



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

WILLIAN RICARDO PIRES

**EFEITOS DA FOTOTERAPIA EMPREGANDO DIODOS
EMISSORES DE LUZ A 940NM NA REGENERAÇÃO DE
DEFEITOS ÓSSEOS**

Londrina
2013

WILLIAN RICARDO PIRES

**EFEITOS DA FOTOTERAPIA EMPREGANDO DIODOS
EMISSORES DE LUZ A 940NM NA REGENERAÇÃO DE
DEFEITOS ÓSSEOS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Departamento de
Odontologia da Universidade Estadual de
Londrina.

Orientador: Prof. Maria Beatriz Bergonse
Pereira Pedriali

Londrina
2013

WILLIAN RICARDO PIRES

**EFEITOS DA FOTOTERAPIA EMPREGANDO DIODOS
EMISSORES DE LUZ A 940NM NA REGENERAÇÃO DE
DEFEITOS ÓSSEOS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Departamento de
Odontologia da Universidade Estadual de
Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Orientador Maria Beatriz Bergonse
Pereira Pedriali
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Componente da Banca Solange de
Paula Ramos
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, ____ de ____ de ____.

PIRES, Willian Ricardo. **Efeitos da fototerapia empregando diodos emissores de luz a 940NM na regeneração de defeitos ósseos**. 2013. Número total de folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

Procedimentos cirúrgicos, traumas e lesões podem provocar lesões ósseas de difícil regeneração. A utilização da fototerapia no pós-operatório imediato e tardio é interessante devido aos seus efeitos anti-inflamatórios, anti-álgicos e a aceleração da reparação tecidual em comprimentos de onda variando de 604 a 940nm. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da LEDterapia a 904nm sob o reparo ósseo e marcadores inflamatórios em ratos Wistar submetidos a confecção de defeitos ósseos em calvária. Ratos Wistar machos foram submetidos a osteotomia com brocas sob refrigeração para confecção de defeitos ósseos de 3mm de diâmetro em calvária. Os animais foram tratados com 4 J/cm² de irradiação diária, até o sétimo dia, em comprimento de onda de 940nm. Os animais foram sacrificados aos 2 e 14 dias pós-operatório para análise morfométrica das áreas de reparo ósseo, infiltrado inflamatório e reabsorção óssea. Os animais controle foram submetidos aos mesmos procedimentos, mas sem aplicação da LEDterapia. Após 2 dias, os animais do grupo LED apresentaram redução do número de células inflamatórias em relação ao grupo controle. Aos 14 dias, houve uma redução das áreas de reabsorção óssea nas paredes do defeito e o aumento da área de ossificação primária no grupo LED. Os resultados sugerem que a LEDterapia a 940nm reduz inflamação pós-operatória, acelera o processo de neoformação óssea e reduz áreas de reabsorção óssea.

Palavras-chave: Fototerapia. Lasers Semicondutores. Regeneração Óssea. Inflamação. Osteoblastos.

PIRES, Willian Ricardo. **Effects of phototherapy employing light emitting diodes at 940 nm in the regeneration of bone defects**. 2013. Número total de folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

Surgical procedures, trauma and injury can cause bone lesions and difficult bone regeneration. The use of phototherapy immediately or during late periods after surgery is interesting due to its anti-inflammatory and analgesic effects and its ability to increase tissue repair at wavelengths ranging from 604 to 940nm. The objective of this study was to evaluate the effects of the 904nm LED irradiation under bone healing and inflammatory markers in bone defects made in rat calvaria. Male Wistar rats were submitted to light irradiation 4 J/cm² energy daily applied, up to seventh day, at 940nm wavelength. The animals were sacrificed at 2 and 14 days postoperatively for morphometric analysis of areas of bone repair, bone resorption and inflammatory infiltrate. Control animals were submitted to the same procedures, but with the equipment turned off. After two days, LED group presented reduced number of inflammatory cells compared to control one. Fourteen days after surgery, reduced areas of bone resorption and increased areas of primary ossification could be observed in LED group. The results suggest that the LED therapy at 940nm reduced postoperative inflammation, speed up the bone formation and reduced bone resorption areas.

Key words: Phototherapy. Lasers, Semiconductor. Bone Regeneration. Inflammation. Osteoblasts.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP – Adenosina trifosfato

RNA – Ácido ribonucleico

DNA – Ácido desoxirribonucleico

LED – Diodo emissor de luz

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

RANKL - Ligante do receptor do fator nuclear kappa- β

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 REGENERAÇÃO, REPARO E CICATRIZAÇÃO DE TECIDO ÓSSEO	13
3.2 APLICAÇÃO DE FOTOTERAPIA PARA REGENERAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO.....	14
3.2 APLICAÇÃO DE LEDTERAPIA A 940NM.....	16
2 JUSTIFICATIVA	16
3 OBJETIVOS	17
4 METODOLOGIA	17
4.1 ANIMAIS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	18
4.2 CONFECÇÃO DE DEFEITOS ÓSSEOS.....	18
4.3 APLICAÇÃO DA LEDTERAPIA.....	19
4.4 PROCEDIMENTOS HISTOPATOLÓGICOS.....	19
4.4.1 Fixação e Inclusão.....	19
4.4.2. Coloração com Hematoxilina Harris, Eosina de Lison e Tricrômico de Mallory.....	20
4.5 ANÁLISES MICROSCÓPICAS E MORFOMÉTRICAS.....	20
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	20
5 RESULTADOS	21
5.1 48 HORAS PÓS-OPERATÓRIO.....	21
5.2 14 DIAS PÓS-OPERATÓRIO.....	21
DISCUSSÃO	26
CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	29

