam a depositar matriz óssea sobre os tabiques de cartilagem calcificada, que servem de apoio à ossificação. Assim, aparece tecido ósseo onde antes existia tecido cartilaginoso. O primeiro tecido ósseo a aparecer no osso longo tem origem

do pericôndrio que recobre a parte média da diáfise, por ossificação intramembranosa (centro de ossificação primário). A segunda etapa se caracteriza pela ação dos osteoclastos que surgiram desde o início do centro de ossificação primário. Estes absorvem o tecido ósseo formado no centro da cartilagem, dando origem ao canal medular que cresce longitudinalmente à medida que a ossificação progride. Células hematógenas multipotentes (células tronco), trazidas pelo sangue, dão origem à medula óssea (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004; GARTNER & HIATT, 1997).

2.4 Processo de reparo ósseo e uso do laser de baixa intensidade

Segundo BARUSKA e colaboradores, 1995, os efeitos do laser de baixa intensidade no crescimento e reparo ósseo, têm sido aplicados limitadamente, pois é mais freqüente seu uso em estudos de cicatrização muscular, nervosa e dérmica.

TRELLES & MAYAYO, 1987, sugeriram que o laser de baixa intensidade acelera o metabolismo (dos osteócitos) propiciando uma rápida formação do calo ósseo, possibilitando assim uma interpretação positiva do estímulo do laser no processo de reparação óssea.

Estudos sugerem que o reparo de uma fratura óssea é diretamente dependente da resposta celular ao estímulo gerado (WODARSKI, 1990).

FREITAS e colaboradores, 2000, demonstraram experimentalmente que doses diárias de laserterapia de baixa intensidade (HeNe), em períodos de 7 e 14 dias, repararam efetivamente a lesão óssea, pelo estímulo da atividade sintética dos osteoblastos, produzindo grande quantidade de fibras colágenas.

Em 2000, FREITAS e colaboradores pesquisaram os efeitos do laser de baixa potência (laser HeNe) na osteogênese de fraturas cirúrgicas em ratos, realizadas com broca dentária de 2 mm de diâmetro. Observou-se claramente a aceleração do reparo ósseo nos animais tratados com o laser.

Outro estudo realizado por COOMBE, 2001, avaliou os efeitos do laser de baixa potência em células osteoblásticas humanas, utilizando doses diárias de laser GaAIs, mostrou que a viabilidade celular não foi afetada pelo laser. Verificou-se ainda um aumento da concentração de cálcio intracelular indicando uma tendência transitória positiva após a irradiação.

“Uma fratura, seja de um osso, de uma placa epifisária ou de uma superfície articular cartilaginosa, é simplesmente uma quebra estrutural em sua continuidade” (SALTER, 2001).

HUBACEK & POSPISILOVA, 2002, afirmam que a atividade mitótica e sintética (síntese de colágeno) dos fibroblastos é aumentada quando irradiados por três semanas com laser de baixa intensidade (HeNe), estimulando assim a regeneração do tecido.

MARINO, 2003, faz referência ao laser de baixa intensidade no reparo ósseo da tíbia de rato como uma possível ação no aumento da vascularização, reabsorção mais rápida de exudatos, aumento da atividade fagocitária (macrófagos) que podem contribuir para uma reparação óssea mais ativa.

“Nos locais de fratura óssea, ocorre hemorragia, pela lesão de vasos sangüíneos, destruição de matriz e morte de células ósseas” (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

Os macrófagos removem o coágulo sangüíneo, restos celulares e matriz para que tenha início da reparação. O perióstio e o endóstio nas proximidades da área

fraturada, dão início a uma intensa proliferação celular, dando origem a um tecido muito rico em células osteoprogenitoras formando um colar em torno da fratura. Esse colar penetra entre as extremidades ósseas rompidas (Figura 6 A e B).

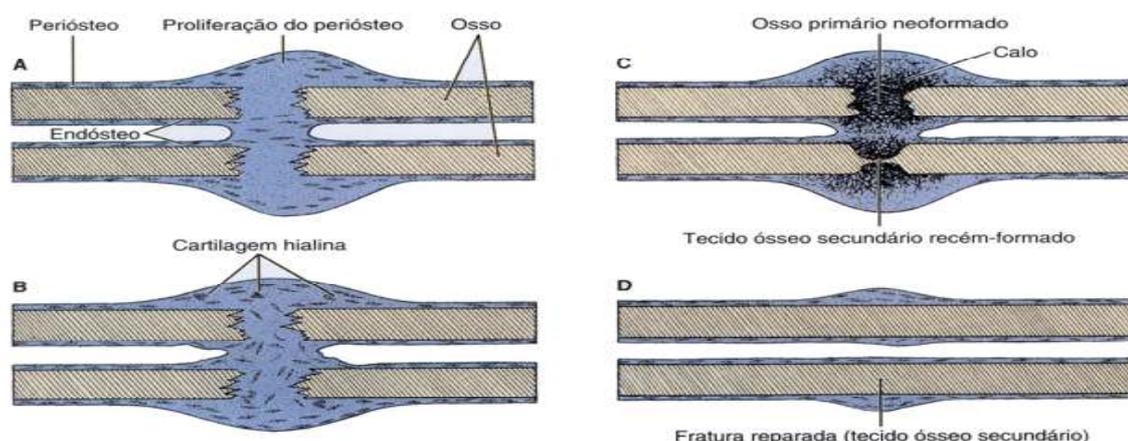


Figura 6: Reparo ósseo mostrando a evolução do processo de regeneração óssea. (Adaptado de Junqueira & Carneiro, 2004)

Nesse colar de tecido conjuntivo, assim como no conjuntivo que penetrou entre as extremidades ósseas rompidas (fraturadas) origina-se tecido ósseo imaturo por ossificação endocondral da cartilagem aí formada, como também por ossificação intramembranosa. Esse processo, decorrido certo tempo, evolui para a formação do calo ósseo, envolvendo a extremidade dos ossos fraturados. O calo ósseo é formado por tecido ósseo imaturo unindo provisoriamente as extremidades fraturadas (Figura 6 C e D). Em seguida dá-se a remodelação do calo ósseo, sendo este, substituído completamente por tecido ósseo lamelar (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

A fratura óssea constitui uma lesão física e possivelmente circulatória, comprometendo a integridade estrutural do tecido ósseo. Quando há uma lesão óssea, não somente o osso é afetado mas também os tecidos moles associados a ele ficam comprometidos (CORMACK, 2003).

O processo de reparo ou regeneração óssea implica na presença de células capazes de regenerar e remodelar o local da lesão devolvendo ao osso sua

integridade natural. Numa fratura simples, ocorre a quebra do osso em duas partes. O perióstio geralmente se rompe, os vasos sanguíneos que atravessam o local da lesão e todos os tecidos moles são rompidos (CORMACK, 2003).

WONG e colaboradores, 2005, evidenciam que a irradiação laser proporciona uma resposta proliferativa em condrócitos no reparo de lesões termiais na cartilagem.

STEIN e colaboradores, 2005, demonstraram que a LLLT (low level laser irradiation therapy) tem importante efeito na proliferação e diferenciação de osteoblastos humanos *in vitro* (HeNe), e que o laser GaAs (arsenieto de gálio) também pode acelerar a reparação óssea, produzindo os mesmos efeitos citados acima, demonstradas na regeneração de suturas médio-palatais em ratos,

Conforme os experimentos de NINOMIYA e colaboradores, 2007, a irradiação laser promove a atividade de um maior número de osteoblastos e faz decrescer o número de osteoclastos, sugerindo que a laserterapia ativa a regeneração óssea devido ao decréscimo do número e atividade dos osteoclastos. Também sugere que a cartilagem é reduzida em seu processo de degeneração pela ossificação endocondral, produzindo a calcificação (mineralização) da matriz cartilaginosa remanescente, originando tecido ósseo primário, tudo isso graças à inatividade dos osteoclastos provocada pelo laser. Como resultado, muitas áreas de matriz cartilaginosa são transformadas em osso trabecular aumentando o volume ósseo.

Os trabalhos experimentais de PINHEIRO & GERBI, 2006, afirmam que o efeito da laserterapia na regeneração óssea é possível, pois estimula osteoblastos no processo de reparação; afirmam também que o tempo e dose de irradiação são importantes nesse processo. Afirmam também que o parâmetro de densidade de energia e intensidade são biologicamente independentes um do outro.

2.5 O laser terapêutico

A palavra *LASER*, é na verdade uma sigla derivada do inglês: *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (VEÇOSO, 1993).

O laser é uma onda eletromagnética, constituída por um feixe de fótons de mesma frequência, com o comprimento de onda em fase (LEHMANN & LATEUR, 1994).

Em 1917, Albert Einstein expôs os princípios físicos da emissão estimulada, o chamado fenômeno laser (VEÇOSO, 1993). Em 1950, Townes, Gordon e Zeyger construíram um aparelho denominado MASER (*Microawe Amplification by Stimulated Emission of Radiation*), que funcionava na banda de ondas milimétricas (BAXTER, 1994). Oito anos mais tarde foi proposto o desenvolvimento do MASER ÓPTICO, mas somente em 1960 é que foi desenvolvido por Theodore H. Maiman, com a criação do laser a rubi.

