

Universidade do Vale do Paraíba  
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

Cibelle Barbosa Lopes

**“REPARAÇÃO ÓSSEA ASSOCIADA OU NÃO A FOTOBIMODULAÇÃO A  
LASER AVALIADA POR ESPECTROSCOPIA RAMAN NO  
INFRAVERMELHO  
PRÓXIMO (ER-IVP)”**

São José dos Campos - SP

2007

Cibelle Barbosa Lopes

“AVALIAÇÃO ATRAVÉS DA ESPECTROSCOPIA RAMAN NO  
INFRAVERMELHO PRÓXIMO (ER-IVP) DO REPARO ÓSSEO ASSOCIADO A  
FOTOBIMODULAÇÃO A LASER”

Tese de Doutorado defendida no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, como complementação dos créditos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

Orientadores: Prof. Antonio Luiz Barbosa Pinheiro, PhD

Prof. Marcos Tadeu Tavares Pacheco, PhD

São José dos Campos - SP

2007

**“Avaliação através da Espectroscopia Raman no infravermelho próximo (ER-IVP) do reparo ósseo associado a fotobiomodulação a Laser”**

L851c

Lopes, Cibelle Barbosa  
Avaliação através da Espectroscopia Raman no infravermelho próximo (ER-IVP) do reparo ósseo associado a fotobiomodulação a Laser/Cibelle Barbosa Lopes. São José dos Campos: UniVap, 2007.  
1 Laser disc.: color

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2007.

1. Fotobiomodulação a laser 2. Reparo ósseo 3. Espectroscopia Raman (ER-IVP) I. Pinheiro, Antonio Luiz Barbosa, Orient. II. Pacheco, Marcos. Tadeu Tavares, Orient. III. Título.

CDU:616-003.9

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processo fotocopiadores ou transmissão eletrônica.

Assinatura do aluno:



Data: 04 de Dezembro de 2007

**CIBELLE BARBOSA LOPES**

**“AVALIAÇÃO ATRAVÉS DA ESPECTROSCOPIA RAMAN NO  
INFRAVERMELHO PRÓXIMO (IVP) DO REPARO ÓSSEO ASSOCIADO  
A FOTOBIMODULAÇÃO A LASER”**

Tese aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Engenharia Biomédica, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. **LANDULFO SILVEIRA JUNIOR** (UNIVAP) \_\_\_\_\_

Prof. Dr. **ANTONIO LUIZ BARBOSA PINHEIRO** (UNIVAP) \_\_\_\_\_

Prof. Dr. **MARCOS TADEU TAVARES PACHECO** (UNIVAP) \_\_\_\_\_

Prof. Dr. **CARLOS ESTRELA** (UFG) \_\_\_\_\_

Prof. Dr. **JOÃO BATISTA TEIXEIRA DA ROCHA** (UFMS) \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Diretor do IP&D – UniVap

São José dos Campos, 04 de dezembro de 2007.

*Dedico este trabalho  
à minha família, verdadeiro  
presente de Deus em minha vida.  
Com amor,*

*Ao meu marido  
Lucas, pelo seu amor,  
compreensão nos momentos de ausência,  
presença constante nos momentos difíceis  
e colaboração na conquista de mais  
este objetivo em nossas vidas.  
Com todo o meu amor!*

## Agradecimentos

*A Deus por todas as oportunidades que me fez enxergar, por todos os desafios que me fez crescer, e pela esperança que me fez sentir em cada momento durante a execução deste trabalho.*

*A minha família, meus pais Aldinor e Regina, minhas irmãs Milene e Caroline e meu marido Lucas pelo carinho, amor, orações e incentivo durante toda a execução deste trabalho, meu eterno amor e gratidão a vocês.*

*Ao querido amigo e orientador Prof. Dr. Antonio Luiz Barbosa Pinheiro, pelo grande exemplo de pessoa que influenciou positivamente em minha vida pessoal e profissional, minha gratidão.*

*Ao Magnífico Senhor Reitor desta Universidade Prof. Dr. Baptista Gargione Filho, ao Excelentíssimo Pró Reitor de Graduação Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro e Excelentíssimo Diretor do IP&D e orientador Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco pela confiança que depositaram e empenho decisivo para o meu ingresso na vida acadêmica e na pós-graduação desta universidade, tornando possível a realização deste trabalho.*

*Aos meus queridos amigos Ilene C. R. César, Luís Eduardo S. Soares, Rick Rocha, Tatiana T. V. Mendez e Dírian Murgo pela compreensão, apoio, companheirismo, carinho, sobretudo pela amizade maravilhosa tão fundamental nos momentos difíceis, minha gratidão.*

*Aos Professores, funcionários e amigos, Prof. Dr. Aldo Brugnera, Profa. Dra. Fátima Zanin, Profa. Dra. Maricília Costa, Profa. Dra. Cristina Pacheco, Profa. Dra. Renata Nicolau, Profa. Dra. Ana Cristina Solis, Profa. Dra. Maria Aparecida N. Jardimi, Prof. Dr. Jarbas F. dos Santos, Profa. MSc. Janaína Duarte, Neide, Regina, Patrícia, Jamilice, Paula, Antonio, Ivone, Nídia, Valéria, Vanessa, Eunice, Marcos, Neila, Leandro, Fabrício, especialmente Prof. Dr. Egberto Munin por permitir a utilização do Laboratório de Experimentação animal e Prof. Dr. Landulfo Silveira Júnior pelo apoio e auxílio, na espectroscopia Raman.*

*Às amigas da Biblioteca (UNIVAP) Bibliotecárias Rosângela Cavalcanti, Conceição Fonseca, Rúbia Gravito Gomes e a auxiliar de biblioteca Ana Maria Felix, pelo carinho, apoio e atenção durante a elaboração deste trabalho.*

*À Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP) pelo espaço físico e suporte financeiro, às empresas DentFix® e Baumer®, pela doação dos materiais, todos tão essenciais para a realização deste trabalho.*

“Tudo o que a mente humana pode conceber  
pode conquistar ”

*W. Clement Stone*

“REPARAÇÃO ÓSSEA ASSOCIADA OU NÃO A FOTOBIMODULAÇÃO A LASER  
AVALIADA POR ESPECTROSCOPIA RAMAN NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO  
(ER-IVP)”