1. INTRODUÇÃO

1.1 REGENERAÇÃO, REPARO E CICATRIZAÇÃO DE TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é um tecido mineralizado de natureza conjuntiva que se dispõe formando os ossos, estruturas rígidas e resistentes que formam o esqueleto (KATCHBURIAN e ARANA, 1999). O tecido ósseo é o principal constituinte do esqueleto funcionando como suporte para as partes moles, proteção de órgãos vitais, como os contidos nas caixas craniana e torácica e no canal raquidiano. O tecido aloja e protege a medula óssea, estrutura formadora das células do sangue. O osso proporciona apoio aos músculos esqueléticos, transformando suas contrações em movimentos úteis, e constitui um sistema de alavancas que amplia as forças geradas na contração muscular. Além dessas funções, os ossos funcionam como depósito de cálcio, fosfato e outros íons, armazenando e liberando-os de maneira controlada, para manter constante a concentração desses importantes íons nos líquidos corporais (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e material extracelular calcificado, a matriz óssea (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008). Apesar do aspecto aparentemente inerte, os ossos crescem, são remodelados e se mantêm ativos durante toda vida. Quando lesionados, como em fraturas e cirurgias ósseas, são capazes de reparação (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2008; KATCHBURIAN e ARANA, 1999; ROSS e PAWLINA, 2009). Os ossos fraturados são capazes de sofrerem regeneração e consolidação das fraturas devido a presença de células osteoprogenitoras do perióstio e do endóstio (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

Após a lesão óssea, inicialmente ocorre hemorragia por rompimento dos vasos sanguíneos e preenchimento da cavidade formada com coágulo sanguíneo. Em seguida, ocorre a destruição da matriz óssea circundante, com morte por apoptose e/ou necrose das células ósseas. Nas etapas iniciais do processo de regeneração, o coágulo e os restos celulares e da matriz são removidos pela ação de macrófagos. Após 48 horas, macrófagos removem ativamente os restos celulares, coágulo e restos de matriz. O perióstio e o endóstio próximos à fratura iniciam uma intensa proliferação formando um tecido rico em células osteoprogenitoras. O pico de neovascularização por ação das células progenitoras

endoteliais ocorre aos 7 dias, após a lesão óssea (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008; MATSUMOTO *et al.*, 2008). Por ser essencial à regeneração do tecido ósseo, a preservação do periósteo e do endósteo, é uma condição crítica durante procedimentos cirúrgicos (KANCZLER e OREFFO, 2008). Inicialmente, células osteoprogenitoras expressam marcadores de diferenciação (fator de crescimento endotelial vascular-VEGF e osteocalcina) e a molécula RANKL (ligante do receptor do fator nuclear kappa- β) que induzem a diferenciação dos osteoclastos, promovendo a remoção da matriz óssea danificada e posteriormente participando da remodelação óssea (KHOSLA *et al.*, 2008). Em ratos Wistar, após 14 dias da perfuração de defeitos ósseos críticos na calota craniana podem ser observadas espículas ósseas na periferia dos defeitos ósseos. Após 60 dias, a cavidade apresenta-se preenchida com tecido ósseo primário (SILVEIRA *et al.*, 2008).

Nos locais de reparação do tecido ósseo podem se formar áreas de cartilagem hialina, ossificação endocondral e intramembranosa. Após algum tempo, aparece um calo ósseo que envolve as extremidades ósseas fraturadas, esse calo ósseo une provisoriamente as extremidades ósseas fraturadas. O osso recém-formado é do tipo primário e é substituído por osso secundário sob a estimulação de forças mecânicas aplicadas sobre o tecido quando o órgão retorna as suas funções (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008; MORGAN *et al.*, 2008).

A regeneração da área lesionada pode não ser completa, ocorrendo diminuição do volume ósseo local e a formação de cicatriz fibrosa (SILVEIRA *et al.*, 2008). As perdas de volume ósseo resultantes da extração dentária, fraturas ósseas, lesões osteolíticas e doença periodontal são particularmente importantes para odontologia, impedindo, em muitos casos, a reabilitação bucal. Em outras áreas da medicina humana e veterinária, o reparo sem perda de volume ósseo ou a regeneração do tecido ósseo é um desafio e tem impulsionado muitas pesquisas na área de bioengenharia (CANCEDDA *et al.*, 2007; JONES *et al.*, 2006).

3.2 APLICAÇÃO DE FOTOTERAPIA PARA REGENERAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO

A fototerapia é uma modalidade terapêutica que emprega fontes de luz com lasers (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) e diodos emissores de luz (*Light-emitting diode* - LED). A irradiação com lasers e LEDs apresentam

efeitos biomoduladores semelhantes, no entanto, fontes de irradiação empregando LEDs são de custo mais baixo, oferecem mais segurança ao operador, irradiam áreas mais amplas que o laser e podem ser combinados em comprimentos de ondas diferentes num mesmo dispositivo, além de não geram calor (KARU, 1987).

Dispositivos terapêuticos com LED demonstram atividade anti-inflamatória e promovem a estimulação de regeneração e reparo tecidual, em comprimentos de onda variando de 604 a 940nm (KARU, 1987; WHELAN *et al.*, 2003). A emissão de luz nos tecidos promove fotoestimulação, que induz ao aumento da proliferação de células (KARU, 1987), de produção de fibroblastos e da síntese de colágenos (TAKAHASHI *et al.*, 1992; VINCK *et al.*, 2003), aumento da expressão de RNA e transcrição do DNA (KARU, 1987; KOLYAKOV, 2005), aumento da síntese de adenosina trifosfato (ATP) (YU *et al.*, 1997), aumento da vascularização (CONLAN; RAPLEY; COBB, 1996), aumento da velocidade de condução nervosa (VINCK *et al.*, 2005) e aumento da expressão de fatores de crescimento (WHELAN *et al.*, 2003), contribuindo para a aceleração do reparo tecidual (SIQUEIRA, *et al.*, 2009).

