

**CRISTINA DE MORAES IZQUIERDO**

**EFEITO DA LASERTERAPIA (GaAIIAs) NO PROCESSO DE REPARO DOS  
TECIDOS ÓSSEO E MOLE EM RATOS SUBMETIDOS À TERAPIA COM  
ZOLENDRONATO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial (projeto de pesquisa avaliado e aprovado pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – protocolo n°. 0104/08).

Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber  
- *Orientador* –

Prof. Manoel Sant´anna Filho  
Prof. Rogério Miranda Pagnoncelli  
Profª. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira  
- *Pesquisadores associados* -

**PORTO ALEGRE**

**2011**

**Dados Internacionais de  
Catalogação na Publicação (CIP)**

I99e Izquierdo, Cristina de Moraes

Efeito da laserterapia (GaAIs) no processo de reparo dos tecidos ósseo e mole em ratos submetidos à terapia com Zolendronato / Cristina de Moraes Izquierdo. – Porto Alegre, 2011.

138 f.

Diss. (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Pós-Graduação em Odontologia, Área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, PUCRS.

**Bibliotecário Responsável**

Ginamara Lima Jacques Pinto

CRB 10/1204



*DEDICATORIA*

---

## DEDICATÓRIA

---

A minha amada avó Dalila sempre presente em minha vida com gestos de amor e palavras doces. Exemplo de superação, força e bondade. Pessoa para quem realizei essa pesquisa sobre os bisfosfonatos.

A minha amada mãe Tânia, o protótipo do amor, minha fortaleza e meu exemplo de vida. Única responsável pela minha formação, baseada nos valores ideais de ética, moral, respeito e amor. Sempre presente em todos os momentos da minha caminhada, me ensinando a viver com fé, e principalmente, me lembrando que devo sonhar sempre, cada vez mais alto, porque sou maior que meus sonhos.

Ao meu amado pai Antonio (*in memoriam*), meu anjo da guarda – está vivo em minha lembrança. Deus nos permitiu um curto período de convivência, mas o eternizou em minha memória e em meu coração. Na certeza de um dia reencontrá-lo, sigo seus passos, grande exemplo.

Ao meu também amado pai James. Considerando que a vida é uma caixa de surpresas, de repente, descobertas, pesquisas e quebra de juramento possibilitaram-me a felicidade e a alegria de dar respostas aos meus questionamentos. Pai, para nós, Deus nos reservou o futuro.

Aos meus amados irmãos Carlos e Antonio - meus ídolos - exemplos de vida. Sempre presentes na minha caminhada: incentivando-me; não me deixando fracassar; indicando-me a estrada certa da vida; ensinando-me como ser forte sem perder a doçura; fazendo-me sorrir - mesmo nos momentos mais difíceis; não me permitindo desistir de nada – acreditando que posso alcançar tudo que desejo. Grandes amigos, companheiros de todas as horas, ensinam-me a ser alguém melhor. Espelho-me em vocês, meus queridos, mais que irmãos - meus amigos.



*AGRADECIMENTOS ESPECIAIS*

---

## *AGRADECIMENTOS ESPECIAIS*

---

A Deus pela arte da vida.

A minha família linda, pelo amor incondicional e por me transmitirem paz nos momentos de desafios.

Aos professores que estiveram ao meu lado nessa trajetória acadêmica, iniciada na minha especialização, Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber pela orientação durante esse trabalho. Nossa caminhada acadêmica já tem colhido bons resultados graças ao seu comprometimento e sabedoria evidenciados como orientador e mestre, e entusiasmo como pesquisador. Profa. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira por sua dedicação e ensinamentos transmitidos com excelência. Aos meus queridos mestres João e Marília, fica a certeza do profissionalismo retido e objetividade com que conduzem seus atos. Mas segundo o escritor francês Antoine de Saint-Exupéry, só constrói quem ama. A seriedade com que atuam não mascara a satisfação e o amor visivelmente empenhados no exercício de sua profissão. Tornaram-me confiante na busca dos meus ideais profissionais. Com carinho e orgulho, aqui estou. Ajudaram a escrever minha história, e hoje, fazem parte dela. Nessa vida acadêmica, não adquiri apenas novos conhecimentos; também fiz dois grandes amigos!



## *AGRADECIMENTOS*

---

A Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, na pessoa de seu Reitor, Prof. Dr. Joaquim Clotet.

A Faculdade de Odontologia da PUCRS, na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. Marcos Túlio Mazzini Carvalho.

Ao ex-diretor da Faculdade de Odontologia da PUCRS, Prof. Dr. Raphael Onorino Carlos Loro (*in memoriam*), pelo seu exemplo.

Ao coordenador do programa de pós-graduação da Faculdade de Odontologia Prof. Dr. José Antonio Poli de Figueiredo.

A CAPES pelo financiamento desse curso.

Ao Prof. Dr. Manoel Sant'anna Filho, pelos ensinamentos transmitidos com excelência, e imensa contribuição para análise histológica desse estudo.

Ao Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli, pela atenção dispensada para a realização dessa pesquisa, através de sua orientação na área de farmacologia e laserterapia, e pelos ensinamentos em cirurgia, transmitidos ao longo do curso, com extrema competência.

Ao Prof. Dr. Claiton Heitz por ensinar a Odontologia com brilhantismo e alegria, sem banalizar a técnica; mas, principalmente, por transmitir o conhecimento em cirurgia de modo exemplar.

Ao Prof. Dr. Rogério Belle, pelas aulas teóricas e práticas cirúrgicas aplicadas com rigor técnico e sabedoria.

A Profa. Dra. Daniela Nascimento, pelos ensinamentos transmitidos com dedicação e competência.



Aos professores do Mestrado em CTBMF da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

A Profa. Dra. Nilza Pereira da Costa e Prof. Dr. Ivori Dutra da Silveira, grandes mestres, responsáveis pela minha iniciação científica.

Ao Prof. Dr. João Moraes Feliz pela contribuição na análise estatística desse estudo.

Ao Sr. Arno, funcionário do Instituto Idéia da PUCRS, pela sua colaboração para realizar a captação e elaboração das imagens histológicas do trabalho.

A Vanessa Stamatto, funcionária do Laboratório de Anatomia e Patologia do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Odontologia da PUCRS, pela colaboração para realização desse trabalho.

A colega Francine pela colaboração na fase experimental e análise dos resultados desse estudo.

Aos colegas de mestrado Alessandro, Felipe, Fernando, Juliana, Roberta, Vinícius e Wâneza, os quais estiveram presentes ao longo dessa conquista.

A médica veterinária da FEPPS, Dra. Luiza Gomes de Macedo Braga, pelo trabalho de dedicação e assistência aos animais que constituíram a amostra dessa pesquisa.

A Lucinara Dadda Dias, funcionária do Biotério de Manutenção do Laboratório de Experimentação Animal do Instituto de Cardiologia de Porto Alegre (FEPPS), pela colaboração durante a fase experimental do estudo.



*EPÍGRAFE*

---

*Senhor! Fazei de mim instrumento de vossa paz.  
Onde houver ódio, que eu leve o amor;  
Onde houver ofensa, que eu leve o perdão;  
Onde houver discórdia, que eu leve a união;  
Onde houver dúvida, que eu leve a fé;  
Onde houver erro, que eu leve a verdade;  
Onde houver desespero, que eu leve a esperança;  
Onde houver tristeza, que eu leve a alegria;  
Onde houver trevas, que eu leve a luz.  
Ó Mestre, Fazei que eu procure mais  
consolar, que ser consolado;  
compreender, que ser compreendido;  
amar, que ser amado.  
Pois, é dando que se recebe,  
é perdoando que se é perdoado,  
e é morrendo que se vive para a vida eterna.*

*(Oração de Paz de São Francisco de Assis)*



*RESUMO*

---

## *RESUMO*

---

Os bisfosfonatos (BPs) são medicamentos utilizados para tratamento de distúrbios reabsortivos do tecido ósseo. Administrados por via oral ou endovenosa, os BPs inibem a atividade osteoclástica suprimindo a remodelação óssea mediada pelos osteoclastos e ficam acumulados de modo persistente na matriz óssea mineralizada. Apesar do benefício de sua utilização, há uma potencial relação entre a terapia com bisfosfonatos e a osteonecrose de maxilares. Nesse estudo foram utilizados 54 ratos. Os animais foram selecionados aleatoriamente e divididos, de modo randomizado, em 3 grupos contendo 18 espécimes. Em todos os grupos, o período de observação foi de 03 meses. O grupo G1 foi o controle; o G2 recebeu a medicação sem laserterapia (LLLT) e o G3 foi o grupo teste que recebeu terapia medicamentosa e laserterapia. Cada grupo foi subdividido em 2 subgrupos contendo 9 espécimes. No subgrupo A foi feita a exodontia do incisivo inferior esquerdo; enquanto que no subgrupo B foi realizado um desgaste com broca na região do primeiro molar inferior esquerdo. A terapia medicamentosa foi realizada com o zolendronato e administrada em doses de 0,6 mg/kg, iniciadas um mês antes da cirurgia. Em cada espécime foi aplicada uma dose da solução a cada 28 dias, totalizando 3 aplicações da substância. A exodontia do incisivo inferior ou defeito com broca foi realizado sete dias após a segunda dose do fármaco. A LLLT foi realizada no momento do procedimento e a cada 48h, com dose de 1J/cm<sup>2</sup>, aplicada de forma pontual com potência de 90 mW e comprimento de onda de 830 nm. As peças foram observadas através das análises macroscópica, histológica e histomorfométrica. A análise estatística foi realizada através dos testes Qui-quadrado, Exato de Fisher e Anova. De acordo com a metodologia utilizada, os

autores concluíram que o Zolendronato associado a uma patologia local, potencializa a possibilidade de ocorrência da osteonecrose. E que a laserterapia não impede o estabelecimento da mesma no protocolo utilizado.

**Palavras-Chave:** *Lasers; Cicatrização; Osteonecrose.*



*ABSTRACT*

---

## *ABSTRACT*

---

Bisphosphonates are drugs, administered/given either orally or intravenously, that are used to treat bone disorders. They inhibit osteoclast formation by suppressing osteoclast-mediated bone resorption and accumulate persistently in the mineralized bone matrix. Notwithstanding the benefit obtained from their use, treatment with bisphosphonates has been associated with maxillary bone necrosis. In this study, 54 rats were used. The rats were randomized into three different groups: G1 (control group); G2 (group treated with zoledronic acid) and G3 (group treated with zoledronic acid and laser therapy). Each group was divided in 2 subgroups (A and B). In group A, the incisive were extracted. In group B, a bur was used to remove bone from the first molar region. Zoledronic acid treatment was initiated one month before surgery and given in three doses of 0,6 mg/kg. Low-level laser therapy was applied during the procedure and every 48h, at a dose of 1J/cm<sup>2</sup>, given punctually, using a power of 90 mW and wavelength of  $\lambda=830\text{nm}$ . The rats were killed at 44 days after the surgical procedure. Specimens were evaluated macroscopically, and underwent histological and histomorphometric analysis. Statistical analysis included the Chi-Square test, Fisher's Exact test and Anova test. The results indicated that laser therapy didn't prevent the osteonecrosis. And that Zolendronic Acid associated with a local pathology has the potencial to increase the occurrence of osteonecrosis.

**Keywords:** Lasers; Wound Healing; Osteonecrosis.





*LISTA DE FIGURAS*

---

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01</b> -	Prateleira ventilada.....	65
<b>Figura 02</b> -	Duas espécimes por gaiola.....	67
<b>Figura 03</b> -	Etiqueta (identificação da gaiola).....	67
<b>Figura 04</b> -	Identificação da amostra com marcações na cauda (exemplos G1A VI e G3 A II).....	68
<b>Figura 05</b> -	Técnica anestésica.....	69
<b>Figura 06</b> -	Técnica de exodontia. (A) mesa cirúrgica com instrumental utilizado; (B) sindesmotomia; (C e D) remoção do dente com movimento curvo; (E) sutura; (F) incisivo inferior esquerdo.....	70
<b>Figura 07</b> -	Técnica cirúrgica: defeito com broca. (A) mesa cirúrgica com instrumentais utilizados; (B) detalhe do afastamento; (C) equipamento de aspiração; (D) broca com marcação em tinta montada em peça reta de micro-motor.....	71
<b>Figura 08</b> -	Técnica de aplicação intra-peritoneal .....	72
<b>Figura 09</b> -	Cabine de Troca (Tecniplast <sup>®</sup> CS5): o ar ambiente é introduzido num módulo de envio, previamente filtrado e dirigido num filtro HEPA, antes de ser distribuído na área de trabalho com fluxo laminar unidirecional.....	73
<b>Figura 10</b> -	Aparelho de <i>laser</i> de baixa potência (Thera laser <sup>®</sup> ).....	74
<b>Figura 11</b> -	Laserterapia imediatamente após a exodontia (aplicação intra-oral diretamente sobre a loja cirúrgica) e 48 horas após o procedimento (aplicação extra-oral).....	74
<b>Figura 12</b> -	laserterapia imediatamente após a exodontia (aplicação intra-oral diretamente sobre a loja cirúrgica) e 48 horas após o procedimento (aplicação extra-oral).....	75
<b>Figura 13</b> -	Ilustração da mesa aquecida.....	75
<b>Figura 14</b> -	Câmara de CO <sub>2</sub> .....	76
<b>Figura 15</b> -	Foto realizada prévia a obtenção da amostra, e imagem aproximada - com detalhe da área manipulada.....	77
<b>Figura 16</b> -	Mandíbula desarticulada. Linha indicando a divisão das hemimandíbulas.....	78
<b>Figura 17</b> -	Padronização da imagem capturada. (A) Hemimandíbula de rato. (B) Extensa relação do incisivo com a mandíbula.....	79
<b>Figura 18</b> -	Mosaico: imagem constituída pela sobreposição de 08 imagens com aumento de 10X. A montagem permite analisar, com mais detalhe, a mesma área fotografada uma única vez no aumento de 5X.....	82
<b>Figura 19</b> -	Autocorreção da imagem.....	83
<b>Figura 20</b> -	Padronização do tamanho.....	84
<b>Figura 21</b> -	Remoção da cor das margens.....	85
<b>Figura 22</b> -	Movimentação das imagens e formação do mosaico.....	86
<b>Figura 23</b> -	Imagem histológica aleatória para ilustrar o aumento de 5X em que foi realizada a análise histomorfométrica.....	87
<b>Figura 24</b> -	Aspecto macroscópico de uma amostra do grupo controle.....	94

<b>Figura 25 -</b>	Aspecto macroscópico de uma amostra do grupo teste sem laserterapia.....	95
<b>Figura 26 -</b>	Aspecto macroscópico de uma amostra do grupo teste com laserterapia.....	96
<b>Figura 27 -</b>	Mosaico G1 A: montagem de imagens obtidas a partir de uma amostra do grupo controle submetido a exodontia.....	101
<b>Figura 28 -</b>	Mosaico G1 B: montagem de imagens obtidas a partir de uma amostra do grupo controle submetido ao procedimento com broca.....	102
<b>Figura 29 -</b>	Mosaico G2 A: montagem de imagens obtidas a partir de uma amostra do grupo teste, sem laserterapia, submetido a exodontia.....	103
<b>Figura 30 -</b>	Mosaico G2 B: montagem de imagens obtidas a partir de uma amostra do grupo teste, sem laserterapia, submetido ao procedimento com broca.....	104
<b>Figura 31 -</b>	Mosaico G3 A: montagem de imagens obtidas a partir de uma amostra do grupo teste, com laserterapia, submetido a exodontia.....	105
<b>Figura 32 -</b>	Mosaico G3 B: montagem de imagens obtidas a partir de uma amostra do grupo teste, com laserterapia, submetido ao procedimento com broca.....	106



*LISTA DE QUADROS E TABELAS*

---

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

---

<b>Quadro 01</b> - Organização dos grupos.....	66
<b>Tabela 01</b> - Associação entre os subgrupos e o processo de reparo epitelial completo. Teste Exato de Fisher: $p = ,001$ .....	91
<b>Tabela 02</b> - Associação entre os grupos e o processo de reparo epitelial completo. Teste Qui-quadrado: $p = ,017$ .....	91
<b>Tabela 03</b> - Associação entre os métodos e o processo de reparo epitelial completo. Teste Qui-quadrado: $p = ,045$ .....	92
<b>Tabela 04</b> - Associação entre os grupos e a presença de osso exposto. Teste Exato de Fisher: $p = ,026$ .....	92
<b>Tabela 05</b> - Associação entre os métodos e a presença de osso exposto. Teste Qui-quadrado: $p = ,000$ .....	92
<b>Tabela 06</b> - Análise de resíduos Ajustados associando os níveis de tratamento e exposição óssea.....	93
<b>Tabela 07</b> - Análise de Resíduos ajustados associando os níveis de tratamento e o processo de reparo epitelial completo.....	93
<b>Quadro 02</b> - Análise macroscópica do grupo controle.....	94
<b>Quadro 03</b> - Análise macroscópica do grupo teste com terapia medicamentosa e sem laserterapia.....	95
<b>Quadro 04</b> - Análise macroscópica do grupo teste com terapia medicamentosa e laserterapia.....	96
<b>Quadro 05</b> - Resultado da análise histológica. Tecido de granulação (0 = ausência de pus; 1 = presença de pus); tecido ósseo (0 = ausência de osso necrótico; 1 = presença de pouco osso necrótico; 2 = presença predominante de osso necrótico).....	97
<b>Tabela 08</b> - Associação entre os subgrupos e a presença de necrose óssea. Teste Exato de Fisher: $p = ,000$ .....	98
<b>Tabela 09</b> - Associação entre os grupos e a presença de necrose óssea. Teste Exato de Fisher: $p = ,000$ .....	98
<b>Tabela 10</b> - Associação entre os métodos e a presença de necrose Teste Exato de Fisher: $p = ,000$ .....	99
<b>Tabela 11</b> - Associação entre os subgrupos e a presença de pus. Teste Exato de Fisher: $p = ,001$ .....	99
<b>Tabela 12</b> - Associação entre os grupos e a presença de pus. Teste Qui-quadrado: $p = ,867$ .....	99
<b>Tabela 13</b> - Associação entre os métodos e o processo de reparo epitelial completo. Teste qui-quadrado: $p = ,000$ .....	100
<b>Quadro 06</b> - Resultado da análise morfométrica.....	107



*LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS*

---

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

---

ATP	- Adenosina – Trifosfato
BPs	- Bisfosfonatos
°C	- Graus centígrados
cm	- Centímetro
cm <sup>2</sup>	- Centímetro quadrado
EV	- Endovenoso
g	- Grama
GaAs	- Arseneto de Gálio
GaAlAs	- Arseneto de Gálio e Alumínio
H	- Hora
HE	- Hematoxilina-Eosina
HeNe	- Hélio-Neônio
Hz	- Hertz
J	- Joule
J/cm <sup>2</sup>	- Joule por centímetro quadrado
LLLT	- <i>Low Level Laser Therapy</i> (Terapia laser de baixa intensidade)
mg/Kg	- Miligrama por quilo
mg/ml	- Miligrama por mililitro
ml	- Mililitro
mm	- Milímetro
mm <sup>2</sup>	- Milímetro quadrado
µm	- Micrometro
mW	- Miliwatt

Dm	- Nanometro
nBPs	- amino-bisfosfonatos
Nd:YAG	- <i>laser</i> de Neodímio
ONJ	- <i>Osteonecrosis of the Jaw</i>
P-C-P	- Estrutura química dos Bisfosfonatos
s	- Segundo
W	- Watt
$\lambda$	- Comprimento de onda
®	- Marca registrada





*SUMÁRIO*

---

## SUMÁRIO

---

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 PROPOSIÇÃO.....</b>	<b>5</b>
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>7</b>
<b>3.1 TECIDO ÓSSEO E BASES BIOLÓGICAS DO PROCESSO DE REPARO ÓSSEO.....</b>	<b>7</b>
<b>3.2 LASERTERAPIA.....</b>	<b>13</b>
<b>3.3 LASERTERAPIA NO PROCESSO DE REPARO.....</b>	<b>30</b>
<b>3.4 BISFOSFONATOS.....</b>	<b>44</b>
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>62</b>
<b>4.1 RESPALDO ÉTICO.....</b>	<b>62</b>
<b>4.2 CARACTERIZAÇÃO.....</b>	<b>62</b>
<b>4.3 VARIÁVEIS.....</b>	<b>62</b>
<b>4.4 HIPÓTESE.....</b>	<b>63</b>
<b>4.5 CÁLCULO DA AMOSTRA.....</b>	<b>63</b>
<b>4.6 CONFIGURAÇÃO DA AMOSTRA.....</b>	<b>63</b>
<b>4.7 MACROAMBIENTE E MICROAMBIENTE.....</b>	<b>64</b>
<b>4.8 ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS.....</b>	<b>65</b>
<b>4.9 IDENTIFICAÇÃO DO ESPÉCIME.....</b>	<b>66</b>
<b>4.10 TÉCNICA CIRÚRGICA.....</b>	<b>68</b>
<b>4.11 MEDICAÇÃO.....</b>	<b>72</b>
<b>4.12 LASERTERAPIA.....</b>	<b>73</b>
<b>4.13 PÓS-OPERATÓRIO.....</b>	<b>75</b>
<b>4.14 PREPARO DAS AMOSTRAS.....</b>	<b>76</b>
<b>4.15 ANÁLISE DAS AMOSTRAS.....</b>	<b>79</b>
<b>4.15.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA.....</b>	<b>80</b>
<b>4.15.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....</b>	<b>80</b>
<b>4.15.3 ANÁLISE DESCRITIVA POR OBSERVAÇÃO DE MOSAICO.....</b>	<b>81</b>
<b>4.15.4 ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....</b>	<b>87</b>
<b>4.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>88</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>90</b>
<b>5.1 RESULTADOS DO EXAME MACROSCÓPICO.....</b>	<b>91</b>
<b>5.2 RESULTADO DA ANÁLISE HISTOLÓGICA.....</b>	<b>97</b>
<b>5.3 RESULTADO DA ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....</b>	<b>107</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>110</b>

<b><i>7 CONCLUSÃO</i></b> .....	<b>121</b>
<b><i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i></b> .....	<b>123</b>
<b><i>APÊNDICE</i></b> .....	<b>133</b>
<b>APÊNDICE 1 – PESO MÉDIO DOS ANIMAIS, EM CADA SUBGRUPO, DURANTE O EXPERIMENTO..</b>	<b>133</b>
<b><i>ANEXOS</i></b> .....	<b>135</b>
<b>ANEXO A – PROTOCOLO DA COMISSÃO CIENTÍFICA E DE ÉTICA DA PUCRS</b> .....	<b>135</b>
<b>ANEXO B – PROTOCOLO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS (CEUA)</b> .....	<b>136</b>
<b>ANEXO C – DECLARAÇÃO DO CHEFE DE SERVIÇO DE MEDICINA EXPERIMENTAL DO LABORATÓRIO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DO INSTITUTO DE CARDIOLOGIA DO RIO GRANDE DO SUL</b> .....	<b>137</b>
<b>ANEXO D – AUTORIZAÇÃO PARA USO DE DEPENDÊNCIAS DO LABORATÓRIO DE ANATOMIA PATOLÓGICA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL</b> .....	<b>138</b>



*INTRODUÇÃO*

---

## 1 INTRODUÇÃO

---

Bifosfonatos (BPs) são medicamentos utilizados no tratamento de numerosas doenças que afetam os ossos, entre elas: osteoporose, neoplasias malignas com metástase óssea, hipercalcemia maligna e mieloma múltiplo. As drogas são desenvolvidas para serem administradas via oral ou endovenosa. Alendronato, etidronato, ibandronato, pamidronato, risedronato, tiludronato e zolendronato são os nomes genéricos dessas medicações. Todas apresentam nitrogênio em sua composição, exceto o etidronato e tiludronato (KUMAR; MERU; SEDGHIZADEH, 2008). Os BPs são análogos químicos da substância endógena – ácido pirofosfórico – que no organismo se encontra como pirofosfato, um inibidor natural da reabsorção óssea. Essa substância sofre rápida hidrólise enzimática. A substituição do átomo central de oxigênio por carbono faz com que os BPs sejam resistentes a essa hidrólise. Essa substância, substituída por uma ligação P-C-P, é pobremente metabolizada pelas enzimas biológicas, causando a permanência dos BPs na circulação. A hidroxila no átomo de carbono é responsável pela grande afinidade dos BPs com nitrogênio na superfície óssea. A eficácia dessa medicação é atribuída à forte especificidade pelo osso e ao mínimo metabolismo sofrido (FERNANDES; LEITE; LANÇAS, 2005).

Entre as propriedades farmacológicas dessa medicação estão: inibição potente da atividade osteoclástica, suprimindo a remodelação óssea mediada por estas células; acúmulo persistente, por anos, da medicação na matriz óssea mineralizada e forte aderência com cristais de hidroxiapatita concentradas seletivamente no osso. A intolerância gastrointestinal, fratura óssea, mialgia, deterioração da função renal, falência renal, erosão e úlceras esofágicas e efeitos

anti-angiogênicos são efeitos adversos dos BPs (MCKAGUE; JORGENSON; BUXTON, 2010; FERNANDES; LEITE; LANÇAS, 2005).

Apesar dos benefícios dessa medicação, a osteonecrose é descrita desde 2003, como efeito adverso em pacientes realizando a terapia com zolendronato, pamidronato ou alendronato (RUGGIERO; DREW, 2007; MARX et al., 2005; MARX, 2003). O trauma dento-alveolar foi o fator de risco mais prevalente. A duração da terapia com a medicação também está relacionada com o desenvolvimento de necrose óssea. Inicialmente, essas lesões ocorriam com o uso das formas endovenosas; mas existem relatos de osteonecrose em pacientes utilizando drogas menos potentes por via oral (MARX et al., 2005). O tipo, dose, potência e duração da droga administrada são fatores importantes e determinantes para o efeito cumulativo da substância no organismo e, conseqüentemente, sua influência na modelação óssea e risco de produzir necrose (MERIGO, 2006). A inibição da função osteoclástica pode impedir o reparo, levando à necrose óssea. Deve-se considerar a propriedade anti-angiogênica de certos BPs.

Osteonecrose em maxilares de pacientes em tratamento com BPs pode se manifestar como exposição do osso avascular na mandíbula, maxila ou ambos. Os pacientes relatam dor, dificuldades para alimentar-se e falar, sangramento, e quando a necrose é extensa e ocorre próxima ao ramo mandibular do nervo trigêmio, podem apresentar parestesia no lábio inferior. Sinusites, fístulas bucais e cutâneas, uma ou mais perdas dentárias, fratura patológica da mandíbula, linfadenopatia são sinais e sintomas que estão frequentemente presentes (VESCOVI et al., 2008).

Todo indivíduo que se submeter a esse tipo de terapia medicamentosa deve informar ao cirurgião-dentista. Um exame clínico rigoroso deve minimizar a

necessidade de procedimentos odontológicos invasivos futuramente (MERIGO et al., 2006), diminuindo o risco de ocorrer necrose.

Estudos têm mostrado a eficiência do uso de antibióticos no tratamento sintomático das necroses. Pesquisas utilizando a laserterapia (LLLT) como possibilidade de tratamento para as necroses associadas a maxilares têm sido realizadas mostrando que a LLLT tem efeito bioestimulador e potencial antimicrobiano quando utilizada em tecidos bucais (VESCOVI et al., 2007; VESCOVI et al., 2008). Os *lasers* mais utilizados são os *lasers* Hélio-Neônio (HeNe) e os diodos (BASFORD, 1995; PINHEIRO et al., 1998). Os *lasers* diodos mais comumente utilizados são, geralmente, variações do GaAlAs, o qual emite um espectro na faixa do infra-vermelho (WALSH, 1997).

A literatura refere o uso da LLLT para tratamento de necrose óssea estabelecida em maxila e mandíbula de paciente utilizando bifosfonato (VESCOVI et al., 2007; VESCOVI et al., 2008). O objetivo deste estudo foi verificar o efeito do *laser* no processo de reparo dos tecidos ósseo e mole influenciado pela terapia com bifosfonato.



*PROPOSIÇÃO*

---



## 2 PROPOSIÇÃO

---

- 1- Analisar o efeito da terapia medicamentosa com o ácido zolendrônico no processo de reparo dos tecidos ósseo e mole em ratos.
- 2- Avaliar o efeito da laserterapia (GaAIIAs de 830 nm) no processo de reparo de tecidos ósseo e mole, em ratos submetidos à terapia com Zolendronato
- 3- Verificar se a laserterapia (GaAIIAs) impede o estabelecimento da osteonecrose.

Avaliar de forma específica, em ambas condições descritas, o processo de reparo ósseo e mole, após:

- exodontia do incisivo inferior esquerdo, através de uma extração traumática com fraturas múltiplas da parede óssea;
- criação de uma área de defeito ósseo através de desgaste com broca da coroa e 1/3 radicular do primeiro molar inferior esquerdo; simulando, assim, restos radiculares mantidos sem tratamento, como potenciais focos de infecção.



#### **3.1 TECIDO ÓSSEO E BASES BIOLÓGICAS DO PROCESSO DE REPARO ÓSSEO**

O processo de reparo ósseo é descrito por três fases: inflamatória, reparadora e de remodelação. A inflamatória é caracterizada pela formação de um coágulo sanguíneo que envolve as superfícies ósseas no local da lesão, estendendo-se pelo periósteo e cavidades medulares próximas, acompanhada de edema mais ou menos intenso. Instala-se assim um processo inflamatório agudo com grande mobilização de neutrófilos e macrófagos, provocado pela liberação de substâncias quimiotáticas (histamina e serotonina) no local lesionado. Essa fagocitose tem como objetivo começar a remoção do coágulo das regiões necrosadas, bem como dos osteócitos mortos que surgem nas superfícies ósseas da região lesionada. Imediatamente, inicia-se a fase reparadora com o aparecimento de um grande número de fibroblastos produtores de colágeno e responsáveis pela formação de um calo fibroso, no qual as fibras colágenas envolvem a região lesionada. À medida que a ação dos macrófagos prossegue, reabsorvendo o coágulo e o tecido ósseo necrosado, surge gradativamente uma nova rede capilar, oriunda das células endoteliais remanescentes dos vasos rompidos e das células mesenquimais indiferenciadas, que invade a região do coágulo juntamente com fibroblastos e osteoblastos, para formar rapidamente um novo tecido ósseo, por meio de um processo de ossificação intramembranosa ou endoconjuntiva. O calo ósseo tem uma textura própria, sendo mais celular e menos mineralizado, indicando a rapidez do

processo de ossificação e justificando a denominação de osso imaturo. Na fase remodeladora, o calo ósseo passa por uma série de processos de reabsorção e neoformação até que a região lesionada retome a textura próxima àquela antes da lesão. As atividades osteoblásticas e osteoclásticas removem os excessos de material do calo ósseo, restabelecendo as cavidades ósseas que existiam, e reconstróem os sistemas de Havers e o trabeculado de osso esponjoso na mesma disposição anterior à lesão (CATANZARO GUIMARÃES, 1982).

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado, constituído de 33% de matriz orgânica, que inclui 28% de colágeno tipo I e o restante de matriz orgânica formada por proteínas não-colágenas, incluindo osteonectina, osteocalcina, proteína morfogênica óssea, proteoglicana óssea e sialoproteína óssea que se dispõe de maneira a formar os ossos, as estruturas rígidas e resistentes que constituem o esqueleto. Apesar do aspecto aparentemente inerte, os ossos crescem, são remodelados e se mantêm ativos durante toda a vida do organismo. Quando lesados, como em fraturas, são capazes de sofrer reparo, fenômeno que demonstra sua permanente vitalidade. A homeostase do tecido ósseo é controlada por fatores mecânicos e humorais, locais e gerais (TEN CATE, 1994).