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar através da espectroscopia Raman no infravermelho próximo (ER-IVP) a concentração da Hidroxiapatita de Cálcio (HAC,  $\sim 958/960\text{cm}^{-1}$ ) presente no tecido ósseo em modelos animais após o uso ou não da fotobimodulação a Laser (infravermelho) em associação ou não com biomateriais, Regeneração óssea guiada (ROG) e implantes de Titânio. O reparo ósseo foi estudado na primeira fase ao redor de implante de Titânio (artigo 1 e 2) e na segunda fase em fratura cirúrgica (artigo 3), ambos em tibia de coelhos. Na primeira fase deste estudo após a cirurgia para colocação do implante, os animais foram divididos, em dois grupos, os controles e irradiados e estes animais foram sacrificados em 15, 30 e 45 dias após a cirurgia para serem analisados por espectroscopia Raman (IVP). Em 30 dias foram observadas diferenças significantes entre os grupos ( $p < 0.001$ ), sendo similar em 45 dias ( $p < 0.001$ ), como também sugere a MEV. A segunda parte deste estudo após a realização da fratura cirúrgica os animais foram divididos em quatro grupos: F (fio), FB (fio + Biomaterial), FBL (fio + Biomaterial + Laser) e FL (fio + Laser). Os animais foram sacrificados em 30 dias após a cirurgia, em seguida avaliados por espectroscopia Raman (IVP), na qual foi realizada na superfície e na profundidade da reparação. A análise estatística não demonstrou diferenças significantes entre os grupos tratados ( $p = 0,14$ ), porém na região da profundidade da fratura foram observadas diferenças significantes nos grupos FBL ( $p < 0,001$ ) e FL ( $p < 0,001$ ) e na superfície a diferença significativa foi observada apenas no grupo sem tratamento (osso normal;  $p = 0,001$ ). Concluiu-se que o uso da fotobimodulação a laser melhora o reparo ósseo ao redor dos implantes e quando associada aos biomateriais e ROG pode ser efetivo, na reparação óssea de fraturas resultando no aumento da deposição da HAC avaliada pela espectroscopia Raman (IVP).

Palavras-chave: Reparo ósseo; Fio de aço, Fotobimodulação a Laser e Espectroscopia Raman (IVP).

“NEAR INFRA-RED RAMAN SPECTROSCOPY STUDY OF THE BONE HEALING  
ASSOCIATED OR NOT TO THE LASER PHOTOBIMODULATION”

ABSTRACT

The aim of this study was to assess, through near-infrared Raman spectroscopy (NIRS), the incorporation of calcium hydroxyapatite (CHA;  $\sim 958/960\text{cm}^{-1}$ ) on the bone tissue in animal models associated or not to Laser photobiomodulation (infrared), biomaterials, guided bone regeneration (GBR) and dental implants. The bone healing was studied in the first phase around the dental implants (paper 1 and 2) and in the second phase it was studied in surgical fractures, both in the tibia of the rabbits. In the first phase the animals were divided into two groups (control and irradiated). The specimens were analyzed by Raman spectroscopy (NIR) after the sacrifice at 15, 30 and 45 days. The results showed significant differences in the concentration of CHA on irradiated and control specimens at both 30 and 45 days after surgery ( $p < 0.001$ ), as showed by Scanning Electronic Microscopy (SEM). The second phase was accomplished in the surgical fractures and the animals were divided into four groups: WO; WO + BMPs; WO + Lasertherapy; and WO + BMPs + Lasertherapy. Animal death occurred after 30 days. Raman spectroscopy was performed at both surface and depth of the fracture site. Statistical analysis showed significant difference on the concentrations of CHA between surface and depth. The analysis in each of the areas showed at the depth of the fracture, significant differences between all treatment groups ( $p < 0.0001$ ). Significant differences were also seen between WO + BMPs + Lasertherapy and WO ( $p < 0.001$ ) and WO + Lasertherapy ( $p < 0.001$ ). It is concluded that the use of NIR Lasertherapy improves the bone healing around the dental implants and surgical fracture when associated to BMPs and GBR as a result of the increasing deposition of CHA measured by Raman spectroscopy (NIR).

Key-word: Bone healing, Wire osteosynthesis:, Laser photobiomodulation and Raman spectroscopy (NIR).

## SUMÁRIO

<i>1 INTRODUÇÃO</i>	<i>10</i>
<i>2 OBJETIVO</i>	<i>17</i>
<i>3 RESULTADOS</i>	<i>18</i>
<i>3.1 Artigo Publicado</i>	<i>18</i>
<i>3.2 Artigo Publicado</i>	<i>19</i>
<i>3.3 Artigo Publicado</i>	<i>20</i>
<i>4 DISCUSSÃO</i>	<i>21</i>
<i>5 CONCLUSÕES</i>	<i>23</i>
<i>6 TRABALHOS FUTUROS</i>	<i>24</i>
<i>REFERÊNCIAS</i>	<i>27</i>
<i>ANEXO Comitê de Ética em Pesquisa</i>	<i>34</i>

# 1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo especializado que apresenta matriz orgânica intercelular mineralizada, células e líquido intersticial. Este tecido possui vascularização e inervação, apresentando uma estrutura altamente organizada com alta capacidade de regeneração.(1)

O tecido ósseo é classificado em compacto (externa) e o trabecular (interna). O osso compacto tem uma superfície sólida e o trabecular tem a aparência esponjosa, pois há espaços vazios preenchidos por células. Nos indivíduos jovens, a medula é vermelha devido a atividade hematopoética e nos indivíduos adultos é amarela devido a maior presença de adipócitos, mas com estímulos apropriados, esta medula amarela pode voltar a ser vermelha.(2)

As principais células que compõem o tecido ósseo são osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, porém as células mesenquimais são células osteoprogenitoras próximas aos vasos sanguíneos e ao periósteo. A matriz óssea é constituída por 33% de matriz orgânica, dos quais 28% é colágeno e os restantes 5% são proteínas não-colágenas. Dentre as proteínas não colágenas destacam-se: osteonectina, osteocalcina, proteoglicanas, sialoproteínas, glicoproteínas e fosfoproteínas.(3) Na matriz óssea também estão presentes lipídeos, fatores de crescimento e proteínas como: Imunoglobulinas, Albumina, Lisosima e Transferrina.(4)