A fototerapia utilizando lasers com comprimento de onda de 600 a 830 nm promove efeitos pró-regenerativos sobre o tecido ósseo *in vivo* e *in vitro* (BARBOS PINHEIRO *et al.*, 2003; PIRES OLIVEIRA *et al.*, 2008; POPPI *et al.*, 2011). A fototerapia induz a diferenciação e proliferação de osteoblastos (BOUVET-GERBETTAZ *et al.*, 2009; PIRES OLIVEIRA *et al.*, 2008), acelera a deposição e remodelamento da matriz óssea (BARBOS PINHEIRO *et al.*, 2003; HABIB *et al.*, 2010; POPPI *et al.*, 2011), aumenta a expressão de proteínas morfogenéticas do osso e genes associados a calcificação da matriz (FUJIMOTO *et al.*, 2010; KIYOSAKI *et al.*, 2010) e aumenta a resistência da matriz óssea à forças mecânicas devido ao maior teor de cálcio (ANGELETTI *et al.*, 2010). Apesar da aplicação da fototerapia empregando lasers ter demonstrado efeitos benéficos sobre o processo de reparo ósseo, a aplicação de fontes de irradiação com LEDs ainda não teve sua eficácia comprovada.

2 JUSTIFICATIVA

Procedimentos cirúrgicos, nos quais ocorrem traumas e lesões ósseas, na Odontologia ou em outras áreas médicas, são frequentemente executados.

A utilização da fototerapia no pós-operatório imediato e tardio é interessante devido aos seus efeitos terapêuticos, como a ação anti-inflamatória, redução do quadro álgico e aceleração da reparação tecidual.

Alguns fatores justificam a utilização do dispositivo terapêutico com LED (Diodo Emissor de Luz) no presente trabalho. Entre eles estão: o custo extremamente baixo do aparelho, fabricado no Laboratório de Física da Universidade de Londrina, comparado com outros aparelhos encontrados no mercado e comparado a outros tratamentos terapêuticos para este fim, como o Laser.

3 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo é avaliar a sequência de eventos celulares e inflamatórios durante a regeneração óssea com a aplicação da LEDterapia a 940nm. Foi pretendido avaliar e comparar o reparo de defeitos ósseos de tamanho crítico na calvária de ratos provocados por instrumento rotatório convencional, o número de osteoclastos diferenciados no processo de regeneração e o padrão de regeneração tecidual nos grupos que foram e que não foram submetidos a aplicação de LEDterapia no pós-operatório.

4 METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Ratos Wistar machos, peso aproximado de 250 a 300g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina, foram alojados em gaiolas coletivas sob condições adequadas de luz e temperatura. Os animais receberam ração e água potável à vontade.

Os animais foram divididos em 3 grupos de 10 animais:

- a) *Grupo controle (GC)*: submetidos a procedimento de abertura e exposição do tecido ósseo da calvária, sem a realização de defeitos ósseos.
- b) *Grupo controle cirurgia (CC)*: submetidos a osteotomia na calvária com instrumento rotatório em baixa rotação e refrigeração.
- c) *Grupo LED (LED)*: submetidos a osteotomia na calvária e a LEDterapia durante 7 dias.

4.2 CONFECÇÃO DE DEFEITOS ÓSSEOS

Os animais foram sedados com éter dietílico e anestesiados com quetamina (50mg/kg) e Xilazina (10mg/kg). Nos animais do grupo CC e LED, a superfície da calota craniana foi exposta e após afastamento do perióstio foi realizado o defeito ósseo com a broca Trefina 3.3 mm NEODENT® (3,3mm de diâmetro) em baixa rotação, sob refrigeração com irrigação de soro fisiológico. Estes defeitos são considerados de tamanho crítico, nestes animais (SILVEIRA *et al.*, 2008). Os defeitos foram preenchidos com coágulo e o tecido mole foi suturado.

Imediatamente após a intervenção cirúrgica, os animais foram medicados com dose única de antibiótico (penicilina 1000UI/kg) e analgésico dipirona sódica (50mg/Kg), por via subcutânea. O procedimento de eutanásia ocorreu em grupos de 10 animais, aos 2 e 14 dias após a cirurgia de acordo com SILVEIRA *et al.* 2008. Para a eutanásia, os animais foram submetidos a *overdose* de solução anestésica descrita anteriormente.

4.3 APLICAÇÃO DA LEDTERAPIA

Com a intenção de estimular o tecido, foi utilizado um aparelho protótipo de confeccionado com LED, desenvolvido no Laboratório de Física, da Universidade Estadual de Londrina (Figura 1).



Figura 1. Aparelho de LEDterapia a 940nm.

A fototerapia foi aplicada com a fonte emissora de luz posicionada perpendicularmente sobre a superfície da calota craniana, a uma distância de 1 cm. A área irradiada foi de 1cm^2 , com intensidade de $4\text{J}/\text{cm}^2$, densidade de $9,5\text{ mW}/\text{cm}^2$, durante 4 minutos. O comprimento de onda utilizado foi de 940nm com abertura de banca de 40nm.

A fototerapia foi iniciada imediatamente após a cirurgia e repetida, sob sedação com éter etílico, até o segundo dia nos animais submetidos à eutanásia no segundo dia pós-operatório. Os animais sacrificados no décimo quarto dia receberam tratamento até o sétimo dia de experimento .