O colágeno do osso representa cerca de metade do colágeno total do corpo humano e está representado quase que exclusivamente na forma de fibras do tipo I. Tanto o colágeno quanto os demais constituintes da matriz orgânica são sintetizados pelo retículo endoplasmático dos osteoblastos. Após a fase de maturação, sais amorfos de fosfato de cálcio começam a precipitar na área do colágeno. Tais focos de mineralização expandem-se e coalescem em cristais de hidroxiapatita para a

futura remodelação. O componente mineral do osso é constituído basicamente por cálcio e fosfato, na forma de cristais de hidroxapatita (BURKITT; YOUNG; HEATH, 1997).

O osso trabeculado não é somente o primeiro tipo a ser formado durante o desenvolvimento do esqueleto, mas também o primeiro a ser depositado durante o processo de reparo de uma fratura. No sítio de fratura, um coágulo sanguíneo é formado inicialmente, mais tarde substituído por tecido colágeno altamente vascularizado (tecido de granulação), o qual se torna progressivamente mais fibroso. As células mesenquimais diferenciam-se em condroblastos e, progressivamente, substituem este tecido fibroso de granulação com cartilagem hialina. Esta ponte firme, mas ainda flexível, é conhecida como calo provisório. Posteriormente, o mesmo é reforçado pela deposição de sais de cálcio na matriz cartilaginosa. As células osteoprogenitoras do endóstio e do perióstio são, a seguir, ativadas e depositam uma trama de osso trabecular no interior e ao redor do calo provisório, transformando-o em calo ósseo. A união óssea é atingida quando o sítio de fratura é completamente unido pelo osso. Sob a influência do estresse funcional, o calo ósseo é lentamente remodelado para formar osso maduro (BURKITT; YOUNG; HEATH, 1997).

Para Marsh e Li (1999), o processo de reparo 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 fibronectina, fatores de crescimento derivados de plaquetas e fatores de crescimento transformadores, os

quais estimulam o influxo de células inflamatórias. A cascata de citocina subsequente traz as células de reparo (fibroblastos, células endoteliais e osteoblastos) para a região da fratura.

- formação de calo frágil (fase proliferativa): caracteriza-se pela formação de tecidos conectivos, incluindo cartilagem, e formação de novos capilares de vasos preexistentes (angiogênese).

- formação de calo rígido (fase de maturação ou remodelação): 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 esse é organizado ao acaso, além de 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 por osteoblastos.

O tecido ósseo é o constituinte principal do esqueleto, serve de suporte para as partes moles e protege órgãos vitais, como os contidos nas caixas cranianas e torácica e no canal raquidiano. Além do mais, aloja e protege a medula óssea, formadora das células do sangue, proporciona apoio aos músculos esqueléticos, transformando suas contrações em movimentos úteis, e constitui um sistema de alavancas que amplia as forças geradas na contração muscular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999)

As superfícies internas e externas dos ossos são recobertas por células osteogênicas e tecido conjuntivo, constituindo o endóstio e o perióstio,

respectivamente. A camada mais superficial do periósteo contém fibras colágenas e fibroblastos. As fibras de Sharpey são feixes de fibras colágenas do periósteo que penetram no tecido ósseo e o prendem firmemente ao periósteo.

Na sua porção mais profunda, o periósteo é mais celular e apresenta células osteoprogenitoras, morfológicamente parecidas com os fibroblastos. As células osteoprogenitoras se multiplicam por mitose e se diferenciam em osteoblastos, desempenhando papel importante no crescimento dos ossos e na reparação das fraturas. O endósteo é em geral constituído por uma camada de células osteogênicas achatadas revestindo as cavidades do osso esponjoso, o canal medular, os canais de Havers e os de Volkmann.

As principais funções do endósteo e do periósteo são a nutrição do tecido ósseo e o fornecimento de novos osteoblastos, para o crescimento e a recuperação do osso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

O osso é composto por células e por uma matriz extra-celular predominantemente colágena (colágeno do tipo I) chamada de osteóide, a qual é mineralizada pela deposição de hidroxapatita, o que oferece ao osso rigidez e força característica.

As células do tecido ósseo são:

Osteoblastos – que sintetizam osteóide e são mediadores de sua mineralização; são encontrados alinhados ao longo das superfícies ósseas.

Osteócitos – que representam, sobretudo, osteoblastos inativos aprisionados dentro do osso formado; podem auxiliar na nutrição do osso.

Osteoclastos – células fagocitárias que são capazes de reabsorver o osso e que são importantes, juntamente com os osteoblastos, na rotatividade e na remodelação constantes do osso.

Os osteoblastos e osteócitos derivam de uma célula mesenquimal primitiva, chamada de célula progenitora. Os osteoclastos, por sua vez, são células fagocitárias multinucleadas derivadas de linhagem celular dos macrófagos-monócitos (YOUNG; HEATH, 2000).

A presença de mineral faz do osso um tecido único, não somente de um ponto de vista biossintético, mas também catabólico. A quantidade de tecido ósseo presente durante o crescimento fisiológico e a remodelação do esqueleto é determinada pelo balanço entre a taxa de formação óssea e a reabsorção óssea. As células responsáveis pela reabsorção óssea são os osteoclastos, descritos originariamente, em 1873, por Albert Kolliker. Trata-se de células gigantes, multinucleadas e são os únicos tipos capazes de reabsorver tecido ósseo. Os osteoclastos são formados pela fusão de monócitos derivada do tecido hematopoético (LENER, 2000).

As funções dos osteoblastos e dos osteoclastos estão intimamente relacionadas. Durante o desenvolvimento do esqueleto. Ao longo da vida, células da linhagem dos osteoblastos sintetizam e secretam moléculas que, em troca, iniciam e controlam a diferenciação dos osteoclastos. Esta é uma interação direta e crucial que já foi bem estabelecida *in vivo*. Uma vez que os osteoblastos e osteoclastos estejam bem diferenciados, há uma menor relação direta entre ambos. O osso é constantemente destruído ou reabsorvido pelos osteoclastos e posteriormente



reposto pelos osteoblastos em um processo fisiológico denominado remodelação óssea, a qual é fortemente regulada por fatores locais e endócrinos (DUCY; SCHINKE; KARSENTY, 2000).

### **3.2 LASERTERAPIA**

Mester et al. (1971) observaram o efeito de baixas doses de *laser* na tratamento de feridas induzidas mecanicamente e em queimaduras. O processo de reparo estimulado pela radiação *laser* envolve uma velocidade aumentada de crescimento epitelial, o que pode, eventualmente, ser o ponto de partida para um crescimento neoplásico. Os autores avaliaram o efeito do *laser* rubi com comprimento de onda de  $\lambda=6,943\text{\AA}$ , densidade de energia variando de 0,5 a  $10\text{J/cm}^2$  e doses de 1,0; 4,0 e  $5,0\text{ J/cm}^2$  em queimaduras realizadas por eletrocoagulação. Os resultados mostraram que a radiação *laser* estimulou não somente a fagocitose, o crescimento de pêlos, o crescimento neoplásico, mas também o reparo de feridas induzidas mecanicamente.

Mester, Mester e Mester (1985) revisaram o uso experimental e clínico dos *lasers* que empregaram, por um período de 20 anos, avaliando, inicialmente, os efeitos do *laser* rubi e, posteriormente, do HeNe e do gás argônio, em 15 sistemas biológicos. Em decorrência dos resultados positivos dos experimentos feitos, os autores começaram, em 1971, a utilizá-lo no tratamento de feridas humanas e úlceras de difícil cicatrização ou não-cicatrizadas completamente. A investigação do processo de reparo de feridas em âmbito molecular surgiu praticamente como resultado do desenvolvimento de exames bioquímicos, radiográficos, enzimático-

histoquímicos e com microscopia eletrônica. Em nível microscópico, inflamação, proliferação e reorganização tecidual foram observadas, o que representa as fases do reparo. As duas primeiras fases, inflamação e proliferação, envolvem o desenvolvimento de tecido de granulação, enquanto a terceira fase é caracterizada por contração, por um lado, e por maturação do tecido cicatricial, por outro. Seguindo as alterações características que ocorrem durante a fase inicial pós-lesão, os fibroblastos aparecem mais tarde. A alta força tênsil do colágeno produzido pelos fibroblastos serve para proporcionar e para repor os defeitos teciduais que ocorrem nas lesões. A experiência dos autores juntamente com os resultados dos experimentos realizados com o objetivo de elucidar o processo de biorregulação do reparo, convenceu os autores a recomendar o uso do *laser* para estimular o reparo tecidual.

Longo et al. (1987) estudaram o efeito do *laser* diodo GaAlAs ( $\lambda=904\text{nm}$ ) no processo de reparo de feridas experimentais. Observaram que o *laser* aplicado por cinco minutos, diariamente, durante cinco dias, com uma frequência de 3.000 Hz (densidade de energia de  $3\text{J}/\text{cm}^2$ ), promoveu o reparo de feridas experimentais em ratos, tanto do ponto de vista macroscópico quanto microscópico. O mesmo *laser*, aplicado nestas condições experimentais, com a mesma densidade de energia por 10 minutos, diariamente, durante cinco dias, com 1.500 Hz de frequência, não afetou as feridas experimentais. O mecanismo pelo qual cada aplicação de *laser* promove o reparo de lesões cutâneas é desconhecido. Tem sido sugerido que o aumento na produção de colágeno e/ou a diminuição da inibição do contato celular pode desempenhar algum papel na ação do *laser*.

Anneroth et al. (1988) analisaram o efeito do tratamento com um *laser* infravermelho no reparo de feridas em ratos, tanto histológica quanto macroscopicamente. Para o estudo, foram utilizados 14 ratos, nos quais duas feridas foram realizadas bilateralmente na região caudal de cada animal. Uma ferida em cada rato recebeu tratamento com radiação *laser*. A ferida contralateral foi mantida sem tratamento, servindo como grupo controle. O período de observação total foi de 15 dias, sendo que, a cada dia, um animal era morto para avaliação. Os ratos foram radiados diariamente com um *laser* diodo (GaAs;  $\lambda=904\text{nm}$ ) com frequência de 500Hz e potência de 0,5mW, por um período de oito minutos e com uma distância de 5mm, até o momento de sua morte. Os resultados não mostraram nenhuma diferença no que se refere ao período de reparo ou à formação de crosta. Nenhuma ferida apresentou sinais de infecção durante o período de observação. O exame histológico também não apresentou nenhuma diferença morfológica óbvia entre as feridas tratadas e não-tratadas. Os autores não confirmaram, com este estudo, que o uso de um *laser* de baixa potência pode melhorar o processo de reparo de feridas.

Hallman et al. (1988) estimaram o efeito do *laser* HeNe na proliferação celular em culturas de fibroblastos humanos. As culturas foram radiadas com o *laser* HeNe com comprimento de onda de  $\lambda=0,633\mu\text{m}$ , 0,9mW, de forma contínua por 60 segundos, diariamente, durante cinco dias. O grupo controle passou pelo mesmo tratamento, entretanto não recebeu radiação. Os resultados foram avaliados por uma análise de covariância e não apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimentais e o grupo controle.

A laserterapia tem sido promovida, desde o final dos anos 60 do século passado, como um tratamento novo, seguro e efetivo para várias condições neurológicas, musculoesqueléticas e de tecidos moles, ocupando intensidades de radiação tão baixas que qualquer efeito biológico que possa ocorrer é decorrente do efeito direto da radiação e não do resultado do aquecimento. Isto significa que a elevação da temperatura induzida pela radiação deve ser mínima, talvez não mais do que 0,1°C a 0,5°C. Para todos os objetivos práticos, esta limitação restringe a energia de tratamento a poucos *joules* por centímetro quadrado e potências do *laser* a 50mW ou menos (BASFOR,1989).

Braverman et al. (1989) avaliaram os efeitos bioestimuladores da radiação com *laser* HeNe ( $\lambda=632,8\eta\text{m}$ ), de GaAIs ( $\lambda=904\eta\text{m}$ ) e de ambos, combinados no processo de reparo de feridas na pele de coelhos. Setenta e dois coelhos foram divididos em quatro grupos. O primeiro serviu como controle e não recebeu radiação, o segundo foi radiado com *laser* HeNe (1,65J/cm<sup>2</sup>), o terceiro, com *laser* GaAIs (8,25J/cm<sup>2</sup>) e o quarto com uma combinação de ambos. As radiações foram realizadas em uma das duas feridas dorsais, diariamente, por um período de 21 dias. Diferenças significativas foram encontradas na força tênsil em todos os grupos radiados, tanto na lesão radiada quanto na lesão que não recebeu radiação direta, quando comparados ao grupo controle. Nenhuma diferença foi encontrada no índice do processo de reparo ou na área de colágeno. O crescimento da epiderme foi maior no grupo do *laser* HeNe comparada ao grupo controle, mas a diferença não foi significativa. Assim, a radiação com comprimento de onda de  $\lambda=632,8\eta\text{m}$  e  $\lambda=904\eta\text{m}$  ou combinadas aumentou a força tênsil durante o reparo de feridas e pode ter liberado fatores teciduais na circulação sistêmica, os quais aumentaram a força

tênsl no lado oposto. Os comprimentos de onda dos feixes *laser* HeNe e GaAAs podem ser relativamente mais eficazes para a bioestimulação comparada com *lasers* cirúrgicos, isto é, devido ao comprimento de onda do *laser* HeNe ser próximo à absorção máxima por vários pigmentos biológicos, como hemoglobina e citocromos mitocondriais, e o *laser* de GaAAs poder penetrar no tecido, por vários milímetros.

Na maioria dos comprimentos de onda, a propagação do *laser* nos tecidos é influenciada pela dispersão e pela absorção. A absorção da radiação *laser* nos tecidos tem sido bastante investigada, e seu comportamento básico, particularmente a dependência do comprimento de onda, é bem documentada para a maioria dos seus cromóforos. A dispersão do *laser* nos tecidos é muito complexa. Várias estruturas como fibras colágenas, células e organelas celulares, vasos e outros componentes teciduais, influenciam na dispersão do *laser* no tecido. O tamanho, a forma e a orientação de tais estruturas influenciam enormemente a dispersão do *laser* nos tecidos (HILLENKAMP, 1989).

A bioestimulação *laser* é um fenômeno fotobiológico. A magnitude do efeito da bioestimulação depende do estágio fisiológico da célula antes da radiação. Isto explica por que o efeito da bioestimulação nem sempre ser possível. Os efeitos positivos da fototerapia em casos de tratamento sistêmico podem ser explicados pelo fato de a luz de baixa potência (azul, vermelha) atuar nas células excitáveis para gerar um potencial de ação nas mesmas (KARU, 1989).

Rochkind et al. (1989) pesquisaram o efeito sistêmico do *laser* não-ablativo HeNe na recuperação de lesões no sistema nervoso periférico e central, bem como

no processo de reparo de feridas e de queimaduras cutâneas. A radiação com *laser* somente no lado direito, em animais com feridas cutâneas bilaterais, melhorou o restabelecimento em ambos os sítios, quando comparada com o grupo controle, o qual não recebeu radiação. Resultados similares foram obtidos em queimaduras bilaterais: a radiação em uma das lesões também causou uma aceleração no processo de reparo no sítio não-radiado. Contudo, no grupo controle não radiado, todos os ratos sofreram necrose avançada na perna e gangrena bilateral. A radiação com o *laser* HeNe em lesões por compressão do nervo ciático no lado direito em um animal com lesão bilateral, aumentou significativamente o potencial de ação na perna esquerda não-radiada. A análise estatística mostrou diferença sendo maior para o grupo tratado com *laser*. Finalmente, o efeito sistêmico foi encontrado em segmentos da medula espinhal, correspondendo aos nervos ciáticos lesados. A degeneração retrógrada bilateral dos neurônios motores da medula espinhal esperada após a lesão bilateral dos nervos periféricos foi significativamente reduzida no grupo tratado com *laser*. Os autores concluíram que o *laser* HeNe exerce um efeito sistêmico pronunciado na pele e nos tecidos adjacentes, bem como nos nervos periféricos severamente lesados e nas regiões correspondentes da medula espinhal. Relataram ainda que os efeitos persistem por longo período após a aplicação do *laser*. Os autores ressaltaram que os efeitos sistêmicos observados são relevantes tanto em termos de aplicação clínica da laserterapia quanto para pesquisas básicas envolvendo os possíveis mecanismos envolvidos.

In De Braekt et al. (1991) analisaram o efeito da laserterapia (GaAIs;  $\lambda=830\text{nm}$ ) no processo de reparo e na contração da ferida após cirurgia palatal em cães. A potência utilizada foi de 30mW e a dose por aplicação, de  $1\text{J}/\text{cm}^2$ , com três

aplicações semanais, perfazendo total de 10 aplicações. As áreas cruentas no mesmo animal foram radiadas, evitando os possíveis efeitos sistêmicos da radiação *laser*. O reparo foi observado clinicamente até que esta se completasse. Nenhuma diferença significativa foi encontrada na qualidade ou no grau de reparo cicatricial entre os grupos controle e experimentais. Os autores concluíram que, macroscopicamente, a laserterapia, sob as condições utilizadas neste estudo, não teve influência no reparo ou contração da ferida.

Van Breugel e Dop Bär (1992) estimaram os efeitos individuais da densidade de potência e do tempo de exposição do *laser* em fibroblastos humanos pelo estudo da sua proliferação e da produção de colágeno tipo I *in vitro*. O *laser* HeNe ( $\lambda=632,8\text{nm}$ ) foi utilizado com uma dose total de 6,8mW. Culturas de fibroblastos humanos foram submetidas ao *laser* HeNe com várias doses de energia, variando a densidade de energia e o tempo de exposição. Em três dias consecutivos, as células foram radiadas por períodos entre 0,5 e 10 minutos. A potência do *laser* variou de 0,55 a 5,98mW. Tanto o número de células quanto a produção de colágeno do tipo I foram determinados para cada condição de radiação. Os resultados mostraram que o *laser* com potências abaixo de 2,91mW pode melhorar a proliferação celular, enquanto potências maiores (5,98mW) não apresentaram nenhum efeito. Os efeitos de estimulação foram mais pronunciados com tempos de radiação entre 0,5 e 2 minutos. A produção de colágeno tipo I foi afetada na direção oposta à proliferação celular: quando a proliferação celular aumentou, a produção de colágeno do tipo I diminuiu. A partir deste experimento ficou claro que o tempo de exposição e a densidade de potência determinam o efeito da radiação *laser*. Assim, a estimulação

e a inibição das propriedades celulares observadas podem ser obtidas com o mesmo *laser* nas mesmas células.

Hall et al. (1994) investigaram, em ratos, o processo de reparo em feridas após a laserterapia. Feridas padronizadas foram realizadas na porção caudal de ratos, bilateralmente. Os animais foram divididos em dois grupos, com 19 animais em cada um. O grupo A foi radiado com *laser* em um lado, sendo que lado oposto foi deixado como controle para possíveis efeitos sistêmicos. O grupo B recebeu uma radiação placebo (luz normal) em um dos lados; o grupo contralateral foi deixado sem tratamento. A frequência utilizada foi de 500Hz e a potência de 1mW. O *laser* foi utilizado perpendicularmente a uma distância de 2mm. A dose diária foi de 0,2J/cm<sup>2</sup> e o período de observação total foi de 21 dias. Dois animais de cada grupo foram mortos a cada dois dias a partir do terceiro dia do experimento. Os resultados, tanto clínicos quanto histológicos, não mostraram diferenças durante todo o período de observação quando os grupos foram comparados entre si. Os autores concluíram que a radiação com *laser* não-ablativo não influenciou o processo de reparo das feridas.

Morimoto et al. (1994) estudaram o efeito do *laser* argônio com vários comprimentos de onda ( $\lambda=351\text{nm}$ ,  $\lambda=458\text{nm}$  e  $\lambda=514,5\text{nm}$ ) na respiração mitocondrial *in vitro*. Os resultados encontrados mostraram que o *laser* argônio gerou várias respostas respiratórias na mitocôndria. No caso do estágio quatro da respiração, os *lasers* de  $\lambda=351\text{nm}$  e de  $\lambda=458\text{nm}$  aceleraram o consumo de oxigênio da mitocôndria. Tal aceleração não foi observada com o *laser* de  $\lambda=514,5\text{nm}$ . Por outro lado, no caso do estágio três da respiração, o *laser*  $\lambda=514,5\text{nm}$  ativou o



consumo de oxigênio da mitocôndria. A ativação não foi observada na radiação com *laser* de  $\lambda=458\text{nm}$ . A radiação com  $\lambda=351\text{nm}$  reduziu o consumo de oxigênio no estágio três. Os efeitos térmicos pela radiação *laser* não foram a causa dominante da melhora do consumo de oxigênio em nenhum estágio respiratório. Os resultados sugeriram que a radiação *laser* com comprimentos de onda de  $\lambda=352\text{nm}$  e  $\lambda=458\text{nm}$  podem danificar a membrana interna da mitocôndria, enquanto aquele com comprimento de onda de  $\lambda=514,5\text{nm}$  pode melhorar levemente a taxa de síntese de ATP.

Pyczek, Sopala e Dabrowski (1994) avaliaram o efeito do *laser* de baixa potência nas células da medula óssea em ratos. Para o estudo, foram utilizados os *lasers* HeNe (632,8nm) e o GaAs (904nm). Superfícies intactas da pele dos ratos foram radiadas sobre uma região do fêmur. A dose total recebida pelo grupo do *laser* HeNe foi de 13,5J, em um período de três dias, e de 13,5J, no grupo do GaAs, também por um período de três dias. A análise sangüínea foi realizada antes do experimento e após a radiação. A medula óssea foi avaliada microscopicamente. Os resultados mostraram que o *laser* GaAs induziu a um decréscimo nos mastócitos da medula óssea e nos basófilos do sangue periférico e um aumento no número de eosinófilos. Um aumento na atividade mitótica na medula óssea foi observado nos grupos experimentais. Nenhuma alteração significativa foi encontrada no hematócrito ou nos níveis de hemoglobina de eritrócitos e reticulócitos no sangue periférico.

A terapia a *laser* tem empregado largas porções do espectro visível e infravermelho. Os primeiros estudos enfatizavam a luz visível de *laser* com gás,

como o hélio neônio (HeNe), rubi, argônio e criptônio. Mais recentemente, os *lasers* diodos semicondutores arseneto de gálio (GaAs) e o arseneto de gálio e alumínio (GaAlAs) tornaram-se mais disponíveis. Há uma aceitação crescente que estes *lasers* são particularmente efetivos. Hoje, os aparelhos de HeNe ainda são muito utilizados, mas a maioria dos trabalhos é feita com o GaAs e GaAlAs com comprimentos de onda entre  $\lambda=820\text{nm}$  e  $\lambda=904\text{nm}$  (BASFOR, 1995).

A laserterapia inicialmente envolvia *lasers* com potências iguais ou menores a 1mW. Com o tempo, a tecnologia melhorou e as potências aumentaram. Hoje, os tratamentos são realizados com aparelhos com potências entre 10 e 90mW, ou mesmo um pouco acima de 100mW. O tempo de tratamento, entretanto, diminuiu enquanto a potência aumentou e a dose permaneceu próxima de 1 a 4J/cm<sup>2</sup>. Devido às semelhanças na dose e a convergência na escolha do *laser*, diferenças significativas persistem entre os tratamentos, destacando-se: velocidade do pulso, modo de aplicação (em contato ou não) e utilização de um único comprimento de onda ou uma combinação destes (BASFOR, 1995).

As características da radiação *laser* – coerência, colimação e monocromia – têm sido examinadas em detalhes. Em particular, a coerência e a colimação não parecem ser cruciais, uma vez que são rapidamente degradadas pela reflexão, enquanto o raio passa através do tecido. Suportando sua relativa falta de importância, está o fato que tanto os *lasers* diodos quanto uma luz não-coerente (de fontes monocromáticas) podem alterar processos biológicos. A monocromia, entretanto, parece vital (BASFOR, 1995).

Pogrel, Chen e Zhang (1997) investigaram, *in vitro*, a ação do *laser* GaAIs ( $\lambda=830\text{nm}$ ) em cultura de fibroblastos e queratócitos humanos. O tempo de exposição variou entre 10 e 120 segundos, com uma potência entre 5 e 100mW e uma densidade de energia de 0,12 a 4,24J/cm<sup>2</sup>. A proliferação celular foi avaliada por espectrometria absorvente, enquanto a adesão celular foi avaliada por análise microcolorimétrica para adesão celular ao colágeno bovino. A migração celular foi avaliada por meio de um filtro utilizando campo microscópico de alta potência. Os resultados não apresentaram diferenças na proliferação celular, na adesão e na migração, tanto nas culturas de fibroblastos como na de queratócitos tratadas com o *laser* de GaAIs, com qualquer densidade de potência ou tempo, quando comparadas com os grupos controles não-radiados. Os autores concluíram que o *laser* GaAIs, quando utilizado em potências entre 5 e 100mW e tempos entre 10 e 120 segundos, não possui efeito bioestimulador em culturas de fibroblastos e queratócitos quanto a proliferação celular, adesão ou migração.

As principais estruturas responsáveis pela absorção dos *lasers* vermelhos e infravermelhos utilizados na terapia com *laser* são as proteínas. Entretanto, a identidade dos fotorreceptores responsáveis pelos efeitos biológicos da terapia com *laser* de baixa potência não é conhecida. Walsh (1997a), revisando estudos até então publicados, observou que tanto elementos do sistema mitocondrial quanto porfirinas endógenas na célula, são os cromóforos que absorvem energia na terapia *laser* de baixa potência. Como a penetração da energia *laser* utilizada na terapia pode ser na ordem de 5 a 10mm, tanto as estruturas superficiais como as profundas podem ser afetadas. Entretanto, enquanto a energia penetra nos tecidos, há uma

dispersão múltipla tanto pelos eritrócitos quanto pelos microvasos, influenciando marcadamente a distribuição final da energia *laser*.

O mesmo autor, em outro artigo (1997b), resumiu os parâmetros que determinam a natureza dos efeitos do *laser*, em qualquer situação: parâmetros fixos, os quais não podem ser modificados pelo operador (comprimento de onda, coeficientes de absorção e de reflexão do tecido radiado; e resfriamento interno - corrente sangüínea) e fatores variáveis, os quais podem ser modificados pelo operador ao nível do equipamento ou na interface tecidual, incluindo (potência do *laser* - modo contínuo ou pulsado; densidade de energia; tempo de exposição e refrigeração externa - água ou ar).

Pinheiro et al. (1998) avaliaram o efeito da laserterapia no tratamento de diversas desordens da região bucal e maxilofacial. Para o estudo, 205 mulheres e 36 homens com idades entre 7 e 81 anos, com alterações na região maxilofacial, foram tratados com *laser* diodo de  $\lambda=632,8 \text{ nm}$ ,  $\lambda=670 \text{ nm}$  e  $\lambda=830 \text{ nm}$ . Os distúrbios incluíam dor na articulação temporomandibular, nevralgia do trigêmeo, dor muscular, inflamação, hipersensibilidade dentinária pós-operatória e pequenos hemangiomas. A maioria dos tratamentos consistia de uma série de 12 aplicações, duas vezes por semana. Em 15 casos, uma segunda série de aplicações foi realizada. Os pacientes foram tratados com uma dose média de  $1,8 \text{ J/cm}^2$ . Os autores observaram, neste estudo, que a luz visível de  $\lambda=632,8 \text{ nm}$  e  $\lambda=670 \text{ nm}$  apresentou um efeito mais pronunciado em lesões superficiais e a luz de  $\lambda=830 \text{ nm}$ , nas lesões profundas. Os resultados mostraram que dos 241 pacientes avaliados, 154 indivíduos apresentaram-se assintomáticos, ao final do tratamento, 50 apresentaram uma

melhora considerável e apenas 37 pacientes apresentavam sintomatologia ao final do tratamento. Os autores concluíram que os resultados obtidos confirmaram que a laserterapia é um meio efetivo e benéfico para o tratamento de várias doenças da região maxilofacial. Não ficou claro, entretanto, por que alguns pacientes não responderam bem ao tratamento; os pesquisadores ressaltaram a possibilidade de algumas condições da articulação temporomandibular não responderem da mesma maneira que outras.

Reddy, Stehno-Bittel e Enwemeka (1998) pesquisaram a influência da fotoestimulação com *laser* na produção de colágeno no reparo de tendões-de-Aquiles em 24 coelhos machos. Após a tenotomia, os animais do grupo experimental foram radiados com *laser* HeNe ( $\lambda=632,8\eta\text{m}$ ), diariamente, com uma dose de  $1,0\text{J}/\text{cm}^2$ , por um período de 14 dias. O grupo controle não recebeu radiação com *laser*. A análise bioquímica dos tendões revelou um aumento de 26% na concentração de colágeno com a laserterapia, indicando um processo cicatricial mais rápido nos tendões do grupo experimental, quando comparado com o grupo controle. Os autores concluíram que a laserterapia facilitou a produção de colágeno, melhorando, desta forma, o reparo.

A laserterapia é dada por um *laser* da classe IIIB, o que significa que ele opera na escala de  $\lambda=600\eta\text{m}$  a  $\lambda=1000\eta\text{m}$  e tem entre 5 e 500mW de potência. O *laser* não-ablativo não é térmico, pois ele não produz calor no tecido atingido. Ao contrário, provoca uma resposta fotoquímica e fotofísica, alterando o funcionamento normal da célula. A emissão do fóton com luz vermelha ou infravermelha é absorvida por fotorreceptores no tecido. Alterações na membrana celular alteram sua

permeabilidade, aumentam a síntese de ATP e outras atividades metabólicas, promovendo, assim, uma série de alterações fisiológicas. Diferentes comprimentos de onda parecem ser absorvidos por distintos receptores. A maioria dos autores concorda que a melhora no processo de reparo das feridas é devida ao aumento na proliferação celular. As alterações fotoquímicas estimuladas pela ação da luz, tanto na membrana celular quanto no núcleo da célula, são: aumento da vasodilatação local, angiogênese, produção de fibroblastos, síntese de colágeno, produção de linfócitos T e B, liberação de endorfinas locais e alterações nas prostaglandinas locais (mudanças fisiológicas como resultado da luz *laser* nos tecidos moles). Este tipo de terapia é usado na estimulação do reparo nos tecidos moles, como antiinflamatório, no alívio da dor e para estimular o sistema imune a fim de atenuar os efeitos infecciosos (FRANKS, 1999).

A penetração e a dispersão da luz ultravioleta e da luz visível na pele são dependentes do comprimento de onda da fonte emissora e das propriedades ópticas individuais das camadas da pele. Na epiderme, a maior responsável pela absorção é a melanina. O comprimento de onda de  $\lambda=400$  a  $\lambda=600\text{nm}$  é absorvido na derme por cromóforos da pele: hemoglobina, oxi-hemoglobina, bilirrubina e caroteno. Uma pobre absorção pelo sangue ocorre com comprimentos de onda de  $\lambda=700$  a  $\lambda=1300\text{nm}$ , com pouca dispersão na derme. Kolárová, Ditrichová e Wagner (1999) investigaram a penetração da luz *laser* de diferentes comprimentos de onda através de camadas da pele e de tecido de granulação em úlceras. Para o estudo, as amostras de pele foram obtidas de homens com idades entre 16 e 40 anos, submetidos à cirurgia plástica, em diferentes regiões do corpo, enquanto as amostras do tecido de granulação foram obtidas de úlceras femurais. Os *lasers*

utilizados foram o HeNe ( $\lambda=632,8\eta\text{m}$ ; 50mW) e um *laser* semiconductor ( $\lambda=675\eta\text{m}$ ; 21mW). A medição da penetração do *laser* foi efetivada com um fotodetector e a análise de dados, realizada em computador. A espessura das amostras foi padronizada em 19mm. Aproximadamente 0,3% do *laser* HeNe e 2,1% do semiconductor penetraram nas amostras. O tecido de granulação apresentou propriedades ópticas significativamente diferentes e a medição da penetração do *laser* foi quase 2,5 vezes maior do que a penetração na pele normal com espessura semelhante, devido às diferenças histológicas estruturais. Diferenças também foram encontradas entre tecidos normais de distintas regiões do corpo. Os autores concluíram que a penetração do *laser* na pele é um fator decisivo para a seleção da dose de sua radiação.

