

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

VITOR LEÃO CASALECHI

AVALIAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA RAMAN DO EFEITO DO LASER (790 nm)
EM REPARO DE DEFEITOS ÓSSEOS

São José dos Campos, SP.

2009

Vitor Leão Casalechi

**AVALIAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA RAMAN DO EFEITO DO LASER (790 nm)
EM REPARO DE DEFEITOS ÓSSEOS**

Dissertação apresentada no Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica, como complementação dos créditos necessários para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientadora: Prof^a Dr^a Renata Amadei Nicolau

São José dos Campos, SP

2009

C33a

Casalechi, Vitor Leão

Avaliação por espectroscopia Raman do efeito do laser (790 nm) em reparo de defeitos ósseos Vitor Leão Casalechi. Orientadores: Profª.Dra.Renata Amadei Nicolau. São José dos Campos, 2009.

1 Disco laser; color

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2009

1. Regeneração tecidual dirigida 2. Ossos 3. Terapia a laser de baixa potência 4. Análise espectral Raman I. Nicolau, Renata Amadei. Orient. II. Título

CDU: 616.71-043.96

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

Assinatura do aluno:



Data:

26/05/2009

VITOR LEÃO CASALECHI

“AVALIAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA RAMAN DO EFEITO DO LASER (790nm) EM REPARO DE DEFEITOS ÓSSEOS”

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre 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:

Profª Dra. ANA MARIA DO ESPIRITO SANTO (UNIVAP)

Profª. Dra. RENATA AMADEI NICOLAU (UNIVAP)

Prof. Dr. MIGUEL ANGEL CASTILLO SALGADO (UNESP)

Profª. Dra. Sandra Maria Fonseca da Costa

Diretor do IP&D – UniVap

São José dos Campos, 20 de abril de 2009.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha família, que tanto fez por me ajudar a concluí-lo.

Transferindo-me sempre a motivação, paciência e ajuda totalmente necessária.

À Marina, namorada, que calmamente se propunha a ajudar-me.

Aos amigos de longa data que torceram pelo final de sucesso dessa jornada.

E aos novos amigos que encontrei durante a realização desse trabalho, em especial, a amiga Karinne Araújo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço antes de todos, justamente e principalmente à minha irmã Dora, que me ajudou sempre que precisei, em todas as fases do trabalho, estando sempre por perto e pronta para me acompanhar.

Também a todos os amigos que ajudaram de qualquer forma para o término do trabalho, principalmente durante a fase experimental, em especial aos amigos: Diana, Cibelle, Rodrigo, Daniel, Jorge, Leonardo e Garça.

À Professora Renata Amadei Nicolau, orientadora, que além de conselheira, executou de forma excelente as suas funções de professora e orientadora.

À amiga Cibelle Lopes, que sempre se colocou pronta para ajudar a sanar inúmeras dúvidas.

Agradeço o prof. Dr. Landulfo Silveira Júnior pela disponibilização do laboratório de Espectroscopia Raman para a realização dos experimentos.

E por fim, agradeço imensamente à Karinne Araújo, que me acompanhou desde o início, quando também iniciou seu projeto, dividindo os problemas, incertezas, preocupações e também as alegrias.

A CAPES pela bolsa concedida para a realização do estudo.

“Grandes descobertas e progressos invariavelmente envolvem a cooperação de várias mentes.”

Alexander Graham Bell

AValiação por Espectroscopia Raman do Efeito do Laser (790 nm) em Reparo de Defeitos Ósseos

RESUMO

A perda óssea ou defeito ósseo é resultado de diversos fatores, tais como, procedimentos cirúrgicos, patologias, traumas ou mesmo um processo fisiológico. Esses defeitos ósseos frequentemente prejudicam e contra-indicam a colocação de implantes osteointegrados ou mesmo interferem na adaptação de próteses removíveis. Em função destas limitações técnicas e materiais têm sido desenvolvidos com a finalidade de restaurar ou minimizar os defeitos ósseos. O objetivo deste estudo foi avaliar através da Espectroscopia Raman no Infravermelho Próximo (ER-IVP), o efeito da terapia com laser operando em baixa potência no reparo de defeitos ósseos em ratos. Neste estudo foram utilizados 18 ratos Wistar albino, machos, pesando entre 270 g e 320 g. Os animais foram divididos em grupo controle e tratados com laser. Foram utilizados 18 animais, divididos nos grupos controle e laser. Em cada animal foi realizado um defeito ósseo na região da metáfise do fêmur direito, de 2 mm de diâmetro, de forma monocortical. O grupo tratado com laser recebeu irradiação (790 nm, $\theta \sim 0,5 \text{ cm}^2$, CW, 40 mW, Kondortech®, São Carlos, SP, Brasil, $4 \text{ J/cm}^2/\text{ponto}$, 4 pontos, 50 s). Os animais foram irradiados imediatamente após a lesão e a cada 48 horas, em um total de 7 sessões. Os animais foram sacrificados 15, 21 e 30 dias após a cirurgia. O tecido ósseo foi analisado por meio de ER-IVP. Observou-se maior teor de HA e de colágeno no grupo laser 15 dias após a cirurgia em relação ao grupo controle. Pode-se concluir que a terapia com laser na região do infravermelho promoveu aumento dos níveis de mineral e porção orgânica nas fases iniciais do processo de reparação óssea.

Palavras-Chave: regeneração óssea, laser infravermelho, espectroscopia Raman.

RAMAN SPECTROSCOPY STUDY OF EFFECT OF LASER (790 nm) IN BONE DEFECTS REPAIR

ABSTRACT

Bone loss, or bone defect, is the result of different factors such as surgical procedures, pathologies, traumas or even physiological processes. These defects are frequently prejudicial and counter-indicated for bone-integrated implants. They also interfere in the adaptation of removable prosthesis. Due to these limitations, techniques and materials have been developed to restore and minimize bone defects. The aim of this study was to evaluate through Near Infrared Raman Spectroscopy (NIRS) the effect of low potency laser therapy in the repair of bone. Eighteen male Wistar albinus rats weighing between 270 g and 320 g were used in the study. The study used 18 animals, divided into 2 groups: control and treated group. In each animal, a 2 mm diameter, monocortical bone defect was promoted at the distal metaphysis of the right femur. The groups treated with laser (790 nm, $\theta \sim 0,5 \text{ cm}^2$, CW, 40 mW, Kondortech®, São Carlos, SP, Brazil, 4 J/cm²/point, 4 points, 50 s). The animals were irradiated immediately after injury and every 48 hours, for a total of 7 sessions. The animals were sacrificed 15, 21 and 30 days after surgery. The bone tissue was analyzed by means of NIRS. There was greater concentration of HA and collagen of the group 15 days after laser surgery in the control group. It can be concluded that laser therapy in the infrared region increased the levels of mineral and organic portion in the early stages of the process of bone repair.

Keywords: bone repair, infrared laser, Raman Spectroscopy.

Lista de Ilustrações

Figura 01- Assepsia após depilação da área	22
Figura 02- Incisão na pele	22
Figura 03- Divulsão da pele e musculatura	22
Figura 04- Exposição do fêmur	22
Figura 05- Confeção do defeito ósseo	23
Figura 06- Defeito ósseo.....	23
Figura 07- Sutura	23
Figura 08- Peça dissecada	25
Figura 09- Secção da peça	25
Figura 10- Peça seccionada	25
Figura 11- Diagrama esquemático do Sistema Raman no infravermelho próximo	26
Figura 12- Espectro de tecido ósseo em cm^{-1} , da média dos espectros referentes ao grupo controle com 15 dias após a cirurgia	29
Figura 13- Média de todos os espectros Raman 15 dias após a cirurgia.....	30
Figura 14- Média de todos os espectros Raman 21 dias após a cirurgia.....	30
Figura 15- Média de todos os espectros Raman 30 dias após a cirurgia.....	31
Figura 16- Média das intensidades do pico 960 cm^{-1} (HA) no reparo ósseo dos grupos nos tempos experimentais. Dados expressos em média \pm desvio padrão.	32
Figura 17- Média das intensidades do pico 1450 cm^{-1} (colágeno) no reparo ósseo dos grupos nos tempos experimentais. Dados expressos em média \pm desvio padrão.....	32

Lista de Tabelas

Tabela 01 - Distribuição dos animais no estudo	21
Tabela 02 - Valores das intensidades Raman relacionadas com as teores de Hidroxiapatita (HA) e colágeno na reparação óssea; com 15, 21 e 30 dias após a cirurgia. Dados expressos em média \pm desvio padrão. 30

Lista de Abreviaturas e Símbolos

BML – Biomodulação Laser

ATP - Adenosina Trifosfato

ADP – Adenosina Difosfato

DNA – Ácido desoxirribonucléico

nm – Nanometro

λ - Comprimento de onda

ER-IVP - Espectroscopia Raman no infravermelho próximo

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CEP – Comitê de Ética e Pesquisa

SISNEP – Sistema Nacional de Informação sobre Ética em Pesquisa

SAEF- *Spatial Average Energy Fluence* ou Fluência Média Espacial de Energia

HA – Hidroxiapatita

SUMÁRIO

1 Introdução	13
2 Revisão de literatura	14
2.1 Tecido ósseo	14
2.1.1 Reparação óssea	16
2.2 Biomodulação laser	16
2.3 Espectroscopia Raman	18
3 Objetivos	20
4 Material e métodos	21
4.1 Aspectos éticos	21
4.2 Animais	21
4.3 Preparo cirúrgico dos defeitos ósseos	22
4.4 Tratamentos realizados	23
4.5 Sacrifício	24
4.6 Armazenamento e preparação das amostras para análises	24
4.7 Espectroscopia Raman no infravermelho próximo (ER-IVP).....	25
4.7.1 Aquisição e armazenamento dos espectros	27
4.7.2 Calibração dos espectros	27
4.7.3 Filtragem e normalização dos espectros	27
4.8 Estatística	28
5 Resultados	29
5.1 Espectroscopia Raman no infravermelho próximo (ER-IVP)	29
5.2 Teor de Hidroxiapatita (HA)	31
5.3 Teor de colágeno	32
6 Discussão	33
7 Conclusões	36
Referências	37
Anexo A- CEP.....	42

1 Introdução

Perdas ou defeitos ósseos podem ocorrer devido a diversos fatores, tais como, procedimentos cirúrgicos, doenças ósseas, traumas ou mesmo um processo fisiológico (WEBER *et al.*, 2006; PINHEIRO *et al.*, 2003). Os defeitos ósseos frequentemente prejudicam e/ou podem contra-indicar a colocação de implantes osteointegrados ou mesmo interferir na adaptação de próteses removíveis (BEZERRA, 2002). Em função desses problemas, desenvolvem-se técnicas e materiais a fim de restaurar ou minimizar perdas ósseas.