4.4 PROCEDIMENTOS HISTOPATOLÓGICOS

4.4.1 Fixação e Inclusão

Após a remoção, as peças foram fixadas em solução fixadora *Bouin* aquosa, por 24 horas. Após fixação, as peças ósseas foram descalcificadas em solução de

do ácido fórmico, por dois dias. As peças foram desidratadas em álcool etílico, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina.

4.4.2. Coloração com Hematoxilina Harris, Eosina de Lison e Tricrômico de Mallory

Lâminas de microscopia com secções de 10µm de tecido foram hidratadas, coradas com hematoxilina e eosina ou tricrômico de Mallory, desidratadas em álcool etílico e xilol e montadas com lamínulas e bálsamo do Canadá. Os cortes foram analisados em microscópio óptico.

4.5 ANÁLISES MICROSCÓPICAS E MORFOMÉTRICAS

Imagens digitalizadas das lâminas histológicas foram capturadas a 40 e 100X de aumento, em sistema de captura de imagens MOTICAM 2.0® (Motic Co., Xiamen, China). Foram contados o número de células inflamatórias por área de coágulo, a área de osso primário neoformado e a área de reabsorção óssea, nos diferentes períodos de observação.

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O número de animais por grupo foi determinado com base no número de avaliações necessárias para que fosse possível observar diferenças significante no número médio de células inflamatórias e espículas ósseas em formação aos 7 dias, nas lâminas histológicas (Silveira, Machado *et al.*, 2008), considerando $P < 0.05$, calculado utilizando-se teste estatístico para cálculo do tamanho da amostra com poder estatístico > 0.8 e considerando um erro do tipo alfa da ordem de 5% (ARANGO, 2009).

As variáveis quantitativas foram expressas em média (desvio padrão), quando o teste de Kolmogorov-Smirnov indicou uma distribuição normal dos dados, ou por mediana (quartis) para dados sem distribuição normal.. Será considerada diferença entre valores significante quando $P < 0.05$.

5 RESULTADOS

5.1 48 HORAS PÓS-OPERATÓRIO

Nenhuma alteração da estrutura óssea foi observada no grupo não submetido a osteotomia, após 2 dias e 14 dias da exposição da calvária.

Após 48 horas, os animais do grupo LED apresentaram menor número de células inflamatórias em áreas próximas às paredes do defeito ósseo (29.4 ± 2.4 células/ $100 \mu\text{m}^2$) em relação ao grupo controle cirurgia (CC) (83.7 ± 5.3 células/ $100 \mu\text{m}^2$, $P < 0.0001$, teste de Mann Whitney) (Figura 2).

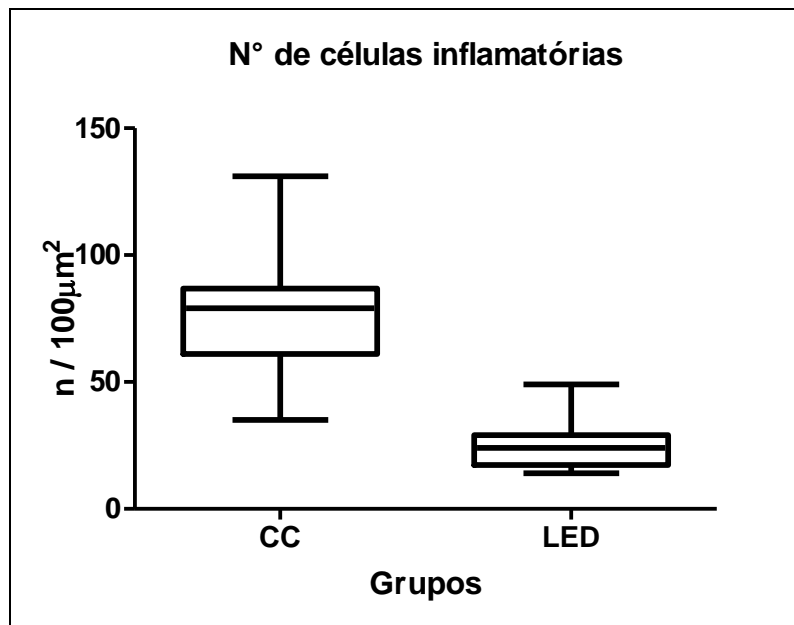


Figura 2. Número de células inflamatórias nos defeitos ósseos dos grupos controle cirurgia (CC) e LEDterapia (LED) após 2 dias pós-operatório. Os animais do grupo LED apresentaram menor número de células inflamatórias em áreas próximas às paredes do defeito em relação ao grupo CC ($p < 0.0001$). Teste de Mann Whitney.

5.2 14 DIAS PÓS-OPERATÓRIO

De acordo com a análise morfométrica, os grupos CC e LED apresentaram áreas de reabsorção óssea. O grupo CC apresentou extensas áreas de reabsorção óssea em todos os ratos, com área mínima de $24.304 \mu\text{m}^2$ e máxima de $65.268 \mu\text{m}^2$. Em relação aos animais do grupo LED, dois deles não apresentaram nenhuma área de reabsorção e os demais apresentaram áreas de reabsorção

reduzidas comparadas ao grupo CC, chegando ao máximo de $7.851 \mu\text{m}^2$ (Figuras 3 e 4).

