ANÁLISE COMPARATIVA DA TERAPIA LASER SOBRE PROCESSOS DE REPARO ÓSSEO

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE LASER THERAPY ON PROCESSES OF BONE REPAIR

Diego Segatto Blaya ¹
Angelo Luiz Freddo ²
Marília Gerhardt de Oliveira ³

¹ Doutor em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial; Professor Adjunto da Faculdade de Odontologia da UFSM

² Doutor em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial; Professor Adjunto da Faculdade de Odontologia da UFRGS

³ Doutora em Odontologia; Pesquisadora; Cirurgiã e Traumatologista Bucomaxilofacial do Grupo Hospitalar Conceição – Porto Alegre – RS - Brasil

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo avaliar, por meio de análise histológica, com a técnica HE, e molecular, com a técnica de Processamento da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real, a biomodulação do processo de reparo ósseo em cavidades confeccionadas em fêmures de ratos, submetidos à irradiação com laser não-ablativo. A periodicidade da irradiação foi a cada 48 horas, iniciando-se imediatamente após a confecção da lesão, com a morte dos animais sendo realizada no 15º, 21º e 30º dias. Os fenômenos teciduais avaliados foram o grau de fechamento da cortical óssea, o grau de neoformação óssea e a presença de invaginação do tecido conjuntivo. Nos grupos indicados para análise molecular, empregaram-se os mesmos protocolos e se avaliou a quantidade da proteína Osteopontina. Os resultados mostraram que não foram evidenciadas diferenças significativas na expressão desta proteína entre os grupos estudados; porém encontrou-se, na análise descritiva, um maior grau de fechamento cortical e de neoformação óssea nos grupos irradiados, quando comparados com o controle. Pôde-se concluir que, nos protocolos utilizados nesta pesquisa, a laserterapia atuou de forma eficiente no processo de reparo ósseo.

Descritores: Desenvolvimento ósseo, Terapia a laser de baixa intensidade; Osteogênese

ABSTRACT

The main objective of the present study is to evaluate, through histological analysis, using the HE technique, and molecular analysis, using the PCR technique in real time, the biomolding process of bone repair in cavities in femorals of mice, which were submitted to non-ablative Laser radiation. The radiation period was every 48 hours, initiated immediately after the injury production, with the animal's death being carried out in the 15th, 21st and 30th days. The evaluated tissue phenomena were the degree of bone cortical closure, the degree of bone neoformation, the presence of conjoint tissue invagination and the presence of pathological bone reabsorbance. In the groups indicated for molecular analysis, the same protocols were used and the quantity of osteopontin protein was evaluated. The results showed that there was no significant difference in the protein expression between the groups studied; nevertheless, in the descriptive analysis, a larger degree of cortical closure and of bone neoformation was found in the groups that received radiation, when compared to the control group. One can conclude that the protocols used in laser therapy were efficient in the bone repair process.

Key-Words: Bone Development, Laser Therapy, Low-Level, Osteogenesis

1-INTRODUÇÃO

Este artigo está de acordo com as normas da World Association of Laser Therapy (WALT) e segue os padrões e modelos recomendados por esta instituição, para pesquisas com lasers¹. O processo de cicatrização tecidual é complexo e envolve tanto respostas locais quanto sistêmicas. Normalmente, o processo de cicatrização óssea é mais lento que aquele dos tecidos moles. Apesar da literatura evidenciar diversos trabalhos a respeito dos benefícios da utilização do laser sobre a cicatrização em tecidos moles, os efeitos do laser não-ablativo no osso ainda são controversos, com estudos apresentando resultados conflitantes².

Nesta pesquisa avaliou-se o processo de reparo ósseo, após a confecção de cavidades cirúrgicas, em fêmures de ratos da linhagem *Wistar*, utilizando laser não ablativo, com comprimento de onda de 685nm (laser vermelho) e 830nm (laser infravermelho), por intermédio da análise histológica de lâminas coradas por técnica HE e por biologia molecular, com a técnica de PCR em tempo real.