As perdas ósseas são grandes problemas em muitas especialidades médicas e odontológicas. Estas podem ocorrer devido às condições fisiológicas (envelhecimento) e patológicas, por exemplo, traumas, lesões patológicas e procedimentos cirúrgicos. Portanto, é fundamental que os profissionais da área biomédica conheçam e possam alterar de maneira positiva, a fisiologia do tecido ósseo visando à correção dos defeitos maxilo-mandibulares. (5,6)

A Odontologia vem estudando métodos que visam restaurar o contorno normal; a função; o conforto; a estética e fonação. Atualmente uma alternativa que vem dando certo é a colocação dos implantes cilíndricos de titânio com posterior colocação das próteses dentárias.(7)

Várias pesquisas demonstram uma boa aceitação dos materiais empregados para a confecção dos implantes, que devem ser biocompatíveis com os tecidos, pois o sucesso vai depender da interação implante-tecido. (8)

A formação óssea na interface osso-implante é um processo fisiológico, regulado por hormônios e fatores locais produzidos pelas células ósseas. Isto envolve eventos sequenciais de adesão celular, proliferação, diferenciação e deposição da matriz óssea. (9)

Diversos estudos *in vivo* e *in vitro* têm sido realizados com a finalidade de avaliar a biocompatibilidade do tecido ósseo com o Titânio. Assim, têm sido observados resultados positivos, sugerindo aumento da taxa de crescimento ósseo, diferenciação e proliferação celular com aumento da Fosfatase alcalina e formação de nódulos ósseos. (10,11,12)

Com finalidade de obter qualidade no resultado após a colocação dos implantes de titânio, contenção de fraturas com fios de aço (semi-rígida) e miniplacas de titânio (rígida) é fundamental obter um excelente processo de cicatrização óssea ao redor desses materiais. (13,14,15)

No tratamento de fraturas ósseas, diversas técnicas de fixação buscam atingir o maior número de requisitos básicos para que as imobilizações cumpram suas finalidades, quais sejam de propiciar a recuperação das feridas, evitando a presença de elementos estranhos que possam proporcionar uma irritação e infecção local. Além de permitir um conforto ao paciente, ser prático, eficiente, deve ser acessível ao maior número de cirurgiões possíveis. (16)

Dentre os diversos métodos de tratamento como a imobilização e fixação, são encontradas as talas gessadas, sondas infláveis, odontossínteses, arcos vestibulares, imobilização maxilo-mandibular, goteiras, bandagens, mentoneiras, capacetes, máscara de *De Lair*, fixação externa, fios de Kirschner, amarra circunferencial, suspensões, além das osteossínteses.

Até a década de 70, fraturas simultâneas na porção média da face eram tratadas através da fixação de pinos extra-orais. (17) O fio de aço é um material tradicional usado para fixação de fraturas porque é um material biocompatível, rígido, que além de permitir um reposicionamento preciso dos fragmentos ósseos é de fácil uso e com custo baixo. (18)

O tratamento de fraturas tem avançado significativamente ao longo dos anos devido ao conhecimento melhorado sobre os princípios biomecânicos e os avanços nos biomateriais e instrumentação.(19)

Atualmente sabe-se que o sucesso do implante de Titânio e da redução de fraturas ósseas depende da qualidade da cicatrização do tecido ósseo. A cicatrização óssea apresenta eventos similares à cicatrização em tecidos moles, porém, ocorre de maneira mais lenta, isto ocorre devido à morfologia e composição do tecido ósseo.

A cicatrização óssea requer etapas consecutivas que dependem do tipo, intensidade, e extensão do dano ósseo.(6)

Segundo MARSH e LI a cicatrização de uma fratura em osso longo pode ser descrita em quatro fases, são elas:

- Formação do hematoma (fase inflamatória ou de granulação): plaquetas ativadas liberam uma variedade de produtos, incluindo a fibronectina, fatores de crescimento derivados de plaquetas, e fatores de crescimento transformadores, os quais estimulam o influxo de células inflamatórias. A cascata de citocinas subsequente atrai as células de reparo (fibroblastos, células endoteliais e osteoblastos) para a região da fratura.
- Formação do calo frágil (fase proliferativa): caracterizada pela formação de tecidos conjuntivos, incluindo cartilagem, e formação de novos capilares de vasos pré-existentes (angiogênese).
- Formação do calo rígido (fase de maturação): conduz a formação de osso novo, tanto diretamente de tecido mesenquimal (intramembranoso) ou via um estágio intermediário de cartilagem (endocondral). Os osteoblastos podem formar osso novo rapidamente, mas este é organizado ao acaso e mecanicamente fraco.
- Fase remodeladora: o osso neoformado é remodelado em osso lamelar mais resistente pela ação organizada dos osteoclastos na reabsorção óssea e pela formação óssea pelos osteoblastos.(20)

A reparação óssea pode não ocorrer se o suplemento sanguíneo for deficiente, se houver instabilidade mecânica ou competição com tecidos de alta proliferação.(5)

Com a finalidade de melhorar a reparação óssea são utilizados diversos materiais, por exemplo: osso bovino orgânico e inorgânico, membrana óssea cortical desmineralizada,

Hidroxiapatita de Cálcio (HAC) e Proteínas Morfogenéticas Ósseas (BMPs). Estes materiais podem ser usados isoladamente ou associados.(5,6, 21,22)

A matriz óssea desmineralizada (MOD) é o um enxerto de osso cortical desmineralizado. Este possui propriedade osteocondutiva devido à presença de fatores de crescimento em sua composição. Dentre os fatores de crescimento, as proteínas ósseas morfogenéticas apresentam um potencial osteoindutor maior.(23)

A diferenciação osteogênica das células ósseas é estimulada pelas BMPs, estas são expressas durante o desenvolvimento embriogênico e pós-natal. Ou seja, locais onde estão ocorrendo a remodelação óssea é necessário utilizar juntamente com carreadores, a fim de obter melhor efeito biológico.(24,25)

Estudos indicam que a BMP (Gen-pro®) não apresenta efeito citotóxico promovendo proliferação celular, restabelecimento da cortical na fratura e no tratamento de defeitos ósseos.(23,24,26)

Em estudos *in vitro* e *in vivo* com a BMP endógena e exógena na formação óssea sob condições patológicas e fisiológicas, os autores observaram que ambas BMPs colaboraram com a formação óssea .(27)

Atualmente são realizadas associações de diferentes materiais com o objetivo de aumentar a qualidade da reparação óssea.

