

MEIRE MAMAN FRACHER ABRAMOFF

***LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA REPARAÇÃO DE TÍBIAS
DE RATOS SUBMETIDAS À RADIAÇÃO IONIZANTE***

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo, para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2011

MEIRE MAMAN FRACHER ABRAMOFF

***LASER* DE BAIXA INTENSIDADE NA REPARAÇÃO DE TÍBIAS
DE RATOS SUBMETIDAS À RADIAÇÃO IONIZANTE**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo, para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

ORIENTADOR : PROF. DR. MAX DOMINGUES PEREIRA
COORIENTADORES : PROF^a. DR^a. MARIA TERESA DE SEIXAS ALVES
PROF. DR. ARNALDO GUILHERME

São Paulo

2011

Abramoff, Meire Maman Fracher.

LASER de baixa intensidade na reparação de tíbias de ratos submetidas à radiação ionizante./ Meire Maman Fracher Abramoff. -- São Paulo, 2011.

xxv, 166f.

Tese (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-graduação em Cirurgia Plástica.

Título em inglês: Low level *LASER* therapy in the reparation of rats tibias submitted to ionizing radiation.

1. *LASER*; 2. Terapia a *LASER* de baixa intensidade; 3. Radiação ionizante; 4. Radioterapia; 5. Osso; 6. Ratos Wistar

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIRURGIA PLÁSTICA**

COORDENADOR: PROF. DR. MIGUEL SABINO NETO

A D'US, sempre.

Aos meus amados Filhos *ANDRÉ* e *LOUISE* que me inspiraram a realizar este estudo, alegraram-me quando eu ficava triste e comemoravam a cada vitória conquistada. Aqui fica um exemplo de perseverança, comprometimento com os sonhos e superação das dificuldades, que gostaria que, como uma semente, germinasse em seus corações.

Ao meu Marido *SÉRGIO*, agradeço pela compreensão e cumplicidade que, carinhosamente, reconheço como uma expressão do nosso amor.

Aos meus queridos Pais *SALOMÃO* e *RICA*, pelo amor incondicional, exemplos de vida e ensinamentos de *FÉ*, que me deram a força de realizar os meus sonhos.

Ao Professor Doutor **MAX DOMINGUES PEREIRA** PROFESSOR ORIENTADOR DO PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA (UNIFESP-EPM) e Orientador desta tese — exemplo de trabalho e dedicação ao que faz. Agradeço por ter acreditado neste projeto, por todas as orientações que aprimoraram a tese e pelo apoio para enfrentar os desafios.

À Professora Doutora **MARIA TERESA DE SEIXAS ALVES**, LIVRE DOCENTE e CHEFE do DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA DA (UNIFESP-EPM) e Coorientadora desta tese — pilar principal deste estudo que, com os seus profundos conhecimentos em patologia e análises, fez de um sonho algo possível e científico. Sou profundamente grata pela sua enorme dedicação a esta tese.

Ao Professor Doutor **ARNALDO GUILHERME** PROFESSOR ASSOCIADO DO DEPARTAMENTO DE OTORRINOLARINGOLOGIA/CIRURGIA DE CABEÇA E PESCOÇO DA UNIFESP-EPM e Coorientador desta tese — agradeço por ter aberto as primeiras portas para tornar este projeto uma realidade.

À Professora Doutora **LYDIA MASAÑO FERREIRA**, TITULAR DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIFESP-EPM e ao Professor Doutor **MIGUEL SABINO NETO** COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIFESP-EPM — expresso minha admiração pelo trabalho e a dedicação em criar um caminho para a pesquisa científica, que possibilitou esta tese e tantas outras, que mais que realizações pessoais, são os tijolos para o engrandecimento científico de uma nação.

À Professora Doutora **LUCIANA ALMEIDA LOPES** COORDENADORA DO NÚCLEO DE PESQUISA E ENSINO DE FOTOTERAPIA NAS CIÊNCIAS DA SAÚDE (NUPEN, SÃO CARLOS-SP) — minha querida amiga que, com o seu carinhoso incentivo e exemplo de vida, deu-me forças para transpor todas as dificuldades. Você é a origem de tudo o que eu sei sobre o *LASER* e esta tese é uma centelha do seu conhecimento.

Ao Professor Doutor **ROBERTO ARAÚJO SEGRETO** e à Professora **HELENA REGINA COMODO SEGRETO**, respectivamente, PROFESSOR LIVRE DOCENTE E ASSOCIADO DO SETOR DE RADIOTERAPIA DO DEPARTAMENTO DE ONCOLOGIA CLÍNICA E EXPERIMENTAL DA UNIFESP-EPM e PROFESSORA ASSOCIADA DO DEPARTAMENTO DE ONCOLOGIA CLÍNICA E EXPERIMENTAL DA UNIFESP-EPM, pela atenciosa acolhida e oportunidade para o desenvolvimento desta pesquisa em seu departamento.

Ao **ADELMO JOSÉ GIORDANI** FÍSICO DO SETOR DE RADIOTERAPIA DO DEPARTAMENTO DE ONCOLOGIA CLÍNICA E EXPERIMENTAL DA UNIFESP-EPM-HSP, pelos cálculos de irradiação e atenção com o estudo.

Ao Professor Doutor **LUCIANO LAURIA DIB** do CENTRO DE REABILITAÇÃO BUCOMAXILOFACIAL DA DISCIPLINA DE CIRURGIA DE CABEÇA E PESCOÇO - UNIFESP-EPM, que iniciou esta jornada como meu coorientador, e que, por circunstâncias diversas, não foi possível acompanhar-me até o fim. Minha gratidão pelos seus ensinamentos e oportunidade de trabalhar com os pacientes com necessidade de reabilitação após o tratamento oncológico.

Ao querido amigo **JOAQUIM AUGUSTO PIRAS DE OLIVEIRA** pela sua acolhida e por ter confiado, a mim, um milésimo dos seus conhecimentos na elaboração de próteses, verdadeiras obras de arte, para a reabilitação facial dos pacientes comprometidos por tumor maligno.

Aos amigos **RICARDO S JAHN, EMNE H. GUMIEIRO, RONALDO ANTÔNIO LEITE, SUSETTE LUCATTO** e **CAROLINA F. SANTANA**, pela oportunidade de participar dos experimentos de todos vocês e, com seus ensinamentos, permitiram que esta pesquisa pudesse percorrer um caminho seguro.

Aos **PROFESSORES** do CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA REPARADORA DA UNIFESP-EPM, pelas sugestões e críticas durante as apresentações no curso e que permitiram o aprimoramento do estudo.

Ao Professor **EDSON SINNES** que, graças à sua amizade e ajuda, permitiu realizar as etapas cirúrgicas com sucesso.

Ao técnico laboratorial **EMANOEL BARRETO CABRAL**, a sua participação foi imprescindível nos cuidados com os animais, na dedicação e profissionalismo de tornar viável toda a fase laboratorial cirúrgica.

Ao físico **RENALDO MANSINI** e **TODA A SUA EQUIPE**, pela cuidadosa calibração dos equipamentos de **LASER**, e assessoria de todos os aspectos físicos com o equipamento.

Ao biólogo **JOAQUIM SOARES DE ALMEIDA** do DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA, pelo excelente preparo das lâminas histológicas e simpatia em esclarecer as dúvidas desta fase laboratorial.

À SECRETÁRIA do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIFESP-EPM, **SANDRA DA SILVA**, agradeço pela sua enorme simpatia e ajuda em vários momentos da minha pós-graduação.

À secretária da DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIFESP-EPM, **MARTA REJANE DOS REIS SILVA**, meu agradecimento pela assistência e colaboração com a burocracia e pelo carinho com o qual foi realizado.

Ao amigo da Pós-Graduação **FLÁVIO ÁVILA KFOURI**, meu muito obrigada pelo seu apoio incondicional em vários momentos desta jornada e que a tornaram mais suave.

Aos PROFESSORES DA PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA, Dr. **CARLOS EDUARDO PINFILDI**, Dr. **RICHARD ELOIN LIEBANO**, **RAFAEL CORRÊA GOBBATO** e Dr^a **ALESSANDRA HADDAD**, agradeço aos vários ensinamento sobre **LASER**, mas, também, pela amizade e pela participação de todos, valorizando o estágio docente.

Aos amigos do CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA, **JOSÉ LUIS GONÇALVES BRETOS**, **IVAN RENE VIANA OMONTE**, **PIERANGELO**

ANGELETTI, FABIANNE M. P. FURTADO pelas inúmeras sugestões, críticas, esclarecimentos e inspiração provenientes de suas teses.

Aos participantes da banca da pré-defesa de tese Professora **MÔNICA TALARICO DUAILIBI** e **MATTHIAS W. M. WEINSTOCK**. Agradeço o cuidado da revisão realizada, o que contribuiu muito com o aprimoramento desta tese.

À amiga do curso de pós-graduação **GABRIELA P. R. PRADO**, pelo seu carinho e apoio em muitos momentos durante essa jornada e pelo trabalho em equipe na elaboração do artigo.

Ao querido amigo dos tempos da graduação Professor **ANTÔNIO CARLOS ALOISE**, por mostrar o caminho da PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIFESP-EPM, para o desenvolvimento desta tese.

Ao amigo Professor Doutor **LUCIANO ARTIOLI MOREIRA** meus sinceros agradecimentos pelas suas sugestões, pela presença no estágio docente e oportunidades para disseminar os conhecimentos do *LASER*.

Ao querido **RICARDO IANNUZZI**, pelas traduções para a língua inglesa, mas, principalmente, pelo carinho com que foram realizadas.

Ao estatístico **JIMMY ADAMS**, pelas análises e pelos seus esclarecimentos sobre os enigmas da estatística.

À *MYUKI HIRAI*, pela carinhosa revisão da língua portuguesa e formatação da tese com dedicação e profissionalismo.

Ao *FRANCISCO GUSTAVO DA SILVEIRA SOUSA JÚNIOR* pela consideração e esmerado tratamento das imagens e tabelas.

Aos meus queridos sogros *SARAH* e *DAVID ABRAMOFF*, pela compreensão da minha ausência e incentivo para continuar a estudar.

Aos meus sempre amigos *SAMI* e *SANDRA SARUÊ*, *ANTÔNIO ALFREDO* e *ETEL FERNANDES*, agradeço pela alegria de ter vocês por perto.

À querida *LÍDIA LINDNER*, por sua fiel colaboração na organização do consultório para que eu pudesse realizar todas as fases desse estudo.

À querida *DOMINGAS MATOS SILVA* que, com seu peculiar senso de humor, cuidou da logística da minha casa e dos meus filhos nos meus inúmeros momentos de ausência.

À querida *IRACEMA FELIX P. NOGUEIRA*, pelas suas preces e incentivo para sempre seguir em frente.

À *FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP)*, pelo financiamento sob a forma de Auxílio à Pesquisa Regular - Protocolo 10/51626-9.

Só foi possível porque vocês estavam ao meu lado.

Estranha é a nossa situação aqui na terra. Cada um de nós vem para uma breve visita, não sabendo por que, no entanto algumas vezes parecendo adivinhar um objetivo. Do ponto de vista da vida diária, no entanto, há uma coisa que sabemos: que estamos aqui por causa do nosso semelhante, acima de tudo, para aqueles de cujo sorriso e bem estar a nossa própria felicidade depende, e também para as incontáveis almas desconhecidas com cujo destino estamos ligados por um vínculo de simpatia. Muitas vezes, durante o dia percebo o quanto a minha própria vida externa e interna está construída em cima do trabalho de outros, tanto vivos como mortos, e como preciso me esforçar honestamente a fim de devolver o tanto o que recebi e ainda estou recebendo.

(Adaptado de Albert Einstein)

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	iv
AGRADECIMENTOS	v
LISTAS	xiii
RESUMO	xxiv
1 INTRODUÇÃO.....	26
2 OBJETIVO.....	32
3 LITERATURA	34
4 MÉTODOS.....	63
5 RESULTADOS.....	89
6 DISCUSSÃO	104
7 CONCLUSÃO	119
REFERÊNCIAS.....	121
NORMAS ADOTADAS	133
ABSTRACT	136
APÊNDICES	138
FONTES CONSULTADAS	170

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Animais preparados para o transporte até o Setor de Radioterapia do Departamento de Oncologia Clínica e Experimental da UNIFESP-EPM. (A) Animais imobilizados por braçadeiras. (B) Placa acrílica perfurada dentro da bandeja de madeira, com os animais posicionados	66
FIGURA 2.	Bandeja com os animais posicionada no equipamento de simulação	67
FIGURA 3.	Imagem das tíbias dos animais durante a simulação	68
FIGURA 4.	Bandeja com os animais, posicionada para a radiação ionizante (RI) no aparelho de telecobaltoterapia	69
FIGURA 5.	Demarcação do local da perfuração por meio de guia plástico	70
FIGURA 6.	Perfuração monocortical na tíbia com 2,5mm de diâmetro	71
FIGURA 7.	Terceira aplicação de <i>LASER</i> com a guia plástico, com o posicionamento da perfuração no osso	73
FIGURA 8.	Equipamento de <i>LASER</i> durante a calibração.....	74
FIGURA 9.	Guia posicionado diretamente na tíbia. (A) Local da perfuração indicado pela seta. (B) Fragmento dentro do cassete e identificado por código para ser enviado ao processo de elaboração de lâminas histológicas	75

FIGURA 10. Sequência de quatro fotos de uma lâmina histológica em aumento de 200 vezes em microscópio óptico. Coloração em tricrômio de Masson	78
FIGURA 11. Delineamento da área de neoformação óssea por meio da ferramenta <i>magic wand</i> do programa de edição de imagens	80
FIGURA 12. Imagem do tecido ósseo neoformado, obtida após a edição	81
FIGURA 13. Imagem convertida em tons de cinza	82
FIGURA 14. Máscara criada igual à imagem editada, pela manipulação do <i>threshold</i> . A) Corresponde à imagem editada no Photoshop®; B) Corresponde ao <i>threshold</i> ; C) corresponde à máscara da imagem finalizada	83
FIGURA 15. Seleção manual (em vermelho) das áreas negativas (em branco)	83
FIGURA 16. Análise e atribuição de valores em μm^2 das áreas negativas	84
FIGURA 17. Fotomicrografias dos grupos I, II, III e IV nos períodos de 7, 14 e 21 dias com magnificação de 200x em microscopia óptica	103

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Índice de Correlação Intra Classes, entre a primeira e segunda avaliações da área do osso neoformado	90
TABELA 2.	Valores médios da área de osso neoformado (μm^2) nos períodos de 7, 14 e 21 dias dos grupos I, II, III e IV	91
TABELA 3.	Valores estatísticos ¹ da área de osso neoformado (μm^2) nos períodos de 7, 14 e 21 dias dos grupos I, II, III e IV	93
TABELA 4.	Valores médios da área de osso neoformado (μm^2) dos grupos I, II, III e IV nos períodos de 7, 14 e 21 dias	94
TABELA 5.	Valores estatísticos ¹ da área de osso neoformado (μm^2) dos grupos I, II, III e IV, nos períodos de 7, 14 e 21 dias	95
TABELA 6.	Valores percentuais de reparação medular no período de 7, 14 e 21 dias nos grupos I, II, III e IV ...	96
TABELA 7.	Valores percentuais da presença de osteoblastos no período de 7, 14 e 21 dias nos grupos I, II, III e IV ...	98
TABELA 8.	Valores percentuais da atividade de osteoblastos no período de 7, 14 e 21 dias nos grupos I, II, III e IV ...	99

TABELA 9.	Valores percentuais da presença de osteoclastos no período de 7, 14 e 21 dias nos grupos I, II, III e IV ...	101
TABELA 10.	Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo I no período de sete dias - primeira avaliação	141
TABELA 11.	Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo II no período de sete dias - primeira avaliação	142
TABELA 12.	Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo III no período de sete dias - primeira avaliação	143
TABELA 13.	Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo VI no período de sete dias - primeira avaliação	144
TABELA 14.	Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo I no período de 14 dias - primeira avaliação	145
TABELA 15.	Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo II no período de 14 dias - primeira avaliação	146
TABELA 16.	Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo III no período de 14 dias - primeira avaliação	147

TABELA 17.	Tabela 17. Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo IV no período de 14 dias - primeira avaliação	148
TABELA 18.	Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo I no período de 21 dias - primeira avaliação	149
TABELA 19.	Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo II no período de 21 dias - primeira avaliação	150
TABELA 20.	Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo III no período de 21 dias - primeira avaliação	151
TABELA 21.	Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo IV no período de 21 dias - primeira avaliação	152
TABELA 22.	Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo I no período de sete dias - segunda avaliação	153
TABELA 23.	Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo II no período de sete dias - segunda avaliação	154
TABELA 24.	Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo III no período de sete dias - segunda avaliação	155

TABELA 25.	Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo IV no período de sete dias - segunda avaliação	156
TABELA 26.	Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo I no período de 14 dias - segunda avaliação	157
TABELA 27.	Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo II no período de 14 dias - segunda avaliação	158
TABELA 28.	Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo III no período de 14 dias - segunda avaliação	159
TABELA 29.	Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo IV no período de 14 dias - segunda avaliação	160
TABELA 30.	Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo I no período de 21 dias - segunda avaliação	161
TABELA 31.	Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo II no período de 21 dias - segunda avaliação	162
TABELA 32.	Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo III no período de 21 dias - segunda avaliação	163

TABELA 33.	Tabela 33. Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo IV no período de 21 dias - segunda avaliação	164
TABELA 34.	Valores médios da área de osso neoformado (μm^2) nos quatro grupos no período de 7 dias na primeira e na segunda avaliação	165
TABELA 35.	Valores estatísticos ¹ da área de osso neoformado (μm^2) dos grupos I, II, III e IV nos períodos de 7 dias na primeira e segunda avaliação.....	165
TABELA 36.	Valores médios da área de osso neoformado (μm^2) nos quatro grupos no período de 14 dias na primeira e na segunda avaliação	166
TABELA 37.	Comparação dos valores estatísticos ¹ entre os grupos no período de 14 dias na primeira e segunda avaliação	166
TABELA 38.	Valores médios da área de osso neoformado (μm^2) nos quatro grupos no período de 21 dias na primeira e na segunda avaliação	167
TABELA 39.	Comparação dos valores estatísticos ¹ entre os grupos no período de 21 dias na primeira e segunda avaliação	167
TABELA 40A-B.	Resultados da avaliação qualitativa	168

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
(*)	Significância estatística
<	Menor
>	Maior
μm²	Micra quadrados
ALP	<i>Alkaline Phosphatase</i> (Fosfatase Alcalina)
AsGaAL	Arsenieto de Gálio e Alumínio
BMP4	<i>Bone morphogenetic protein 4</i> (Proteína Morfogenética Óssea)
CEDEME	Centro de Desenvolvimento de Modelo Experimental
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
cGy	<i>Centigrays</i>
cm²	Centímetros quadrados
Co60	Cobalto 60
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i> (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético)
EPM	Escola Paulista de Medicina
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
g	Gramma
Gy	<i>Gray</i>
h	hora
ICC	Índice de Correlação Intraclasses
IMRT	<i>Intensity Modulation Radiation Therapy</i> (Radioterapia com Intensidade Modulada)
J	Joule
kg	Quilograma
LASER	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i> (Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação)
LLLT	<i>Low-Level LASER Therapy</i> (LASER de Baixa Intensidade)
MDA/Houston	<i>University of Texas MD Anderson Cancer Center</i>

MeV	Megaelétron-volt
MHz	Mega-hertz
mm	Milímetro
mW	Miliwatt
n	Número amostral
nm	Nanômetro
° C	Graus Centígrados
ORN	Osteorradionecrose
PVC	Cloreto de Polivinila
QT	Quimioterapia
rad	<i>Radiation Absorbed Dose</i> (Dose de Radiação Absorvida)
RI	Radiação Ionizante
rpm	Rotações por minuto
RT	Radioterapia
RT-qPCR	<i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa)

<i>Runx2</i>	<i>Runt-related transcription factor 2</i> (Fator Relacionado ao Runt tipo 2)
s	Segundo
<i>SATA</i>	<i>Spatial Average Temporal Average Intensity</i> (Intensidade Média Temporal)
<i>TGF-β1</i>	<i>Transforming Growth Factor β1</i> (Fator de transformação do crescimento beta)
U	Unidade
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
<i>USA</i>	<i>United States of America</i> (Estados Unidos da América)
<i>VEGF</i>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (Fator de Crescimento Vascular Endotelial)
W	Watt
λ	Lambda

RESUMO

RESUMO

INTRODUÇÃO: A radiação ionizante (RI) desenvolve alterações estruturais que retardam e impedem a reparação do tecido ósseo. O *LASER* de baixa intensidade (*LLLT*) desencadeia o incremento celular qualitativo e quantitativo, acelerando o processo de reparação no osso. **OBJETIVO:** Avaliar os efeitos do *LLLT* na reparação de tíbias de ratos submetidas à RI. **MÉTODO:** Setenta e dois ratos *Wistar-EPM-1*, machos e saudáveis foram distribuídos nos seguintes grupos: Grupo I: Controle *sham* (18 tíbias); Grupo II: *LASER* (18 tíbias); Grupo III: RI (18 tíbias); Grupo IV: RI e *LASER* (18 tíbias). Os Grupos III e IV foram submetidos à RI com dose única (30GY). Em cada tíbia foi realizada uma perfuração monocortical ($\phi=2,5\text{mm}$), na porção de diáfise. Nos grupos III e IV, a operação foi realizada após 28 dias da RI. Nos grupos II e IV, foram realizadas três aplicações de *LLLT* sobre a pele (AsGaAL, 100mW, 808nm, 20s, 3,57W/cm², 72J/cm², 2J), em dias alternados iniciando logo após a operação. A eutanásia ocorreu aos 7, 14 e 21 dias após a cirurgia com seis amostras de osso de cada grupo. A histomorfometria foi realizada por análise digital da imagem e a celularidade foi analisada qualitativamente. **RESULTADOS:** Em todos os períodos: houve aumento significativo ($p<0,006$) de osso neoformado no Grupo IV, comparado ao Grupo III; não houve diferença significativa entre o Grupo IV e o Grupo I; a radiação ionizante reduziu a neoformação óssea no Grupo III em comparação ao Grupo I. **CONCLUSÃO:** O *LLLT* aumentou a área óssea neoformada durante a fase inflamatória abreviando a reparação das tíbias de ratos submetidas à RI.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A face é de extrema importância para conferir identidade ao indivíduo. Deformidades causadas por defeitos congênitos, trauma, infecções ou tumores podem comprometer a função, a estética e exercer influência negativa à autoestima.

Nos casos de câncer na região da cabeça e pescoço, tradicionalmente, a radioterapia (RT), a cirurgia e a quimioterapia (QT) são as principais opções de tratamento (BERNIER *et al.*, 2004; COOPER *et al.*, 2004; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2008) e com frequência resultam em efeitos colaterais associados ao tratamento oncológico. Dependendo do estadiamento e localização do tumor, as ressecções das lesões malignas determinam sequelas importantes com o comprometimento da função, da nutrição, da estética e, assim, aspectos fisiológicos e sociais são afetados com profunda repercussão na qualidade de vida dos pacientes no pós-tratamento oncológico (CAMPBELL, MARBELLA, LAYDE, 2000; CURRAN *et al.*, 2007).

A RT é uma radiação ionizante (RI) utilizada na terapêutica oncológica para erradicar o câncer de cabeça e pescoço. Porém, o tecido ósseo sadio adjacente à lesão recebe altas doses de RI que podem causar graves alterações estruturais do tecido endotelial e assim determinar um processo de fibroatrofia dos vasos dentro do campo de irradiação (DELANIAN & LEFAIX, 2004). Com o comprometimento do suprimento sanguíneo o tecido ósseo pode apresentar hipóxia e hipocelularidade (MARX, 1983a) que resultam em atrofia óssea, osteorradiocrose (ORN) e

fraturas patológicas. Dessa forma o tecido irradiado apresenta menor capacidade de evoluir para a reparação no caso de uma cirurgia reparadora ou de sustentar uma prótese reparadora, e, com a possibilidade eminente de ser infectado por micro-organismos.

O tratamento conservador, com o emprego de curetagem, antibióticos e câmara hiperbárica, é indicado nos estágios iniciais da ORN enquanto a ressecção cirúrgica associada à câmara hiperbárica ficam reservadas para os casos mais avançados e refratários (MARX, 1983b). A reconstrução dos defeitos provenientes da cirurgia para a remoção do tumor, ou a reparação após intervenções para restabelecer a função e a fisiologia das estruturas ósseas submetidas à RI, é um desafio que apresenta limitada previsibilidade (CURI & DIB, 1997; OH *et al.*, 2009).

Esses pacientes podem ser reabilitados por meio de enxertos ósseos autógenos (MARX, 1991), retalhos microcirúrgicos (HURVITZ, KOBAYASHI, EVANS, 2006; DE BREE *et al.*, 2008) e implantes dentais (JACOBSSON, NANNMARK, TURESSON, 1987; SCHWEIGER, 1989; MARX, EHLER, PELEG, 1996; TOLMAN & TAYLOR, 1996) que se osseointegram aos ossos remanescentes, propiciando sustentação para as próteses e para os tecidos moles.

Assim, existe a necessidade de pesquisas com biomateriais com propriedades osteoindutoras e osteocondutoras (WÜRZLER *et al.*, 1998; SPRINGER *et al.*, 2008) e com biotecnologias para tornar mais rápida e eficiente a capacidade de reparação do osso e, especificamente, do osso submetido a altas doses de RI.

O *LASER*¹ de baixa intensidade (*LLLT*, do inglês *Low-level LASER therapy*) tem sido objeto de diversos estudos com o intuito de otimizar a reparação do tecido ósseo. A melhor compreensão dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos no processo de fotobiomodulação proveem novas perspectivas do uso dessa tecnologia. A hipótese mais aceita é que ocorre a interação do *LLLT* com a mitocôndria tendo como molécula fotoceptora a citocrome *c* oxidase, a qual é uma enzima terminal da cadeia respiratória responsável pelo transporte de elétrons (KARU, SMOLYANINOVA, ZELENIN, 1991; KARU, 1999). A excitação dessa enzima desencadeia uma cascata de reações sendo uma delas a dissociação do óxido nítrico do centro catalítico da citocrome *c* oxidase. O óxido nítrico é um regulador fisiológico da atividade da citocrome *c* oxidase, e uma vez separados, permite que o transporte de elétrons ocorra mais rapidamente. O óxido nítrico é tóxico para a célula, porém devido a fotossensibilidade, ocorre uma degradação oxidativa dessa molécula (SARTI *et al.*, 2003; BRUNORI *et al.*, 2004). Esses eventos elevam a produção de trifosfato de adenosina (ATP) e mesmo pequenas alterações do nível de ATP, desencadeiam alterações do metabolismo celular (KARU, 1999). Recentes estudos mostram que o ATP além de ser um combustível celular, é uma molécula sinalizadora intercelular. Foram identificados receptores específicos para a molécula de ATP, como os da família P2, e dependendo do subtipo, são observadas diferentes reações (KHAKH, BURNSTOCK, 2009). Quando o ATP liga ao receptor P2X ocorre a entrada de íons de cálcio e sódio na célula. Por outro lado, quando essa conexão é com o receptor

¹ Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação, do inglês *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*.