2- REVISTA DE LITERATURA

A presença de mineral faz do osso um tecido único, não somente do ponto de vista biosintético, mas também do catabólico. A quantidade de tecido ósseo presente durante o crescimento fisiológico e a remodelação do esqueleto é determinada pelo balanço entre as taxas de formação óssea e reabsorção óssea. As células responsáveis pela reabsorção óssea são os osteoclastos, descritos originariamente por Albert Kölliker, em 1873. Trata-se de células gigantes e multinucleadas, formadas pela fusão de células mononucleares derivadas do tecido hematopoiético, sendo os únicos tipos capazes de reabsorver tecido ósseo³.

Conforme Derx et al.⁴ (1998), a matriz orgânica do osso é uma cadeia de proteínas bem-organizada. O principal constituinte é o colágeno tipo I. As proteínas não-colágenas compreendem quase 10% do conteúdo total de proteínas do osso. Várias dessas proteínas não-colágenas já foram identificadas, incluindo osteocalcina, osteopontina, osteonectina, sialoproteína óssea. Dentre elas, somente a osteocalcina e a osteopontina são específicas para o osso.

Conforme Ramoshebi et al.⁵ (2002), o osso possui uma estrutura de proteínas fortalecidas por fosfato de cálcio, além de uma capacidade regenerativa. O processo de formação ocorre a partir de uma dinâmica biológica que envolve processos bioquímicos, celulares e hormonais continuamente facilitados por um estado de deposição, reabsorção e remodelação ósseas. Na engenharia tecidual óssea existem três parâmetros fundamentais que determinam a capacidade de osteoindução: sinais osteoindutores solúveis, viabilidade de células mesenquimais indiferenciadas responder e se diferenciarem em células formadoras de osso e adequada matriz extracelular.

Conforme Brugnera et al.⁶ (1998), os lasers podem ser classificados em dois grandes grupos: os não-cirúrgicos ou LILT (*Low-Intensity Laser Treatment*) e os cirúrgicos ou HILT (*High-Intensity Laser Treatment*), sendo estes últimos subdivididos, conforme sua forma de emissão, em contínuos, pulsáteis e *Q-switched*. Em ambos os grupos, pode-se encontrar os meios ativos sólido, líquido, gasoso ou mistos.

Os lasers também podem ser classificados em vermelhos, com comprimento de onda variando de $\lambda=600$ a 680nm , e infravermelho, de espectro na faixa de $\lambda=700$ a 940nm . O comprimento de onda é determinado especificamente pelo meio contido no interior da câmara de ressonância óptica. Este meio pode ser sólido (Rubi, cristais de Nd:YAG, Er:YAG, Ho:YAG), líquido (lasers de corante, como o Rodamina) ou gasoso (CO_2 , lasers *Excimer*, ArF, XeCl)⁷.

A célula tem um limiar de sobrevivência, de acordo com o tecido onde ela está localizada e seu estado fisiológico. Quando se utiliza uma baixa intensidade de energia, estimula-se sua membrana ou suas mitocôndrias. Dessa forma está se induzindo essa célula a biomodulação, ou seja, ela trabalhará buscando um estado de normatização da região afetada. São indicadas principalmente em situações onde se busca melhor qualidade e maior rapidez do processo reparacional, como no pós-operatório, na reparação de tecido mole, ósseo e nervoso, em quadros de edema instalado, em que se procura a mediação do processo inflamatório, ou nos quadros de dor, sejam elas agudas ou crônicas. Quando, ao contrário, é oferecida uma densidade tão alta de energia a ponto de a mesma se transformar em dano

térmico e ultrapassar o limiar de sobrevivência dessa célula, estar-se-á utilizando o laser com indicações para termoablação, corte e coagulação dos tecidos⁸⁻¹⁰.

A laserterapia é usada na Biomedicina, principalmente para promover a regeneração tecidual. Dentre suas vantagens, destacam-se o controle da dor pós-operatória, a estimulação da cicatrização e a redução da inflamação. O aumento na produção de fibroblastos e colágeno, além do aumento da circulação sanguínea dentro do tecido regenerado, bem como os efeitos supressivos nas reações imunes, também são obtidos com a laserterapia¹¹.