A partir da década de 60, o laser sofreu uma grande evolução, permitindo que cirurgias oftálmicas fossem realizadas com sucesso (Nova York, 1961) e mais tarde a criação do laser semicondutor, 1962 (VEÇOSO, 1993). Entretanto, COLLS, 1984, afirma que o laser terapêutico só foi adaptado para esse fim em 1965, quando Sinclair e Knoll adaptaram a radiação laser à prática terapêutica.

A grande importância científica do advento do laser consiste numa forma de manipulação da matéria em níveis extremamente íntimos. Com a criação da radiação laser, o homem, por meio desse recurso tecnológico, alcançou níveis subatômicos, passou a ser capaz de manipular estruturas muitíssimo menores em relação à menor estrutura observável. Aqui reside a importância e a grandiosidade do laser idealizado por Einstein (VEÇOSO, 1993).

2.6 Efeitos foto biológicos do laser

2.6.1 Efeitos primários do laser

a) Efeito bioquímico

O estímulo quanto à liberação de substâncias como a histamina, a serotonina, a bradicinina e outras, assim como a modificação das reações enzimáticas normais, tanto no sentido de excitação como de inibição, são duas formas de atuação da energia absorvida (VEÇOSO, 1993).

A radiação laser exerce, por outro lado, um estímulo na produção de ATP no interior das células, originando e provocando a aceleração da mitose, esta que se produz quando há um aumento proporcional do ATP e das mitocôndrias.

Dentro desses efeitos bioquímicos, inclui-se a ação fibrinolítica, característica específica da ação do laser (VEÇOSO, 1993).

b) Efeito bioelétrico

Seu principal efeito é a normalização do potencial de membrana afim de que não sejam transmitidos aos centros superiores, estímulos dolorosos. Numa célula, o sódio é abundante e penetra-a com facilidade. Devido a isso a célula deve expulsá-lo mediante um mecanismo de que dispõe, chamado “bomba de sódio” e que precisa de um gasto de energia para seu funcionamento, extraída da hidrólise de ATP. O laser atua de modo direto, sobre a mobilidade iônica, aumentando-a e, de modo

indireto, aumentando a quantidade de ATP produzido pela célula. Este efeito bioelétrico ajuda a normalizar o potencial de membrana, atuando como reequilibrador e normalizador da atividade funcional celular (VEÇOSO, 1993).

2.6.2 Efeitos indiretos do laser

a) Estímulo da microcirculação

Através de mediadores químicos, a radiação laser tem uma ação indireta sobre o esfíncter pré-capilar paralisado. Isto provoca uma abertura constante e, por isso, um estímulo da microcirculação. A liberação da histamina produz a persistente dilatação, podendo manifestar-se a maior ou menor distância, conforme a potência da radiação. Como consequência da vasodilatação capilar e arteriolar, têm-se a melhora na troficidade zonal pelo aumento de nutrientes e oxigênio, eliminando os catabólitos e aporte de elementos defensivos, deduzindo-se daí sua capacidade antiinflamatória (VEÇOSO, 1993).

b) Aumento da troficidade local

É tida como uma das principais consequências da irradiação, já que aumenta a produção de ATP mitocondrial, aumentando a velocidade mitótica celular. Disto se conclui que o laser acelera os processos de reparação, sendo devido ao estímulo da capacidade de cicatrização do tecido conjuntivo e da neoformação de vasos a partir dos já existentes (VEÇOSO, 1993)

São vários os tecidos estimulados como, por exemplo: no tecido nervoso ocorre aumento da velocidade de regeneração das fibras nervosas danificadas.. No tecido ósseo, estimula a reparação do osso; estímulo geral sobre a hematopoese na medula (COLLS, 1984). Aumento da troficidade na pele; ativação do bulbo piloso e, em especial dos fibroblastos responsáveis pela formação das fibras colágenas e elásticas (VEÇOSO, 1993).

2.6.3 Efeitos terapêuticos gerais

a) Efeito analgésico

“A irradiação laser provoca também um segundo mecanismo que atuaria a favor de manter o potencial de membrana evitando a despolarização. Se tem detectado aumento na síntese de ATP depois da irradiação, energia celular que será utilizada pelas fibras nervosas para a expulsão do sódio pelo mecanismo da chamada “bomba de sódio e potássio”, esta que atua contra gradiente de concentração e portanto requer um gasto energético extra para o seu funcionamento. Vemos pois que tanto direta com indiretamente atua como fator equilibrador do potencial de membrana em repouso, dificultando a transmissão do estímulo doloroso local.” (tradução do autor - COLLS, 1984).

O laser atua localmente, reduzindo a inflamação, provocando a reabsorção de exudatos e favorecendo a eliminação de substâncias alógenas. Interfere na mensagem elétrica durante a transmissão do estímulo doloroso, mantém o gradiente iônico em ambos os lados da membrana celular, evitando ou reduzindo a despolarização da mesma. Atua também em fibras nervosas grossas, provocando

um bloqueio das fibras finas – dolorosas. Estimula a produção das beta-endorfinas direta e indiretamente; evita a diminuição do limiar doloroso dos receptores de dor. A irradiação com laser normaliza e equilibra a energia presente no ponto lesado.(VEÇOSO, 1993).

2.6.4 Efeito antiinflamatório, anti-edematoso e normalizador

a) Circulatório

O laser tem demonstrado seus efeitos terapêuticos favoráveis sobre o sistema de defesa do organismo. Sua radiação de baixa intensidade é atérmica não interferindo em processos inflamatórios agudos. O estímulo da microcirculação local e vasodilatação arteriolar favorece o aporte de neutrófilos, monócitos e a reabsorção do exudato fibrinoso, obtendo a resolução da reação inflamatória mais rápida do que o organismo é capaz. É preciso usar com prudência em casos de infecção, simultaneamente com terapia medicamentosa (antibióticos). “Isto porque alguns microorganismos mais resistentes poderiam disseminar-se.” (Tradução do autor - COLLS, 1984).

b) Efeito bioestimulativo e trófico tissular

Como havia sido exposto anteriormente, a ação do laser estimula a produção do ATP mitocondrial e incrementa a síntese protéica. O estímulo trófico é provindo de união do efeito ao nível circulatório com o efeito potencializador da produção de energia disponível na célula.

Tem-se demonstrado em alguns tecidos:

Aumento de fibroblastos, conseqüentemente de fibras colágenas;

Regeneração de vasos sangüíneos a partir dos já existentes;

Incremento da velocidade de crescimento de nervos seccionados;

Incremento de reepitelização a partir de restos basais;

Em conseqüência de todos estes, incremento do ritmo de divisão celular

(VEÇOSO, 1993).

c) Efeitos comprovados do laser em traumatismos tendinosos

Nos traumatismos tendinosos parciais a irradiação laser acelera o trofismo para melhor reconstrução do tecido, favorecendo e acelerando a cicatrização, e ainda evitando a inflamação da bainha fibrosa. Em lesões crônicas ajuda a evitar a formação de cicatrizes imperfeitas, assim como aderência aos tendões afetados (COLLS, 1984).

2.7 Absorção da radiação laser nos tecidos

As irradiações eletromagnéticas ao incidirem sobre os tecidos, uma parte se reflete e outra é absorvida. A absorção, por sua vez, depende da presença de moléculas absorventes, pigmentos e de sua distribuição espacial (VEÇOSO, 1993).

2. 8 O laser GaAs

O laser Arsenieto de Gálio tem dado excelentes resultados na elaboração de lasers semicondutores. Por semicondutor entendemos aquelas substâncias que, por serem isolantes, possuem uma condutividade muito inferior aos metais.

O Gálio apresenta maior condutividade que o Arsênio. Ao combiná-los forma-se um cristal de Arsenieto de Gálio com características elétricas similares ao Germânio e Silício (VEÇOSO,1993).

Na elaboração de um diodo é necessário incorporar determinadas impurezas. Ao GaAs em estado de fusão inclui-se o Telúrio (Te). Como este tem um elétron de valência a mais que o Arsênio, obteremos, ao cristalizar, uma estrutura cristalina homogênea na qual alguns átomos de Te substituíram átomos de As. Ficaram assim, elétrons livres e, conseqüentemente converterá em um bom condutor. A este cristal de GaAs dopado com Telúrio, chamamos do tipo N, por terem elétrons de carga negativa. A um outro cristal de GaAs em estado de fusão, acrescenta-se Zinco (Zn). Pode-se verificar que ocorre algo similar, pois o Zn possui um elétron de valência menor que o Ga. Ao esfriar-se ter-se-á um cristal no qual átomos de Zinco substituíram átomos de Gálio, resultando em ausência de elétrons denominados buracos sendo, então, um bom condutor. Tipo P. Ao unirmos os cristais de GaAs do tipo P e N obtém-se um diodo semicondutor. A fronteira entre os dois cristais é chamada de junção (VEÇOSO, 1993).

Aplicando-se o pólo negativo de uma pilha à região P e o positivo à região N, o diodo estará polarizado inversamente e não conduzirá. Aplicando-se o positivo da pilha à região P e o negativo à região N, o diodo está diretamente polarizado, fluindo então, a corrente com facilidade.

Produzem-se recombinações sucessivas dos elétrons e buracos, acompanhadas de desprendimentos de quantas de energia luminosa. Ao circular a corrente, sendo esta de pouca intensidade, só tomarão parte na excitação e recombinação, poucos elétrons. Deste modo o processo adquirirá um caráter desordenado e os fótons serão absorvidos pelo próprio cristal. Porém, se a densidade da corrente é suficientemente alta para que os elétrons gerados na recombinação superem aos absorvidos pelo cristal, a radiação se tornará coerente e o raio sairá (COLLS, 1984).