P2Y, permite que o cálcio intracelular estocado seja liberado. A concepção do ATP como uma molécula sinalizadora permite a compreensão da universalidade de fenômenos desencadeados pela interação da célula com o LLLT (KARU, 2010).

A ação benéfica do *LLLT* no processo de reparação do tecido ósseo é notada na fase inflamatória, incluindo-se o aumento da liberação de prostaglandinas, o aumento do aporte sanguíneo e dos vasos neoformados, o aumento da atividade enzimática, o aumento da celularidade e o aumento do acúmulo de cálcio. Esses eventos criam uma condição favorável para o incremento qualitativo e quantitativo de osso (TRELLES & MAYAYO, 1987; TAKEDA, 1988; BARUSHKA, YAAKOBI, ORON, 1995; YAAKOBI, MALTZ, ORON, 1996; LUGER *et al.*, 1998; SILVA JÚNIOR *et al.*, 2002; GARAVELLO-FREITAS *et al.*, 2003; NICOLA *et al.*, 2003; GARAVELLO, BARANAUSKAS, DA CRUZ-HÖFLING, 2004; PINHEIRO & GERBI, 2006; PRETEL, LIZARELLI, RAMALHO, 2007, LIU *et al.*, 2007; MATSUMOTO *et al.*, 2009; FÁVARO-PÍPI *et al.*, 2010, 2011).

O estudo de DA CUNHA *et al.* (2007) avaliou o emprego do *LLLT* em osso submetido à RT. Por meio de análise histológica foi observado aumento da celularidade medular, do número de osteócitos, dos canais de Harvers, bem como significativo aumento da atividade osteoblástica em fêmur de ratos. O *LASER* melhorou a qualidade do tecido ósseo irradiado durante o processo de remodelação óssea.

Na pesquisa realizada, a literatura mostrou-se escassa quando relaciona o *LLLT* ao osso submetido à RI.

Considerando os resultados das pesquisas com *LLLT* na reparação do tecido ósseo, acredita-se que o *LLLT* pode desempenhar importante papel, principalmente na prevenção das complicações provenientes da RI na remodelação e na reparação do osso sadio incluído no campo de irradiação.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

Avaliar os efeitos do *LASER* de baixa intensidade na reparação óssea de tíbias de ratos submetidas à radiação ionizante.

LITERATURA

3. LITERATURA

3.1 ESTUDOS EM HUMANOS DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO IONIZANTE NO TECIDO ÓSSEO

EWING (1926) relatou observações sobre casos de alterações no tecido ósseo submetido à radiação ionizante (RI). O autor descreveu o aparecimento de lesões, referidas como osteíte, inclusive após três anos da RT. Sob intensa radiação terapêutica, o tecido ósseo apresentava obliteração medular, necrose, alterações vasculares, risco de fraturas espontâneas e com evolução clínica indeterminada. A presença de dor era frequentemente referida pelos pacientes e o tecido tornava-se muito suscetível a infecções e fraturas. O autor sugeriu que se deveria concentrar maior atenção ao possível fracionamento das doses por um período mais prolongado, como forma de prevenir os efeitos colaterais da RT.

SAVOSTIN-ASLING & SILVERMAN (1978) avaliaram mandíbulas de oito pacientes submetidos à RT (6000 a 7200*rads*² fracionadas por cinco a seis semanas) e compararam com mandíbulas não irradiadas. Foram observados o processo de remodelação interna da cortical óssea e a presença de ósteons completos e incompletos. Os achados mostraram que, inicialmente, houve diminuição da atividade osteoblástica, enquanto a atividade osteoclástica perdurou por um período e cessando-se a seguir. Esse desequilíbrio da atividade celular resultou em osso de alta porosidade. O processo de recrutamento entre osteoblastos e osteoclastos apresentou variabilidade

² Do inglês *Radiation Absorbed Dose* (Dose de Radiação Absorvida).

entre as amostras; porém, sempre em taxa considerada abaixo do normal. Foram encontradas micro fraturas no osso irradiado que não apresentavam sinais de reparação. Os ósteons incompletos também eram mais frequentes no osso irradiado, reforçando que esse tecido apresentava comprometimento da remodelação fisiológica.

MARX (1983a) descreveu novo conceito da fisiopatologia da osteorradionecrose (ORN). O autor acompanhou a evolução de 26 casos de ORN e realizou análises microbiológicas das áreas das mandíbulas seccionadas. O critério de diagnóstico para seleção dos casos era a exposição de osso superior a um centímetro (cm), sem evidência de cura no período de seis meses. Os resultados mostraram que os micro-organismos e o trauma não foram determinantes na fisiopatologia da ORN. Observou-se que a ORN era uma entidade espontânea intimamente relacionada com a dose total de irradiação e o uso de implantes radioativos. A hipovascularidade do tecido irradiado resultou em hipóxia e hipocelularidade, referidos como o princípio do triplo “H” da ORN, e determinaram um colapso no equilíbrio fisiológico da renovação celular e síntese de colágeno da mucosa ou pele. Dessa forma, a exposição óssea ocorreu sem a presença de trauma ou infecção. O autor sugeriu que a clássica sequência de evolução da ORN de radiação, trauma e infecção não era suficiente e propôs que, diante das novas observações, a sequência mais adequada da ORN era: radiação; hipovascularidade, hipóxia e hipocelularidade (princípio do triplo “H”); diminuição do *turn over* celular e síntese de colágeno levando ao rompimento do tecido; incapacidade de evoluir para a cura, uma vez que o suprimento da demanda de suprimento metabólico, de oxigênio e energético não era suficiente.

MARX (1983b) propôs protocolo cirúrgico agressivo associado ao uso de câmara hiperbárica, em 58 pacientes com ORN avançada e refratária. O protocolo foi considerado muito satisfatório, uma vez que contemplou os critérios de resolução estabelecidos: ausência de dor, reconstrução da continuidade mandibular, restauração da função mandibular inclusive com próteses e a manutenção da mucosa intacta com recobrimento do osso. Associou-se a melhora desses casos ao aumento da tensão de oxigênio que induziu a proliferação fibroblástica e aumento da síntese de colágeno. Também foi observado o aumento da angiogênese e da celularidade na ferida osteorradiocêntrica. As razões das diferentes respostas, algumas nas primeiras sessões com oxigênio hiperbárico e outras após a associação com a cirurgia, relacionaram-se, primeiramente, com a variação do grau de dano que ocorreu nas mesmas doses de RI, sendo impossível prever o grau de hipóxia, hipovascularidade e hipocelularidade tecidual. Segundo, a câmara hiperbárica aumentava o nível transitório de tensão de oxigênio, não significando, contudo, que alcançaria os níveis normais. E terceiro, o tecido necrótico não era reabsorvido devido à hipovascularidade que retardava ou impedia a cicatrização, por isso a necessidade de debridamento. O autor concluiu que câmara hiperbárica, associada à cirurgia, devem ser as primeiras opções de tratamento da ORN.

BRAS, DE JONGE, VAN MERKESTEYN (1990) estudaram 17 mandíbulas irradiadas com ou sem ORN e compararam com mandíbulas hípidas. Entre as mandíbulas não irradiadas e irradiadas sem ORN observaram-se pequenas diferenças como a fibrose do periósteo e leve diminuição da espessura da artéria alveolar inferior. Nos casos com ORN houve obliteração das artérias e necrose da cortical bucal com ou sem sequestro,

enquanto a cortical lingual apresentava vitalidade e neoformação óssea subperiostal. Os achados desse estudo indicaram que a ORN da mandíbula era uma necrose isquêmica rádio induzida pela obliteração da artéria alveolar inferior e dos seus ramos. A revascularização da artéria facial foi prejudicada por alterações dos vasos e do periósteo, devido à RT.

GLANZMANN & GRATZ (1990) analisaram a incidência de ORN mandibular em pacientes com câncer da cavidade oral, orofaringe e epifaringe. As doses foram fracionadas entre 2,0 e 1,2 *Grays (Gy)*, cinco a dez sessões por semana, e dose total entre 60 e 78,2Gy. observou-se maior incidência de ORN com doses totais superiores a 65Gy com o fracionamento padrão e nos três primeiros anos após a RT. Os autores relataram a existência de dependência entre as doses maiores por fração e maior incidência de ORN. Porém, outros fatores de risco deveriam ser considerados, como a proximidade do osso com o tumor, estado dental antes da RT e o volume mandibular irradiado.

FUJITA *et al.* (1996) avaliaram o registro clínico de 148 pacientes diagnosticados com carcinomas de língua, com estadiamento T1 e T2, no período de 1978 a 1989. Quando aplicada somente a braquiterapia intersticial, com agulhas de cobalto, rádio ou grampos de irídio a dose era de 65 a 70Gy no plano de cinco milímetros (mm) de distância do centro do plano das fontes de radioatividade. Quando associada com radiação externa de 30Gy, a dose da braquiterapia intersticial foi entre 50 a 60Gy. A incidência de complicações ósseas foi significativamente maior nos casos com associação das terapias ($p<0,01$) e nos tumores T2 ($p<0,04$). Foi observado que doses acima de 90Gy determinaram um maior número de

alterações no osso ($p < 0,01$) assim como com taxas iguais ou maiores que $0,55\text{Gy/h}$ ($p = 0,03$). Os resultados sugerem que combinações de dose e taxa de dose constituem um limite para a incidência de complicações ósseas.

PERNOT *et al.* (1997) desenvolveram estudo com 1134 pacientes com tumores na cavidade oral (772 casos) e orofaringe (361 casos). Os pacientes foram estadiados em T1 (29,5%), T2 (42%), T3 (26%), T4-Tx (2,5%) e N0 (74,5%). A radiação externa com telecobalto consistiu em doses de 50Gy durante cinco semanas, com frações diárias de 2Gy com cinco frações por semana. A braquiterapia foi realizada com baixas doses de irídio como única terapia nos casos de tumores primários. A associação de braquiterapia e radiação externa foram utilizadas em 770 pacientes. O total de 330 pacientes apresentou complicações nos tecidos moles e ósseo, sendo classificadas em grau 1 com pequenas ulcerações (20% dos pacientes), grau 2 com ulcerações persistentes e recorrentes (9%), grau 3 apresentava lesões graves com envolvimento ósseo e necessidade de cirurgia ou hospitalização (4%) e grau 4 relacionadas ao óbito dos pacientes (0,2%). As análises compreenderam fatores de risco relacionados aos tumores e aos tratamentos empregados. No que se refere a complicações ósseas foi observado que dose ($>80\text{Gy}$), taxa de dose ($>0,7\text{Gy/h}$), o volume de tecido irradiado e a presença de protetores de mandíbula eram fatores que deveriam ser considerados no planejamento terapêutico. Os autores ressaltaram que em casos de tumores maiores nem sempre era possível ponderar sobre esses aspectos.

CURI & DIB (1997) revisaram, retrospectivamente, 104 pacientes que desenvolveram ORN na mandíbula. Foram avaliados fatores de risco

predisponentes, tratamentos estabelecidos e resultados obtidos das intervenções na ORN. A pesquisa incluiu os registros durante o período de 1972 a 1992, com história de ORN, com ao menos três meses de duração. Foram considerados fatores de risco de ORN a localização anatômica do tumor, a cirurgia, o protocolo de irradiação (dose, taxa de dose e tipo de irradiação), tempo entre a radiação e o aparecimento da ORN, trauma dental após RT e estado da saúde dental. A radiação externa (90,4% dos pacientes) foi realizada em 89,3%, com acelerador linear (4 megaelétron-volt - MeV), abreviaturas 10,6% com cobalto 60 e dose total variando de 3.000 a 7.400 *Centigrays* (cGy). Na braquiterapia foram utilizados implantes de fios de céσιο e irídio com dose total entre 1.000 a 4.000cGy. Como resultado, de 104 pacientes 93 (89,4%) apresentaram alterações da mucosa, e 11 indivíduos (10,6%) tiveram rompimento espontâneo da mucosa oral. Ocorreram dois picos com maior incidência de ORN: aos 12 meses e entre 24 e 60 meses após a RT. A reparação completa da ORN ocorreu em 44 casos (42,3%), em 27 pacientes ocorreu entre os primeiros 24 meses. Um padrão agudo progressivo de ORN foi observado em 26 casos (25,1%) que, em dez indivíduos, evoluíram para fraturas patológicas. O processo estável e crônico de ORN foi detectado em 34 pacientes (32,6%). A ORN foi muito mais frequente na mandíbula (95,2%), e os autores relacionaram esse fato ao baixo suprimento sanguíneo e à qualidade do osso compacto da mandíbula, em concordância com a literatura disponível. Observou-se, ainda, que a localização do tumor predispôs a maior incidência de ORN, e foi associada à agressividade da técnica cirúrgica empregada. Grandes ressecções, ou em alguns pontos específicos, comprometem a vascularização, aumentando o risco de ORN. Quanto ao

estadiamento tumoral, os tumores menos invasivos e sem metástase local e a distância, apresentaram menor incidência de ORN. Verificaram que com doses inferiores a 5.000cGy houve diminuição da incidência de ORN. O tratamento conservador, que incluiu irrigações com antibióticos e antissépticos, curetagem, analgésico e anti-inflamatório, e câmara hiperbárica, obteve altas taxas de cura. Concluíram que o entendimento da importância dos fatores de risco poderia contribuir com a prevenção da ORN.

THORN *et al.* (2000) delinearam um estudo clínico para avaliar a relação entre a extensão da ORN e o campo de irradiação. Foram inclusos 80 pacientes com ORN que não obtiveram boa evolução após tratamento conservador ou curetagem cirúrgica. Inicialmente, foram feitas radiografias e mapas das regiões afetadas e dos campos de irradiação. O tratamento foi realizado com câmara hiperbárica e cirurgia. O regime de radiação consistiu em radiação externa por meio de acelerador linear (4MeV) com 2Gy em 73 casos, um caso foi associado com braquiterapia e seis casos receberam 2.2Gy, quatro vezes por semana e com a dose total superior a 60Gy. Todos os casos de ORN, à exceção de um, foram localizados dentro do campo de irradiação. Na mandíbula, as mais afetadas foram a cortical bucal da região de pré-molar, molar e retro molar.

JERECZEK-FOSSA & ORECCHIA (2002) realizaram revisão de literatura sobre os efeitos da RT na mandíbula. Os relatos da literatura estabeleciam que a mandíbula era o osso mais afetado pela RT, sendo a ORN sua maior complicação. Os autores encontraram grande variação (de 0,4% a 56%) na incidência de ORN na literatura. Tipicamente, a ORN ocorria nos primeiros

três anos após a RT, porém, esses pacientes encontravam-se sob risco indefinidamente. Inúmeros fatores foram associados ao risco de desenvolver a ORN, dentre os quais, alguns relacionados com o protocolo de RT como a dose total, dose biológica efetiva, a energia do fóton, a taxa de dose da braquiterapia, a associação com irradiação externa e braquiterapia intersticial, o tamanho do campo de irradiação, o tamanho da fração e o volume da mandíbula irradiado com altas doses. Existiam, também, os fatores relacionados aos tumores, sendo mencionado na literatura que tumores com maior tamanho, com maior proximidade do osso e localizados em tonsila, e região retromolar aumentavam o risco de ORN. Entre os riscos inferidos aos pacientes, os autores referiram a correlação entre a presença de dente e o estado de saúde da dentição, o tempo entre a RT e as extrações dentais, a higiene oral e o uso de álcool e tabaco. O tratamento das lesões ósseas incluía medidas conservadoras como irrigação com solução salina, antissépticos, antibióticos, remoção de sequestros e osso perdido delicadamente, assim como o emprego da câmara hiperbárica. A cirurgia era reservada para os casos de ORN persistente. Os autores concluíram que, com a introdução de medidas preventivas de higiene oral e avaliação dental antes e depois da RT, com o aperfeiçoamento das técnicas de irradiação e diagnóstico e tratamentos mais confiáveis, obteve-se a diminuição da incidência de ORN.

REUTHER *et al.* (2003) realizaram estudo retrospectivo (1969-1999) para determinar a incidência de ORN e os fatores etiológicos envolvidos em 830 pacientes acometidos de câncer de cabeça e pescoço. Nos dados coletados observou-se que 8,2% dos pacientes apresentaram ORN, com o triplo de incidência no gênero masculino (9,6% contra 3,4% no gênero

feminino). O corpo da mandíbula foi o local com maior ocorrência. Quanto aos fatores de risco, os tumores em estágio avançado tiveram maiores taxas de acometimento; as ressecções de segmento de mandíbula causaram maior incidência devido ao envolvimento desse procedimento com a vascularização; e a extração dos dentes, antes e depois da RT, correspondeu a 50% dos casos de ORN. Os pacientes que receberam RT pré-cirúrgica tiveram o aparecimento precoce das lesões ($p=0,002$), em relação aos que receberam no pós-cirúrgico. Apenas 40% dos pacientes diagnosticados com ORN alcançaram a cura com cirurgia e uso de antibióticos. Concluiu-se que a ORN era uma doença de etiologia multifatorial e que necessitava de acompanhamento durante sua evolução.

STUDER, GRÄTZ, GLANZMANN (2004) estudaram, retrospectivamente, os registros de 268 pacientes com câncer de cabeça e pescoço, entre 1980 e 1998, com dose mínima de 60Gy e compararam com a técnica de planejamento tridimensional com hiperfracionamento ou irradiação moderadamente acelerada, realizada no período entre 1990 e 1998, para avaliar a incidência de ORN de mandíbula. Quando empregado o fracionamento convencional e doses de 60 a 66,6Gy, a ORN com indicação de ressecção mandibular ocorreu em 6,2% dos casos; quando empregadas doses entre 66.7 e 72Gy, a incidência aumentou para 20,1%. Com a irradiação hiperfracionada com doses entre 72 e 78.8Gy a incidência foi de 6,6%. Após o reforço concomitante, com o regime preconizado pelo *MDA/Houston (University of Texas MD Anderson Cancer Center)* e dose entre 63.9 e 70.5Gy, não houve casos de ORN. No protocolo de 6x2Gy/semana ou 7x1.8Gy /semana com dose total entre 66 e 72Gy, aproximadamente 17% dos pacientes apresentaram ORN. Houve redução

em torno de 5% quando empregada a técnica de hiperfracionamento ou irradiação moderadamente acelerada.

DELANIAN & LEFAIX (2004) propuseram o conceito de que altas doses de RT resultavam em sequelas locais que poderiam perdurar por muitos anos, devido ao processo de fibroatrofia induzido pela radiação. Essa teoria relacionava-se com as reações das células endoteliais frente à RT e, histopatologicamente, três fases poderiam ser distinguidas três fases na fibroatrofia: inicial pré-fibrótica; constitutiva organizada e de densificação e remodelação da matriz. Essas fases, por sua vez, relacionavam-se com a associação de radicais livres e fibroblastos, parcialmente mediadas pelo *TGF β 1* (*transforming growth factor β 1*). Os efeitos foram atribuídos à presença de um contínuo ataque de radicais livres e à alteração da proliferação e metabolismo dos fibroblastos que alteraram o estroma fibroblástico. No processo de fibroatrofia, todas as células e componentes extracelulares foram afetados pela radiação. A fibrose relacionava-se com a lenta reparação e a não compartimentalização estrutural dos tecidos conectivos em derme, tecido subcutâneo.

PARLIAMENT *et al.* (2005) descreveram, qualitativa e quantitativamente, a distribuição da irradiação por radioterapia com intensidade modulada (*IMRT* do inglês *Intensity Modulation Radiation Therapy*) e RT convencional na mandíbula de pacientes acometidos por câncer da cavidade oral, nasofaringe e orofaringe. Observaram que a dose média detectada na mandíbula foi maior nos casos de câncer oral. Também foram encontrados pequenos volumes de osso denominados *hot spots* que receberam a dose máxima relativa, semelhante com os resultados da

braquiterapia, o que poderia ser considerado um local de alto risco de ORN. Com *IMRT*, a cortical lingual da mandíbula recebeu dose superior em relação à cortical bucal. Esses achados foram importantes no planejamento de reabilitação, para evitar a colocação de implantes osteointegrados nos locais de risco.

STUDER *et al.* (2006), em estudo descritivo, avaliaram o uso de *IMRT* em relação à tolerância do tecido ósseo. Participaram desse experimento 123 pacientes, sendo que 73 foram tratados com *IMRT* com doses consideradas de risco para o desenvolvimento de ORN (>60Gy para orofaringe e cavidade oral). Vinte e um pacientes foram tratados com RT pós-cirúrgica, enquanto que em 52 casos a RT foi a opção primária e definitiva. Em 56 indivíduos, foi administrada QT concomitantemente. O seguimento, em média de 22 meses (12-46 meses), revelou que menor volume de osso mandibular foi exposto a altas doses de irradiação, com o uso de *IMRT*, cujo achado os autores interpretaram como a redução da incidência de ORN, permitindo, assim, melhora da osseointegração de implantes dentais nesses pacientes.

FISCHER & EPSTEIN (2008) em revisão de literatura, descreveram os efeitos colaterais da cirurgia, QT e RT dos pacientes submetidos ao tratamento do câncer de cabeça e pescoço. A RT e a QT podem causar efeitos diretos na mucosa oral como, também, efeitos indiretos provenientes da toxicidade regional e sistêmica. Em pacientes imunossuprimidos, essa toxicidade pode ser exacerbada pela colonização da microflora oral. Esses efeitos podem ter sua resolução em pouco tempo, porém, a RT em particular, induz a danos teciduais que podem durar por

toda vida. Essas complicações resultam da mudança do suprimento sanguíneo, fibrose do tecido conectivo, neuropatias, atrofia da mucosa e alterações da celularidade. Devido aos efeitos colaterais do tratamento do câncer, esses pacientes passam por dificuldades e frustrações que levam a um isolamento social e à depressão. Os autores ressaltaram a necessidade de monitoramento constante, como forma de controle e motivação de adaptação.

KELISHADI, ST-HILAIRE, RODRIGUEZ (2009) avaliaram o custo do tratamento de ORN em estágio avançado da região crânio facial. Foram analisados os custos de 15 pacientes provenientes do *Johns Hopkins Hospital* ou do *R Adams Cowley Shock Trauma Center*, no período de 2002 a 2008, que realizaram tratamento conservador que incluía procedimentos como debridamento cirúrgico, câmara hiperbárica e diárias de hospital que totalizavam, aproximadamente, US\$25.000. O tratamento mais agressivo, que consistia em ressecção simultânea a reconstrução com retalho microvascular e hospitalização de sete dias, tinha o valor médio de US\$30.000. Na prática, a maioria dos pacientes recebia as duas formas de tratamento, acumulando um custo, por paciente, de US\$55.000. O tratamento tradicional conservador tinha indicação na terapia da ORN; porém, os autores colocaram que, dependendo da severidade da ORN, a remoção cirúrgica seguida de reconstrução teria a melhor relação custo-benefício para o paciente.

OH *et al.* (2009) reavaliaram os registros de 114 pacientes tratados de ORN mandibular durante 16 anos (1989 a 2004). Observaram que os pacientes com tumores em estágio precoce que realizaram as extrações

dentais e avaliação da saúde bucal, antes da irradiação obtiveram resposta positiva para o tratamento conservador, na maioria dos casos. A presença de tumores primários com estadiamento mais avançado, apresentando hábitos de tabagismo e ingestão de álcool após a RT, irradiação superior a 6.000*rads*, fístula orocutânea, fraturas patológicas, trismo e baixa resposta ao tratamento conservador, foram condições que indicaram forte conduta de ressecção mandibular.

MADRID, ABARCA, BOUFERRACHE (2010) sugeriram que, devido à compreensão da fisiopatologia na ORN, foram propostas novas abordagens terapêuticas: para ORN leve e moderada, com uso de novos agentes como o ultrassom, moléculas biológicas (proteínas morfogenéticas, distração osteogênica, agentes antioxidantes como a pentoxifilina e vitamina E); para a prevenção de ORN, permaneceu a recomendação de extração dos dentes comprometidos por cárie e doença periodontal severa antes da RT; para os casos mais avançados, a cirurgia com retalho livre foi relatado como tratamento de escolha.

3.2 ESTUDOS EM ANIMAIS DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO IONIZANTE NO TECIDO ÓSSEO

AITASALO & ARO (1986) avaliaram, histomorfometricamente, as alterações da RI em tíbia de coelhos (*New Zealand*, machos, peso 2,9-3,6kg, n=33). Em avaliação qualitativa visualmente estimada, observaram alterações mesmo com dose de 5Gy, e, após um dia da irradiação, verificaram hemorragia, eosinofilia e leve edema. A hemorragia medular foi mais intensa com doses de 20 e 30Gy. O tecido apresentava fibrose na quinta semana, tornando-se mais pronunciada após 11 semanas. A partir de 10Gy houve estreitamento ou oclusão dos vasos, sendo que com 20Gy as alterações foram muito mais evidentes e persistentes. As mudanças eram mais extensivas com o aumento da dose de irradiação. Na cortical óssea observou-se aumento de lacunas, refletindo os danos causados nos osteoblastos e osteoclastos, assim como no equilíbrio existente entre essas células. Na medula, a dose de 20Gy mostrou intensos efeitos vasculares com endoarterite obliterativa e lesões trombóticas.

AITASALO (1986) estudou as alterações enzimáticas na reparação do perióstio de mandíbulas, com diferentes doses de irradiação, em 40 ratos (*Wistar* com peso entre 225 e 346g). A irradiação foi realizada após 15 minutos da cirurgia com dose única de 20Gy. As avaliações histoquímicas foram realizadas nos períodos de 1, 2, 3, 8, 10, 12, 14 e 24 horas após a irradiação. Houve aumento das concentrações teciduais da fosfatase ácida, da *citocrome oxidase*, *lactate dehidrogenase*, *isocitrate dehidrogenase*, *glucose 6 phosphate dehidrogenase* e *succinate dehidrogenase* nas mandíbulas irradiadas em todos os períodos. O aumento de enzimas oxidativas e hidrolíticas nas fases iniciais foi considerado possível indicador do dano causado pela RI.

JACOBSSON, NANNMARK, TURESSON (1987) investigaram os efeitos agudos na microvascularização em tíbias de coelhos, por meio de microscopia vital. Após a irradiação com cobalto 60 (Co60) em dose única de 25Gy, a aderência dos leucócitos e subsequente migração para o espaço intersticial foram avaliadas por um período de quatro horas. Observou-se que, duas horas após a radiação, ocorreu aderência dos leucócitos no endotélio dos capilares e vênulas, indicando o estabelecimento de processo inflamatório agudo.

LORENTE, SONG, DONOFF *et al.* (1992) desenvolveram modelo de estudo, em mandíbula de ratos (*Sprague-Dawley*) irradiada ou não irradiada, no qual foram confeccionados defeitos (perfurações) com quatro mm de diâmetro. Essas perfurações foram preenchidas com partículas de osso desmineralizado provenientes de ossos longos irradiados ou não. A cirurgia foi realizada após duas ou quatro semanas da irradiação e as avaliações da porcentagem de preenchimento do defeito ocorreram quatro semanas após a cirurgia. Os melhores resultados foram em mandíbula não irradiada com partículas não irradiadas, seguido de mandíbulas irradiadas com partículas não irradiadas e, por fim, mandíbulas não irradiadas com partículas irradiadas. Os enxertos efetuados duas semanas após a irradiação apresentaram melhor reparação em comparação com os enxertos de quatro semanas. Esses resultados sugeriram que, no período de duas semanas após a irradiação, o leito não representou fator limitante.