O processo de reparo das feridas pode ser dividido em três fases: a celular, a proliferativa e a remodeladora. Conforme a maior parte dos relatos sobre bioestimulação a laser, os efeitos mais importantes da laserterapia ocorrem na fase de proliferação, pois acredita-se que o processo de metabolismo celular se acentua devido a fotorrecepção mitocondrial pela luz monocromática, sugerindo que o laser aumenta o metabolismo respiratório de certas células e, assim, modifica as propriedades eletrofisiológicas das mesmas¹².

Ozawa et al.¹³ (1998), verificaram a ação da irradiação de 500mW com laser de AsGaAl (830nm) em cultura de osteoblastos de ratos. Os resultados encontrados demonstraram que a irradiação promoveu maior proliferação celular e aumento da fosfatase alcalina. Ademais, os especialistas perceberam uma maior formação de nódulos ósseos nas culturas irradiadas após, 21 dias, e ressaltam dois pontos importantes em sua pesquisa: ocorreu estimulação da proliferação celular de osteoblastos e a irradiação provocou estímulo na diferenciação celular, observado pela maior diferenciação de células osteoblásticas e pelo incremento na formação óssea.

Dörtbudak et al.¹⁴ (2002) avaliaram o efeito do laser diodo (690nm) em culturas de osteoblastos de ratos. Três grupos, com 10 culturas em cada um, foram irradiados (três vezes) com um laser diodo (690nm), durante 60 segundos, com uma dose de 1,6J/cm² por aplicação, de forma pulsátil. Outros três grupos, também com 10 culturas em cada um, foram usados como grupos-controle. O método da fluorescência com tetraciclina foi utilizado para comparar o crescimento ósseo nos espécimes, após um período de oito, 12 e 16 dias. Os resultados mostraram que todos as culturas irradiadas apresentaram um depósito ósseo significativamente maior do que os grupos-controle. Os especialistas concluíram que a irradiação com laser diodo não-ablativo tem um efeito bioestimulador nos osteoblastos *in vitro*.

Da mesma forma como os osteoblastos, os odontoblastos também podem ser estimulados a formarem tecido ósseo ou dentina terciária em dentes irradiados por laserterapia. Tate et al.¹⁵ (2006), avaliaram através da técnica de HE e imunohistoquímica, a face mesial dos primeiros molares superiores de 103 ratos Wistar, irradiados com laser GaAlAs (infravermelho, 830 nm), diferentes potências (0.5, 1.0, 1.5W) e avaliados em períodos que variaram de 6 horas a 30 dias pós laserterapia. Os autores concluíram que a terapia a laser GaAlAs, desde que com adequada irradiação promove a formação de dentina terciária ou tecido ósseo em polpas que sofreram alguma injúria.

Silva Júnior et al.¹⁶ (2002) avaliaram a quantidade de osso neoformada após a irradiação com laser GaAlAs (infravermelho, 830 nm) em feridas cirúrgicas em fêmures de ratos. Na pesquisa, 40 ratos foram divididos em quatro grupos, com 10 animais em cada um, da seguinte maneira: grupo A (12 sessões, 4,8J/cm² por sessão, período de observação de 28 dias); grupo C (três sessões, 4,8J/cm² por sessão, período de observação de sete dias). Os grupos B e D serviram como controle, não recebendo irradiação. A morfometria computadorizada mostrou uma diferença significativa entre as áreas de osso mineralizado nos grupos C e D. Não houve diferença entre os grupos A e B. Os autores concluíram que, em condições experimentais, a terapia com laser não-ablativo de 830nm melhora a cicatrização óssea nos estágios iniciais.

Nicola et al.¹⁷ (2003) avaliaram a atividade de células ósseas após a laserterapia próxima ao sítio da lesão. Para o estudo, fêmures de 48 ratos foram perfurados. Os animais foram divididos em dois grupos: um grupo experimental, com 24 ratos, e um grupo controle, o qual não recebeu irradiação, também com 24 animais. O grupo experimental foi irradiado com o um laser GaAlAs (660nm, 10Jcm²) no segundo, quarto, sexto e oitavo dias após a cirurgia, com avaliação dos resultados por histomorfometria óssea. Os autores relataram que a atividade celular foi maior no grupo irradiado, quando comparado ao grupo controle e concluíram que a laserterapia aumenta a atividade nas células ósseas, tanto na reabsorção quanto na formação, ao redor do sítio de reparo, sem entretanto, alterar a estrutura óssea.