Um laser de diodo típico tem a forma de um paralelepípedo retangular com dimensões aproximadas de 0,1 x 0,1 x 0,1 mm. Tem superfícies planas, perfeitamente polidas, porque necessitam refletir a luz em seu interior, para a formação de um feixe coerente (VEÇOSO, 1993)..

A corrente é aplicada nos lados opostos do bloco, sendo o fluxo de corrente perpendicular à união dos semicondutores. Ao se produzir a reflexão nas faces polidas do diodo, esta tende a favorecer a saída das ondas pelas bases quadradas, propagando-se a luz coerente ao longo da união e estimulando por sua vez a radiação procedente de outros pares de elétrons-buraco até alcançarem a intensidade suficiente para saírem pelos extremos. O Laser GaAs emite radiação com comprimento de onda (λ) ao redor dos 904 nm, situando-se em torno do infravermelho (VEÇOSO, 1993).

2.9 Dosimetria

A Laserterapia é uma terapia energética de tipo fotônica, na qual é preciso estabelecer, para maiores resultados nos tratamentos, uma dosimetria energética adequada onde deve-se levar em conta a área de superfície de aplicação, a densidade de energia e o tempo de aplicação. Ao calcular a densidade de energia – D – fornecida pelo aparelho, deve-se saber a potência média ou contínua fornecida e o diâmetro do feixe laser – no caso de emissão direta – ou diâmetro da fibra óptica

Calcula-se então, a densidade de potência e a de energia. Dada pelo quociente da potência – P – em Watts, pela área – A – em cm^2 , sendo o resultado, expresso em Watts/cm^2 .

Como a energia em Joules é o produto da potência pelo tempo, tem-se que, de acordo com a intensidade, o quociente da energia (potência pelo tempo) pela área (VEÇOSO, 1993).

Finalmente, para se saber o tempo necessário obtém-se o quociente da densidade – expressa em Joules/cm^2 – multiplicada pela área, pela potência.

Demonstra-se que, quanto ao significado físico desta fórmula, será sempre válida, porém fisiologicamente tem limites. Em trabalhos sobre Eletrofisiologia e publicações da revista *Physical Therapy* inglesa demonstra-se que a célula não reage a estímulos que não atinjam um certo limiar. Isto é, "... se intensidades de baixa densidade não são reconhecidas pelas células, fica evidente que densidade de energia pequena, não terão efeito fisiológico..." Abaixo de determinada densidade, não adianta prolongar a exposição do feixe, isto é, a dosimetria não depende somente do tempo mas também de uma densidade numérica (LONGO, 1987).

2. 10 Formas de aplicação do laser

O laser pode ser aplicado de duas maneiras: terapia zonal e pontual.

A terapia zonal é feita quando se deseja um incremento dos efeitos derivados dos pequenos depósitos efetuados previamente com as aplicações pontuais.

Na terapia pontual utiliza-se o aparelho em contato com a pele do paciente, concentrando-se a potência em um determinado ponto na superfície.

De modo geral, todo tratamento deverá iniciar-se com aplicação pontual, a começar pelos pontos mais graves aos menos graves (VEÇOSO, 1993).

2. 11 Indicações no tratamento com laser

A Laserterapia pode ser usada em todos os casos que se queira um tratamento eficaz de uma região superficial de tecido, isto é, indicado para tratamento anti-álgicos, antiinflamatórios, anti-edematosos, como estímulo da microcirculação, da troficidade local, enfim, em todas as áreas que se deseja uma regeneração tecidual (VEÇOSO, 1993).

2. 12 Contra-indicações no tratamento com laser

a) Contra-indicações absolutas

Deve-se evitar a irradiação em pacientes neoplásicos, processos bacterianos agudos e na retina.

Em pacientes neoplásicos é aconselhável não se efetuar o tratamento com laser.

Nos processos bacterianos agudos só se deve irradiar a área se se tem cobertura prévia de antibióticos pelo risco que se tem de provocar uma aceleração e extensão do problema.

A irradiação transpassa o humor aquoso do olho depositando-se na retina que produzirá um processo degenerativo, sendo causa de uma cegueira irreversível. A este órgão deve-se dar especial atenção, cuidando-se para que, no local onde se efetua o tratamento não se tenham espelhos ou outros objetos de brilho metálico que possam refletir involuntariamente a irradiação (VEÇOSO, 1993).

b) Contra-indicações relativas

Estão concentradas em um grupo onde ainda há dúvidas sobre sua aplicação ou não. São elas:

- Pacientes submetidos a tratamentos com esteróides, não deverão ser irradiados.

- Irradiação da mama, na mastopatia fibrocística representa um perigo frente à possibilidade de malignização.

- Disfunções tireoidianas, arritmias cardíacas e existência de marcapassos. Este último se tem defendido pois, o laser não é ionizante.

- É desaconselhável irradiar pacientes que estejam em tratamento com fármacos fotossensibilizantes (VEÇOSO, 1993).

3 OBJETIVOS

- Estudar o processo da regeneração óssea em lesões produzidas cirurgicamente no osso da tíbia de ratos da linhagem *Albinus wistar*, estimulados com laser GaAs (Arsenieto de Gálio) de baixa intensidade;

- Avaliar histológica e histométricamente, se os resultados obtidos pela laserterapia de baixa intensidade, altera a velocidade da regeneração óssea em tíbia de rato.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local

O experimento foi realizado no biotério do Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium de Lins – SP (Unisalesiano), da Missão Salesiana de Mato Grosso – MS.

A obtenção dos cortes histológicos foi desenvolvida no Laboratório de Histologia e a análise histométrica na Unidade de Morfometria e Morfologia do Programa de Pós-graduação da Universidade do Sagrado Coração de Bauru – SP (USC).

a) Animal e grupos experimentais

Foram utilizados no estudo experimental 42 ratos machos da linhagem *Albinus wistar*, com idade média de três meses, pesando entre 200 e 250 gramas, fornecidos pelo biotério do Unisalesiano.

Os animais foram divididos em três grupos constituídos de 14 ratos cada um, todos submetidos à lesão cirúrgica por meio de uma broca odontológica de 3 mm de diâmetro (Trefine), sendo 7 ratos irradiados pelo laser GaAs, 24 horas após a cirurgia (grupo estimulado - GE) e 7 não estimulados (grupo controle - GC). O primeiro grupo (GE e GC) foi

eutanasiado, após 14 dias. No segundo grupo, após 28 dias e no terceiro, após 56 dias.

Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, com quatro a cinco ratos cada, alimentados com ração-padrão (ração Purina) do biotério e água, até o dia do sacrifício (nas primeiras 48 horas após a cirurgia foi adicionado analgésico à água, dipirona sódica - Novalgina).

4.2 Procedimento cirúrgico e lesão

Para a realização da cirurgia, os animais foram submetidos a um jejum de 12 horas e, em seguida, anestesiados com uma mistura de Ketamina a 5% e Xilazina a 2%, na proporção de 1:4, aplicando-se doses de 0,15 ml/100 g de peso corporal, por via intramuscular. Anestesiados, os ratos foram tricotomizados na face lateral da perna direita de maneira a permitir a visualização do campo cirúrgico (figura 8). Em seguida, o referido campo foi preparado com anti-sepsia utilizando-se uma solução alcoólica de iodo a 20% (álcool iodado).

Para expor cirurgicamente a tíbia, foi feita uma incisão longitudinal na face lateral da perna direita indo desde a região média da diáfise da tíbia até o joelho (figura 9). Os tecidos adjacentes foram afastados, expondo a superfície óssea do côndilo superior da tíbia (figura 10). Neste local procedeu-se a lesão cirúrgica por meio de uma broca odontológica de 3 mm de diâmetro, acoplada a um motor de baixa rotação, modelo Multimicro NSR – r.p.m. máxima: 20.000

(figura 11). Durante a lesão cirúrgica, a área foi irrigada com solução fisiológica (soro fisiológico) e, em seguida, foi feito o reposicionamento dos tecidos adjacentes e o procedimento de sutura com fio de sutura de algodão 3.0 com agulha (figura 12).

Passadas 24 horas da cirurgia, num período de 10 dias consecutivos, foram feitas aplicações com o laser GaAs de baixa intensidade (figura 13), de comprimento de onda 904 nm, 3 Joules/cm², com três aplicações pontuais de 30 segundos cada (total: 90 segundos). Aparelho laser LIV 877 da KLD Biosistemas Equipamentos Eletrônicos Ltda. (figura 7).

Após os respectivos períodos de experimentação, os animais receberam dose letal do anestésico usado no procedimento cirúrgico para a realização da eutanásia. As peças das tíbias foram recortadas e fixadas em solução de Bouin por 48 horas, mantidas sob refrigeração a 4°C. Logo após, cada peça foi colocada em 50 ml de EDTA para a descalcificação, a solução foi trocada a cada 5 dias, por um período de 40 dias. Posteriormente, foram clarificadas em álcoois de concentração crescente, clarificadas em xilol e, incluídas em parafina histológica e obtidos os cortes histológicos de 0,6 µm de espessura no plano transversal e corados pelo tricrômico de Masson.



Figura 7: Foto do Aparelho Laser (GaAs), utilizado na laserterapia, da KLD Biosistemas Equipamentos Eletrônicos Ltda.