OHRNELL *et al.* (1997) relataram os efeitos tardios em tíbias de ratos com diferentes doses de irradiação. Vinte e seis ratos (*Sprague-Dawley* com peso 325-400g) foram submetidos à RI com doses únicas de 10, 20, 30

e 35Gy, com equipamento de Co60. Após 12 semanas, foram instalados implantes de titânio que permaneceram sem carga por oito semanas. Na avaliação histológica evidenciou-se que as reações foram dose dependente, com efeitos mais pronunciados nas doses mais altas. Com doses de 30 e 35Gy a cortical óssea apresentou menor espessura com reabsorção periosteal e endosteal. Nessas doses mais altas, também, foi observado menor quantidade de osso neoformado e presença mais abundante de tecido fibroso ao redor dos implantes. A espessura do osso diminuiu significativamente com doses de 30 e 35Gy. As capacidades mecânicas da osseointegração dos implantes fixados no osso foram reduzidas de forma dose dependentes, cujo resultado foi relacionado com os achados histomorfométricos.

KIYOHARA, SAKURAI, KASHIMA (2003) realizaram análise de imagens binarizadas de radiografias, para a detecção das alterações ósseas iniciais induzidas por RI. Foi utilizada a porção distal do fêmur direito de 35 ratos (*Wistar*, peso de aproximadamente 340g), sendo dez animais para estudo radiográfico e 25 para análise histomorfométrica nos períodos de 0, 1, 2, 3 e 4 semanas após a RI. A unidade geradora de RI foi realizada com unidade geradora de Raios-X e com dose única de 30Gy. Na avaliação histológica, após uma semana foram observados poucos efeitos relacionados à irradiação, com pequeno aumento de células gordurosas e inflamatórias entre as trabéculas ósseas; no período de duas semanas houve aumento dessas células. Na terceira semana, foi notada diminuição das trabéculas ósseas e das células que compõem a medula celular, além do decréscimo da espessura do osso. Esses efeitos foram muito mais pronunciados na quarta semana, com menor quantidade de osso trabecular.

As imagens radiográficas binarizadas revelaram que, após quatro semanas de irradiação, a maior parte da estrutura óssea interna havia desaparecido. Concluiu-se que esse método de avaliação não invasivo facilitou a visualização do osso medular e permitiu o diagnóstico bastante precoce das alterações que, em muitos casos, não eram percebidas nas radiografias convencionais.

3.3 ESTUDO EM ANIMAIS DOS EFEITOS DO *LASER* DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE O TECIDO ÓSSEO

TRELLES & MAYAYO (1987) demonstraram, em estudo realizado em 60 ratos (C57BL, ambos os gêneros, oito semanas de idade, 30g de peso), que o *LLLT* (He-Ne, 632nm, 4mW, 2,4J, 10min, a 20cm de distância da lesão, aplicação transcutânea, 12 aplicações em dias alternados) possuía a propriedade de modular a função dos osteócitos, promover a aceleração do metabolismo e formação do calo ósseo. Observaram por meio de análise histológica, que as fraturas das tíbias de ratos, quando irradiadas com *LLLT*, apresentavam aumento de significância estatística ($p < 0.05$, teste t de Student). em relação ao controle, na espessura do perióstio e valor médio de trabéculas neoformadas. Observaram, também, que no grupo irradiado havia predominância de tecido fibroconectivo, com abundante atividade osteoblástica e dos osteócitos no tecido osteóide, denotando maturação mais avançada. Os autores mencionaram a propriedade do *LASER* que poderia não atuar diretamente sobre a reparação *per se*, mas que poderia criar uma série de condições ambientais, acelerando a reparação da fratura óssea.

TAKEDA (1988) registraram a atuação do *LLLT* no alvéolo, logo após a extração de dentes em ratos (*Wistar*, n=24 animais, oito semanas de idade). Foi utilizado equipamento de *LASER* semiconductor (AsGa, 904nm, densidade de energia de 25mW/cm², 20J/cm², durante cinco min) com aplicações diárias e iniciadas no ato cirúrgico e, posteriormente, as feridas foram irradiadas. Os sacrifícios foram realizados nos momentos 0, 2, 4 e 7 dias, após as extrações. Na avaliação histopatológica semiquantitativa, observaram que no dia zero não havia diferença em relação ao controle, no dia dois havia maior proliferação fibroblástica no grupo com *LASER* quando comparado ao controle. No dia quatro, o grupo irradiado apresentou formação de tecido osteóide trabecular ou matriz óssea com ou sem ossificação em estado mais avançado que o grupo controle, em que ainda verificava-se tecido de granulação. No dia sete, no grupo experimental, o osso trabecular neoformado era mais espesso e abundante quando comparado ao controle. Concluíram que o *LASER* obteve efeito benéfico na fase inicial da reparação alveolar.

BARUSHKA, YAAKOBI, ORON (1995), em experimento em tíbias de 292 ratos (*Sprague Dawley*, de 300 a 350g de peso), observaram por meio de análise bioquímica e histomorfométrica que, em defeitos ósseos produzidos com diâmetro de 1,6mm, o *LLLT* (He-Ne *LASER*, 632nm, 6,0mW, 1,9mm de diâmetro da ponteira, por 2,3min, dose de 31J/cm², nos 5° e 6° dias após a cirurgia, diretamente no defeito ósseo) promoveu a reparação óssea mais rápida do que observada no grupo controle. Os autores observaram que a irradiação com *LASER* de He-Ne com parâmetros apropriados (tempo, energia e frequência), realizada após o trauma, afetaram a população de osteoblastos e osteoclastos, quando comparado ao

grupo controle. Esse efeito foi demonstrado pelo aumento da atividade da fosfatase alcalina (ALP do inglês *Alkaline Phosphatase*) ($p < 0,01$ no décimo dia), considerada um bom marcador da atuação osteoblástica, e pela diminuição da atividade da fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP do inglês *Tartrate-Resistant Acid Phosphatase*), ($p < 0,05$ nos 11° e 12° após a cirurgia), indicadora da atividade osteoclástica.

YAAKOBI, MALTZ, ORON (1996) em estudo com 292 ratos (*Sprague Dawley*, de 300 a 350g de peso), em defeitos ósseos em tíbias produzidos com diâmetro de 1,6mm, o *LLLT* (He-Le, 632nm, 6,0mW, 1,9mm de diâmetro da ponteira, por 2,3 min, dose de 31J/cm², nos 5° e 6° dias após a cirurgia, diretamente no defeito ósseo) demonstraram a relação entre a atividade enzimática da ALP e da TRAP, dentro da evolução do processo osteogênico. Mencionaram, ainda, que o acúmulo de cálcio no grupo irradiado nos 11°, 13° e 15° dias após a cirurgia, eram significativamente maiores ($p < 0,05$) em comparação ao controle. A taxa de calcificação, observada pela incorporação de cálcio radioativo, também mostrou efeitos significativos maiores ($p < 0,05$) no grupo irradiado. Concluíram que o *LLLT* proporcionou melhor reparação da cortical óssea dos defeitos produzidos em modelo experimental.

LUGER *et al.* (1998) utilizaram métodos biomecânicos para investigar os efeitos do *LLLT* (HeNe, 632,8nm, 35mW, distância focal de 20cm, 30 min) na reparação de tíbias de 50 ratos *Wistar* (quatro meses de idade, 400±20g). O *LASER* foi aplicado por 14 dias consecutivos, sendo a primeira irradiação realizada após a cirurgia, sobre a pele, na região da fratura (dez min), um pouco acima da fratura (dez min) e na porção abaixo

da fratura (dez min) em 25 animais. Os animais do grupo controle foram submetidos aos mesmos procedimentos de anestesia e cirurgia; porém, sem a irradiação. As tíbias foram removidas após quatro semanas. Os animais que não apresentavam reparação da fratura dentro dos padrões foram excluídos do experimento. Na análise do calo ósseo observaram que a resistência com carga máxima da tíbia foi significativamente maior no grupo irradiado ($p=0,0140$); houve, também, aumento da resistência à deformação elástica da tíbia ($p=0,0023$). Concluiu-se que o calo ósseo, no grupo não irradiado, tendeu a ser mais volumoso, porém, mais fraco devido a sua natureza fibrocartilaginosa. No osso irradiado a reparação apresentou-se em estágio mais avançado, sinalizando a união da fratura e reabsorção do calo ósseo.

SILVA JÚNIOR *et al.* (2002) realizaram estudo em defeitos cirúrgicos no fêmur de ratos (*Wistar*, $n=40$, ambos os gêneros, peso de 250g) para avaliar o efeito do *LASER* diodo (830nm, 40mW, 4,8J/cm², diâmetro de, aproximadamente, um mm, corrente contínua, aplicação transcutânea, por contato, três vezes por semana) na biomodulação da cicatrização óssea. O defeito cirúrgico media, aproximadamente, um cm². Os animais foram randomizados em quatro grupos: grupo A, irradiado em dias alternados por 12 sessões e submetido à eutanásia no 28^o dia; grupo C, irradiado por três sessões e submetido à eutanásia no sétimo dia; os grupos B e D atuaram como respectivos controle sem irradiação. A primeira irradiação ocorreu 48h após a cirurgia. Na avaliação histomorfométrica computadorizada, o grupo irradiado por três sessões e avaliado aos sete dias apresentou significativo aumento da neoformação óssea, quando comparado ao grupo controle. No grupo irradiado por 12 sessões com avaliação aos 28 dias, não

foram observadas diferenças de significância estatística em relação ao seu controle. Segundo os autores, o grupo irradiado com *LASER* de baixa intensidade apresentou melhores resultados na fase inflamatória da reparação óssea quando comparado ao grupo controle.

NICOLA *et al.* (2003) avaliaram a atividade celular em fêmur de ratos (*Wistar*, n=48, 24 animais no grupo controle e 24 no grupo irradiado, machos, com peso entre 250-300g) após o uso do *LASER* de Arsenieto de Gálio e Alumínio (AsGaAl) (660nm, 0,005W, 10J/cm², 0,8J, 0,0625W/cm² área do spot de 0,08cm², em um ponto, sobre a pele). As irradiações foram realizadas aos 2, 4, 6 e 8 dias em 24 animais após a cirurgia. O defeito cirúrgico foi confeccionado com um mm de diâmetro e dois mm de profundidade na porção de epífise. Após a cirurgia e 24h antes da eutanásia foi administrado *Terramycin* (Pfizer) intramuscular (20mg/kg), como marcador da taxa de aposição mineral. As eutanásias ocorreram 5, 15 e 25 dias após a cirurgia. A histomorfometria revelou aumento da atividade celular, produzindo fenômenos de neoformação e reabsorção. O grupo irradiado apresentou aumento do volume ósseo, da atividade osteoblástica e aumento da aposição mineral aos 15 dias ($p=0,0008$) e aos 25 dias ($p=0,0061$). Foi observado, também no grupo irradiado, aumento da superfície dos osteoclastos aos 5 e 25 dias ($p=0,049$ e $p=0,0028$, respectivamente) e de superfícies erodidas 25 dias após a realização dos defeitos ósseos ($p=0,0032$). Esse incremento da atividade osteoclástica não alterou a arquitetura óssea, bem como a estrutura do tecido manteve os índices normais no último dia de avaliação.

GARAVELLO-FREITAS *et al.* (2003) avaliaram a reparação óssea em perfurações monocorticais de 1,6 mm de diâmetro em tíbias de ratos (*Wistar*, n=36, machos, 250-280g, idade de 75 dias), utilizaram um *LASER* (He-Ne, 1mW, 633nm, e depósito de energia de 0,03J, 0,3J e 0,9J, respectivamente, por 0,5, 5 e 15min, sobre a pele). As irradiações iniciaram 24h após a cirurgia e eram realizadas diariamente por 7 ou 14 dias. Havia grupos controles de animais não irradiados de 7 e 14 dias. A análise histológica em colorações de tricrômio de Masson, hematoxilina - *Picrosírius* e *Picrosirius* pelo método polarizado. Nos grupos irradiados com *LASER* observou-se aumento da atividade de osteoblastos e dos osteócitos, aumento da celularidade dentro da medula óssea intratrabecular e aumento da proliferação de vasos sanguíneos, permitindo maior fluxo de células inflamatórias. A avaliação histomorfométrica revelou maior formação de trabéculas ósseas nos ratos irradiados por sete dias com doses de 0,3J e 0,9J quando comparado ao grupo controle. Por outro lado, doses diárias de 0,9J por 14 dias resultaram em diminuição do trabeculado neoformado quando comparado ao grupo controle. Concluiu-se que o *LASER* apresentou efeito biomodulador e que, a partir de uma ação estimulatória na primeira semana, desencadeou efeito inibitório na segunda semana de irradiação.

GARAVELLO, BARANAUSKAS, DA CRUZ-HÖFLING (2004) estudaram a influência do *LLLT* na neoformação de vasos no processo de reparação da medula óssea. O experimento incluiu 24 tíbias de ratos (*Wistar*, adultos jovens, 250-280g; idade de 75 dias) que foram submetidos à cirurgia para confecção de uma perfuração monocortical na porção de diáfise. Foi utilizado *LASER* de He-Ne (1mW, 633nm, diâmetro de 1mm, transcutânea)

sendo a primeira aplicação realizada 24h após a cirurgia e as demais, diariamente por 7 ou 14 dias com densidade de energia de 31,5 ou 94,5J/cm². No exame das secções histológicas por microscopia óptica foi possível visualizar uma rápida deposição de matrix óssea e características histológicas, compatíveis com o processo de reparação no grupo *LASER*. O número de vasos aumentou após sete dias de irradiação com 94,5J/cm²; porém, diminuiu significativamente quando irradiado por 14 dias, independente da dose. No grupo controle não foi observado aumento do número de vasos no período de 8 e 15 dias. Esse efeito estimulatório/inibitório foi dose dependente.

PRETEL, LIZARELLI, RAMALHO (2007) em experimento controlado, avaliaram a reparação de defeitos realizados na mandíbula de ratos (*Holtzman*, machos, 300g, n=30 animais sendo 15 no grupo controle). Foi utilizado um *LASER* diodo de AsGaAl (780nm, 35mW, 40s, diâmetro =1,0mm, 178J/cm², 1,4J, modo contínuo) em aplicação única, diretamente sobre o defeito. As avaliações ocorreram nos dias 15, 45 e 60, sendo as amostras processadas e coradas com hematoxilina e eosina, tricrômio de Masson e *picrossirius*. Os resultados histológicos mostraram formação óssea nos dois grupos; porém, no grupo *LASER* houve abreviação do período inflamatório e a promoção de formação mais rápida de nova matrix óssea nos períodos de 15 e 45 dias, quando comparado ao controle ($p<0,05$).

LIU *et al.* (2007) demonstraram os efeitos do *LLLT* (830nm, 40J/cm² distribuídos em quatro pontos de 10J/cm², 200mW/cm², 1,5mm de diâmetro, 50s, em modo contínuo) na reparação de fraturas de tíbias de coelhos. Os animais foram distribuídos em grupo controle e grupo com

LASER com irradiação transcutânea diária por quatro semanas. A osteotomia foi realizada com serra oscilatória e a fratura estabilizada com fixador externo. Após quatro semanas, os coelhos foram submetidos à eutanásia. Na avaliação radiográfica não houve diferença estatística. Na avaliação histológica com coloração de hematoxilina e eosina verificou-se ligeiro aumento do volume do osso irradiado, com menos fibrocartilagem e aumento da estrutura trabecular em relação ao controle. Na microtomografia computadorizada, foi observada diferença de significância estatística ($p=0,006$) na remodelação óssea. Os resultados sugeriram que o *LLLT* estimula a ossificação endosteal e periostal e o aumento do volume do calo ósseo após quatro semanas.

MATSUMOTO *et al.* (2009) analisaram a ação do *LLLT* sobre a ciclo-oxigenase-2 durante a reparação óssea. O experimento foi realizado em 48 ratos (*Wistar*, oito semanas, 250g, distribuídos em grupo irradiado e controle). Foi realizada perfuração com cinco mm de profundidade na metáfise da tíbia. O *LASER* de AsGaAl (732nm, diâmetro de 3mm, 16J/cm², 1min, corrente contínua, pontual, em um ponto, transcutâneo) foi aplicado, inicialmente, 24h após a cirurgia e, depois, a cada 48h por 15 dias ou até o momento da eutanásia. As análises histológicas e imunohistológicas foram realizadas nos períodos de 2, 7, 14 e 21 dias. Histologicamente, foi notada maturação mais rápida durante a fase inflamatória da reparação nos períodos de 7, 14 e 21 dias. A expressão da ciclo-oxigenase-2 aumentou no grupo irradiado depois de sete dias, tendo seu efeito mais pronunciado aos 14 dias ($p<0,05$). A ciclo-oxigenase-2 é a enzima responsável pela transformação do ácido aracônico em prostaglandinas e relaciona-se com a reparação tecidual em diferentes mecanismos celulares, como na

angiogênese, prevenção de apoptose maturação de osteoblastos e formação óssea. Os autores associaram a melhora do reparo ósseo ao aumento da expressão da ciclo-oxigenase-2.

FÁVARO-PÍPI *et al.* (2010) compararam os efeitos do ultrassom (1,5MHz, 1:4 *duty cycle*³, intensidade SATA 30mW/cm², 20min/sessão modo de aplicação estacionário) com o *LLLT* (AsGaAl, 830nm, modo contínuo, diâmetro do feixe de 0,028cm², 50W/cm², 50J/cm², 30mW tempo de 47 segundos e energia por ponto de 0,51J, em um ponto, contato da ponteira com o tecido). Os ratos (*Wistar*, n=90, peso de 300±20g) foram randomizados em três grupos com 30 ratos cada: grupo controle (defeito ósseo sem tratamento); grupo *LASER*; grupo ultrassom. A perfuração com 2,5mm de diâmetro foi realizada no terço superior das tíbias. Os tratamentos com *LASER* e ultrassom iniciaram-se 24h após a cirurgia, com sessões por três vezes por semana e intervalo de 48h. As amostras foram coletadas aos 7, 13 e 25 dias após a cirurgia. A análise histopatológica, realizada com microscopia óptica, avaliou qualitativamente a área total do defeito, e a morfometria mensurou a área de osso neoformado por meio de sistema de análise digital da imagem. Os autores relatam diferenças evidentes a partir do dia 13, quando o grupo com *LASER* apresentou trabéculas mais maduras, maior quantidade de deposição óssea e tecido conectivo mais vascularizado, quando comparado aos grupos controle e ultrassom. Não foi observada alteração do metabolismo ósseo com o uso do ultrassom, sendo sugerido que a energia aplicada no protocolo pode ter sido insuficiente para causar o estímulo.

³ Razão cíclica ou Ciclo de trabalho ⇔ Razão cíclica ou ciclo de trabalho. Utilizado para descrever a fração de tempo em que um sistema está em estado ativo.

FÁVARO-PÍPI *et al.* (2011) mediram a expressão de genes osteogênicos após a irradiação com *LLLT* no processo de reparação óssea em tíbias de ratos (*Wistar*, n=60, distribuídos em grupo controle e irradiados, peso 300 a 320g, idade de 12 a 13 semanas). Foi provocado um defeito cirúrgico não crítico de aproximadamente 2,5mm. A irradiação iniciou-se 24h pós-cirurgia e foram realizadas por 3, 6 e 12 sessões com intervalo de 48h com um diodo de AsGaAl (830nm, 30mW, área do spot de 0,028cm², 1071W/cm², 47s, 1,4J, 50J/cm², modo contínuo, pontual e aplicação em um ponto. Os animais foram submetidos à eutanásia aos 7, 13 e 25 dias, efetuando-se análise histológica e PCR quantitativo em tempo real (*RT-qPCR* do inglês *Real Time Polymerase Chain Reaction*). Na avaliação histológica, os autores observaram que o grupo irradiado apresentava trabéculas mais maduras, maior quantidade de deposição óssea e tecido conjuntivo mais vascularizado nos períodos de 13 e 25 dias. No grupo irradiado pelo *RT-qPCR* foram estudados os marcadores ALP relacionado com atividade osteoblástica, BMP4 (proteína morfogenética óssea do inglês *Bone morphogenetic protein 4*), responsável pelo recrutamento, maturação celular e aumento do osso neoformado, *Runx2* (do inglês *Runt-related transcription factor 2*), fator de transcrição essencial para diferenciação osteoblástica e osteogênese e, por fim, a osteocalcina responsável pela ligação do cálcio à matriz óssea. Foi notado aumento somente da expressão do gene da osteocalcina no período de sete dias ($p < 0,05$). No período de 13 dias houve consistente aumento da BMP4 ($p < 0,05$) do grupo com *LASER*. Aos 25 dias, verificou-se significativo aumento da expressão da ALP, BMP4 e *Runx2* ($p < 0,05$), superior ao do controle; contudo, não foi observada elevação da osteocalcina. Esses

resultados aos 13 e 25 dias, corresponderam à fase mais intensa de atividade celular, deposição de osso neoformado e mineralização. Concluiu-se que, sob o ponto de vista dos marcadores envolvidos nesse processo, ocorreu efeito estimulador do *LASER* na reparação óssea.

3.4 ESTUDOS EM ANIMAIS DOS EFEITOS DO LASER NO TECIDO ÓSSEO SUBMETIDO À RADIAÇÃO IONIZANTE

DA CUNHA *et al.* (2007) relataram o primeiro trabalho sobre o emprego do *LLLT* em osso submetido à RI. Foi analisado o fêmur de 22 ratos *Wistar* distribuídos em quatro grupos: grupo I, apenas RI; grupo II, *LASER* um dia antes da RI; grupo III, *LASER* logo após a RI; grupo IV, *LASER* quatro semanas após a RI. A RI foi realizada em dose única de 3000cGy. O *LLLT* foi aplicado em quatro pontos, com sete irradiações em intervalo de 48 horas ($\lambda=780\text{nm}$, densidade de energia de $100\text{J}/\text{cm}^2$, 40mW de potência, tempo de 100s, área do *spot* de $0,04\text{cm}^2$, em modo contínuo). Os animais foram submetidos à eutanásia seis semanas após a RI. Radiograficamente, observou-se quantidade significativamente maior de tecido ósseo. A histologia descritiva qualitativa mostrou a ocorrência de aumento da celularidade medular, e aumento de significância estatística da atividade osteoblástica. Por meio da análise digital da imagem, observou-se significativo aumento do número de osteócitos e dos canais de *Harvers* dos grupos II e IV. Concluiu-se que o *LASER* promoveu resposta positiva na biomodulação do tecido ósseo previamente irradiado, especialmente quando aplicado antes ou após quatro semanas da irradiação.

DESMONS *et al.* (2007) avaliaram a ação de um *LASER* de diodo de alta intensidade (810nm, 2W, três segundos, 48J/cm², diâmetro de 4mm) na revascularização do tecido ósseo irradiado com Raios-X (18.75Gy). Vinte coelhos foram distribuídos em quatro grupos (n=5): grupo I, controle; grupo II, irradiação com *LASER*; grupo III, irradiação com Raios-X; e grupo IV, pré-condicionamento com *LASER* 24h antes dos Raios-X. Foi instalada uma câmara óssea na calvária dos coelhos e, logo acima, foram implantados três parafusos de titânio com a função de fixar a câmara fotográfica. Os animais foram acompanhados por 12 semanas. Após a implantação da câmara, aguardou-se um período para que ocorresse a estabilização da densidade vascular. Após a estabilização, foi realizada a aplicação do *LASER* e dos Raios-X. As fotografias dos vasos sanguíneos dessa região foram obtidas semanalmente. Por meio de programas de computador especiais foram processadas a imagem e o cálculo da densidade vascular. A ação angiolítica dos vasos foi confirmada nos grupos III e IV. Nas fases iniciais (até a semana quatro) verificaram diminuição dos grandes vasos e da rede vascular fina no grupo III, enquanto que no grupo IV houve perda total somente da rede vascular fina. Na segunda fase, a partir da semana cinco, o grupo III apresentou limitado aumento da vascularização pela rede fina de capilares. No grupo IV, devido à presença dos vasos grandes, ocorreu neoformação da rede capilar fina, e o restabelecimento da arquitetura vascular, muito similar à inicial. Na avaliação histológica do tecido ósseo, o pré-condicionamento com *LASER* conservou as estruturas primárias clássicas após as 12 semanas.

MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1 DESENHO DA PESQUISA

Este estudo experimental, longitudinal, prospectivo, controlado, e de centro único foi realizado na Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Escola Paulista de Medicina (EPM).

Foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP-EPM, sob o Protocolo 0525/06 (APÊNDICE 1) e obteve financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), sob a forma de Auxílio à Pesquisa Regular - Protocolo 10/51626-9.

4.2 AMOSTRA

Foram utilizados 72 ratos da espécie *Rattus norvegicus albinus*, da linhagem *Wistar*, EPM-1, machos, saudáveis, adultos jovens com idade variando entre 90 e 105 dias e com peso variando entre 300 a 340g, procedentes e mantidos no biotério do Centro de Desenvolvimento de Modelo Experimental (CEDEME) da Universidade Federal do Estado de São Paulo - Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM), em gaiolas individuais de policarbonato autoclaváveis, medindo de 30x50cm, com maravalha tratada, recebendo alimentação e hidratação *ad libitum*.

O biotério apresentava controles de temperatura de 20 a 23 graus celsius (° C), de umidade relativa entre 45 e 55%, de ciclos de iluminação dia/noite de 12 horas e de nível de ruído de 55dB.

Os animais foram distribuídos, aleatoriamente, em quatro grupos:

- Grupo I ⇒ Cirurgia controle - *sham* (18 animais, 18 tíbias).
- Grupo II ⇒ Irradiado com *LASER* (18 animais, 18 tíbias).
- Grupo III ⇒ Irradiado com RI (18 animais, 18 tíbias).
- Grupo IV ⇒ Irradiado com RI e *LASER* (18 animais, 18 tíbias).

Foi realizado sorteio para determinar o grupo de cada animal, por meio de papéis numerados dentro de envelope escuro, e sorteado por uma pessoa não participante do experimento, com a numeração das gaiolas individualizadas dos animais. As tíbias direitas ou esquerdas receberam o mesmo procedimento de sorteio por papéis dentro de envelope escuro.

4.3 PROCEDIMENTOS

4.3.1 IRRADIAÇÃO COM A RADIAÇÃO IONIZANTE (RI)

O procedimento de radiação foi realizado no Setor de Radioterapia do Departamento de Oncologia Clínica e Experimental da UNIFESP-EPM.