Weber et al.¹⁸(2006) avaliaram histologicamente a influência da radiação laser, utilizando um de diodo infravermelho (GaAlAs, 830nm, 50mW) no processo de reparo de enxertos ósseos autógenos. As feridas ósseas foram criadas em fêmures de 60 ratos *Wistar*, sendo que o fragmento ósseo removido foi utilizado como enxerto autógeno. Os animais foram divididos em quatro grupos, com 15 animais em cada, de acordo com o protocolo de irradiação no trans-operatório: G1 (grupo controle), G2 (irradiação na loja cirúrgica), G3 (irradiação no enxerto ósseo) e G4 (irradiação na loja cirúrgica e no enxerto ósseo). A dose de irradiação, durante o ato operatório, foi de 10J/cm², aplicada sobre a loja cirúrgica (G2 e G4) e sobre o enxerto ósseo (G3 e G4). Todos os animais, com exceção do grupo controle, receberam irradiação durante 15 dias, a cada 48 horas, com uma dose de 10J/cm² (4 x 2,5J/cm²). Os períodos de observação foram de 15, 21 e 30 dias. Os autores concluíram que, nos grupos nos quais o laser foi aplicado na loja cirúrgica, durante o trans-operatório (G2 e G4), a atividade de remodelação óssea foi, qualitativa e quantitativamente, mais exuberante quando comparados com os grupos G1 e G3, tendo um efeito de biomodulação positiva sobre o processo de reparo ósseo em enxertos ósseos quando aplicado no trans-operatório.

3- METODOLOGIA

Com o objetivo de verificar a ação da irradiação dos lasers infravermelho (830nm) e vermelho (685nm) sobre o processo de reparo ósseo, nos intervalos de tempo propostos, ratos albinos da linhagem *Wistar*, machos, com peso variando de 300 a 350 gramas, clinicamente sadios foram submetidos ao experimento, avaliando-se e comparando-se os resultados obtidos por meio de análises histológica e molecular.

Os animais foram selecionados, aleatoriamente, pesados e divididos em seis grupos distintos, com 6 animais em cada um, totalizando um n = 36. Desses, três grupos foram destinados à análise histológica e os outros três para análise molecular.

Em todos os grupos, o período de observação foi de 15, 21 e 30 dias após o procedimento cirúrgico. Desta forma, cada grupo foi subdividido em três subgrupos (A, B, e C), de acordo com o período de observação (Tabela 1).

Previamente ao procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos à anestesia geral com injeção intramuscular de anestésico (xilazina e quetamina).

Após a anestesia, os animais foram submetidos à tricotomia. A assepsia da região foi realizada com digluconato de clorexidina a 2%. Com um bisturi, realizou-se uma incisão contínua, na pele da região lateral da coxa direita de cada um dos animais. Os tecidos subcutâneo e muscular foram divulsionados com o auxílio de uma tesoura romba, permitindo, assim, acesso ao periósteo.

Para padronizar a localização da lesão óssea, foi inserido um parafuso de titânio medindo 3 mm de comprimento, na região da apófise medial do fêmur. A partir desse, mediu-se, com um compasso de ponta seca, outros 5 mm, tornando este o ponto de eleição para a trepanação com a trefina.

Com o fêmur exposto, em sua face lateral superior, utilizou-se a trefina de 2 mm de diâmetro, acoplada em um motor elétrico com 1000 rpm, associado à irrigação contínua com soro fisiológico. Foi removido o tecido ósseo, com área aproximada de 3 mm², cujo limite em sua profundidade foi a medula óssea.

Após esta fase, todos os tecidos foram reposicionados e suturados por planos com fio mononylon 5.0.

As regiões de irradiação laser, à distância de 5mm além do parafuso de titânio, usado como ponto de referência interno, foram tatuadas com tinta nanquim preta na pele dos animais. Este coincide com ponto central da loja cirúrgica, permitindo assim, uma padronização da região de aplicação do laser.