Figura 8: Foto da tricotomia e assepsia.



Figura 9: Foto da incisão cirúrgica.



Figura 10: Foto do afastamento dos tecidos adjacentes.



Figura 11: Foto do procedimento da lesão cirúrgica na tíbia.



Figura 12: Foto do procedimento de sutura.



Figura 13: Foto da laserterapia pontual 24 horas após a cirurgia.



Figura 14: Microscópio óptico Nikon H550L – Micro Publisher 3.3 RTU. Utilizado na captação das imagens das lâminas e na histometria.

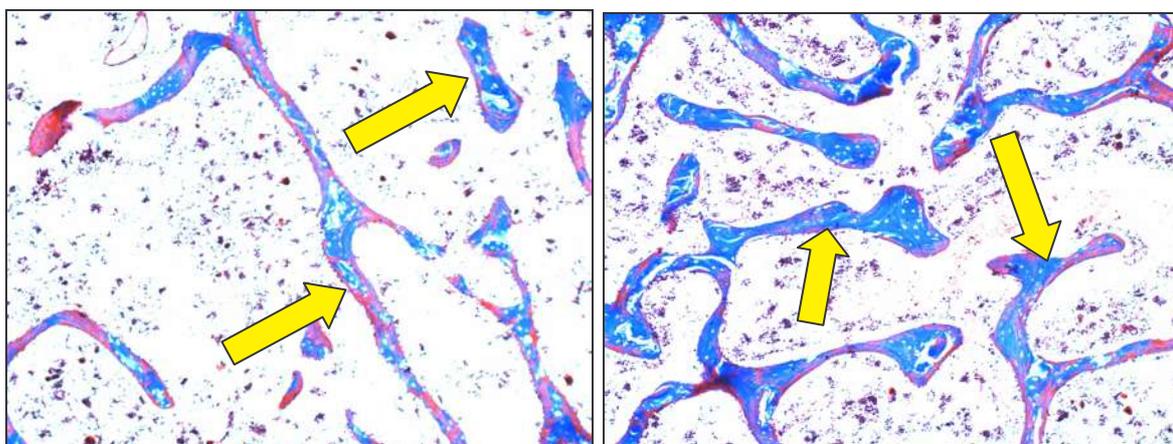
Na figura 14, ilustração do microscópio Nikon H550L, utilizado na obtenção das imagens captadas pelo software Image-Pro-Plus, adquirido pelo projeto FAPESP 03/09503-3 sob a responsabilidade do Prof. Dr. Sérgio Augusto Catanzaro Guimarães.

As análises histométricas foram obtidas pelo software Origin 7.5, com a colaboração da Profa. Dra. Ângela Mitie Otta Kinoshita

5 RESULTADOS

Foram escolhidas lâminas de 4 animais do GE e 4 do GC mais representativas, de cada período de estudo (14, 28 e 56 dias) e submetidas à análise histológica e histométrica. Na primeira análise comparou-se a evolução de trabéculas ósseas e cartilagem e, na segunda, osso compacto e osso esponjoso.

A figura 15 A e B, ilustra as regiões de interesse. Comparativamente, percebe-se a nítida diferença entre o GC (A), com presença de poucas trabéculas em estágio inicial de formação e, o GE (B), onde se verifica o maior número de trabéculas num estágio mais avançado de formação. Tais figuras A e B, correspondem aos grupos GC e GE, respectivamente, no período de 14 dias.



(A)

(B)

Figura. 15: Em A (seta), rato 3, presença de trabéculas ósseas neo-formadas ainda em estágio inicial de formação (GC – 14 dias). Em B (setas), rato 3, presença de trabéculas ósseas neo-formadas mais numerosas (GE – 14 dias). Fotomicrografia pelo microscópio de luz, 10X.

A figura 16 A e B, nos mostra o processo de ossificação endocondral em andamento (28 dias) tanto no GC (A) como no GE (B) no mesmo período, porém a ossificação endocondral é mais evidente no GE pelo laser, onde os condrócitos se mostram mais hipertrofiados (figura 12 B).

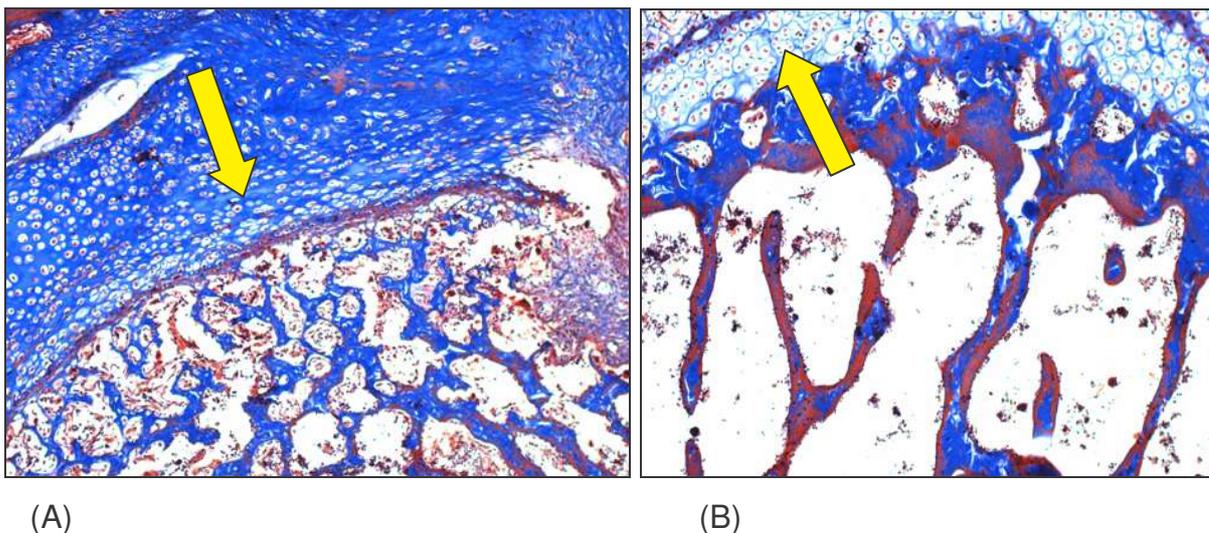


Figura. 16: Em A, rato 2, GC, 28 dias, observa-se, indicado pela seta amarela, a cartilagem hialina em processo inicial de ossificação endocondral e trabéculas ósseas; em B, rato 3, GE, mesmo período, a ossificação endocondral, indicada pela seta amarela, mostra-se bem evoluída com os condrócitos em adiantado estágio de ossificação endocondral – fotomicrografia pelo microscópio de luz, 10X.

A figura 17 A e B, ilustra o processo de ossificação endocondral no período de 56 dias. Em A, temos o GC em processo adiantado de degeneração da cartilagem hialina com condrócitos hipertrofiados. Em B, GE, verifica-se que o mesmo processo já nos mostra a cartilagem com regiões calcificadas, morte dos condrócitos por apoptose e formação de trabéculas diretrizes, portanto mais avançado que o observado no GC. Nesse período, já se verifica a presença de trabéculas completamente formadas tanto no GC como no grupo GE. O que fica evidente é a evolução mais acelerada da ossificação endocondral e das trabéculas ósseas no GE

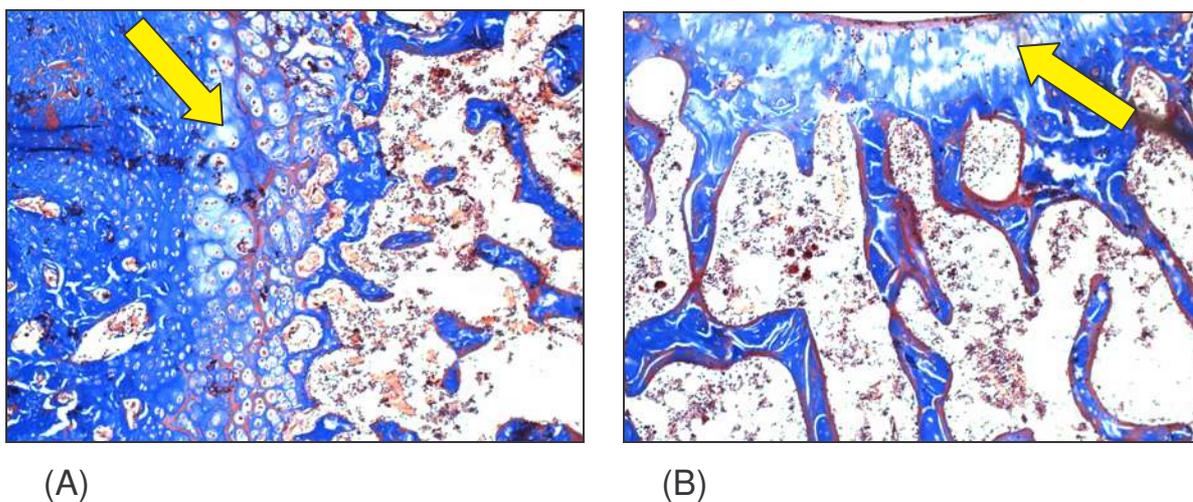
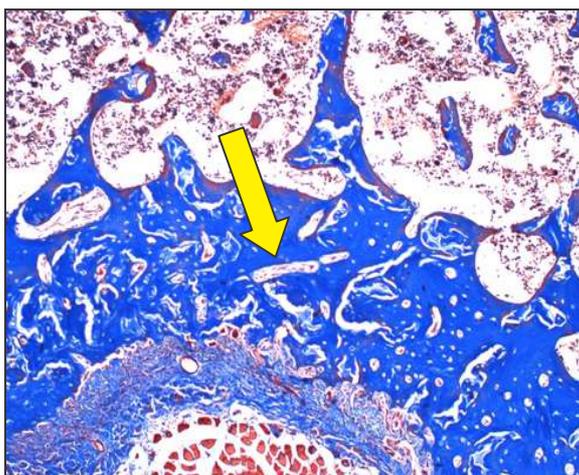
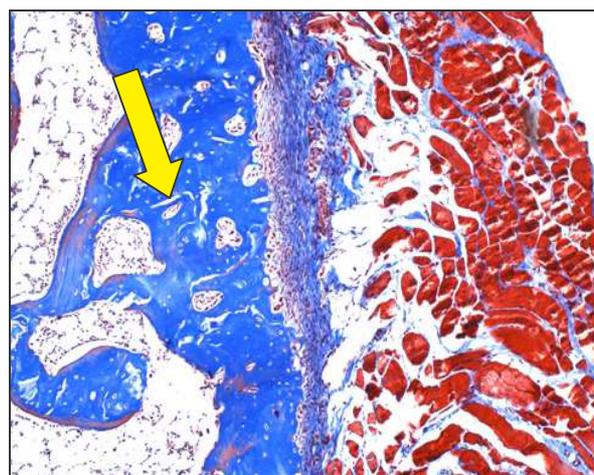