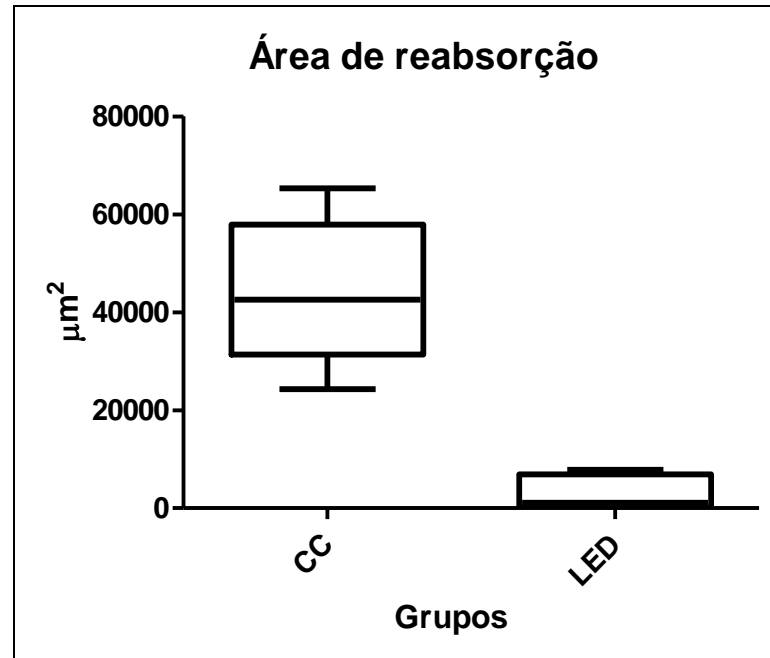


Figura 3. Área de reabsorção na parede dos defeitos ósseos dos grupos controle cirurgia (CC) e LEDterapia (LED) após 14 dias pós-operatório. Os animais do grupo LED apresentaram menores áreas de reabsorção óssea em relação ao grupo CC ($p < 0.05$). Teste de Mann Whitney.

Após 14 dias, os defeitos ósseos do grupo LED estavam preenchidos com extensas áreas de ossificação primária, ocupando 22,8 a 60,6% da área total do defeito. Os animais do grupo controle apresentaram espículas ósseas em formação apenas nas paredes do defeito, ocupando de 1,1 a 12,7 % da área total do defeito (Figuras 4, 5 e 6).

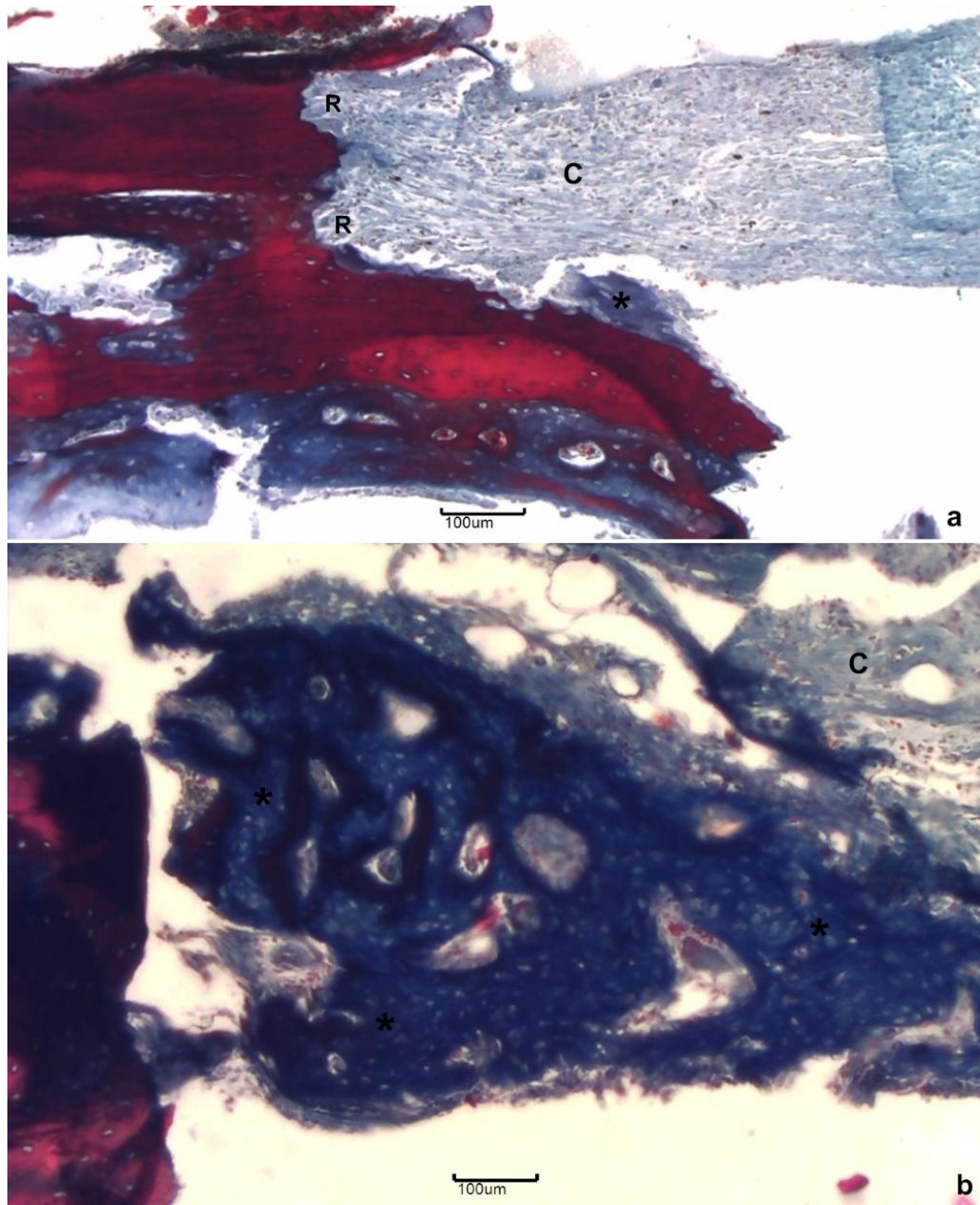


Figura 4. Padrão de reparo ósseo próximo ao osso secundário após 14 dias pós-operatório. **a** O grupo controle cirurgia (CC) apresenta áreas de reabsorção óssea (R) e o defeito cirúrgico preenchido com tecido fibroso e colágeno (C) e pouco tecido ósseo primário (*). **b** O grupo LED apresenta extensa área do defeito preenchido com tecido ósseo primário (*) indicando um melhor padrão regenerativo comparado ao CC. Coloração em Tricrômio de Malory. Aumento em 5X.