Nos grupos II e V, o aparelho utilizado foi o laser de diodo infravermelho (arseneto de Gálio-Alumínio; GaAlAs), com comprimento de onda de λ -830nm, com emissão contínua. A dose de irradiação, durante as sessões, foi de 10J/cm², aplicada de forma pontual e contínua, com 50mW de potência, pelo tempo de 1min 53s, logo após o término da cirurgia e a cada 48 horas, totalizando oito aplicações, no 15º dia.

Nos grupos III e VI, utilizou-se o laser vermelho (fosfeto de Gálio-Alumínio-Índio; InGaAlP) com comprimento de onda de λ -685nm, de modo pontual e emissão contínua. A dose, durante as sessões, também foi de 10J/cm², com 35mW de potência, por 2min 30s, totalizando oito aplicações.

Nos grupos I e IV (controles), os ratos passaram pelo mesmo procedimento dos grupos testados; porém, não foi acionado o laser, mantendo-se os animais imobilizados pelo mesmo tempo do grupo II.

Para a obtenção das amostras, os animais foram mortos aos 15, 21 e 30 dias de pós-operatório, usando-se uma câmara hermética de CO₂.

Para o processamento da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi utilizado o método de transcrição reversa seguido da PCR em tempo real (*real time*), para a quantificação de uma proteína marcadora de células osteoprogenitoras não-colágenas (osteopontina).

A região do reparo ósseo foi delimitada macroscopicamente e marcada com o auxílio de um paquímetro, no qual padronizou-se o material a ser analisado em 7mm de osso. Assim, o tecido ósseo foi particulado, com a utilização de uma lima para osso, na região delimitada previamente, sendo a mesma limpa e autoclavada a cada processo realizado, com o objetivo de se evitarem contaminações com RNAses, as quais degradariam o material a ser estudado. O produto dos 7 mm de osso particulado foi colocado em um *ependorf* para a devida padronização das quantidades de RNA das amostras, a fim de se dar início ao processo de extração dos ácidos nucléicos das amostras e sua posterior transcrição reversa para obtenção dos cDNAs. Com o propósito de padronizar as amostras, utilizou-se a mesma quantidade de cDNA de todas as amostras, que foram armazenadas a -20°C, para uma análise por *Real Time-PCR*.

A análise quantitativa da proteína osteopontina foi realizada por meio da técnica de RT-PCR com os seguintes oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos:

Osteopontina OPN D 5' gat gaa cca agc gtg gaa ac 3'
 OPN R 5' tga aac tcg tgg ctc tga tg 3'

O estudo das lâminas foi realizado com o emprego da microscopia óptica, visando ao estudo do processo de reparo ósseo. O fechamento da cortical óssea, a neoformação óssea e a invaginação do tecido conjuntivo para o interior do defeito ósseo foram os critérios utilizados para a avaliação do reparo ósseo.

4- RESULTADOS

A partir dos resultados do teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, verificou-se diferenças significativas no grau de fechamento vertical (Tabela 2) e no grau de neoformação óssea (Tabela 3) entre os grupos estudados. Observou-se que o grupo controle apresentou menores graus de fechamento vertical e de neoformação óssea do que os grupos laser infravermelho e laser vermelho, os quais não divergiram entre si ($p \leq 0,01$).

Segundo os resultados do teste qui-quadrado, verificou-se que não existiram diferenças significativas entre os grupos quanto a presença de corticalização ($p=0,09$) (Tabela 4).

Em nenhum dos animais testados foi encontrada invaginação do tecido conjuntivo para o interior da cavidade cirúrgica.

Também através dos resultados do teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, verificou-se que não havia diferenças significativas no grau de fechamento vertical e neoformação óssea entre os tempos estudados ($p=0,87$).

A partir dos resultados do teste qui-quadrado, verificou-se que existiu diferença significativa entre o tempo e a presença de corticalização (Tabela 5). Observou-se que a presença de corticalização é maior nos animais mortos no período de 30 dias ($p \leq 0,01$).

Para a verificação da normalidade dos dados foi utilizado o teste não-paramétrico Kolmogorov-Smirnov, o qual é considerado uma prova de aderência que diz respeito ao grau de concordância entre a distribuição de um conjunto de valores amostrais e determinada distribuição teórica específica. Neste caso, a distribuição foi normal. Para os dados do presente estudo, esta condição foi garantida, sendo, então, utilizado um teste paramétrico para análise dos dados.