Figura. 17: Em A, rato 3, GC, 56 dias, a seta amarela nos mostra a degeneração adiantada da cartilagem evidenciando os condrócitos bem hipertrofiados; em B, rato 7, GE, mesmo período, também indicado pela seta amarela, a cartilagem encontra-se em estágio calcificado, onde os condrócitos já desapareceram (apoptose) – fotomicrografia pelo microscópio de luz, 10X.

As figuras 18 A e B, nos apresentamos os estágios finais (mais evoluídos) da reparação óssea, onde em A, tem-se o estágio inicial da formação de osso compacto com a presença de vasos sanguíneos ossificantes e presença de pericôndrio mais espesso. Já em B, observa-se o osso compacto bem formado, numerosos osteócitos e matriz óssea densa.



(A)



(B)

Figura. 18: Em A, osso compacto em estágio inicial de formação (seta), rato 1, GC; em B (seta), rato 6, GE, osso compacto em estágio mais adiantado com matriz óssea mais densa (seta). Respectivamente GC e GE., 56 dias – fotomicrografia pelo microscópio de luz, 10X.

A figura 19 A e B, nos ilustra a presença de osso esponjoso (trabéculas) em formação a partir da degeneração da cartilagem (ossificação endocondral), é possível observar dois estágios diferentes de evolução: o primeiro, menos avançado, (em A, canto inferior esquerdo) e, o segundo mais adiantado (em A, canto superior esquerdo). Em B já se verifica o osso esponjoso (trabéculas) praticamente formado com invasão de medula óssea ainda imatura (A e B – 56 dias).

Observação: Vale ressaltar aqui que, de acordo com a revisão literária, a classificação de osso compacto e osso esponjoso é macroscópica e não histológica, pois o osso compacto e as trabéculas que separam as cavidades do osso esponjoso têm a mesma estrutura histológica básica.

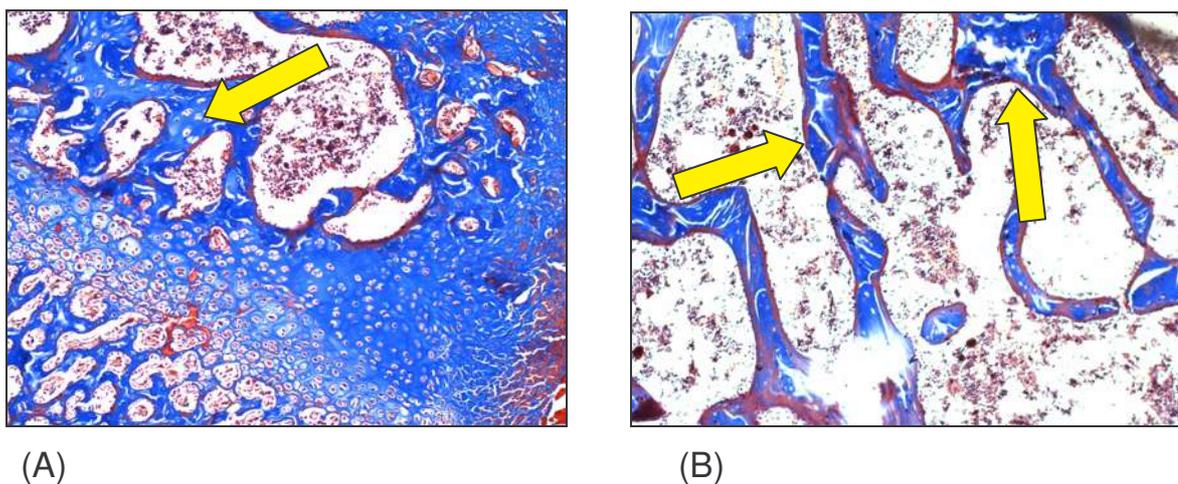


Figura 19: Em A, rato 1, GC – 56 dias, presença de trabéculas ósseas, osso esponjoso (seta) em estágios diferentes de maturação; em B, rato 7, GE – 56 dias, as trabéculas ósseas já estão em estágios mais evoluídos (setas) em sua maturação (fotomicrografia pelo microscópio de luz, 10X).

5.1 Análises histométricas

As tabelas de 1 e 2 mostram os valores médios e os desvios padrão obtidos da análise Histométrica, de acordo com os períodos, relativos aos GE e GC.

Período (dias)	Trabéculas Ósseas (%)		Cartilagem (%)	
	Estimulado	Controle	Estimulado	Controle
14	65.1 ± 2.9 [*]	40.4 ± 3.3 [*]	34.5 ± 3.3 [*]	61.1 ± 4.9 [*]
28	71.9 ± 1.2 ^{**}	69.8 ± 2.2 ^{**}	28.0 ± 1.2 ^{**}	30.3 ± 2.2 ^{**}
56	83.4 ± 2.1 [*]	73.6 ± 1.6 [*]	16.6 ± 2.1 [*]	26.4 ± 1.6 [*]

Tabela 1: Valores Médios e Desvios Padrão da fração percentual das áreas de Trabéculas Ósseas e Cartilagem, obtidos por Histometria. ^{*} Médias significativamente diferentes ($p < 0.05$)-Teste Tukey; ^{**} $p > 0.05$

Período (dias)	Osso Compacto (%)		Osso Esponjoso (%)	
	Estimulado	Controle	Estimulado	Controle
14	39.6 ± 15.1*	17.9 ± 4.6*	60.4 ± 15.1*	82.1 ± 4.6*
28	41.6 ± 3.1*	32.3 ± 4.0*	58.5 ± 3.1*	67.7 ± 4.0*
56	72.1 ± 12.3*	41.6 ± 5.7*	27.9 ± 12.3*	58.5 ± 5.7*

Tabela 2: Valores Médios e Desvios Padrão da fração percentual das áreas de Osso Compacto e Osso Esponjoso, obtidos por histometria. * Médias significativamente diferentes ($p < 0.05$)-Teste Tukey

A figura 20 ilustra os resultados da análise histométrica dos GC, 14, 28 e 56 dias respectivamente.

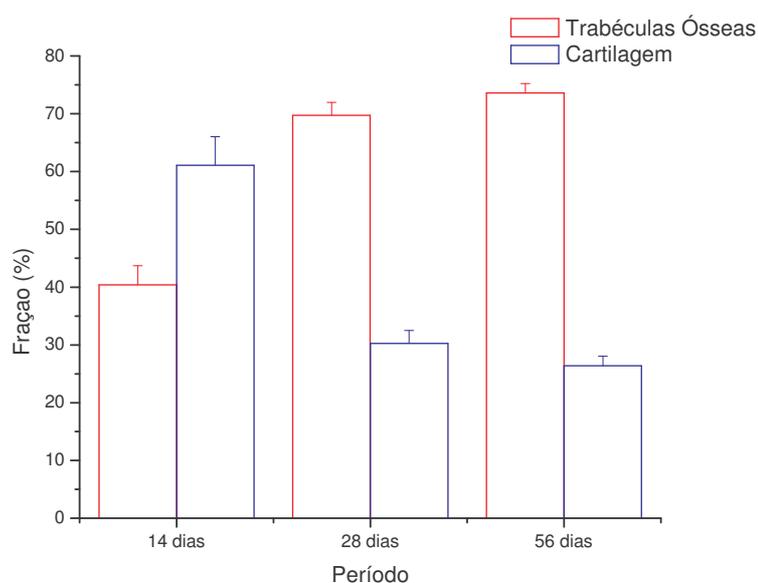


Figura 20: Resultados da análise histométrica nos grupos GC, relativamente às trabéculas ósseas e cartilagem nos períodos de 14, 28 e 56 dias, respectivamente.

A figura 21 ilustra os resultados da análise histométrica dos GE, 14, 28 e 56 dias respectivamente.