As reações vasculares durante a laserterapia também são consideradas como um dos possíveis mecanismos responsáveis pelos efeitos clínicos da luz *laser*, pois a circulação sangüínea é um determinante importante para o processo de reparo de feridas e para o alívio da dor. A melhora da circulação, devido à radiação com o *laser*, pode ser considerada um dos possíveis mecanismos da eficácia clínica do *laser* de baixa potência no tratamento da dor ou para promover o reparo de feridas. Maegawa et al. (2000) estudaram o efeito do *laser* não-ablativo na microcirculação mesentérica de ratos, *in vivo*, e na concentração sistólica de cálcio em células musculares de vasos em ratos, *in vitro*. O *laser* utilizado possuía um comprimento de onda de  $\lambda=830\eta\text{m}$ , sendo aplicada uma dose de  $38,2\text{mW}/\text{mm}^2$ . Os resultados mostraram uma potente dilatação nas arteríolas radiadas com *laser*, o que levou a um aumento marcante na circulação sangüínea arteriolar. Os autores concluíram

que as alterações circulatórias observadas parecem ser mediadas largamente pela redução do íon cálcio intracelular em células musculares dos vasos.

Walker et al. (2000) analisaram o efeito da radiação *laser* no reparo de feridas na pele de ratos previamente radiados com raios X, com o objetivo de provocar um atraso no processo de reparo. Setenta e duas horas após a radiação, todos os ratos foram anestesiados e uma ferida cirúrgica com uma área de 7mm<sup>2</sup> foi realizada no dorso de cada animal. Em dois grupos, os animais foram tratados com *laser* GaAlAs ( $\lambda=660\text{nm}$ , 5KHz; 15mW), três vezes por semana (0,5 e 1,5J/cm<sup>2</sup>, respectivamente). As áreas das feridas foram calculadas por um sistema computadorizado de análise de imagens. Na segunda fase do experimento, os ratos foram tratados da mesma maneira, com exceção da dose aplicada, que foi de 4J/cm<sup>2</sup>. Os resultados demonstraram que o tratamento com *laser* com 0,5; 1,5 e 4J/cm<sup>2</sup> não apresentaram nenhum efeito benéfico no processo de reparo das feridas. Os autores concluíram que estes achados proporcionam uma pequena evidência do suposto efeito estimulador do *laser* não-ablativo *in vivo* nos parâmetros investigados.

Almeida Lopes et al. (2001) estudaram o efeito da laserterapia em cultura de fibroblastos humanos, comparando o efeito na proliferação celular de *laser* de luz visível com *lasers* infravermelhos, mantendo a dose constante de 2J/cm<sup>2</sup> e usando diferentes irradiações. A radiação com *laser* foi realizada com *lasers* diodo com os seguintes comprimentos de onda:  $\lambda=670\text{nm}$ ,  $\lambda=780\text{nm}$ ,  $\lambda=692\text{nm}$ ,  $\lambda=786\text{nm}$ . Os resultados mostraram que, nas culturas de fibroblastos em condições de déficit nutricional, quando radiadas com a mesma dose, o *laser* infravermelho induziu a uma maior proliferação celular quando comparado ao *laser* visível, quando as



potências eram diferentes. Entretanto, *lasers* de mesma potência de saída apresentaram efeitos semelhantes no crescimento celular, independentemente do comprimento de onda. Para os autores, a terapia com *laser* de baixa potência melhorou a proliferação de fibroblastos, *in vitro*, além de que um menor tempo de exposição resulta em maior proliferação.

Estudo realizado por Pinheiro et al. (2005) avaliou o processo cicatricial de feridas, submetidas ou não a laserterapia ou luz polarizada. Uma ferida foi criada no dorso de 30 ratos, divididos em 5 grupos, de acordo com a terapia realizada: (1) controle; (2) laserterapia com 20J/cm<sup>2</sup>; (3) laserterapia com 40 J/cm<sup>2</sup>; (4) luz polarizada com 20 J/cm<sup>2</sup>; e (5) luz polarizada com 40 J/cm<sup>2</sup>. Os autores concluíram que tanto a laserterapia quanto a luz polarizada aplicadas na dose mais baixa (20 J/cm<sup>2</sup>) promovem maior deposição de colágeno e melhor organização cicatricial da ferida.

Kreisler et al. (2002) analisaram os efeitos da radiação *laser* na taxa de proliferação de fibroblastos gengivais humanos *in vitro*. Um grupo de 110 culturas de fibroblastos foram radiadas com um *laser* diodo (GaAlAs;  $\lambda=809\text{nm}$ ; 10mW) com doses entre 1,96J/cm<sup>2</sup> e 7,84J/cm<sup>2</sup>. O tempo de exposição variou entre 75 e 300 segundos. Outras 110 culturas de fibroblastos serviram como controle e não receberam radiação. O tratamento com *laser* realizou-se alternadamente: uma, duas e três vezes, em um intervalo de 24 horas. A taxa de proliferação foi determinada pela atividade de fluorescência por um indicador adicionado a cultura celular. A proliferação foi determinada 24, 48 e 72 horas após a radiação. Os resultados

mostraram que as células radiadas revelaram uma atividade proliferativa consideravelmente maior. As diferenças foram muito significativas, 24 horas após a radiação, mas diminuíram de uma maneira energia-dependente 48 e 72 horas após a radiação. Os autores concluíram que o efeito da laserterapia nos fibroblastos ficou evidente. Sua duração, entretanto, parece ser limitada. Os pesquisadores ressaltaram que os resultados encontrados podem ser clinicamente relevantes, indicando que tratamentos repetitivos são necessários para alcançar um efeito positivo do *laser* nas aplicações clínicas.

### **3.3 LASERTERAPIA NO PROCESSO DE REPARO**

Takeda (1988) avaliou histologicamente o efeito da laserterapia (GaAs) no processo inicial de reparo do alvéolo após a exodontia em ratos *Wistar*. Após a exodontia dos primeiros molares superiores direitos, os alvéolos foram imediatamente radiados, no grupo experimental, por cinco minutos. Durante o período de observação, que foi de zero, dois, quatro e sete dias, os animais foram radiados diariamente também por um período de cinco minutos. Um *laser* semiconductor de GaAs foi utilizado com um comprimento de onda de  $\lambda=904\text{nm}$ ; densidade de potência de  $25\text{mW}/\text{cm}^2$  e densidade de energia de  $20\text{J}/\text{cm}^2$ . Animais não-radiados serviram como grupo controle. Os resultados sugeriram que a radiação com *laser* não-ablativo teve um efeito benéfico no processo inicial do reparo do alvéolo dentário. No período de observação zero (5 minutos após a exodontia) não ocorreu diferença no reparo entre os grupos; no período de dois dias, a proliferação fibroblástica foi mais proeminente no grupo teste; no quarto dia, a formação de tecido osteóide ou matriz óssea com ou sem ossificação, foi mais avançada no

grupo teste; já no sétimo dia, a formação óssea foi maior no grupo teste. Esta conclusão baseou-se nos seguintes achados: a proliferação de fibroblastos de remanescentes do ligamento periodontal foi mais pronunciada nos animais radiados e a formação de um trabeculado osteóide ou de osso neoformado foi vista mais precocemente no osso radiado.

Em um estudo-piloto, Gordjestani, Dermaut e Thierens (1994), investigaram o efeito da laserterapia no metabolismo ósseo. Um defeito ósseo circular foi realizado nos ossos parietais, em seis ratos. Os animais foram divididos em dois grupos: experimental e controle. O primeiro recebeu tratamento com *laser* infravermelho (GaAs;  $\lambda=904\eta\text{m}$ ) no defeito do lado esquerdo, com densidade de potência de  $33,3\text{mW}/\text{cm}^2$  e densidade de energia equivalente a  $20\text{J}/\text{cm}^2$ , administrada diariamente, mas não recebeu radiação no defeito ósseo do lado direito. O *laser* infravermelho foi escolhido devido à sua maior penetração nos tecidos subcutâneos, em função de sua baixa absorção na água ou nos pigmentos da pele. O grupo controle não recebeu radiação em ambos os lados. A escolha de um grupo experimental e de um grupo controle baseou-se na consideração de que a aplicação do *laser* em uma área bem definida pode ter um efeito local e sistêmico. Após 28 dias, o metabolismo ósseo foi avaliado por meio de cintilografia. Os resultados não mostraram diferença no metabolismo ósseo entre os lados direito (lado controle) e esquerdo (lado experimental) no grupo controle. Os valores encontrados no grupo experimental também não apresentaram diferença significativa quando comparados com o grupo controle.

David et al. (1996) estudaram, radiográfica, biomecânica e histologicamente, os efeitos do *laser* HeNe no reparo de fraturas ósseas em ratos. Para o estudo, 62 ratos sofreram osteotomia na tíbia, bilateralmente, seguida por fixação interna com fios intramedulares. As pernas direitas receberam radiação com *laser* HeNe ( $\lambda=632,8\text{nm}$ ; 10mW) com uma dose de 0,2 e 4J, diariamente, durante duas a seis semanas. A perna esquerda serviu como controle, não recebendo radiação. Os resultados radiográficos e histológicos não apresentaram melhora no processo de reparo ósseo. Biomecanicamente, os ossos radiados em dois espécimes dos grupos teste foram significativamente mais fracos que o grupo controle. Os autores concluíram, de acordo com os resultados obtidos, que a laserterapia com o *laser* HeNe não influenciou o reparo ósseo.

Saito e Shimizu (1997) verificaram os efeitos da laserterapia no reparo ósseo durante a expansão da sutura palatina em ratos (com até 6 semanas ou com 180 g de peso médio). Um *laser* diodo ( $\lambda=\text{GaAlAs}$ ; 830nm) com potência de 100mW e densidade de energia de  $35,3\text{J/s/cm}^2$  foi aplicado à sutura palatina durante a expansão da seguinte maneira: diariamente, por um período de sete dias, durante 3 ou 10 minutos (dose total de 126J e 420J, respectivamente), durante três dias com aplicações de sete minutos, do primeiro ao terceiro dia ou do quinto ao sétimo dia (dose total de 126J), e somente no primeiro dia, logo após a cirurgia, por 21 minutos ininterruptos (dose total de 126J). Um grupo controle foi utilizado, o qual não recebeu radiação. Os resultados foram avaliados por meio de histomorfometria óssea e exame histológico. Os resultados mostraram que o grupo com sete dias de radiação apresentou uma aceleração significativa no processo de reparo ósseo quando comparada com os espécimes não-radiados e que este aumento era dose-

dependente. A radiação durante os períodos iniciais (dias 0 e 2) apresentou-se mais efetiva, enquanto que nem o período mais longo (dias 4 e 6) nem a radiação em um dia somente apresentaram qualquer efeito no reparo ósseo. Os autores concluíram que a laserterapia pode acelerar o reparo na sutura palatina durante a cirurgia de expansão rápida da maxila e que este efeito é dependente não apenas da dose total de radiação, mas, também, do tempo e da frequência de radiação. Os autores salientaram ainda que, embora as aplicações com *laser* nos estágios iniciais sejam mais efetivas na regeneração óssea, o tratamento com *laser* nos períodos posteriores pode ter um importante papel na manutenção da atividade do processo de reparo ósseo. O *laser* diodo de GaAlAs é conhecido por apresentar uma grande penetração tecidual porque a hemoglobina e a água possuem um baixo coeficiente de absorção para ele; entretanto, o mecanismo pelo qual a radiação *laser* promove a formação óssea não é completamente entendido, mas acredita-se que seja em função da diferenciação de osteoblastos e que estes devem possuir uma dose ótima específica de radiação para sofrer estimulação ou diferenciação.

A radiação com *laser* não-ablativo tem sido apontada como responsável pela biomodulação no processo de reparo de fraturas ósseas em modelos animais, baseado em estudos morfogênicos, bioquímicos e de microscopia eletrônica. Luger et al. (1998) avaliaram o efeito da laserterapia no processo de reparo de feridas utilizando métodos biomecânicos. O estudo foi realizado com dois grupos de ratos *Wistar* com 25 animais cada um, os quais sofreram uma fratura na tíbia, recebendo fixação interna. O primeiro grupo foi tratado com *laser* HeNe ( $\lambda=632,8\text{nm}$ , potência de 35mW), aplicado transcutaneamente por 30 minutos, diariamente, durante 14 dias. O segundo grupo serviu como controle e não recebeu radiação.

Após quatro semanas, as tíbias foram removidas e tensionadas até sua fratura. A carga máxima da fratura e a dureza estrutural da tíbia foi significativamente maior no grupo radiado. Além disso, a não-união da fratura foi encontrada em quatro ratos do grupo controle e em nenhum do grupo radiado. Os autores concluíram que o *laser* não-ablativo desempenha um importante papel na melhora do reparo ósseo em ratos.

Ozawa et al. (1998) analisaram os efeitos do *laser* não-ablativo em culturas de células na proliferação celular, formação de nódulos ósseos, atividade da fosfatase alcalina e na expressão do gene da osteocalcina, utilizando células calvárias de ratos. As células foram isoladas do feto e radiadas com o *laser* de GaAIs ( $\lambda=830\text{nm}$ , 500mW) em vários estágios da cultura celular. A energia total correspondente a 10 minutos de exposição foi de  $3,82\text{J}/\text{cm}^2$ . Os pesquisadores realizaram a radiação de forma pulsada, iniciada após um dia da cultura e efetivada uma vez por dia até o décimo sexto dia. Como controle, culturas de células sem radiação foram utilizadas. Os autores observaram que a radiação com *laser* nos estágios iniciais de cultura de células estimulou significativamente a proliferação celular, a atividade da fosfatase alcalina e também a expressão do gene da osteocalcina. Além disso, a radiação nos estágios iniciais estimulou significativamente a formação de nódulos ósseos. Entretanto, estes efeitos não puderam ser encontrados após 21 dias. Os investigadores concluíram que a radiação *laser* pode ter dois papéis principais na estimulação da formação óssea. Um é a estimulação da proliferação celular em um estágio inicial, o outro é a estimulação da diferenciação celular, resultando em um aumento no número de osteoblastos diferenciados e em um aumento na formação óssea. Ambos os papéis

podem ser exibidos pelo *laser* somente em células imaturas, mas não em osteoblastos maduros. As propriedades da radiação *laser* não agem na osteossíntese por si só, mas geram uma série de condições ambientais que aceleram o processo de reparo ósseo. Entretanto, o mecanismo regulador da laserterapia ainda não foi completamente elucidado.

Dörtbudak, Haas e Mailath-Pokorny (2000) pesquisaram o efeito do *laser* diodo ( $\lambda=690\text{nm}$ ) em culturas de osteoblastos de ratos. Três grupos, com 10 culturas cada um, foram radiados três vezes com um *laser* diodo ( $\lambda=690\text{nm}$ ), por um período de 60 segundos, com uma dose de  $1,6\text{J}/\text{cm}^2$  por aplicação, de forma pulsada. Outros três grupos, com 10 culturas cada um, foram utilizados como grupos controle. O método da fluorescência com tetraciclina foi utilizado para comparar o crescimento ósseo nos espécimes após um período de 8, 12 e 16 dias. Os resultados mostraram que todas as culturas radiadas apresentaram um depósito ósseo significativamente maior que os grupos controle, o que levou a concluir que a radiação com *laser* diodo não-ablativo ter efeito bioestimulador nos osteoblastos *in vitro*.

O corte traumático ou cirúrgico de um osso longo é imediatamente seguido por uma seqüência de processos reparadores nos quais as células osteogênicas do perióstio começam a proliferar e a diferenciar-se em osteoblastos. Freitas, Baranauskas e Cruz-Höfling (2000) analisaram a influência do *laser* HeNe na osteogênese após fratura cirúrgica controlada em ratos *Wistar*, com início de terapia 24 horas após a cirurgia. Os animais foram separados em três grupos, de acordo com as doses de radiação. Após radiações diárias, os espécimes foram mortos, no oitavo e no décimo quinto dias pós-operatórios. As tíbias contralaterais não

receberam radiação e serviram como controle. Através de microscopia eletrônica e óptica, os autores observaram que a laserterapia, com doses de  $31,5\text{J}/\text{cm}^2$  e  $94,7\text{J}/\text{cm}^2$ , resultou na formação de trabeculado ósseo mais espesso, indicando uma maior síntese de fibras colágenas. Entretanto, a dose de  $3,15\text{J}/\text{cm}^2$  não apresentou diferença aparente entre os grupos experimental e controle. A laserterapia não somente diminuiu o período de todo processo de reparo como também produziu uma maior área de reparo ósseo. O mecanismo biológico relacionado com este processo ainda não está bem definido. A hipótese mais provável é que a energia *laser* possa excitar as porfirinas e os citocromas (os quais são cromóforos intracelulares), promovendo, desta maneira, uma maior atividade celular, aumentando a concentração de ATP, ALP e liberando cálcio.

Kawasaki e Shimizu (2000) investigaram o efeito da laserterapia na velocidade da movimentação dentária e na remodelação óssea durante movimento ortodôntico experimental em ratos, utilizando o *laser* GaAlAs, com comprimento de onda de  $\lambda=830\text{nm}$  e potência contínua de  $100\text{mW}$ . Assim, procederam às radiações diariamente, durante nove minutos, por um período de 13 dias, com uma dose diária de  $35,3\text{W}/\text{cm}^2$ . Os efeitos do *laser* foram avaliados quantitativamente pela estimativa da quantidade de movimento dentário e pela formação óssea, bem como pelo número de antígenos de proliferação do núcleo celular (PCNA), no lado da tensão, e pelo número de osteoclastos, no lado da compressão. Os resultados revelaram que, no grupo radiado com *laser*, a quantidade de movimentação dentária foi significativamente maior do que no grupo controle (sem radiação) no final do tratamento. A quantidade de osso formada e a taxa de proliferação celular, no lado da tensão, assim como o número de osteoclastos, no lado da pressão, foram



significativamente maiores no grupo experimental, quando comparados com o controle. Os autores concluíram que o *laser* de GaAlAs estimula o movimento dentário, o qual é acompanhado por uma aceleração na remodelação do osso alveolar, indicado pelo aumento no número de osteoclastos, pela proliferação celular do ligamento periodontal e pela formação de osso mineralizado.

Kucerová et al. (2000) avaliaram o efeito de diferentes frequências da luz *laser* (diodo,  $\lambda=670\text{nm}$  e HeNe,  $\lambda=632,8\text{nm}$ ) no processo de reparo após a extração de molares em humanos, utilizando frequências de cinco, 292 e 9000Hz no experimento; a densidade de energia empregada para todos os grupos foi de  $1,5\text{J}/\text{cm}^2$ . O período de radiação foi de quatro dias para todos os grupos, com exceção do grupo controle que não recebeu tratamento com *laser*. A monitorização do nível da IgA secretora e da albumina na saliva e as alterações na densidade óssea foram utilizadas como marcadores do efeito da bioestimulação óssea. Para a avaliação do desconforto pós-operatório, prepararam um questionário especial com uma escala da sensação pós-operatória. Os resultados revelaram uma diferença significativa nos níveis dos marcadores salivares (sIgA e albumina) entre os grupos radiados e o grupo controle. Observaram diferenças significativas nos sentimentos subjetivos durante o tratamento. A densidade óssea, após a exodontia e depois de seis meses do tratamento foi examinada por meio de radiografias digitais. Nenhuma diferença significativa foi detectada entre a densidade óssea entre os grupos radiados e controle. Os autores concluíram que a laserterapia melhora subjetiva e objetivamente o processo de reparo após exodontias, podendo ser recomendada como um método de escolha clínica.

O reparo tecidual é um processo complexo que envolve respostas locais e sistêmicas. O uso da laserterapia para o reparo de feridas tem sido apontado como efetivo na modulação da resposta tanto local como sistêmica. Normalmente, o processo de reparo do osso é mais lento que o dos tecidos moles. Os efeitos do *laser* não-ablativo no osso ainda são controversos, pois estudos têm mostrado resultados diferentes. Pinheiro et al. (2001) avaliaram morfológicamente a neoformação óssea após a radiação com *laser* de 830nm em feridas cirúrgicas criadas em fêmur de ratos. Quarenta ratos *Wistar* foram divididos em quatro grupos: grupo A (12 sessões, 4,8J/cm<sup>2</sup> por sessão, 28 dias); grupo C (3 sessões, 4,8J/cm<sup>2</sup> por sessão, sete dias). Os grupos B e D serviram como controle não-radiados. Quarenta e oito horas após a cirurgia, os defeitos dos grupos experimentais foram radiados transcutaneamente com um *laser* diodo de 830nm e 40mW, com uma dose total de 4,8J/cm<sup>2</sup>. As radiações foram realizadas três vezes por semana. A morfometria computadorizada mostrou diferença significativa entre as áreas de mineralização óssea nos grupos C e D. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos A e B (28 dias). Em uma segunda investigação, foi determinado o efeito da laserterapia no reparo ósseo após a inserção de implantes. Dez cães foram divididos em dois grupos de cinco animais, os quais receberam os implantes. Dois animais de cada grupo serviram de controle. Os animais foram radiados três vezes por semana, por duas semanas, com um *laser* diodo ( $\lambda=830\text{nm}$ ; 40mW) com uma dose total de 4,8J/cm<sup>2</sup> por sessão e uma dose de 1,2J/cm<sup>2</sup> por ponto. Os animais foram mortos aos 45 e 60 dias após a cirurgia. Os resultados da microscopia eletrônica de varredura mostraram um melhor reparo ósseo após a radiação com o *laser* diodo de 830nm. Os autores ressaltam que tais achados sugerem que a utilização do *laser* não-ablativo (830nm) melhora significativamente o

reparo ósseo nos estágios iniciais, concluindo, pois, que a laserterapia pode aumentar o reparo ósseo nos estágios iniciais do processo.

Torricelli et al. (2001) avaliaram, *in vitro*, o efeito bioestimulador do *laser* GaAIs na cartilagem óssea. Para o estudo, culturas de condrócitos derivadas de cartilagem humana e de ratos foram expostas ao tratamento com *laser*, utilizando os seguintes parâmetros: 300J, 1W e 100 ou 300Hz (grupo A e B, respectivamente). As aplicações foram realizadas por 10 minutos, diariamente, por cinco dias consecutivos. O grupo controle não recebeu tratamento com *laser*. Os resultados mostraram um efeito positivo na bioestimulação da proliferação celular em relação ao grupo controle. O aumento na viabilidade de condrócitos radiados foi mantido por cinco dias após o término das radiações. Para os autores, os resultados obtidos no estudo contribuem como base para a utilização racional do *laser*, com os parâmetros avaliados, tanto experimental quanto clinicamente.

A laserterapia tem sido apontada como capaz de modular várias respostas biológicas afetadas por alguns fatores envolvidos com o modo da radiação, tais como: dose total de energia, espectro do *laser*, densidade de potência e fase de radiação. A fim de aplicar a terapia *laser* ao uso clínico, as propriedades e os efeitos biológicos do *laser* devem ser precisamente elucidados e desenvolvidos modos mais efetivos de radiação, assim como métodos de aplicação mais fáceis de usar. Ueda e Shimizu (2001) avaliaram o efeito de diferentes freqüências de pulso do *laser* na formação de nódulos ósseos, em osteoblastos de células calvárias de ratos. As células foram radiadas uma única vez com *laser* GaAIs ( $\lambda=830\text{nm}$ , 500mW), com dois protocolos distintos de radiação: contínuo e pulsado (1Hz). A energia total foi de

3,84J/cm<sup>2</sup>, para ambos os grupos. Os autores avaliaram os efeitos na proliferação celular, formação de nódulos ósseos, atividade da fosfatase alcalina e na expressão gênica da fosfatase alcalina. Em ambos os grupos, todas essas variáveis mostraram-se estimuladas, quando comparados com o grupo controle não-radiado. A radiação na forma pulsada estimulou mais acentuadamente todos estes fatores, quando comparado com o grupo de *laser* contínuo. Os autores chegaram à conclusão que a radiação com o *laser* pulsado de baixa frequência (1Hz) estimulou mais a formação óssea, *in vitro*, quando comparada com a radiação contínua. Embora a capacidade estimuladora da radiação *laser* seja influenciada por fatores como dose total de energia, espectro da luz, densidade de potência e fase de radiação, o modo pulsátil da radiação do *laser* não-ablativo deve ser considerada um fator que influencia a resposta biológica.

Dörtbudak, Haas e Mailath-Pokorny (2002) avaliaram os efeitos da laserterapia em osteócitos e também na reabsorção óssea em sítios de implantes, em cinco macacos babuínos machos. Quatro lojas foram realizadas, em cada crista ilíaca, para acomodar os implantes. Os sítios do lado esquerdo foram radiados com *laser* de  $\lambda=690\text{nm}$ , com 1mW de potência, durante um minuto (6 joules), imediatamente após a inserção dos implantes. Após cinco dias, os resultados foram analisados histologicamente. Os resultados mostraram que o número de osteoclastos viáveis era maior nas amostras dos grupos submetidos à radiação *laser* imediatamente após a colocação dos implantes em comparação com o grupo controle, sugerindo uma maior quantidade de osso vital presente na área radiada do que nas áreas não-radiadas. A reabsorção óssea, em contraste, não foi afetada pela laserterapia. Os autores concluíram que a radiação *laser* pode ter efeitos positivos

na integração de implantes e que é possível o processo de reparo ser acelerado por meio de tal processo.

Silva Júnior et al. (2002) estudaram morfometricamente a quantidade de osso neoformada após a radiação com *laser* GaAIs em feridas cirúrgicas em fêmur de ratos. Nesse estudo, 40 ratos foram divididos em quatro grupos, com 10 representantes cada, da seguinte maneira: grupo A (12 sessões,  $4,8\text{J}/\text{cm}^2$  por sessão, período de observação de 28 dias); grupo C (3 sessões,  $4,8\text{J}/\text{cm}^2$  por sessão, período de observação de sete dias). Os grupos B e D serviram como controle, não recebendo radiação. A morfometria computadorizada mostrou uma diferença significativa entre as áreas de osso mineralizado nos grupos C e D. Não houve diferença entre o grupo A e B. Os autores concluíram que, em tais condições experimentais, a terapia com *laser* não-ablativo com  $830\text{nm}$  melhora o reparo ósseo nos estágios iniciais.

Nicola et al. (2003) avaliaram a atividade de células ósseas após a laserterapia próxima ao sítio da lesão óssea. Para o estudo, foram realizados defeitos ósseos em fêmures de 48 ratos. Os animais foram divididos em dois grupos: um experimental, com 24 ratos, e um grupo controle, o qual não recebeu radiação, também com 24 animais. O grupo experimental foi radiado com o um *laser* GaAIs ( $\lambda 660\text{nm}$ ,  $10\text{J}/\text{cm}^2$ ) no segundo, quarto, sexto e oitavo dias após a cirurgia. Os resultados foram avaliados por meio de histomorfometria óssea. Segundo os autores, a atividade celular foi maior no grupo radiado, quando comparado ao controle, concluindo que a laserterapia aumenta a atividade nas células ósseas,

tanto na reabsorção quanto na formação, ao redor do sítio de reparo, sem, entretanto, alterar a estrutura óssea.

Weber et al. (2006) avaliaram histologicamente o efeito da LLLT ( $\lambda$  830 nm; 50 mW; 10 J/cm<sup>2</sup>) no processo de reparo de defeitos ósseos associados com enxerto ósseo autógeno. Os ratos foram divididos em quatro grupos: (G1) controle; (G2) LLLT no leito cirúrgico; (G3) LLLT no enxerto e (G4) LLLT no enxerto e no leito cirúrgico. Os resultados mostraram que a laserterapia aplicada no trans-operatório no leito cirúrgico (G2 e G4) permitiu remodelamento ósseo qualitativa e quantitativamente mais evidente do que quando comparada aos grupos G1 e G3. Os autores concluíram que o LLLT tem efeito biomodulador positivo quando aplicado no leito operatório no trans e pós-operatório.

Blaya et al. (2008) realizaram estudo para avaliar a propriedade bioestimuladora do laser não ablativo aplicado sobre cavidades feitas em fêmur de ratos. Os 18 ratos foram divididos, de modo randomizado, em três grupos contendo 6 animais cada: grupo I - controle - sem irradiação; grupo II: teste que teve aplicação de laser infra-vermelho (GaAlAs); e o grupo III: teste com irradiação de laser vermelho (InGaAlP). Cada grupo foi subdividido em três subgrupos de acordo com o tempo de análise (15, 30 e 45 dias). Os resultados revelaram neoformação óssea maior nos grupos testes até 21 dias de pós-operatório. Aos 30 dias, a formação óssea do grupo controle já se fazia similar aos demais grupos. Os pesquisadores concluíram que tanto o laser vermelho quanto o infra-vermelho aplicados (10J/cm<sup>2</sup>) aumentaram significativamente a neoformação óssea.

Rodrigo et al. (2009) estudaram o efeito sistêmico e o processo de reparo de feridas produzidas em ratos e tratadas com aplicação de laser vermelho e infra-vermelho. Foram utilizados 36 ratos divididos em 4 grupos (controle; laser vermelho; laser infra-vermelho e ambos). Em todas as espécimes foram realizadas três feridas com 1 cm de diâmetro, separadas por 7 cm uma da outra. Cada grupo foi dividido em três subgrupos de acordo com o período de observação (3, 5 e 7 dias de pós-operatório). As aplicações foram realizadas a cada 48 horas, sendo a primeira realizada imediatamente após o procedimento cirúrgico. O efeito sistêmico do laser foi observado, no local mais distante do ponto de aplicação, no terceiro dia pós-operatório. Os autores concluíram que a combinação dos lasers resulta no efeito sistêmico mais evidente no reparo de feridas produzidas em ratos.

De acordo com Campanha et al. (2010), o laser de baixa intensidade (GaAIs) promove a osteointegração de implantes, com baixa estabilidade inicial, quando aplicado em estágios iniciais do processo de reparo ósseo. Os autores realizaram um estudo, através da colocação de implantes com baixa estabilidade primária, na tíbia de 30 coelhos. Esses animais foram divididos em 2 grupos: com e sem aplicação de *laser*. Cada grupo foi subdividido em 3 subgrupos, de acordo com o tempo em que as espécimes foram mortas. Os resultados revelaram um aumento significativo no torque de remoção do grupo com implantes irradiados nos períodos de 15 e 30 dias, quando comparados ao grupo controle.

### 3.4 BISFOSFONATOS

Em uma pesquisa realizada por Liberman (1995), mulheres com osteoporose recebendo alendronato tiveram significativo aumento progressivo na densidade óssea mineral em todas áreas do esqueleto. Enquanto aquelas que receberam placebo, apresentaram diminuição da densidade. A ocorrência de novas fraturas vertebrais foi determinada pela análise de radiografias digitais. O autor concluiu que o uso do alendronato diariamente aumenta progressivamente a massa óssea, coluna e em todo corpo, e reduz a incidência de fraturas vertebrais.

Gandrud et al. (2003) foram aplicadas baixas doses de Pamidronato (1mg/Kg), com administração endovenosa, em intervalos trimestrais, em 11 crianças com osteoporose. Os autores associaram o uso da medicação com diminuição de fraturas e aumento da área e volume da densidade óssea mensurada. Ainda referiram febre, dor muscular, náusea e fadiga como efeitos adversos ocorridos, geralmente, após a primeira administração do fármaco apenas.

Marx (2003) publicou um estudo informando a ocorrência de osteonecrose em pacientes fazendo uso de bisfosfonatos. De 36 pacientes, 24 estavam fazendo uso de pamidronato 90 mg com administração endovenosa mensal; seis estavam fazendo uso de Zolendronato após terem recebido pamidronato; e seis estavam recebendo apenas zolendronato 4 mg endovenoso mensalmente. Vinte e dois pacientes estavam recebendo dexametasona, 24 mantinham a quimioterapia e quatro tinham história de radioterapia. Em 28 pacientes ocorreu a exposição óssea,



parecendo ter como fator desencadeante a exodontia prévia; entretanto, oito pacientes manifestaram a lesão espontaneamente. Nos 36 casos, a exposição foi restrita aos ossos maxilares. Da mesma forma, nenhum caso com exposição óssea em outros ossos tinha sido descrito na literatura. As lesões que ocorreram espontaneamente foram justificadas pela espessura fina da mucosa na região onde ocorreram – superfície lingual da região posterior da mandíbula. Os autores concluíram que o tratamento odontológico preventivo, o uso de próteses dentárias com materiais macios, e a não colocação de implantes pareciam condutas prudentes para evitar o estabelecimento dessa lesão de difícil tratamento. O controle da osteonecrose foi obtido através de tratamentos com antibióticos, anti-sépticos e cirurgias.