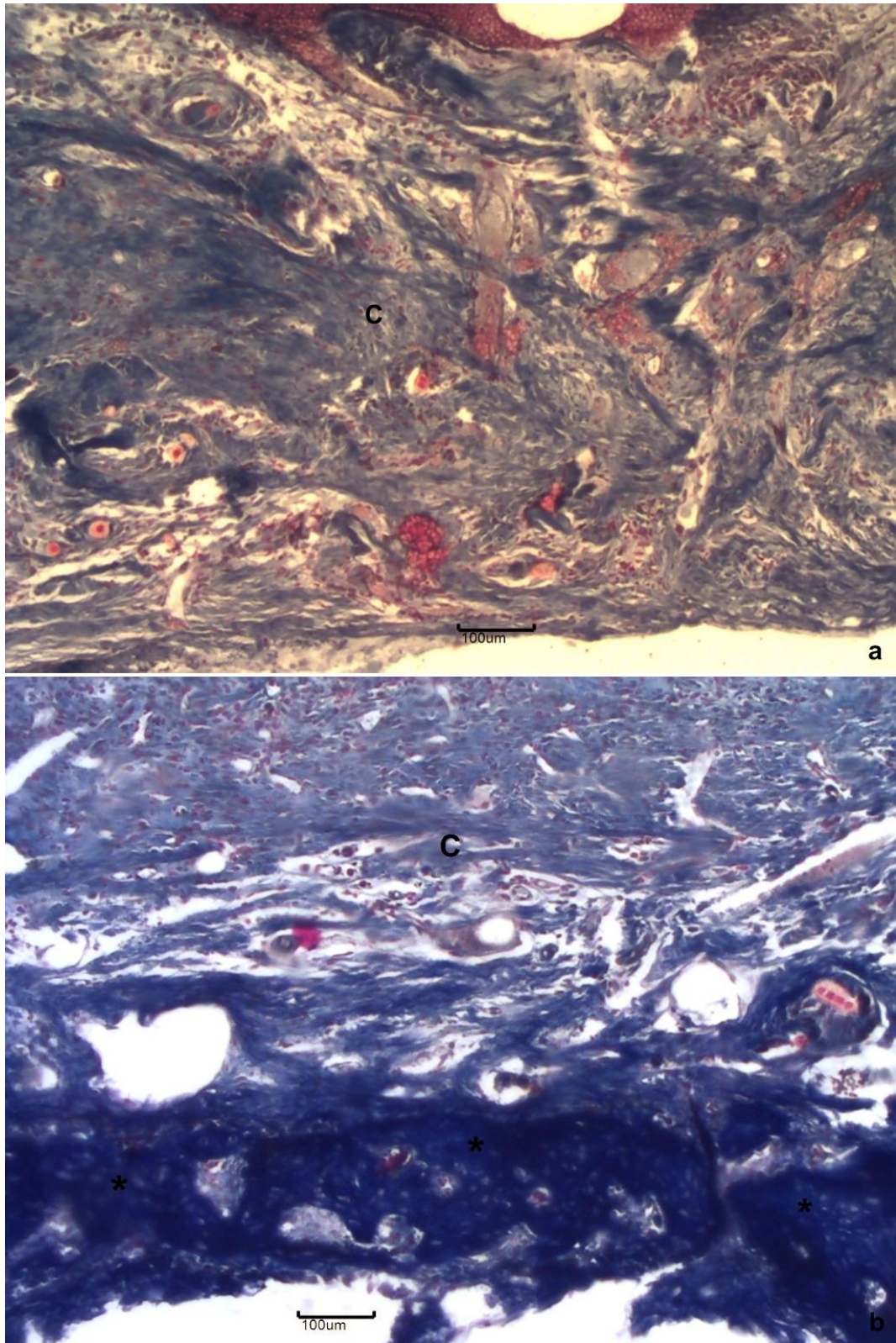


Figura 5. Padrão de reparo ósseo no meio do defeito cirúrgico após 14 dias pós-operatório. **a** O grupo controle cirurgia (CC) apresenta abundante tecido fibroso rico em colágeno (R) na área central do defeito ósseo. **b** O grupo LED (LED) apresenta a base do defeito preenchido com tecido ósseo primário (*) indicando um melhor padrão regenerativo comparado ao CC. Coloração em Tricrômio de Malory. Aumento em 5X.