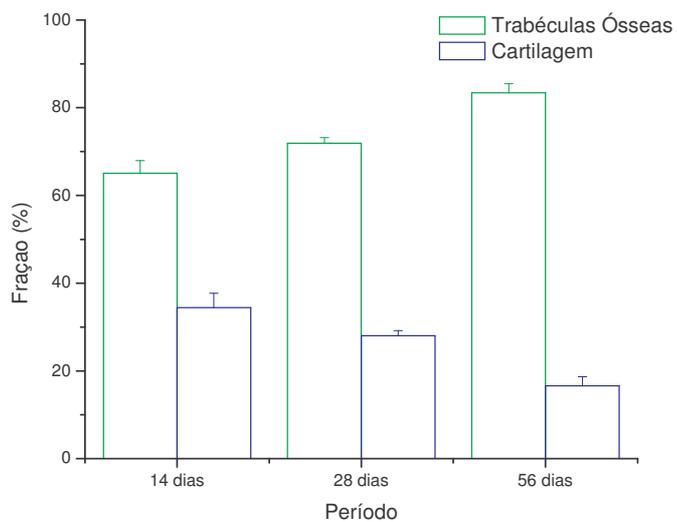


Figura 21: Resultados da análise histométrica nos grupos GE, relativamente às trabéculas ósseas e cartilagem nos períodos de 14, 28 e 56 dias, respectivamente.

A figura 22 mostra os resultados da análise histométrica dos GE, 14, 28 e 56 dias respectivamente.

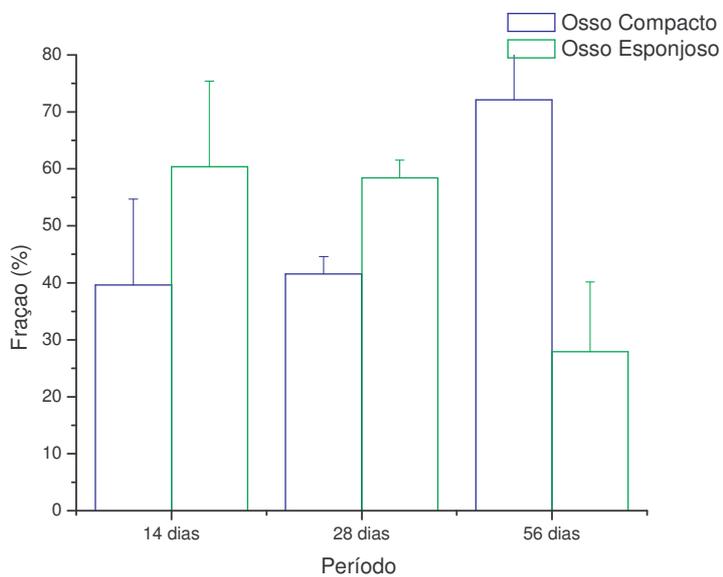


Figura 22: Resultados da análise histométrica nos grupos GE, relativamente às trabéculas ósseas e cartilagem nos períodos de 14, 28 e 56 dias, respectivamente

A figura 23 mostra os resultados da análise histométrica dos GC, 14, 28 e 56 dias respectivamente.

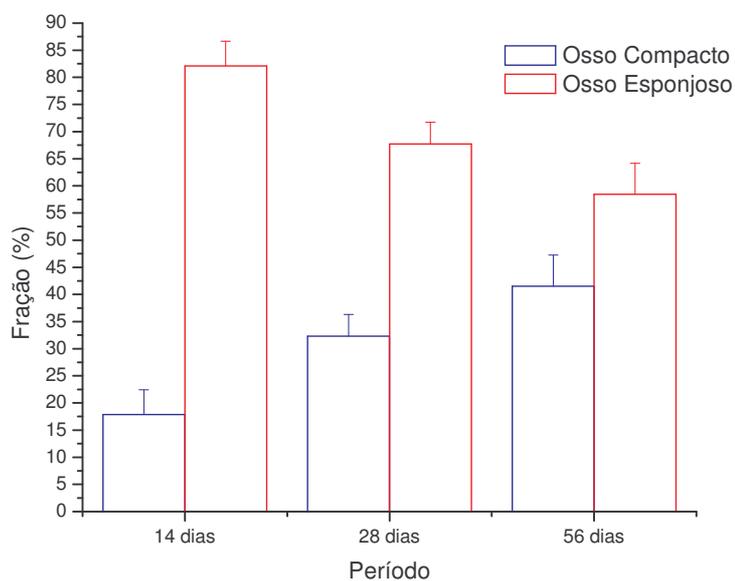


Figura 23: Resultados da análise histométrica nos grupos GC, relativamente às trabéculas ósseas e cartilagem nos períodos de 14, 28 e 56 dias, respectivamente

A figura 24 ilustra a evolução comparativa nos GC e GE, relativamente às trabéculas ósseas e cartilagem nos três períodos.

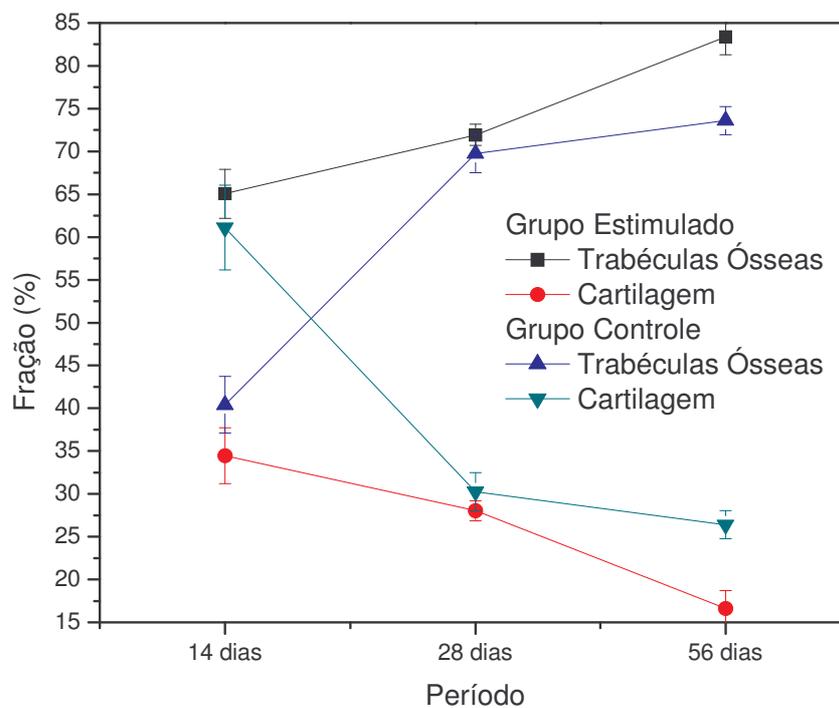


Figura 24: Evolução da fração da área relativa à trabécula óssea e cartilagem nos grupos GE e GC.

A figura 25 demonstra a evolução comparativa nos GE e GC, relativamente ao osso compacto e osso esponjoso nos três períodos.

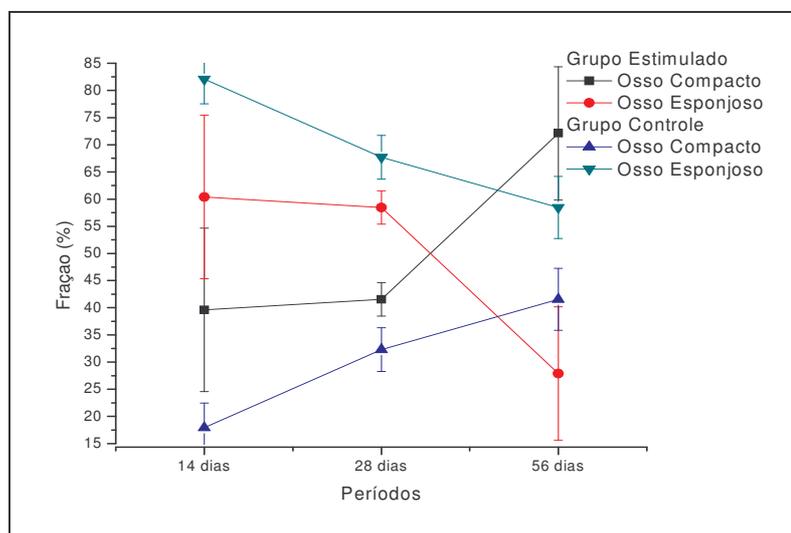


Figura 25: Evolução da fração da área relativa ao osso compacto e osso esponjoso nos grupos GE e GC.

As figuras 26 e 27 ilustram as evoluções comparativas nos GE e GC, relativamente aos quatro tipos de tecidos analisados nos três períodos respectivos.