A reparação tecidual é um processo complexo que envolve respostas locais e sistêmicas. Frequentemente, a reparação óssea é mais lenta em relação à reparação de tecidos moles, devido à diferente morfologia e composição entre os tecidos. O tecido ósseo possui uma enorme capacidade de regeneração, na maioria dos casos isso possibilita a restauração da arquitetura e função original. No entanto, existem algumas condições que dificultam essa capacidade de regeneração, e a completa reparação pode não ocorrer caso não haja um bom suprimento sanguíneo, estabilidade mecânica ou ocorra alta proliferação de outros tecidos locais (PINHEIRO *et al.*, 2003).

A fototerapia é um recurso para otimizar a reparação tecidual. Muito estudada na última década, vem apresentando bons resultados no que se refere à reparação óssea (LOPES *et al.*, 2007; GERBI *et al.*, 2008; MARTÍNEZ *et al.*, 2008).

Atualmente, têm-se investigado a ação da fotobiomodulação através de técnicas biomoleculares. A Espectroscopia Raman é uma técnica que possibilita a análise de amostras de tecido ósseo em nível molecular. Com esta técnica pode-se identificar a estrutura molecular e níveis de concentração de determinadas moléculas do tecido analisado (LOPES *et al.*, 2007; MOREIRA *et al.*, 2008; SILVEIRA Jr. *et al.*, 2003; NOGUEIRA *et al.*, 2005). A análise molecular de tecido ósseo biomodulado por terapia laser tem sido pouco explorada, justificando estudos neste segmento empregando a Espectroscopia Raman.

2 Revisão de Literatura

2.1 Tecido ósseo

O osso é um tecido conjuntivo especializado, com três componentes principais: matriz orgânica, componente mineral e componente celular (osteoblastos, osteoclastos e osteócitos). O componente mineral ou inorgânico, hidroxiapatita - HA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), é responsável pela característica de rigidez do osso e compõem cerca de 60-70% da massa óssea de adultos. Enquanto o restante é formado pela parte orgânica, composto principalmente pelo colágeno (ligação $\text{CH}_3\text{-CH}_2$), que garante certa elasticidade ao osso. O esqueleto é composto por dois tipos de ossos: o cortical e o trabecular. Com funções de suporte, conformação do corpo e proteção dos órgãos internos. O osso cortical é responsável por 80% da massa esquelética, está presente nas epífises dos ossos longos e é encontrado como revestimento de todos os ossos do organismo. É o tecido ósseo maduro, com alta resistência mecânica. Caracteriza-se por formação lenta e por ter uma estrutura altamente organizada de fibras colágenas e cristais de minerais. O osso trabecular constitui cerca de 20% da massa esquelética e é encontrado nos corpos vertebrais e nos ossos chatos. Microscopicamente, o osso trabecular desempenha importante papel durante o reparo ósseo, sendo o primeiro tecido a ser formado. Caracteriza-se por uma velocidade de formação mais rápida que o cortical, por ter uma matriz de colágeno desorganizada, sem a estrutura organizada dos sistemas harvesianos, que são canaliculos que nutrem as células ósseas mineralizadas. Em função dessas características é um tecido frágil, exibindo pouca resistência biomecânica (CURREY, 1970; ROBERTS *et al.*, 1987; MARINHO, 1995; ARAUJO, 2006; BITTENCOURT, 2008).

A parte orgânica do tecido ósseo é composta por fibras de colágeno, basicamente do tipo I, as quais estão imersas em uma substância fundamental amorfa, que contém mucopolissacarídeos, glicoproteínas, como a osteoconectina, osteocalcina, osteopontina e sialoproteína óssea. A mineralização ocorre quando há a presença das fibras colágenas. Sais minerais se cristalizam por entre as fibras e posteriormente ao seu redor, conferindo a dureza desse tecido. A maior parte da massa óssea é constituída pela parte mineralizada, ou inorgânica, formada principalmente por cálcio e fósforo juntamente com outros componentes, incluindo bicarbonato, citrato, magnésio, sódio e potássio

(GARTNER; HIATT, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; BITTENCOURT, 2008).

A maioria dos ossos está envolta por uma camada de tecido conjuntivo denso, o perióstio, que é formado por duas camadas: uma interna que é osteogênica (fornecedora de células para a formação de tecido ósseo) e a externa que é a fibrosa, composta de fibras colágenas, fibroblastos e vasos sanguíneos. O endóstio é a outra camada de tecido conjuntivo que envolve ou reveste a cavidade medular, sendo delgado e também possuindo potencial osteogênico. As principais funções do endóstio e perióstio são a de nutrição do tecido ósseo e o fornecimento de novos osteoblastos para o crescimento e a recuperação do osso. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Este tecido de sustentação está em constante remodelação, mediado basicamente por dois tipos de células: osteoblastos e os osteoclastos. A atividade anabólica do osso (formação) é mediada pelos osteoblastos, que derivam das células-tronco do tecido conjuntivo, as quais são responsáveis pela síntese dos constituintes orgânicos do osso, a matriz osteóide e, conseqüentemente, pela calcificação da matriz. Têm também a capacidade de concentrar fosfato de cálcio atuando na mineralização da matriz. São encontrados alinhados às superfícies ósseas formando uma estrutura similar a um epitélio simples. Quando o osteoblasto é envolvido pela matriz recém sintetizada, passa a ser chamado osteócito e a área correspondente aos seus prolongamentos envolvidos pela matriz forma os canalículos, que são as vias de nutrição e excreção celular, já que o processo de difusão entre as células não ocorre devido à mineralização da matriz. A atividade catabólica (reabsorção) é mediada pelos osteoclastos, que são células gigantes multinucleadas da linhagem dos macrófagos, que se originam de células precursoras mononucleadas da medula óssea que em contato com o tecido ósseo unem-se para formar os osteoclastos multinucleados. Essas células possuem a capacidade de reabsorver o osso. Sua superfície ativa em contato com o osso secreta enzimas lisossômicas ácidas (colagenase e outras hidrolases) que degradam o componente mineral do tecido ósseo. Sua atividade é controlada por citocinas e por alguns hormônios da tireóide e paratireóide. Os osteoblastos e osteoclastos, por possuírem capacidades antagônicas, são de extrema importância no processo de crescimento, remodelação e reparação do osso. Os osteócitos são células achatadas em forma de amêndoa, com retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi pouco desenvolvidos, núcleo reduzido e cromatina condensada, indicando pouca atividade celular. Apesar dessas características, essas células possuem significativa importância

na manutenção da matriz óssea e sua morte é seguida de reabsorção da área correspondente, são conhecidos como moduladores da atividade celular, já que determinam reativação óssea da transmissão de impulsos mecânicos e elétricos (MARINHO, 1995; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; BITTENCOURT, 2008).

O osso apresenta-se macroscopicamente no seu exterior, uma superfície lisa, que corresponde ao osso cortical. E em seu interior, apresenta inúmeras cavidades intercomunicantes, que correspondem às trabéculas ósseas e formam o osso esponjoso. Nos ossos longos, as extremidades ou epífises são formadas por osso esponjoso com uma delgada camada superficial compacta. A diáfise é quase totalmente compacta, com pequena quantidade de osso esponjoso na sua parte profunda, delimitando o canal medular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

2.1.1 Reparação óssea

A reparação tecidual é um processo complexo que envolve respostas locais e sistêmicas. Frequentemente, a reparação óssea é mais lenta em relação à reparação de tecidos moles, devido à diferente morfologia e composição entre os tecidos.

O tecido ósseo possui uma enorme capacidade de regeneração, na maioria dos casos isso possibilita a restauração da arquitetura e função original. No entanto, existem algumas condições que dificultam essa capacidade de regeneração, e a completa reparação pode não ocorrer caso não haja um bom suprimento sanguíneo, estabilidade mecânica ou ocorra alta proliferação de outros tecidos locais (NICOLAU *et al.*, 2003; PINHEIRO *et al.*, 2003).

Durante a fase inicial de reparação óssea, a atividade osteoblástica é principalmente proliferativa, e a deposição de matriz óssea com posterior incorporação por Hidroxiapatita ocorre mais tardiamente. Osteoblastos mais maduros têm maior capacidade de deposição, caracterizando maturação óssea (LOPES *et al.*, 2007).

A lesão óssea pode ser decorrente de diversos fatores, tais como, procedimentos cirúrgicos, neoplasias, traumas, etc (WEBER *et al.*, 2006; NICOLAU *et al.*, 2003; PINHEIRO *et al.*, 2003).