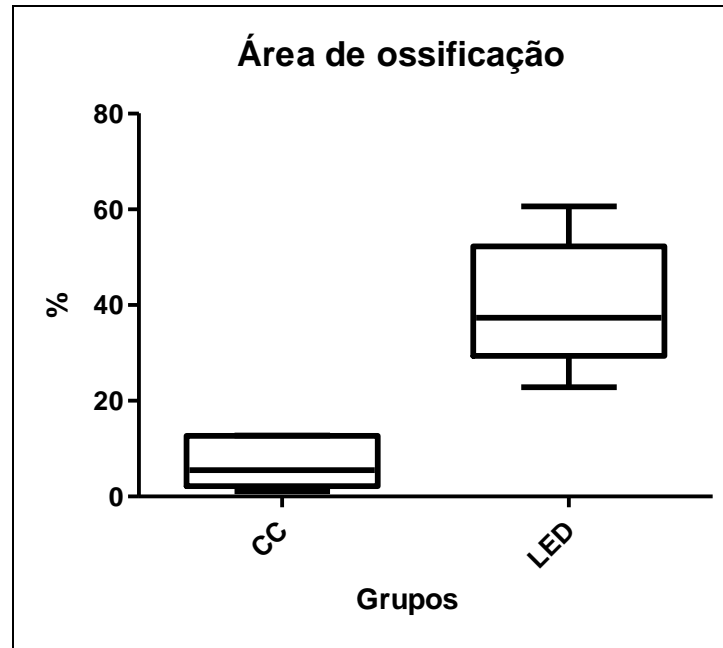


Figura 6. Área de ossificação primária dos grupos controle cirurgia (CC) e LEDterapia (LED). Os animais do grupo LED apresentaram maiores áreas de ossificação dos defeitos ósseos preenchidos com tecido ósseo primário após 14 dias em relação ao grupo CC ($p < 0.05$). Teste de Mann Whitney.

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que a fototerapia empregando diodos emissores de luz no espectro de onda infra-vermelho (940 nm), diminui o processo inflamatório agudo, inibe ou diminui a reabsorção óssea pós-operatória e acelera a osteogênese. Os preceitos em relação às atividades celulares sugerem que a radiação eletromagnética na região do infravermelho é provavelmente absorvida na cadeia respiratória mitocondrial, resultando em aumento do metabolismo celular. Este aumento da atividade celular pode ter levado ao aumento da transdução de sinais a outras partes da célula, incluindo as membranas celulares, que resultam em estímulos do reparo tecidual. Estes dados podem apontar para uma atividade celular aumentada em osteoblastos irradiados em virtude do aumento na produção de ATP (KARU, PYATIBRAT, KALENDO, 1988), proporcionando um aumento da atividade mitótica (SILVA, 1998), além do aumento da síntese proteica (PASSARELA, *et al.*, 1988; GRECO *et al.*, 1989). Sugere-se que o efeito fotobiomodulador foi devido também ao aumento dos níveis de fatores de crescimento, como o fator de crescimento de fibroblasto, também encontrado em cicatrização do tecido ósseo, que atua em células diferenciadas, aumentando a taxa de proliferação e maturação celular e estimulando a secreção de matriz óssea (GRECO, *et al.*, 1989), associada à provável capacidade de secreção de íons cálcio e fosfato por osteoblastos maduros do grupo irradiado com LED.

Neste estudo, foi observado que o grupo submetido à LEDterapia a 940nm reduziu significativamente o número de células inflamatórias em relação ao grupo controle. Estudos sobre a inflamação tecidual demonstraram que a LEDterapia reduz os níveis de interleucina-1, fator de necrose tumoral- α e recrutamento de células inflamatórias (FONSECA *et al.*, 2012; PIRES, *et al.*, 2011; SERAFIM *et al.*, 2011). Considerados conjuntamente, estes estudos sugerem que a terapia com LED pode ser um método útil para a redução da inflamação após injúrias no tecido ósseo.

De acordo com SILVEIRA *et al.*, 2008, em ratos Wistar, após 14 dias da perfuração de defeitos ósseos críticos na calota craniana podem ser observadas espículas ósseas na periferia dos defeitos ósseos. No presente estudo encontramos o mesmo aspecto histológico no grupo controle, que apresentaram espículas ósseas em formação apenas nas paredes do defeito, sendo que nos animais submetidos à LEDterapia os defeitos ósseos estavam preenchidos com tecido ósseo (alcançando

até 60,6% do defeito), o que sugere que o processo de ossificação pode ser completado precocemente, no entanto, são necessários estudos para análise de períodos mais longos.

Sendo a terapia com LED de custo inferior a terapia com laser, estes dados podem contribuir para o desenvolvimento de novas pesquisas nesta área, além de nortear protocolos clínicos.

CONCLUSÃO

Com base nos parâmetros empregados e nos resultados obtidos, os resultados sugerem que a terapia com diodos emissores de luz (940nm) pode atenuar o processo inflamatório pós osteotomia e acelerar o processo de reparo ósseo.

REFERÊNCIAS

ARANGO, H.G. Bioestática. Teórica e Computacional. 3.ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2009.

ANGELETTI, P. et al. Effect of low-level laser therapy (GaAIs) on bone regeneration in midpalatal anterior suture after surgically assisted rapid maxillary expansion. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 109, n. 3, p. e38-46, Mar 2010. ISSN 1528-395X (Electronic) 1079-2104 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20219584>>.

BOUVET-GERBETTAZ, S. et al. Effects of low-level laser therapy on proliferation and differentiation of murine bone marrow cells into osteoblasts and osteoclasts. **Lasers Surg Med**, v. 41, n. 4, p. 291-7, Apr 2009. ISSN 1096 9101 (Electronic) 0196-8092 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19347941>>.

CANCEDDA, R.; GIANNONI, P.; MASTROGIACOMO, M. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. **Biomaterials**, v. 28, n. 29, p. 4240-50, Oct 2007. ISSN 0142-9612 (Print) 0142 9612 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17644173>>.

CORAZZA, A. V. et al. Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources. **Photomed Laser Surg**, v. 25, n. 2, p. 102-6, Apr 2007. ISSN 1549-5418 (Print) 1549-5418 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17508845>>.