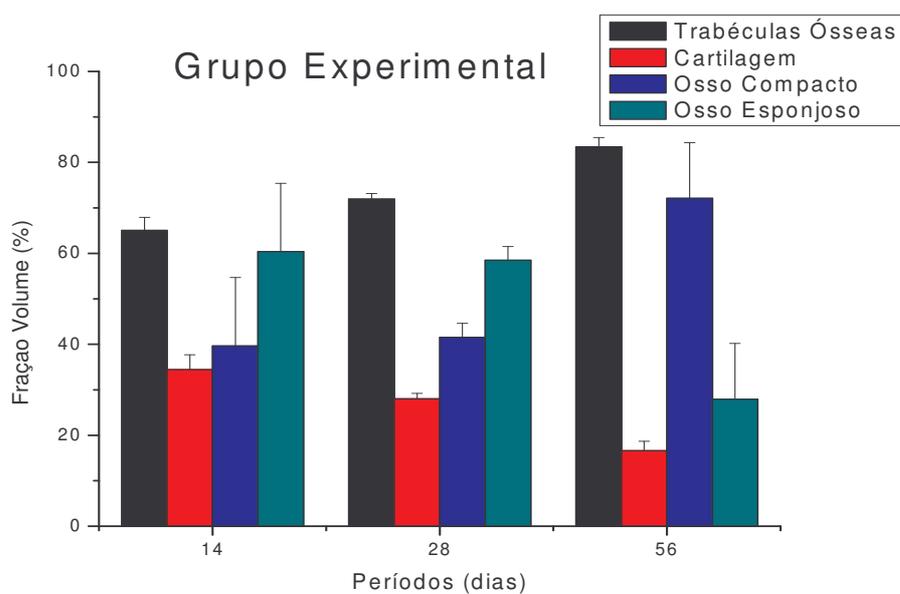


Figura 26: GE: Comparação evolutiva dos três períodos relativos à trabéculas ósseas, cartilagem, osso compacto e osso esponjoso.

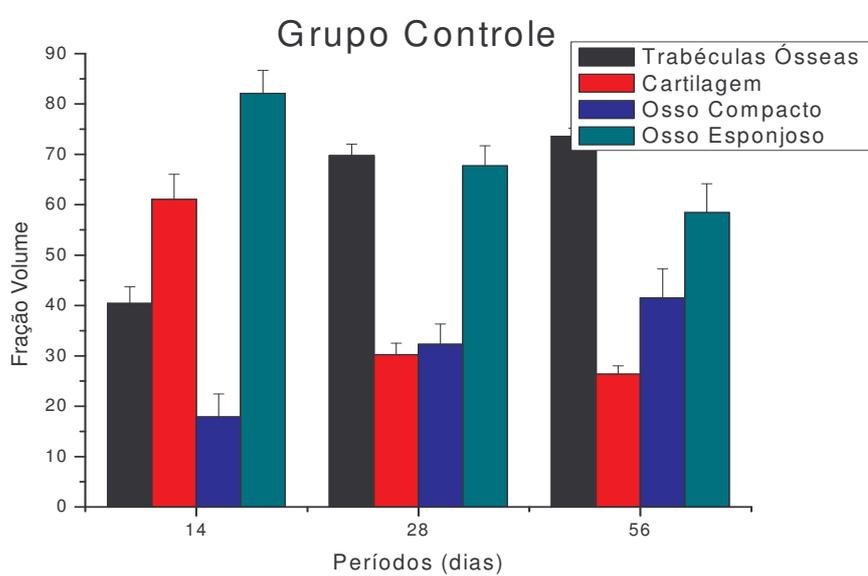


Figura 27: GC: Comparação evolutiva dos três períodos relativos à trabéculas ósseas, cartilagem, osso compacto e osso esponjoso.

6. DISCUSSÃO

No GE de 14 dias, em todos os ratos verificou-se um aumento percentual considerável de trabéculas ósseas quando comparado ao GC. A cartilagem, nesse mesmo período, percentualmente decresceu no GE em relação ao GC; isso devido ao fato de a cartilagem ter sido degenerada no processo de ossificação endocondral, sugerindo que o laser intensificou esse processo. Na observação do osso compacto, verificou-se, no GE pelo laser, no mesmo período, um aumento percentual significativo em todos os ratos quando comparado ao GC; novamente sugere que a formação de osso compacto foi intensificada pela ação da irradiação laser. A análise do osso esponjoso verificou-se uma diminuição percentual significativa nos ratos 1 e 4, GE em relação aos ratos 1 e 4, GC (diferença média de aproximadamente 30%); já os ratos 2 e 3, GE comparados aos ratos 2 e 3, GC (a diferença oscilou em torno de uma média de 13,5%); isso talvez tenha ocorrido por diferenças individuais entre os ratos, uma vez que a dose de irradiação (3 J/cm^2), o tempo de aplicação (90 s) foram sempre os mesmos; mesmo assim os resultados mostraram-se significativos.

Na verificação do GE de 28 dias relativamente ao GC, não houve um resultado significativo na comparação das trabéculas ósseas, a diferença percentual média foi muito pequena. O mesmo correu com a análise da cartilagem. Já a formação de osso compacto demonstrou um resultado significativo entre o GE e o GC. Resultado idêntico ao do osso compacto foi verificado no osso esponjoso.

O GE de 56 dias, comparado ao GC, no mesmo período, apresentou os seguintes resultados: Trabécula óssea com diferença significativa no GE. A análise da cartilagem também demonstrou um decréscimo significativo no GE, indicando uma ossificação endocondral mais acelerada pela irradiação laser. Relativamente ao osso compacto, no GE mostrou-se mais desenvolvido, observando-se uma

considerável diferença (média de 30,55%) comparada ao GC. Resultado idêntico ao do osso compacto foi observado no osso esponjoso, inclusive apresentando a mesma média de 30,55%.

Os resultados obtidos mostram que de acordo com FREITAS e colaboradores, 2000, ocorre, num período de 7 a 14 dias, uma intensa atividade sintética dos osteoblastos produzindo grande quantidade de fibras colágenas acelerando a reparação óssea. STEIN e colaboradores, 2005, também afirmam o mesmo, acrescentando que o laser tem importante efeito na proliferação e diferenciação dos osteoblastos. Tais resultados coincidem com os obtidos em nosso experimento, principalmente no grupo de animais irradiados no período de 14 dias.

COOMBE e colaboradores, 2001, demonstraram um aumento do cálcio intracelular em células osteoblásticas humanas irradiadas por laser de baixa intensidade, esta constatação reforça a presença de trabéculas ósseas neoformadas encontradas na leitura histológica neste presente estudo e confirmadas na análise estatística.

Já em 1987, TRELLES & MAYAYO, afirmaram que o laser de baixa intensidade possibilita uma interpretação positiva na aceleração do processo de reparação óssea. Este estudo também indicou semelhança nos resultados de acordo com a literatura.

VEÇOSO, 1993, indica que o laser é um excelente estímulo na produção de ATP no interior das células, conseqüentemente, a aceleração da mitose está diretamente proporcional ao aumento do ATP e das mitocôndrias. Na reparação óssea, esse fenômeno é de grande importância, pois o número de osteoblastos deve ser aumentado para que o reparo ósseo evolua satisfatoriamente. Neste estudo,

verifica-se um aumento do número de osteoblastos de forma parecida ao relatado na literatura.

LUGER e colaboradores, 1998, demonstraram que a carga máxima (ensaio mecânico) suportada no calo ósseo, inicialmente osso imaturo (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004) que evolui para osso compacto da tíbia fraturada de rato, mostrou-se significativamente maior no grupo que recebeu irradiação laser; nosso presente estudo indicou diferença importante na formação do osso compacto, especialmente no grupo estimulado de 56 dias, fortalecendo deste modo, que a terapia laser de baixa intensidade estimula a formação de osso compacto.

Estudos realizados por HUBACEK & POSPILOVA, 2002, mostraram que a atividade mitótica e sintética (síntese de colágeno) dos fibroblastos é aumentada quando irradiados por três semanas com laser de baixa intensidade (HeNe). Como os fibroblastos do perióstio têm importante papel na reparação óssea reconstruindo o perióstio e, como o perióstio é fornecedor de células osteoprogenitoras, a irradiação laser tem aqui importante função estimuladora. Com base nessa afirmação literária, é que foi tomada a decisão pela escolha do laser de baixa intensidade no presente estudo. Isto foi comprovado neste presente estudo.

CORMACK, 2005, afirma que o processo de reparo ou regeneração óssea implica na presença de células capazes de regenerar e remodelar o local da lesão, devolvendo ao osso sua integridade natural. Segundo WORDARSKI, 1990, estudos sugerem que o reparo de uma fratura óssea é diretamente dependente da resposta celular ao estímulo gerado. Indo ao encontro dessa idéia, nosso estudo sugere que tais células (fibroblastos, osteoblastos e células osteoprogenitoras) são estimuladas pelo laser e promovem uma reparação óssea rápida e eficiente.

Vários estudos experimentais reforçam a eficiência da terapia laser no reparo de fratura óssea (STEIN e colaboradores, 2005; GARAVELLO-FREITAS e colaboradores, 2003; SILVA JÚNIOR e colaboradores, 2002; FREITAS e colaboradores, 2000, dentre outros autores). Os resultados obtidos neste experimento são semelhantes aos encontrados na literatura citada. Pela análise histométrica ficou evidente que o tecido ósseo irradiado com laser de baixa intensidade respondeu favoravelmente, mostrando um reparo ósseo mais acelerado. Ficou claro que no período inicial (14 dias), a resposta ao estímulo foi mais positiva; No período intermediário (28 dias), a irradiação parece não ter sido tão evidente como se esperava, salientando apenas a resposta significativa do osso compacto. No último período (56 dias), a reparação óssea mostrou-se bastante evoluída em todos os aspectos (trabéculas, cartilagem, osso compacto e osso esponjoso). Finalizando essa discussão, ficou demonstrado que a ação do laser de baixa intensidade (GaAs) efetivamente estimulou e acelerou o processo da reparação óssea na tíbia do rato. Confirma esse resultado, a análise estatística fundamentada na histometria.