Sob efeito anestésico, induzido e mantido por injeções intraperitoneais de anestésico Cloridrato de Ketamina 70mg/kg de peso corpóreo (Ceva Produtos Veterinários, São Paulo, Brasil), associado ao relaxante muscular Cloridrato de Xilazina 10mg/kg de peso corpóreo (Ceva Produtos Veterinários, São Paulo, Brasil), os animais dos Grupos III e IV foram dispostos paralelamente, sobre uma placa de acrílico perfurada e imobilizados por braçadeiras de náilon suavemente atadas, nas patas dianteiras e traseiras, conforme FIGURA 1A (GUMIEIRO *et al.*, 2010).

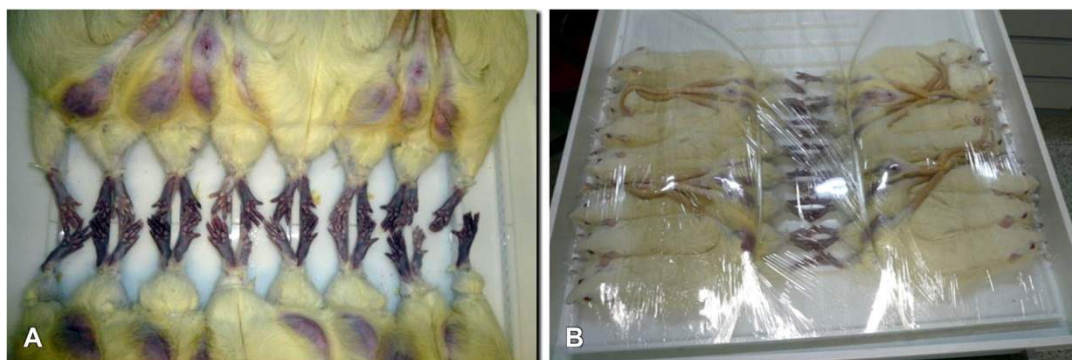


FIGURA 1. Animais preparados para o transporte até o Setor de Radioterapia do Departamento de Oncologia Clínica e Experimental da UNIFESP-EPM. (A) Animais imobilizados por braçadeiras. (B) Placa acrílica perfurada dentro da bandeja de madeira, com os animais posicionados.

A placa acrílica e os animais foram envoltos em filme plástico, com cautela, para permitir a sua respiração. A placa acrílica foi colocada dentro de uma bandeja de madeira com alças, para permitir o transporte até o Setor de Radioterapia do Departamento de Oncologia Clínica e Experimental da UNIFESP-EPM (FIGURA 1B).

Previamente à RI, a bandeja com os animais foi posicionada em equipamento de simulação (FIGURA 2) (*Varian Medical Systems, Inc., Palo Alto, California, USA*) para assegurar que todas as tíbias estivessem dentro do campo de irradiação de 26x16cm (FIGURA 3).



FIGURA 2. Bandeja com os animais posicionada no equipamento de simulação.

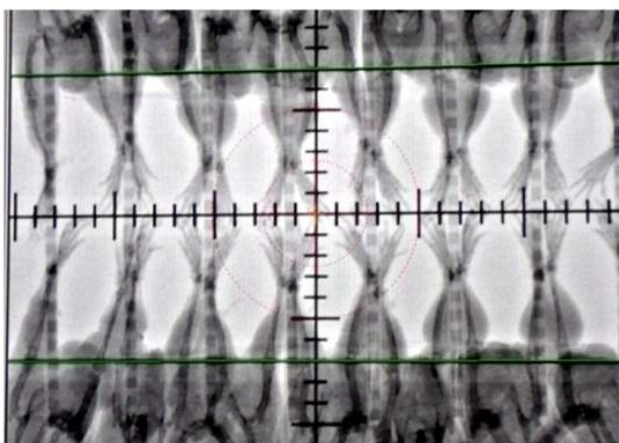


FIGURA 3. Imagem das tíbias dos animais durante a simulação.

A dose de RI foi de 30Gy, em única sessão durante, aproximadamente, 27 minutos (Unidade de Cobalto - 60, *Varian Medical Systems, Inc., Palo Alto, California, USA*) com taxa de dose de 110Gy/min e com distância focal de 80cm) (FIGURA 4).

O controle da dosimetria da RI foi realizado pelo Núcleo de Proteção Radiológica da UNIFESP-EPM.



FIGURA 4. Bandeja com os animais, posicionada para a radiação ionizante (RI) no aparelho de telecobaltoterapia.

4.3.2 TÉCNICA OPERATÓRIA

Com os animais anestesiados por injeções intraperitoneais de Cloridrato de Ketamina 70mg/kg, associadas ao cloridrato de Xilazina 10mg/kg de peso corpóreo, a operação foi realizada 28 dias após a RI nos animais dos grupos III e IV. Os animais dos grupos I e II também foram operados, conforme descrito a seguir.

A tricotomia da pata posterior foi realizada com tosquiadora elétrica e a antissepsia do campo operatório, efetuada com clorexidina a 2%.

Para assegurar a aplicação do *LASER* no mesmo local da perfuração na tíbia, foi confeccionado um guia plástico com orifício com diâmetro de, aproximadamente, quatro mm para permitir o contato entre a ponteira do *LASER* e a ferida cirúrgica. Este guia foi posicionado sobre a pele do animal antes da cirurgia, com a margem superior sobre a patela da tíbia e com o orifício coincidindo o local em que a perfuração foi realizada na tíbia. Com caneta de tinta de longa duração, foi desenhado o contorno deste dispositivo para a localização da perfuração (FIGURA 5).

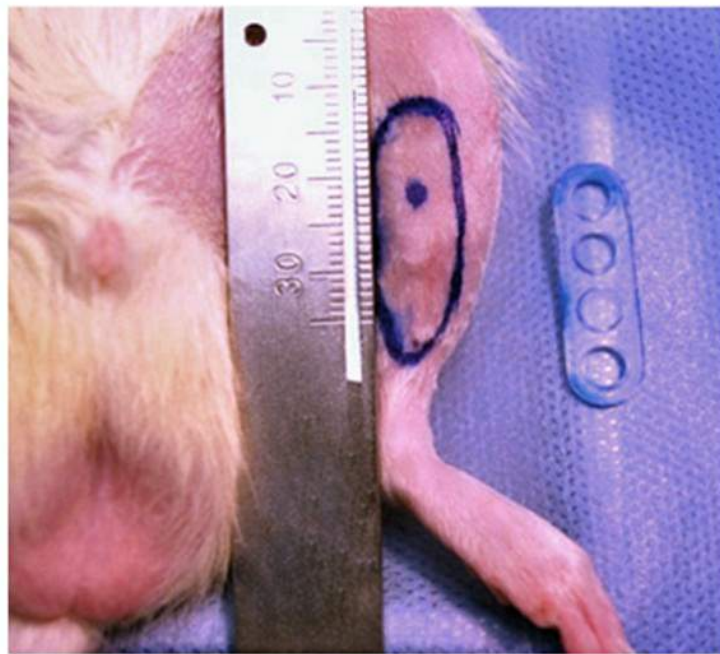


FIGURA 5. Demarcação do local da perfuração por meio de guia plástico.

A face medial das tíbias direita ou esquerda foi exposta por incisão de, aproximadamente, um cm de comprimento no sentido craniocaudal e dois mm abaixo da articulação do joelho.

O guia plástico foi novamente posicionado para conferir o local da perfuração no osso. A perfuração na porção de diáfise, circular, monocortical com 2,5mm de diâmetro foi realizada com broca diamantada esférica (*KG Sorensen*, Cotia, São Paulo, Brasil) acionada por motor elétrico (*VK Driller Equipamentos Elétricos Ltda.*, Jaguaré, São Paulo, Brasil) com aproximadamente 1600 rotações por minuto (rpm) (FIGURA 6).

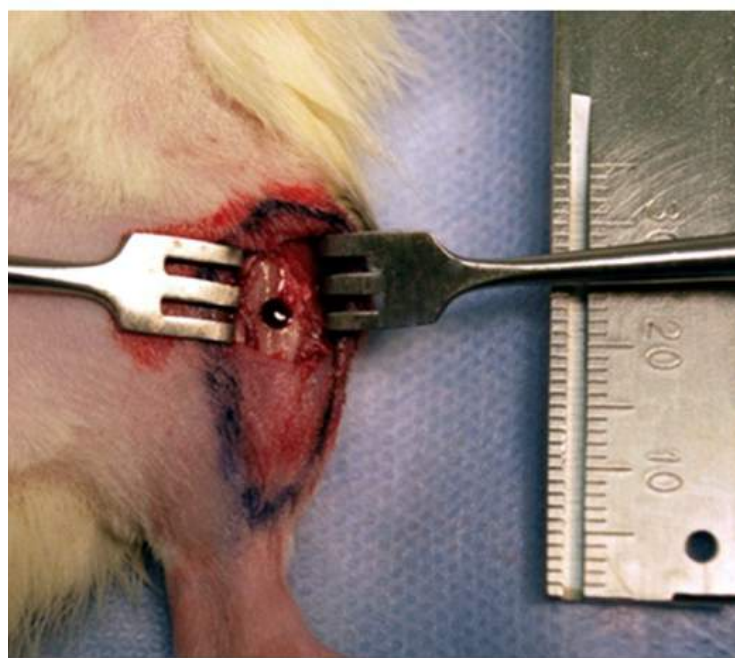


FIGURA 6. Perfuração monocortical na tíbia com 2,5mm de diâmetro.

A cirurgia foi realizada sob irrigação constante com solução salina estéril. Para a sutura empregou-se fio de náilon monofilamentar 4-0.

Após a cirurgia foi administrado analgésico (Paracetamol, 1mg/ml via oral) e antibiótico (Benzilpenicilina benzatina, 600.000U intramuscular).

Os animais foram mantidos em sala aquecida entre 27 a 30° C até a recuperação anestésica.

4.3.3 IRRADIAÇÃO COM O *LASER*

Sob anestesia, com a metade da dose utilizada na cirurgia, foram realizadas três irradiações com *LLLT*, sendo a primeira logo após a sutura, a segunda após 48h e a terceira após 96h do ato operatório. O *LASER* foi aplicado nos animais dos grupos II e IV. Nos grupos I e III foram realizados os mesmos procedimentos; porém, com o equipamento desligado.

O aparelho de *LASER* consistiu em diodo com meio ativo de AsGaAL (DMC, São Carlos, Brasil), com comprimento de onda de 808nm, potência de 100mW, área da secção transversal aproximada de 0,028cm², diâmetro de 0,6mm, dose de 72J/cm² com depósito de energia de 2J, 3,57W/cm² e tempo em torno de 20s por ponto, por aplicação. Regime contínuo de operação. A aplicação pontual, em um ponto perpendicular ao tecido e por contato (FIGURA 7).

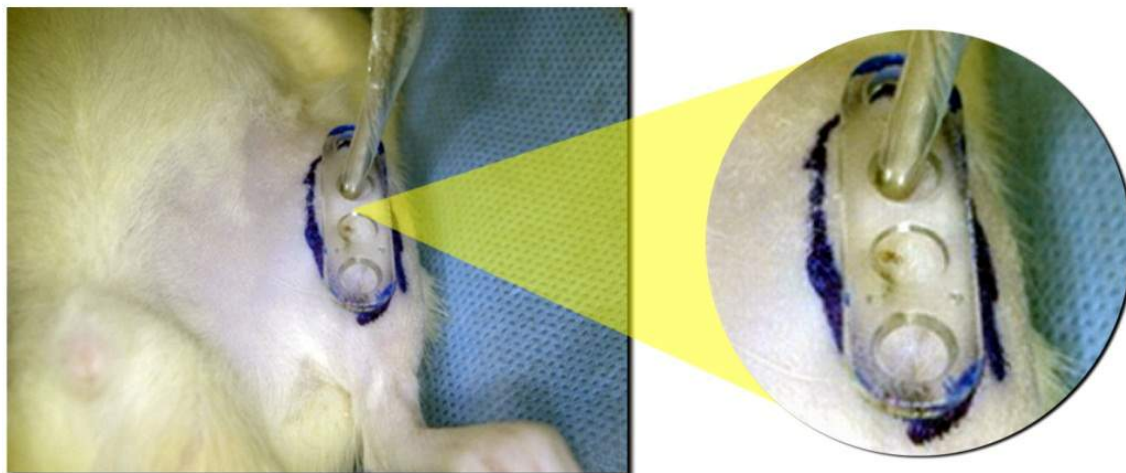


FIGURA 7. Terceira aplicação de *LASER* com a guia plástico, com o posicionamento da perfuração no osso.

A ponta do *LASER* foi envolta em filme plástico de PVC (cloreto de polivinila) devidamente esticado, para evitar o contato com o sangue. Operadores e auxiliares utilizaram óculos protetores, compatíveis com o comprimento de onda do *LASER*.

Posicionando-se novamente o guia plástico, respeitados os limites determinados pela delimitação com a caneta, a ponta do *LASER* foi encaixada no orifício do guia.

O equipamento de *LASER* (FIGURA 8) foi calibrado pelo fabricante por um conjunto de medidores de potência (*Coherent, Inc.*, Santa Clara, CA, USA).



FIGURA 8. Equipamento de *LASER* durante a calibração.

4.3.4 EUTANÁSIA

A eutanásia dos animais foi realizada com a sua exposição ao dióxido de carbono, com concentração aproximada de 70% de dióxido de carbono na taxa de 20% do volume da câmara por minuto. Seis animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia aos 7, 14 e 21 dias após a cirurgia.

4.3.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As análises histológicas foram realizadas no Departamento de Patologia da UNIFESP-EPM.

As patas operadas foram dissecadas e, as tíbias removidas fixadas por no mínimo 24h em formol tamponado a 10% e, posteriormente, descalcificadas em *EDTA* (ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*) por período de cerca de 24h, até que se pudesse cortar o material com bisturi.

Assim que descalcificadas, as tíbias foram incisadas na região proximal e distal com distância em torno de dois mm em relação ao defeito ósseo, e o fragmento colocado em cassetes e codificado (FIGURA 9).

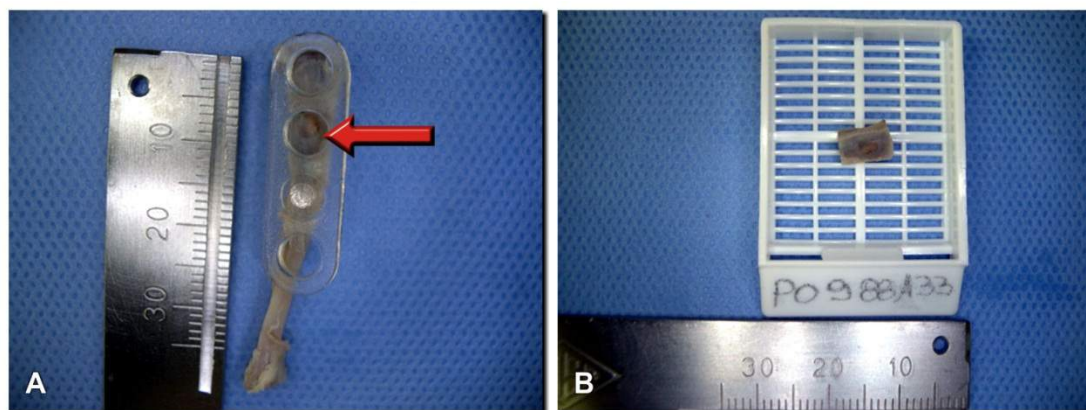


FIGURA 9. Guia posicionado diretamente na tíbia. (A) Local da perfuração indicado pela seta. (B) Fragmento dentro do cassete e identificado por código para ser enviado ao processo de elaboração de lâminas histológicas.

Foram obtidos de 3 a 4 cortes de cada tíbia com a espessura de aproximadamente três micra (μm), realizados no sentido longitudinal do OSSO.

4.3.5.1 Processamento histológico para obtenção das lâminas

Os cassetes com o fragmento de osso foram acondicionados em recipientes e levados ao histotécnico (*Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany*). O processamento consistiu na desidratação, em álcool absoluto, por meio de quatro imersões de 1h cada; na pré-impregnação (diafanização) com quatro imersões, em xilol de, aproximadamente, 1h cada e, depois, a impregnação com duas imersões, em parafina a 70° C, de 1h cada.

Após este processo as amostras foram incluídas em parafina para confecção dos cortes histológicos em micrótomo semiautomático (*Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Germany*). O material foi, então, aquecido a 70°C por 1h em estufa.

Foi realizada nova imersão em xilol por 15 minutos, seguidos de quatro banhos de passagens no xilol. Na sequência, o material recebeu quatro banhos de passagem de álcool absoluto e hidratação em água corrente. As amostras foram encaminhadas para a coloração de hematoxilina e eosina e tricrômio de Masson modificado.

4.3.5.2 Coloração de hematoxilina e eosina

As amostras foram imersas em corante de hematoxilina durante cinco minutos. A seguir, lavadas em água corrente e imersas em eosina por dois minutos. Foram realizadas quatro passagens em álcool absoluto e

quatro passagens em xilol. Terminada a coloração, foi feita a montagem da lâmina e lamínula.

4.3.5.3 Tricrômio de Masson modificado (cromotrópio R2)

As amostras foram imersas em corante de hematoxilina durante cinco minutos. Por conseguinte, foram lavadas em água corrente e imersas em coloração de cromotrópio R2 por 20min. O processo foi finalizado com a montagem em lâmina e lamínula.

4.3.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA QUANTITATIVA

4.3.6.1 Captura de imagens

A captura das imagens das lâminas histológicas foi realizada no Departamento de Patologia da UNIFESP-EPM.

Todas as imagens foram capturadas sempre pela mesma patologista. O material foi codificado para que houvesse o mascaramento de análise. Desta forma, a patologista e a pesquisadora, que realizaram as leituras, desconheciam a qual grupo pertencia a lâmina.

Foi utilizado microscópio óptico triocular com objetivas plan-acromáticas (*Olympus, Center Valley, PA, USA*) acopladas à máquina fotográfica (*Olympus, Center Valley, PA, USA*). Este sistema de captura de

imagens estava conectado ao computador com processador Intel® Celeron® 766MHz (*Intel Corporation, Santa Clara, CA,USA*), trabalhando em ambiente Windows® (*Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA*), com placa de vídeo e captura de imagem (*Tseng Laboratories Inc., Newtown, Pensilvania*).

A leitura iniciou por meio de microscopia óptica (lâminas coradas em tricrômio de Masson) o aumento de duas vezes, com a identificação do local com maior incidência de osso neoformado (princípio do “*hot spot*”) na perfuração óssea. A partir deste ponto foram capturadas quatro imagens consecutivas no sentido horário e com magnificação de 200 vezes (FIGURA 10). Foi avaliado o corte mais representativo e sem artefatos de técnica laboratorial.

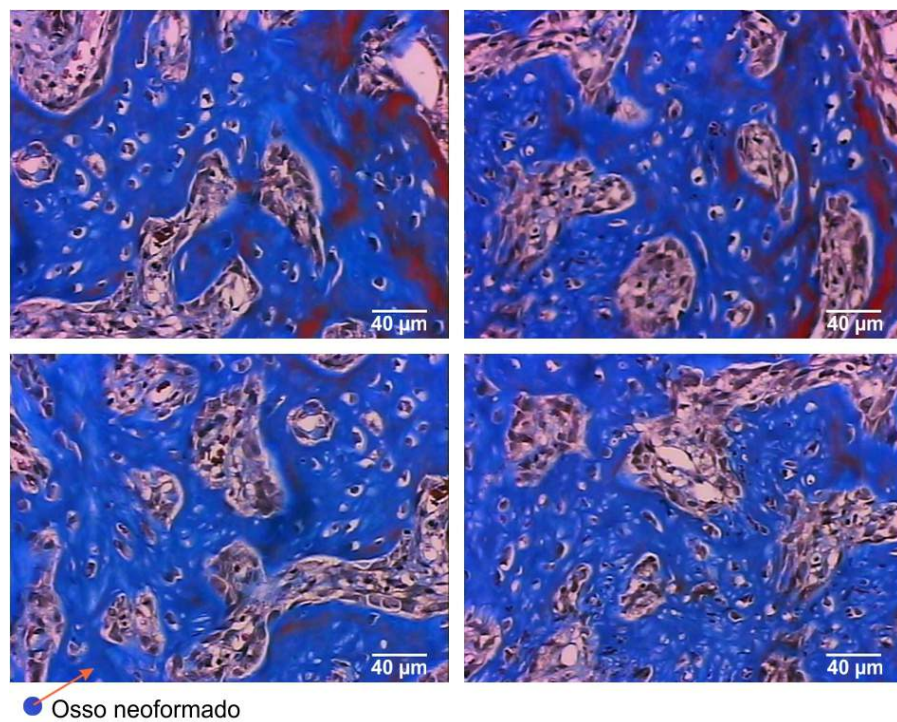


FIGURA 10. Sequência de quatro fotos de uma lâmina histológica em aumento de 200 vezes em microscópio óptico. Coloração em tricrômio de Masson.

4.3.6.2 Sistema digital de leitura da imagem

A leitura das imagens compreendeu as fases de seleção da imagem, a mensuração da imagem e o cálculo da área de osso neoformado.

Para a seleção da área óssea foi utilizado o programa para o tratamento das imagens fotográficas *Adobe® Photoshop® Elements 8* (*Adobe Systems Incorporated, San Jose, California, USA*).

A mensuração das áreas selecionadas foi realizada pelo aplicativo *Image Tool for Windows* versão 3.00 (*Department of Dental Diagnostic Science at the University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, USA*).

O cálculo das áreas mensuradas foi efetuado pelo programa *Microsoft Office Excel 2007* (*Microsoft® , Redmond, Washington, USA*).

Foram realizadas duas leituras das imagens pela pesquisadora, sendo todo o processo conferido por patologista sênior com experiência em avaliação em tecido ósseo. O material foi codificado previamente no momento da inclusão nos cassetes, portanto os pesquisadores desconheciam o grupo ao qual pertenciam as imagens das lâminas histológicas.

4.3.6.3 Seleção da imagem

A imagem, capturada no formato TIFF (*Tagged Image File Format*), foi transferida para o programa *Adobe® Photoshop® Elements 8*.

As áreas de osso neoformado foram delimitadas por intermédio da ferramenta *magic wand*, a qual permitiu selecionar os *pixels* com a cor similar à escolhida (FIGURA 11).

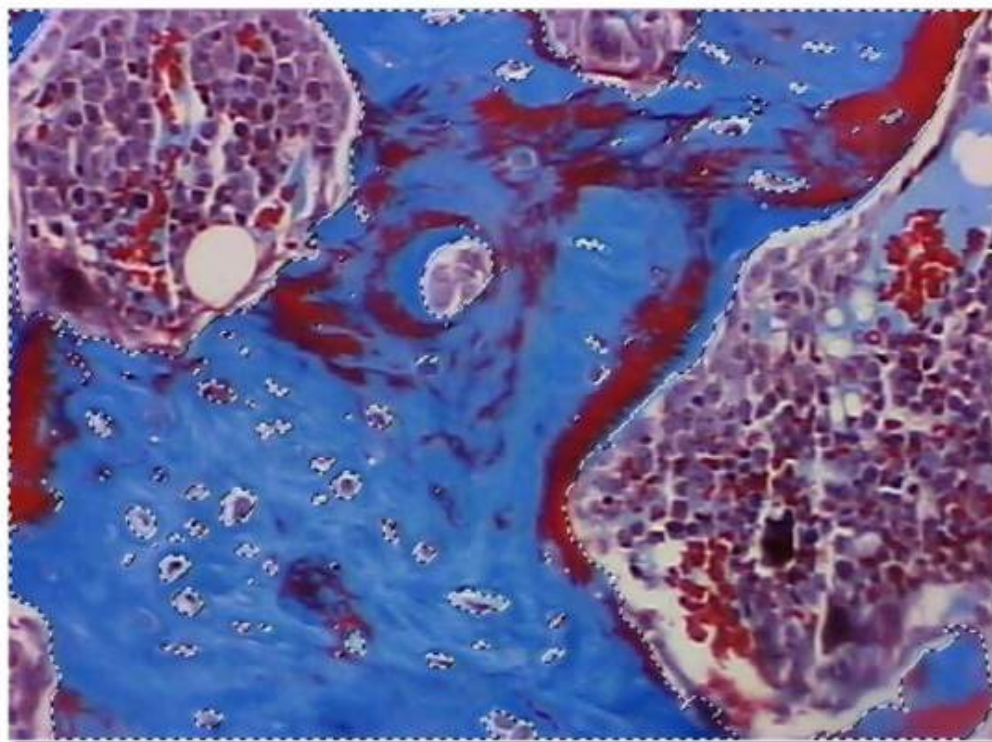


FIGURA 11. Delineamento da área de neoformação óssea por meio da ferramenta *magic wand* do programa de edição de imagens.

Na opção *select*, foi selecionada a função *inverse* para manter a área de interesse, e pela ferramenta *eraser*, com tamanho 170, foi apagada da imagem o correspondente ao osso remanescente da cirurgia, infiltrado,

compatível com tecido de granulação, ou nos estágios mais avançados, o tecido medular do osso. Novamente, na opção *select*, foi selecionada a função *deselect* e a imagem foi salva no computador (FIGURA 12).

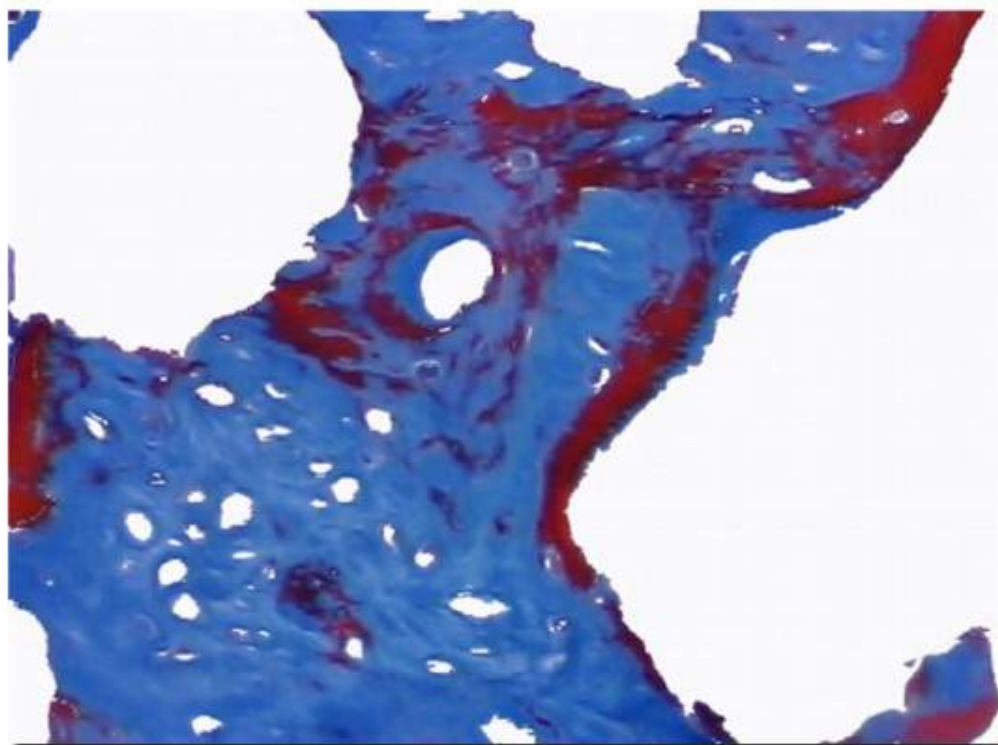


FIGURA 12. Imagem do tecido ósseo neoformado, obtida após a edição.