2.2 Biomodulação laser

Na última década o número de estudos envolvendo terapias utilizando fontes luminosas vem crescendo, devido aos resultados promissores atestados. Tem sido evidenciado que a fotobiomodulação pode ser útil como auxiliar em terapias destinadas a otimização do processo de reparação tecidual (GERBI *et al.*, 2008), tanto em tecidos moles quanto em tecidos mineralizados (MARTÍNEZ *et al.*, 2008; LOPES *et al.*, 2007).

A biomodulação laser (BML) é uma modalidade de tratamento que não produz efeito térmico sobre os tecidos, portanto, os efeitos biológicos obtidos não podem ser atribuídos ao aumento de calor. A intensidade dos efeitos depende do metabolismo celular ou da condição clínica tecidual antes da irradiação. Isso explica o porquê do efeito positivo da biomodulação laser nem sempre pode ser evidenciado. A ação da BML tem início através da absorção da luz por cromóforos presentes nos tecidos biológicos. Um importante cromóforo é o citocromo c-oxidase, presente nas mitocôndrias, componente integrante da cadeia respiratória celular. A mitocôndria por sua vez é responsável síntese de ATP, fornecendo energia celular, mantendo suas atividades metabólicas como: síntese de proteína; motilidade celular; manutenção do potencial de membrana e replicação celular (HARRIS, 1991; WILDEN, 1998; DAMANTE, 2003).

A literatura tem apontado vários fenômenos biológicos modulados pela ação da BML, incluindo: aumento na síntese de ATP, redução de prostaglandina, melhora do gradiente iônico transmembranas, alteração da condução nervosa, alteração do suprimento sanguíneo e neoformação vascular, melhora da função celular (liberação de fatores de crescimento, replicação celular), melhora da síntese de DNA, proteínas, efeito antiinflamatório, redução da dor e aceleração da reparação tecidual (PINHEIRO *et al.*, 2001; NICOLAU *et al.*, 2003 e 2004). A fototerapia além de apresentar bons resultados na reparação de tecidos moles, também tem mostrado resultados positivos em reparação de tecido duro, aumentando o conforto pós-operatório e diminuindo o período da reparação (MERLI *et al.*, 2005). A BML tem promovido bons resultados no que se refere à cicatrização de feridas (DALL AGNOL *et al.*, 2009), melhora na regeneração de nervos (BELCHIOR *et al.*; 2009; DOS REIS *et al.*, 2008) melhora na formação neovascular e na indução de formação óssea (DINIZ *et al.*, 2008). Porém os efeitos da BML em osso ainda não são bem conhecidos, devido a resultados conflitantes, se ocorre no osso em geral ou se é apenas uma estimulação de células isoladas (PINHEIRO *et al.*, 2001, NICOLAU *et al.*, 2003).

2.3 Espectroscopia Raman

Sabendo que a energia luminosa é proporcional à frequência dela, logo, a mudança de frequência dessa luz espalhada deve ser igual à frequência vibracional do espalhamento das moléculas. Esse processo de troca de energia entre espalhamento das moléculas e a luz incidente é conhecido como efeito Raman. Haja vista que cada espécie molecular possui sua banda vibracional molecular, o espectro Raman de uma substância específica irá consistir de uma série de picos ou bandas, cada qual deslocada por uma das frequências vibracionais características daquela molécula, portanto os espectros adquiridos são atribuídos à estrutura molecular dos elementos constituintes. (HANLON et al., 2000).

Esta técnica tem mostrado grande aplicabilidade no estudo de tecidos duros, como na investigação de mudanças químicas em canais dentários (KWON et al. 2004) e no estudo das mudanças na estrutura orgânica e inorgânica da dentina ocorrida pela irradiação de laser de Er:YAG (SOARES, 2007).

Como visto anteriormente a espectroscopia Raman é uma técnica óptica baseada no espalhamento inelástico da luz pela matéria, que possibilita de forma menos invasiva e não destrutiva a análise de amostras. O espelhamento da luz pela matéria ocorre com a mudança de frequência da luz monocromática que incide na amostra, através de interação com a matéria (MARTINS, 2008). Sendo possível identificar de forma precisa a estrutura molecular das amostras (LOPES *et al.*, 2007; MOREIRA *et al.*, 2008; SILVEIRA Jr. *et al.*, 2003; NOGUEIRA *et al.*, 2005). As técnicas espectroscópicas fornecem informações detalhadas sobre os níveis de energia dos espécimes em estudo. Em nível molecular, a radiação pode interagir com a matéria por processos de absorção ou de espalhamento e, este último pode ser elástico (Rayleigh) ou inelástico (efeito Raman) (SILVEIRA Jr. *et al.*, 2003; NOGUEIRA *et al.*, 2005).

A espectroscopia Raman vem sendo muito estudada ultimamente pela grande variação de aplicações em que a mesma pode ser utilizada. É uma técnica vibracional, na qual o espectro contém as informações das vibrações das ligações químicas dos grupos moleculares das amostras. Como as bandas de vibrações são específicas e estreitas para cada grupo molecular e cada pico no espectro corresponde a uma vibração molecular específica, as alterações moleculares dos tecidos em sua normalidade ou tecidos alterados podem ser assim capturados em espectros Raman e gerar espectros

específicos. O espectro Raman é como a impressão digital da molécula e fornece informações bioquímicas específicas, não encontradas em outra técnica óptica. Os aparelhos utilizados pela técnica Raman são um aparato que fornece radiação monocromática para a excitação do material (laser), um espectrômetro que faz a dispersão da luz e um detetor que converta este sinal luminoso em sinal elétrico. Assim é possível estudar os movimentos vibracionais das moléculas dos diferentes materiais, permitindo a sua identificação (SILVEIRA Jr. *et al.*, 2001).

Dentre algumas das aplicações da espectroscopia Raman estão as análises de biomateriais, de proteínas fotossintéticas e alimentos. Percebe-se então o potencial de aplicação dessa técnica para a área médica, visando diagnósticos, como arteriosclerose, cânceres e outros (SCHRADER *et al.*, 1995). Pode-se então, determinar as substâncias presentes tanto no tecido normal como em processos patológicos (SILVEIRA Jr., 2001).

A aplicação da espectroscopia Raman no estudo de tecidos biológicos objetiva a detecção precoce de doenças e o aumento da eficácia na aquisição dos dados. O espectro Raman pode ser obtido de um modo minimamente invasivo e analisado rapidamente para facilitar o diagnóstico (SCHRADER; DIPPEL, 1999). As posições e intensidades relativas das diversas bandas do espectro Raman podem ser usadas para identificar grande parte das estruturas biológicas moleculares (DUARTE *et al.*, 2002).

A espectroscopia Raman é usada também para analisar processos de mineralização óssea (NICOLAU; ZÂNGARO; SATHAIAH, 1998; SATHAIAH, NICOLAU; ZÂNGARO, 1999), para definir as mudanças na estrutura química que ocorrem nas doenças ósseas e para estudar a biocompatibilidade de vários tipos de materiais usados como implantes protéticos (OTTO *et al.*, 1997; CARDEN; MORRIS, 2000).

O comprimento de onda no infravermelho próximo reduz o efeito da fluorescência dos tecidos, promovendo menos degradação fotolítica nas amostras, permitindo assim a utilização de uma maior potência no laser (PAULA Jr.; SATHAIAH, 2004).

3 Objetivo

Avaliar a ação da biomodulação laser de diodo (790nm) sobre o reparo ósseo de defeitos cirúrgicos em ratos por espectroscopia Raman dispersiva (níveis de material mineral e orgânico).

4 Material e métodos

4.1 Aspectos éticos

Neste estudo foram aplicados os princípios éticos da experimentação animal em conformidade ao COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). O protocolo de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa CEP / UNIVAP registrado junto ao SISNEP (nº A074/CEP/2007 - Complemento).

4.2 Animais

Neste estudo foram utilizados 18 ratos Wistar albinos, machos, adultos e saudáveis, pesando entre 270g e 320g, idade média de 80 dias, provenientes do Biotério da Anilab (Animais de Laboratório) da cidade de Paulínia do estado de São Paulo. Os animais foram mantidos no Biotério do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba em gaiolas de polietileno padrão, em grupos aleatórios de cinco animais por gaiola, com acesso a ração e água *ad libitum*, passando por um período de adaptação de cinco dias previamente ao início do estudo. A sala foi mantida com as condições de iluminação controlada em ciclos de 12 horas claro/12 horas escuro.

Os 18 animais foram divididos em 2 grupos, conforme Tabela 1. Cada grupo foi subdividido em 03 (três) subgrupos, de acordo com o período em que os animais foram sacrificados (15; 21 e 30 dias).

Tabela 1: Distribuição dos animais no estudo por grupo (n=9) e subgrupo (n=3).

GRUPO (n = 9)	SUBGRUPOS (n = 3)	TRATAMENTO
I	15 / 21 / 30 dias	laser desligado
II	15 / 21 / 30 dias	laser

4.3 Preparo cirúrgico dos defeitos ósseos

Todos os animais receberam por via subcutânea Atropina, na dose de 0,04 ml para cada 100 g de peso corpóreo, aguardando repouso de 15 minutos (SCHANAIDER; SILVA, 2004). A anestesia foi realizada com a administração de Cetamina (cloridrato) 10% - 10 ml (Syntec) utilizando a dose de 0,1 ml para cada 100 g de peso corpóreo e Xilazina (cloridrato) 2% - 10 ml (Syntec) com dose de 0,1 ml para cada 100 g, por via intramuscular (MASSONE, 1994).

Os animais tiveram a perna esquerda tricotomizada. A assepsia foi promovida com a aplicação tópica de iodo povidine, sobre a área a ser incisionada. A área a ser operada foi isolada com campos cirúrgicos estéreis fenestrados. Uma incisão linear de 20 mm de extensão foi realizada no sentido crânio-caudal, com o auxílio de um bisturi (lâmina nº 15). Em seguida promoveu-se a divulsão do tecido muscular e descolamento do periósteo para a exposição da superfície óssea do fêmur (Figuras 01 a 04).



Figura 01 – Assepsia após depilação da área.



Figura 02 – Incisão na pele.



Figura 03 – Divulsão da musculatura.



Figura 04 – Exposição do fêmur.

Uma cavidade monocortical padronizada de 2 mm de diâmetro e até atingir o canal medular foi criada com uma broca esférica de aço nº 8, montada em um micromotor elétrico de baixa rotação (35000 rpm, Dentec®) sob refrigeração abundante com solução fisiológica 0,9% (Labormédica®), na metáfise do fêmur dos animais (Figura 05 e 06).



Figura 05 – Confecção do defeito ósseo.



Figura 06 – Defeito ósseo.

4.4 Tratamentos realizados

Os animais do grupo I (controle), não receberam nenhum tipo de tratamento. O grupo II somente foi submetido à biomodulação Laser ($\lambda=790\text{nm}$, $\theta\sim 0,5\text{cm}^2$, CW, 40mW, 50 s, Kondortech®, São Carlos, SP, Brasil).

Após a confecção dos defeitos ósseos o tecido muscular foi suturado com fio reabsorvível catgut (J&J Ethicon 4.0, Figura 07) e a pele com fio de nylon (J&J Ethicon 3.0).



Figura 07 – Sutura com fio reabsorvível.

Após a cirurgia os animais foram submetidos à profilaxia antibiótica com o uso de Pentabiótico (Fort Dodge®) de amplo-espectro, via intramuscular profunda em dose única de 0,02 ml para cada 100 g de peso corpóreo.

No grupo irradiado com laser, as margens da ferida foram tatuadas com tinta nanquim em quatro pontos. Esses pontos foram usados como guias para a aplicação da fototerapia, equidistantes sobre a linha de incisão. O laser foi aplicado medialmente a cada marcação, perpendicularmente ao tecido e em contato com o mesmo, evitando uma possível interferência da tinta na absorção da luz pelos tecidos e reflexão da luz com perda de energia para o meio. O tratamento começou imediatamente após a sutura e consistiu de aplicação transcutânea em quatro pontos cardeais na área de lesão óssea (0,5 cm de distância entre os pontos). A fototerapia foi aplicada a cada 48 horas durante 15 dias. A dose por ponto foi de 4 J/cm², sendo cada ponto irradiado por 50 segundos, resultando em uma dose de 16 J/cm² por sessão, totalizando 7 sessões.

4.5 Sacrifício

Após o período de 15, 21 e 30 dias pós-operatórios, os animais foram sacrificados de acordo com os princípios éticos adequados (COBEA). Para a obtenção das amostras ósseas foi utilizado o mesmo procedimento anestésico realizado na cirurgia. Depois de anestesiados os animais receberam por via intracardíaca a aplicação de anestésico Tiopental Sódico (Cristália) na dose de 0,05 ml para cada 100 g do peso corpóreo. Após 5 minutos foi realizada a aplicação por via intracardíaca de cloreto de potássio 0,4 ml para cada 100 g de peso corpóreo (MASSONE, 1994).

4.6 Armazenamento e preparação das amostras para análises

O fêmur dos animais, ainda inteiros (Figura 08), foi dividido em dois, pelo centro do defeito ósseo e no sentido transversal, através de secção com disco diamantado em baixa rotação (35000 rpm, Dentec®) (Figura 09), irrigando a região do defeito com soro fisiológico, através de uma seringa, durante o processo de secção. A figura 10 demonstra o resultado da secção do fêmur pelo centro do defeito ósseo. As amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C) para análise através da espectroscopia Raman no infravermelho próximo (ER-IVP). Essas foram armazenadas em nitrogênio líquido, pois não é aconselhável a fixação química de amostras a serem

analisadas por espectroscopia Raman, devido à emissão de fluorescência das substâncias fixadoras (HANLON *et al.*, 2000).



Figura 08 – Peça dissecada.



Figura 09 – Secção da peça.

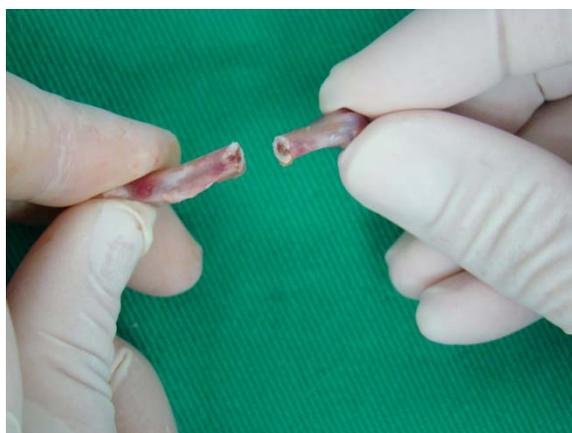


Figura 10 – Peça Seccionada.

Para a coleta dos dados da espectroscopia Raman, as amostras que antes estavam congeladas foram levadas para uma sala climatizada. As amostras acondicionadas por 5 minutos em um recipiente com solução fisiológica a 0,9% para preservar as características estruturais do tecido durante o descongelamento. Foram coletados espectros de dois pontos de cada amostra, na região de osso cortical, pois a geometria nesta área é menos irregular que a área trabecular.

4.7 Espectroscopia Raman no infravermelho próximo (ER-IVP)

A análise das amostras por Espectroscopia Raman (ER-IVP) foi realizada em um único dia, com o objetivo de evitar variações no alinhamento e calibração do sistema e nível de ruídos eletromagnéticos (p.ex. raios cósmicos) (TIMLIN *et al.*, 1999; LOPES *et al.*, 2007).

A análise das amostras através da espectroscopia Raman no infravermelho próximo (ER-IVP) foi realizada no laboratório de Espectroscopia Biomolecular no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) na Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP).

Para caracterização do espectro Raman, foi usado o laser de diodo em 830 nm como fonte de excitação, com potência de 100 mW, direcionado até a amostra por prismas e lentes que compunham o sistema. As aquisições dos espectros foram realizadas com acumulações únicas com duração de 5 segundos, numa resolução inicialmente de 8 cm^{-1} . A amostra foi colocada em um porta-amostra adaptado a um posicionador com deslocamento micrométrico nos três eixos (x, y, z). O sinal Raman gerado na amostra foi coletado com angulação de 90° em relação ao feixe incidente na amostra. O sinal foi filtrado por um filtro passa banda do tipo *notch* (Kaiser Optical Systems®, MI, USA, modelo HNPF 3804) com comprimento de onda de rejeição em 830nm, focalizado na entrada da fenda do espectrômetro (Figura 11). Este filtro eliminou a radiação Rayleigh espalhada, permitindo a passagem somente do sinal Raman para o espectrômetro (Chromex®, NM, USA, modelo 250IS). Após a dispersão da luz através do espectrômetro, o sinal Raman foi detectado por uma câmera CCD refrigerada por nitrogênio líquido (SILVEIRA Jr., 2001; LOPES *et al.*, 2007).

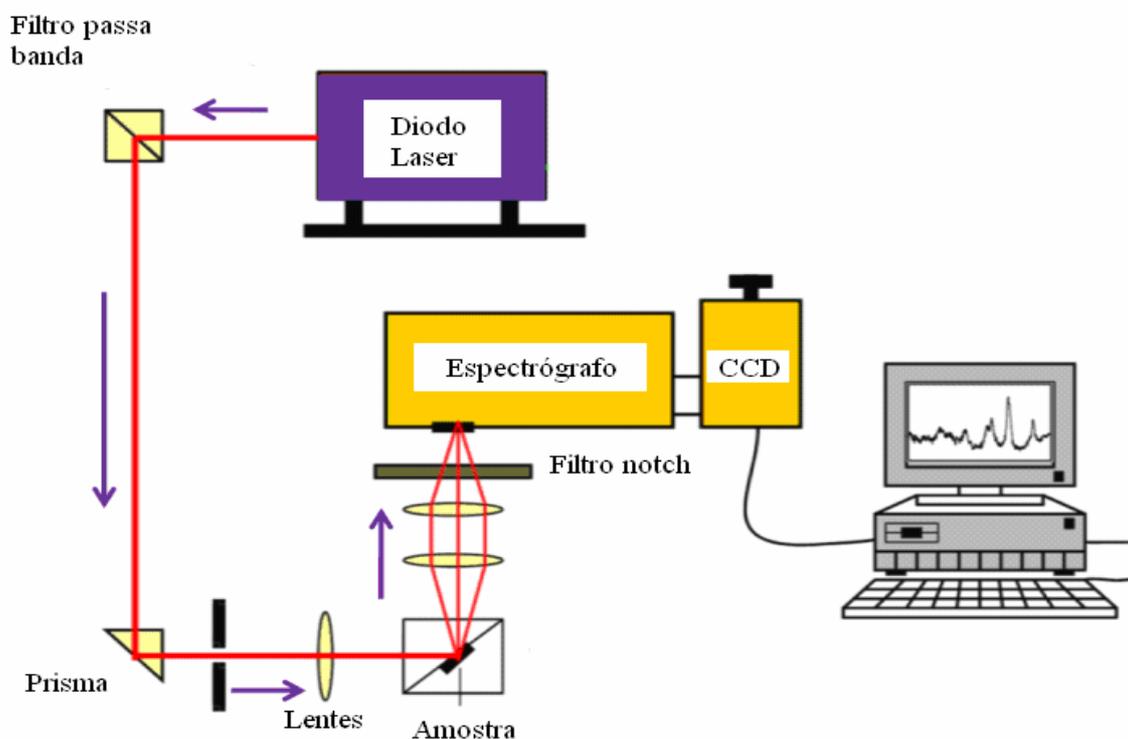


Figura 11 - Diagrama esquemático do Sistema Raman no infravermelho próximo.

4.7.1 Aquisição e armazenamento dos espectros

Para a aquisição e armazenamento dos espectros foram utilizados um microcomputador (Magitronic®, 486/100 MHz) e um programa CSMA® (Princeton Instruments®, NJ, USA, versão 2.4) que controla o tempo de exposição do detector e o número de aquisições por amostra e armazena os espectros. O tempo de exposição para obtenção dos espectros foi de 5 segundos por ponto (LOPES *et al.*, 2007). Sendo que em cada amostra foram explorados dois pontos na região cortical do defeito ósseo.

4.7.2 Calibração de frequência

Após a transferência dos espectros do microcomputador acoplado ao sistema, para outro microcomputador, utilizou-se o programa Mat Lab® (The Mathworks®, MA, USA, versão 4.2) para realização da calibração dos espectros. Durante o experimento foram realizadas aquisições de espectros de naftaleno para a realização da calibração posterior dos espectros. A calibração visa permitir a correlação dos espectros originais em pixel para cm^{-1} , a partir do espectro de uma amostra com valores de pico conhecidos.

4.7.3 Filtragem e normalização dos espectros

No processo de filtragem do espectro original foi utilizado uma curva de polinômio de ordem cinco (adequada para este tipo de espectro) gerada pelo programa Mat Lab®, cujo objetivo foi reduzir o ruído causado pelo CCD e remover o background de fluorescência originado pelas amostras.

A normalização foi realizada no programa Excel® (Microsoft Corporation®, WA, USA, versão 7.0). Esta etapa tem a finalidade de eliminar as possíveis variações durante o experimento, como o desalinhamento do sistema ótico, oscilação da potência do laser e geometria da amostra, ou seja, fatores que influenciam tanto na intensidade da fluorescência quanto na intensidade dos picos Raman. Neste caso, na intensidade dos picos de (960cm^{-1}) , representando a Hidroxiapatita e de (1450cm^{-1}) , representando o colágeno, presentes no espectro do tecido ósseo analisado em ambos os grupos.

4.8 Estatística

Todas as variáveis obtidas no estudo foram analisadas com o auxílio do programa GraphPad InStat 3 (Inc., San Diego, CA, USA). O teste One-Way ANOVA foi aplicado, com nível de significância de 95% ($p < 0,05$). Utilizou-se o teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas entre os grupos controle e tratados.

5 Resultados

5.1 Espectroscopia Raman no infravermelho próximo (ER-IVP)

O valor da intensidade para cada pico Raman (960 cm^{-1} e 1450 cm^{-1}) foi obtido a partir da altura do pico, ou seja, foi realizada uma subtração entre as intensidades do valor máximo e valor mínimo (Figura 12) presentes nos espectros das médias de cada grupo em 15, 21 e 30 dias após a cirurgia. Esta intensidade está relacionada diretamente com o teor/incorporação de Hidroxiapatita (HA) (960 cm^{-1}), referente à vibração molecular PO_4 ; e colágeno (1450 cm^{-1}), referente à vibração molecular da ligação $\text{CH}_3\text{-CH}_2$, no tecido ósseo neoformado, ou seja, quanto mais alta a intensidade, maior a concentração.

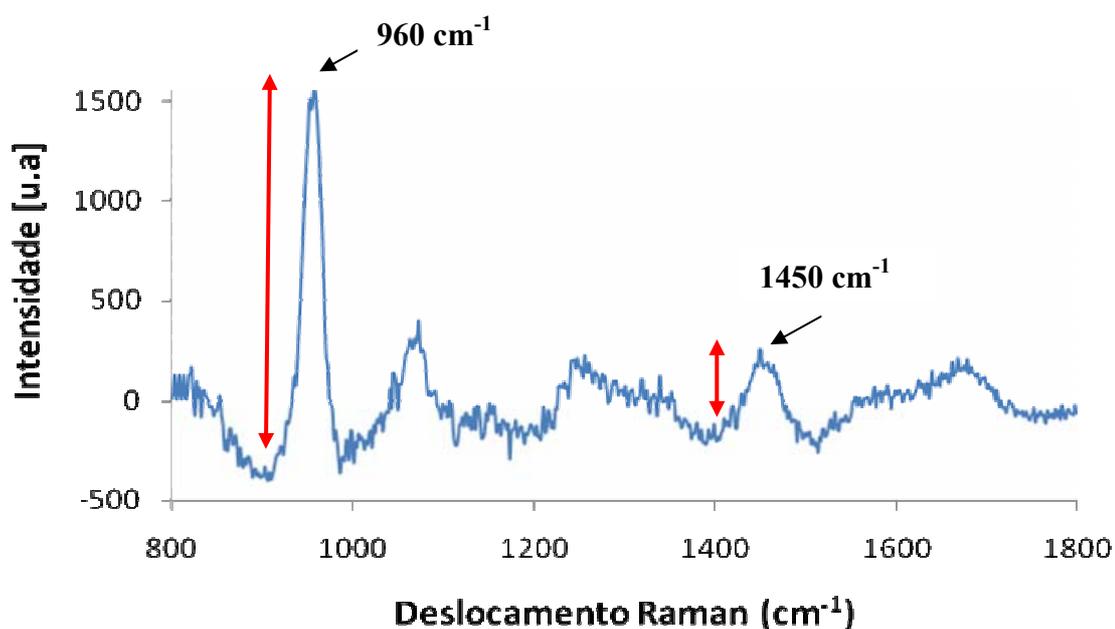


Figura 12: Espectro de tecido ósseo em cm^{-1} , da média dos espectros referentes ao grupo controle com 15 dias após a cirurgia.

Os resultados da espectroscopia Raman (ER-IVP) obtidos na região cortical do defeito ósseo de todos os grupos e nos períodos de 15, 21 e 30 dias após a cirurgia podem ser vistos na Tabela 2 e nas Figuras 13, 14 e 15.

Tabela 2: Valores das intensidades Raman relacionadas com as teores de Hidroxiapatita (HA) e colágeno na reparação óssea; com 15, 21 e 30 dias após a cirurgia.

Grupo	15 dias		21 dias		30 dias	
	HA	Colágeno	HA	Colágeno	HA	Colágeno
I- Controle	1777 ± 189	375 ± 35	1911 ± 385	397 ± 127	1691 ± 302	336 ± 48
II- Laser	3365 ± 739*	496 ± 50*	1860 ± 958	395 ± 71	1861 ± 506	422 ± 106

* p<0,05

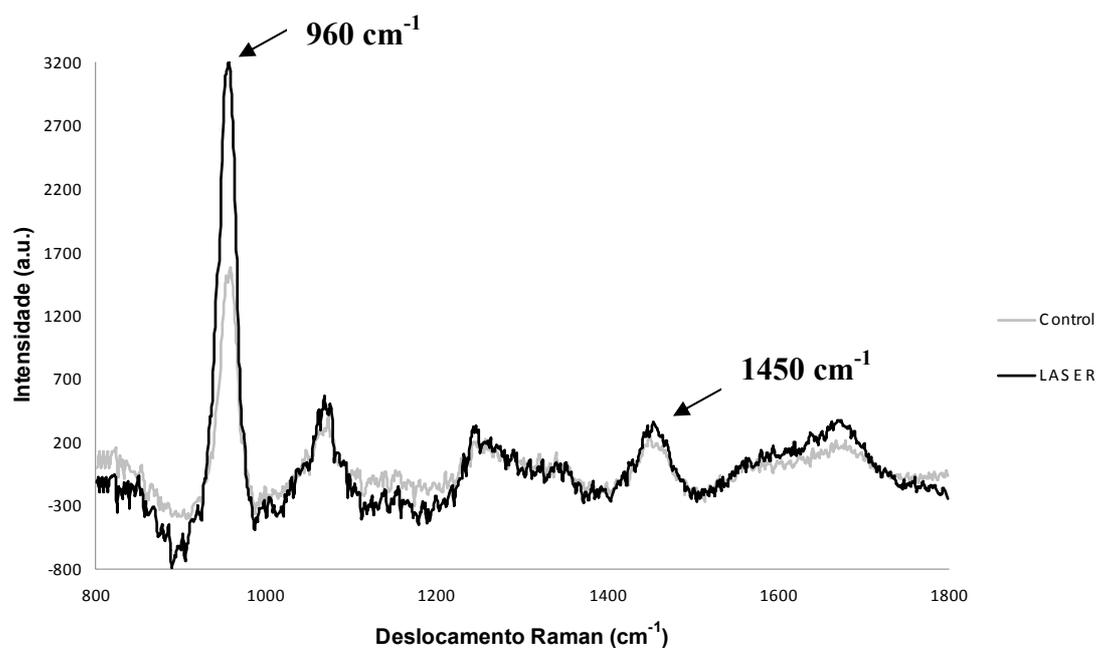


Figura 13: Média de todos os espectros Raman 15 dias após a cirurgia.

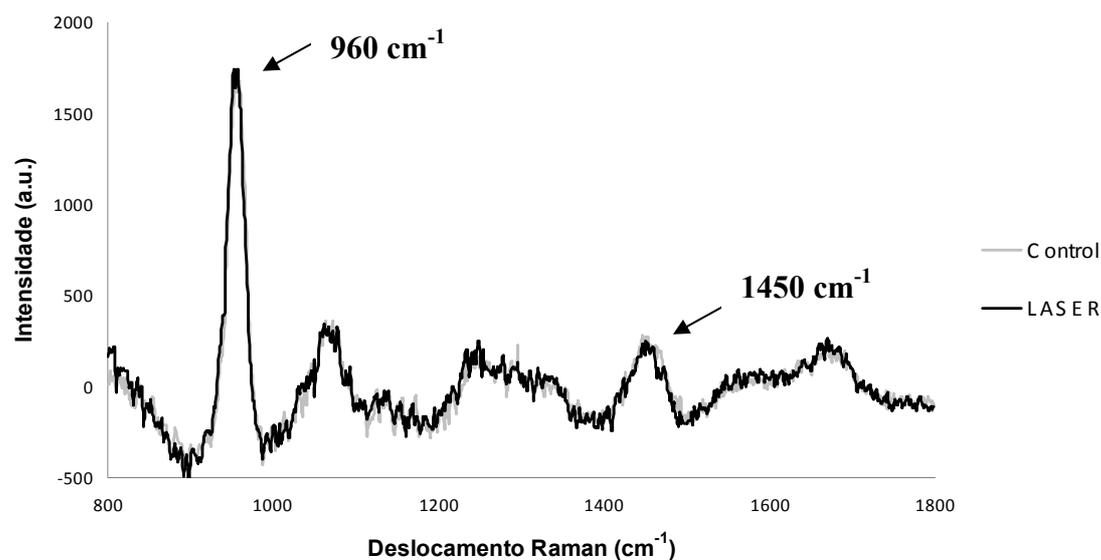


Figura 14: Média de todos os espectros Raman 21 dias após a cirurgia.

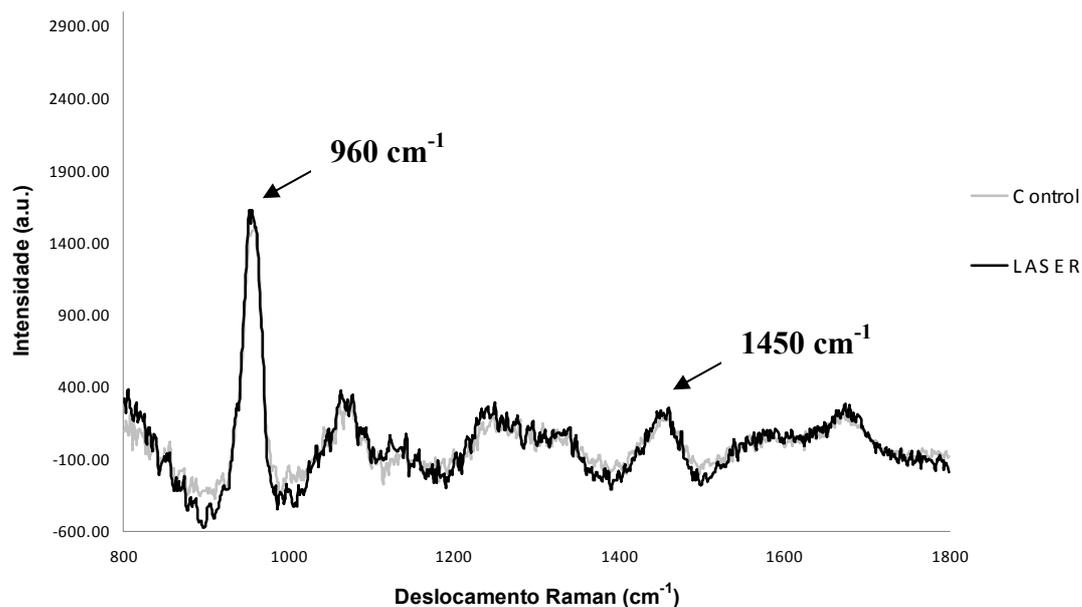


Figura 15: Média de todos os espectros Raman 30 dias após a cirurgia.

5.2 Teor de Hidroxiapatita (HA)

A análise estatística dos dados referentes ao teor de HA mostrou que houve diferença significativa entre os grupos com 15 dias após a cirurgia. Na comparação entre os grupos analisados, evidenciou-se diferença significativa entre os grupos I e II ($p < 0,05$). O grupo II se apresentou superior ao grupo I quanto à intensidade do pico de HA. Em 21 dias não foram detectadas intensidades significativamente superiores entre os grupos. A mesma situação ocorreu entre os grupos no período de 30 dias (Figura 16).

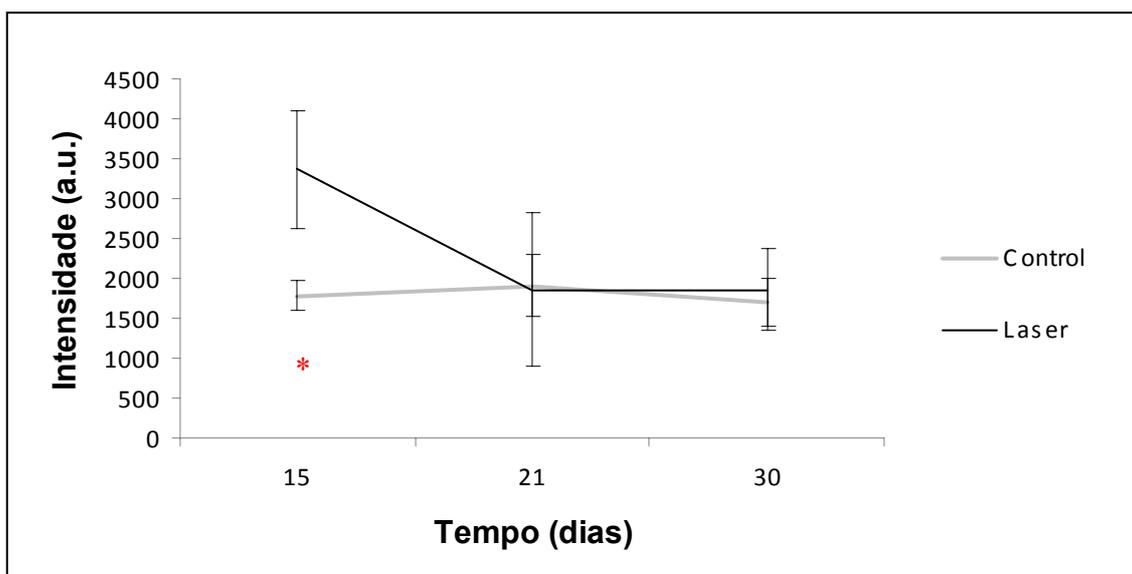


Figura 16: Média das intensidades do pico 960 cm^{-1} (HA) no reparo ósseo dos grupos nos tempos experimentais. Dados expressos em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$

5.3 Teor de colágeno

Com relação ao colágeno, aos 15 dias foram observadas diferenças significativas entre o grupo I e II ($p < 0,05$), sendo superior no grupo laser. Não houve diferença significante nos períodos seguintes, 21 e 30 dias (Figura 17).

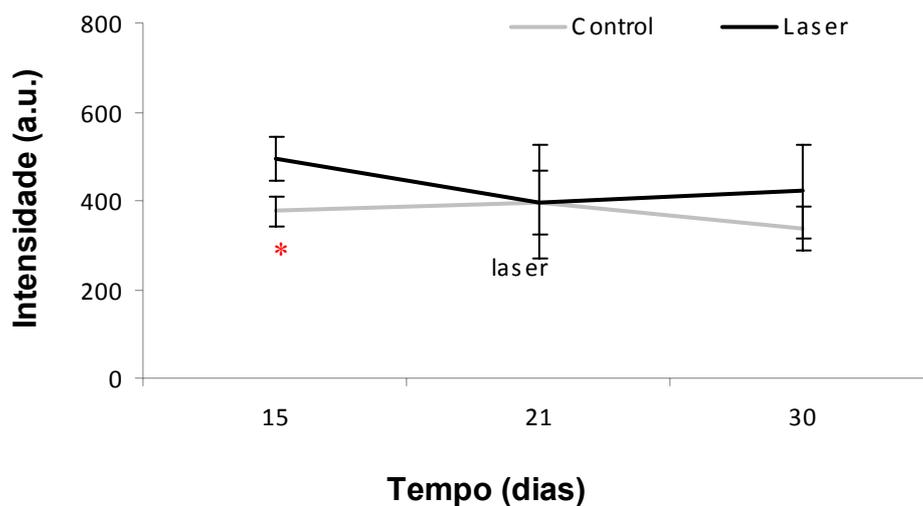


Figura 17: Média das intensidades do pico 1450 cm^{-1} (colágeno) no reparo ósseo dos grupos nos tempos experimentais. Dados expressos em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$

6 Discussão

No presente estudo foram utilizados ratos albinos, considerando sua ampla utilização em investigação de reparo ósseo, uma vez que sua resposta metabólica é semelhante à humana neste tecido (RESTREPO *et al.*, 1998; NICOLAU *et al.*, 2003; PINHEIRO *et al.*, 2003). Além de outras vantagens, como, facilidade de manuseio, resistência a variações climáticas (CARVALHO *et al.*, 2006; NASCIMENTO *et al.*, 2008). Nos ratos, a maturação do osso depositado sobre o defeito ocorre na faixa de 30 dias após a lesão (RESTREPO *et al.*, 1998; GERBI *et al.*, 2005; PINHEIRO, *et al.* 2008). Por este motivo o tempo experimental adotado se faz justificado.

A Espectroscopia Raman foi utilizada como forma de análise devido à fidelidade de seus resultados, os quais apresentam características da estrutura molecular das amostras.

O laser usado no estudo para a biomodulação tecidual foi escolhido em função de sua qualidade de aparelho portátil e clinicamente utilizado usualmente.

Segundo autores a terapia com luz coerente tem demonstrado efeitos positivos sobre o processo de reparo tecidual (tecido ósseo, cutâneo, etc) (NICOLAU *et al.*, 2003; PINHEIRO *et al.*, 2003; ROCHKIND *et al.*, 2004; LOPES *et al.*, 2005; LIRANIGALVÃO *et al.*, 2006; LOPES *et al.*, 2007; LOPES *et al.*, 2007).

A radiação coerente na região do infravermelho próximo do espectro eletromagnético foi utilizada nesse trabalho com fins terapêuticos. Devido à capacidade de penetração, desta radiação, no interior dos tecidos biológicos visou-se ação sobre o tecido ósseo (BASFOR, 1995). A biomodulação laser tem como características: melhora da função celular (liberação de fatores de crescimento, replicação celular), efeito antiinflamatório, redução da dor e indução de formação óssea (PINHEIRO *et al.*, 2001; NICOLAU *et al.*, 2003; NISSAN *et al.* 2006).

Os resultados obtidos no presente estudo, no que se refere à comparação entre os grupos no tempo de 15 dias, demonstram que a incorporação de Hidroxiapatita (HA) no grupo II (laser) foi significativamente superior ao grupo I (controle). Com relação ao

colágeno o grupo II novamente apresentou-se significativamente superior em relação ao grupo I. Tais diferenças podem ter ocorrido devido à biomodulação gerada pela terapia com laser. Estes dados corroboram com a literatura no que se refere à qualidade da reparação óssea na fase inicial do processo (15 dias pós-lesão), pois segundo autores a fototerapia gera aumento da proliferação e atividade osteoblástica (deposição de colágeno), neoformação óssea (LIU *et al.*, 2007; DINIZ *et al.*, 2008; PINHEIRO; GERBI, 2006; TORRES *et al.*, 2008), e diminuição inflamatória (KHADRA *et al.*, 2005; OBRADOVIĆ *et al.*, 2008). Esses resultados são coerentes com os encontrados na literatura e mostram que os benefícios causados pela biomodulação laser são mais notáveis no primeiro estágio da reparação óssea (NICOLAU; ZÂNGARO; SATHAIAH, 1998; SATHAIAH, NICOLAU; ZÂNGARO, 1999). Sendo que a aceleração do processo de reparação não mais se destaca nos períodos subseqüentes, 21 e 30 dias.

No período de 21 dias, portanto, não houve significância entre a diferença dos grupos, tanto para o teor de HA quanto para o teor de colágeno. Embora (LIRANI, 2004; LIRANI; SILVA, 2004), sugerirem em seus trabalhos que o predomínio da formação óssea nos grupos irradiados com laser foi por volta do vigésimo dia pós-cirúrgico, apresentando: maior número de osteoblastos em superfície e maior quantidade de deposição do tecido osteóide.

Não foram observadas diferenças significativas referente a qualquer um dos picos estudados entre os grupos no tempo de 30 dias. Provavelmente, quanto ao colágeno, a não significância entre as diferenças se deve ao fato de haver pouca concentração de tecido não mineralizado nos defeitos nesta fase, na qual os defeitos já possuem praticamente toda sua nova estrutura mineralizada. Já sobre a falta de diferença significativa de concentração de HA entre os grupos, possivelmente sugere que no período de 30 dias os defeitos, tanto dos animais irradiados quanto dos não irradiados, estivessem em estágios avançados e parecidos no processo de reparação óssea. Com concentrações de HA já elevadas e similares. Situação condizente com a literatura pesquisada (NICOLAU *et al.*, 2003; GERBI *et al.*, 2008).

Aplicando-se os conceitos de SAEF (*Spatial Average Energy Fluence* ou Fluência Média Espacial de Energia), deve haver uma relação entre a energia total subministrada pelo laser e áreas totais de tratamento empregando-se a equação:

$$\text{SAEF (J/cm}^2\text{)} = \frac{P \text{ (W)} \cdot t \text{ (s)} \cdot n}{A \text{ (cm}^2\text{)}}$$

Onde, “n” é o número de aplicações pontuais e dependerá do tamanho da área total (A) a ser tratada e do tamanho do feixe do equipamento a ser empregado (VÉLEZ; TRELLES; RIGAU, 2000; NICOLAU *et al.*, 2006).

A dose empregada para a BML no presente estudo foi de 4 J/cm² por ponto de irradiação totalizando 16 J/cm² por sessão. Esta dose foi aplicada para modular uma estrutura óssea com lesão aproximada de 2 mm de diâmetro e profundidade. A correlação para defeitos maiores deve ser realizada considerando o nível de energia entregue ao tecido *vs* massa de tecido lesionado, ou seja, 254,8 J/cm² de SAEF. Este aspecto de correlação não foi abordado anteriormente ao tecido ósseo, sendo de extrema valia para nortear os cálculos de dose para áreas lesionadas de dimensões diferentes da investigada no presente estudo.

7 Conclusão

Com base nos resultados encontrados nesse estudo, podemos concluir que a reparação óssea foi otimizada em relação ao grupo controle nas primeiras fases de reparação (15 dias), acelerando o processo de regeneração, quando estimulada com a biomodulação laser diodo com $\lambda=790\text{nm}$.

Referências

ABRAHAMAS, J. J.; HAYT, M.W.; ROCK, R. Sinus lift procedure of the maxilla in patients with inadequate bone for dental implants: radiographic appearance. **Am. J. Roentgenol.**, v.174, n.5, p.1289-1292, 2000.

ARAÚJO, T.S. **Produção de hidroxiapatita pura e dopada para aplicação em biosensores**, 2006. 85f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Sergipe. Aracajú, 2006.

BASFORD, J. R. Low-intensity laser therapy: still not an established clinical tool. **Lasers Surg. Med.**, v. 16, n.4, p.331-342, 1995.

BELCHIOR, A. C., *et al.* Influence of laser (660 nm) on functional recovery of the sciatic nerve in rats following crushing lesion. **Lasers. Med. Sci.** DOI: 10.1590/S1413-35552008000300009, 2009

BEZERRA, F. J. B.; LENHARO, A. **Terapia clínica avançada em implantodontia**. São Paulo: Artes Médicas, 2002. 329 p.

BITTENCOURT, R. **Fototerapia (Laser 830 nm) e Eletroterapia (100 µA e 200 µA) em Reparo Ósseo de Ratos**. 2008. 105f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Universidade do Vale do Paraíba. São José dos Campos. 2008.

CARDEN, A; MORRIS, M. D. Application of vibrational spectroscopy to the study of mineralized tissues (review). **J. Biomed. Opt.**, v.5, n.3, p.259-268, 2000.

CARVALHO, P. T. C., *et al.* Effect of 650 nm low-power laser on bone morphogenetic protein in bone defects induced in rat femors. **Acta Cir. Bras.**, v.21, n.4, p.63-68, 2006.

CURREY, J.D. The mechanical propoerties of bone. **Clin. Orthop. Rel. Res.**, v. 73, p.210-231, 1970.

DALL AGNOL, M. A., *et al.* Comparative analysis of coherent light action (laser) versus non-coherent light (light-emitting diode) for tissue repair in diabetic rats. **Lasers Med. Sci.** Feb 24. DOI: 10.1007/s10103-009-0648-5, 2009

DAMANTE, C. A. **Avaliação clínica e histológica dos efeitos do laser em baixa intensidade (GaAlAs) na cicatrização de gengivoplastia em humanos**. 2003. 92f. Dissertação (Mestrado em Periodontia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

DINIZ, J. S., *et al.* Effect of low-power gallium-aluminum-arsenium laser therapy (830 nm) in combination with bisphosphonate treatment on osteopenic bone structure: an experimental animal study. **Lasers Med. Sci.**, DOI: 10.1007/s10103-008-0568-9, 2008.

DOS REIS, F. A., *et al.* Effect of laser therapy (660 nm) on recovery of the sciatic nerve in rats after injury through neurotmesis followed by epineural anastomosis. **Lasers Med. Sci.** DOI 10.1007/s10103-008-0634-3, 2008

DUARTE, J., *et al.* Use of near-infrared Raman spectroscopy to detect IgG and IgM antibodies against toxoplasma gondii in serum samples of domestic cats. **Cellular and Molecular Biology**, v. 48, n.5, p.585-589, 2002.

GARTNER, L. P.; HIATT; J.L. **Tratado de Histologia em Cores**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 472p.

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

GERBI, M. E. M., *et al.* Infrared laser light further improves bone healing when associated with bone morphogenic proteins: an in vivo study in a rodent model. **Photomed. Laser Surg.**, v.26, n.1, p.55-60, 2008.

GRAZIANI, F., *et al.* Comparison of implant survival following sinus floor augmentation procedures with implants placed in pristine posterior maxillary bone: a systematic review. **Clin. Oral Implants Res.**, v.15, n.6, p.677-682, 2004.

HANLON, E. B., *et al.* Prospects for in vivo Raman spectroscopy. **Phys. Med. Biol.**, v.45, p. R1-R59, DOI: 10.1088/0031-9155/45/2/201, 2000.

HARRIS, D. M., Biomolecular mechanisms of laser biostimulation. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v.9, n.4, p.277-279, 1991.

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

KHADRA A. M., *et al.* Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. **Biomaterials**, v.26, n.17, p.3503-3509, 2005.

KWON, T.Y.; FUJISHIMA, T.; IMAI, Y. FT-Raman spectroscopy of calcium hydroxide medicament in root canals. **International Endodontic Journal**, v.37, n.7, p.489-493, 2004.

LIRANI, A. P. R. **Estudo comparativo dos efeitos do ultra-som e do laser de baixa intensidade no reparo ósseo de tibia de rato**. 2004. Dissertação (Mestrado)- Instituto de Química de São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

LIRANI A. P. R., SILVA O. L. Propriedades mecânicas de fraturas ósseas submetidas a terapia laser de baixa intensidade. **Rev. Brás. Biomec.** v.5, p.19-24, 2004.

LIRANI-GALVÃO, A. P.; JORGETTI, V.; SILVA, O. L. Comparative study of how low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound affect bone repair in rats. **Photomed. Laser Surg.**, v.24, n.6, p.735-740, 2006.

LIU, X., *et al.*, Effect of lower-level laser therapy on rabbit tibial fracture. **Photomed. Laser Surg.**, v.25, n.6, p.487-494, 2007.

- LOPES, C. B., *et al.* Infrared laser light reduces loading time of dental implants: a raman spectroscopic study. **Photomed. Laser Surg.**, v.23, n.1, p.27-31, 2005.
- LOPES, C. B., *et al.* Infrared laser photobiomodulation (830 nm) on bone tissue around dental implants: a raman spectroscopy and scanning electronic microscopy study in rabbits. **Photomed. Laser Surg.**, v.25, n.2, p.96-101, 2007.
- LOPES, C. B., *et al.* The effect of the association of NIR laser therapy BMPs, and guided bone regeneration on tibial fractures treated with wire osteosynthesis: Raman spectroscopy study. **J. Photochem. Photobiol. B: Biology**, v.89, n.2, p.125-130, 2007.
- MARINHO, R. M. **Climatério**. Rio de Janeiro: Medsi Editora Médica e Científica, 1995. 235p.
- MARTÍNEZ, M. E. M.; PINHEIRO, A. L. B.; RAMALHO, L. M. P. Effect of IR laser photobiomodulation on the repair of bone defects grafted with organic bovine bone. **Lasers Med. Sci.**, v.23, n.3, p.313-317, 2008.
- MARTINS, M. A. S. **Espectroscopia Raman Diferencial**. 2008. Dissertação (Mestrado em Física e Astronomia) – Universidade do Vale do Paraíba. São José dos Campos. 2008.
- MASSONE, F. **Anestesiologia veterinária: farmacologia e técnicas**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. 252p.
- MERLI, L. A., *et al.* Effect of low-intensity laser irradiation on the process of bone repair. **Photomed. Laser Surg.**, v.23, n.2, p.212-215, 2005.
- MOREIRA, L. M., *et al.* Raman spectroscopy: a powerful technique for biochemical analysis and diagnosis. **Spectros. Int. J.**, v.22, n.1, p.1-19, 2008.
- NASCIMENTO, C., *et al.* Bone repair using mineral trioxide aggregate combined to a material carrier, associated or not with calcium hydroxide in bone defects. **Micron.**, v.39, n.7, p.868-874, 2008.
- NICOLAU, R. A., *et al.* Análise da reparação óssea em fêmur de ratos utilizando-se Espectroscopia Raman. In: FÓRUM NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA EM SAÚDE, 4 outubro, 1998, Curitiba, PR. **Anais...** Curitiba, p.369-370.
- NICOLAU, R. A., *et al.* Effect of low-power GaAlAs laser (660 nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. **Lasers Med. Sci.**, v.18, n.2, p.89-94, 2003.
- NICOLAU, R. A., *et al.* Neurotransmitter release changes induced by low power 830 nm diode laser irradiation on the neuromuscular junctions of the mouse. **Lasers Surg. Med.**, v.35, n.3, p.236-41, 2004.

NICOLAU, R. A., *et al.* Electromiographic study of GaAlAs laser (685 e 830 nm) effect on masseter muscle fatigue process clinical study.. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF THE WORLD ASSOCIATION OF LASER THERAPY,6., October 25-28, 2006. Lemesos, Cyprus. **Proceedings...**, [S.L]:WALT,2006.

NISSAN, J., *et al.* Effect of low intensity laser irradiation on surgically created bony defects in rats. **J. Oral Rehabil.**, v.33, n.8, p.619-924, 2006.

NOGUEIRA, G. V., *et al.* Raman spectroscopy study of atherosclerosis in human carotid artery. **J. Biomed. Opt.**,v.10, n.3, p.031117-1 – 031117-7, 2005.

OBRADOVIĆ, R. R.; KESIĆ, L. G.; PEŠEVSKA, S. Influence of low-level laser therapy on biomaterial osseointegration: a mini-review. **Lasers Med. Sci.**, DOI: 10.1007/s10103-008-0573-z, 2008.

OTTO, C., *et al.* Applications of micro-raman imaging in biomedical research. **J. Raman Spectros.**, v.28, n.?, p.143-150, 1997.

PAULA JÚNIOR, A. R; SATHAIAH, S. Raman spectroscopy for diagnosis of atherosclerosis: a rapid analysis using neural networks. **Med. Eng. Phys.**, v. 27, n. 3, p.237-244, 2005.

PINHEIRO, A. L. B., *et al.* Biomodulatory effects of LLLT on bone regeneration. **Laser Therapy.** v.13, p.73-78, 2001.

PINHEIRO, A. L. B., *et al.* Effect of 830-nm laser light on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone and decalcified cortical osseous membrane. **J. Clin. Laser Med.**, v.21, n.6, p.383-388, 2003.

PINHEIRO, A. L. B., *et al.* Effect of low level laser therapy on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone. **Braz. Dent. J.**, v.14, n.3, p.177-181, 2003.

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

RAGHOEBAR, G. M., *et al.* Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor?. **Clin. Oral Implants Res.**, v.16, n.3 p.349-356, 2005.

RESTREPO, L. L. V., *et al.* Avaliação de implantes de osso bovino liofilizado Osseobond e membrana reabsorvível de osso bovino liofilizado: estudo microscópico em tibia de ratos (wistar albinus). **Rev. Bras. Implant.**, v.4, n.1, p.8-14, 1998.

ROBERTS, W. E., *et al.* Bone physiology and metabolism. **CDA J.**, v.15, n.10, p.54-61, 1987.

ROCHKIND, S., *et al.* Molecular structure of the bony tissue after experimental trauma to the mandibular region followed by laser therapy. **Photomed. Laser Surg.**, v.22, n.3, p.249-253, 2004.

- SATHAIAH, S., *et al.* **Promotion of bone repair by low power laser therapy: a Raman spectral investigation.** In: INTERNATIONAL Conference ICASS and FACSS, v. 45, p.24-29, 1999.
- SCHANAIDER, A.; SILVA, P. C. Uso de animais em cirurgia experimental. **Acta Cir. Bras.**, v.19, n.4, p. 441-447, 2004.
- SCHRADER, B., *et al.* NIR FT Raman spectroscopy in medical diagnosis. **J. Mol. Struct.**, v. 348, p. 293-296, 1995.
- SCHRADER, B.; DIPPEL, B. NIR Raman spectroscopy in medicine and biology: results and aspects. **J. Mol. Struct.**, v. 480/481, p.21-32, 1999.
- SILVEIRA JÚNIOR, L. **Correlação entre a técnica de Espectroscopia Raman e a Análise Histológica das placas ateromatosas em artérias coronárias humanas.** 2001. 109f. Tese (Doutorado em Ciências - Área de concentração de Fisiopatologia experimental) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- SILVEIRA JÚNIOR, L., *et al.* Near infrared Raman spectroscopy of human coronary arteries: histopathological classification based on Mahalanobis distance. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v.21, n.4, p.203-208, 2003.
- SOARES, L.E.S.; BRUGNERA Jr, A.; ZANIN, F.A.A.; PACHECO, M.T.T.; MARTIN, A.A. Effects of treatment for manipulation of teeth and Er:YAG laser irradiation on dentin: A Raman spectroscopy analysis. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.25, n.1, p.50-57, 2007.
- TIMLIN, J. A.; CARDEN, A; MORRIS, M. D. Chemical microstructure of cortical bone probed by Raman transects. **Applied Spectroscopy**, v.53, n.11, p.1429-1435, 1999.
- TORRES, C. S., *et al.*, Does the use of laser photobiomodulation, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration improve the outcome of autologous bone grafts? An in vivo study in a rodent model. **Photomed. Laser Surg.**, v. 26, n. 4, p.371-377, 2008.
- VÉLEZ, M.; TRELLES; M.; RIGAU, J. Características y parámetros dosimétricos de los sistemas láser y otros sistemas lumínicos. In: CISNEROS, J. L.; CAMACHO, F. Eds. **Láser u fuentes de luz pulsada intensa en dermatología y dermatocosmética.** Madrid: Aula Médica Ediciones; p. 57-68, 2000.
- WEBER, J. B. B., *et al.* Laser therapy improves healing of bone defects submitted to autologous bone graft. **Photomed. Laser Surg.**, v.24, n.1, p.38-44, 2006.
- WILDEN, L.; KERTHEIN, R. Import of radiation phenomena of electrons and therapeutic low-level laser in regard to the mitochondrial energy transfer. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v.16, n.3, p.159-165, 1998.

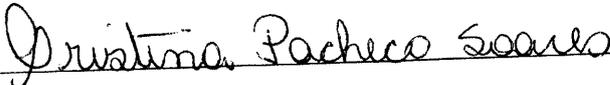
Anexo A – Comitê de Ética

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
UNIVAP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n.º A074/CEP/2007, sobre "*Avaliação histológica da FBML (780 nm) no reparo de defeitos ósseos tratados ou não com MTA, BMP e ROG*", sob a responsabilidade de *Vitor Leão Casalechi*, sofreu alteração no projeto inicial, com aumento no número de amostras de tecido ósseo e modificação das técnicas de análise, acarretando alteração no título do projeto para "**AVALIAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA RAMAN DO EFEITO DO LASER (790 nm) EM REPARO DE DEFEITOS ÓSSEOS**".

São José dos Campos, 26 de março de 2009

 _____

PROFA. DRA. CRISTINA PACHECO SOARES

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade do Vale do Paraíba – Univap