Com o objetivo de comparar os grupos entre si, foram realizados os testes estatísticos Análise de Variância (ANOVA) e de comparações múltiplas de Tukey. Este teste aplica-se a situações nas quais o pesquisador deseja comparar mais de dois grupos experimentais com relação a uma variável quantitativa. O procedimento de Tukey é um complemento ao ANOVA e visa identificar quais as médias que, tomadas duas a duas, diferem significativamente entre si.

A partir dos resultados dos testes não-paramétricos Kruskal-Wallis, da Análise de Variância e de comparações múltiplas de Tukey, verificou-se que não existem diferenças significativas entre os grupos estudados ($p=0,88$) (Tabela 6).

5- DISCUSSÃO

O reparo tecidual no osso difere muito daquele em tecidos moles devido à sua morfologia e também à sua composição. Normalmente, o processo no osso é mais lento do que o dos tecidos moles. O curso natural do reparo ósseo compreende fases consecutivas, as quais diferem de acordo com o tipo e a intensidade do trauma, bem como da extensão do dano ao osso².

A escolha de um grupo experimental e de um grupo controle baseou-se na premissa de que a aplicação do laser em uma área bem-definida pode ter tanto efeito local quanto sistêmico, que pode explicar por que algum estudo, seja em tecidos moles seja em tecido ósseo, falharam em revelar efeitos significativos quando compararam sítios irradiados em um mesmo animal¹¹.

Em todos os grupos avaliados, foi encontrado algum grau de neoformação óssea e de fechamento da cortical, sendo que os grupos irradiados após o 15º dia apresentaram um maior grau de corticalização e neoformação. Nenhum dos grupos sofreu reabsorção óssea patológica ou invaginação do tecido conjuntivo para o interior da cavidade, comprovando a ação bioestimuladora da laserterapia. Sugere-se a utilização de outras técnicas de coloração das

lâminas para a avaliação do colágeno e da organização das fibras colágenas para favorecer uma constatação mais apurada da eficácia da laserterapia.

O parafuso de titânio, com 3mm de comprimento, foi utilizado como marcador ou posicionador. Assim, é mais fácil a localização macroscópica do reparo ósseo, tanto para a realização do preparo histológico das lâminas, quanto para a imagem do osso na obtenção do cDNA para a realização do RT-PCR.

O presente estudo está de acordo com Nicola et al.¹⁷ (2003) e Weber et al.¹⁸ (2006), os quais utilizaram a técnica pontual de aplicação do laser sobre os tecidos. Referida técnica foi eleita para ser realizada, nesta pesquisa, em decorrência de poder aproximar a ponteira do aparelho da área lesada, na tentativa de minimizar a reflexão e objetivando um aumento mais expressivo da absorção de energia.

Quanto ao protocolo que no trans-operatório não utiliza o laser diretamente sobre a lesão óssea, concorda-se com Brugnera et al.⁶ (1998), que estaria inibindo alguns fenômenos inflamatórios, como a perda do aparecimento de fatores quimiostáticos, nos estágios iniciais da inflamação, interferindo com os efeitos dos mediadores químicos induzidos pela inflamação e a síntese de prostaglandinas.

Todos os grupos experimentais apresentaram uma maior atividade de remodelação óssea nos períodos iniciais do experimento (15 dias), com uma tendência a estabilização dos 21 aos 30 dias, o que pode confirmar a ação do laser, nos estágios iniciais, na estimulação da proliferação celular^{13,18}.

Embora os níveis da proteína osteopontina não tenham sido estatisticamente significativos, pode-se observar uma maior quantidade da mesma nos grupos irradiados, constatando-se um efeito positivo da laserterapia com os dois protocolos usados. Da mesma forma, as avaliações histológicas e molecular para os grupos com lasers infravermelho (grupo V) e vermelho (grupo VI) demonstraram tendências de melhores resultados para o grupo V. Mas considera-se necessária a realização de novas pesquisas para avaliar, de forma mais específica, a formação da proteína osteopontina, quando o processo de reparo ósseo está associado com a laserterapia.