FONSECA, P. D. A. et al. Effects of light emitting diode (LED) therapy at 940 nm on inflammatory root resorption in rats. **Lasers Med Sci**, Jan 2013. ISSN 1435-604X (Electronic). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22350492>>.

FUJIMOTO, K. et al. Low-intensity laser irradiation stimulates mineralization via increased BMPs in MC3T3-E1 cells. **Lasers Surg Med**, v. 42, n. 6, p. 519-26, Aug 2010. ISSN 1096-9101 (Electronic) 0196-8092 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20662028> >.

GRECO, M.; GUIDA, G.; PERLINO, E.; MARRA, E.; QUAGLIARIELLO, E. Increase in RNA and protein synthesis by mitochondria irradiated with helium-neon laser. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 163, n. 3, p. 1428-1434, 1989.

HABIB, F. A. et al. Laser-induced alveolar bone changes during orthodontic movement: a histological study on rodents. **Photomed Laser Surg**, v. 28, n. 6, p. 823-30, Dec 2010. ISSN 1557-8550 (Electronic) 1549-5418 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21142724> >.

JUNQUEIRA LC; CARNEIRO, J. Histologia Básica. 11ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2008.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. Histologia e embriologia oral. 2ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1999.

KANCZLER, J. M.; OREFFO, R. O. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. **Eur Cell Mater**, v. 15, p. 100-14, 2008. ISSN 1473-2262 (Electronic) 1473-2262 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18454418> >.

KARU, T. I.; KOLYAKOV, S. F. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. **Photomed Laser Surg**, v. 23, n. 4, p. 355-61, Aug 2005. ISSN 1549-5418 (Print) 1549-5418 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16144476> >.

KARU, T. I.; PYATIBRAT, L.; KALENDO, G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. **J. Photochem. Photobiol. B**, v. 27, n. 3, p. 219-23, 1995.

KARU, T. I.; TIFLOVA, O. A. Effect of low-intensity monochromatic visible light on the growth of *Escherichia coli* cultures. **Mikrobiologija**, v. 56, n. 4, p. 626-30, Jul-Aug 1987. ISSN 0026-3656 (Print) 0026-3656 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3320690> >.

KHOSLA, S.; WESTENDORF, J. J.; OURSLER, M. J. Building bone to reverse osteoporosis and repair fractures. **J Clin Invest**, v. 118, n. 2, p. 421-8, Feb 2008. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18246192> >.

KIYOSAKI, T. et al. Low-level laser therapy stimulates mineralization via increased Runx2 expression and ERK phosphorylation in osteoblasts. **Photomed Laser Surg**, v. 28 Suppl 1, p. S167-72, Aug 2010. ISSN 1557-8550 (Electronic) 1549-5418 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20649430> >.

MATSUMOTO, T. et al. Fracture induced mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for bone healing. **J Cell Physiol**, v. 215, n. 1, p. 234-42, Apr 2008. ISSN 1097-4652 (Electronic) 0021-9541 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18205179> >.

PASSARELLA, S.; OSTUNI, A.; ATLANTE, A.; QUAGLIARIELLO, E. Increase in the ADP/ATP exchange in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 156, n. 2, p. 978-986, 1988.

Pires, D. et al. Low-level laser therapy (LLLT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of anti- and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat. **Lasers Med Sci** v. 26, n. 1, p. 85–94, 2011.

PIRES-OLIVEIRA, D. A. et al. Laser 904 nm action on bone repair in rats with osteoporosis. **Osteoporos Int**, v. 21, n. 12, p. 2109-14, Dec 2010. ISSN 1433-2965 (Electronic) 0937-941X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20204601> >.

RE POPPI, R. et al. Evaluation of the osteogenic effect of low-level laser therapy (808 nm and 660 nm) on bone defects induced in the femurs of female rats submitted to ovariectomy. **Lasers Med Sci**, v. 26, n. 4, p. 515-22, Jul 2011. ISSN 1435-604X (Electronic) 0268-8921 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21246388> >.

ROSS, M.H.; PAWLINA, W. Histologia. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

SERAFIM, K. G. et al. Effects of 940 nm light-emitting diode (led) on sciatic nerve regeneration in rats. **Lasers Med Sci**, May 6 2011. ISSN 1435-604X (Electronic) 0268-8921 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21547474>>.

SILVA, E. C. Radiação laser. In RODRIGUES, E. M. (Ed.). **Manual de recursos terapêuticos**. Rio de Janeiro: Revinter, p. 17-35, 1998.

SILVEIRA, R. L. et al. Bone repair process in calvarial defects using bioactive glass and calcium sulfate barrier. **Acta Cir Bras**, v. 23, n. 4, p. 322-8, Jul-Aug 2008. ISSN 1678-2674 (Electronic) 0102-8650 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18641801> >.

VINCK, E. et al. Pain reduction by infrared light-emitting diode irradiation: a pilot study on experimentally induced delayed-onset muscle soreness in humans. **Lasers Med Sci**, v. 21, n. 1, p. 11-8, Apr 2006. ISSN 0268-8921 (Print) 0268-8921 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16538423> >.

VINCK, E. M. et al. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. **Lasers Med Sci**, v. 18, n. 2, p. 95-9, 2003. ISSN 0268-8921 (Print) 0268-8921 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12928819> >.

WHELAN, H. T. et al. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on molecular changes for wound healing in diabetic mice. **J Clin Laser Med Surg**, v. 21, n. 2, p.

67-74, Apr 2003. ISSN 1044-5471 (Print) 1044-5471 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12737646> >.

WONG-RILEY, M. T. et al. Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins: role of cytochrome c oxidase. **J Biol Chem**, v. 280, n. 6, p. 4761-71, Feb 11 2005. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15557336>>.