4.3.6.4 Mensuração da Imagem

A imagem, com a área de osso neoformado, foi transferida para o aplicativo *Image Tool for Windows* versão 3.00.

Neste programa, a imagem foi convertida em tons de cinza e submetida a uma calibração carregada, previamente, no computador, que possibilitou a correspondência de área em *pixel* em área em micra quadrados (FIGURA 13).

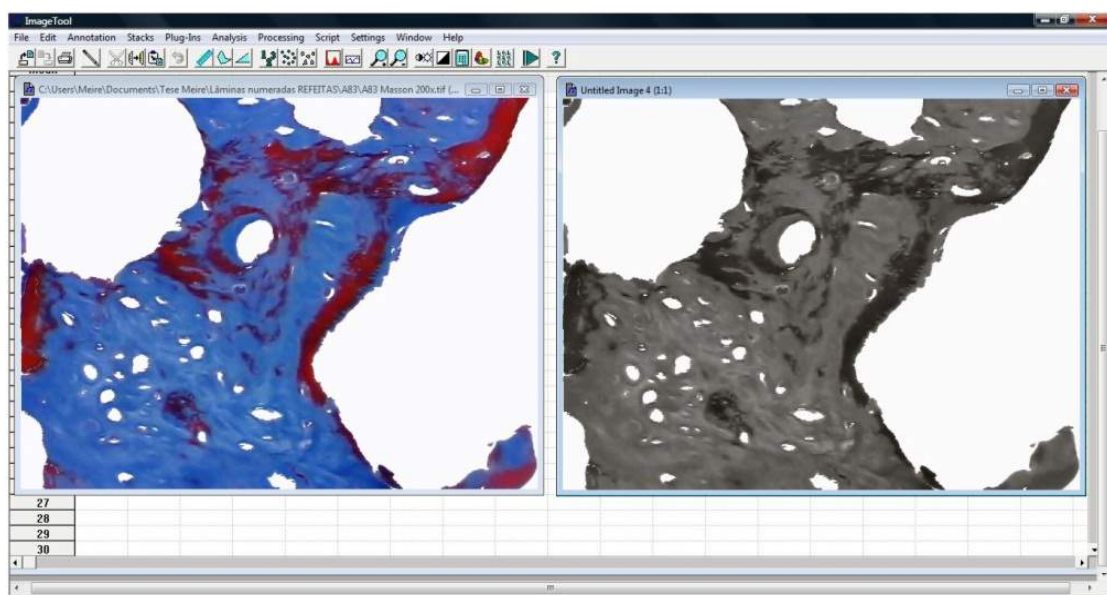


FIGURA 13. Imagem convertida em tons de cinza.

Com a ferramenta *analysis*, na função *find object*, deslizou-se manualmente a barra do *threshold*, criando-se uma máscara igual à original em tons de cinza (FIGURA 13). Automaticamente, o programa delimitou e numerou as áreas negativas da imagem que correspondiam ao tecido removido no *Photoshop*[®]. Manualmente, foram selecionadas as áreas que correspondiam às imagens negativas. A mesma ferramenta, *analysis*, na função *analyse*, mensurou estas áreas em μm^2 (FIGURAS 14 a 16).

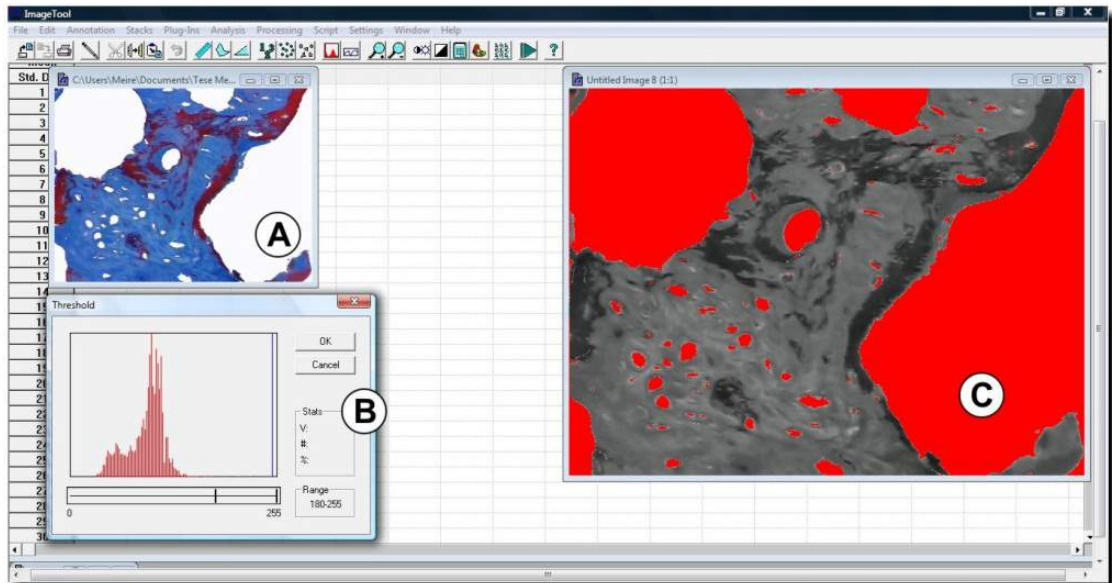


FIGURA 14. Máscara criada igual à imagem editada, pela manipulação do *threshold*. A) Corresponde à imagem editada no Photoshop®; B) Corresponde ao *threshold*; C) corresponde à máscara da imagem finalizada.

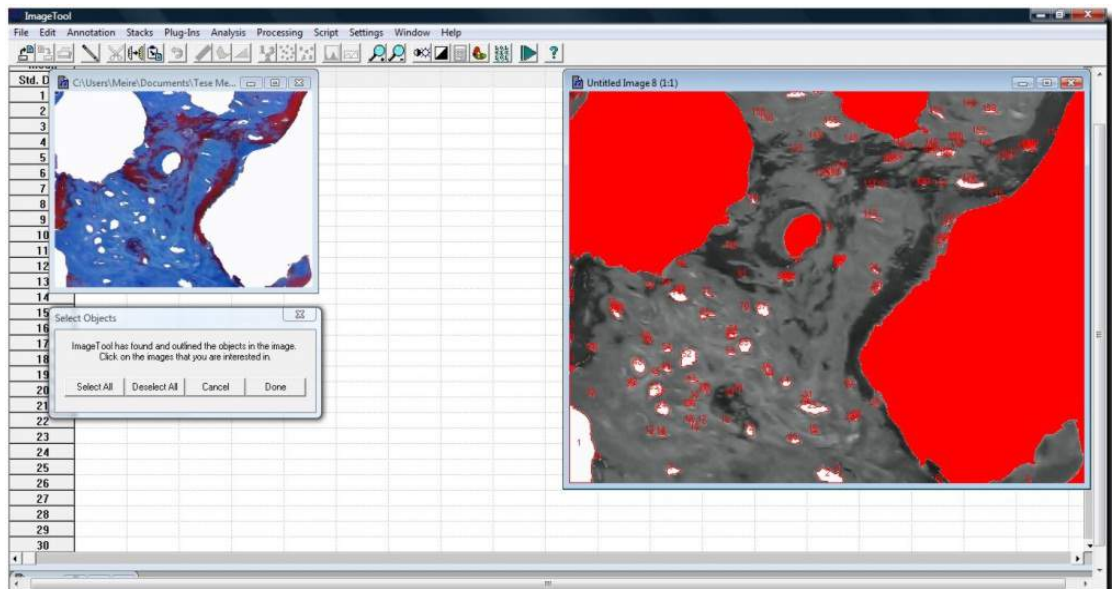


FIGURA 15. Seleção manual (em vermelho) das áreas negativas (em branco).

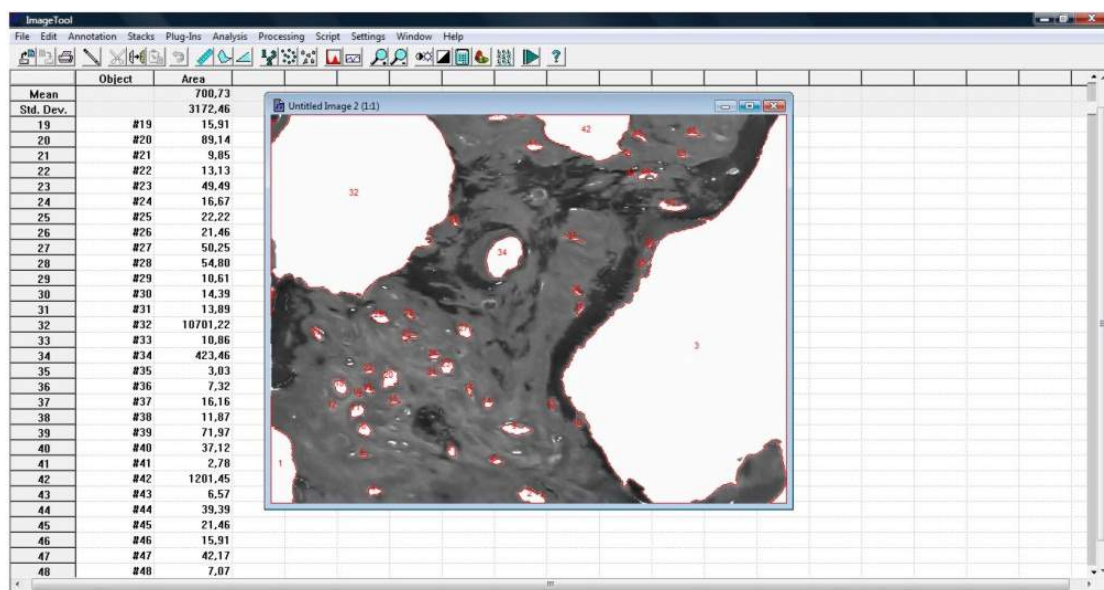


FIGURA 16. Análise e atribuição de valores em μm^2 das áreas negativas.

4.3.7 CÁLCULO DA ÁREA DE OSSO NEOFORMADO

Os dados obtidos na fase de mensuração da imagem foram enviados para *Microsoft Office Excel 2007* e realizada a somatória das áreas negativas.

A área total do retângulo da imagem foi de $77571,77\mu\text{m}^2$. Ao subtrair-se a área calculada da área negativa, obteve-se o valor da área de osso neoformado em μm^2 .

4.3.7.1 Análise histológica qualitativa

Foram analisadas a reparação medular, a presença de osteoblastos, a atividade osteoblástica e a presença de osteoclastos.

As lâminas coradas pelo HE (coloração de hematoxilina-eosina) foram analisadas qualitativamente, em microscópio óptico (BX41, *Olympus, Center Valley, PA, USA*), de múltiplos observadores, para a análise simultânea pela pesquisadora e pela patologista sênior. A leitura iniciou com uma avaliação global da perfuração com aumento de 100x e depois a magnificação óptica foi sucessivamente aumentada até 400x.

REPARAÇÃO MEDULAR

A reparação medular foi qualitativamente classificada, segundo a evolução de maturação do tecido medular. A presença do tecido fibrovascular indicou fases iniciais, enquanto a presença de medula óssea representou uma fase de maturação mais avançada do processo de reparação. A classificação foi baseada na divisão do orifício circular em quatro quadrantes onde cada quadrante correspondia a 25% da área avaliada. Conforme a quantidade de área de reparação medular foi atribuída a pontuação descrita no QUADRO 1.

QUADRO 1. Critério de pontuação para avaliação qualitativa da maturação do tecido conjuntivo.

FASE DA REPARAÇÃO MEDULAR	QUANTIDADE DE ÁREA	PONTUAÇÃO
Regeneração fibro vascular		1
Presença de medula óssea	<25%	2
	Próximo de 26 e 50%	3
	Próximo de 51 e 75%	4
	Próximo de 76 e 100%	5

QUANTIDADE DE OSTEOLASTOS

De acordo com a presença ou ausência dos osteoblastos foi elaborado um método de classificação conforme QUADRO 2. Considerou-se leve a presença de osteoblastos em não mais que 25% da amostra, moderada em até 50% e acentuada acima de 50% da amostra.

QUADRO 2. Critério de pontuação conforme a presença de osteoblastos.

TIPO DE CÉLULA	OCORRÊNCIA	CLASSIFICAÇÃO	PONTUAÇÃO
Osteoblastos	Ausentes		
	Presentes	Leve	1
		Moderada	2
		Acentuada	3

ATIVIDADE OSTEOLÁSTICA

A presença de atividade osteoblástica foi baseada na análise da morfologia dos osteoblastos conforme QUADRO 3.

QUADRO 3. Critério de avaliação da atividade dos osteoblastos.

TIPO DE CÉLULA	MORFOLOGIA	CLASSIFICAÇÃO
Osteoblastos	Redondos	Ativos
	Afilados	Inativos

QUANTIDADE DE OSTEOCLASTOS

Segundo a presença dos osteoclastos foi elaborado um método de classificação conforme QUADRO 4. Quando presentes, os osteoclastos foram classificados como leve quando esparsos e isolados na amostra; moderado quando sua ocorrência era em agregados localizados em pontos eventuais no orifício e finalmente, acentuado quando esses agregados distribuíam-se por toda a amostra.

QUADRO 4. Critério de pontuação qualitativa da presença de osteoclastos.

TIPO DE CÉLULA	OCORRÊNCIA	CLASSIFICAÇÃO	PONTUAÇÃO
Osteoclastos	Ausente		
	Presente	Leve	1
		Moderado	2
		Acentuado	3

4.4 Análise estatística

Para determinar se o tamanho da amostra era representativo, foi utilizada a ferramenta Poder e Tamanho da Amostra do Minitab 15 (*Minitab Inc., State College, PA, USA*).

As variáveis deste estudo foram avaliadas quanto ao seu padrão de distribuição amostral pelo teste de Anderson-Darling e homocedasticidade pelo teste de Levene. Na ausência das condições de normalidade foram empregados testes não paramétricos.

O Índice de Correlação Intraclassas (ICC) mensurou a confiabilidade entre as duas leituras realizadas nas lâminas histológicas.

O teste de Kruskal-Wallis foi empregado para a comparação da área média de osso neoformado entre os quatro grupos, e dentro de cada grupo, nos dias 7, 14 e 21. Este teste comparou mais de duas variáveis, simultaneamente, mas não concluiu em qual grupo estava a diferença.

O teste de Mann-Whitney comparou as amostras independentes aos pares, permitindo identificar em qual grupo ocorreu a diferença. Foi realizada a Correção de Bonferroni.

O nível de rejeição de hipótese de nulidade foi fixado em $p \leq 0,05\%$ ou 5%.

A significância estatística foi representada por um asterisco (*).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

O resultado do poder de amostra revelou que a amostra obteve um poder de 78,35% (0,7835).

O cálculo do ICC, entre a primeira e a segunda avaliações, foi realizado em todos os grupos e todos os tempos. Verificou-se que todas as correlações intraclassas obtiveram significância estatística (TABELA 1).

TABELA 1. Índice de Correlação Intra Classes, entre a primeira e segunda avaliações da área do osso neoformado.

Grupos	7 Dias		14 Dias		21 Dias	
	ICC	<i>p</i> -valor	ICC	<i>p</i> -valor	ICC	<i>p</i> -valor
I	98,0%	<0,001	99,9%	<0,001	99,9%	<0,001
II	97,7%	<0,001	99,9%	<0,001	99,8%	<0,001
III	99,4%	<0,001	99,6%	<0,001	99,9%	<0,001
IV	86,1%	<0,001	99,9%	<0,001	99,9%	<0,001

ICC - Índice de Correlação Intra Classes

Os dados utilizados em toda a análise, e apresentados neste capítulo, foram os resultados da primeira avaliação. Os dados originais da primeira leitura das lâminas constam no APÊNDICE 2. Os dados originais, referentes à segunda leitura, bem como a comparação com a primeira leitura encontram-se no APÊNDICE 2.

Deve-se ressaltar que foram utilizados testes não paramétricos, pois as suposições iniciais para se utilizar testes paramétricos, como a normalidade da distribuição e a homocedasticidade (homogeneidade das variâncias), não foram consideradas satisfeitas.

Houve diferença com significância estatística, quando comparados os grupos I, II, III e IV para a área média de osso neoformado nos períodos de 7, 14 e 21 dias (TABELA 2), ou seja, em cada período avaliado as respostas foram diferentes conforme o procedimento empregado.

TABELA 2. Valores médios da área de osso neoformado (μm^2) nos períodos de 7, 14 e 21 dias dos grupos I, II, III e IV.

	Grupos	Média	Desvio Padrão	n	p-valor
7 Dias	I	30.852	8.767	6	<0,001*
	II	41.422	5.180	6	
	III	10.739	16.334	6	
	IV	26.314	12.435	6	
14 Dias	I	50.931	23.831	6	<0,001*
	II	49.592	22.533	6	
	III	25.361	17.399	6	
	IV	48.820	15.636	6	
21 Dias	I	68.860	13.553	6	<0,001*
	II	72.642	8.146	6	
	III	36.851	22.008	6	
	IV	66.108	15.228	6	

n - Número de lâminas analisadas

p-valor - Valor estatístico com nível de significância $p \leq 0,05$

Teste de Kruskal-Wallis

7 dias	14 dias	21 dias
I x II x III x IV	I x II x III x IV	I x II x III x IV

Verificou-se que, aos sete dias, o Grupo II apresentou maior área média de osso neoformado comparado ao Grupo I. Entre o Grupo I e o Grupo IV não houve diferença estatística; porém, o Grupo III apresentou a menor área de osso neoformado em relação aos demais grupos. Aos 14 dias, a reparação óssea foi semelhante nos grupos I, II e IV, enquanto no Grupo III havia uma área média significativamente menor de osso neoformado. Aos 21 dias, este resultado manteve-se, ou seja, o Grupo III apresentou menor área média de osso neoformado, com diferença estatística, quando comparado aos grupos I, II e IV. Em relação à área média de osso neoformado foi possível notar que: o Grupo III apresentou a menor área média de osso neoformado, em todos os períodos, quando comparado aos demais grupos; houve diferença estatística entre os grupos III e IV nos períodos de 7, 14 e 21 dias; não se verificou diferença estatística entre os grupos I e IV em nenhum dos períodos avaliados; não se observou diferença estatística entre os grupos I e II nos períodos de 14 e 21 dias (TABELA 3).

TABELA 3. Valores estatísticos¹ da área de osso neoformado (μm^2) nos períodos de 7, 14 e 21 dias dos grupos I, II, III e IV.

	Grupos	Grupo I <i>p</i> -valor	Grupo II <i>p</i> -valor	Grupo III <i>p</i> -valor
7 Dias	II	<0,006*		
	III	<0,006*	<0,006*	
	IV	1	<0,006*	<0,006*
14 Dias	II	1		
	III	<0,018*	0,012*	
	IV	1	1	<0,006*
21 Dias	II	1		
	III	<0,006*	<0,006*	
	IV	1	0,91	<0,006*

p-valor - Valor estatístico com nível de significância $p \leq 0,05$

¹ - Corrigido para comparação múltipla (Correção de Bonferroni).

Teste de Mann Whitney

I x II / I x III / I x IV / II x III / II x IV / III x IV

7 dias 14 dias 21 dias

II > I = IV > III I = II = IV > III I = II = IV > III

Os resultados a seguir, referem-se às comparações dentro de cada grupo nos períodos de 7, 14 e 21 dias (TABELA 4). Houve aumento da área média de osso neoformado em todos os grupos, com diferença estatística.

TABELA 4. Valores médios da área de osso neoformado (μm^2) dos grupos I, II, III e IV nos períodos de 7, 14 e 21 dias.

Grupos	Dias	Média	Desvio Padrão	n	p-valor
I	7	30.852	8.767	6	<0,001*
	14	50.931	23.831	6	
	21	68.860	13.553	6	
II	7	41.422	5.180	6	<0,001*
	14	49.592	22.533	6	
	21	72.642	8.146	6	
III	7	10.739	16.334	6	<0,001*
	14	25.361	17.399	6	
	21	36.851	22.008	6	
IV	7	26.314	12.435	6	<0,001*
	14	48.820	15.636	6	
	21	66.108	15.228	6	

n - Número de lâminas analisadas

p-valor - Valor estatístico com nível de significância $p \leq 0,05$

Teste de Kruskal-Wallis

Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
7 x 14 x 21 dias	7 x 14 x 21 dias	7 x 14 x 21 dias	7 x 14 x 21 dias

No Grupo I houve aumento da área média de osso neoformado com diferença estatística entre os períodos 7, 14 e 21 dias. No Grupo II, entre 7 e 14 dias, não se observou diferença estatística; porém, entre 14 e 21 dias, verificou-se aumento da área de osso neoformado. No Grupo III, entre o sétimo e décimo quarto dia, notou-se aumento significativo; porém, entre o 14º e o 21º dias, o aumento não foi significativo. No Grupo IV ocorreu

aumento da área média de osso neoformado com diferença estatística entre todos os grupos. Todos os grupos aumentaram significativamente a área média de osso neoformado nos períodos de 7, 14 e 21 dias (TABELA 5).

TABELA 5 Valores estatísticos¹ da área de osso neoformado (μm^2) dos grupos I, II, III e IV, nos períodos de 7, 14 e 21 dias.

Grupos	Dias	7 dias <i>p</i> -valor	14 dias <i>p</i> -valor
I	14	0,027*	
	21	<0,001*	0,018*
II	14	1	
	21	<0,001*	<0,001*
III	14	0,012*	
	21	<0,001*	0,198
IV	14	<0,001*	
	21	<0,001*	0,003*

p-valor - Valor estatístico com nível de significância $p \leq 0,05$

¹ - Corrigido para comparação múltipla (Correção de Bonferroni).

Teste de Mann Whitney

7 X 14 / 7 X 21 / 14 X 21

Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
7 < 14 < 21 dias	7 = 14 < 21 dias	7 < 14 = 21 dias	7 < 14 < 21 dias

A seguir serão expostos os resultados da avaliação qualitativa.

RESULTADOS DA REPARAÇÃO MEDULAR

Os resultados percentuais da reparação medular, no período de sete dias, mostraram que todos os grupos encontravam-se em fase inicial da reparação medular, possibilitando observar leve avanço da reparação no Grupo II, enquanto no Grupo III ainda era evidente a fase de regeneração fibrovascular (TABELA 6).

No período de 14 dias, o Grupo II apresentou reparação medular em estágio mais avançado em relação aos demais grupos. A reparação medular do Grupo I não era evoluída como no Grupo II; porém, observou-se que era mais avançada em comparação aos grupos IV e III, respectivamente.

Aos 21 dias houve reparação medular completa dos grupos I e II. O Grupo IV encontrava-se em estágio avançado da reparação, enquanto o Grupo III permanecia em fase intermediária (TABELA 6).

TABELA 6. Valores percentuais de reparação medular no período de 7, 14 e 21 dias nos grupos I, II, III e IV.

Reparação medular 7 dias	Grupo I		Grupo II		Grupo III		Grupo IV	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Regeneração fibrovascular	4	66,7%	4	66,7%	5	83,3%	4	66,7%
Presença de medula óssea $\leq 25\%$	2	33,3%	1	16,7%	1	16,7%	2	33,3%
Presença de medula óssea de 26 a $\leq 50\%$	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
Presença de medula óssea de 51 a $\leq 76\%$	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
Presença de medula óssea de 76 a 100%	0	0,0%	1	16,7%	0	0,0%	0	0,0%

Reparação medular 14 dias	Grupo I		Grupo II		Grupo III		Grupo IV	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Regeneração fibrovascular	0	0,0%	0	0,0%	2	33,3%	0	0,0%
Presença de medula óssea $\leq 25\%$	0	0,0%	0	0,0%	1	16,7%	0	0,0%
Presença de medula óssea de 26 a $\leq 50\%$	2	33,3%	0	0,0%	1	33,3%	4	66,7%
Presença de medula óssea de 51 a $\leq 76\%$	2	33,3%	2	33,3%	1	16,7%	1	16,7%
Presença de medula óssea de 76 a 100%	2	33,3%	4	66,7%	0	0,0%	1	16,7%

Reparação medular 21 dias	Grupo I		Grupo II		Grupo III		Grupo IV	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Regeneração fibrovascular	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
Presença de medula óssea $\leq 25\%$	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
Presença de medula óssea de 26 a $\leq 50\%$	0	0,0%	0	0,0%	2	33,3%	1	16,7%
Presença de medula óssea de 51 a $\leq 76\%$	0	0,0%	0	0,0%	3	50,0%	1	16,7%
Presença de medula óssea de 76 a 100%	6	100,0%	6	100,0%	1	16,7%	4	66,7%

n - Número de lâminas analisadas

QUANTIDADE DE OSTEOLASTOS

Quanto à presença de osteoblastos no período de sete dias, ocorreu aumento mais pronunciado do número de osteoblastos nos grupos I, II e IV, enquanto no Grupo III a presença de osteoblastos era, ainda, leve (TABELA 7).

No período de 14 dias observou-se diminuição da quantidade de osteoblastos nos grupos I, II e IV. No Grupo III verificou-se aumento da quantidade de osteoblastos compatível com a fase mais precoce do processo de reparação (TABELA 7).

No período de 21 dias ocorreu expressiva diminuição da quantidade de osteoblastos nos grupos I e II, que pode ser atribuída à finalização da fase inflamatória do processo de reparação. O Grupo IV mostrou diminuição da presença dos osteoblastos, contudo menor que os grupos I e II. O Grupo III apresentou quantidade moderada de osteoblastos, compatível com uma fase de remodelação medular (TABELA 7).

TABELA 7. Valores percentuais da presença de osteoblastos no período de 7, 14 e 21 dias nos grupos I, II, III e IV.

Quantidade de osteoblastos 7 dias	Grupo I		Grupo II		Grupo III		Grupo IV	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Ausente	0	0,0%	1	16,7%	1	16,7%	0	0,0%
Presente Leve	0	0,0%	0	0,0%	4	66,7%	1	16,7%
Presente Moderado	1	16,7%	1	16,7%	0	0,0%	0	0,0%
Presente Acentuado	5	83,3%	4	66,7%	1	16,7%	5	83,3%

Quantidade de osteoblastos 14 dias	Grupo I		Grupo II		Grupo III		Grupo IV	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Ausente	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
Presente Leve	2	33,3%	2	33,3%	0	0,0%	2	33,3%
Presente Moderado	4	66,7%	3	50,0%	4	66,7%	3	50,0%
Presente Acentuado	0	0,0%	1	16,7%	2	33,3%	1	16,7%

Quantidade de osteoblastos 21 dias	Grupo I		Grupo II		Grupo III		Grupo IV	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Ausente	1	16,7%	4	66,7%	0	0,0%	1	16,7%
Presente Leve	4	66,7%	1	16,7%	1	16,7%	2	33,3%
Presente Moderado	0	0,0%	1	16,7%	4	66,7%	3	50,0%
Presente Acentuado	1	16,7%	0	0,0%	1	16,7%	0	0,0%

n - Número de lâminas analisadas

ATIVIDADE OSTEOLÁSTICA

Aos sete dias verificou-se atividade osteoblástica em todos os grupos; no entanto, no Grupo II iniciou-se uma diminuição da atividade (TABELA 8).