6- CONCLUSÕES

Os resultados dos protocolos avaliados, nesta pesquisa, permitem concluir que: a laserterapia, atuou de forma benéfica no processo de reparo ósseo; a irradiação pelos lasers infravermelho (830nm) e vermelho (685nm) aceleraram o processo regenerativo primário, melhorando a qualidade da estrutura óssea e mostrando um osso mais compacto do que no grupos controles; a proteína osteopontina apresentou maiores índices de concentração nos grupos irradiados.

7- REFERÊNCIAS

1. WALT, Standards for the design and conduct of systematic reviews with low-level laser therapy for musculoskeletal pain and disorders. *Photomedicine and Laser Surgery*, v.24, n.6, p.759-760, Nov. 2006.
2. PINHEIRO, A.L.B.; et al. Biomodulatory effects of LLLT on bone regeneration. *Laser Therapy*, v. 13, special millennium edition, p. 73-79, 2001.
3. LERNER, U.H. Osteoclast formation and resorption. *Matrix Biology*, v.19, p.107-120, May 2000.

4. DERKX, P., et al. Immunolocalization and quantification of noncollagenous bone matrix proteins in methylmethacrylate-embedded adult human bone in combination with histomorphometry. *Bone*, New York, N.Y., v. 22, n. 4, p. 367-373, Apr. 1998.
5. RAMOSHEBI, L. N., et al. Tissue engineering: TGF- β superfamily members and delivery systems in bone regeneration. *Experimental Reviews in Molecular Medicine*, Oxford, Sep. 2002. Disponível em : <<http://www.expertreviews.org/02004969h.htm>>. Acesso em: 5 ago. 2005.
6. BRUGNERA JUNIOR, A.; PINHEIRO, A.L.B. *Lasers na Odontologia Moderna*. São Paulo: Pancast, 1998.
7. ROSENSHEIN, J.S. The physics of Surgical Lasers. *Oral Maxillofac. Surg. Clin. North Am.*; Philadelphia, v.9, no.1, p. 33-47, Feb. 1997.
8. KARU, T. I. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation. *Lasers Life Sci*, v.2, n.1, p.53-74, 1988.
9. MISSERENDINO, L.J.; PICK, R.M. *Lasers in Dentistry*. Chicago: Quintessence, 1995. p. 341.
10. ALMEIDA-LOPES, L.; VÉLEZ-GONZÁLEZ, M.; BRUGNERA, PINHEIRO, A. B. The use low level laser therapy for wound healing: Clinical study. In: Annual Meeting- Lasers in Surgery and Medicine, Proceedings... Florida, EUA 1999. p.16-18.
11. PINHEIRO, A.L.B.; FRAME, J.W. Laser em Odontologia: seu uso atual e perspectivas futuras. *Revista Gaúcha de Odontologia*, Porto Alegre, v.40, n.5, p.327-332, set./out. 1992.
12. MEYERS, A. Lasers and Wound Healing. *Arch Otolaryngol Head Neck Surgery*, 116, 1128. 1990.
13. OZAWA, Y; et al. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarian cells. *Bone*, v. 22, n. 4, p. 347-354, Apr. 1998.
14. DÖRTBUDAK, O.; HAAS, R.; MAILATH-POKORNY, G. Effect of low-power laser irradiation on bony implants sites. *Clin. Oral Implants Res.*, v. 13, n. 3, p. 288-292, 2002.
15. TATE, Y. et al. Odontoblast responses to GaAlAs laser irradiation in rat molars: an experimental study using heat-shock protein-25 immunohistochemistry. *Eur J Oral Sci*; v.114, p.50-57, 2006.
16. SILVA JÚNIOR, A.N.; et al. Computerized morphometric assessment of effect of low-level laser therapy on bone repair: an experimental animal study. *Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery*, v. 20, n. 2, p. 83-87, Apr. 2002.

17. NICOLA, R.A.; et al. Effect of low-power GaAlAs laser (660nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. *Lasers in Medical Science*, London, v.18, n.2, p.89-94, May 2003.
18. WEBER, J. B. B. et al Laser therapy improves healing of bone defects submitted to autologus bone graft. *Photomedicine and Laser Surgery*, v.24, n.1, p.38-44, 2006.