A Regeneração óssea guiada (ROG) é uma técnica que auxilia através de uma membrana a reparação óssea, ou seja, guiando e controlando mecanicamente a regeneração tecidual impedindo o crescimento do epitélio e do tecido conjuntivo, permitindo o preenchimento desse espaço por células ósseas alveolares provindas do ligamento periodontal (23).

Estudos anteriores demonstraram que os benefícios observados com o uso dos biomateriais e da ROG podem ser otimizados através da fotobiomodulação a laser.

A fotobiomodulação a laser pode ser usada para descrever intervenções não invasivas envolvendo a luz terapêutica, por exemplo, situações envolvendo tecido cutâneo e subcutâneo para reparação tecidual, acupuntura baseada na luz e irradiação transcutânea para alívio da dor. A fotobiomodulação pode ser apropriada para descrever irradiação *in vitro* de culturas celulares e tecidos. (28)

Os efeitos da fotobiomodulação a laser são do tipo fotoquímico e fotofísico.(29) O efeito fotoquímico (luz visível) provoca reações químicas na célula. O efeito fotofísico e/ou fotoelétrico (luz infravermelho) provoca mudanças nos potenciais de membrana que se traduzem intracelularmente com um incremento da síntese de ATP. Os incrementos de ATP mitocondrial favorecem um grande número de reações químicas presentes no metabolismo celular. (30)

A energia laser excita as porfirinas e os cromóforos intracelulares e estes promovem um aumento da atividade celular, aumentando a concentração da Fosfatase Alcalina, ocorrendo a liberação de cálcio (31).

Vários estudos demonstram a fotobiomodulação em tecido duros utilizando o Laser infravermelho (IV), devido à alta capacidade de penetração nos tecidos, mas este deve ocorrer nos estágios iniciais da reparação (32,33), além disso, é importante observar a dose de irradiação, o tempo e o modo de irradiação.(5)

Os efeitos gerados pela fotobiomodulação a Laser são fotoestimuladores devido ao aumento do metabolismo celular, quimiotaxia e vascularização. A fotobiomodulação a Laser acelera em curto prazo a síntese de ATP em longo prazo a transcrição e a replicação do DNA.(29) Além disso, pode promover aumento na formação do nódulo ósseo e aumento na expressão do gene para Fosfatase alcalina (33,34,35), síntese de colágeno (36) e produção de fatores de crescimento como fator de crescimento queratinócito (FCQ), fator de crescimento de transformação (FCT) e fator de crescimento derivado de plaquetas (FCDP) (37), diminuição da dor devido ao aumento da liberação de  $\beta$ -endodorfina, promovendo um efeito analgésico e aumento da histamina seguida da vasodilatação e atuação na via de síntese das prostaglandinas inibindo a ação da enzima Cicloxigenase, promovendo assim efeito antiinflamatório (38).

A fotobiomodulação a laser foi usada com sucesso no processo de cicatrização óssea em diferentes procedimentos clínicos, como exodontia (33,39,40,41), desordens da ATM (42,43), tratamento ortodôntico e cirurgias ortognáticas (33,41).

Estudos em cicatrização óssea também observaram maior vascularização e um arranjo lamelar mais compacto ao redor de implantes dentários em cães irradiados com laser (44), assim como o efeito positivo na adesão e proliferação de fibroblastos gengivais

humanos cultivados sob discos de Titânio (9) e também efeitos estimulatórios em teste biomecânico em fêmur de ratas ovariectomizadas. (45)

Atualmente o sucesso na reparação óssea vem sendo observado com a associação dos biomateriais e ROG com a fotobiomodulação a laser (IV).

Em estudos *in vivo* realizados anteriormente na cicatrização óssea associaram osso bovino inorgânico (Gen-ox®), membrana cortical descalcificada (Gen-derm®) e fotobiomodulação a laser (IV). Observaram abundante produção de colágeno, aumento da neoformação óssea (46,47), melhora na quantidade de fibras colágenas nos estágios iniciais (15 dias) e aumento na quantidade de tecido ósseo trabecular organizado no período de 30 dias quando comparado ao controle. (22)

Em outro estudo também observaram efeito biomodulador positivo na reparação óssea associada ao enxerto ósseo autógeno quando o laser (IV) foi aplicado no trans-operatório.(6)

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, MEV, Raio X e tomografia. E atualmente também pode ser utilizada a espectroscopia Raman (IVP) na avaliação tecidual.

A Espectroscopia Raman (IVP) foi proposta por Chandrasekhara Venkata Raman, na Índia, em 1928. O efeito Raman descreve um processo fundamental em que a energia é trocada entre a luz e a matéria. Quando a luz interage com a substância ela pode ser espalhada ou absorvida, grande parte dessa luz é espalhada mantendo a mesma frequência da luz incidente (espalhamento elástico). Contudo, uma pequena fração da luz incidente poderá ser espalhada com frequências diferentes devido às energias vibracionais das moléculas no material. Visto que a energia é proporcional à frequência, a mudança na frequência da luz espalhada deve ser igual à frequência vibracional da molécula. Este processo de troca de energia entre vibrações moleculares e luz incidente é o efeito Raman (48,49)

O espectro Raman traz consigo informações das vibrações das ligações químicas dos diversos grupos moleculares. Como as bandas de vibração são únicas e específicas, estreitas e sensíveis à variação da estrutura molecular, diferenças que dependem do grupo molecular analisado podem ser facilmente identificadas. O espectro Raman é como uma

impressão digital da molécula, fornecendo informação bioquímica específica, não encontrada em outras técnicas óptica. (49)

A espectroscopia Raman no infravermelho próximo (ER-IVP) é uma técnica que permite investigar diversos fenômenos, materiais e substâncias, por exemplo, ácido lático (50), câncer (51), materiais odontológicos (52,53) e tecidos dentais (54), diagnóstico de arteriosclerose.(49,55)

Vários estudos *in vivo* e *in vitro* são realizados com a finalidade de monitorar o sinal  $960\text{cm}^{-1}$ , que indica compostos inorgânicos causado pela vibração do  $\text{PO}_4^{-3}$  da HAC, presente no tecido ósseo e em diversos biomateriais. No tecido ósseo este sinal indica o processo de desmineralização e remineralização, pois o objetivo é definir as mudanças na estrutura química que acompanham as patologias ósseas e no diagnóstico da biocompatibilidade de vários materiais assim como também no diagnóstico precoce de doenças. (56, 57, 58)

Atualmente, alguns estudos utilizaram o efeito Raman na avaliação de diferentes formas da HAC, ou seja, na biocompatibilidade de materiais sintéticos (57), na análise quantitativa da HAC e colágeno (COL) em processos de desmineralização artificial em osso *in vitro*.(59) Foram realizados estudos na mineralização normal e patológica *in vivo* e *in vitro*, nos quais foram avaliados os componentes orgânicos e inorgânicos do tecido ósseo e a sua relação com o estágio de mineralização óssea (60).