Ruggiero et al. (2004) realizaram uma revisão de 63 casos de pacientes que apresentaram osteomielites associadas ao uso de bisfosfonatos entre Fevereiro de 2001 e Junho de 2003. Desses pacientes, 56 receberam BPs endovenoso e apenas 7 receberam via oral. Vinte e quatro pacientes apresentaram envolvimento do osso maxilar, enquanto quarenta apresentaram envolvimento mandibular. Apenas nove pacientes não tiveram história de procedimento dento-alveolar prévio; entretanto, apresentaram exposição óssea espontânea e necrose do osso alveolar. Ao exame microscópico, todas amostras continham osso necrótico associado a bactérias e tecido de granulação. Os autores julgam necessário maiores esclarecimentos para o entendimento da patogênese desse processo, apesar desse estudo servir para alertar clínicos sobre a potencial complicação de necrose associada a pacientes fazendo uso de BPs.

Bisfosfonatos são medicamentos que alteram o metabolismo ósseo, aumentam a massa óssea, e diminuem o risco de fratura, bem como têm uma importante função no tratamento de diversas desordens que afetam o tecido ósseo como osteoporose e hipercalcemia associada à disseminação óssea de neoplasias malignas - especialmente mieloma múltiplo e câncer metastático para o osso. (LICATA, 2005).

Segundo uma revisão de literatura feita por Fernandes, Leite e Lanças (2005), os Bisfosfonatos (BPs) formam uma classe de substâncias químicas que apresenta uma ligação P – C – P em sua estrutura, e agem como inibidores da reabsorção óssea, mediada pelos osteoclóstos. São análogos químicos da substância endógena, denominada ácido pirofosfórico, que no organismo se encontra como pirofosfato, um inibidor natural da reabsorção óssea. Entretanto, essa substância não pode ser usada como agente terapêutico no tratamento de doenças ósseas, pois sofre uma rápida hidrólise enzimática. Os BPs que contêm nitrogênio em sua cadeia lateral são mais potentes. A substituição do átomo central de oxigênio por um de carbono faz com que os BPs sejam mais resistentes a degradação enzimática. Diferentes substituintes ligados ao carbono central dão características únicas para cada fármaco. O grupo R1 fornece a afinidade dos BPs aos cristais ósseos, enquanto o grupo R2 é responsável pela potência e atividade farmacológicas. Por causa dessa diferença de potência entre esses fármacos, suas doses clínicas também diferem acentuadamente. A adição de um grupo hidroxila na posição 1 aumenta a capacidade anti-reabsortiva. Derivados com um grupo amino são extremamente ativos. Além disso, o comprimento da cadeia lateral é muito

importante. Os alimentos causam diminuição na absorção do químico, devendo esse ser administrado 30 minutos antes da refeição. A excreção renal é a única rota de eliminação dos BPs. Após a administração endovenosa, se ligam ao osso e só são liberados quando o tecido ósseo é reabsorvido. Esses fármacos têm se mostrado ativos sobre o metabolismo de vários protozoários, podendo ser utilizado no tratamento de doenças de Chagas, Leishmaniose visceral, malária e toxoplasmose.

Marx et al. (2005) realizaram uma revisão verificando a relação de pacientes que tiveram exposição óssea com o uso de BPs. De 119 pacientes, 32 receberam pamidronato (Aredia), 48 receberam zolendronato (Zometa), 36 receberam Aredia e posteriormente Zometa, e três receberam alendronato (Fosamax). A maioria dos pacientes estava recebendo tratamento para mieloma múltiplo, câncer de mama e próstata; apenas três recebiam o BPs para tratamento de osteoporose. Exodontias, progressão da doença periodontal, cirurgia periodontal, implantes e tratamentos endodônticos foram os eventos principiantes para ocorrência da necrose na maioria dos casos; 25% dos pacientes fizeram a exposição óssea espontaneamente. Os autores concluíram que os fatores locais são de extrema importância e se forem controlados prévio a terapia medicamentosa podem diminuir a incidência de necrose. A não realização de procedimentos cirúrgicos odontológicos pode evitar o desenvolvimento da osteonecrose.

Segundo Suzuki et al. (2006), os BPs inibem lipopolisacarídeos, os quais induzem a diferenciação osteoclástica, fusão, ligação, ação e ativação. Os autores revelam que as moléculas de adesão celular têm importante função no crescimento

do esqueleto. Essas moléculas, tais como: osteopontina e integrina  $\beta 3$  receptor estão envolvidas na diferenciação osteoclástica, migração para regiões de reabsorção, fusão de células precursoras osteoclásticas pós-mitose, polarização celular e formação da zona de denso selamento para a reabsorção através da migração.

De acordo com a revisão de literatura realizada por McClung (2006), os bisfosfonatos são inibidores potentes da atividade osteoclástica, que reduzem o *turnover* ósseo e restabelecem o balanço entre a reabsorção e a formação óssea. Doses orais intermitentes e administração intravenosa são mais convenientes do que o esquema original de doses diárias. Essas drogas são geralmente bem toleradas e têm um excelente perfil de segurança, no qual efeitos colaterais sérios são incomuns. A meia vida residual é longa (anos) no tecido ósseo. Nos pacientes com osteoporose, em poucos meses do início da terapia medicamentosa, observa-se uma diminuição clínica relevante na incidência de fraturas. Os efeitos colaterais gatro-intestinais são geralmente atribuídos aos BPs. A osteonecrose dos maxilares tem sido relatada como outro efeito colateral ocorrido também após procedimentos odontológicos invasivos ou trauma. Orienta-se que os pacientes tenham uma rotina de cuidados dentários. Os Bisfosfonatos têm sido uma importante indicação para prevenção e tratamento de várias formas de osteoporose.

No estudo de casos realizado na Italia no período de 2004 a 2006, foram relatados vinte e nove pacientes, entre 45 e 83 anos, recebendo terapia medicamentosa com pamidronato seguidos por zolendronato (11 pacientes);

zolendronato apenas (15 pacientes) e alendronato (três pacientes). O pamidronato 90mg foi administrado endovenoso por duas a quatro horas a cada quatro semanas; o zolendronato foi aplicado por infusão durante 15 minutos com intervalos de quatro semanas; e o alendronato 70mg foi administrado via oral semanalmente. As administrações foram feitas para tratamento de mieloma múltiplo, metástase óssea e osteoporose. Nenhum paciente foi tratado com corticóide, Quatorze pacientes realizaram exodontias prévias no mesmo local onde ocorreu a necrose. O tempo decorrido entre o procedimento odontológico e o desenvolvimento da osteonecrose variou entre um mês e um ano. Um paciente removeu um implante onde a osteonecrose ocorreu. Ao exame clínico, observou-se uma lesão ulcerada com exposição óssea. Histologicamente, osteíte necrótica associada a infiltrado de linfócitos e granulócitos. De acordo com as características clínicas, foi aplicado um tipo de tratamento: terapia medicamentosa associada ou não a terapia cirúrgica com ou sem bioestimulação com aplicação de *laser* Nd:YAG. As terapias aplicadas promoveram sucesso parcial, em especial quando o *laser* foi utilizado. Os autores concluíram que todo paciente que recebe BPs deveria ser encaminhado ao dentista para uma avaliação cuidadosa, e que cirurgias em maxilares não são recomendadas nesse período (MERIGO et al., 2006).

A Associação Americana de Cirurgia Oral e Maxilofacial (2007) estabeleceu critérios para o diagnóstico de osteonecrose incluindo: (1) tratamento prévio com Bisfosfonato; (2) exposição óssea persistente por mais de 8 semanas; (3) nenhuma história de radioterapia prévia. Entretanto, em 2009 foi feita uma revisão para incluir pacientes com o estágio zero da doença, caracterizado por nenhuma evidência de

necrose óssea, mas com: (1) sintomas inespecíficos como dor ou odontalgia não explicadas por causas odontogênicas; (2) achados clínicos incluindo perda dentária não justificada por doença periodontal crônica e / ou fístula periodontal / periapical não associada à necrose pulpar ou (3) achados radiográficos incluindo perda óssea não atribuída a doença periodontal crônica, alteração óssea trabecular, e não remodelamento ósseo persistente em áreas de exodontia.

A osteonecrose dos maxilares é uma complicação muito discutida na literatura. Apesar da forte relação clínica entre a necrose e a terapia com os BPs, a causa definitiva ainda não é bem esclarecida. Estudos clínicos deixam claro que são necessárias maiores investigações para avaliar os fatores de risco e a incidência desse problema na população de risco. Em adição, é necessário elucidar os mecanismos celular, molecular e genético envolvidos nesse processo. E ainda, seria ideal desenvolver um modelo animal com o processo da doença para estabelecer critérios de tratamento desse efeito colateral – osteonecrose. A eficácia dessa medicação no tratamento e prevenção de complicações no tecido ósseo associadas com osteoporose e metástases ósseas tem um impacto positivo para esses pacientes e é responsável pelo extenso uso na medicina. (RUGGIERO; DREW, 2007).

Vescovi et al. (2007) consideram a aplicação de *laser* Nd:YAG com potencial para aumentar o controle sobre a osteonecrose em maxilares. Nesse estudo clínico, os pacientes foram divididos em 4 grupos: (1) tratados somente com medicação (antibióticos com ou sem antimicóticos); (2) tratados com medicamento e cirurgia

(sequestrectomia e curetagem óssea); (3) tratados com medicamentos e *laser*; (4) tratados com terapia medicamentosa, cirúrgica e aplicação de *laser*. Foi considerado sucesso a ausência de sinais de infecção, sintomatologia dolorosa, fístulas orais ou cutâneas e reparo da mucosa sobre o tecido ósseo. O reparo completo ocorreu em apenas um dos três pacientes tratados somente com medicação; e em ambos tratados com a associação do *laser*. De sete pacientes tratados com antibiótico e cirurgia, três tiveram completo reparo; ao passo que, dos sete que tiveram associação de antibiótico, cirurgia e aplicação de *laser*, seis cicatrizaram completamente. Os autores observaram que o uso do *laser*, com propriedade bioestimulante, melhorou os sinais clínicos do paciente que desenvolveu a osteonecrose.

Bezerra (2007) estudaram as possibilidades medicamentosas para tratamento das reabsorções externas pós-traumatismo dental. Revisaram e discutiram a literatura que indica o uso da medicação de duas formas após a avulsão dentária: imergindo o dente avulcionado em solução contendo BP antes do reimplante, ou utilizando-o como medicação intracanal. Atualmente, existem medicações eficazes para o tratamento de reabsorções inflamatórias, entre elas: hidróxido de cálcio, a associação de corticóide-antibiótico e a calcitonina. Quanto as reabsorções substitutivas, nenhum tratamento mostra-se totalmente eficaz. Os autores, então, verificaram que os BPs são medicamentos promissores na tentativa de controle dessas reabsorções do tipo substitutivas.

Mori et al. (2007), testaram o alendronato como medicação intracanal em dentes de ratos avulsionados que tiveram reimplante tardio. Observaram que, tanto os dentes tratados com bisfosfonato como os tratados com pasta de hidróxido de cálcio, não revelaram reabsorção radicular após 60 dias do procedimento.

Um estudo realizado por Kumar, Meru e Sedghizadeh (2008), avaliou pacientes da Faculdade de Odontologia da Universidade do sul da Califórnia, no período de Outubro de 2005 à Abril de 2007, que desenvolveram osteonecrose nos maxilares após receberem terapia medicamentosa com BPs. Inicialmente, os pacientes receberam BPs para tratamento de mieloma múltiplo (2), câncer de mama (1), câncer de próstata (1) e osteoporose (9). Os bisfosfonatos com nitrogênio foram administrados EV ou via oral. Os pacientes desenvolveram necrose óssea após terem sido submetidos ou não a procedimentos odontológicos: trauma crônico por prótese total (6), exodontia (6) e ambos (1). A necrose como efeito adverso do uso dessa medicação é, clinicamente, similar a osteonecrose induzida por radioterapia ou osteomielites, manifestando úlceras na mucosa bucal e sequestro ósseo. Os autores concluíram que os BPs têm terapêutica benéfica significativa, o que justifica sua indicação e uso. Entretanto, complicações como osteonecroses podem ser esperadas de acordo com a dose e duração da terapia. Tratamento de infecções dentárias e periodontais, e manutenção de higiene bucal são fundamentais antes do início da terapia medicamentosa, buscando prevenir essa importante complicação.

A osteonecrose dos maxilares deve ser relacionada à combinação de fatores que alteram o metabolismo ósseo, que quando combinados com BPs, aumentam o



risco de necrose. Uma revisão de literatura para identificação de casos de osteonecrose de maxilares em indivíduos recebendo bisfosfonatos foi realizada. Todos pacientes receberam essa terapia por uma indicação diferente do câncer. Nesse estudo se observou que entre aqueles que desenvolviam necrose, a maioria tinha condição sistêmica alterada e fazia uso de outras medicações (HESS et al., 2008).

Abu-Id et al. (2008) avaliaram um total de 82 pacientes fazendo uso de bisfosfonatos de 17 centros diferentes onde 78 desenvolveram osteonecrose. Observaram que 94,9% tinham recebido a medicação endovenosa para tratamento de condições malignas, 3,8% por osteoporose e 1,3% para tratamento da doença de Paget. Desses pacientes, 46,2% desenvolveram osteonecrose de maxilares (ONJ) espontaneamente, enquanto os demais (53,8%) tiveram osteonecrose após uma intervenção cirúrgica. Os pacientes com câncer estavam realizando quimioterapia. 10% dos pacientes eram diabéticos e 11% fumantes regulares. Os autores concluíram que pacientes com desordens malignas recebendo BPS endovenosos, e / ou com história de quimioterapia, radioterapia ou uso corrente de esteróides são pacientes de alto risco para desenvolvimento de necrose. E, uma vez identificado um paciente de alto risco, esse deve sofrer uma avaliação dentária rigorosa para evitar procedimentos invasivos após início da terapia com BPS. Nesse estudo, os pesquisadores classificaram os pacientes de baixo risco como sendo aqueles que recebem bisfosfonato via oral e não têm história de quimioterapia ou radioterapia prévia.

Sedghizadeh (2008) realizou estudo para identificar o biofilme microbiano da osteonecrose em maxilares secundária ao uso de BPs. Amostras de osso de pacientes com a doença foram avaliadas através de técnicas histopatológicas convencionais e microscopia eletrônica de varredura. A variedade morfológica estendeu-se de 2 a 15 tipos; e eles incluíram espécies de *fusobacterium*, *bacillus*, *actinomyces*, *staphylococcus*, *streptococcus*, *selemonas* e três tipos de *treponemes*. A co-agregação foi observada entre as diferentes espécies do biofilme. Os autores concluíram que os organismos identificados são coerentes com a microbiota da cavidade bucal, particularmente durante processos patológicos como doença periodontal, pulpar, periapical e fúngica. Considerando a capacidade bacteriana em causar a perda óssea patológica, os autores concluíram que, além da implicação clínica e terapêutica, o biofilme microbiano tem importante função no processo da osteonecrose.

Regev, Lustmann e Nashef (2008) descreveram uma técnica de extração dentária com menor trauma possível ao tecido ósseo. É um procedimento que causa destruição ao ligamento periodontal e extrusão dentária. É realizada através do uso de uma banda adaptada na porção cervical do dente e, que é deslocada em direção apical progressivamente. Segundo esses autores, das 21 raízes, de 10 pacientes, que foram extraídas por essa técnica apenas três não tiveram sucesso, o que torna esse procedimento recomendado para ser usado em pacientes fazendo uso de BPs. Desses 10 pacientes submetidos a essa técnica, oito pacientes tinham recebido a medicação para tratamento de câncer de mama e mieloma múltiplo; dois pacientes tinham realizado tratamento para osteoporose por 10 anos. Os autores concluíram

que essa técnica de extração atraumática é ideal para ser usada em pacientes recebendo terapia medicamentosa com BPs, podendo prevenir o estabelecimento da osteonecrose.

Segundo Santos et al. (2008), a etiopatogenia da osteonecrose continua em investigação, mas a relação entre o uso de BPs e o desenvolvimento de necrose óssea em tecidos bucais após a manipulação ou trauma tem ficado cada vez mais evidente. A doença de base do paciente não parece influenciar tanto quanto o tipo, a dose e o tempo da administração do fármaco. Uma vez estabelecida a necrose, o tratamento referido na literatura é muito variável; mas seu tratamento tem como consenso uma abordagem multiprofissional. A suspensão ou substituição dos BPs deverá ser bem avaliada quanto ao custo – benefício no bem estar do paciente.

Vescovi et al. (2008) descreveram 28 casos de pacientes que desenvolveram a osteonecrose e foram tratados com laser Nd:YAG associado ou não a antibiótico terapia e cirurgia. Os resultados mostraram melhora clínica completa em nove dos 14 pacientes tratados com laser biomodulador. Considerando sucesso clínico, a ausência de sensibilidade ou sintomas de infecção, nenhuma exposição óssea ou fístula ativa, os autores concluíram que o laser tem potencial para controle da necrose.

Jakobson et al. (2008), verificaram melhora da fixação biomecânica e osteointegração do implante após aplicação local de alendronato na região

manipulada. Os pesquisadores realizaram a colocação de implantes em tíbia de 10 cães, bilateralmente, sendo um lado sem medicação (grupo controle).

O ácido zolendrônico tem sido indicado para tratamento de osteoporose. Em uma pesquisa realizada em 2009 por Mclung et al. (2009), os autores observaram que o Zolendronato 5mg, aplicado endovenoso - em doses anuais ou em única dose, aumenta de forma significativa a densidade óssea mineral da região lombar da coluna e do quadril e fêmur. Ambas as formas de tratamento preveniram a perda óssea, e foram bem toleradas por mulheres com perda da massa óssea pós-menopausa.

Osteonecrose dos maxilares é uma osteomielite crônica de causa multifatorial. Os fatores sistêmicos relevantes, como imunossupressão, quimioterapia, terapia com corticóide e doenças endócrinas, são capazes de influenciar no desenvolvimento dessa lesão. A literatura demonstra uma relação entre o uso crônico de BPs e o desenvolvimento de osteonecrose. Os bisfosfonatos contendo nitrogênio são usados para tratamento de metástases ósseas de tumores malignos, prevenção e tratamento de osteoporose, doença de Paget e hipercalcemia. O tratamento da osteonecrose é difícil e prolongado. Quando o uso de antibióticos e anti-sépticos (conservador) não é efetivo no controle da doença; então, um tratamento radical, como ressecção do osso envolvido, deve ser realizado (BORGIOI, 2009).

Segundo Martins et al. (2009 b) o tratamento da osteonecrose é bastante complexo e diversos protocolos terapêuticos vêm sendo descritos na literatura com índices variáveis de sucesso. Assim, pensando nessa forma de osteonecrose, a prevenção é fundamental, pois a maior parte dos casos é desencadeada por algum fator traumático, quadros infecciosos que levam ao rompimento da mucosa oral, infecção, exposição e necrose óssea. O protocolo preventivo deve incluir avaliação clínica e imaginológica oral antes do tratamento com BPs ser iniciado, para eliminar focos de infecção, seguido de consultas odontológicas periódicas para eliminar possíveis fatores traumáticos, monitoramento do nível do metabolismo ósseo pelo CTx e orientação dos pacientes quanto aos riscos de desenvolverem a osteonecrose. Na anamnese realizada durante o tratamento odontológico, o cirurgião dentista deve estar alerta para identificar pacientes usuários crônicos de BPs e poder prevenir as complicações decorrentes do uso dessa droga. Os oncologistas, por outro lado, devem solicitar aos pacientes que façam avaliação odontológica prévia e mantenham saúde bucal.

Martins et al. (2009 a) relataram o caso clínico de uma paciente com adenocarcinoma de mama primário submetida a quimioterapia e uso de ácido zolendrônico devido a metástases ósseas no quadril. Após sete meses do uso do bisfosfonato, a paciente apresentou exposição óssea mandibular. Foi realizado debridamento cirúrgico, resultando em fístulas e dor. Com a realização de antibioticoterapia e enxaguatório bucal, ocorreu melhora com o fechamento parcial das fístulas. Entretanto, em quatro meses, a situação clínica se agravou, a paciente

retornou com necrose submandibular e exposição óssea intra e extraoral com drenagem. Passado cinco dias de tratamento paliativo, a paciente morreu de sépsse.

Thong et al. (2009), afirmaram que o etidronato, quando usado como medicação intra-canal em dentes avulsionados, não impede a reabsorção radicular após o reimplante em macacos. Compararam o processo de reparo ósseo, após 8 semanas do reimplante, dos dentes tratados com medicação de hidróxido de cálcio ou bisfosfonato e sem tratamento prévio. Verificaram que em 39% dos casos ocorreu reabsorção e em 41% anquilose quando utilizado o etidronato como medicação intra-canal.

Zahrowski (2009) verificou os métodos disponíveis para monitorar clínica e radiograficamente o tratamento ortodôntico de pacientes que estão recebendo terapia com bisfosfonatos. Nas radiografias, observa-se na imagem uma área hipermineralizada. Clinicamente, durante o tratamento ortodôntico, pode se observar uma diminuição progressiva da movimentação dentária. Movimentação dentária, mobilidade dentária, mudanças radiográficas da lâmina dura e do espaço do ligamento periodontal devem ser avaliados constantemente. Os riscos ortodônticos devem ser comparados com o aumento dos riscos sistêmicos em caso de suspensão do uso da medicação. Nenhum paciente deve suspender o BP sem o conhecimento e consentimento do médico que prescreveu tal fármaco.

Bartzela (2009) em uma revisão de literatura verificaram que muitos fármacos interferem no tratamento ortodôntico. É fundamental uma anamnese detalhada para obter informações adequadas dos pacientes quanto à sua condição sistêmica e ao uso de medicações. Além da osteonecrose, o aumento do tempo para movimentação dentária é uma possibilidade relatada e não desejada.

Recentemente, um comprometimento ocular tem sido relatado na literatura como um dos efeitos adversos do uso de BPs. O artigo escrito por Mckague, Jorgenson e Buxton (2010), descreve o caso clínico de uma paciente que manifestou conjuntivite crônica enquanto usava o medicamento alendronato. Além disso, edema orbital e periorbital também tem sido relatado como condições mais raras de ocorrência.

A indicação do zolendronato por infusão anual é um método relativamente novo, mas que já deixa evidente sua eficácia no tratamento de osteoporose. O efeito positivo do zolendronato na prevenção de fraturas por osteoporose introduz um novo conceito de administração, tornando esse fármaco tão bom quanto, se não superior, as outras modalidades de tratamento. A incidência de efeitos adversos é baixa, sendo a ocorrência da osteonecrose rara, o que faz o ácido zolendrônico ter boa aceitação pelos pacientes (HAMDY et al., 2010).

No estudo realizado por Hutchinson et al. (2010), 10 em 30 pacientes sem exposição óssea, mas com sintomatologia dolorosa, fazendo uso de BPS,

apresentaram no exame de imagem esclerose óssea na região onde , clinicamente, referiam dor. Os autores sugerem que esses dados devem ser melhor entendidos ou esclarecidos para se determinar se a esclerose óssea é um achado específico indicador do risco de progressão da osteonecrose.

Na pesquisa realizada por Lazarovici et al. (2010), 18 de 78 pacientes fazendo uso da terapia medicamentosa com bisfosfonato, desenvolveram necrose nos maxilares após dois meses da cirurgia bucal. Desses pacientes, quatro fizeram uso de BPs via oral e 14, via endovenosa. 67% dos pacientes apresentaram osteonecrose no estágio um; 27%, no estágio dois; e 6%, no estágio três. Dos 18 pacientes com a necrose, cinco foram no segmento posterior da mandíbula; três no segmento anterior; seis na porção posterior da maxila; e quatro no segmento anterior. Os autores mediram os níveis de CTX (*C-Terminal Telopeptide of Collagen I*) - produto degradado de colégeno tipo I e o maior constituinte da matriz orgânica óssea, em 74 pacientes. Os resultados revelaram que valores inferiores a 150 mg/ml foram significativamente associados ao desenvolvimento de necrose. Os pesquisadores também mediram os níveis de BAP (*Bone Alkaline Phosphatas*) – enzima específica osteoblástica) e PTH (*Parathyroid Hormone*), não encontrando diferença significativa entre os valores medidos nos pacientes que desenvolveram ou não a necrose. Os autores concluíram que os níveis de CTX, apesar de não serem indicadores definitivos da osteonecrose, têm importante colaboração na avaliação prévia à cirurgia oral. Já o BAP é valido apenas como informação adicional. Enquanto o PTH não parece ter valor de predição para desenvolvimento da necrose.





### 4.1 RESPALDO ÉTICO

Nessa pesquisa, foram respeitados os princípios éticos na experimentação animal, de acordo com a lei n° 11.794 da Constituição Federal de 08 de Outubro de 2008 (Lei Arouca) e com a resolução n° 714 do Conselho Federal de Medicina Veterinária de 20 de Junho de 2002. Foi aprovada por: Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS (protocolo sob o n°: 0104/08) – Anexo A, e Comitê de Ética para Uso de Animais – CEUA (protocolo sob o n°: 09 /00096) – Anexo B.

### 4.2 CARACTERIZAÇÃO

A pesquisa foi realizada junto ao programa de Pós-graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), como parte integrante da linha de pesquisa: Diagnóstico e terapêutica aplicada.

### 4.3 VARIÁVEIS

Variáveis independentes: *laser* ablativo e bisfosfonato;

Variáveis dependentes: processo ósseo alveolar.

#### **4.4 HIPÓTESE**

A radiação com *laser* de arseneto de gálio e alumínio acelera a neoformação óssea e atua na biomodulação do processo de reparo dos tecidos ósseo e mole em ratos.

O uso de bisfosfonato torna o animal mais suscetível durante um procedimento odontológico invasivo, dificultando o reparo da ferida e potencializando a possibilidade de ocorrência da osteonecrose.

A laserterapia favorece o processo de reparo de feridas em animais fazendo uso do bisfosfonato.

#### **4.5 CÁLCULO DA AMOSTRA**

Utilizou-se o software (Minitab 15) para determinar o cálculo amostral. Adotando-se um poder de 0.80 (80%) e um nível de significância de 0,05 (5%), para a realização de uma Anova com seis níveis de tratamentos (G1 A, G1 B, G2 A, G2 B, G3 A e G3 B) e supondo uma diferença mínima significativa entre as médias dos tratamentos em torno de 1,8 vezes o desvio padrão do erro, faz-se necessário 9 repetições (ratos) por tratamento. Assim, o total de ratos necessários foi de 54.

#### **4.6 CONFIGURAÇÃO DA AMOSTRA**

Para o presente trabalho, foram utilizados 54 ratos da raça Wistar, *Rattus norvegicus*, variação *albinus*, machos, com peso médio de 336 gramas, clinicamente saudáveis. Os animais foram obtidos no vivário da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) e passaram por um período de quinze dias de

ambientação no Laboratório de Experimentação Animal do Instituto de Cardiologia de Porto Alegre / RS, onde a pesquisa foi realizada. Durante todo o período experimental, os animais foram alimentados com dieta sólida padrão do biotério (ração NUVILAB CR1<sup>®</sup>/ Nuvital Nutrintes LTDA.), exceto nas primeiras 24 horas após a intervenção, e água *ad libidum*. Nesse primeiro momento de pós-operatório, os animais receberam “dieta de cafeteria” (salsicha e queijo), apesar de se deixar a ração servida.

#### **4.7 MACROAMBIENTE E MICROAMBIENTE**

A sala para o alojamento dos animais tinha controle do fotoperíodo, com ciclos de luz fluorescente / escuridão de 12 horas. A entrada no macroambiente sempre foi feita com equipamentos de proteção individual (jaleco, máscara, óculos e luvas). O controle de ruídos foi seguido cuidadosamente para evitar estresse e alterações fisiológicas nos animais.

As gaiolas utilizadas no experimento eram plásticas contendo na parte superior um aramado em aço inox para colocação do bebedouro (garrafa em policarbonato com anel de vedação em silicone e bico de aço inox) e ração. Essas caixas foram cobertas com tampa superior contendo elemento filtrante e encaixadas numa prateleira ventilada (Figura 01), o que garantia condições de temperatura (22° +/- 2) e umidade (45 – 75%) ideais para a higidez animal. A troca das gaiolas, para limpeza e desinfecção, foi realizada diariamente com troca da maravalha (raspas de madeira autoclavadas).



Figura 1 – Prateleira Ventilada.

#### **4.8 ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS**

Os animais foram selecionados aleatoriamente e divididos, de modo randomizado, em 3 grupos contendo 18 espécimes. Em todos os grupos, o período de observação foi de 03 meses. O grupo G1 foi o controle; o G2 recebeu a medicação sem laserterapia e o G3 foi o grupo teste que recebeu terapia medicamentosa e laserterapia. Cada grupo foi subdividido em dois subgrupos contendo 09 espécimes. No subgrupo A foi realizada a exodontia do incisivo inferior

esquerdo; e no subgrupo B, defeito com broca na região do primeiro molar inferior esquerdo (Quadro 1).

GRUPO	SUBGRUPO	n	TERAPÊUTICA COM BISFOSFONATO	LASERTERAPIA	TRATAMENTO	PERÍODO DE OBSERVAÇÃO
G1	G1A	09	NÃO	NÃO	EXO	03 meses
	G1B	09			BROCA	03 meses
G2	G2A	09	SIM	NÃO	EXO	03 meses
	G2B	09			BROCA	03 meses
G3	G3A	09	SIM	SIM	EXO	03 meses
	G3B	09			BROCA	03 meses

Quadro 1 – Organização dos grupos e períodos de observação.

#### 4.9 IDENTIFICAÇÃO DO ESPÉCIME

Em cada gaiola foram acomodados dois ratos, garantindo espaço, suficiente, para movimentos corporais normais, acesso a água e alimento (Figura 02). Como o número de animais por grupo era ímpar, um espécime permaneceu isolado. As caixas foram identificadas por etiquetas coloridas contendo o nome e telefone do pesquisador e dados de cada grupo, subgrupo e numeração dos animais (Figura 03). Além disso, cada roedor também foi identificado na cauda. A marcação foi feita utilizando-se uma combinação de cores de canetas de retroprojektor. Preconizou-se realizar as marcações, na base da cauda, nas cores vermelha, azul e preta para identificar os grupos G1, G2 e G3 respectivamente. E as cores vermelha e azul, pintadas na ponta da cauda, para demarcar os subgrupos A e B. Essa última marcação foi realizada contendo de um a nove halos, o que também correspondia ao número do espécime em seu subgrupo (Figura 04).