No período de 14 dias, todos os grupos ainda mantiveram a atividade osteoblástica (TABELA 8).

No período de 21 dias ocorreu diminuição mais acentuada da atividade osteoblástica do Grupo II evidenciando a diminuição da síntese de osso, seguido dos grupos I e IV. No Grupo III ainda havia atividade de 100% dos osteoblastos (TABELA 8).

TABELA 8. Valores percentuais da atividade de osteoblastos no período de 7, 14 e 21 dias nos grupos I, II, III e IV.

Atividade osteoblástica 7 dias	Grupo I		Grupo II		Grupo III		Grupo IV	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Ausente	0	0,0%	0	0,0%	1	16,7%	0	0,0%
Ativos	6	100%	5	83,3%	5	83,3%	6	100%
Inativos	0	0,0%	1	16,7%	0	0,0%	0	0,0%

Atividade osteoblástica 14 dias	Grupo I		Grupo II		Grupo III		Grupo IV	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Ausente	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
Ativos	6	100%	6	100%	6	100%	6	100%
Inativos	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%

Atividade osteoblástica 21 dias	Grupo I		Grupo II		Grupo III		Grupo IV	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Ausente	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
Ativos	5	83,3%	2	33,3%	6	100%	5	83,3%
Inativos	1	16,7%	4	66,7%	0	0,0%	1	16,7%

n - Número de lâminas analisadas

PRESENÇA DE OSTEOCLASTOS

No período de sete dias, evidenciou-se grande presença de osteoclastos do Grupo II neste período o que diferenciou muito em relação do Grupo I (TABELA 9).

Aos 14 dias, o Grupo II iniciou uma diminuição da atividade osteoclástica compatível com um processo de reparação em estágio mais avançado. Os grupos I e IV encontravam-se em estágio semelhante, enquanto no Grupo III aumentava a quantidade de osteoclastos (TABELA 9).

Com 21 dias, mais uma vez, foi possível observar que o Grupo II atingia um estágio mais avançado do processo de reparação em relação aos demais grupos uma vez que se notou intensa diminuição da quantidade de osteoclastos, característico de finalização do processo de reabsorção óssea. Ambos os grupos (I e IV) encontravam-se em fase semelhante de diminuição de osteoclastos, enquanto o Grupo III ainda apresentava presença de muitos osteoclastos, indicando intenso processo de reabsorção (TABELA 9).

TABELA 9. Valores percentuais da presença de osteoclastos no período de 7, 14 e 21 dias nos grupos I, II, III e IV.

Quantidade de osteoclastos 7 dias	Grupo I		Grupo II		Grupo III		Grupo IV	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Ausente	4	66,7%	1	16,7%	1	16,7%	1	16,7%
Presente Leve	0	0,0%	0	0,0%	3	50,0%	1	16,7%
Presente Moderado	0	0,0%	1	16,7%	2	33,3%	2	33,3%
Presente Acentuado	2	33,3%	4	66,7%	0	0,0%	2	33,3%

Quantidade de osteoclastos 14 dias	Grupo I		Grupo II		Grupo III		Grupo IV	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Ausente	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	16,7%
Presente Leve	0	0,0%	0	0,0%	1	16,7%	0	0,0%
Presente Moderado	0	0,0%	3	50,0%	1	16,7%	0	0,0%
Presente Acentuado	6	100,0%	3	50,0%	4	66,7%	5	83,3%

Quantidade de osteoclastos 21 dias	Grupo I		Grupo II		Grupo III		Grupo IV	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Ausente	2	33,3%	5	83,3%	0	0,0%	1	16,7%
Presente Leve	1	16,7%	0	0,0%	3	50,0%	2	33,3%
Presente Moderado	0	0,0%	0	0,0%	2	33,3%	1	16,7%
Presente Acentuado	3	50,0%	1	16,7%	1	16,7%	2	33,3%

n - Número de lâminas analisadas

As fotomicrografias (FIGURA 17), com magnificação de 200x com microscopia óptica, permitiram a visualização da área de osso neoformado nos grupos I, II, III e IV nos períodos de 7, 14 e 21 dias. Aos sete dias o Grupo III apresentou imagens compatíveis com regeneração fibrovascular, enquanto nos grupos I, II e IV havia tecido ósseo neoformado, com recrutamento de osteoblastos mais precoce no Grupo II (*LASER*). Aos 14 dias verificou-se maior aumento de área de osso neoformado no Grupo Controle, quando comparado ao Grupo II (*LASER*); porém, neste último,

havia maior maturação do tecido medular e maior número de osteoclastos nesta fase que, provavelmente, estavam envolvidos no processo de reabsorção óssea e, assim, com diminuição da área de osso neoformado. Neste período, também, observou-se a diferença da área de osso neoformado entre o Grupo III (RI) e IV (RI e *LASER*), sendo este último muito similar com a área do Grupo Controle. Aos 21 dias os grupos I e II apresentavam reparação medular completa. No Grupo IV (RI e *LASER*) a reparação encontrava-se em estágio avançado e no Grupo III (RI) notou-se reparação mais lenta e, ainda, com recrutamento celular.

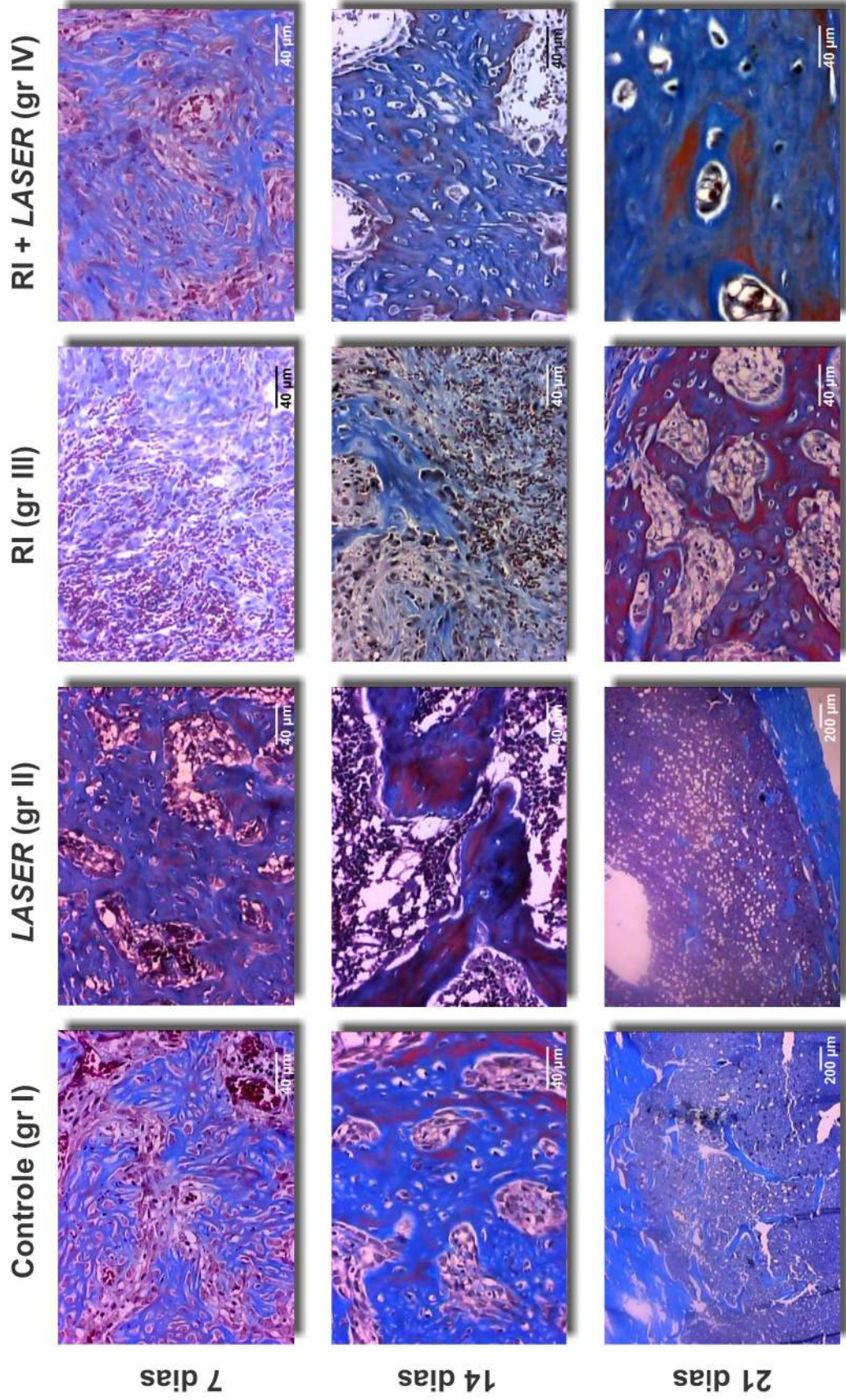


FIGURA 17. Fotomicrografias dos grupos I, II, III e IV nos períodos de 7, 14 e 21 dias com magnificação de 200x em microscopia óptica. As fotomicrografias dos Grupos Controle e LASER aos 21 dias estão em aumento de 20x. Coloração em tricrômio de Masson

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A RT é uma forma eficaz e amplamente utilizada como terapia de várias doenças malignas. Em tumores de cabeça e pescoço faz parte da conduta terapêutica (BERNIER *et al.*, 2004; COOPER *et al.*, 2004).

Contudo, dependendo do protocolo empregado e da presença de fatores de risco, a RT pode desencadear o surgimento de efeitos adversos que determinam grande perda da qualidade de vida dos pacientes submetidos ao tratamento oncológico.

Os avanços tecnológicos dos equipamentos de RT como o uso da IMRT e da radioterapia conformal tridimensional (RT-3D), o refinamento da técnica de radiação, bem como o fracionamento da dose com o propósito de diminuir o volume da dose nos tecidos adjacentes sadios ainda não foram suficientes para eliminar completamente os riscos do desenvolvimento da ORN (STUDER *et al.*, 2006), e os efeitos colaterais tardios como a atrofia óssea, ORN, fraturas patológicas e desenvolvimento de doenças malignas induzidas pela radiação (JERECZEK-FOSSA & ORECCHIA, 2002).

As formas de abordagem da ORN ainda não são totalmente satisfatórias, havendo grande necessidade do desenvolvimento de pesquisas para tornar o processo de reparação óssea e, particularmente do osso submetido à RT, mais rápido e eficaz.

O objetivo deste estudo foi o de avaliar se o *LLLT* teria a capacidade de otimizar a reparação de tíbias de ratos submetidas à RI.

A hipótese que o *LLLT* poderia atuar de forma benéfica no osso submetido à RI, foi baseada na compreensão da interação do *LLLT* com as estruturas intracelulares, e o entendimento de quais mecanismos estariam envolvidos na manifestação dos efeitos.

Quando o *LLLT*, dentro do espectro do vermelho e do infravermelho próximo incide sobre as células, é absorvido por fotoceptores localizados na mitocôndria, mais especificamente uma enzima da cadeia respiratória denominada citocromo *c* oxidase na forma parcialmente reduzida. Com a absorção da luz, ocorre uma excitação dos elétrons seguida de reações fotoquímicas que alteram a reação de redução-oxidação da célula e resulta em modulação da célula de estado reduzido para estado oxidado, determinando o aumento intracelular de ATP. O incremento energético leva ao aumento do metabolismo celular, e essa regulação é especialmente importante para células que apresentam condição restritiva nutricional ou estresse. Por outro lado, o equilíbrio que ocorre no processo de respiração celular, com a mudança para um estado mais oxidado, favorece as células que apresentam condição de hipóxia, pois, nesses casos, a regulação da reação de redução-oxidação é mais importante que o aporte energético. A magnitude da resposta celular, quando irradiada pelo *LLLT*, depende do estado do potencial de redução da célula no momento da irradiação. A resposta é maior quando o potencial está mais reduzido. O potencial hidrogeniônico (pH) da célula também possui importante papel na resposta frente à irradiação e, quanto mais baixo, mais marcante será o efeito. Essas condições de pH baixo e potencial redox reduzido são, normalmente,

encontradas em células que sofreram algum trauma ou alteração de sua homeostase (KARU, SMOLYANINOVA, ZELENIN, 1991).

MARX, 1983a discorreu sobre os conceitos da fisiopatologia da ORN e relatou que radiação ionizante induz a conversão da água em radicais livres que interagem com o DNA e RNA, provocando sua desorganização ou rompimento. Dessa forma, ocorre a morte celular por inativação dos sistemas vitais ou incapacidade de reprodução. A irradiação diminui a capacidade de renovação e síntese colágena e devido ao comprometimento vascular, não ocorre o suprimento de oxigênio, energético e metabólico necessário para o restabelecimento da homeostase.

Uma provável explicação para a reparação ocorrer em menor período com o *LLLT* é que devido ao incremento energético intracelular é desencadeado o aumento metabólico que induz uma mudança do potencial de redução para um estado mais oxidado, essa condição propicia o aumento da síntese de DNA (KARU, 1999). Também, é referido na literatura que o *LLLT* atua no aumento da angiogênese e do fluxo sanguíneo o que eleva a nutrição e oxigenação tecidual (MIRÓ *et al.*, 1984; IHSAN, 2005; GARAVELLO, BARANAUSKAS, DA CRUZ-HÖFLING, 2004).

Para a amostra, foram usados ratos da linhagem *Wistar*, EPM-1, machos, saudáveis, adultos jovens com idade variando entre 90 e 105 dias e com peso médio variando entre 300 a 340g, considerando-se fundamentação literária relativamente aos parâmetros para tíbias de ratos com estas idade e peso, tanto para a radiação com a RI (OHRNELL *et al.*, 1997; KIYOHARA, SAKURAI, KASHIMA, 2003), como para a radiação com o

LLLT (BARUSHKA, YAAKOBI, ORON, 1995; YAAKOBI, MALTZ, ORON, 1996; GARAVELLO-FREITAS *et al.*, 2003; GARAVELLO, BARANAUSKAS, DA CRUZ-HÖFLING, 2004), posteriormente corroborados por trabalhos mais recentes (MATSUMOTO *et al.*, 2009; FÁVARO-PÍPI *et al.*, 2010).

A quantidade de animais por grupo foi avaliada estatisticamente antes do experimento porém, o teste de poder da amostra foi determinante, uma vez que para os seus cálculos são ponderados os valores dos desvios médios. Assim, apesar do número reduzido de animais a finalização do experimento ocorreu quando a amostra foi considerada representativa pela análise estatística.

Os animais foram imobilizados conforme os procedimentos relatados por GUMIEIRO *et al.* (2010), com uso de placa acrílica perfurada e de braçadeiras de náilon, permitindo manutenção da posição das tíbias durante a radiação e a reprodutibilidade do procedimento nas várias sessões de RI.

O protocolo de RI foi baseado nos estudos de OHRNELL *et al.* (1997) que compararam diferentes doses únicas de 10, 20, 30 e 35Gy e concluíram que, com doses de 30 e 35Gy, as tíbias de ratos apresentavam menor espessura com presença de reabsorção periostal e endosteal. A dose de 30 Gy também foi utilizada nos trabalhos de DA CUNHA *et al.* (2007) e KIYOHARA, SAKURAI, KASHIMA (2003) e foram observadas as alterações no tecido ósseo consequentes da RI.

A data da cirurgia com 28 dias após a RI foi fundamentada nos estudos de KIYOHARA, SAKURAI, KASHIMA (2003) que irradiaram fêmures de ratos *Wistar* com RI em dose única de 30Gy e avaliaram as amostras por

histomorfometria, bem como por radiografias binarizadas nos períodos de 0, 1, 2, 3, e 4 semanas. Observaram que, após quatro semanas, os efeitos da RI estavam bem estabelecidos e mais pronunciados que nos períodos anteriores.

O diâmetro da perfuração de 2,5mm, do presente experimento, não foi considerado defeito crítico; porém, quando pesquisado nas publicações sobre *LLLT* em tecido ósseo, foram encontrados trabalhos com semelhante diâmetro, sendo a maioria nas tíbias e alguns realizados no fêmur (BARUSHKA, YAAKOBI, ORON, 1995; YAAKOBI, MALTZ, ORON, 1996; NICOLA *et al.*, 2003; GARAVELLO-FREITAS *et al.*, 2003; GARAVELLO, BARANAUSKAS, DA CRUZ-HÖFLING, 2004; PRETEL, LIZARELLI, RAMALHO, 2007; FÁVARO-PÍPI *et al.*, 2011).

A energia depositada de 2J foi utilizada conforme o trabalho de TRELLES & MAYAYO (1987) que empregou 2,4J no tratamento de fraturas de tíbias de ratos. Mais recentemente, observou-se que energia semelhante foi utilizada em experimentos em ratos (PRETEL, LIZARELLI, RAMALHO, 2007; FÁVARO-PÍPI *et al.*, 2011).

O comprimento de onda empregado (808nm) neste estudo, corresponde ao infravermelho próximo, que possui penetração mais profunda nos tecidos quando comparado ao vermelho, e induz ao aumento da proliferação osteoblástica, deposição de colágeno e formação de osso. O comprimento de onda infravermelho foi utilizado em trabalhos para avaliar o desempenho do *LLLT* no processo de reparação do tecido ósseo em ratos (TAKEDA, 1988; SILVA JÚNIOR *et al.*, 2002). Ressalta-se que os efeitos na

reparação óssea não são definidos somente como interação da célula com o *LLLT*, mas pelos efeitos locais sobre a vascularização e drenagem linfática (TRELLES & MAYAYO, 1987).

As aplicações em três dias alternados coincidem com o trabalho de SILVA JÚNIOR *et al.* (2002) que comparou a reparação óssea de fêmur de ratos em defeitos críticos, com irradiação por três dias e por 12 dias alternados. Houve aumento significativo de neoformação óssea no grupo com três irradiações em relação ao controle, o que não ocorreu no grupo irradiado por 12 sessões. Concluiu-se que o *LLLT* apresentava melhores resultados quando aplicado na fase inflamatória da reparação. Dados semelhantes foram encontrados em experimentos comparativos entre períodos de irradiação (GARAVELLO-FREITAS *et al.*, 2003; GARAVELLO, BARANAUSKAS, DA CRUZ-HÖFLING, 2004).

Foram realizados, aproximadamente, quatro cortes por coloração e por perfuração, sendo selecionada, pela patologista sênior, a imagem com melhor representatividade da lesão e que não apresentasse artefatos de técnica laboratorial. Este método de avaliação foi utilizado por FÁVARO-PÍPI *et al.* (2010). Esta seleção foi realizada devido ao reduzido tamanho da lesão e que, portanto, possibilitou inferir que foi afetada pelos dois tipos de radiação de forma homogênea.

A análise digital da imagem é um meio diagnóstico e prognóstico utilizado na patologia, para obtenção de dados precisos de componentes celulares e teciduais por meio da mensuração automática e contagem do objeto de interesse (ANDREA, BLEGGI-TORRES, ALVES, 2008). A

morfometria, realizada por meio de programas de computador, permitiu a comparação da imagem original com a imagem processada. Além disso, possibilitou a conferência entre os observadores de todo o material, nas diversas etapas da avaliação. A avaliação histomorfométrica, por análise digital da imagem, foi utilizada para mensuração de área óssea neoformada com irradiação do *LLLT* de SILVA JÚNIOR *et al.* (2002) e FÁVARO-PÍPI *et al.* (2010).

Não foi realizado teste estatístico entre os observadores devido à conferência de todas as fases do processo de análise digital da imagem pela patologista sênior, e a concordância absoluta entre os pesquisadores.

Neste estudo, a dose de RI foi considerada bem sucedida uma vez que houve diferença estatística na diminuição da área do osso neoformado, quando comparados os Grupos I (Controle) e Grupo III (RI) em todos os períodos avaliados. Estes resultados correspondem com os achados de OHRNELL *et al.* (1997) que, em estudo comparativo de doses únicas de 10, 20, 30 e 35Gy em ratos, observou o estabelecimento de alterações ósseas significativas com dose de 30Gy

Relativo à dose de *LLLT*, a literatura mostrou-se extremamente variada, devido à grande quantidade de parâmetros ajustáveis no equipamento e à respectiva falta de padronização das pesquisas e cálculos. Até o momento, não foi estabelecida qual a melhor dose ou protocolo de irradiação com o *LLLT* para cada tecido, mas, para o tecido ósseo, são normalmente utilizadas doses mais altas do que para o tecido cutâneo.

Neste estudo o Grupo IV (RI e *LASER*) apresentou significativo aumento da área de osso neoformado nos três momentos de avaliação, quando comparado com o Grupo III (RI). Este resultado está de acordo com o que foi encontrado na literatura pesquisada sobre o uso do *LLLT* em osso submetido à RI (DA CUNHA *et al.*, 2007). Em modelo de estudo em animais *Wistar* com dose de RI de 30Gy, porém, com diferentes parâmetros de irradiação com *LASER*, os autores observaram, radiograficamente, significativo aumento na quantidade de osso nos animais do grupo irradiado com *LASER* um dia antes da RI, e no grupo irradiado quatro semanas após a RI. Na análise histológica houve aumento da celularidade medular, do número de osteócitos e dos canais de *Harvers* e significativo incremento da atividade osteoblástica nos animais irradiados com *LASER* um dia antes da RI, logo após a RI e quatro semanas após a RI. No estudo de DA CUNHA *et al.* (2007) foi relatada a presença de reações cutâneas que ocorreram na sexta semana após a irradiação ionizante. Essas lesões foram relacionadas com os parâmetros empregados no *LASER*. Os pesquisadores presumiram que a energia depositada poderia ter ultrapassado o limiar de estimulação, passando a ter um efeito inibitório para o tecido cutâneo (OHSHIRO & CALDERHEAD, 1991). Porém, no tecido ósseo, a dose utilizada determinou um efeito estimulador. Esses eventos cutâneos não foram observados no presente experimento com os parâmetros empregados no *LASER*.

É importante salientar que DA CUNHA *et al.* (2007) observaram a evolução no processo de remodelação óssea. O presente estudo foi

realizado em modelo de reparação óssea e até o momento, não foi encontrado na literatura relatos semelhantes.

Fato relevante foi o resultado da comparação entre os Grupos I (Controle) e IV (RI e *LASER*), em que não foi observada diferença com significância estatística no processo de reparação do osso submetido à RI. Até o momento, não foi encontrado na literatura pesquisada um artigo que pudesse comparar e discutir este resultado, mas pode se inferir que o estado patológico do tecido determinou a condição ideal para o desempenho do *LLLT* (KARU, SMOLYANINOVA, ZELENIN, 1991; ALMEIDA-LOPES *et al.*, 2001).

Em todos os grupos, os animais evoluíram para a reparação óssea e este fato pode ser atribuído ao modelo animal adotado, que possui evolução rápida e eficiente dos processos de reparação. Deve-se salientar que o Grupo III apresentou menor área de osso neoformado nos períodos de 7, 14, e 21 dias, quando comparado aos outros grupos.

O comprometimento vascular da ORN é fator determinante e o *LLLT* possui importante ação sobre a angiogênese, também chamada de revascularização. GARAVELLO-FREITAS *et al.* (2003) observaram que, nos grupos irradiados com *LASER*, houve aumento da atividade de osteoblastos e dos osteócitos, aumento da celularidade dentro da medula óssea intratrabecular e aumento da proliferação de vasos sanguíneos, permitindo maior fluxo de células inflamatórias. Esses resultados na vascularização foram posteriormente confirmados em nova análise do experimento realizada por GARAVELLO, BARANAUSKAS, DA CRUZ-HÖFLING (2004).

O suporte vascular é essencial para a reparação do tecido ósseo. Fatores de crescimento como o fator de crescimento endotelial (*VEGF* do inglês *vascular endothelial growth factor*) e citocinas, estimulam o recrutamento, a sobrevivência e a atividade dos osteoblastos e osteoclastos (GLOWACKI, 1998). DESMONS *et al.* (2007) observaram que o pré-condicionamento com o *LASER* de alta intensidade protegeu a rede vascular no osso, com suprimento de sangue comprometido pela radiação de Raios-X. Esse resultado foi atribuído ao calor gerado pelo *LASER* de alta intensidade que induziu um aquecimento homogêneo das paredes vasculares, produzindo relaxamento e melhor perfusão de sangue nos tecidos circundantes.

Na avaliação qualitativa, aos sete dias (TABELA 7), observou-se acentuada atividade osteoblástica no Grupo I (Controle), II (*LASER*) e IV (RI e *LASER*), diferentemente do Grupo III (RI) que apresentava atividade leve. Estes resultados concordam com os achados de SAVOSTIN-ASLING & SILVERMAN (1978), que descreveram a diminuição da atividade dos osteoblastos, muito embora a atividade osteoclástica ainda permanecesse por um período, após a RI. Relativamente à atividade osteoblástica, baseou-se na morfologia dos osteoblastos, em que uma forma arredondada e prismática indicava atividade, e uma forma afilada com citoplasma orientado paralelamente à superfície óssea caracterizava a diminuição da atividade osteoblástica (MAROTTI apud MEUNIER, 1976). O incremento da atividade osteoblástica no período de cinco e seis dias após, a cirurgia, foi evidenciado pelo aumento significativo da alcalina fosfatase, marcador da atividade osteoblástica, no estudo de BARUSHKA, YAAKOBI, ORON (1995).

A presença osteoclástica, aos sete dias (TABELA 9), foi maior no Grupo II (*LASER*) quando comparado aos demais grupos, estando em conformidade com as observações de NICOLA *et al.* (2003) que relataram maior quantidade e atividade de osteoclastos cinco dias após a cirurgia nos animais irradiados com *LLLT* sem o comprometimento da arquitetura do osso. Nos grupos não irradiados com *LLLT*, a existência de osteoclastos, neste momento do experimento, deveu-se, provavelmente, ao evento traumático da cirurgia que necessitava da reabsorção do material necrótico e não ao sinergismo existente entre estas células.

No período de 14 dias (TABELA 6), verificou-se reparação medular do Grupo II (*LASER*) em estágio mais avançado. A presença acentuada de osteoblastos nesta fase indicou atraso da reparação no Grupo III (RI). Em relação à presença de osteoclastos, o Grupo II (*LASER*) obteve menor quantidade, refletindo que, neste momento, este Grupo encontrava-se na finalização do processo de reabsorção das traves ósseas, sendo substituído pelo tecido medular. Esse resultado do *LLLT* no período de 2 semanas após a cirurgia também foi encontrado por BARUSHKA, YAAKOBI, ORON (1995) que observou a diminuição da atividade da fosfatase alcalina.