O osso trabecular de coelhos também foi estudado com o objetivo de fornecer informações sobre os constituintes orgânicos e inorgânicos, além de promover informação sobre a relação entre esses dois constituintes ósseos (61).

Em um estudo foi realizada a monitorização das mudanças ósseas e foram demonstradas alterações na distribuição do mineral e nas propriedades da matriz em tecidos que foram feitos biópsias.(58)

Através da espectroscopia Raman (IVP) também foi verificado que a cerâmica de fosfato de Cálcio utilizada na regeneração óssea guiada não é citotóxica.(62) Assim como a fotobiomodulação a laser também promove melhora no reparo ósseo devido ao aumento da HAC como foi observada com a espectroscopia Raman (IVP) realizada em defeitos ósseos em ratos tratados com laser.(63)

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo Geral**

O objetivo deste estudo foi avaliar através da espectroscopia Raman (ER-IVP) a concentração da Hidroxiapatita de Cálcio (HAC,  $\sim 958/960\text{cm}^{-1}$ ) presente no tecido ósseo, em modelos animais após o uso ou não da fotobiomodulação a Laser (infravermelho) em associação ou não com biomateriais, Regeneração óssea guiada (ROG) e implantes de Titânio.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- O objetivo do primeiro estudo foi avaliar através da espectroscopia Raman (IVP) a incorporação da HAC ( $\sim 958/960\text{cm}^{-1}$ ) no tecido ósseo ao redor dos implantes dentais de Titânio inseridos em tibia de coelho após fotobiomodulação a laser (IV).
- O objetivo do segundo estudo foi avaliar através da espectroscopia Raman (IVP) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), a incorporação da HAC ( $\sim 958/960\text{cm}^{-1}$ ) e a qualidade da cicatrização no reparo ósseo ao redor do implante dental de Titânio inserido em coelho após fotobiomodulação a laser (IV).
- O objetivo do terceiro estudo foi avaliar com a espectroscopia Raman (IVP) a incorporação da HAC ( $\sim 958/960\text{cm}^{-1}$ ) no tecido ósseo fraturado de tibia de Coelho tratado com fixação interna semi-rígida associada ou não a fotobiomodulação a laser (IV) com ou não o uso de biomateriais e Regeneração óssea guiada (ROG).

## **3 RESULTADOS**

### **3.1 Artigo Publicado**

LOPES, CB et. al. IR Laser Light Reduces Loading Time of Dental Implants: A Raman Spectroscopic study. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.23, n.1, p.27-31, 2005.

### 3.2 Artigo Publicado

LOPES, C. B. et al. Infrared Laser Photobiomodulation ( $\lambda$ 830 nm) on Bone Tissue Around Dental Implants: A Raman Spectroscopy and Scanning Electronic Microscopy Study in Rabbits. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 25, n. 2, p. 96–101, 2007. DOI: 10.1089/pho.2006.2030.

### **3.3 Artigo Publicado**

LOPES, C. B. et al. The Effect of the Association of NIR Lasertherapy BMPs, and Guided Bone Regeneration on Tibial Fractures Treated with Wire Osteosynthesis: Raman Spectroscopy Study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 89, p. 125-130, **2007**. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2007.09.011.

## 4 DISCUSSÃO

A motivação principal deste estudo foi em relação ao tempo e a qualidade da reparação óssea, visto que estudos anteriores demonstraram sucesso do uso da fotobiomodulação a Laser em lesões ósseas. Porém, esta área apresenta controversa, pois alguns estudos apresentam resultados conflitantes.

Portanto, é necessário se identificar os melhores parâmetros a serem utilizados na prática clínica. (1,5,6,22,46,47)

Outro fato relevante deste estudo é a seleção do método de avaliação do tecido ósseo. A espectroscopia Raman (IVP) permite avaliação molecular da amostra, sem preparo prévio elaborado da amostra e que já foi utilizada com sucesso anteriormente neste tecido pelo nosso grupo e por outro.(1,49,64)

Neste estudo foram utilizados coelhos machos adultos jovens em fase de crescimento, para evitar a interferência de fatores como climatério e idade. A utilização de coelhos para estudo da remodelação óssea também é freqüente, uma vez que as respostas do tecido ósseo destes mamíferos às injúrias se assemelham às encontradas em humanos. (1,44,65)

O tecido ósseo possui boa capacidade regenerativa conseguindo restaurar as propriedades mecânicas e estruturais, porém alguns cuidados devem ser respeitados durante o processo de reparação, tais como o suprimento sanguíneo, estabilidade mecânica e a ausência de outros tecidos com alta atividade proliferativa. (5)

Até o presente momento, poucos trabalhos mostraram a utilização da espectroscopia Raman na cicatrização óssea associada a fotobiomodulação a laser, sendo que os trabalhos iniciais publicados em revistas internacionais foram realizados pelo nosso grupo (1,66,67).

Neste trabalho existem dois aspectos que podem ser analisados a luz dos resultados obtidos através do uso de três modelos experimentais, nos quais, uma técnica única (espectroscopia Raman no infravermelho próximo) foi utilizada para avaliar o reparo ósseo quantificando-se as concentrações da HAC em tecido ósseo submetido ou não a fotobiomodulação a laser (infravermelho) (1,66,67).

O modelo descrito no primeiro estudo (artigo 1), mostrou que a análise por espectroscopia Raman (IV), foi eficaz na detecção de diferenças entre o tecido ósseo irradiado e não irradiado ao redor de implante de Titânio. Os resultados deste estudo mostraram diferenças significantes na concentração da HAC entre os animais irradiados e o controle, ou seja, nos períodos avaliados de 30 e 45 dias após a cirurgia ( $p < 0,001$ ).