Figura 02 – Duas espécimes por gaiola



Figura 03 – Etiquetas (identificação das gaiolas)

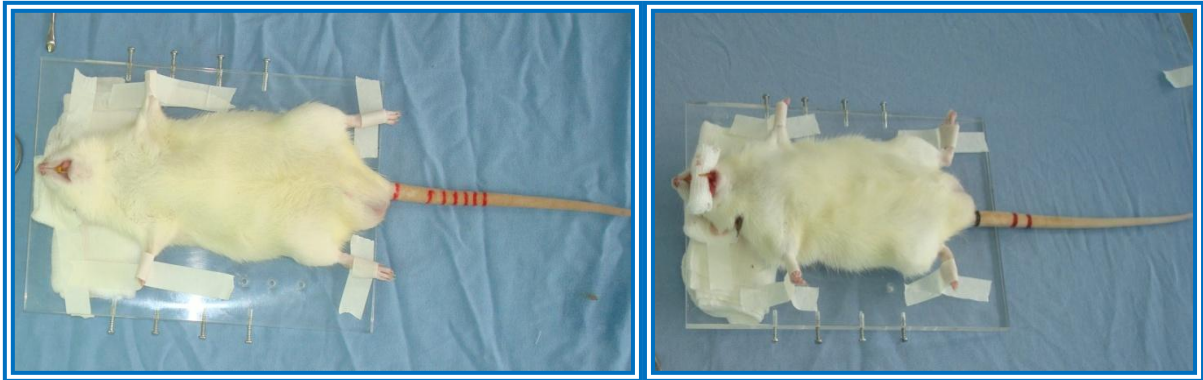


Figura 04 – Identificação da amostra com marcações na cauda (exemplos: G1 A VI e G3 A II)

#### 4.10 TÉCNICA CIRÚRGICA

Previamente ao ato cirúrgico, os animais foram submetidos à anestesia geral através da injeção intraperitoneal, administrando-se a substância na cavidade peritoneal entre os órgãos abdominais. Injetou-se o fármaco na metade posterior do abdome com o animal contido pelo dorso. Essa imobilização foi feita firmemente, colocando-se a mão no dorso e caixa torácica; a cabeça foi contida com o polegar e o indicador, imediatamente atrás da mandíbula. A substância anestésica continha 0,025 ml/100g de peso corpóreo do animal, do sedativo, analgésico e relaxante muscular Cloridrato de Xilazina 2% (Anasedan<sup>®</sup> Divisão Vertbrands Saúde Animal – Jacaréi - SP / Brasil) e 0,05 ml/100g de peso corpóreo do animal do anestésico geral Cloridarato de Ketamina 10% (Dopalen<sup>®</sup> Divisão Vertbrands Saúde Animal – Jacaréi - SP / Brasil) (Figura 05).





Figura 05 – Técnica anestésica.

A exodontia do incisivo inferior esquerdo (subgrupo A) foi realizada, em nove animais de cada grupo. Inicialmente foi realizada a sindesmotomia, múltiplas fraturas do processo ósseo alveolar, luxação e exarticulação do elemento dentário com pinça hemostática curva adaptada para este procedimento em ratos. Após, foi realizada a regularização óssea (quando necessário), hemostasia e sutura com fio de nylon 4-0 (Mononylon Ethilon/Ethicon CO) (Figura 06).

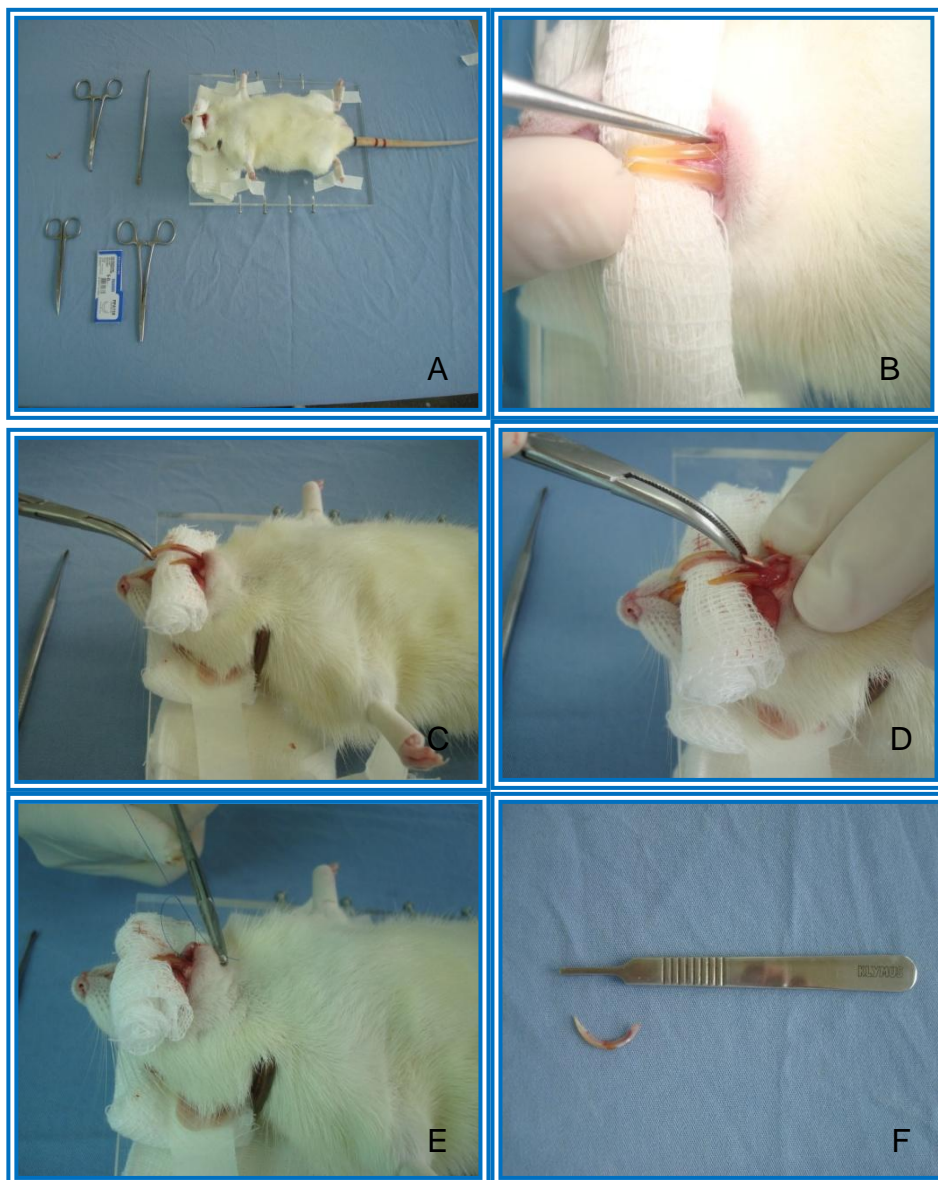


Figura 06 – Técnica de exodontia A. mesa cirúrgica com instrumental utilizado; B. sindesmotomia; C. e D. remoção do dente com movimento curvo; E. sutura; F. incisivo inferior esquerdo.

Nos outros nove animais, de cada grupo, foi realizado um defeito com broca (subgrupo B). A coroa dentária e parte das raízes do primeiro molar inferior esquerdo foram desgastadas. Utilizou-se uma broca esférica carbide, tamanho quatro, adaptada a peça reta de um micromotor. A perfuração foi realizada com profundidade de 04 mm (conforme marcado na broca previamente) sob irrigação constante de soro fisiológico e aspiração. Instrumentais (espátulas) foram adaptadas

para serem utilizadas como afastadores e protetores da mucosa jugal e língua do animal. Após, foi realizada a hemostasia e sutura com fio de nylon 4-0 (Mononylon Ethicon) (Figura 07).

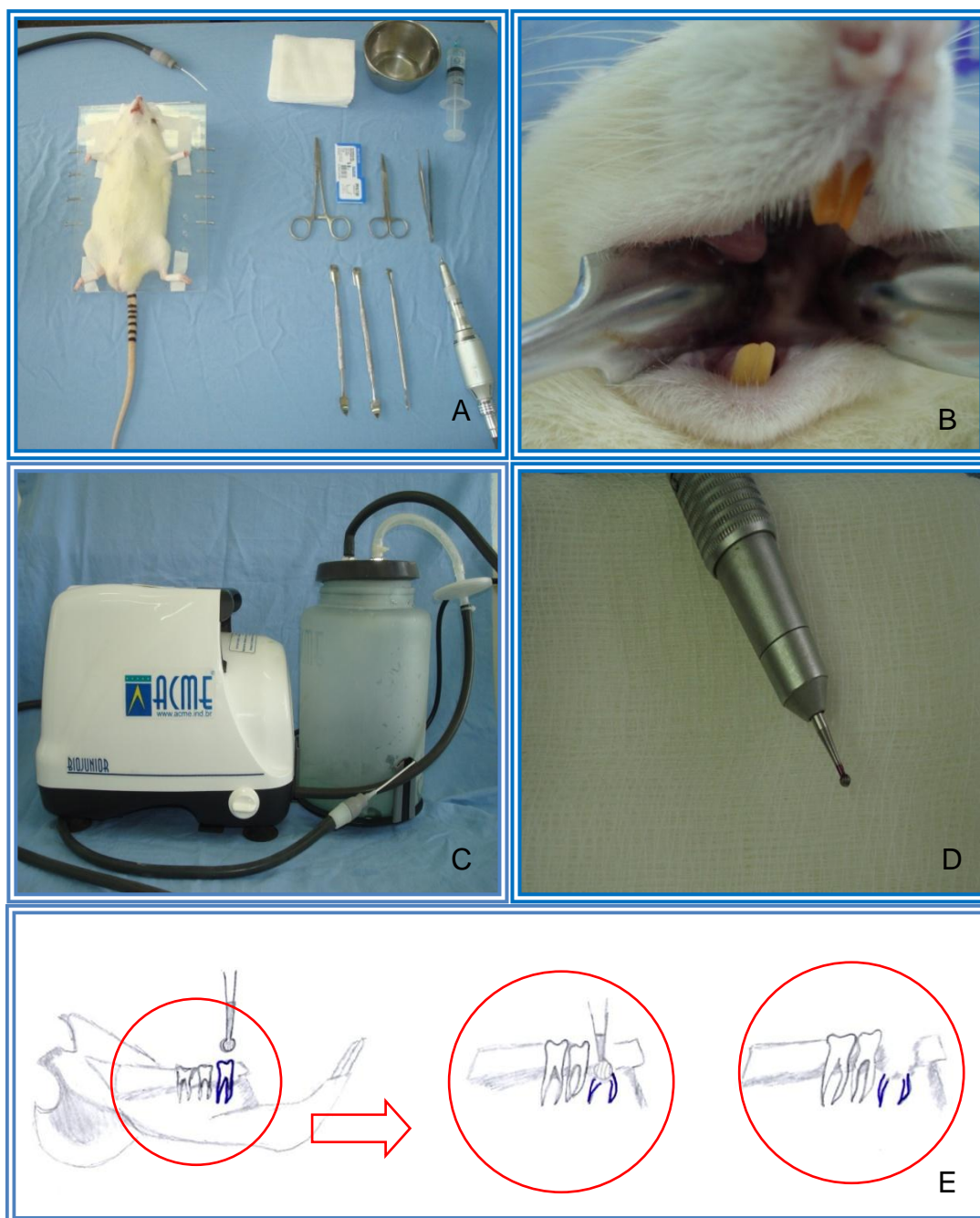


Figura 07 – Técnica cirúrgica: defeito com broca (A. mesa cirúrgica com instrumentais utilizados; B. detalhe do afastamento; C. equipamento de aspiração; D. broca com marcação em tinta montada em peça reta de micro-motor; E. desenho esquemático da técnica de desgaste com broca do dente e parte do processo alveolar).

#### 4.11 MEDICAÇÃO

Os grupos de estudo receberam injeção intra-peritoneal (0,6mg/kg) de zolendronato (Zometa<sup>®</sup>, Novartis Biociências S.A.) – Anexo E, e os grupos sem tratamento receberam solução salina (Figura 08). A terapia com a medicação e a solução salina foi realizada por um período de 3 meses. Em cada espécime foi aplicada uma dose da solução a cada 28 dias, totalizando 3 aplicações da substância. A exodontia do incisivo inferior ou defeito com broca foram realizadas sete dias após a segunda dose do fármaco. A pesagem dos roedores foi feita com 24 horas de antecedência da data determinada para administração do fármaco. Isso permitiu que fosse realizado o cálculo da dose máxima não letal, a ser aplicada para cada animal. Nas datas pré-determinadas para a aplicação foram abertos frascos novos, descartando-se a medicação restante ao final do dia. O lacre de cada ampola foi rompido e aberto dentro de uma cabine de troca (Tecniplast CS5), sendo realizada a manipulação do fármaco apenas nesse ambiente (Figura 09). Esse equipamento garantiu um espaço protegido dos agentes atmosféricos, evitando a contaminação do processo, da experimentação, dos pesquisadores e dos animais. As seringas e agulhas utilizadas foram individuais e descartadas após o uso em cada amostra.



Figura 08 – Técnica de aplicação intra-peritoneal.



Figura 09 – Cabine de Troca (tecniplast CS5): o ar ambiente é introduzido num módulo de envio, previamente filtrado, antes de ser distribuído na área de trabalho com fluxo laminar unidirecional.

#### 4.12 LASERTERAPIA

O aparelho utilizado foi o *laser* de diodo infra-vermelho (arseneto de gálio e alumínio), com potência de 90mW e comprimento de onda de  $\lambda=830\text{nm}$ , com emissão contínua (Thera Laser/ DMC Equipamentos, São Paulo, Brasil) (Figura 10).

O sistema de entrega foi constituído por fibra óptica com  $\varnothing = 0,06\text{cm}$ . O procedimento foi realizado de forma pontual, na condição emissão contínua, com uma dose de  $1\text{J}/\text{cm}^2$ , na região central do alvéolo, com tempo total de 12s.

Os ratos, dos dois subgrupos (A e B), ainda sob efeito da anestesia geral, foram radiados imediatamente após o procedimento, de forma pontual, intra-oral, no centro da área de reparo. Por 14 dias a cada 48 horas, de acordo com o grupo experimental a que pertenciam, foram realizadas aplicações de *laser* com uma dose

de  $1\text{J}/\text{cm}^2$ , de forma pontual, extra-oral. A aplicação extra-oral foi realizada através da contenção do animal, sem ser necessário o uso de sedação. Foi realizado um protocolo de 07 aplicações de *laser* (Figuras 11 e 12).

Os animais dos grupos G1 e G2 receberam o mesmo tratamento, porém o aparelho de *laser* permaneceu desligado; isso permitiu que o estresse causado pela manipulação dos ratos fosse igual nos diferentes grupos.

De acordo com as regulamentações brasileiras, o *laser* foi aplicado em local isolado, com caracteres e simbologia internacionais para área em uso ou presença de radiação, observando os procedimentos de segurança recomendados para tratamento com luz *laser*.



Figura 10 – Aparelho de *laser* de baixa potência (Thera laser®).

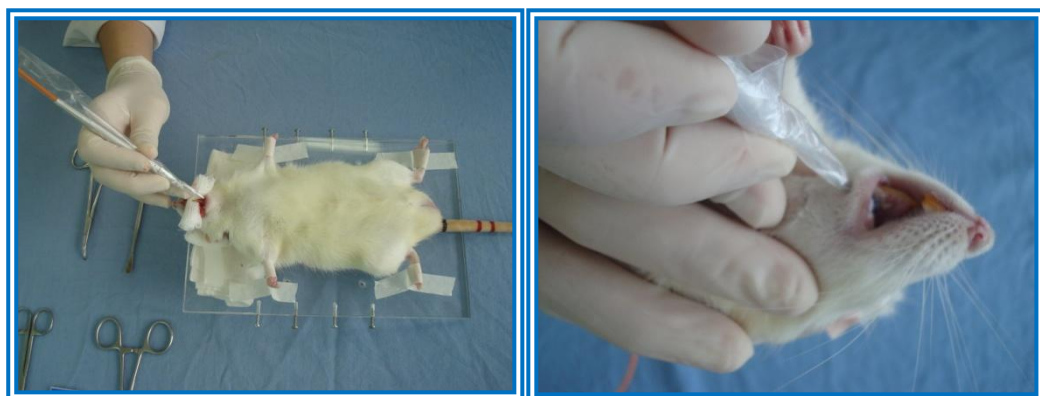


Figura 11 – laseterapia imediatamente após a exodontia (aplicação intra-oral diretamente sobre a loja cirúrgica) e 48 horas após o procedimento (aplicação extra-oral).



Figura 12 - Laseterapia imediatamente após o desgaste (aplicação intra-oral diretamente sobre a loja cirúrgica) e 48 horas após o procedimento (aplicação extra-oral).

#### 4.13 PÓS-OPERATÓRIO

Imediatamente após o procedimento cirúrgico, os ratos foram acomodados em camas aquecidas, o que permitiu controlar a temperatura corporal durante a fase inicial da recuperação anestésica. Isso também garantiu cuidado maior no controle de sangramento pós-operatório e avaliação da reação do animal imediatamente após o manejo (Figura 13).



Figura 13 – Ilustração da mesa aquecida.

Após estes procedimentos, os animais continuaram sendo mantidos no Vivário do Laboratório de Experimentação Animal do Instituto de Cardiologia de Porto Alegre e acomodados em gaiolas, mantidos em condições adequadas de temperatura (25°C), umidade e ventilação; identificados e numerados de acordo com o grupo correspondente, data das cirurgias, radiações e medicações. A limpeza das gaiolas continuou sendo realizada diariamente, a fim de diminuir os riscos de contaminação e infecção pós-operatória.

Os ratos receberam analgésico no pós-operatório imediato e por 48 horas após o procedimento. Foi administrada Torbugesic (Butorfanol) 2mg/Kg do peso corpóreo de 4/4h subcutânea.

#### **4.14 PREPARO DAS AMOSTRAS**

Para a obtenção das amostras, os animais foram submetidos à eutanásia aos 44 dias de pós-operatório, através da exposição dos mesmos em uma câmara hermética de dióxido de carbono, até que a morte dos animais fosse constatada pela ausência dos sinais vitais (Figura 14).



Figura 14 – Câmara de CO<sub>2</sub>



Antes da obtenção das amostras para avaliação microscópica, as áreas manipuladas foram fotografadas com câmera digital, imediatamente após a morte dos animais, corretamente identificados (Figura 15). Foi realizada a descrição detalhada, conforme o que foi observado clinicamente, quanto à presença ou ausência de pus, epiteliação e exposição ou não de osso. O observador que fez a descrição clínica não tinha conhecimento sobre o grupo a que a amostra pertencia.



Figura 15 – Foto realizada prévia a obtenção da amostra, e imagem aproximada - com detalhe da área manipulada.

Após a constatação da morte dos animais pela ausência dos sinais vitais, as peças cirúrgicas foram removidas com segmentos dos grupos testes e dos grupos controle. A mandíbula foi desarticulada e separada na linha média por uma lâmina de bisturi número 12. Apenas a hemi-mandíbula manipulada no experimento foi utilizada, sendo a outra metade desprezada(Figura 16).



Figura 16 – Mandíbula desarticulada. Linha indicando a divisão das hemi-mandíbulas.

As amostras foram colocadas em vidros previamente etiquetados, contendo solução de formalina tamponada a 10%, e mantidos por um período de 48 horas, tempo necessário para a fixação.

O processamento histológico foi realizado no Laboratório de Anatomia Patológica do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Odontologia da PUCRS, seguindo a rotina laboratorial preconizada. As peças foram descalcificadas em ácido nítrico a 5 % durante 72 horas, seguindo-se a sua desidratação em álcool. Após incluídas em parafina, os cortes foram realizados longitudinalmente no meio do alvéolo, seguindo a linha do sulco central do primeiro molar inferior, divididas em secções com 6µm de espessura. As lâminas foram preparadas com a técnica de coloração por hematoxilina e eosina (HE) e observadas em microscópio óptico de

luz. As amostras foram codificadas de modo que o observador não identificasse o grupo que estava avaliando.

#### 4.15 ANÁLISE DAS AMOSTRAS

Foram realizadas três formas de análise:

- análise macroscópica descritiva sobre o processo de reparo do tecido mole e exposição ou não de tecido ósseo (subgrupos A e B);
- análise histológica (através da observação descritiva de um mosaico e observação em microscópio com objetiva de 40X) sobre a presença de necrose em tecido ósseo e em tecido conjuntivo (subgrupos A e B);
- análise morfométrica, através da mensuração de área, de tecido ósseo, (subgrupo B);

A região para a análise do alvéolo foi padronizada. Uma área, equidistante da base mandibular e raízes do primeiro e segundo molares inferiores, foi determinada para avaliação de parte do alvéolo onde foi realizada a exodontia. Já a área do alvéolo criado por desgaste com broca foi localizada por ser a região imediatamente anterior ao segundo molar inferior (Figura 17).

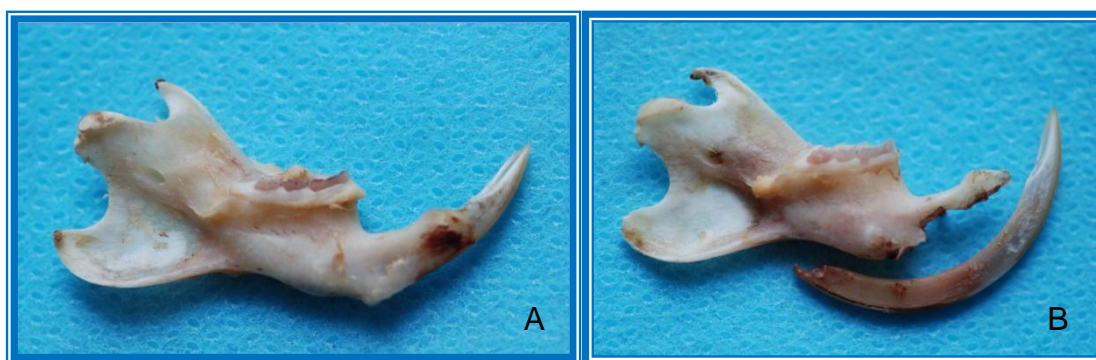


Figura 17: Padronização da imagem capturada. (A) Hemimandíbula de rato. (B) Extensa relação do incisivo extraído com a mandíbula.

#### **4.15.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA**

Todas as amostras foram avaliadas, com auxílio de uma lupa e boa iluminação, quanto ao aspecto macroscópico da evolução do processo de reparo no alvéolo, tanto nos espécimes do grupo controle quanto nos dos grupos experimentais.

Após a constatação da morte dos animais, as áreas operadas foram fotografadas com câmera digital (KODAK 7.2 megapixels e 4X zoom óptico). As amostras foram codificadas e entregues aos dois observadores, que realizaram uma análise descritiva da região. As fotos foram observadas num segundo momento, levando-se em consideração três critérios:

- reparo da ferida epitelial completa ou parcial;
- exposição ou não de tecido ósseo.

As imagens também foram codificadas para impedir que os avaliadores reconhecessem a peça no momento da análise.

#### **4.15.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA**

O estudo das lâminas foi realizado com o emprego da microscopia óptica, visando o estudo do processo de reparo do tecido ósseo através da análise descritiva. Para tal, foi realizado uma avaliação com lentes objetivas de 5X, 10X e 40X. Os aspectos histológicos das peças do grupo controle, bem como das peças submetidas a tratamento foram descritas levando-se em consideração: presença de

tecido ósseo, presença de necrose no trabeculado ósseo (osso não vital) e presença de pus no tecido de granulação.

#### **4.15.3 ANÁLISE DESCRITIVA POR OBSERVAÇÃO DE MOSAICO**

Após a confecção do mosaico, foi realizada uma análise descritiva da região alveolar quanto à presença de osso necrótico e presença de supuração no tecido de granulação. Para as mensurações foram preconizados os seguintes valores:

Quanto ao tecido ósseo:

- 0: osso sadio;
- 1: presença de pouco osso necrótico;
- 2: presença predominante de osso necrótico;

Quanto à presença de pus no tecido de granulação:

- 0: ausência de pus;
- 1: presença de pus;

Essas informações foram dispostas em uma tabela específica e analisadas estatisticamente.

##### **4.15.3.1 MOSAICO**

A análise morfométrica foi realizada através da avaliação de imagens histológicas capturadas a partir da observação por objetivas de 5X, o que permitiu verificar qualitativamente a formação ou não de tecido ósseo no local manipulado. É sabido que quanto maior o aumento proporcionado pela lente objetiva, menor é o campo capturado da lâmina. Logo, ao se observar o campo com objetiva de 10X, não foi possível analisar todo o alvéolo, sendo necessário realizar uma montagem a partir de várias capturas de imagens da mesma lâmina. A captação da imagem foi

realizada através de uma micro-câmera acoplada ao microscópio e interligada ao computador (câmera Motican 2500 com 5 Mega pixels e o software Motic Images 2.0). Isso permitiu que se obtivesse uma imagem sem distorção (através de montagem) igual à imagem original (5X), porém com nível superior de detalhamento e sem redução do campo de análise (Figura 18).

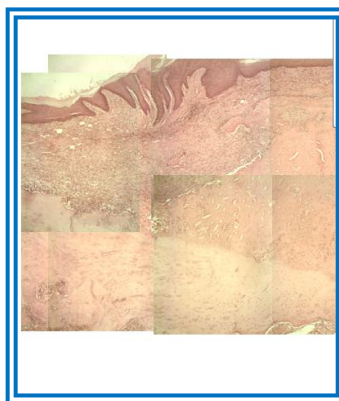


Figura 18 – Mosaico: imagem constituída pela sobreposição de 08 imagens com aumento de 10X. A montagem permite analisar, com mais detalhe, a mesma área fotografada uma única vez no aumento de 5X.

#### **4.15.3.2 CONFECÇÃO DO MOSAICO**

O mosaico foi confeccionado utilizando-se o programa da *Microsoft Office Word 2007*. No novo documento, foi inserido um determinado número de caixas de textos necessários para cada montagem. Na caixa de texto mais superior da folha A3, foi colada a imagem obtida com a objetiva de 5X, para que se tivesse a idéia total da imagem a ser montada. Nas demais caixas, foram inseridas as imagens correspondentes àquela numeração. As imagens foram tratadas automaticamente pelo programa *Microsoft Office Picture Manager* e, em seguida, o tamanho foi padronizado (Figuras 19 e 20). A cor das linhas e do preenchimento das caixas de

texto foi removida. E, então, as imagens puderam ser arrastadas com o mouse e sobrepostas de modo a permitirem a formação da imagem como um mosaico (Figuras 21 e 22).

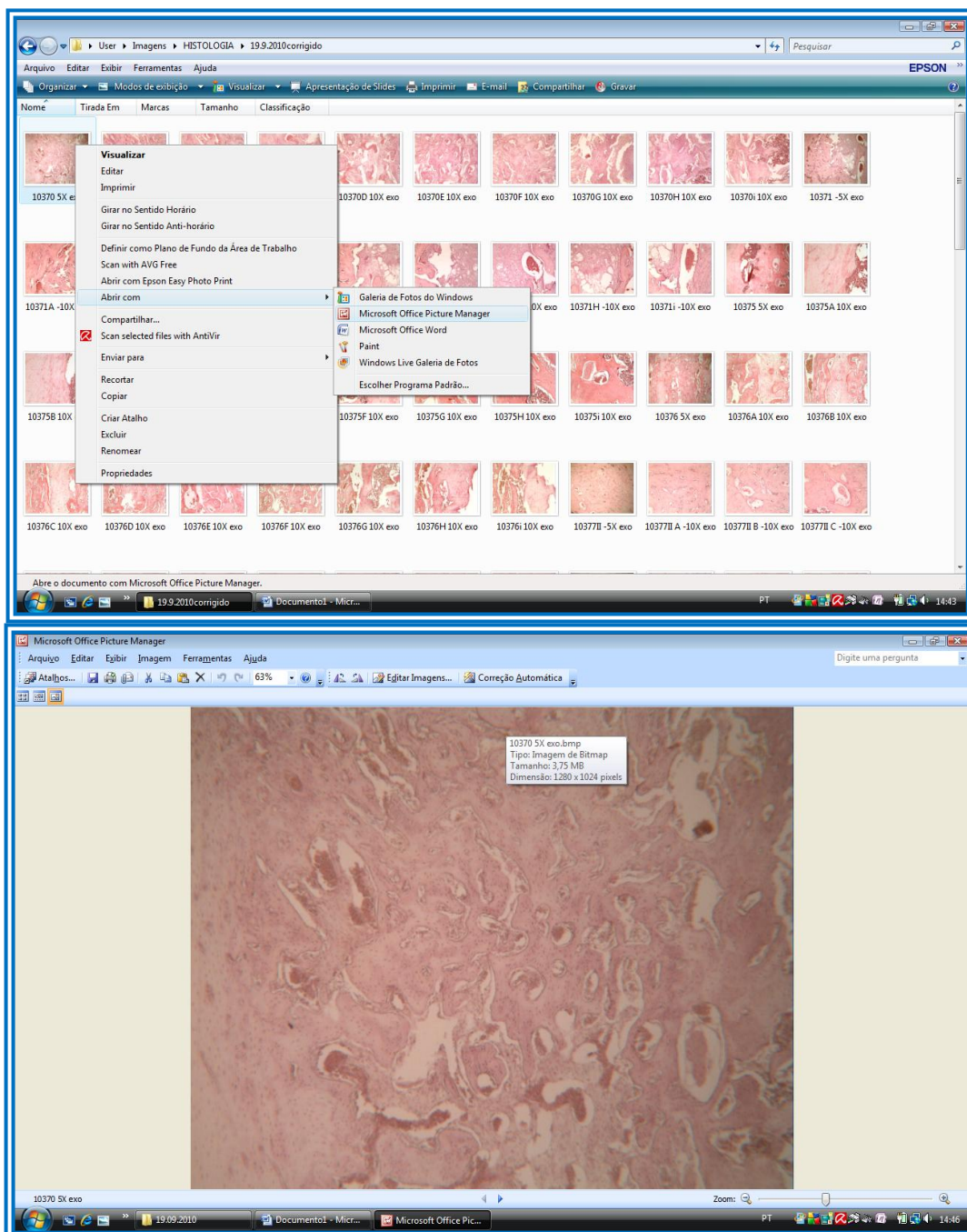


Figura 19: Autocorreção da imagem

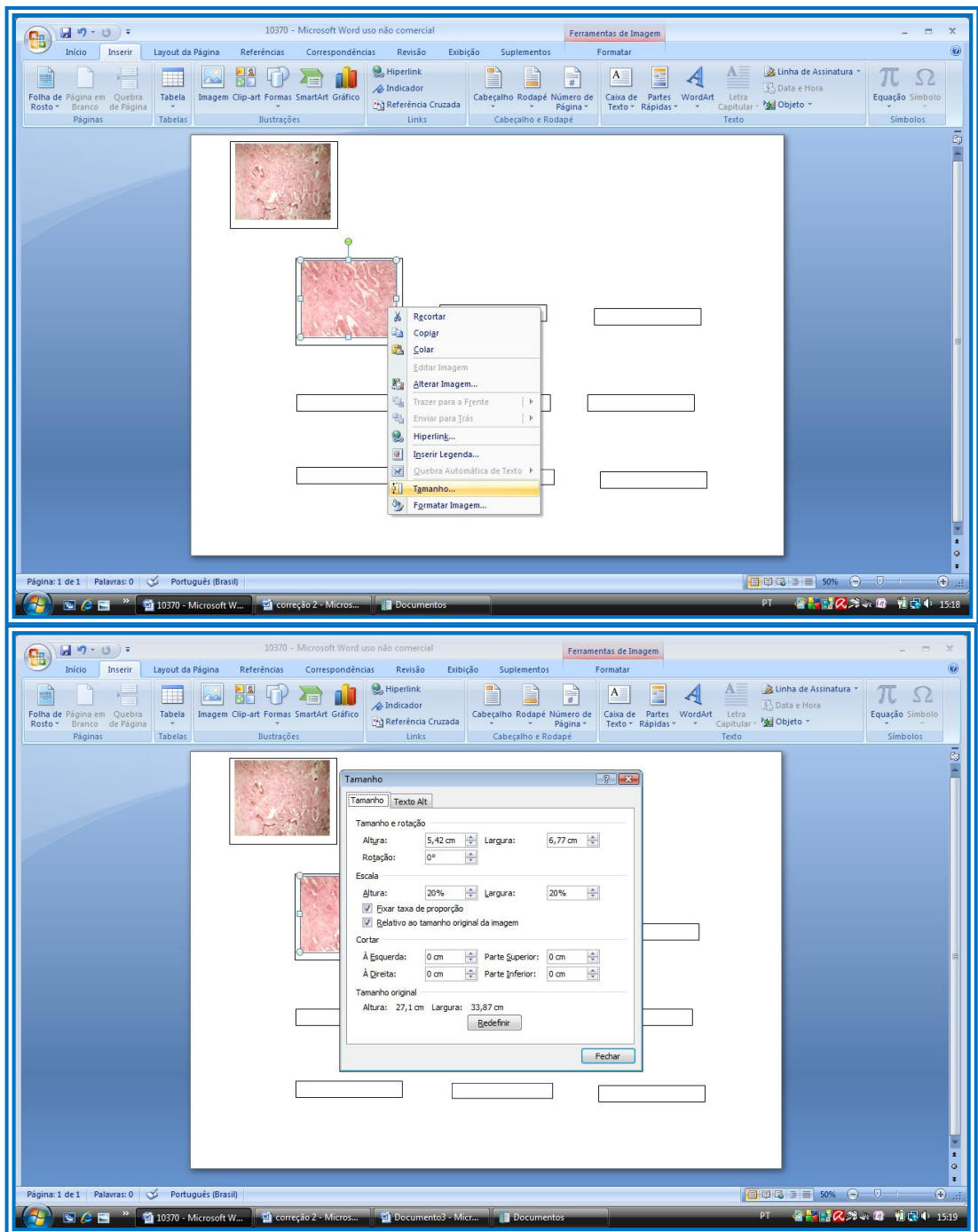


Figura 20: Padronização do tamanho



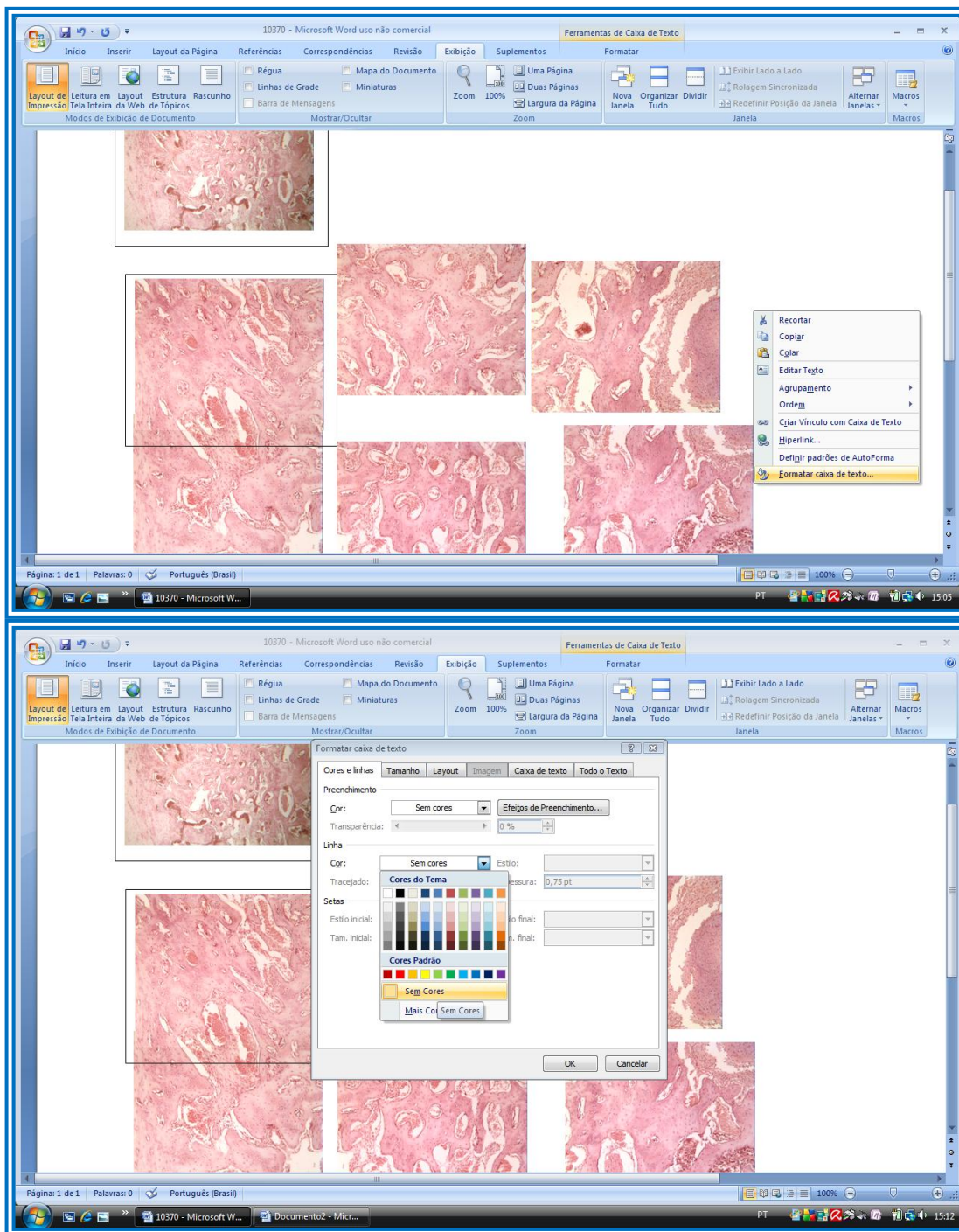


Figura 21: Remoção da cor das margens.