Aos 21 dias (TABELA 6) o Grupo I (Controle) e Grupo II (*LASER*) apresentaram o maior número de animais no estágio mais avançado da reparação medular resultado corroborado por FÁVARO-PÍPI *et al.* (2011) que notaram o efeito benéfico do *LLLT* na reparação óssea no período de 25 dias. Quanto à presença de osteoblastos, foi menor no Grupo II (*LASER*) e a maior parte estava inativo, o que foi considerado indicativo de finalização do processo de reparação. No Grupo III (RI) observou-se a totalidade dos

osteoblastos ainda em atividade, diferentemente das observações do SAVOSTIN-ASLING & SILVERMAN (1978) que indicaram diminuição da atividade osteoblástica após a RI, este fato poderia relacionar-se com a alta taxa de renovação celular do modelo animal adotado. Neste período, notou-se comportamento semelhante dos Grupos I e IV na neoformação óssea, enquanto no Grupo III (RI) percebia-se atraso do processo de reparação.

As análises qualitativas, do presente estudo, estavam em conformidade com os resultados dos trabalhos que utilizaram este tipo de avaliação em experimentos com *LLLT* em tecido ósseo (BARUSHKA, YAAKOBI, ORON, 1995; YAAKOBI, MALTZ, ORON, 1996; GARAVELLO-FREITAS *et al.*, 2003; NICOLA *et al.*, 2003; DA CUNHA *et al.*, 2007; FÁVARO-PÍPI *et al.*, 2011) e foram muito importante para complementar e reforçar os resultados encontrados na análise quantitativa.

As perspectivas incluem análises mais detalhadas dos efeitos do *LLLT* sobre o osso submetido à RI. Neste estudo, foi delineado um modelo com propriedade de reprodutibilidade, tanto dos parâmetros da RI como do *LLLT* e com o subsídio da literatura pesquisada. Observou-se, dentro deste modelo de estudo, que o *LLLT* possui capacidade de melhorar a reparação do osso submetido à RI. Assim, com novas análises utilizando a imunohistoquímica poder-se-ia obter uma leitura mais específica da angiogênese, da atividade osteoblástica, dos fatores de crescimento envolvidos neste processo ou avaliar o balanço do recrutamento de osteoblasto/osteoclasto.

Novos parâmetros do *LLLT* também deveriam ser pesquisados. A energia utilizada neste estudo foi fundamentada em trabalhos prévios (TRELLES & MAYAYO, 1987), mas que não podem ser considerados como parâmetro ideal. O mesmo ocorre com a frequência das sessões de *LLLT*, a potência e regime de aplicação.

A literatura sobre o *LLLT* apresenta resultados conflitantes, frequentemente relacionados com a dificuldade de padronização de metodologia devido a grande quantidade de variáveis tanto do modelo experimental selecionado como também dos parâmetros do *LLLT*. Os parâmetros empregados em estudos *in vitro* não podem ser empregados em modelos *in vivo* ou clínicos pois existe o que se chama de janela terapêutica, ou seja, dose de energia muito específica para cada aplicação do *LLLT* e uma dose muito alta ou baixa podem determinar, por exemplo, um resultado inibitório ou a ausência de resultados, respectivamente. Além disso, é constante encontrar nos relatos especificações inapropriadas dos parâmetros, cálculos incorretos da irradiação e insuficiente descrição dos protocolos (TUNER, HODE, 1998; BOUVET-GERETTAZ, *et al*, 2009).

Diante dos resultados apresentados no presente estudo e da necessidade de melhorar as condições de remodelação e reparação do osso irradiado por RI, é possível considerar uma aplicação clínica do *LLLT*. O *LASER* é uma terapia não invasiva, de baixo custo quando comparado com as modalidades terapêuticas disponíveis (KELISHADI, ST-HILAIRE, RODRIGUEZ, 2009), além da baixa probabilidade de desenvolver efeitos colaterais, quando empregado com o diagnóstico e protocolo e adequado.

É importante o desenvolvimento de estudos clínicos do *LLLT*, na prevenção ou diminuição de alterações nos processos de remodelação e melhora da reparação dos tecidos sadios, ou seja, sem comprometimento tumoral, mas que se encontram dentro do campo de RI.

O *LLLT*, também, pode ser uma abordagem complementar quando realizadas curetagem de osso necrótico, ressecções e procedimentos para a reabilitação do paciente, em que há necessidade de estímulo no processo de reparação.

A possibilidade de ter um osso circundante à lesão, que ofereça condição de equilíbrio dos processos fisiológicos, é fator determinante no prognóstico da reabilitação funcional, estética e psicossocial dos pacientes, após o tratamento oncológico.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

O *LASER* de baixa intensidade aumentou a área óssea neoformada, durante a fase inflamatória, abreviando a reparação das tíbias de ratos submetidas à radiação ionizante.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Aitasalo K, Aro H. Irradiation-induced hypoxia in bones and soft tissues: an experimental study. *Plast Reconstr Surg.* 1986 Feb;77(2):256-67.

Aitasalo K. Effect of irradiation on early enzymatic changes in healing mandibular periosteum and bone. A histochemical study on rats. *Acta Radiol Oncol.* 1986 May-Jun;25(3):207-12.

Almeida-Lopes L, Rigau J, Zângaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med.* 2001;29(2):179-84.

Andrea CE; Bleggi-Torres LF, Alves MTS. Análise da morfometria nuclear: descrição da metodologia e o papel dos softwares de edição de imagem. *J Bras Patol Med Lab.* 2008 Fev;44(1):51-57.

Barushka O, Yaakobi T, Oron U. Effect of low-energy laser (He-Ne) irradiation on the process of bone repair in the rat tibia. *Bone.* 1995 Jan;16(1):47-55.

Bernier J, Domenge C, Ozsahin M, Matuszewska K, Lefèbvre JL, Greiner RH, et al. Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med.* 2004 May 6;350(19):1945-52. Available from URL:
<http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMoa032641> or
<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa032641#t=articleTop>.

Bouvet-Gerbetaz S, Merigo E, Rocca JP, Carle GF, Rochet N. Effects of low-level laser therapy on proliferation and differentiation of murine bone marrow cells into osteoblasts and osteoclasts. *Lasers Surg Med.* 2009 Apr;41(4):291-7.

Bras J, de Jonge HK, van Merkesteyn JP. Osteoradionecrosis of the mandible: pathogenesis. *Am J Otolaryngol.* 1990 Jul-Aug;11(4):244-50.

Brunori M, Giuffrè A, Forte E, Mastronicola D, Barone MC, Sarti P. Control of cytochrome c oxidase activity by nitric oxide. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Apr 12;1655(1-3):365-71.

Campbell BH, Marbella A, Layde PM. Quality of life and recurrence concern in survivors of head and neck cancer. *Laryngoscope.* 2000 Jun;110(6):895-906.

Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Campbell BH, Saxman SB, et al. Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 2004 May 6;350(19):1937-44. Available from URL:
<http://www.hopkinsmedicine.org/bin/s/c/NEJM%202004%20postop%20CR%20US.pdf>

Curi MM, Dib LL. Osteoradionecrosis of the jaws: a retrospective study of the background factors and treatment in 104 cases. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997 Jun;55(6):540-4; discussion 545-6.

Curran D, Giralt J, Harari PM, Ang KK, Cohen RB, Kies MS, et al. Quality of life in head and neck cancer patients after treatment with high-dose radiotherapy alone or in combination with cetuximab. *J Clin Oncol*. 2007 Jun 1;25(16):2191-7.

Da Cunha SS, Sarmiento V, Ramalho LM, De Almeida D, Veeck EB, Da Costa NP, et al. Effect of laser therapy on bone tissue submitted to radiotherapy: experimental study in rats. *Photomed Laser Surg*. 2007 Jun;25(3):197-204.

de Bree R, Rinaldo A, Genden EM, Suárez C, Rodrigo JP, Fagan JJ, Kowalski LP, Ferlito A, Leemans CR. Modern reconstruction techniques for oral and pharyngeal defects after tumor resection. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2008 Jan;265(1):1-9.

Delanian S, Lefaix JL. The radiation-induced fibroatrophic process: therapeutic perspective via the antioxidant pathway. *Radiother Oncol*. 2004 Nov;73(2):119-31.

Desmons S, Delfosse C, Rochon P, Buys B, Penel G, Mordon S. Effect of a laser irradiation on the vascularisation of safety and X-ray radiated bone. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2007;2007:5846-9.

Ewing J. Radiation osteitis. *Acta Radiol*. 1926;(6):399-412.

Fávaro-Pípi E, Feitosa SM, Ribeiro DA, Bossini P, Oliveira P, Parizotto NA, et al. Comparative study of the effects of low-intensity pulsed ultrasound and low-level laser therapy on bone defects in tibias of rats. *Lasers Med Sci*. 2010 Sep;25(5):727-32. Epub 2010 Jun 3.

Fávaro-Pípi E, Ribeiro DA, Ribeiro JU, Bossini P, Oliveira P, Parizotto NA, et al. Low-level laser therapy induces differential expression of osteogenic genes during bone repair in rats. *Photomed Laser Surg.* 2011 May;29(5):311-7. doi: 10.1089/pho.2010.2841. Epub 2011 Feb 9.

Fischer DJ, Epstein JB. Management of patients who have undergone head and neck cancer therapy. *Dent Clin North Am.* 2008 Jan;52(1):39-60, viii.

Fujita M, Hirokawa Y, Kashiwado K, Akagi Y, Kashimoto K, Kiri H, et al. An analysis of mandibular bone complications in radiotherapy for T1 and T2 carcinoma of the oral tongue. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1996 Jan 15;34(2):333-9.

Garavello I, Baranauskas V, da Cruz-Höfling MA. The effects of low laser irradiation on angiogenesis in injured rat tibiae. *Histol Histopathol.* 2004 Jan;19(1):43-8. Available from URL:
http://www.hh.um.es/pdf/Vol_19/19_1/Garavello-19-43-48-2004.pdf

Garavello-Freitas I, Baranauskas V, Joazeiro PP, Padovani CR, Dal Pai-Silva M, da Cruz-Höfling MA. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. *J Photochem Photobiol B.* 2003 May-Jun;70(2):81-9.

Glanzmann C, Gratz KW. Radionecrosis of the mandibula: a retrospective analysis of the incidence and risk factors. *Radiother Oncol.* 1995 Aug;36(2):94-100.

Glowacki J. Angiogenesis in fracture repair. *Clin Orthop Relat Res.* 1998 Oct;(355 Suppl):S82-9.

Gumieiro EH, Abrahão M, Jahn RS, Segretto H, Alves MT, Nannmark U, Granström G, Dib LL. Platelet-rich plasma in bone repair of irradiated tibiae of Wistar rats. *Acta Cir Bras.* 2010 Jun;25(3):257-63.

Hurvitz KA, Kobayashi M, Evans GR. Current options in head and neck reconstruction. *Plast Reconstr Surg.* 2006 Oct;118(5):122e-133e.

Ihsan FR. Low-level laser therapy accelerates collateral circulation and enhances microcirculation. *Photomed Laser Surg.* 2005 Jun;23(3):289-94.

Jacobsson M, Nannmark U, Turesson I. Acute microvascular reactions to ionizing irradiation in bone-anchored titanium implants: a vital microscopic study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1987 Winter;2(4):193-6.

Jerezek-Fossa BA, Orecchia R. Radiotherapy-induced mandibular bone complications. *Cancer Treat Rev.* 2002 Feb;28(1):65-74.

Khakh BS, Burnstock G. The double life of ATP. *Sci Am.* 2009 Dec;301(6):84-90, 92.

Karu T, Smolyaninova N, Zelenin A. Long-term and short-term responses of human lymphocytes to He-Ne laser radiation. *Lasers Life Sci.* 1991;4(3):167-78.

Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B.* 1999 Mar;49(1):1-17.

Karu T. Mitochondrial mechanisms of photobiomodulation in context of new data about multiple roles of ATP. *Photomed Laser Surg.* 2010 Apr;28(2):159-60.

Kelishadi SS, St-Hilaire H, Rodriguez ED. Is simultaneous surgical management of advanced craniofacial osteoradionecrosis cost-effective? *Plast Reconstr Surg.* 2009 Mar;123(3):1010-7.

Kiyohara S, Sakurai T, Kashima I. Early detection of radiation-induced structural changes in rat trabecular bone. *Dentomaxillofac Radiol.* 2003 Jan;32(1):30-8.

Liu X, Lyon R, Meier HT, Thometz J, Haworth ST. Effect of lower-level laser therapy on rabbit tibial fracture. *Photomed Laser Surg.* 2007 Dec;25(6):487-94.

Lorente CA, Song BZ, Donoff RB. Healing of bony defects in the irradiated and unirradiated rat mandible. *J Oral Maxillofac Surg.* 1992 Dec;50(12):1305-9.

Luger EJ, Rochkind S, Wollman Y, Kogan G, Dekel S. Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. *Lasers Surg Med.* 1998;22(2):97-102.

Madrid C, Abarca M, Bouferrache K. Osteoradionecrosis: an update. *Oral Oncol.* 2010 Jun;46(6):471-4. Epub 2010 May 10.

Marotti G. Decrement in volume of osteoblasts during osteon formation and its effect on the size of the corresponding osteocytes. In: Meunier PJ (ed) Bone histomorphometry: Second International Workshop. Paris: Armour Montague. 1976 Jun-Jul:385-97.

Marx RE, Ehler WJ, Peleg M. "Mandibular and facial reconstruction" rehabilitation of the head and neck cancer patient. *Bone*. 1996 Jul;19(1 Suppl):59S-82S.

Marx RE. Osteoradionecrosis: a new concept of its pathophysiology. *J Oral Maxillofac Surg*. 1983a May;41(5):283-8.

Marx RE. A new concept in the treatment of osteoradionecrosis. *J Oral Maxillofac Surg*. 1983b Jun;41(6):351-7.

Marx RE. Current advances in reconstruction of the mandible in head and neck cancer surgery. *Semin Surg Oncol*. 1991 Jan-Feb;7(1):47-57.

Matsumoto MA, Ferino RV, Monteleone GF, Ribeiro DA. Low-level laser therapy modulates cyclo-oxygenase-2 expression during bone repair in rats. *Lasers Med Sci*. 2009 Mar;24(2):195-201.

Miró L, Coupe M, Charras C, Jambon C, Chevalier JM. Estudio capiloscopico de la acción de un láser de AsGa sobre la microcirculación. *Inv Clin Laser*. 1984;1(2):9-14.

-
- National Cancer Institute. Oropharyngeal Cancer Treatment (PDQ®) [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute [acesso em 2010 Nov 11]. Available from URL: <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/oropharyngeal/Patient/page4>.
- Nicola RA, Jorgetti V, Rigau J, Pacheco MTT, dos Reis LM, Zângaro RA. Effect of low-power GaAlAs laser (660 nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. *Lasers Med Sci*. 2003;18(2):89-94.
- Oh HK, Chambers MS, Martin JW, Lim HJ, Park HJ. Osteoradionecrosis of the mandible: treatment outcomes and factors influencing the progress of osteoradionecrosis. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009 Jul;67(7):1378-86.
- Ohrnell LO, Brånemark R, Nyman J, Nilsson P, Thomsen P. Effects of irradiation on the biomechanics of osseointegration. An experimental in vivo study in rats. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 1997 Dec;31(4):281-93.
- Ohshiro T, Calderhead RG. Development of low reactive-level laser therapy and its present status. *J Clin Laser Med Surg*. 1991 Aug;9(4):267-75.
- Parliament M, Alidrisi M, Munroe M, Wolfaardt J, Scrimger R, Thompson H, et al. Implications of radiation dosimetry of the mandible in patients with carcinomas of the oral cavity and nasopharynx treated with intensity modulated radiation therapy. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2005 Mar;34(2):114-21.

Pernot M, Luporsi E, Hoffstetter S, Peiffert D, Aletti P, Marchal C, et al. Complications following definitive irradiation for cancers of the oral cavity and the oropharynx (in a series of 1134 patients). *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1997 Feb 1;37(3):577-85.

Pinheiro ALB, Gerbi MEMM. Photoengineering of bone repair processes. *Photomed Laser Surg.* 2006 Apr;24(2):169-78.

Pretel H, Lizarelli RF, Ramalho LT. Effect of low-level laser therapy on bone repair: histological study in rats. *Lasers Surg Med.* 2007 Dec;39(10):788-96.

Reuther T, Schuster T, Mende U, Kübler A. Osteoradionecrosis of the jaws as a side effect of radiotherapy of head and neck tumour patients--a report of a thirty year retrospective review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2003 Jun;32(3):289-95.

Sarti P, Giuffrè A, Barone MC, Forte E, Mastronicola D, Brunori M. Nitric oxide and cytochrome oxidase: reaction mechanisms from the enzyme to the cell. *Free Radic Biol Med.* 2003 Mar 1;34(5):509-20.

Savostin-Asling I, Silverman S Jr. Effects of therapeutic radiation on microstructure of the human mandible. *Am J Anat.* 1978 Feb;151(2):295-305.

Schweiger JW. Titanium implants in irradiated dog mandibles. *J Prosthet Dent.* 1989 Aug;62(2):201-5.

Silva Júnior AN, Pinheiro AL, Oliveira MG, Weismann R, Ramalho LM, Nicolau RA. Computerized morphometric assessment of the effect of low-level laser therapy on bone repair: an experimental animal study. *J Clin Laser Med Surg*. 2002 Apr;20(2):83-7.

Springer IN, Niehoff P, Açil Y, Marget M, Lange A, Warnke PH, et al. BMP-2 and bFGF in an irradiated bone model. *J Craniomaxillofac Surg*. 2008 Jun;36(4):210-7.

Studer G, Grätz KW, Glanzmann C. Osteoradionecrosis of the mandibula in patients treated with different fractionations. *Strahlenther Onkol*. 2004 Apr;180(4):233-40.

Studer G, Studer SP, Zwahlen RA, Huguenin P, Grätz KW, Lütolf UM, et al. Osteoradionecrosis of the mandible: minimized risk profile following intensity-modulated radiation therapy (IMRT). *Strahlenther Onkol*. 2006 May;182(5):283-8.

Takeda Y. Irradiation effect of low-energy laser on alveolar bone after tooth extraction. Experimental study in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1988 Dec;17(6):388-91.

Thorn JJ, Hansen HS, Specht L, Bastholt L. Osteoradionecrosis of the jaws: clinical characteristics and relation to the field of irradiation. *J Oral Maxillofac Surg*. 2000 Oct;58(10):1088-93; discussion 1093-5.

Thorn JJ, Hansen HS, Specht L, Bastholt L. Osteoradionecrosis of the jaws: clinical characteristics and relation to the field of irradiation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000 Oct;58(10):1088-93; discussion 1093-5.

Tolman DE, Taylor PF. Bone-anchored craniofacial prosthesis study: irradiated patients. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1996 Sep-Oct;11(5):612-9.

Trelles MA, Mayayo E. Bone fracture consolidates faster with low-power laser. *Lasers Surg Med.* 1987;7(1):36-45.

Tunér J, Hode L. It's all in the parameters: a critical analysis of some well-known negative studies on low-level laser therapy. *J Clin Laser Med Surg.* 1998 Oct;16(5):245-8.

Würzler KK, DeWeese TL, Sebald W, Reddi AH. Radiation-induced impairment of bone healing can be overcome by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J Craniofac Surg.* 1998 Mar;9(2):131-7.

Yaakobi T, Maltz L, Oron U. Promotion of bone repair in the cortical bone of the tibia in rats by low energy laser (He-Ne) irradiation. *Calcif Tissue Int.* 1996 Oct;59(4):297-300.

NORMAS ADOTADAS

NORMAS ADOTADAS

BIREME. Centro Latinoamericano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde. DeCS: descritores em ciências da saúde [citado em 01 jan 2011]. Disponível em: http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660.exe/decsserver/?IsisScript=../cgi-bin/decsserver/decsserver.xis&interface_language=p&previous_page=homepage&previous_task=NULL&task=start.

COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Princípios Éticos na Experimentação Animal [s.d.]. Disponível em: <http://www.fcfar.unesp.br/ceua/principios%20eticos%20na%20experimentacao%20animal%20cobeapdf>.

Distributed by Dept. of Veterinary Anatomy, Cornell University, 1983.

INMETRO. Sistema Internacional de Unidades. 8ª ed (revisada). Rio de Janeiro; 2007. Disponível em:

<http://www.inmetro.gov.br/infotec/publicacoes/Si.pdf>

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: writing and editing for biomedical publication [Internet]. Philadelphia (PA): ICMJE Secretariat office, American College of Physicians; [updated 2010 Apr; cited 2011 Jan 23]. Available from: URL: <http://www.icmje.org>.

International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature. Nômina Anatômica Veterinária. 3rd ed. New York: Ithaca; 1993.

Orientação normativa para elaboração e apresentação de teses: guia prático. Ferreira LM, coordenadora; Goldenberg S, Nahas FX, Barbosa MVJ, Ely PB, organizadores. São Paulo: Livraria Médica Editora; 2008.

ABSTRACT


ABSTRACT

INTRODUCTION: Ionizing radiation (IR) develops structural changes that delay and restrain bone tissue repair. The Low-Level Laser therapy (*LLLT*) unchains a qualitative and quantitative cell growth, accelerating the bone repair process. **OBJECTIVE:** To evaluate the effects of *LLLT* on the repair of tibias from rats subjected to IR. **METHOD:** 72 male and healthy Wistar were divided into four groups: Group I: Sham Control (18 tibias), Group II: LASER (18 tibias), Group III: IR (18 tibias), Group IV: IR and LASER (18 tibias). Groups III and IV were submitted to IR with a single dose (30Gy). Monocortical perforation (diameter 2.5mm) was surgically performed in the portion of the tibial dyaphysis. In Groups III and IV, the surgery occurred 28 days after IR. In groups II and IV, post-surgery, three applications of *LLLT* were carried out (GaALAs, 100mW, 808nm, 20s, 3.57 W/cm², 72J/cm², 2J), on alternate days. Samples were collected after 7, 14 and 21 days. Histomorphometry was processed by digital image analysis and cellularity was qualitatively analyzed. **RESULTS:** In all periods, there was a significant increase ($p < 0.006$) of new formed bone in Group IV when compared to Group III; no significant difference between Group I and Group IV was observed; the protocol of ionizing radiation reduced bone formation in Group III when compared to Group I. **CONCLUSION:** *LLLT* increased the newly formed bone area during the inflammatory phase, abbreviating the repair of rats tibias submitted to IR.

APÊNDICES

APÊNDICE 1.

FOLHA DE APROVAÇÃO DO PROTOCOLO CEP. 0252/06

	Universidade Federal de São Paulo Escola Paulista de Medicina	Comitê de Ética em Pesquisa Hospital São Paulo
São Paulo, 2 de junho de 2006. CEP 0525/06		
Ilmo(a). Sr(a). Pesquisador(a) MEIRE MAMAN FRACHER ABRAMOFF Co-Investigadores: Ronaldo Leite; Suzette Lucatto; Roberto Segreto; Helena Segreto; Arnaldo Guilherme; Carolina Santana; Emne Gumieiro; Luciano Dib; João Santos; Ricardo Jahn Disciplina/Departamento: Cabeça e Pescoço/Otorrinolaringologia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo Patrocinador: Recursos Próprios.		
<u>PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL</u>		
Ref: Projeto de pesquisa intitulado: “ Estudo sobre os efeitos do laser de baixa intensidade em tibias de ratos submetidas à radioterapia ”.		
CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Estudo experimental crônico em ratos wistar. RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: não se aplica. OBJETIVOS: Realizar um experimento comparativo com avaliação histomorfométrica em tibias de ratos para acompanhar e registrar os efeitos que o laser de baixa intensidade pode desempenhar no processo de reparação do osso previamente irradiado com altas doses de radioterapia. RESUMO: Serão utilizados 120 ratos wistar, machos, com idade variando entre 90 e 120 dias e pesando em média 350 g oriundos do CEDEME - Unifesp. Os animais serão divididos nos seguintes grupos: grupo 1, não irradiado e sem laser, (n=30); grupo 2, não irradiado com laser (n=30); grupo 3, irradiado sem laser (n=30) e grupo 4, irradiado com uso do laser (n=30); Após o ato cirúrgico as datas de sacrifício dos animais (n=5 de cada grupo) serão: 4, 7, 14, 21, 56, 84 dias. A anestesia geral será induzida e mantida por injeções intraperitoneais de ketamina e xilazina de 100mg/kg. Os animais serão irradiados na dose de 30 GY no serviço de radioterapia da Unifesp e realizada a cirurgia após 30 a 40 dias após a irradiação, e serão realizadas 3 irradiações com laser de baixa intensidade, sendo a primeira no ato cirúrgico, a segunda após 48hs e a terceira após 72h do ato cirúrgico. Sob efeito anestésico, será realizada a tricotomia das patas posteriores com técnica cirúrgica descrita para a confecção do defeito ósseo, sendo a face medial da tibia exposta e realizadas as osteotomias em ambas as tibias para que o animal utilize as duas patas da mesma forma. Os animais serão sacrificados com pentobarbital ip, na dose de 100mg/kg, com dissecações das patas operadas, e o material coletado (periósteo, músculo e fásia) fixadas em formol para análise histológica e histomorfométrica. FUNDAMENTOS E RACIONAL: Visa avaliar histomorfométricamente o efeito do laser de baixa intensidade no processo de reparação em tecido ósseo previamente irradiado. MATERIAL E MÉTODO: descritos os procedimentos cirúrgicos e laboratoriais com equipe especializada. DETALHAMENTO FINANCEIRO: sem financiamento específico R\$ 8800,00. CRONOGRAMA: 06 meses.		
Rua Botucatu, 572 - 1º andar – conj. 14 - CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil Tel.: (011) 5571-1062 - 5539.7162		
1		



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

OBJETIVO ACADÊMICO: mestrado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 28/5/2007 e 22/5/2008.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

APÊNDICE 2. TABELAS

TABELA 10. Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo I no período de sete dias - primeira avaliação.

Lâmina	Área negativa	Área da imagem	Área de osso	Somatória da área de osso	Área média
		77571,77			30851,56
A7	50632,75		26939,02		
	54288,64		23283,13		
	59672,75		17899,02		
	55464,17		22107,60		
				90228,77	
A8	38698,66		38873,11		
	51444,09		26127,68		
	46709,29		30862,48		
	32602,39		44969,38		
				140832,65	
A9	39092,05		38479,72		
	40679,01		36892,76		
	43495,35		34076,42		
	30059,35		47512,42		
				156961,32	
A10	34430,05		43141,72		
	39583,10		37988,67		
	46959,19		30612,58		
	58418,71		19153,06		
				130896,03	
A11	46338,83		31232,94		
	58364,01		19207,76		
	60239,34		17332,43		
	48028,08		29543,69		
				97316,82	
A12	49800,75		27771,02		
	37130,44		40441,33		
	47906,92		29664,85		
	51246,91		26324,86		
				124202,06	

TABELA 11. Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo II no período de sete dias - primeira avaliação.