No segundo estudo (artigo 2), foram avaliadas duas regiões do tecido ósseo ao redor de implantes (terço médio e apical) e estes dados foram também avaliados através de outro método de avaliação, a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A MEV também evidenciou diferenças significantes entre o tecido ósseo irradiado e não irradiado. Os resultados em ambos os terços do implante (médio e inferior) demonstraram diferenças significantes na concentração da HAC entre os animais irradiados e o controle, ou seja, em ambos os períodos avaliados 30 e 45 dias após a cirurgia ( $p < 0,001$ ). Assim, podemos sugerir que a MEV demonstra, de forma qualitativa, os resultados obtidos através da espectroscopia Raman.

Em ambos trabalhos (artigo 1 e 2) é possível evidenciar uma redução em 30% no tempo de reparação óssea, pois foi obtida no grupo irradiado com 30 dias uma concentração de HAC similar a 45 dias após a cirurgia, pois este é um período muito próximo ao tempo necessário para estabilização do implante em coelho é 42 dias após a cirurgia, em condições normais de reparação.

No terceiro estudo foram utilizados modelos de trauma ósseo associados ou não ao uso de biomateriais e Regeneração Óssea Guiada (RGO) submetidos à fotobiomodulação a laser, obtendo-se resultados significantes sob a efetividade de ambos os métodos de detecção (Raman) e de tratamento (fotobiomodulação a laser). Foram observadas diferenças significantes ( $p < 0,0001$ ) entre todos os grupos na região da profundidade da fratura. Ainda na profundidade da fratura foram observadas diferenças entre o grupo fio + BMP+ Laser e o grupo fio ( $p < 0,001$ ) e fio + Laser ( $p < 0,001$ ). Na região da superfície diferenças significantes foram observadas entre os grupos tratados e o osso normal (sem fratura) ( $p = 0,0001$ ), também não foram observadas diferenças entre os grupos tratados ( $p = 0,14$ ). É importante considerar que na profundidade da fratura, ou seja, no tecido ósseo trabecular há maior número de células ósseas e entre elas as células osteoprogenitoras, sendo assim estas são mais efetivas a ação da fotobiomodulação a laser.

## 5 CONCLUSÕES

A avaliação dos resultados obtidos nos permite concluir que a fotobiomodulação a laser (IV) associada a biomateriais e ROG melhorou a cicatrização óssea ao redor de implante e em fraturas óssea de acordo com os resultados obtidos pela espectroscopia Raman (IVP) que demonstrou aumento na deposição da HAC (~958/960cm<sup>-1</sup>).

- A fotobiomodulação a laser (IV) melhorou a reparação óssea periimplantar como pode ser demonstrado pelo aumento da deposição da HAC mensurado pela espectroscopia Raman (IVP).
- O uso da fotobiomodulação a laser demonstrou efetividade na melhora da reparação óssea ao redor do implante devido ao aumento na deposição da HAC através da espectroscopia Raman (IVP) e MEV.
- O uso da fotobiomodulação a laser (IV) associada a biomateriais e ROG melhorou a cicatrização óssea em fraturas ósseas devido ao aumento na deposição da HAC monitorada pela espectroscopia Raman (IVP).

## 6 TRABALHOS FUTUROS

- Pesquisar outros picos Raman no espectro do tecido ósseo que podem estar relacionados com o reparo ósseo, além da inflamação e angiogênese.
- Pesquisar outras técnicas de diagnóstico óptico (Fluorescência) com a finalidade de obter uma aplicabilidade clínica.
- Correlacionar a cicatrização óssea associada a fotobiomodulação a laser avaliada pela espectroscopia Raman com outras técnicas de diagnóstico convencional.
- Metanálise sobre fotobiomodulação a laser associada ao tecido ósseo e espectroscopia Raman.
- Monitoramento *in vivo* da HAC no tecido ósseo.

## REFERÊNCIAS

- (1) LOPES, CB et. al. IR Laser Light Reduces Loading Time of Dental Implants: A Raman Spectroscopic study. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.23, n.1, p.27-31, 2005.
- (2) ROSS, M. H.; REITH, E. J.; ROMRELL, L J. **Histologia: Texto e atlas**. São Paulo: Panamericana, 1993.
- (3) PINHEIRO, ALB et al. A Laserterapia Não-cirúrgica em Implantodontia. In: **Implantes Osseointegrados – Técnica e Arte**. São Paulo: Editora Santos, 2002.
- (4) NOCITI Jr, F. H. **Implante de titânio em fêmur de coelho: Avaliação histológica e radiográfica dos fenômenos envolvidos**. Piracicaba, 1994. Dissertação (Mestrado em Biologia e Patologia Buco-Dental - Área de concentração de Patologia). Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp.
- (5) PINHEIRO, A. L. B. ; GERBI, M. E. Photoengineering of bone repair processes. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, n. 2, p.169-178, 2006.
- (6) WEBER, J. B. B. et al. Laser therapy improves healing of bone defects submitted to autologous bone graft. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, n. 1, p. 38-44, 2006.
- (7) ALBREKTSSON, T. et al. Osseointegrated Oral Implants: A Swedish Multicenter Study of 8139 Consecutively Inserted Nobelpharma Implants. **Journal of Periodontology**, p.287-296, 1987.
- (8) HANSSON, H A.; ALBREKTSSON, T.; BRANEMARK, P.I. Structural aspects of the interface between tissue and titanium implants. **Journal of Prosthetics Dentistry**, v.50, n.1, 1983.
- (9) KHADRA, M. et al. Laser therapy accelerates initial attachment and subsequent behaviour of human oral fibroblasts cultured on titanium implant material. **Clinical oral implants research**, v.16, p. 168-175, 2005.
- (10) ROSA, A. L.; BELOTI, M. M. Rat bone marrow cell response to titanium and titanium alloy with different surface roughness. **Clinical oral implant research**, v. 14, p. 43-48, 2003.
- (11) MAEZTU, M. A; ALAVA, J. I.; GAY-ESCOBAR, C. Ion implantation: surface treatment for improving the bone integration of titanium and Ti6Al4V dental implants. **Clin. Oral Impl. Res**, v. 14, p. 57–62, 2003.