7 CONCLUSÃO

Ficou demonstrado que a ação do laser de baixa intensidade (GaAs) efetivamente estimulou e acelerou o processo da reparação óssea na tíbia do rato. Confirma esse resultado, a análise estatística fundamentada na histometria. Portanto, os resultados obtidos evidenciam que a reparação óssea foi acelerada nos GE, pois os mesmos responderam favoravelmente ao estímulo do laser quando comparados aos respectivos GC.

REFERÊNCIAS

BONNARENS, F. & EINHORN, T.A. Prediction of a standard closed fracture in laboratory animal bone. **J. Orthop. Res.** , V. 2, P.97-101, 1991.

BARUSKA, O.; YAAKOBI, T.; ORON, U. Effect of low energy (HeNe) irradiation on the process of bone repair in the rat tibia. **Bone**.New York, v. 16, n. 1, p. 47-55, jan. 1995.

BAXTER G.D.; WALSH, D.M.; ALLEN, J.M. Efects of low intnsity infrared laser irradiation upon conduction in the human median nerve in vivo. **Exp. Physol.**; 79: 227-234. 1994.

BAXTER, G. Davidi. **Therapeutic lasers theory and practice**. Churchil Livingstone, 1994.

COLLS, J. C. **La terapia laser hoy**. Barcelona, 1984.

COOMBE, A. R. et al. The effect of low level laser irradiation on osteoblastic cells. **Clin Orthop. Res.** v. 4, p. 3-14. 2001.

CORMACK, David H. **Fundamentos de histologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,. 371p. 2003.

FREITAS, I. G. F.; BARANAUSKAS, V.; CRUZ-HÖFLING, M. A. Laser effects on osteogenesis. **Applied Surface Science** 154-155: 548-554, 2000.

FREITAS, João Alberto H.; PROVENZANO, Jaqueline. **Laser em oftalmologia**. Revintor, 2000.

GARAVELLO-FREITAS, I. *et al.* Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, n. 70, p. 81-89. 2003.

GARTNER, L. P.; HIAT, J. L. **Tratado de histologia em cores**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 426p.

HUBACEK, J.;POSPISILOVA, J. Effect of He-Ne laser radiation upon fibroblasts in the course of wound healing. **ENT, Clinic, Faculty Hospital Olomouc**, CZ, 2002.

JUNQUEIRA, Luiz C.; CARNEIRO, José. **Histologia básica (texto e atlas)**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 488p.

KARU, T I. Fotobiology of low laser therapy, In: Letokov VS et a/, editors.Laser Science Technology, an International Handbook, Vol 8, **Harwood Academic Publishers**, London, 1989.

LONGO, *et al.* Effect of diodes-laser silver-arsenide aluminium (Ga-Al-As) 904 nm on healing of experimental wounds. **Laser in Surgery and Medicine**. V. 7, p. 44-47. 1987.

LUGER, E. J. *et al.* Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. **Lasers Surgery Medicine**, v. 22, n.2, p. 97-102.1998.

MARINO, J.A.M. **Efeito do laser terapêutico de baixa potência sobre o processo de reparação óssea em tibia de rato**. 107p. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

NINOMIYA, T.; HOSOYA, A.; NAKAMURA, H.; SANO, K.; NISHISAKA, T.; OZAWA, H. Increase of bone volume by a nanosecond pulsed laser irradiation is caused by a decreased osteoclast number and an activated osteoblasts. **Elsevier** 40: 140-148, 2007.

PIMENTA *et al* CO₂ laser in brain stem glioma. Artigo, **Revista Brasileira de Clínica e Terapêutica**, 2005.

PIMENTA, Luiz H. M.; PIMENTA, Tânia M.; PIMENTA, Aloysio de M. Emprego do laser a CO₂ em pacientes neurocirúrgicos – **Revista Brasileira de Clínica e Terapêutica**, nov-dez. 1986.

PINHEIRO, A. L. B.; GERBI, M. E. M. M. Photoengineering of bone process. **Photomedicine And Laser Sugery**, vol 24, n. 2, 2006.

SILVA JUNIOR, *et al.* Computadoruzed morphometric assesment of the effect of low-level laser therapy on repair; na experimental animal study. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 20, n. 2, p. 83-87. 2002.

STEIN, A.; BENAYAHU, D.; MALTZ, L.; ORON, U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. **Photomedicine And Laser Sugery**, vol 23. n. 2. 2005.

TIPHLOVA, O..A.; KARU T. I.; FURZIKOV, N. P.; KARBYSHEVA, E. A. Lethal and mutagenic effects of XeCl laser radiation on Escherichia coli bactéria. **Radiobiologiya**, 27(5), 706-708, (in Russian).1987.

TIPHLOVA, O..A.; KARU, T. I. Role of primary effects: action of HeNe laser radiation on bacteriophage T4 – escherichia coli interation, **Radiobiologiya**, 25, p. 112-115. (in Russian). 1989.

TRELLES, M. A. ; MAYAYO, E.; MIRÓ, L.; BAUDIN, G.; LAPIN, R. Histamine & low power laser. **J. Bloodles Med Surg** v.6. n.1, p.15-16, 1988.

TRELLES, M. A. **NN soft – laserterapia**. Madrid: Enar, 1982.

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

YEW, D. ; LI, W.; PANG, K.; MOK, Y.; AU, C. Stimulation of collagen formation in the intestinal anastomosis by dose He-He laser. **Scanning Microscopy**. V.3, n.1, p.379-386, 1989.

WONG et al, Identification of chondrocyte proliferation following laser irradiation, thermal injury, and mechanical trauma. **Lasers in Sugery and Medicine** 37:89-96, 2005.

WORDARSKI, K. H. Properties and origen of osteoblasts. **Clin. Orthop**. V. 3, p. 276-293, 1990.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

BRUALA, A. **El laser HeNe em el tratamiento de los quemados.** Barcelona: 1983.

DAMANTE, Carla Andreotti. **Avaliação clínica e histológica dos efeitos do laser em baixa intensidade (GaAIs) na cicatrização de gengivoplastia em humanos.** 2003. 92p. (Dissertação de mestrado). Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Bauru.

DALPINO, Gisele Blassioli. **O emprego da ressonância do spin eletrônico como técnica auxiliar na determinação do grau de mineralização do osso neoformado em modelos de cicatrização óssea guiada.** 2006. 106p. (Dissertação de mestrado). Universidade do Sagrado Coração, Bauru.

DI FIORI, Mariano H. S.; MANCINI, R. E.; DE ROBERTS, E. P. D. **Novo atlas de histologia, microscopia óptica, histoquímica e microscopia eletrônica.** 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. 355 p.

ENDO, Cristina. **Estudo dos efeitos do tratamento com laser num modelo experimental de lesão nervosa por esmagamento do nervo ciático em ratos.** 2002. 54p. (Dissertação de mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto

FERRENCE, J. R. & LEMON. **Curso de física onda, som e luz.** São Paulo: Edgard Blücher, 1979.

GOODMAN, L.A. On simultaneous confidence intervals for multinomials proportions. **Tedinometrics**, 7(2): 247-54, 1965.

GOODMAN, L.A. **Simultaneous confidence intervals for contrasts.** Guanabara Koogan, 2003.

KOUCCS. L. & FISZA. **Aplicaciones biologicas y medicas del laser.** Madrid. 1984.

LIRANI, Ana Paula Rebucci. **Estudo comparativo dos efeitos do ultra-som e do laser de baixa intensidade no reparo ósseo de tibia de rato.** 2004. 94p., (Dissertação de mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

MASTER E., MASTER A. F; MASTER A. The biomedical effects of laser application. **Laser Surg. Med.** 5:31-9. 1985.

MASTER E., NAGYLUOSKAY S. DOKLEU A. Laser stimulation of wound healing // **Acta Chir.** 17. 1. 49-55. 1976.

MASTER, E.; MASTER A. Les effets bio-stimulants du laser. Son efficacite dans le traitement des ulcères cutanés. **Lion Chir.** 80. 6. 457-459. 1984.

MAYAYO, E.; TRELLES, M. Irradiación laser experimental de la mucosa anal em el ratón de laboratorio. **Inv. Clin. Laser** I. v.4 p.28, 1984.

MONTGOMERY, D.C. **Design and analysis of experiments**, 3th ed., John Wiley, New York, 649 p., 1991.

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

ROCCIA, L. **Laserterapia**. Barcelona: Ibérica Impresiones Generales, 1989.

SALTER, R. B. **Distúrbios e lesões do sistema musculoesquelético**. 3. ed. Rio de Janeiro: Médica, 2001.

TAVARES, Marcelo Rodrigo. **Efeito do laser terapêutico na cicatrização tendinosa: estudo experimental em ratos**. 2002. (Dissertação de mestrado), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

ANEXO



PRPPG
Pró-reitoria
de Pesquisa e
Pós-graduação

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA*Protocolo nº 82/07*

Título do Projeto: *"Efeito do laser arsenieto de gálio na reparação de lesão óssea na tibia do rato"*

Pesquisador (a) Responsável: Luiz Alberto Massarote

Comitê de Ética:

O CEP analisou, baseado em parecer competente, o presente projeto e o considerou aprovado.

Data: 23 de agosto de 2007

Assinatura do Presidente:

P/ **Prof. Dr. Marcos da Cunha Lopes Virmond**

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)