Lâmina	Área negativa	Área da imagem	Área de osso	Somatória da área de osso	Área média
		77571,77			41421,66
A50	42776,24		34795,53		
	41826,70		35745,07		
	37833,73		39738,04		
	33766,20		43805,57		
				154084,21	
A51	36124,01		41447,76		
	34060,88		43510,89		
	40615,99		36955,78		
	28604,81		48966,96		
				170881,39	
A53	27885,53		49686,24		
	34276,33		43295,44		
	48390,18		29181,59		
	38032,95		39538,82		
				161702,09	
A54	40417,49		37154,28		
	37596,16		39975,61		
	37195,62		40376,15		
	36765,87		40805,90		
				158311,94	
A55	32874,61		44697,16		
	37915,78		39655,99		
	42401,91		35169,86		
	34509,43		43062,34		
				162585,35	
A56	28288,98		49282,79		
	27370,13		50201,64		
	34671,50		42900,27		
	33401,49		44170,28		
				186554,98	

TABELA 12. Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo III no período de sete dias - primeira avaliação.

Lâmina	Área negativa	Área da imagem	Área de osso	Somatória da área de osso	Área média
		77571,77			10738,82
A41	77571,77		0		
	77571,77		0		
	73149,78		4421,99		
	47937,50		29634,27		
				34056,26	
A42	46152,74		31419,03		
	32011,27		45560,50		
	38101,35		39470,42		
	32505,40		45066,37		
				161516,32	
A43	77571,77		0		
	61631,20		15940,57		
	77571,77		0		
	77571,77		0		
				15940,57	
A44	77571,77		0		
	77571,77		0		
	77571,77		0		
	77571,77		0		
				0	
A69	77571,77		0		
	77571,77		0		
	77571,77		0		
	58492,51		19079,26		
				19079,26	
A70	77571,77		0		
	77571,77		0		
	77571,77		0		
	50432,29		27139,48		
				27139,48	

TABELA 13. Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo VI no período de sete dias - primeira avaliação.

Lâmina	Área negativa	Área da imagem	Área de osso	Somatória da área de osso	Área média
		77571,77			26313,64
A1	47987,35		29584,42		
	45712,64		31859,13		
	36685,34		40886,43		
	47006,46		30565,31		
				132895,29	
A2	43018,59		34553,18		
	53510,48		24061,29		
	48266,85		29304,92		
	40358,39		37213,38		
				125132,77	
A45	62564,98		15006,79		
	32704,24		44867,53		
	56880,42		20691,35		
	71392,78		6178,99		
				86744,66	
A46	70586,78		6984,99		
	77571,77		0		
	64281,76		13290,01		
	62189,76		15382,01		
				35657,01	
A47	39103,60		38468,17		
	42933,21		34638,56		
	40444,77		37127,00		
	30546,08		47025,69		
				157259,42	
A48	51186,03		26385,74		
	54732,35		22839,42		
	52752,70		24819,07		
	57777,66		19794,11		
				93838,34	

TABELA 14. Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo I no período de 14 dias - primeira avaliação.

Lâmina	Área negativa	Área da imagem	Área de osso	Somatória da área de osso	Área média
		77571,77			50931,09
A19	47920,06		29651,71		
	48769,97		28801,80		
	44746,99		32824,78		
	51691,05		25880,72		
				117159,01	
A20	34146,80		43424,97		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
				276140,28	
A21	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
				310287,08	
A28	60971,13		16600,64		
	55018,19		22553,58		
	54371,48		23200,29		
	41523,14		36048,63		
				98403,14	
A25	41549,98		36021,79		
	41902,14		35669,63		
	48164,95		29406,82		
	33710,98		43860,79		
				144959,03	
A26	34889,40		42682,37		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
				275397,68	

TABELA 15. Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo II no período de 14 dias - primeira avaliação.

Lâmina	Área negativa	Área da imagem	Área de osso	Somatória da área de osso	Área média
A31	0	77571,77	77571,77	310287,08	49592,37
	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
A32	44693,17		32878,60	102736,52	
	59770,22		17801,55		
	55971,39		21600,38		
	47115,78		30455,99		
A33	0		77571,77	310287,08	
	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
A57	21792,06		55779,71	159818,23	
	31308,28		46263,49		
	49762,86		27808,91		
	47605,65		29966,12		
A58	39536,15		38035,62	116758,16	
	55998,21		21573,56		
	58346,29		19225,48		
	39648,27		37923,50		
A65	26515,80		51055,97	190330,03	
	25326,99		52244,78		
	35889,10		41682,67		
	32225,16		45346,61		

TABELA 16. Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo III no período de 14 dias - primeira avaliação.

Lâmina	Área negativa	Área da imagem	Área de osso	Somatória da área de osso	Área média
		77571,77			25360,31
A71	35228,82		42342,95		
	34783,60		42788,17		
	38899,29		38672,48		
	46075,98		31495,79		
				155299,39	
A72	77571,77		0		
	43176,70		34395,07		
	39812,25		37759,52		
	37355,80		40215,97		
				112370,56	
A73	36847,62		40724,15		
	56436,53		21135,24		
	51918,09		25653,68		
	41289,62		36282,15		
				123795,22	
A74	52345,59		25226,18		
	41968,72		35603,05		
	29130,61		48441,16		
	31055,81		46515,96		
				155786,35	
A78	67380,45		10191,32		
	73444,72		4127,05		
	67021,56		10550,21		
	41032,27		36539,50		
				61408,08	
A79	77571,77		0		
	77571,77		0		
	77571,77		0		
	77571,77		0		
				0	

TABELA 17. Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo IV no período de 14 dias - primeira avaliação.

Lâmina	Área negativa	Área da imagem	Área de osso	Somatória da área de osso	Área média
		77571,77			48819,52
A17	38178,15		39393,62		
	39891,39		37680,38		
	35793,38		41778,39		
	27480,17		50091,60		
				168943,99	
A18	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
				310287,08	
A67	29635,67		47936,10		
	44072,54		33499,23		
	26875,14		50696,63		
	16470,67		61101,10		
				193233,06	
A68	31923,47		45648,30		
	36510,01		41061,76		
	37988,72		39583,05		
	29202,03		48369,74		
				174662,85	
A59	49952,05		27619,72		
	27893,13		49678,64		
	36075,96		41495,81		
	15076,32		62495,45		
				181289,62	
A60	33879,62		43692,15		
	38425,20		39146,57		
	46185,79		31385,98		
	48544,56		29027,21		
				143251,91	

TABELA 18. Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo I no período de 21 dias - primeira avaliação.

Lâmina	Área negativa	Área da imagem	Área de osso	Somatória da área de osso	Área média
		77571,77			68860,41
A29	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
				310287,08	
A30	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
				310287,08	
A89	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
				310287,08	
A90	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
				310287,08	
A91	9568,76		68003,01		
	20786,80		56784,97		
	22623,36		54948,41		
	25219,93		52351,84		
				232088,23	
A88	25879,24		51692,53		
	36278,18		41293,59		
	30645,65		46926,12		
	38070,59		39501,18		
				179413,42	

TABELA 19. Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo II no período de 21 dias - primeira avaliação.

Lâmina	Área negativa	Área da imagem	Área de osso	Somatória da área de osso	Área média
		77571,77			72641,99
A34	10080,05		67491,72		
	3615,75		73956,02		
	21779,26		55792,51		
	20622,43		56949,34		
				254189,59	
A35	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
				310287,08	
A36	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
				310287,08	
A92	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
				310287,08	
A93	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
				310287,08	
A87	9250,54		68321,23		
	16225,19		61346,58		
	12395,07		65176,70		
	24346,27		53225,50		
				248070,01	

TABELA 20. Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo III no período de 21 dias - primeira avaliação.

Lâmina	Área negativa	Área da imagem	Área de osso	Somatória da área de osso	Área média
		77571,77			36851,38
A84	37881,20		39690,57		
	29052,81		48518,96		
	10260,05		67311,72		
	8870,80		68700,97		
				224222,22	
A85	57810,19		19761,58		
	60414,59		17157,18		
	36948,63		40623,14		
	39102,07		38469,70		
				116011,60	
A86	57559,20		20012,57		
	42709,70		34862,07		
	41938,32		35633,45		
	38021,34		39550,43		
				130058,52	
A75	64523,44		13048,33		
	61405,21		16166,56		
	77571,77		0		
	77571,77		0		
				29214,89	
A76	31300,70		46271,07		
	68154,62		9417,15		
	34091,21		43480,56		
	35231,31		42340,46		
				141509,24	
A77	0		77571,77		
	0		77571,77		
	35951,28		41620,49		
	30919,13		46652,64		
				243416,67	

TABELA 21. Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo IV no período de 21 dias - primeira avaliação.

Lâmina	Área negativa	Área da imagem	Área de osso	Somatória da área de osso	Área média
		77571,77			66108,45
A94	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
				310287,08	
A83	34463,41		43108,36		
	37714,48		39857,29		
	47185,46		30386,31		
	39202,54		38369,23		
				151721,19	
A95	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
				310287,08	
A62	11853,44		65718,33		
	26686,26		50885,51		
	7739,01		69832,76		
	5783,52		71788,25		
				258224,85	
A96	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
				310287,08	
A97	19400,82		58170,95		
	12201,46		65370,31		
	23566,75		54005,02		
	9322,31		68249,46		
				245795,74	

TABELA 22. Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo I no período de sete dias - segunda avaliação.

Lâmina	Área negativa	Área da imagem	Área de osso	Somatória da área de osso	Área média
		77571,77			30920,05
A7	50658,49		26913,28		
	55791,75		21780,02		
	61634,53		15937,24		
	55414,12		22157,65		
				86788,19	
A8	40568,25		37003,52		
	51240,59		26331,18		
	47577,90		29993,87		
	34743,46		42828,31		
				136156,88	
A9	37651,63		39920,14		
	37258,06		40313,71		
	40034,40		37537,37		
	29665,63		47906,14		
				165677,36	
A10	35891,09		41680,68		
	39681,33		37890,44		
	47381,68		30190,09		
	53275,82		24295,95		
				134057,16	
A11	44264,49		33307,28		
	56457,97		21113,80		
	59283,89		18287,88		
	53058,20		24513,57		
				97222,53	
A12	46640,83		30930,94		
	41026,06		36545,71		
	50087,53		27484,24		
	50353,48		27218,29		
				122179,18	

TABELA 23. Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo II no período de sete dias - segunda avaliação.

Lâmina	Área negativa	Área da imagem	Área de osso	Somatória da área de osso	Área média
		77571,77			40886,42
A50	42628,24		34943,53		
	40238,14		37333,63		
	38563,77		39008,00		
	32881,18		44690,59		
				155975,75	
A51	36302,86		41268,91		
	38418,47		39153,30		
	37755,58		39816,19		
	30828,59		46743,18		
				166981,58	
A53	29301,60		48270,17		
	35156,35		42415,42		
	48673,55		28898,22		
	37382,26		40189,51		
				159773,32	
A54	40564,68		37007,09		
	38197,88		39373,89		
	37820,38		39751,39		
	36907,54		40664,23		
				156796,60	
A55	33137,25		44434,52		
	38426,88		39144,89		
	42701,37		34870,40		
	35211,71		42360,06		
				160809,87	
A56	30555,57		47016,20		
	30341,67		47230,10		
	35585,58		41986,19		
	32867,12		44704,65		
				180937,14	

TABELA 24. Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo III no período de sete dias - segunda avaliação.

Lâmina	Área negativa	Área da imagem	Área de osso	Somatória da área de osso	Área média
		77571,77			10015,75
A41	77571,77		0		
	77571,77		0		
	71538,49		6033,28		
	50245,96		27325,81		
				33359,09	
A42	50393,08		27178,69		
	41437,05		36134,72		
	39077,56		38494,21		
	36166,84		41404,93		
				143212,55	
A43	77571,77		0		
	61629,17		15942,6		
	77571,77		0		
	77571,77		0		
				15942,60	
A44	77571,77		0		
	77571,77		0		
	77571,77		0		
	77571,77		0		
				0	
A69	77571,77		0		
	77571,77		0		
	77571,77		0		
	55818,65		21753,12		
				21753,12	
A70	77571,77		0		
	77571,77		0		
	77571,77		0		
	51461,06		26110,71		
				26110,71	

TABELA 25. Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo IV no período de sete dias - segunda avaliação.

Lâmina	Área negativa	Área da imagem	Área de osso	Somatória da área de osso	Área média
		77571,77			25671,39
A1	47933,18		29638,59		
	47197,17		30374,60		
	42666,59		34905,18		
	46964,26		30607,51		
				125525,88	
A2	46544,15		31027,62		
	56077,51		21494,26		
	49133,13		28438,64		
	41112,39		36459,38		
				117419,90	
A45	33786,19		43785,58		
	53654,69		23917,08		
	69483,03		8088,74		
	61888,50		15683,27		
				91474,67	
A46	70450,43		7121,34		
	77571,77		0		
	62357,58		15214,19		
	70775,90		6795,87		
				29131,40	
A47	39652,32		37919,45		
	39669,00		37902,77		
	44377,67		33194,10		
	32173,42		45398,35		
				154414,67	
A48	49656,57		27915,20		
	54847,52		22724,25		
	51938,77		25633,00		
	55697,19		21874,58		
				98147,03	

TABELA 26. Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo I no período de 14 dias - segunda avaliação.

Lâmina	Área negativa	Área da imagem	Área de osso	Somatória da área de osso	Área média
		77571,77			50722,15
A19	48628,56		28943,21		
	48023,32		29548,45		
	45693,66		31878,11		
	52372,31		25199,46		
				115569,23	
A20	36259,60		41312,17		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
				274027,48	
A21	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
				310287,08	
A28	61663,27		15908,50		
	56071,65		21500,12		
	54695,45		22876,32		
	43894,38		33677,39		
				93962,33	
A25	39520,97		38050,80		
	42017,34		35554,43		
	48175,31		29396,46		
	32476,38		45095,39		
				148097,08	
A26	34898,47		42673,30		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
				275388,61	

TABELA 27. Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo II no período de 14 dias - segunda avaliação.

Lâmina	Área negativa	Área da imagem	Área de osso	Somatória da área de osso	Área média
		77571,77			49449,98
A31	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
				310287,08	
A32	44944,17		32627,60		
	59594,94		17976,83		
	55832,74		21739,03		
	46057,43		31514,34		
				103857,80	
A33	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
				310287,08	
A57	22449,66		55122,11		
	31235,56		46336,21		
	50318,89		27252,88		
	47850,36		29721,41		
				158432,61	
A58	40925,43		36646,34		
	57283,74		20288,03		
	59394,99		18176,78		
	40175,52		37396,25		
				112507,40	
A65	27530,46		50041,31		
	24316,44		53255,33		
	36073,40		41498,37		
	30939,03		46632,74		
				191427,75	

TABELA 28. Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo III no período de 14 dias - segunda avaliação.

Lâmina	Área negativa	Área da imagem	Área de osso	Somatória da área de osso	Área média
		77571,77			24290,50
A71	37568,81		40002,96		
	38768,78		38802,99		
	40183,56		37388,21		
	46698,14		30873,63		
				147067,79	
A72	77571,77		0		
	45114,92		32456,85		
	41570,92		36000,85		
	39700,35		37871,42		
				106329,12	
A73	42352,16		35219,61		
	58912,82		18658,95		
	57148,58		20423,19		
	44891,46		32680,31		
				106982,06	
A74	52281,90		25289,87		
	39509,41		38062,36		
	28463,50		49108,27		
	31444,16		46127,61		
				158588,11	
A78	67458,21		10113,56		
	73719,71		3852,06		
	66321,34		11250,43		
	38782,67		38789,10		
				64005,15	
A79	77571,77		0		
	77571,77		0		
	77571,77		0		
	77571,77		0		
				0	

TABELA 29. Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo IV no período de 14 dias - segunda avaliação.

Lâmina	Área negativa	Área da imagem	Área de osso	Somatória da área de osso	Área média
		77571,77			48868,60
A17	38660,18		38911,59		
	39858,83		37712,94		
	36133,52		41438,25		
	26325,95		51245,82		
				169308,60	
A18	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
				310287,08	
A67	30206,63		47365,14		
	43688,72		33883,05		
	27859,43		49712,34		
	16432,05		61139,72		
				192100,25	
A68	35343,73		42228,04		
	36234,52		41337,25		
	38713,22		38858,55		
	30980,06		46591,71		
				169015,55	
A59	49071,25		28500,52		
	25653,60		51918,17		
	35436,87		42134,90		
	15079,11		62492,66		
				185046,25	
A60	33478,36		44093,41		
	36120,21		41451,56		
	45383,32		32188,45		
	48216,51		29355,26		
				147088,68	

TABELA 30. Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo I no período de 21 dias - segunda avaliação.

Lâmina	Área negativa	Área da imagem	Área de osso	Somatória da área de osso	Área média
		77571,77			68958,62
A29	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
				310287,08	
A30	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
				310287,08	
A89	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
				310287,08	
A90	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
				310287,08	
A91	10285,88		67285,89		
	21017,88		56553,89		
	23758,67		53813,10		
	25153,50		52418,27		
				230071,15	
A88	25150,25		52421,52		
	36340,83		41230,94		
	28902,34		48669,43		
	36106,24		41465,53		
				183787,42	

TABELA 31. Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo II no período de 21 dias - segunda avaliação.

Lâmina	Área negativa	Área da imagem	Área de osso	Somatória da área de osso	Área média
		77571,77			72513,53
A34	10359,05		67212,72		
	3668,54		73903,23		
	22543,62		55028,15		
	24000,15		53571,62		
				249715,72	
A35	0	77571,77			
	0	77571,77			
	0	77571,77			
	0	77571,77			
				310287,08	
A36	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
				310287,08	
A92	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
				310287,08	
A93	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
				310287,08	
A87	8929,65		68642,12		
	16109,83		61461,94		
	11503,18		66068,59		
	24283,67		53288,10		
				249460,75	

TABELA 32. Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo III no período de 21 dias - segunda avaliação.

Lâmina	Área negativa	Área da imagem	Área de osso	Somatória da área de osso	Área média
		77571,77			37190,73
A84	38115,73		39456,04		
	29176,55		48395,22		
	10456,56		67115,21		
	9413,45		68158,32		
				223124,79	
A85	57502,61		20069,16		
	60412,58		17159,19		
	36387,25		41184,52		
	38568,46		39003,31		
				117416,18	
A86	58019,53		19552,24		
	42557,43		35014,34		
	39845,67		37726,10		
	37467,31		40104,46		
				132397,14	
A75	64112,62		13459,15		
	60279,47		17292,30		
	77571,77		0		
	77571,77		0		
				30751,45	
A76	30365,09		47206,68		
	68134,62		9437,15		
	32598,12		44973,65		
	33078,64		44493,13		
				146110,61	
A77	0		77571,77		
	0		77571,77		
	35850,50		41721,27		
	31659,04		45912,73		
				242777,54	

TABELA 33. Valores das mensurações da área de osso neoformado em μm^2 do grupo IV no período de 21 dias - segunda avaliação.

Lâmina	Área negativa	Área da imagem	Área de osso	Somatória da área de osso	Área média
		77571,77			66401,21
A94	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
				310287,08	
A83	34463,41		43108,36		
	37542,78		40028,99		
	46733,72		30838,05		
	38969,51		38602,26		
				152577,66	
A95	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
				310287,08	
A62	11928,93		65642,84		
	26665,32		50906,45		
	6576,95		70994,82		
	4475,80		73095,97		
				260640,08	
A96	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
	0		77571,77		
				310287,08	
A97	19489,94		58081,83		
	10760,85		66810,92		
	22200,92		55370,85		
	8285,20		69286,57		
				249550,17	

TABELA 34. Valores médios da área de osso neoformado (μm^2) nos quatro grupos no período de 7 dias na primeira e na segunda avaliação.

	1ª Avaliação				2ª Avaliação			
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Média	30.852	41.422	10.739	26.314	30.920	40.886	10.016	25.671
Desvio Padrão	8.767	5.180	16.334	12.435	8.525	4.529	14.781	11.978
n	6	6	6	6	6	6	6	6
p-valor	<0,001*				<0,001*			

Teste de Kruskal-Wallis

n - Número de lâminas analisadas

p-valor - Valor estatístico com nível de significância $p \leq 0,05$

TABELA 35. Valores estatísticos¹ da área de osso neoformado (μm^2) dos grupos I, II, III e IV nos períodos de 7 dias na primeira e segunda avaliação.

	Grupos	Grupo I	Grupo II	Grupo III
		p-valor	p-valor	p-valor
1ª Avaliação	II	<0,006*		
	III	<0,006*	<0,006*	
	IV	1	<0,006*	0,006*
2ª Avaliação	II	<0,006*		
	III	<0,006*	<0,006*	
	IV	1	<0,006*	<0,006*

Teste de Mann Whitney

p-valor - Valor estatístico com nível de significância $p \leq 0,05$

¹ - Corrigido para comparação múltipla (Correção de Bonferroni).

TABELA 36. Valores médios da área de osso neoformado (μm^2) nos quatro grupos no período de 14 dias na primeira e na segunda avaliação.

	1ª Avaliação				2ª Avaliação			
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Média	50.931	49.592	25.361	48.820	50.722	49.450	24.291	48.869
Desvio Padrão	23.831	22.533	17.399	15.636	24.047	22.686	16.849	15.543
n	6	6	6	6	6	6	6	6
<i>p</i> -valor	0,001*				<0,001*			

Teste de Kruskal-Wallis

n - Número de lâminas analisadas

p-valor - Valor estatístico com nível de significância $p \leq 0,05$

TABELA 37. Comparação dos valores estatísticos¹ entre os grupos no período de 14 dias na primeira e segunda avaliação.

	Grupos	Grupo I	Grupo II	Grupo III
		<i>p</i> -valor	<i>p</i> -valor	<i>p</i> -valor
1ª Avaliação	II	1		
	III	0,018*	0,012*	
	IV	1	1	<0,006*
2ª Avaliação	II	1		
	III	0,012*	0,006*	
	IV	1	1	<0,006*

Teste de Mann Whitney

p-valor - Valor estatístico com nível de significância $p \leq 0,05$

¹ - Corrigido para comparação múltipla (Correção de Bonferroni).

TABELA 38. Valores médios da área de osso neoformado (μm^2) nos quatro grupos no período de 21 dias na primeira e na segunda avaliação.

	1ª Avaliação				2ª Avaliação			
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Média	68.860	72.642	36.851	66.108	68.959	72.514	37.191	66.401
Desvio Padrão	13.553	8.146	22.008	15.228	13.280	8.476	21.960	15.150
n	6	6	6	6	6	6	6	6
<i>p</i> -valor	<0,001*				<0,001*			

Teste de Kruskal-Wallis

n - Número de lâminas analisadas

***p*-valor** - Valor estatístico com nível de significância $p \leq 0,05$

TABELA 39. Comparação dos valores estatísticos¹ entre os grupos no período de 21 dias na primeira e segunda avaliação.

	Grupos	Grupo I	Grupo II	Grupo III
		<i>p</i> -valor	<i>p</i> -valor	<i>p</i> -valor
1ª Avaliação	II	1		
	III	<0,006*	<0,006*	
	IV	1	0,91	<0,006*
2ª Avaliação	II	1		
	III	<0,006*	<0,006*	
	IV	1	1	<0,006*

Teste de Mann Whitney

***p*-valor** - Valor estatístico com nível de significância $p \leq 0,05$

¹ - Corrigido para comparação múltipla (Correção de Bonferroni)

TABELA 40A. Resultados da avaliação qualitativa

Lâmina	Reparação fibrovascular da medula	Presença de osteoblastos	Atividade osteoblástica	Presença de osteoclastos	Número do grupo	Data
A1	1	3	ativos	2	IV	7
A2	1	3	ativos	2	IV	7
A7	1	2	ativos	3	I	7
A8	1	3	ativos	ausente	I	7
A9	1	3	ativos	ausente	I	7
A10	1	3	ativos	3	I	7
A11	2	3	ativos	ausente	I	7
A12	2	3	ativos	ausente	I	7
A17	3	2	ativos	3	IV	14
A18	5	1	ativos	ausente	IV	14
A19	3	2	ativos	3	I	14
A20	4	1	ativos	3	I	14
A21	4	1	ativos	3	I	14
A25	3	2	ativos	3	I	14
A26	5	2	ativos	3	I	14
A28	5	2	ativos	3	I	14
A29	5	1	ativos	ausente	I	21
A30	5	1	ativos	3	I	21
A31	5	2	ativos	2	II	14
A32	5	1	ativos	2	II	14
A33	5	1	ativos	2	II	14
A34	5	2	ativos	3	II	21
A35	5	0	inativo	ausente	II	21
A36	5	0	inativo	ausente	II	21
A41	1	1	ativos	ausente	III	7
A42	1	1	ativos	2	III	7
A43	2	3	ativos	2	III	7
A44	1	1	ativos	1	III	7
A45	2	3	ativos	1	IV	7
A46	1	1	ativos	ausente	IV	7
A47	2	3	ativos	3	IV	7
A48	1	3	ativos	3	IV	7
A50	1	3	ativos	2	II	7
A51	1	3	ativos	3	II	7
A53	5	0	inativo	ausente	II	7
A54	2	2	ativos	3	II	7

TABELA 40B. Resultados da avaliação qualitativa.

Lâmina	Reparação fibrovascular da medula	Presença de osteoblastos	Atividade osteoblástica	Presença de osteoclastos	Número do grupo	Data
A55	1	3	ativos	3	II	7
A56	1	3	ativos	3	II	7
A57	4	2	ativos	3	II	14
A58	4	3	ativos	3	II	14
A59	3	1	ativos	3	IV	14
A60	4	2	ativos	3	IV	14
A62	4	2	ativos	3	IV	21
A65	5	2	ativos	3	II	14
A67	3	2	ativos	3	IV	14
A68	3	3	ativos	3	IV	14
A69	1	1	ativos	1	III	7
A70	1	0	inativo	1	III	7
A71	3	2	ativos	3	III	14
A72	2	3	ativos	3	III	14
A73	3	2	ativos	3	III	14
A74	4	2	ativos	3	III	14
A75	3	2	ativos	2	III	21
A76	4	2	ativos	1	III	21
A77	3	3	ativos	2	III	21
A78	1	3	ativos	2	III	14
A79	1	2	ativos	1	III	14
A83	5	2	ativos	3	IV	21
A84	5	2	ativos	1	III	21
A85	4	2	ativos	3	III	21
A86	4	1	ativos	1	III	21
A87	5	1	ativos	ausente	II	21
A88	5	1	ativos	3	I	21
A89	5	0	inativo	ausente	I	21
A90	5	1	ativos	1	I	21
A91	5	3	ativos	3	I	21
A92	5	0	inativo	ausente	II	21
A93	5	0	inativo	ausente	II	21
A94	5	1	ativos	1	IV	21
A95	5	1	ativos	2	IV	21
A96	5	0	inativo	ausente	IV	21
A97	3	2	ativos	1	IV	21

FONTES CONSULTADAS

FONTES CONSULTADAS

Andersen ML, D'Almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF, Magalhães LE, et al. Princípios Éticos e Práticos no Uso de Animais de Experimentação. Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP - Escola Paulista de Medicina - Departamento de Psicobiologia. São Paulo: UNIFESP-Universidade Federal de São Paulo; 2004.

Siegel S, Castellan Jr., NJ. Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento. 2^a ed. Porto Alegre (RS): Artmed; 2006.