- (12) GAN, L. et al. Calcium phosphate sol-gel derived thin films on porous-surfaced implants for enhanced osteoconductivity Part II: Short-term in vivo studies. **Biomaterials**, v. 25, p. 5313-5321, 2004.
- (13) CHRITAH, A.; LAZOW, S. K.; BERGER, J. R. Transoral 2.0mm locking miniplate fixation of mandibular fractures plus 1 week of maxillomandibular fixation: a prospective study. **Journal oral maxillofacial surgery**, v. 63, n.12, p.1737-41, 2005.
- (14) ALPHA, C. et al. The incidence of postoperative wound healing problems following sagittal ramus osteotomies stabilized with miniplates and monocortical screws. **Journal oral maxillofacial surgery**, v. 64, n. 4, p. 659-68, 2006.
- (15) ERDOGAN, Ö. et al. Effects of Low-Intensity Pulsed Ultrasound on Healing of Mandibular Fractures: An Experimental Study in Rabbits. **American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**, v. 64, p.180-188, 2006.
- (16) MARZOLA, C. **Técnica Exodôntica**. 3.ed. São Paulo: Pancast, 2000.
- (17) ROWE, N. L. ; KILLEY, G. C. **Fractures of the facial skeleton** London: Livingston 1970.
- (18) BROADDUS, W. C. et al. Titanium miniplates or stainless steel wire for cranial fixation: a prospective randomized comparison. **Journal of Neurosurgery**, v. 96, n. 2, p. 244-7, 2002.
- (19) FERNANDEZ, J. R. et al. A three-dimensional numerical simulation of mandible fracture reduction with screwed miniplates. **Journal of Biomechanics**, v. 36, n. 3, p. 329-337, 2003.
- (20) MARSH, D. R. e LI, G. The biology of fracture healing: optimising outcome. **British Medical Bulletin**, v. 55, n. 4, p. 856-869, 1999.
- (21) ROCHKIND, S. et al. Molecular structure of the bony tissue after experimental trauma to the mandibular region followed by laser therapy. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 22, n. 3, p. 249-253, 2004.
- (22) GERBI, M. E. et al. Assessment of bone repair associated with the use of organic bovine bone and membrane irradiated at 830nm. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 23, n. 4, p. 382-388, 2005.
- (23) GUIMARÃES, M. C. M. et. al. Pool of Bovine Morphogenetic proteins and guided tissue regeneration in the treatment of intrabony periodontal defects. I-clinical measurements. **Journal Applied Oral Science**, v.12, n. 1, p. 70-77, 2004.
- (24) VIANA, R. I. **Estudo in vitro da citocompatibilidade do pool de BMP conjugado à hidroxiapatita utilizado como ósseoindutor**. Campinas, 2003. Dissertação (Mestrado em

Biologia Molecular e Fisiológica). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas - Unicamp.2003.

(25) REINHARD, G. et. al. Proliferation and Osteogenic Differentiation of Cells from Cortical Bone Cylinders, Bone Particles from Mill, and Drilling Dust. **Journal Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 63, p. 238-243, 2005.

(26) LIMA, A. F. M. et al. Aspectos radiográficos e densitométricos na consolidação de fraturas tratadas por proteínas morfogenéticas ósseas em rádio de coelhos. **Brazilian journal of veterinary research and animal science**, v. 41, n. 6, p. 416-422, 2004.

(27) KUGIMIYA, F. et al. Involvement of endogenous bone morphogenetic protein (BMP)2 and BMP6 in bone formation. **The journal of biological chemistry**, v. 280, n. 42, p. 35704-35712, 2005.

(28) ENWEMEKA, C. M. Evidence-based photomedicine. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 23, p.353.

(29) MORAES, V. et. al;. Effect of low level laser therapy on the viability and proliferation of human primary bone cells. **Brazilian Dental Journal**, v.15, p.87, 2004.

(30) RIGAU, J. **Acción de la luz láser a baja intensidad en la modulación de la función celular**. 1996. 211f Tese (Doutorado em Medicina). Universitat Rovira i Virgili.

(31) FREITAS, I. G. F.; BARANAUSKAS, V.; CRUZ-HÖFLING, M. A. Lasers effects on osteogenesis. **Applied Surface Science**, v.154-155, p.548-554, 2000.

(32) PINHEIRO, A. L. B. et al. Biomodulatory effects of LLLT on Bone Regeneration . In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON NEAR-FIELD OPTICAL ANALYSIS: PHOTODYNAMIC THERAPY & PHOTOBIOLOGY EFFECTS, 2., 2002, Houston, Tx.. **Proceedings...**[s.l.]: National Aerospace Agency, 2001. v. 2. p. 14-22.

(33) UEDA, Y. ; SHIMIZU, N. Effects of pulse frequency of low level laser therapy (LLLT) on bone nodule formation in rat calvarial cells. **Journal of clinical laser medicine** , v. 21, n. 5, p. 271-277, 2003.

(34) YAAKOBI, T.; MALTZ, L.; ORON, U. Promotion of bone repair in the cortical bone of the tibia in rats by low energy laser (He-Ne) irradiation. **Calcified Tissue International**, v.59, n. 4, p. 297-300, 1996.

(35) NISSAN, J. et al. Effect of low intensity laser irradiation on surgically created bony defects in rats. **Journal of oral rehabilitation** v. 33, p. 619-624, 2006.

(36) CONLAN, M. J.; RAPLEY, J. W.; COBB, C. M. Biostimulation of Wound healing by low-energy laser irradiation. A review. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 23, p. 492-496, 1996.