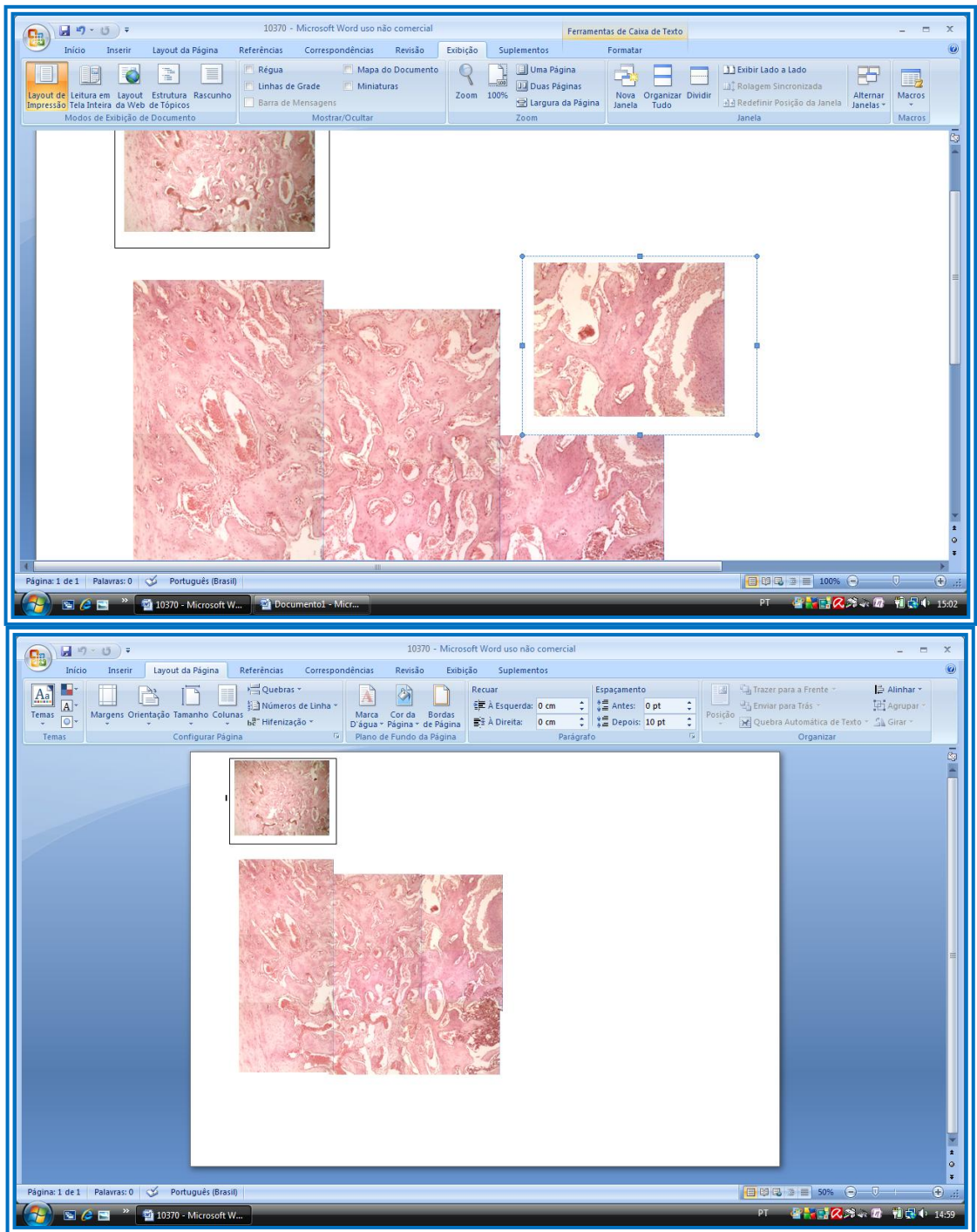


Figura 22: Movimentação das imagens e formação do mosaico.

#### 4.15.4 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

As imagens histológicas observadas através da lente objetiva de 5X foram capturadas e analisadas através de um sistema computacional *Image-Pro Plus* (Figura 23).

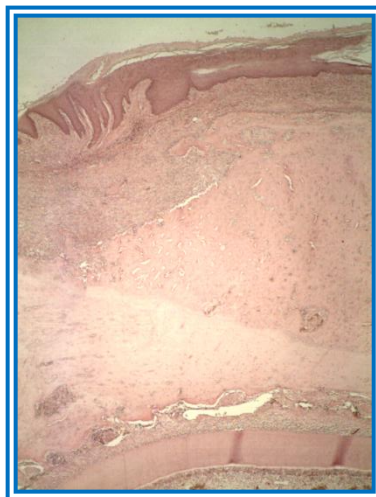


Figura 23 – Imagem histológica ilustrativa observada com objetiva de 5X em que foi realizada a análise histomorfométrica.

A imagem microscópica capturada pela câmera acoplada no micro-computador foi digitalizada e transformada em uma imagem constituída por um conjunto de pixels.

Esse programa permitiu mensurar as áreas desejadas, através da delimitação do contorno das mesmas, avaliando o processo de evolução do reparo do alvéolo. Todos os valores foram transformados em percentuais. A área total foi medida considerando-se toda a extensão da imagem fotografada com objetiva de 5X (padronizada), a área de osso existente foi delimitada e, então, a porcentagem de tecido ósseo na imagem foi calculada.

Os valores foram transferidos para uma tabela formulada especificamente para essa finalidade. As imagens foram codificadas, de modo que o avaliador,

previamente treinado e calibrado, não tivesse conhecimento do grupo o qual pertenciam os espécimes que estava avaliando.

#### **4.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados histomorfométricos foram analisados estatisticamente através do Teste de Shapiro-Wilk para testar a distribuição de probabilidade (normalidade) da variável de interesse (porcentagem de tecido ósseo na imagem). E pelo Teste de Levine para avaliar a homogeneidade dos grupos. Os dados foram analisados, por meio do teste Anova uma vez que satisfizeram os pressupostos teóricos (normalidade e homogeneidade).

Para o resultado macroscópico, a análise foi realizada pela associação entre os níveis de tratamentos (G1 A, G1 B, G2 A, G2 B, G3 A e G3 B) e os desfechos propostos quanto à exposição de tecido ósseo e ocorrência do reparo da ferida epitelial completa. Da mesma forma, para o resultado histológico, a análise foi feita entre os níveis de tratamentos (G1 A, G1 B, G2 A, G2 B, G3 A e G3 B) e os desfechos propostos quanto à presença de osso necrótico e presença de pus. Para ambos resultados, a associação foi analisada utilizando-se o Teste de Qui-quadrado ou o Teste Exato de Fisher (quando o percentual de células esperadas – menores de 5 unidades – fosse maior que 25%).



## *RESULTADOS*

## 5 RESULTADOS

---

Durante todo o período de observação, ocorreu a morte de 02 animais:

- G1B IV (amostra do grupo controle de defeito com broca);
- G2 B IV (amostra do grupo teste, com terapia medicamentosa e sem laserterapia, de defeito com broca).

Em quatro animais correspondentes ao grupo de exodontia ocorreu fratura do ápice radicular durante o procedimento cirúrgico:

- G1 A VII (grupo controle);
- G1 A VIII (grupo controle);
- G3 A VI (grupo teste com terapia medicamentosa e laserterapia);
- G3 A VIII (grupo teste com terapia medicamentos e laserterapia).

Os animais dos três grupos (G1, G2 e G3) apresentaram aumento gradativo do peso no início do experimento. As amostras referentes ao subgrupo B continuaram apresentando aumento gradual do peso ao longo de todo o estudo. Apenas os espécimes dos grupos testes (G2 e G3) revelaram diminuição após a exodontia do incisivo, reequilibrando seu peso em um mês. Essa observação demonstrou a capacidade adaptativa do roedor em questão após a extração de um dente, até então considerado fundamental para sua alimentação e sobrevivência. Essa análise também permitiu concluir que a perda do peso não estava associada à terapia medicamentosa (APÊNDICE 1).

## 5.1 RESULTADOS DO EXAME MACROSCÓPICO

O observador preencheu os quadros, dispostos a seguir, de acordo com a descrição realizada no dia da morte e a análise das fotos (Quadros 2 – 4 e Figuras 24 – 26). De acordo com a análise estatística do reparo da ferida epitelial completa e a exposição de tecido ósseo estão significativamente relacionadas com o tipo de terapia aplicada (G1, G2 e G3) e ao método utilizado (A e B) (Tabelas 1 – 5).

Tabela 1 – Associação entre os subgrupos e o reparo da ferida epitelial completa. Teste Exato de Fisher:  $p = ,001$ .

	REPARO EPITELIAL COMPLETO		
	SIM	NÃO	TOTAL
<b>G1 A</b>	7 (100,0%)	0 (0%)	7 (100,0%)
<b>G1 B</b>	6 (75,0%)	2 (25,0%)	8 (100,0%)
<b>G2 A</b>	2 (22,2%)	7 (77,8%)	9 (100,0%)
<b>G2 B</b>	6 (75,0%)	2 (25,0%)	8 (100,0%)
<b>G3 A</b>	1 (11,1%)	8 (88,9%)	9 (100,0%)
<b>G3 B</b>	6 (66,7%)	3 (33,3%)	9 (100,0%)
<b>TOTAL</b>	28 (56,0%)	22 (44,0%)	50 (100,0%)

Tabela 2 – Associação entre os grupos e o reparo da ferida epitelial completa. Teste Qui-quadrado:  $p = ,017$ .

	REPARO EPITELIAL COMPLETO	
	Sim	Não
<b>G1</b>	13 (86,7%)	2 (13,3%)
<b>G2</b>	8 (47,1%)	9 (52,9%)
<b>G3</b>	7 (38,9%)	11 (61,1%)

Tabela 3 – Associação entre os métodos e o reparo da ferida epitelial completa. Teste Qui-quadrado:  $p = ,045$ .

REPARO EPITELIAL COMPLETO		
	Sim	Não
<b>Exo</b>	10 (40%)	15 (60%)
<b>Broca</b>	18 (72%)	7 (28%)

Tabela 4 – Associação entre os grupos e a presença de osso exposto. Teste Exato de Fisher:  $p = ,026$ .

PRESENÇA DE OSSO EXPOSTO		
	Sim	Não
<b>G1</b>	0 (0%)	14 (100%)
<b>G2</b>	4 (23,5%)	13 (76,5%)
<b>G3</b>	7 (38,9%)	11 (61,1%)

Tabela 5 – Associação entre os métodos e a presença de osso exposto. Teste Qui-quadrado:  $p = ,000$ .

PRESENÇA DE OSSO EXPOSTO		
	Sim	Não
<b>Exo</b>	11 (44%)	14 (56%)
<b>Broca</b>	0 (0%)	25 (100%)



Os Testes Qui-quadrado e Exato de Fisher revelaram que a presença de osso exposto e o reparo da ferida epitelial completa estão relacionadas ao grupo. A análise de resíduos ajustados indicou o comportamento diferente do grupo controle em relação aos demais grupos, com 0% de exposição óssea (Tabela 6) e tendência a maioria apresentar reparo epitelial completo (Tabela 7). Essa análise de resíduos ajustada é realizada através da avaliação da curva de normalidade (Z), onde  $-1,96 < Z < 1,96$ .

Tabela 6 - Análise de Resíduos Ajustados associando os níveis de tratamento e a exposição óssea.

OSSO EXPOSTO		
	Sim	Não
<b>G1</b>	- 2,38	2,38
<b>G2</b>	0,13	- 0,13
<b>G3</b>	2,10	- 2,10

Tabela 7 - Análise de Resíduos Ajustados associando os níveis de tratamento e o reparo da ferida epitelial completa.

REPARO EPITELIAL COMPLETO		
	Sim	Não
<b>G1</b>	- 2,86	2,86
<b>G2</b>	0,91	- 0,91
<b>G3</b>	-1,83	1,83

	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1
	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	
REPARO EPITELIAL COMPLETO	-		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	X	X			X	
REPARO EPITELIAL PARCIAL	-												-				X		X
PRESENÇA DE OSSO EXPOSTO																			
AUSÊNCIA DE OSSO EXPOSTO			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X

Quadro 02 – Análise macroscópica do grupo controle

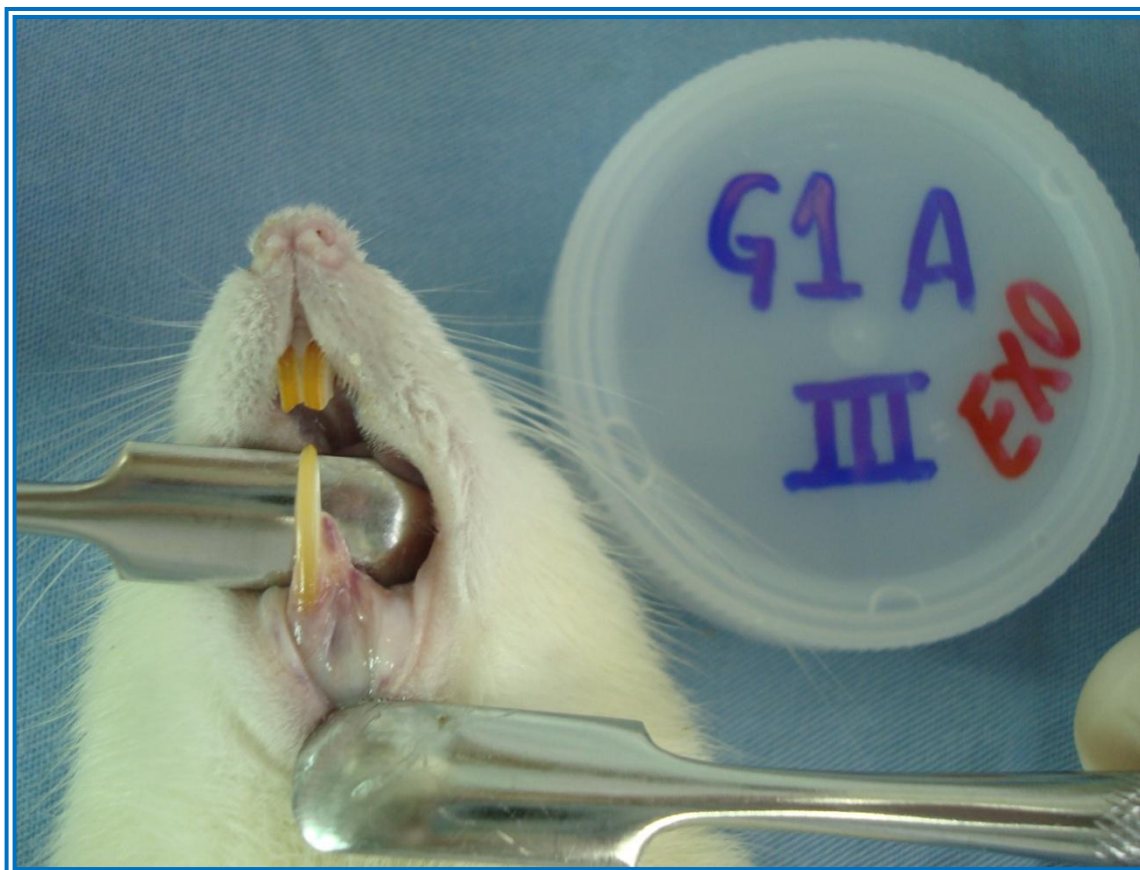


Figura 24 – Aspecto macroscópico de uma amostra do grupo controle.

	G2	G2	G2	G2	G2	G2	G2	G2	G2	G2	G2	G2	G2	G2	G2	G2	G2	G2	G2
	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	
REPARO EPITELIAL COMPLETO		X		X						X	X	X					X	X	X
REPARO EPITELIAL PARCIAL	X		X		X	X	X	X	X					X	X				
PRESENÇA DE OSSO EXPOSTO	X	X			X		X												
AUSÊNCIA DE OSSO EXPOSTO			X	X		X		X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X

Quadro 03 – Análise macroscópica do grupo teste com terapia medicamentosa e sem laserterapia.



Figura 25 – Aspecto macroscópico de uma espécime do grupo teste sem laserterapia.

	G3	G3	G3	G3	G3	G3	G3	G3	G3	G3	G3	G3	G3	G3	G3	G3	G3	G3	G3
	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	
<b>REPARO EPITELIAL COMPLETO</b>							X			X	X	X		X				X	X
<b>REPARO EPITELIAL PARCIAL</b>	X	X	X	X	X	X		X	X				X		X	X			
<b>PRESEÇA DE OSSO EXPOSTO</b>	X		X	X	X	X		X	X										
<b>AUSÊNCIA DE OSSO EXPOSTO</b>		X					X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Quadro 04 – Análise macroscópica do grupo teste com terapia medicamentosa e laserterapia

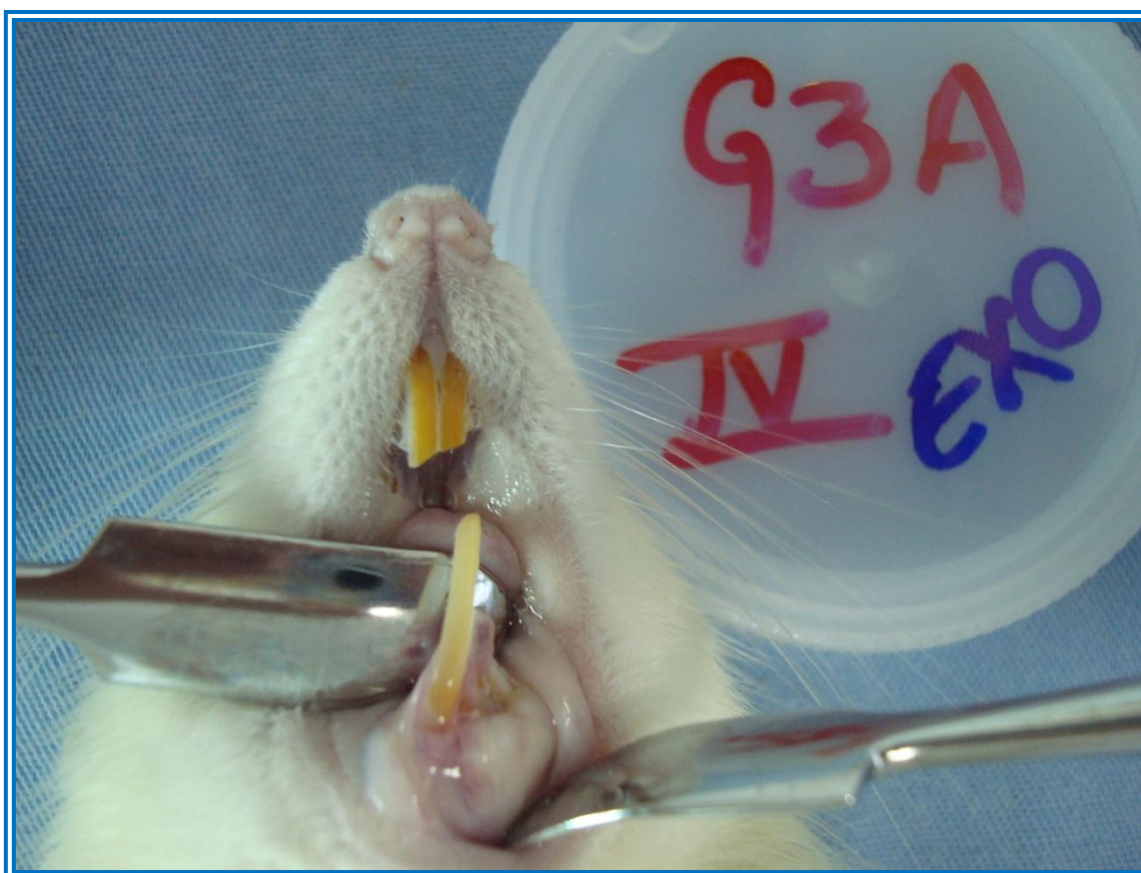


Figura 26 – Aspecto macroscópico de uma amostra do grupo teste com laserterapia.

## 5.2 RESULTADO DA ANÁLISE HISTOLÓGICA

As amostras foram analisadas, de modo descritivo, a partir da observação das lâminas, com lente objetiva de 40X, quanto à presença ou não de pus no tecido de granulação. Os mosaicos montados, a partir de imagens capturadas durante a observação das lâminas com lentes objetivas de 5X e 10X (Figuras 27 – 32), permitiram uma avaliação detalhada do tecido ósseo, conforme a presença de tecido ósseo vital/sadio ou necrótico (Quadro 05).

	TECIDO DE GRANULAÇÃO	TECIDO ÓSSEO		TECIDO DE GRANULAÇÃO	TECIDO ÓSSEO		TECIDO DE GRANULAÇÃO	TECIDO ÓSSEO
	PRESENÇA DE PUS	PRESENÇA DE NECROSE		PRESENÇA DE PUS	PRESENÇA DE NECROSE		PRESENÇA DE PUS	PRESENÇA DE NECROSE
G1A I	0	0	G2A I	0	0	G3A I	0	0
G1A II	0	0	G2A II	0	0	G3A II	-	
G1A III	0	0	G2A III	0	0	G3A III	1	1
G1A IV	0	0	G2A IV	0	0	G3A IV	0	0
G1A V	0	1	G2A V	0	0	G3A V	0	0
G1A VI	0	0	G2A VI	0	0	G3A VI	0	0
G1A VII	0	0	G2A VII	0	0	G3A VII	0	0
G1A VIII	1	2	G2A VIII	0	1	G3A VIII	0	0
G1A IX	0	0	G2A IX	0	0	G3A IX	0	0
G1B I	0	0	G2B I	1	2	G3B I	SEM AMOSTRA	
G1B II	1	1	G2B II	1	1	G3B II	1	0
G1B III	0	0	G2B III	0	1	G3B III	1	2
G1B IV	MORTE		G2B IV			G3B IV	0	2
G1B V	1	1	G2B V	0	1	G3B V	0	2
G1B VI	SEM AMOSTRA		G2B VI	0	1	G3B VI	1	2
G1B VII	1	1	G2B VII	1	1	G3B VII	1	1
G1B VIII	1	0	G2B VIII	1	2	G3B VIII	1	1
G1B IX	1	2	G2B IX	1	2	G3B IX	0	1

Quadro 05 – Resultado da análise histológica. Tecido de granulação (0 = ausência de pus; 1 = presença de pus); tecido ósseo (0 = ausência de osso necrótico; 1 = presença de pouco osso necrótico; 2 = presença predominante de osso necrótico).

De acordo com a análise estatística (Teste Qui-quadrado e Teste Exato de Tukey) a presença de pus e a exposição de tecido ósseo não são dependentes do tipo de terapia aplicada (G1, G2 e G3), mas estão relacionados ao método utilizado (A e B) (Tabela 8 – 13).

Tabela 8 – Associação entre os subgrupos e a presença de necrose óssea. Teste Exato de Fisher: p = ,000

	NECROSE		
	AUSÊNCIA DE OSSO NECRÓTICO	PRESENÇA DE POUCO OSSO NECRÓTICO	PRESENÇA PREDOMINANTE DE OSSO NECRÓTICO
<b>G1 A</b>	7 (77,8%)	1 (11,1%)	1 (11,1%)
<b>G1 B</b>	3 (42,9%)	3 (42,9%)	1 (14,3%)
<b>G2 A</b>	8 (88,9%)	1 (11,1%)	0 (,0%)
<b>G2 B</b>	0 (,0%)	5 (62,5%)	3 (37,5%)
<b>G3 A</b>	7 (87,5%)	1 (12,5%)	0 (,0%)
<b>G3 B</b>	1 (12,5%)	3 (37,5%)	4 (50,0%)
<b>TOTAL</b>	53,1%	28,6%	18,4%

Tabela 9 – Associação entre os grupos e a presença de necrose óssea. Teste Exato de Fisher: p = ,000.

	OSSO NECRÓTICO		
	AUSÊNCIA	PRESENÇA DE POUCO OSSO	PRESENÇA PREDOMINANTE
<b>G1</b>	10 (62,5%)	4 (25%)	2 (12,5%)
<b>G2</b>	8 (47,1%)	6 (35,3%)	3 (17,6%)
<b>G3</b>	8 (50%)	4 (25%)	4 (25%)

Tabela 10 – Associação entre os métodos e a presença de necrose óssea. Teste Exato de Fisher: p = ,000

<b>OSSO NECRÓTICO</b>			
	AUSÊNCIA	PRESEÇA DE POUCO OSSO	PRESEÇA PREDOMINANTE
<b>Exo</b>	<b>22 (84,6%)</b>	<b>3 (11,5%)</b>	<b>1 (3,8%)</b>
<b>Broca</b>	<b>4 (17,4%)</b>	<b>11 (47,8%)</b>	<b>8 (34,8%)</b>

Tabela 11 – Associação entre os subgrupos e a presença de pus. Teste Exato de Fisher: p = 001

<b>PRESEÇA DE PUS</b>			
	SIM	NÃO	TOTAL
<b>G1 A</b>	1 (11,1%)	8 (88,9%)	9 (100,0%)
<b>G1 B</b>	5 (71,4%)	2 (28,6%)	7 (100,0%)
<b>G2 A</b>	0 (0%)	9 (100%)	9 (100,0%)
<b>G2 B</b>	5 (62,5%)	3 (37,5%)	8 (100,0%)
<b>G3 A</b>	1 (12,5%)	7 (87,5%)	8 (100,0%)
<b>G3 B</b>	5 (62,5%)	3 (37,5%)	8 (100,0%)
<b>TOTAL</b>	<b>34,7%</b>	<b>65,3%</b>	<b>100,0%</b>

Tabela 12 – Associação entre os grupos e a presença de pus. Teste Qui-quadrado: p = ,867

<b>PRESEÇA DE PUS</b>		
	SIM	NÃO
<b>G1</b>	6 (37,5%)	10 (62,5%)
<b>G2</b>	5 (29,4%)	12 (70,6%)
<b>G3</b>	6 (37,5%)	10 (62,5%)

Tabela 13 – Associação entre os métodos e a presença de pus. Teste Qui-quadrado:  $p = ,000$ .

PRESENÇA DE PUS		
	SIM	NÃO
Exo	2 (7,7%)	24 (92,3%)
Broca	15 (65,2%)	8 (34,8%)

A análise de resíduos ajustados indicou que o comportamento dos grupos apresentou diferenças casuais não significativas quanto à presença de osso necrótico e presença de pus.



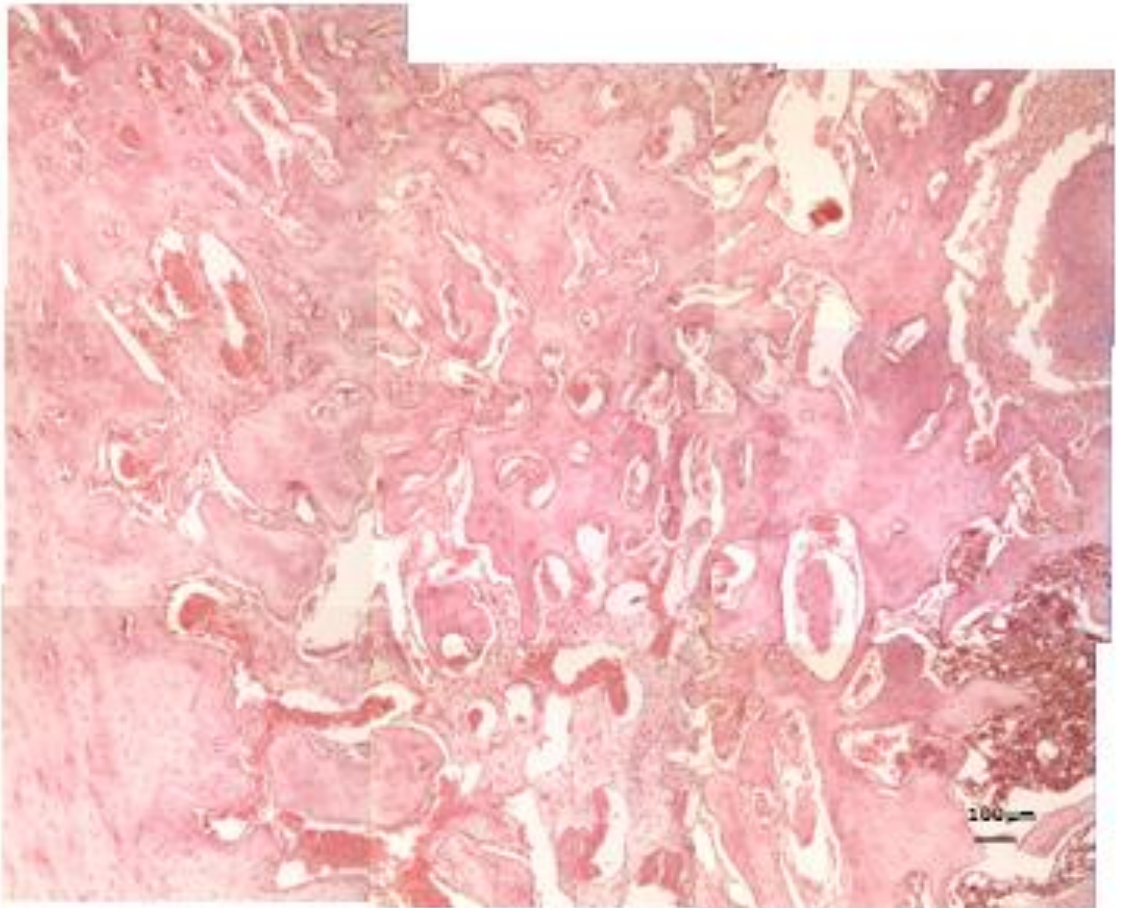
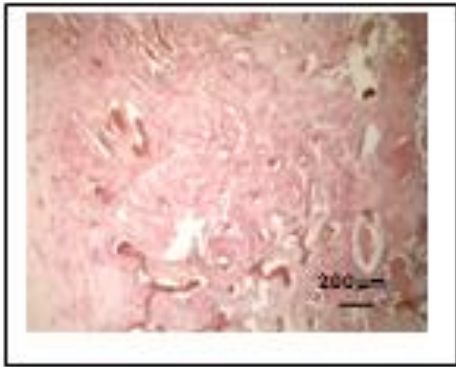


Figura 27 – Mosaico G1 A II: montagem de imagens obtidas a partir de uma amostra do grupo controle submetido à exodontia. Figura menor e mosaico (imagens capturadas através da observação das lâminas com objetiva de 5X e 10X respectivamente).

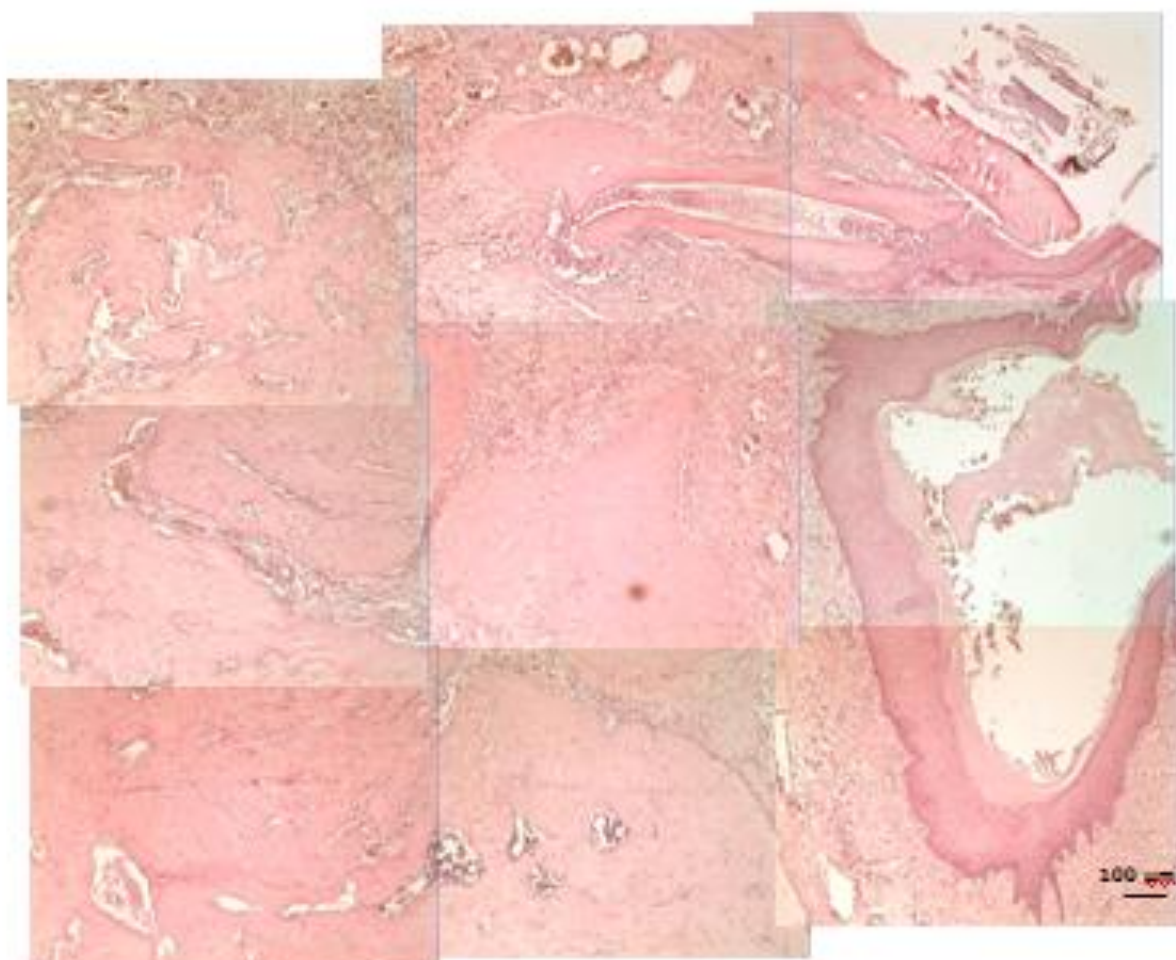
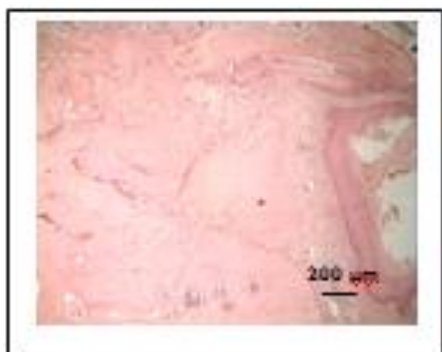


Figura 28 – Mosaico G1 B II: montagem de imagens obtidas a partir de uma amostra do grupo controle submetido ao procedimento com broca. Figura menor e mosaico (imagens capturadas através da observação das lâminas com objetiva de 5X e 10X respectivamente).

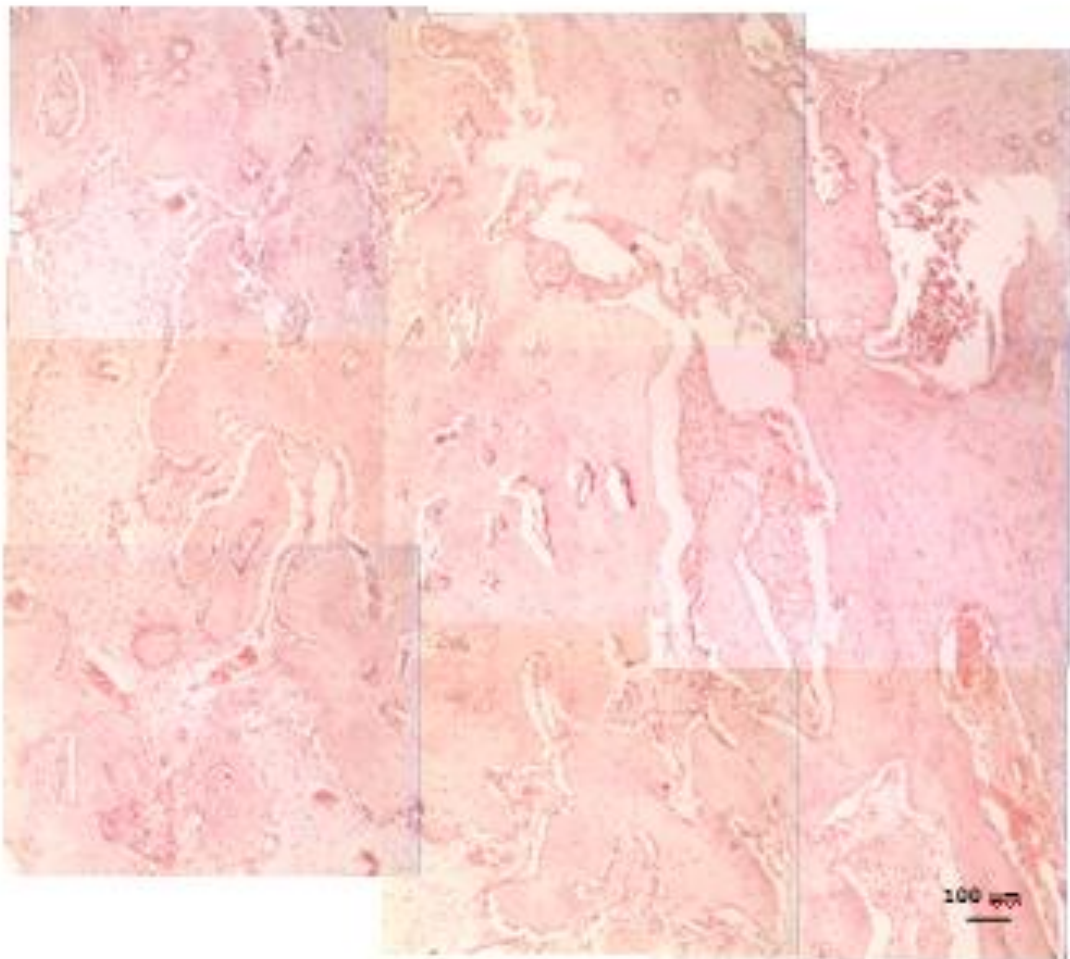


Figura 29 – Mosaico G2 A IV: montagem de imagens obtidas a partir de uma amostra do grupo teste, sem laserterapia, submetido a exodontia. Figura menor e mosaico (imagens capturadas através da observação das lâminas com objetiva de 5X e 10X respectivamente).

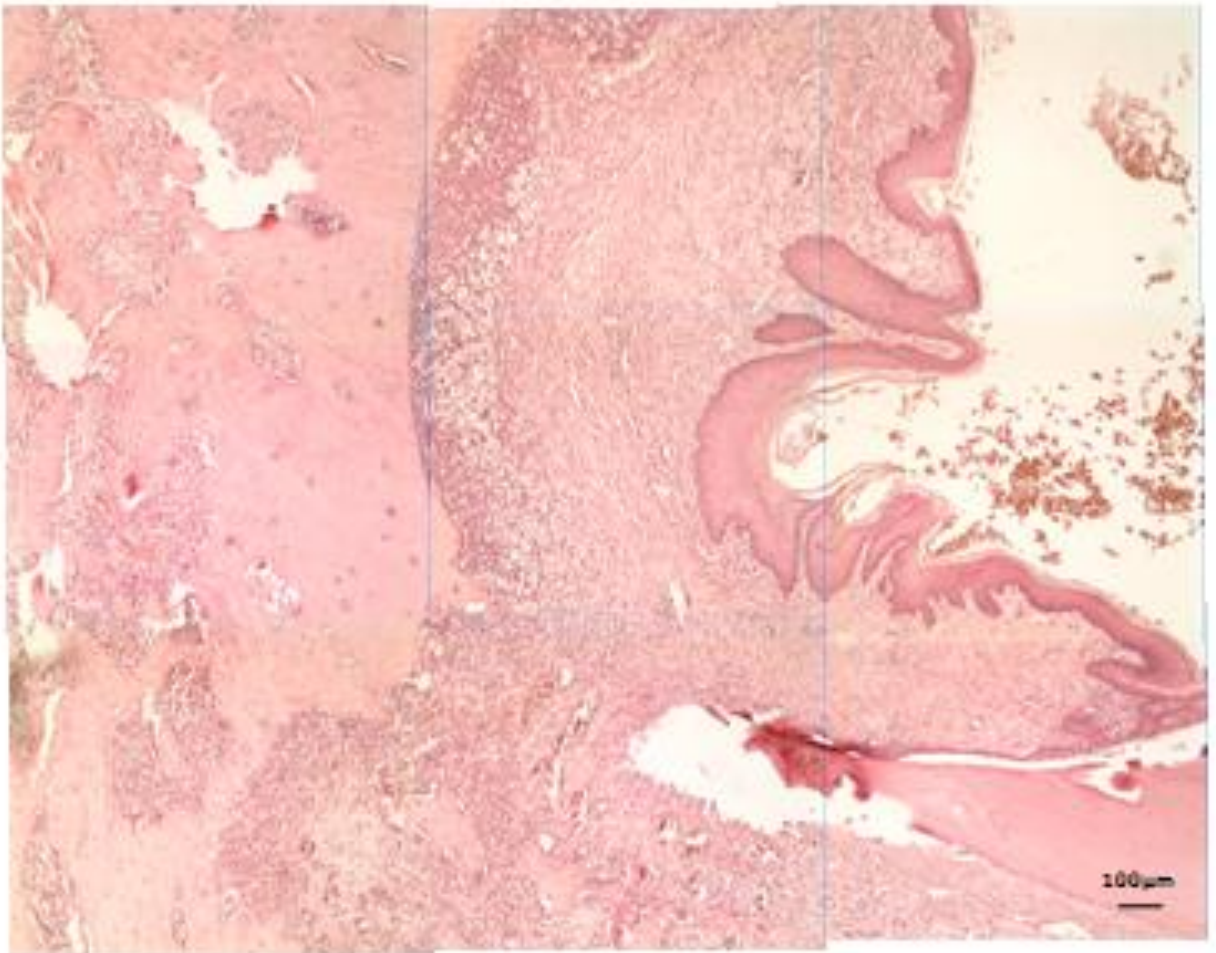
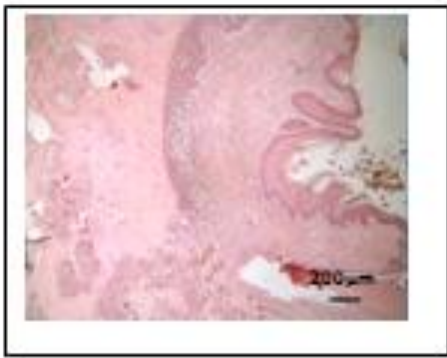


Figura 30 – Mosaico G2 B VIII: montagem de imagens obtidas a partir de uma amostra do grupo teste, sem laserterapia, submetido ao procedimento com broca. Figura menor e mosaico (imagens capturadas através da observação das lâminas com objetiva de 5X e 10X respectivamente).

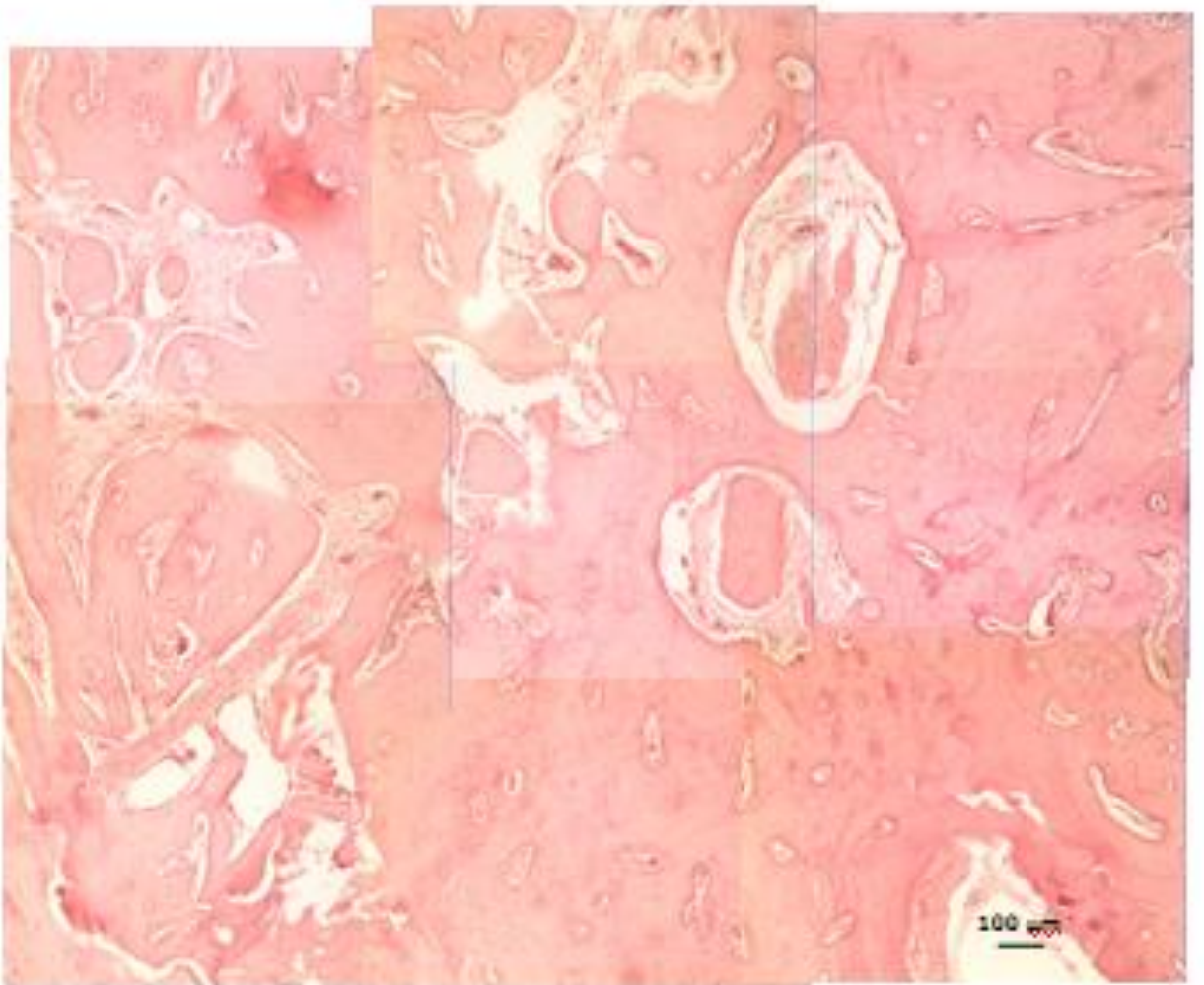
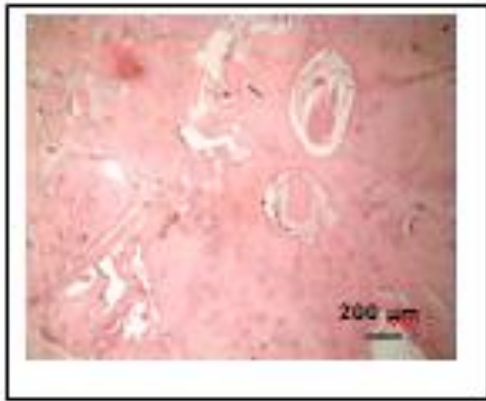


Figura 31 – Mosaico G3 A V: montagem de imagens obtidas a partir de uma amostra do grupo teste, com laserterapia, submetido à exodontia. Figura menor e mosaico (imagens capturadas através da observação das lâminas com objetiva de 5X e 10X respectivamente).

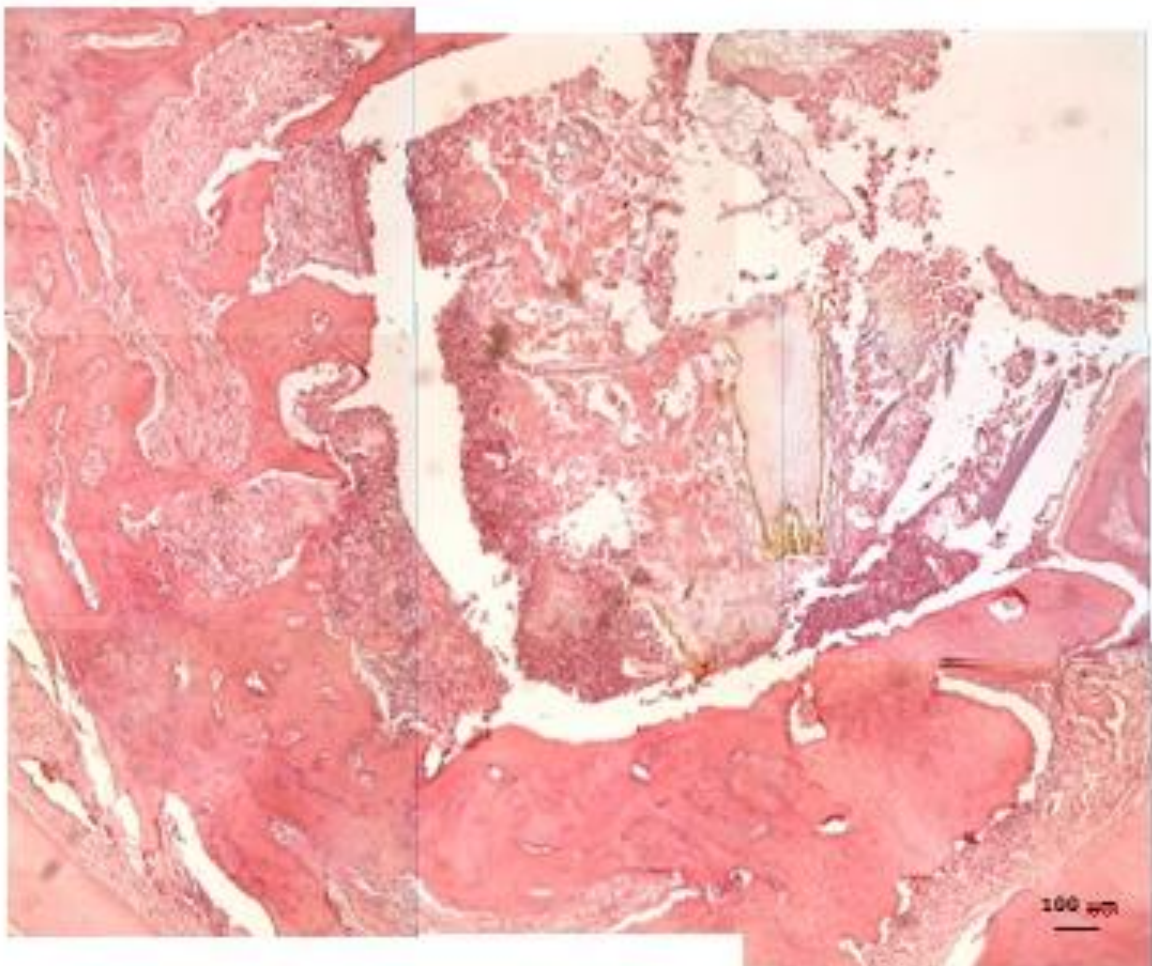
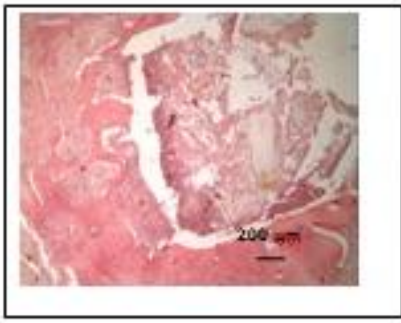


Figura 32 – Mosaico G3 B VI: montagem de imagens obtidas a partir de uma amostra do grupo teste, com laserterapia, submetido ao procedimento com broca. Figura menor e mosaico (imagens capturadas através da observação das lâminas com objetiva de 5X e 10X respectivamente).

### 5.3 RESULTADO DA ANÁLISE MORFOMÉTRICA

As amostras histológicas do grupo de exodontia foram constituídas predominantemente por tecido ósseo. Devido a essa observação, a medição morfométrica foi realizada apenas no grupo teste de defeito com broca. Os resultados foram expressos em porcentagem e descritos no quadro abaixo (Quadro 06).

	PERCENTUAL DE TECIDO ÓSSEO NA IMAGEM
G1B I	36,13%
G1B II	48,77%
G1B III	36,20%
G1B IV	MORTE
G1B V	33,09%
G1B VI	SEM AMOSTRA
G1B VII	49,90%
G1B VIII	42,40%
G1B IX	16,67%
G2B I	18,29%
G2B II	42,97%
G2B III	35,42%
G2B IV	MORTE
GB V	37,82%
G2B VI	42,40%
G2B VII	66,52%
G2B VIII	33,99%
G2B IX	62,03%
G3B I	SEM AMOSTRA
G3B II	55,59%
G3B III	35,09%
G3B IV	49,64%
G3B V	43,12%
G3B VI	39,35%
G3B VII	27,79%
G3B VIII	37,98%
G3B IX	43,67%

Quadro 06 – Resultado da análise morfométrica

Apenas os valores referentes ao subgrupo B foram expostos, uma vez que as lâminas relacionadas ao método de exodontia (subgrupo A) apresentaram imagens formadas por tecido ósseo (100%).

Os pressupostos teóricos de normalidade foram satisfeitos de acordo com o Teste Shapiro-Wilk ( $p > 0,05$ ) e de homogeneidade de acordo com o Teste Levene ( $p = 0,499$ ). Seguiu-se a Anova ( $p = 0,725$ ), o qual revelou que as médias da porcentagem de tecido ósseo na imagem não diferem de modo significativo entre si.





*DISCUSSÃO*

---

## 6 DISCUSSÃO

---

O termo câncer é utilizado genericamente para representar um conjunto de tumores malignos de diferentes localizações. Importante causa de doença e morte no Brasil, desde 2003, as neoplasias malignas constituem-se na segunda causa de morte na população, representando quase 17% dos óbitos de causa conhecida, notificados em 2007 no Sistema de Informações sobre Mortalidade. Compreender e controlar as doenças malignas requer conhecimentos científicos e experiências que vão desde o conhecimento dos complexos mecanismos de regulação molecular intracelular às escolhas individuais do estilo de vida. A prevenção e o controle de câncer estão entre os mais importantes desafios, científicos e de saúde pública, da nossa época (INCA / Ministério da Saúde).

De acordo com a publicação feita no *site* oficial do INCA do Ministério da Saúde, as estimativas feitas para o ano de 2010 também são válidas para 2011. Essa pesquisa indica 489.270 novos casos de Câncer. O Câncer de pele será o mais incidente, seguido pelos tumores de próstata, mama feminina, cólon e reto, pulmão, estômago e colo de útero. Segundo a Organização Mundial da Saúde, o impacto global do Câncer mais que dobrou em 30 anos. O contínuo crescimento global, bem como seu envelhecimento, afetará de forma significativa o impacto dessa doença no mundo.

As transformações no padrão demográfico brasileiro começaram a ocorrer no final do século XX através da queda expressiva de fecundidade associada ao declínio consistente dos níveis de mortalidade, não acompanhada pelos níveis de

natalidade. Sendo assim, o envelhecimento populacional se consolida nessa primeira metade do século XXI (IBGE 2009).

Associado ao crescimento e envelhecimento populacional está, também, o aumento da incidência de osteoporose - doença de evolução silenciosa, caracterizada pela perda de massa óssea. E, segundo a Organização Mundial da Saúde, a osteoporose é a epidemia silenciosa desse século.

O impacto dessas doenças no mundo atual estimula novas linhas de pesquisas buscando o entendimento amplo dessas enfermidades, suas manifestações, melhores abordagens e formas de diagnóstico mais rápido. Da mesma forma, os métodos de tratamento são estudados, objetivando também melhorar sua eficácia e diminuir possíveis efeitos colaterais indesejados.

Os Bisfosfonatos (BPs) são medicamentos amplamente utilizados nessas doenças ósseas e metastáticas. A FDA (*Food and Drug Administration*) iniciou a aprovação do seu uso clínico em 1991. Entretanto, a partir de 2003, relatos de necrose dos maxilares foram citados como efeito colateral associado a essa medicação (MARX, 2003). Os BPS tornaram-se protagonistas em pesquisas médicas e odontológicas. A literatura aborda estudos relacionados com as propriedades farmacológicas, efetividade no tratamento das doenças, manifestação de efeitos colaterais indesejados e possibilidade de controle desses, e aplicabilidade do fármaco em outras especialidades odontológicas.

Os Bisfosfonatos são fármacos que interferem na remodelação óssea através da inibição da reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos. Os BPs são resistentes à degradação enzimática, apresentam meia vida biológica longa. A influência sobre o metabolismo ósseo justifica sua extensiva utilização no tratamento

de doenças ósseas, tais como: doença de Paget, hipercalcemia maligna, a osteoporose e doenças metastáticas e osteolíticas. Os bisfosfonatos formam uma classe de substância química que apresenta uma ligação P-C-P em sua estrutura. Diferentes substituintes, ligados ao carbono central dessa estrutura, dão características únicas para cada fármaco. As propriedades físico-químicas dos BPs são similares entre os membros da série; entretanto as propriedades anti-reabsortivas diferem grandemente. Por causa dessa diferença de potência entre esses fármacos, suas doses clínicas também diferem acentuadamente. (FERNANDES; LEITE; LANÇAS, 2005). Além da grande afinidade pelo osso e sua capacidade anti-osteoclástica, os bisfosfonatos apresentam propriedades anti-angiogênicas (MERIGO et al., 2006).

A efetividade dessa droga no controle das doenças é indiscutível. Não obstante, seus efeitos colaterais são diversos. A osteonecrose dos maxilares (ONJ) tem mostrado ser o mais preocupante para a Odontologia. Grande número de casos clínicos tem sido descritos na literatura internacional, de forma progressiva, desde 2003. Há uma preocupação em desenvolver métodos de tratamento curativo para esse efeito secundário. Autores concordam que a manifestação da necrose não está associada apenas a um fator, mas a um conjunto desses, tais como: interação medicamentosa; tríade dose / tempo / via de administração do fármaco e doença de base do paciente. Acredita-se que a ONJ resulte de uma interligação entre metabolismo ósseo alterado pelos BPs, trauma local, aumento da necessidade de reparo ósseo, infecção e hipovascularização. Assim, a necrose seria o resultado da incapacidade do tecido ósseo afetado em reparar e se remodelar frente a quadros inflamatórios desencadeados por estresse mecânico (mastigação), exodontias, irritações por próteses ou infecções dental e periodontal (MARTINS et al. ,2009).

Segundo Abu-Id et al. (2008), os pacientes podem ser divididos em dois grupos de risco: alto risco (pacientes portadores de doenças malignas recebendo bisfosfonatos via endovenosa e/ou quimioterapia e radioterapia) e baixo risco: pacientes fazendo uso de BPs via oral sem história de quimioterapia e radioterapia.

Uma vez estabelecida a necrose óssea, outra discussão se torna fundamental: a forma de tratamento para esse efeito secundário. Segundo relato de uma série de casos clínicos descritos por Borgioli (2009), o tratamento e o manejo desses pacientes dependem do estágio clínico da necrose. Pacientes com exposição óssea assintomática podem ser tratados com bochechos de antimicrobianos contendo clorexidina 0,12% e avaliações clínicas regulares. Aqueles com exposição óssea, dor e infecção devem ser tratados com antibióticos e analgésicos, bem como bochechos com anti-sépticos. Já os pacientes com dor, infecção, fístula oral e fraturas patológicas devem ser tratados com os mesmos cuidados da situação anterior associada ao debridamento cirúrgico. Essas abordagens não são tratamentos definitivos, mas paliativos. O controle dentário e periodontal são fundamentais desde antes do início da terapia medicamentosa, buscando prevenir o estabelecimento da necrose e conseqüente infecção secundária.

O uso da laserterapia também é discutido como uma possibilidade de tratamento definitivo para a osteonecrose. Entretanto, apesar do grande potencial para promover o controle da necrose, não se caracteriza como eficiente para a cura com total reparo da mucosa e melhora de sinais e sintomas clínicos na maioria dos casos (VESCOVI et al., 2008).

Inúmeros estudos sobre osteonecrose associada ao uso de BPs estão descritos na literatura. Apesar da grande quantidade de relato de casos clínicos, a definição da melhor abordagem de um paciente com necessidade de ser submetido tratamento odontológico invasivo, ou tratamento da necrose estabelecida ainda não são conclusivas (KUMAR; MERU; SEDGHIZADEH, 2008; ABU-ID et al., 2008; RUGGIERO et al., 2004; MARX et al.; 2005).

As visitas periódicas ao odontólogo e a correta higiene bucal são fundamentais para manutenção da saúde bucal de todos. Aqueles pacientes com indicação para tratamento com terapia medicamentosa contendo Bisfosfonatos devem ter um controle ainda mais rigoroso.

A partir desse questionamento fundamentou-se o objetivo desse trabalho: observar o efeito da laserterapia no processo de reparo do alvéolo em ratos submetidos à terapia medicamentosa com Bisfosfonato. Para essa pesquisa, foram utilizados 54 ratos da raça Wistar. Os animais foram selecionados aleatoriamente e divididos, de modo randomizado, em 3 grupos contendo 18 espécimes. Em todos os grupos, o período de observação foi de 03 meses. O grupo G1 foi o controle; o G2 recebeu a medicação sem laserterapia e o G3 foi o grupo teste que recebeu terapia medicamentosa e laserterapia. Cada grupo foi dividido em 2 subgrupos (métodos): A – exodontia do incisivo inferior com fratura da tábua óssea; B – desgaste do primeiro molar inferior com broca criando uma situação desfavorável de resto radicular com inflamação. A escolha do animal roedor foi feita porque já existiam trabalhos prévios de administração dessa medicação aos ratos (dados de segurança pré-clínicos informados pelo fabricante – disponibilizados através da bula do Zometa), e pela razão desses animais, metabolicamente, serem mais rápido que o ser humano. Os

ratos vêm sendo utilizados como modelo experimental por numerosos pesquisadores para avaliar o processo de reparo ósseo. Assim, a resposta cicatricial sob uma variedade de condições tem sido bem documentada. Os ossos longos dos ratos apresentam uma camada de osso cortical densamente mineralizada e bem formada, não sofrem remodelação interna e, conseqüentemente, adaptam-se ao estudo da cinética óssea. Estudos prévios têm relatado um ciclo de remodelação óssea alveolar de seis dias, para ratos, comparados aos 60 a 120 dias para adultos humanos. Além disso, a neoformação óssea em ratos tem sido observada após seis dias do tratamento cirúrgico (FRIESEN et al., 1999). Um viés nesse estudo, sem dúvida, foi o risco aumentado de ocorrência de infecção, por acúmulo de ração nas regiões manipuladas e pela condição de higiene do microambiente. A medicação escolhida para o estudo foi um Bisfosfonato de indicação ampla e aplicação endovenosa – Zolendronato: Bisfosfonato de última geração, indicado para tratamento de pacientes com mieloma múltiplo, osteoporose e metástase óssea de tumores sólidos, tais como câncer de próstata e câncer de mama.

A análise macroscópica dos resultados evidenciou que o reparo da ferida epitelial completa está diretamente relacionada ao grupo, quando comparado grupo controle com grupos testes. Logo, a medicação interferiu no processo cicatricial do tecido mole. É sabido que os BPs têm efeito anti-angiogênico nos tecidos próximos a necrose, o que pode dificultar o reparo do tecido mole. O *laser* não influenciou no processo de reparo quando aplicado em um dos grupos testes. Na literatura, conforme já citado anteriormente, a laserterapia parece influenciar potencialmente na melhora dos sinais e sintomas clínicos da lesão (VESCOVI et al., 2008). O atual estudo discorda dessa possibilidade, ainda que o *laser* tenha sido aplicado antes do aparecimento da necrose, objetivando evitar seu surgimento. Segundo Takeda

(1988), o *laser* influenciou de forma benéfica no processo inicial do reparo de alvéolos de ratos submetidos à exodontia. A circulação sangüínea é um determinante importante para o reparo de feridas e para o alívio da dor. A melhora da circulação, devido à radiação com o *laser*, pode ser considerada um dos possíveis mecanismos da eficácia clínica do *laser* de baixa potência no tratamento da dor ou para promover o reparo de feridas. Maegawa et al. (2000) estudaram o efeito do *laser* não-ablativo na microcirculação mesentérica de ratos, *in vivo*, e na concentração sistólica de cálcio em células musculares de vasos em ratos, *in vitro*. Os resultados mostraram uma potente dilatação nas arteríolas radiadas com *laser*, o que levou a um aumento marcante na circulação sangüínea arteriolar. Entretanto, o atual estudo revelou que a capacidade anti-angiogênica dos BPs é capaz de superar o estímulo proliferativo do *laser*, dificultando o fechamento epitelial do alvéolo. Essa dificuldade no processo de reparo do tecido mole concorda com o artigo de Martins et al. (2009) que mostra que estes medicamentos interferem na proliferação do epitélio de revestimento indicando que o efeito dos medicamentos sobre o tecido epitelial pode induzir a alteração de reparo tecidual e fazer parte da fisipatogenia da osteonecrose.

No presente estudo, verificamos que o *laser* não influenciou no desenvolvimento da osteonecrose, não se destacando como uma terapia positiva e de eleição para evitar o desenvolvimento da lesão necrótica em pacientes que fazem uso de BPs. O *laser* pode ser usado com sucesso para melhorar os sinais e sintomas da osteonecrose (uma vez estabelecida) conforme relatado na literatura (Vescovi et al, 2007; Vescovi et al, 2008; Merigo et al, 2006). Suas propriedades e vantagens associadas ao seu uso, em outras pesquisas, com outros objetivos e com diferentes metodologias são indiscutíveis (Silva Junior et al, 2002; Blaya et al, 2008).



Entretanto, os estudos relacionados à laserterapia como bioestimulador têm protocolos variados e não determinam um valor específico de dose, potência e tempo ideais para estimular a neoformação óssea (Saito e Shimizu, 1997; Campanha et al., 2010; Nicola et al., 2003; Weber et al., 2006). Na nossa pesquisa, a LLLT não foi importante para cumprir o objetivo proposto com a metodologia aplicada.

A Associação Americana de Cirurgia Oral e Maxilofacial (2007) estabeleceu critérios para o diagnóstico de osteonecrose incluindo: (1) tratamento prévio com Bisfosfonato; (2) exposição óssea persistente por mais de 8 semanas; (3) nenhuma história de radioterapia prévia. No presente estudo o tempo de análise pós operatória foi de 45 dias; entretanto, é sabido que o metabolismo do roedor é mais rápido que do humano. Logo, considerou-se a exposição óssea nesse período como osteonecrose. Ainda sobre a análise macroscópica, observou-se que a exposição óssea estava relacionada ao grupo, ou seja, os grupos testes mostraram um aumento significativo da exposição óssea quando comparados ao grupo controle. Já o *laser*, novamente não influenciou sobre o reparo.

O resultado macroscópico evidenciou pior reparo da ferida epitelial e maior exposição óssea quando utilizado o método cirúrgico de exodontia, o que não ocorreu na análise histológica. Isto provavelmente se deve ao fato de que, durante a exodontia ocorreram múltiplas fraturas da tábua óssea, ocasionando seqüestros ósseos na região. Os seqüestros (osso necrótico) não estão relacionados com a medicação, mas com a técnica cirúrgica. Além disso, na avaliação microscópica, o sítio de observação foi em uma região mais profunda do alvéolo (no grupo exodontia), com o objetivo de analisar uma região com maior quantidade óssea, sem

interferência dos seqüestros ósseos, ao passo que a observação macroscópica necessariamente é realizada em uma área mais superficial.

A medicação, associada a patologia local, potencializa a chance de ter uma osteonecrose. Neste estudo não foi avaliada a associação da doença (câncer), que poderia interferir negativamente em ambos os métodos.

Os resultados histológicos revelaram que há relação direta da presença de osso necrosado e da presença de pus com o método utilizado. Quando foi criada uma situação desfavorável com a broca, simulando restos radiculares, observou-se pior desempenho cicatricial. As raízes residuais funcionam como focos sépticos, que dificultam o reparo e cria um meio favorável para uma infecção secundária, o que justifica o predomínio de pus também no grupo controle quando foi utilizado o método broca. A medicação não influenciou de modo significativo a presença de supuração no tecido nem a presença de necrose óssea. A atual pesquisa revela que a osteonecrose está vinculada a vários fatores locais e gerais, e não exclusivamente ao uso dessa medicação. A associação dos BPs a outros medicamentos com características antiangiogênicas da quimioterapia pode contribuir intensificando o fator de risco geral. Segundo Santos et al. (2008), a etiopatogenia da osteonecrose continua em investigação, mas a relação entre o uso de BPs e o desenvolvimento de necrose óssea em tecidos bucais após a manipulação ou trauma tem ficado cada vez mais evidente. Embora a etiologia desse processo osteonecrótico permaneça obscura, várias drogas para tratamento do câncer podem induzir osteonecrose e algumas delas são comumente usadas em associação com os BPS. Destacam-se os corticóides, talidomida, vincristina, ciclofosfamida e metotrexato os quais têm efeitos antiangiogênicos, como inibição do fator de crescimento fibroblástico.

A variação genética individual frente ao metabolismo da droga pode conferir resistência ou suscetibilidade ao desenvolvimento da osteonecrose dos maxilares. Além desses fatores gerais ou sistêmicos, o fator local tem importância fundamental (MARX, et al., 2005; ABU-ID et al., 2008). A existência de um fator retentivo ou sítio de infecção permite um desequilíbrio na microbiota bucal, o que tende a aumentar progressivamente se não tratado. A presença de restos radiculares representa um foco séptico potencial com sinais de inflamação e infecção que são incapazes de involuir sem tratamento; mas mesmo assim podem, apresentar equilíbrio.



*CONCLUSÃO*

---

## 7 CONCLUSÃO

---

De acordo com a metodologia utilizada nesse trabalho, concluiu-se que:

- 1- o zolendronato associado a uma situação patológica local (restos radiculares– potenciais focos de infecção) potencializa o estabelecimento de osteonecrose.
- 2- a laserterapia não influenciou no processo de reparo dos tecidos ósseo e mole em ambas situações clínicas avaliadas;
- 3- a laserterapia não impediu o estabelecimento de osteonecrose nessa metodologia aplicada.



*REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

---

## *REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

---

ABU-ID, MH. Et al. Bis-phossy jaws – high and low risk factors bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw. **J Craniomaxillofac Surg**, v. 36, p. 95 -103, 2008.

ALMEIDA LOPES, L. et al. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. **Lasers Surg Med**, v. 29, n. 2, p. 179-184, Aug. 2001.

ANNEROTH, G. et al. The effect of low-energy infra-red laser radiation on wound healing in rats. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 26, n. 1, p. 12-17, Feb. 1988.

AMERICAN ASSOCIATION OF ORAL AND MAXILLOFACIAL SURGERY POSITION PAPER ON BISPHOSPHONATE-RELATED OSTEONECROSIS OF THE JAWS. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 65, p. 369, 2007.

BASFORD, JR. Low-energy laser therapy: controversies and new research findings. **Laser Surg Med**, v. 9, n. 1, p. 1-5, 1989.

BASFORD, JR. low intensity laser therapy: still not an established clinical tool. **Lasers Surg Med**, v.16, p. 331-342, 1995.

BARTZELA, T. Medication effects on the rate of orthodontic tooth movement: a systematic literature review. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 135, p. 16-26, 2009.

BEZERRA A; CALDEIRA C; GAVINI G. Estágio atual e perspectivas futuras do tratamento das reabsorções externas pós-traumatismo dental. **Revista de odontologia da universidade cidade de são Paulo**, v. 19, n 2, p. 209-216, 2007.

BLAYA, DS. et al. Histologic study of the effect of laser therapy on bone repair. **J Contemp Dent Pract**, v. 9, n. 6, p. 41-48, 2008.

BORGIOLI, A. Bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw: Clinical and physiopathological considerations. **Therapeutics and clinical risk management**, v. 5, p. 217-227, 2009.

BRAVERMAN, B. et al. Effect of helium-neon and infrared laser irradiation on wound healing in rabbits. **Lasers Surg Med**, New York, v. 9, n. 1, p. 50-58, 1989.

BURKITT, HG.; YOUNG, B.; HEATH, JW. Skeletal tissues. In: BURKITT, H. G.; YOUNG, B.; HEATH, J. W. **Wheater's funcional histology: a text and colour atlas**. Edimburg: Churchill Livingstone, 1997. p. 170-190.

CAMPANHA, BP. et al. Low-level laser therapy for implants without initial stability. **Photomed Laser Surg**, v. 28, n. 3, p. 365-369, 2010.

CATANZARO GUIMARÃES, S. A. **Patologia básica da cavidade bucal**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1982. p. 282-315.

DAVID, R. et al. Effect of low-power HeNe laser on fracture healing in rats. **Lasers Surg Med**, New York, v. 19, n. 4, p. 458-464, 1996.

DÖRTBUDAK, O.; HAAS, R.; MAILATH-POKORNY, G. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. **Clin Oral Implants Res**, v. 11, n. 6, p. 540-545, Dec. 2000.

DÖRTBUDAK, O.; HAAS, R.; MAILATH-POKORNY, G. Effect of low-power laser irradiation on bony implants sites. **Clin Oral Implants Res**, v. 13, n. 3, p. 288-292, June 2002.

DUCY, P.; SCHINKE, T.; KARSENTY, G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance (bone remodeling and repair: review). **Science**, v. 289, n. 5484, p. 1501-1504, Sept. 2000.

FERNANDES C; LEITE R; LANÇAS F. Bisfosfonatos: síntese, análises químicas e aplicações farmacológicas. **Quin nova**, v.28, n.2, p. 274-280, 2005.

FRANKS, Y. Low level laser therapy. **Journal of Community Nursing**, v. 13, n. 4, p. 14-22, Apr. 1999.

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



GANDRUD LM. et al. Low-dose intravenous pamidronate reduces fractures in childhood osteoporosis. **J Pediatr Endocrinol Metab**, v.16, n. 6, p. 887 -892, 2003.

GORDJESTANI, M.; DERMAUT, L.; THIERENS, H. Infrared laser and bone metabolism: a pilot study. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 23, n. 1, p. 54-56, Feb. 1994.

HALL, G. et al. Effect of low level energy laser irradiation on wound healing: an experimental study in rats. **Swed Dent J**, v. 18, n. 1-2, p. 29-34, 1994.

HALLMAN, HO. et al. Does low-energy helium-neon laser irradiation alter "in vitro" replication of human fibroblasts? **Lasers Surg Med**, v. 8, n. 2, p. 125-129, 1988.

HAMDY, RC. et al. Zolendronic acid: clinical utility and patient considerations in osteoporosis and low bone mass. **Drug Des Devel Ther**, v. 4, p. 321-335, 2010.

HESS LM. et al. Factors associated with osteonecrosis of the jaw among bisphosphonate users. **Am J Med**, v. 121, p. 475-483, 2008.

HILLENKAMP, F. Laser radiation tissue interaction. **Health Physics**, v. 56, n. 5, p. 613-616, May 1989.

HUTCHINSON, M. et al. Radiographic findings in bisphosphonate-treated patients with stage 0 disease in the absence of bone exposure. **J Oral Maxillofac Surg**, v.68, p. 2232-2240, 2010.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Indicadores Sociodemográficos e de saúde no Brasil 2009. Rio de Janeiro, 2009.

Instituto Nacional de Câncer – INCA. Estimativa 2010 – Incidência de câncer no Brasil. Brasil, 2010.

IN DE BRAEKT, MH. et al. Effect of low-level laser therapy on wound healing after palatal surgery in beagle dogs. **Lasers Surg Med**, v. 11, n. 5, p. 462-470, 1991.

JACOBSON, T. et al. Local bisphosphonate treatment increase fixation of hydroxyapatite-coated implants inserted with bone compaction. **J Orthop Res**, v.27, p.189-194, 2009.

JUNQUEIRA, LC.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: JUNQUEIRA, LC.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 111-128.

KARU, T. Photobiology of low-power laser effects. **Health Physics**, v. 56, n. 5, p. 691-704, May 1989.

KAWASAKI, K.; SHIMIZU, N. Effects of low-energy laser irradiation on bone remodeling during experimental tooth movement in rats. **Lasers Surg Med**, v. 26, n. 3, p. 282-291, 2000.

KOLÁROVÁ, H.; DITRICOVÁ, D.; WAGNER, J. Penetration of the laser light into the skin in vitro. **Lasers Surg Med**, v. 24, n. 3, p. 231-235, 1999.

KREISLER, M. et al. Low level 809nm diode laser-induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. **Lasers Surg Med**, v. 30, n. 5, p. 365-369, June 2002.

KUCEROVÁ, H. et al. Low-level laser therapy after molar extraction. **J Clin Laser Med Surg**, v. 18, n. 6, p. 309-315, Dec. 2000.

KUMAR, SKS.; MERU M.; SEDGHIZADEH, PP. Osteonecrosis of the jaws secondary to bisphosphonate therapy: a case series. **J Contemp Dent Pract.**, v.9, n.1, p.63-9, 2008

LAZAROVICI, TS. Serologic bone markers for predicting development of osteonecrosis of the jaw in patients receiving bisphosphonates. **J Oral Maxillofac Surg**, v.68, p. 2241 – 2247, 2010.

LERNER, UH. Osteoclast formation and resorption. **Matrix Biology**, v. 19, n. 2, p. 107-120, May 2000.

LIBERMAM, UA. Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. **N Engl J Med**, v.333, p. 1437 – 1441, 1995.

LICATA, AA. Discovery, clinical development, and therapeutic uses of BPs. **Am Pharmacother**, v. 39, n 4, p. 668 -677, 2005.

LONGO, L. et al. Effect of diodes-laser silver arsenide-aluminium (GaAlAs) 904nm on healing of experimental wounds. **Lasers Surg Med**, v. 7, n. 5, p. 444-447, 1987.

LUGER, EJ. et al. Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. **Lasers Surg Med**, v. 22, n. 2, p. 97-102, 1998.

MCCLUNG M. Bifosfonatos. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.50, n.4, p. 735-744, Aug, 2006.

MCCLUNG M. Zoledronic acid for the prevention of bone loss in postmenopausal women with low bone mass: a randomized controlled trial. **Obstet gynecol**, v.114, n.5, p. 999-1007, 2009.

MARSH, DR.; LI, G. The biology of fracture healing: optimising outcome. **Br Med Bull**, v. 55, n. 4, p. 856-869, Oct. 1999.

MARTINS, GL. et al. Mandibular avascular osteonecrosis caused by bisphosphonate – a case report and brief review. **Rev odonto ciênc**, v. 24, n. 4, p. 435-438, 2009 a.

MARTINS, MAT. et al. Osteonecrose dos maxilares associada ao uso de bisfosfonatos: importante complicação do tratamento oncológico. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 31, n.1, p. 41-46, 2009 b.

MARX RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 61, n.9, p. 1115-1117, 2003.

MARX RE, et al. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 63, n. 11, p. 1567-1575, 2005.

MCKAGUE M; JORGENSON D; BUXTON K. Ocular side effects of bisphosphonates. **Can Fam Physician**, V.56, oct, p.1015-1017, 2010.

MAEGAWA, Y. et al. Effects of near-infrared low-level laser irradiation on microcirculation. **Lasers Surg Med**, v. 27, n. 5, p. 427-437, 2000.

MERIGO, E. et al. Bone necrosis of jaws associated with bisphosphonate treatment: a report of twenty-nine cases. **Acta Biomed**, v. 77, p. 109-117, 2006.

MESTER, E. et al. Effect of laser rays on wound healing. **Am J Surg**, v. 122, n. 4, p. 532-535, 1971.

MESTER, E.; MESTER, A. F.; MESTER, A. The biomedical effects of laser application. **Lasers Surg Med**, v. 5, n. 1, p. 31-39, 1985.

MORI GG. et al. Morphometric and microscopic evaluation of the effect of a solution of alendronate as an intracanal therapeutic in rat teeth submitted to late reimplantation. **Dent Traumatol**, v.23, p.218-21, 2007.

MORIMOTO, Y. et al. Effect of low-intensity argon laser irradiation on mitochondrial respiration. **Lasers Surg Med**, v. 15, n. 2, p. 191-199, Oct. 1994.

NICOLA, RA. et al. Effect of low-power GaAlAs laser (660nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. **Lasers Med Sci**, v. 18, n. 2, p. 89-94, May 2003.

OZAWA, Y. et al. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarian cells. **Bone**, v. 22, n. 4, p. 347-354, Apr. 1998.

PINHEIRO ALB, et al. Low-level laser therapy is an important tool to treat disorders of the maxillofacial region. **J Clin Laser Med Surg**, v. 16, n. 4, p. 223-226, 1998.

PINHEIRO, ALB. et al. Biomodulatory effects of LLLT on bone regeneration. **Laser Therapy**, v. 13, special millennium edition, p. 73-79, 2001.

PINHEIRO, ALB. et al. Polarized light (400-2000 nm) and non ablative laser (685 nm): a description of the wound healing process using immunohistochemical analysis. **Photomed Laser Surg**, v. 23, n. 5, p. 485-492, 2005.

POGREL, MA.; CHEN, JW.; ZHANG, K. Effects of low-energy gallium-aluminum-arsenide laser irradiation on cultured fibroblasts and keratinocytes. **Lasers Surg Med**, v. 20, n. 4, p. 426-432, 1997.

PYCZEK, M.; SOPALA, M.; DABROWSKI, Z. Effect of low-energy laser power on the bone marrow of the rat. **Folia Biologica**, v. 42, n. 3-4, p. 151-156, 1994.

REDDY, GK.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, CS. Laser Photostimulation of collagen production in healing rabbit achilles tendons. **Lasers Surg Med**, v. 22, n. 5, p. 281-287, 1998.

REGEV E; LUSTMANN J; NASHEF R. Atraumatic teeth extraction in bisphosphonate-treated patients. **J Oral Maxillofac Surg**, 66, p. 1157 -1161, 2008.

ROCHKIND, S. et al. Systemic effects of low-power laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds, and burns. **Lasers Surg Med**, v. 9, n. 2, p. 174-182, 1989.

RODRIGO et al. Analysis of the systemic effect of red and infrared laser therapy on wound repair. **Photomed Laser Surg**, v. 27, n. 6, p. 929-935, 2009.

RUGGIERO SL, et al. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. **J Oral Maxillofac Surg**, 62: 527 -534, 2004.

RUGIERO SL; DREW SJ. Osteonecrosis of the jaws and bisphosphonate therapy. **J Dent Res**. 86 (11): 1013 – 1021, 2007.

SANTOS PSS. et al. Osteonecrose maxilar em pacientes portadores de doenças neoplásicas sob uso de bisfosfonatos. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 30, n 6, p. 501 -504, 2008

SAITO, S.; SHIMIZU, N. Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in rat. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 111, n. 5, p. 525-532, May 1997.

SEDGHIZADEH PP. Identification of microbial biofilms in osteonecrosis of the jaws secondary to bisphosphonate therapy. **J Oral Maxillofac Surg.**, v. 66, p. 767-775, 2008.

SILVA JÚNIOR, A. N. et al. Computerized morphometric assessment of effect of low-level laser therapy on bone repair: an experimental animal study. **J Clin Laser Med Surg**, v. 20, n. 2, p. 83-87, Apr. 2002.

SUZUKI K. et al. Current topics in pharmacological research on bone metabolism: inhibitory effects of bisphosphonates on the differentiation and activity of osteoclasts. **J Pharmacol Sci**, v.100, p. 189 -194, 2006.

TAKEDA, Y. Irradiation effect of low-energy laser on alveolar bone after tooth extraction: experimental study in rats. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 17, n. 6, p. 388-391, Dec. 1988.

TEN CATE, AR. **Histologia Bucal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p. 95-111.

THONG YL. et al. Intracanal bisphosphonate does not inhibit replacement resorption associated with delayed replantation of monkey incisors. **Dent Traumatol**, v.25, n.4, p.386-93, 2009.

TORRICELLI, P. et al. Laser biostimulation of cartilage: in vitro evaluation. **Biomed Pharmacother**, v. 55, n. 2, p. 117-120, Mar. 2001.

UEDA, Y.; SHIMIZU, N. Pulse irradiation of low-power laser stimulates bone nodule formation. **J Oral Sci**, v. 43, n. 1, p. 55-60, Mar. 2001.

VAN BREUGEL, HHFI.; DOP BÄR, PR. Power density and exposure time of HeNe laser irradiation are more important than total energy dose in photo-biomodulation of human fibroblasts in vitro. **Lasers Surg Med**, v. 12, n. 5, p. 528-537, 1992.

VESCOVI P. et al. Nd:YAG laser biostimulation os bisphosphonate-associated necrosis of the jawbone with and without surgical treatment. **Br J Oral Maxillofac Surg** 45: 628 -632, 2007.

VESCOVI, P. et al. Nd:YAG laser bioestimulation in the treatment of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: clinical experience in 28 cases. **Photomed Laser Surg**, v. 26, n. 1, p. 37-46, 2008.

WALKER, MD. et al. Effect of low-intensity laser irradiation (660nm) on a radiation-impaired wound-healing model in murine skin. **Lasers Surg Med**, v. 26, n. 1, p. 41-47, 2000.

WALSH, LJ. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 1. Soft tissue applications. **Aust Dent J**, v. 42, n. 4, p. 247-254, Oct. 1997 a.

WALSH, LJ. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 2. Hard tissue applications. **Aust Dent J**, v. 42, n. 5, p. 302-306, 1997 b.

WEBER, JBB. 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.

YOUNG, B.; HEATH, J. W. Tecidos esqueléticos. In: YOUNG, B.; HEATH, J. W. Histologia funcional. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 172-192.

ZAHROWSKI JJ. Optimizing orthodontic treatment in patients taking bisphosphonates for osteoporoses. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v.135, p. 361-374, 2009.



*APÉNDICE*

---



## APÊNDICE

---

**APÊNDICE 1 – Peso médio dos animais, em cada subgrupo, durante o experimento.**


	31.7.09	19.8.09	26.8.09	23.9.09	24.9.09	19.10.09	22.10.09	13.11.09	
<b>G1 A</b>	263 g	318 g	<b>PRIMEIRA DOSE</b>	374 g	<b>SEGUNDA DOSE</b>	377 g	<b>TERCEIRA DOSE</b>	403 g	<b>MORTE</b>
<b>G1 B</b>	238 g	285 g		332 g		311 g		369 g	
<b>G2 A</b>	275 g	314 g		382 g		362 g		384 g	
<b>G2 B</b>	264 g	338 g		405 g		419 g		440 g	
<b>G3 A</b>	294 g	341 g		398 g		368 g		402 g	
<b>G3 B</b>	290 g	346 g		413 g		423 g		451 g	



*ANEXOS*

---

ANEXO A – Protocolo da Comissão Científica e de Ética da PUCRS

 *Comissão Científica e de Ética  
Faculdade da Odontologia da PUCRS*

---

Porto Alegre 13 de maio de 2009

**O Projeto de:** Dissertação

**Protocolado sob n°:** 0104/08

**Intitulado:** Análise histomorfométrica do efeito da laserterapia (GaAIIAs) na cicatrização de alvéolos em ratos submetidos à terapia com zolendronato

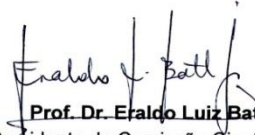
**Pesquisador Responsável:** Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber

**Pesquisadores Associados:** Cristina de Moraes Izquierdo; Marília Gerhardt de Oliveira

**Nível:** Mestrado

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 13 de maio de 2009.

*Este projeto deverá ser imediatamente encaminhado ao CEUA/PUCRS*





  
**Prof. Dr. Eraldo Luiz Batista Júnior**  
Presidente da Comissão Científica e de Ética da  
Faculdade de Odontologia da PUCRS

---

Av. Ipiranga, 6681, Prédio 06 sala 209  
Porto Alegre /RS – Brasil – Cx. Postal:1429  
90619-900

Fone/Fax: (51) 3320-3538  
e-mail: [odontologia-pg@pucrs.br](mailto:odontologia-pg@pucrs.br)

## ANEXO B – Protocolo do Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA)

	<p>Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS</p>	
Ofício 075/09 - CEUA	Porto Alegre, 16 de julho de 2009.	
Senhor Pesquisador:		
<p>O Comitê de Ética para o Uso de Animais apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 09/00096, intitulado: <b>"Análise histomorfométrica do efeito da laserterapia (GaAIAs) na cicatrização de alvéolos em ratos submetidos à terapia com zolendronato"</b>.</p> <p>Sua investigação está autorizada a partir da presente data.</p>		
Atenciosamente,		
		
Prof. Dr. Paulo Márcio Condessa Pitrez Coordenador-Adjunto do CEUA – PUCRS		
Ilmo. Sr. Prof. Dr. João Batista Weber N/Universidade		
	<p>Campus Central Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60 sala 314 CEP: 90610-000 Fone/Fax: (51) 3320-3345 E-mail: <a href="mailto:ceua@pucrs.br">ceua@pucrs.br</a></p>	

## ANEXO C – Declaração do chefe de serviço de Medicina Experimental do Laboratório de Experimentação Animal do Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul



Porto Alegre, 13 de maio de 2009

Prezados Senhores

Eu, Dra. Beatriz Schaan, chefe do serviço de medicina experimental, conheço o protocolo de pesquisa intitulado "Análise histomorfométrica do efeito da laserterapia (GaAlAs) na cicatrização de alvéolos em ratos submetidos à terapia com zolendronato," desenvolvida por Prof. Dr João Batista Blessmann Weber e a aluna Cristina de Moraes Izquierdo. Este projeto será realizado no Laboratório de Experimentação Animal do Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul com animais provenientes do Biotério da Fundação Estadual de Produção Pesquisa em Saúde – FEPPS.

O início desta pesquisa só poderá ocorrer a partir da apresentação da carta de aprovação do Comitê de Ética para uso de Animais da PUCRS.

Declaro, também, que o laboratório possui câmara de CO<sub>2</sub> disponível para a utilização dos pesquisadores durante a realização dos projetos de pesquisa.

Atenciosamente,

Dra Beatriz Schaan  
Chefe do serviço de medicina experimental  
Laboratório de Experimentação Animal  
Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul

## **ANEXO D – Autorização para uso de dependências do Laboratório de anatomia Patológica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul**

### **AUTORIZAÇÃO DO USO DE DEPENDÊNCIAS DE LABORATÓRIO**

Porto Alegre, 07 de novembro de 2008.

À Comissão de Ciência e Ética da Faculdade de Odontologia-PUCRS

Autorizo, pelo presente, que as dependências do Laboratório de Anatomia Patológica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul por mim coordenadas sejam utilizadas pelo(s) pesquisador(es) Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber e aluna Cristina de Moraes Izquierdo com a finalidade de realizar processamento histológico de rotina para a técnica HE em 54 lâminas e captura das imagens com a câmera acoplada ao microscópio. Esses procedimentos deverão ser feitos durante a realização do projeto de dissertação intitulada “Análise histomorfométrica do efeito do LLLT na cicatrização de alvéolos em ratos submetidos a terapia com Zolendronato”.

Atenciosamente,

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Manoel Sant'ana Filho