- (37) DESMET, K D. et al. Clinical and experimental applications of NIR-LED photobiomodulation. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, n. 2, p. 121-128, 2006.
- (38) MERLI, L A S. et al. Effect of low intensity laser irradiation on the processo f boné repair. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 23, n. 2, p. 212-215, 2005.
- (39) ROYNESDAL A. K. et al. The effect of soft-laser application on postoperative pain and swelling. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.22, p. 242-245, 1993.
- (40) KUCEROVÁ, H. et al. Low-level laser therapy after molar extraction. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, v. 18, n. 6, p. 309-315, 2000.
- (41) UEDA, Y. e SHIMIZU, N. Pulse irradiation of low power laser stimulates bone nodule formation. **Journal of Oral Sciences**, v. 43, p. 1, p. 55-60, 2001.
- (42) PINHEIRO, A. L. B. et al. Low-Level Laser Therapy in the Management of Disorders of the Maxillofacial Region. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, v.15, n. 4, p. 181-183, 1997.
- (43) PINHEIRO, A. L. B. et al. *Is LLLT Effective in the Management of TMJ Pain?* In: **SPIE Conference on Laser in Dentistry V**, San Jose, California, 1999, January, v. 3593, p. 44-48.
- (44) OLIVEIRA, M. A. M. **Efeito da radiação laser não cirúrgica na bioestimulação óssea pós- implante: Análise com Microscopia Eletrônica de Varredura**. 1999. Monografia (Especialização em Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial) Universidade Federal de Pernambuco.1999.
- (45) RENNO, A. C. M. et al. Effects of 830nm laser, used in two doses, on biomechanical properties of osteopenic rat femora. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, n. 2, p. 202-206, 2006.
- (46) PINHEIRO, A. L. B. et al. Effect of 830 nm Laser Light on Repair of Bone Defects Grafted with Organic Bovine Bone and Decalcified Cortical Osseous Membrane. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, v. 21, p. 383 - 388, 2003.
- (47) PINHEIRO, A. L. B. et al. Effect of low level laser therapy on the repair of boné defects grafted with inorganic bovine boné. **Brazilian Dental Journal**, v. 14, n. 3, p. 177-181, 2003.
- (48) HANLON, E. B. et al. Prospects for *in vivo* Raman spectroscopy. **Physics in Medicine and Biology**, v. 45, p. R1 -R59, 2000.

- (49) SILVEIRA-JUNIOR, L. Near infrared Raman spectroscopy of Human coronary arteries: Histopathological classification based on Mahalanobis distance. **Journal of Clinical Laser medicine and Surgery**, v. 21, n. 4, p. 203-208, 2003.
- (50) PILOTTO, S. et al. Analysis of near-infrared Raman spectroscopy as a new technique for transcutaneous non-invasive diagnosis of blood components. **Lasers in Medical Science**, v. 16, n. 1, p. 2-9, 2001.
- (51) OLIVEIRA, A. P. et al. Near-infrared Raman spectroscopy for oral carcinoma diagnosis. **Photomedicine and laser surgery**, v. 24, n. 3, p. 348-353, 2006.
- (52) SOARES, L.E.S., MARTIN, A. A., PINHEIRO, A. L. B. Degree of Conversion of Composite Resin: A Raman Study. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 21, n. 6, p. 357-362, 2003.
- (53) SOARES, L. E. S. et al. Vicker's hardness and Raman spectroscopy evaluation of a dental composite cured by an argon laser and a halogen lamp. **Journal of Biomedical Optics**, v. 9, n. 3, p. 601-608, 2004.
- (54) SOARES, L. E. S. et al. Fourier Transform Raman Spectroscopy study of human dentin irradiated with Er:YAG laser. **SPIE, Laser in Dentistry XI**, Bellingham, WA, January v. 5687, p. 157-162, 2005.
- (55) NOGUEIRA, G. V. Raman spectroscopy study of atherosclerosis in human carotid artery. **Journal of Biomedical Optics**, v. 10, n. 3, p. 031117-1 - 031117-7, 2005.
- (56) OTTO, C. et al. Applications of Micro-Raman Imaging in Biomedical Research. **Journal of Raman Spectroscopy**, v.28, p. 143-150, 1997.
- (57) CARDEN, A.; MORRIS, M. D. Application of vibrational spectroscopy to the study of mineralized tissues (review). **Journal of Biomedical Optics**, v. 5, n. 3, p. 259-268, 2000.
- (58) BOSKEY, A. L. et al. Comparison of mineral quality and quantify in iliac crest biopsies from high-and low-turnover osteoporosis: an FT-IR microspectroscopic investigation. **Osteoporos International**, v. 16, n. 12, p. 2031-2038, 2005.
- (59) KONTOYANNIS, C. G. e VAGENAS, N.V. FT-Raman Spectroscopy: A tool for monitoring the demineralization of bones. **Applied Spectroscopy**, v. 54, n. 11, p. 1605-1609, 2000.
- (60) MORRIS, M. D. et. al. Early mineralization of normal and pathologic calvaria as revealed by Raman spectroscopy. In: **SPIE Biomedical Vibrational Spectroscopy II**, San Jose, California. 2002, January, v. 4614, p. 28-39.
- (61) PENEL, G. et al. Composition of bone and apatitic biomaterials as revealed by intravital Raman microspectroscopy. **Bone**, v. 36, p. 893-901, 2005.

(62) NAVARRO, M. et al. New macroporous calcium phosphate glass ceramic for guided bone regeneration. **Biomaterials**, v. 25, p. 4233-4241, 2004.

(63) NICOLAU, R. A. **Efeito do laser de baixa potência (As-Ga-Al) em tecido ósseo de rato submetido à lesão, analisado por histomorfometria óssea**. 2001. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica), Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP. 2001..

(64) SCHRADER B. et al. NIR FT Raman-Spectroscopy In Medical Diagnosis. **Journal Of Molecular Structure**, v. 348, p. 293-296, 1995.

(65) SCHENK, R. K. Regeneração óssea bases biológicas. In: BUSER, D; DAHLIN, C; SCHENK, RK. **Regeneração Óssea Guiada na Implantologia**. São Paulo: Quintessence Books. 1996.

(66) LOPES, C. B. et al. Infrared Laser Photobiomodulation ( $\lambda$ 830 nm) on Bone Tissue Around Dental Implants: A Raman Spectroscopy and Scanning Electronic Microscopy Study in Rabbits. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 25, n. 2, p. 96–101, 2007.

(67) LOPES, C. B. et al. The Effect of the Association of NIR Lasertherapy BMPs, and Guided Bone Regeneration on Tibial Fractures Treated with Wire Osteosynthesis: Raman Spectroscopy Study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 89, p. 125-130, 2007.

## ANEXO – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVAP

### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVAP

#### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n.º A003/2006/CEP, intitulado “*Avaliação da cicatrização óssea em fraturas com ou sem perda de substância, provocadas em tibia de coelhos e mantidas com fixação rígida ou semi-rígida tratadas com ou sem laserterapia, biomateriais*”, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Antonio Luiz B. Pinheiro, está de acordo com a Lei 11977/2005 (SP), os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA/1991), e as Normas Para a Prática Didático-Científica da Vivisseção de Animais (Lei 6638/1979) sendo, portanto, aprovado por esta Comissão de Ética em Pesquisa.

Informamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação.

São José dos Campos, 11 de abril de 2006.



PROF. DR. LANDULFO SILVEIRA JUNIOR  
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVAP