

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOFOTÔNICA APLICADA ÀS
CIÊNCIAS DA SAÚDE

GIULIANA GIOVINAZZO ANSELMO RAMOS

EFEITOS DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA
FOTOBIMODULAÇÃO ÓSSEA APÓS EXODONTIA DE
MOLARES EM RATOS ESPONTANEAMENTE
HIPERTENSOS

São Paulo

2016

GIULIANA GIOVINAZZO ANSELMO RAMOS

**EFEITOS DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA
FOTOBIMODULAÇÃO ÓSSEA APÓS EXODONTIA DE
MOLARES EM RATOS ESPONTANEAMENTE
HIPERTENSOS**

Dissertação apresentada à Universidade Nove de Julho para obtenção do título de **Mestre** em Biotônica aplicada às Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Miranda França

São Paulo

2016

Ramos, Giuliana Giovinazzo Anselmo

Efeitos do laser de baixa intensidade na fotobiomodulaçao ossea apos exodontia de molares em ratos espontaneamente hipertensos. / Giuliana Giovinazzo Anselmo Ramos. 2016.

55 f.

Dissertaçao (Mestrado) — Universidade Nove de Julho - UNINOVE, Sao Paulo, 2016.

Orientador (a) Profa. Dra. Cristiane Miranda Frank a.

1. Hipertensao. 2. Neoformaçao ossea. 3. Lasers. 4. Terapia com luz de baixa intensidade, 5. Laser.

I. Horliana, Anna Carolina Ratto Tempestini.

II. Titulo.

CDU 615.831

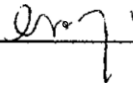
Sao Paulo, 19 de dezembro de 2016.

TERMO DE APROVAÇÃO


Aluna: GIULIANA GIOVINAZZO ANSELMO RAMOS

Título da Dissertação: "Efeito do laser de baixa intensidade na fotobiomodulação pos exodontia de molares em ratos espontaneamente hipertensos"

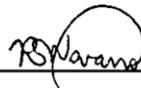
Presidente: PROF. DR.ª CRISTIANE MIRANDA FRANÇA



Membro: PROF. DR.ª ANA CAROLINA RATTO TEMPESTINI HORL



Membro: PROF. DR. RICARDO SCARPARO NAVAR



DEDICATÓRIA

Aos meus pais pela educação e eterno incentivo

À minha família, pelo amor incondicional e compreensão

À minha filha Bianca, minha principal motivação e razão de viver.

AGRADECIMENTOS

À Professora Kristianne Porta Santos Fernandes, coordenadora do programa de Pós-Graduação em Biofotônica aplicada às Ciências da Saúde da Universidade Nove de Julho.

À Profa. Cristiane Miranda França, pela orientação, carinho, incentivo e paciência.

À Professora Dra. Sandra Kalil Bussadori, pela oportunidade de aperfeiçoamento profissional nesta renomada instituição.

À Professora Dra. Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana pela atenção e orientação.

Aos demais membros da equipe docente do Programa de Doutorado da Uninove, professores Prof. Dr Alessandro Melo Deana, Profa. Dra. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari, Profa. Dra. Daniela de Fátima Teixeira da Silva, Prof. Dr. Renato Prates, pela atenção e pelos ensinamentos compartilhados.

Aos meu pais pela educação e exemplo que sempre me proporcionaram.

Aos meus colegas de turma de mestrado pelos momentos de aprendizado e companheirismo durante o curso.

Agradeço a todas as pessoas, que, direta ou indiretamente contribuíram na elaboração desse trabalho.

À Universidade Nove de Julho, por incentivar a pesquisa científica e me permitir concluir mais esta etapa.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Palavras não são suficientes para expressar o que sentimos, neste momento, a gratidão é imensa, não cabe no peito.

Primeiramente agradeço à Deus por me permitir trilhar esta jornada com muita retidão, fé, resignação e gratidão.

Bianca, minha filha, por você e para você tudo que conquistei e conquisto, você é minha inspiração diária, minha fonte de vida, minha razão de existência. Com seu nascimento aprendi muito sobre amor, paciência e fé. Obrigada minha filha, por mesmo na inocência de seus 3 anos, me motiva a cada olhar e sorriso.

Aos meus pais. Exemplo de profissão, companheiros e professores. Obrigada por todo apoio de sempre, sem vocês não teria cumprido mais esta etapa. Ao meu irmão Francisco, pelo companheirismo e dedicação.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Cristiane Miranda França, que me ensinou muito sobre Biofotônica, mas também sobre vida, perseverança e dedicação. Obrigada por acreditar em mim; desde o nosso primeiro contato. Me espelho e inspiro na sua carreira de professora, mulher e mãe. Obrigada.

Às minhas queridas amigas, que foram parceiras em tantos momentos, vocês foram essências para essa conquista: Márcia Cabral Oliveira e Marcela Leal.

À minha querida amiga de escola, faculdade e de vida: Camila Godoy. Obrigada por me resgatar e me dar a oportunidade. Obrigada por pegar em minha mão e acreditar sempre em mim.

Ao meu grande amigo Pedro Cabral Oliveira, por todo companheirismo, dedicação e amizade verdadeira.

Aos meus queridos alunos e amigos Luiz Cabral Oliveira e Murilo Rezende Alves, com tanta dedicação e responsabilidade; sem vocês não teria realizado com tanto êxito.

“A Razão é o passo, o aumento da ciência o caminho, e o benefício da humanidade é o fim.”

(Thomas Hobbes)

RESUMO

A Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) é considerada como uma síndrome poligênica, multifatorial, adicionada a fatores ambientais, vasculares, hormonais, renais e neurais, que afeta de 1 a cada 3 adultos acima de 65 anos. Existe uma associação entre indivíduos hipertensos e densidade mineral óssea reduzida. A bioestimulação com laser de baixa intensidade (LBI) tem atividade anti-inflamatória, acelera a cicatrização de defeitos ósseos *in vivo* e *in vitro*, estimula o fluxo sanguíneo, recrutamento e ativação de osteoblastos, osteossíntese, e diminuição da atividade osteoclástica. A hipótese desse trabalho é que a fotobiomodulação com LBI melhore o reparo ósseo após exodontia em ratos hipertensos. Para o estudo foram utilizados 24 ratos espontaneamente hipertensos SHR do gênero feminino (200-250 g), (CONCEA :AN0032/2015) nos quais foram extraídos os molares inferiores direito e esquerdo. O alvéolo esquerdo foi o controle e o direito recebeu a laserterapia ,segundo os seguintes parâmetros: λ : 808 (\pm 10) nm, P= 100 mW, área do feixe: 0,126 cm², 40 segundos, 4 J, 0,8 W/cm², densidade de energia 32 J/cm². Foram realizadas duas aplicações, uma no pós-operatório imediato e outra no dia 7. Nos dias 7, 14 ,30 e 60 os animais foram eutanasiados e os fragmentos de mandíbula enviados para descalcificação, inclusão em parafina, coloração com hematoxilina & eosina e tricrômico de Mallory. As amostras foram avaliadas por um patologista sem conhecimento dos grupos, que analisou a presença e tipo de inflamação, necrose, microorganismos, epitelização, área de osso neoformado e número de osteócitos. Os dados foram avaliados com teste *t* (SPSS v23, IBM) e não houve diferença estatística entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados. Conclui-se que nas condições do estudo, a aplicação de LBI não interferiu no reparo ósseo de alvéolos de ratos espontaneamente hipertensos.

Palavras – chave: Hipertensão, neoformação óssea, lasers, terapia com luz de baixa intensidade, cirurgia bucal

ABSTRACT

Systemic Arterial Hypertension (SAH) is considered as a polygenic, multifactorial syndrome, due to environmental, vascular, hormonal, renal and neural factors, affecting 1 in 3 adults over 65 years. There is an association between hypertensive individuals and reduced bone mineral density. Biostimulation with low intensity laser (LBI) has anti-inflammatory activity, accelerates the healing of bone defects *in vivo* and *in vitro*, stimulates blood flow, recruitment and activation of osteoblasts, osteosynthesis, and decreased osteoclastic activity. The hypothesis of this work is that photobiomodulation with LBI improves bone repair after exodontia in hypertensive rats. For the study, 24 female spontaneously hypertensive SHR rats (200-250 g) were used in which the right and left lower molars were extracted. The left alveolus was the control and the right one received the laser therapy (Therapy XT, DMC, São Carlos, Brazil), according to the following parameters: λ : 808 (\pm 10) nm, P = 100 mW, beam area: 0.126 cm², time = 40 seconds, total energy = 4 J, power density = 0.8 W/cm², energy density 32 J/cm². Two applications were performed, one in the immediate postoperative period and the other on day 7. On days 7, 14, 30 and 60 the animals were euthanized and the mandible fragments sent for decalcification, paraffin inclusion, staining with hematoxylin & eosin and Mallory's trichrome. The samples were evaluated by a pathologist without knowledge of the groups, who analyzed the presence and type of inflammation, necrosis, bacteria, epithelialization, neoformed bone area and number of osteocytes. The data were evaluated with t-test (SPSS v23, IBM) and there was no statistical difference between the groups in any of the parameters evaluated. It is concluded that under the conditions of the study, the application of LBI did not interfere in the bone repair of alveoli of spontaneously hypertensive rats.

Key words: Hypertension, bone neoformation, lasers, low intensity light therapy, oral surgery

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Metodologia para realização do procedimento cirúrgico

Figura 2: Metodologia de contagem de células

LISTA DE ABREVIações

ATP: Adenosina Trifosfato

BMP: Proteína Morfogenética óssea

FBM: Fotobiomodulação

IL: interleucina;

J: Joule

J/ cm² : Joules por centímetro quadrado

LASER: Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação;

LBI: Laser de Baixa Intesnidade

HE: Hematoxilina e Eosina

HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica

MEC: matriz extracelular;

Mm/Hg: milímetros por mercúrio

mW/cm²: Mili Wats por centímetro quadrado

mg/kg: miligramas por quilograma

NO: Óxido Nítrico

nm: Nanometros

Nd:YAG: Laser de Neodímio

PA: Pressão Arterial

OMS: Organização Mundial de Saúde

ROS: Espécies Reativa de Oxigênio

SHR: Ratos Espontaneamente Hipertensos

TNF: fator de necrose tumoral;

TRAP: Fosfatase ácida tartarato- resistente;

MicroCT: Micro Computed Tomography

UNINOVE: Universidade Nove de Julho;

λ : Lambda : comprimento de onda ;

SUMÁRIO

1. Contextualização	13
1.1. Hipertensão Arterial	13
1.1.1. Definição.....	13
1.1.2. Epidemiologia	13
1.1.3. Causas e Classificação	14
1.1.4. Neoformação óssea	15
1.1.5. Associação da Hipertensão arterial com o metabolismo ósseo....	16
1.2. Modelos Experimentais de Hipertensão.....	16
1.3. Fotobiomodulação e reparo ósseo.....	17
2. Objetivos	20
2.1. Objetivos Gerais	20
2.2. Objetivos Específicos.....	20
3. Materiais e Métodos.....	21
3.1. Animais e grupos experimentais	21
3.2. Procedimentos experimentais.....	21
3.3. Avaliação Clínica	23
3.4. Eutanásia e processamento do material.....	23
3.5. Análise histológica do reparo ósseo.....	24
3.6. Histomorfometria óssea	24
3.7. Análise estatística	25
4. Resultados	26
4.1. Artigo I.....	26
5. Discussão	27

6. Conclusão	SUMÁRIO	29
7. Bibliografia		30
8. Anexos		35
8.1. Fluxograma		35
8.2. CONCEA		36
8.3. Artigo I		39

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1 Hipertensão arterial

1.1.1 Definição

As Diretrizes Brasileiras de Hipertensão VI (DBH VI) conceituam a Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) como "uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA)". Associa-se frequentemente a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo (coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos) e a alterações metabólicas, com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não-fatais.¹

De acordo com o relatório da OMS (Organização Mundial de Saúde), um em cada três adultos apresentam hipertensão arterial, e a projeção dessa situação para 2025 é que um terço de todos os adultos apresentarão hipertensão arterial. A hipertensão arterial é importante por sua alta prevalência, mas também porque muitas vezes é assintomática, o que leva ao atraso de intervenção e tratamento.² Cerca de 50% a 60% dos indivíduos hipertensos não têm conhecimento da sua condição sistêmica.³

A hipertensão arterial é a causa *mortis* de 9,5 milhões de pessoas em todo o mundo. Doenças como obesidade, hiperglicemia e hiperlipidemia na maioria das vezes estão associadas a hipertensão arterial ou tem grande risco de desenvolvê-la. É uma condição multifatorial caracterizada pelo aumento da resistência vascular periférica e fluxo sanguíneo devido ao remodelamento vascular.²⁻⁴

1.1.2 Epidemiologia

Estudos de prevalência de Hipertensão Arterial Sistêmica no Brasil, regionais e isolados, mostram que em mais ou menos 30% da população adulta apresenta hipertensão arterial sistêmica, considerando os valores de PA

(pressão arterial) $\geq 140/90$ mm Hg , apresentando em mais de 50% em indivíduos entre 60 e 69 anos, e 75% em indivíduos com mais de 70 anos.^{5,6}

A prevalência global, vista em revisão sistemática, em 44 estudos em 35 países, é de 37,8 % no gênero masculino e 32,1% no gênero feminino.⁷

1.1.3 Causas e classificação

A Hipertensão Arterial Sistêmica é considerada como uma síndrome poligênica, multifatorial, adicionada a fatores ambientais, vasculares, hormonais, renais e neurais. Um dos principais mecanismos sistêmicos envolvidos na hipertensão arterial é a constrição da musculatura lisa. A resistência vascular elevada, tem como consequência a contração aumentada da musculatura lisa dos vasos. A disfunção endotelial também participa da gênese da hipertensão arterial, o endotélio regula o tônus vascular e propicia resistência vascular periférica e sintetiza substâncias vasoativas como o óxido nítrico e a endotelina (peptídeo vasoconstritor) que potencializam a constrição do músculo liso vascular.⁸

A pressão arterial exercida pelo sangue, no interior das artérias, varia conforme alterações no sistema cardiovascular, em relação ao débito cardíaco que representa o volume ejetado do ventrículo esquerdo em cada sístole, e a resistência vascular periférica, que é quando os vasos apresentam resistência ao fluxo sanguíneo normal. A Hipertensão pode ser classificada em dois tipos: Primária: quando a causa é desconhecida, e secundária que está relacionada a causas específicas como, doenças renais, associada a gestação ou a alterações anatômicas cardíacas, exemplo a coarctação aórtica.⁹

Para o tratamento da HAS, existem basicamente 6 classes de anti-hipertensivos: diuréticos, betabloqueadores, simpatolíticos de ação central, antagonistas/bloqueadores de canais de cálcio e inibidores de enzima conversora de angiotensina (polipeptídeo que estimula a constrição dos vãos sanguíneos) e antagonistas do receptor de angiotensina, caso não aconteça o controle da pressão arterial com a monoterapia, ou seja , um destes fármacos , pode –se adicionar uma segunda droga ou substituição das mesmas.¹⁰

1.1.4 Neoformação Óssea

O tecido ósseo, é um tipo de tecido conjuntivo especializado, rígido composto por uma parte orgânica (25-35 %), constituída principalmente por colágeno tipo I, proteoglicanas e proteínas de adesão, e por uma a parte inorgânica (65-75%) é formada sobretudo por cálcio e fósforo na forma de cristais de hidroxiapatita. No osso é observado osteóide, que compreende uma matriz óssea recém-formada adjacente aos osteoblastos ativos e que não estão ainda calcificados. As células osteogênicas ou osteoprogenitores se diferenciam em osteoblastos. Osteócitos são as células maduras. Feixes de fibras colágenas são paralelos entre si, tornando possível um arranjo helicoidal ao redor dos canais osteônicos.¹¹

A orientação das fibras colágenas determina a mineralização do tecido ósseo. Os osteoblastos são responsáveis pela deposição de matriz óssea, e também excretam, além de outras, a proteína morfogenética óssea (BMP), que é uma proteína insolúvel em meio ácido, mantém-se até que seja liberada pela reabsorção óssea por osteoclastos, e assim ocorrendo esse mecanismo, a liberação de BMP é levada à superfície das células mesenquimais indiferenciadas, assim originando uma membrana protéica , ativada pelo fosfato presente e assim originando o início do processo de diferenciação osteoblástica , estimulando então a produção do novo tecido ósseo.¹²

A produção de tecido ósseo pelos osteoblastos, estes, incapazes de se locomover ou se dividir e proliferar para o interior dos defeitos ósseos, depende das células precursoras osteogênicas (mesenquimais), estas tendo a habilidade de se deslocarem para o local do defeito ósseo e iniciarem a diferenciação em osteoblastos. A neoformação óssea depende de: uma fonte de células formadoras de osso ou células com capacidade de se diferenciarem em células formadoras de osso, presença de estímulos osteoindutores, que originam a diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos e presença de um meio osteocondutor para que as células mesenquimais diferenciadas ou osteoprogenitoras possam formar o osso.¹³

1.1.5 Associação da Hipertensão Arterial com o Metabolismo Ósseo

Algumas patologias, interferem no processo de reparação e neoformação óssea, a HAS é uma delas, que interferem no tecido ósseo, além de ter envolvimento com o sistema de regulação de cálcio no indivíduo hipertenso, induzindo uma perda de massa óssea importante. Tanto em humanos, como em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), a densidade mineral óssea é reduzida, quando comparados a normotensos. Sugerindo uma ligação entre hipertensão e metabolismo ósseo.¹⁴

Além da alteração do metabolismo ósseo, os medicamentos para tratamento da hipertensão podem prejudicar o reparo ósseo, por exemplo, bloqueadores/antagonistas de canais de cálcio.^{3,4} Essas drogas que diminuem os níveis de cálcio no fluxo sanguíneo através do bloqueio de canais de cálcio tipo L. As células ósseas expressam esses canais, assim sugerindo que a sinalização antagonista afeta o metabolismo ósseo.¹⁵

Para análise do processo de cicatrização /aposição/ remodelação óssea após extração de elemento dental, são preconizados métodos histológicos e radiográficos. A radiografia é um método relativamente fiel, não invasivo, rápido e de baixo custo e permite uma análise longitudinal, sendo interpretada através do aumento (ou diminuição) da radiopacidade, e assim analisando a densidade óssea. Como podemos, então chegar a conclusão que portadores de hipertensão arterial apresentem uma alteração na cicatrização/aposição/remodelação óssea, assim apresentando uma densidade óssea prejudicada, diminuída. Essas características são encontradas nos ratos espontaneamente Hipertensos (SHR), que é o modelo animal experimental de hipertensão arterial mais próximo ao humano hipertenso. Esses animais nascem normotensos, e desenvolvem uma hipertensão arterial a partir da oitava semana de idade.³

1.2 Modelos experimentais de hipertensão

Em 1963, Okamoto e Aoki desenvolveram um modelo experimental de hipertensão, sem que nenhum recurso fisiológico, cirúrgico ou farmacológico

fosse necessário. Os ratos espontaneamente hipertensos, os SHR foram desenvolvidos por uma seleção meticulosa, entre irmãos e irmãs de onde eram cruzados os animais com os maiores níveis de pressão arterial de cada ninhada, e isso por várias gerações, uniformemente de modo a resultar em animais naturalmente portadores de doença hipertensiva em 100% dos descendentes. Desde então, o SHR é reconhecido como um excelente modelo de hipertensão experimental e pode servir como modelo de estudos clínicos da hipertensão essencial humana.¹⁶

A semelhança entre a hipertensão humana e a observada no SHR, inclui: a) a predisposição genética para hipertensão sem etiologia específica, b) o aumento da resistência periférica total sem expansão de volume e, c) igual resposta a tratamentos com drogas, tanto em machos quanto fêmeas. Por apresentar um relativo curto período de vida, ser pequeno, ter relativamente baixo custo, e ser de fácil manutenção em biotérios, os SHR são utilizados para estudo da história natural, determinantes genéticos e alterações fisiopatológicas da doença hipertensiva essencial.¹⁶

Os ratos espontaneamente hipertensos (SHR), durante o crescimento, apresentam o corpo menor e massa esquelética reduzida, quando a massa óssea é calculada a partir da massa corpórea, os valores se apresentam diminuídos em relação à massa óssea, sugerindo uma atividade maior de reabsorção óssea conseqüentemente o nível sérico de cálcio também (hipercalciúria e cálcio ionizado) quando comparados a animais normotensos.⁴

1.3 Fotobiomodulação e reparo ósseo

Atualmente laserterapia ou fotobiomodulação (FBM) com laser de baixa intensidade, pode criar uma série de efeitos positivos que aceleram a cicatrização de defeitos ósseos *in vivo* e *in vitro*. O laser de baixa intensidade estimula o fluxo sanguíneo, recrutamento e ativação de osteoblastos, osteossíntese, e diminuição da atividade osteoclástica e também promovendo ação antiinflamatória.¹⁷

Esta terapia desempenha papel importante na ativação de componentes da estrutura celular, convertendo a energia luminosa (irradiada) em energia fotoquímica, levando à reações bioquímicas na cadeia respiratória mitocondrial. A fotobiomodulação promove mudanças no metabolismo, assim induzindo mudanças moleculares, celulares e sistêmicas, promovendo então uma resposta fotobiológica intracelular, ativando a produção de adenosina trifosfato (ATP), óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS), alterando as bombas de sódio e potássio, e facilitando a permeabilidade da membrana. Como resultado, observa-se *in vivo* e clinicamente a redução do processo inflamatório e edema, modificação da resposta micro e macrovascular, e melhor reparação tecidual. Ademais, o laser de baixa potência é um tratamento não invasivo e de baixo custo.^{18, 19}

O uso da FBM em células ósseas foi publicado pela primeira vez em 1998 por Ozawa et al., no qual ele irradiou osteoblastos de ratos e observou formação de nódulos de mineralização.²⁰ Daí em diante, vários estudos demonstraram um efeito bioestimulador em células tronco de osso e aceleração do reparo ósseo. Ebrahimi et al., 2012, realizaram uma revisão sistematizada da literatura sobre o tema e concluíram que existe uma grande variabilidade nos métodos de estudo e parâmetros de doses, de modo que os resultados são difíceis de se comparar. Todavia, os autores concluíram que na maioria dos casos a FBM pode acelerar o reparo ósseo em locais de exodontia, fraturas e distração osteogênica em modelos animais. O laser de diodo foi o mais estudado, com comprimentos de onda utilizados variaram entre 633 a 904 nm.²¹

Segundo Shakouri, et. al (2010) mostraram benefícios do uso do laser de baixa intensidade no comprimento de onda de 830 nm (próximo ao infravermelho), tendo também uma proliferação de osteoblastos e afetando o transporte de cálcio durante a nova formação óssea, assim também sendo eficaz no processo de cicatrização óssea.²²

Fukuoka, et al. (2011), estudaram os efeitos do laser de baixa intensidade em uma única aplicação nos alvéolos após a exodontia. O tecido foi avaliado 6 horas, 3, 7 e 21 dias e os autores observaram que a crista alveolar era maior nos grupos irradiados do que nos controles e que havia mais células positivas para

actina de músculo liso no controle que nos grupos irradiados, concluindo que o laser induz características diferentes no processo de reparo, sugerindo um efeito benéfico no mesmo.²³

Na tentativa de esclarecer a influência dos parâmetros do laser no reparo de alvéolos dentais, Park et al. (2015), investigaram os efeitos do tempo de irradiação na expressão de genes e proteínas relacionadas ao remodelamento ósseo. Os alvéolos foram irradiados com laser de diodo, (980 nm) por 0, 1, 2, ou 5 minutos durante 3 ou 7 dias. O maior nível de expressão dos genes de osteocalcina, colágeno I, fator de crescimento derivado de plaquetas e fator de crescimento de endotélio vascular foi observado na aplicação de 5 minutos.²⁴

O laser de neodímio (Nd:YAG), 1064 nm, 1,25 W, 15 Hz e 5 minutos de exposição ($14,37 \text{ J/cm}^2$) aumentou a expressão de osteocalcina, mas não a de osteopontina durante o reparo de alvéolos de animais com condições sistêmicas alteradas, como no caso de medicação relacionada com osteonecrose, o zolendronato e a dexametasona, segundo estudado por Mergoni et al., 2016.²⁵

A densidade de potência é importante na FBM do reparo ósseo. Nissan et al., 2006 estudaram o efeito de duas doses: 4 e $22,4 \text{ mW/cm}^2$ aplicados diariamente por 3 minutos durante 1, 2 ou 4 semanas. Foi observado que o grupo que recebeu a menor dose apresentou aumento do cálcio no local do defeito cirúrgico, mas não de fosfatase alcalina.²⁶

Existem vários protocolos de irradiação do alvéolo após a cirurgia, geralmente o comprimento de onda varia entre 660 nm a 830 nm (vermelho e infravermelho), onde é sugerido aplicação em dose única após procedimento cirúrgico odontológico.²⁷

Com base nesses estudos, a hipótese proposta para esse trabalho é que a irradiação com laser em baixa intensidade possa melhorar o reparo de alvéolos de ratos espontaneamente hipertensos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar o efeito da laserterapia no processo de reparo/neoformação óssea em ratos espontaneamente hipertensos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a morfologia do reparo tecidual dos alvéolos comparando com controle contralateral não tratado.

- Avaliar a inflamação, necrose, presença de microorganismo e área de osso neoformado controle contralateral não tratado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e grupos experimentais

O protocolo experimental utilizado neste estudo seguiu as diretrizes e os princípios éticos em experimentação animal elaborados pelo CONCEA. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Nove de Julho, sob o protocolo CONCEA : AN0032/2015 (Anexo II).

Para o estudo foram utilizados 24 ratos espontaneamente hipertensos SHR do gênero feminino com 12 semanas de vida. Essa idade foi estimada para que os animais estivessem com hipertensão e maturação máxima do esqueleto.

As ratas foram oriundas e mantidas no Biotério da Universidade Nove de Julho em caixas plásticas apropriadas sob temperatura constante de 22-25° C, com luminosidade controlada (ciclo de 12h - claro/escuro), ventilação controlada artificialmente umidade relativa de 50-60%. Foi utilizada ração para camundongos (NUTRILAB CR-1[®]) e água *ad libitum*.

3.2 Procedimentos experimentais

Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de solução de Quetamina (100 mg/kg – Dopalen, Vetbrands, Jacareí, SP) e Xilazina, (10 mg/kg– Anasedan, Vetbrands, Jacareí, SP). Os animais foram contidos e os primeiros molares esquerdo e direito inferiores removidos cirurgicamente com uso de alavanca e Hollenback 3 s(Figura 1).

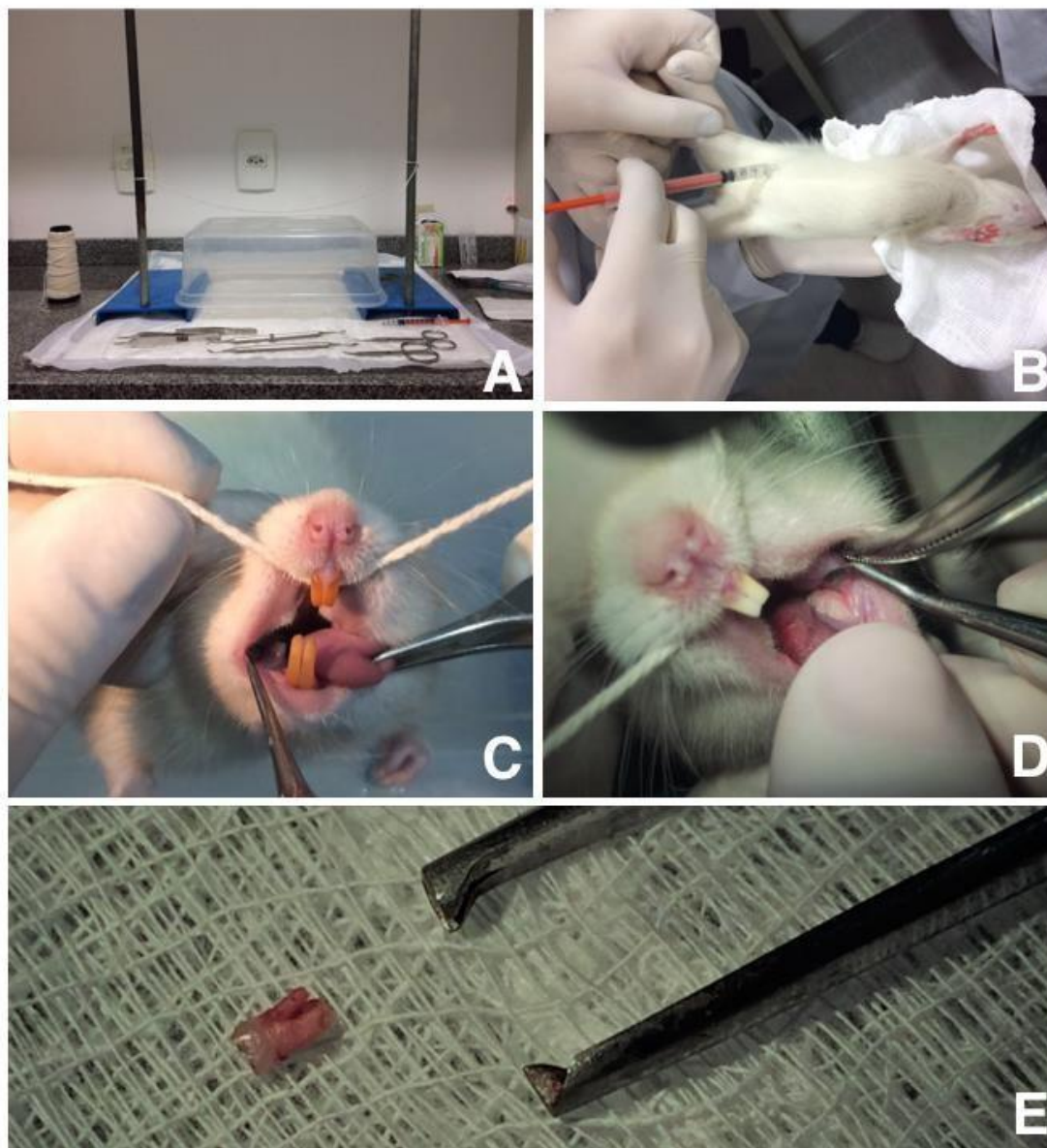


Figura 1: A- Forma de contenção e apoio para a realização do procedimento cirúrgico ; B- Injeção Intraperitoneal de anestésico ; C- Apoio e afastamento da língua para início do procedimento; D- Luxação do dente molar com instrumento hollenback 3s para sua exodontia; E- Elemento dental íntegro, sem fraturas radiculares após a exodontia.

Imediatamente após a cirurgia o alvéolo do lado esquerdo recebeu fotobiomodulação com laser em baixa intensidade (Therapy XT, DMC, São Carlos, Brasil), segundo os seguintes parâmetros: λ : 808 (\pm 10) nm, P= 100 mW, área do feixe: 0,126 cm², tempo= 40 segundos, energia total= 4 J, densidade de potência= 0,8 W/cm², densidade de energia 32 J/cm². Os alvéolos do lado direito serviram como controle contralateral e não foram tratados.

Em seguida os animais foram colocados em colchonete térmico para até o retorno anestésico para evitar hipotermia e administrada solução de dipirona 50 mg/kg via subcutânea para evitar desconforto do pós-operatório da extração.

Os animais foram monitorados diariamente quanto seu consumo de água, ração e semanalmente quanto ao peso e pressão arterial.

3.3 Avaliação clínica

Clinicamente os animais foram avaliados quanto à presença de úlcera oral, edema, pus ou fístula, bem como presença de dor ou alteração de peso e comportamento.

3.4 Eutanásia e processamento do material

Após 7, 15, 30 e 60 dias contados à partir da extração, 6 animais (em cada tempo de eutanásia) foram pesados e receberam dose letal de anestésico (Quetamina 400mg/kg + Xilazina 40 mg/kg, via intraperitoneal).

Após eutanásia realizou-se a tricotomia da região de mandíbula, dissecação das mesmas com remoção da região operada e tecidos moles circunvizinhos. Para tal, mandíbulas foram seccionadas usando-se peça de mão e disco de Carborundum (Disco de Carborundum Dentorium - Labordental). Os fragmentos ósseos das hemi-mandíbulas foram fixados em solução de formalina tamponada a 10% por um período de 24 a 48 horas e em seguida cada peça envolvida em gaze identificada e colocada suspensa em um recipiente (Becker) contendo ácido nítrico (Merk) a 5%, por quinze dias para descalcificação. Então o material foi processado rotineiramente para inclusão em parafina, e colocação com hematoxilina e eosina (HE) e Tricrômico de Mallory com cortes histológicos longitudinais ao longo eixo da mandíbula para visualização de todo ao alvéolo e tecido ósseo neoformado.

3.5 Análise histológica do reparo ósseo

As amostras histológicas foram fotografadas e avaliadas por patologista experiente, sem prévio conhecimento dos grupos.

Os parâmetros do reparo alveolar foram avaliados nos cortes corados por HE, e seguiram os seguintes critérios: presença ou ausência de epitelização, inflamação, tipo de infiltrado inflamatório, necrose e número de osteócitos segundo a metodologia proposta por Kumar, 2010²⁸. Foi considerado como necrose óssea áreas de lacunas osteocíticas vazias e superfícies fortemente erodidas. A inflamação foi avaliada de acordo com a quantidade e tipo de células inflamatórias. Qualitativamente, a inflamação será classificada em aguda (predominância de neutrófilos de infiltração), crônica (predominância de células mononucleares de infiltração, tal como os macrófagos e linfócitos) e mista (a presença de ambas as células de processos agudos e crônicos em proporções semelhantes).²

3.6 Histomorfometria óssea

A área do osso neoformado foi avaliada em cortes corados por Tricrômico de Mallory, com auxílio do plugin “treshold” do software ImageJ, no qual o programa leu as áreas fortemente coradas em azul, características do osso (Figura 2).²⁹

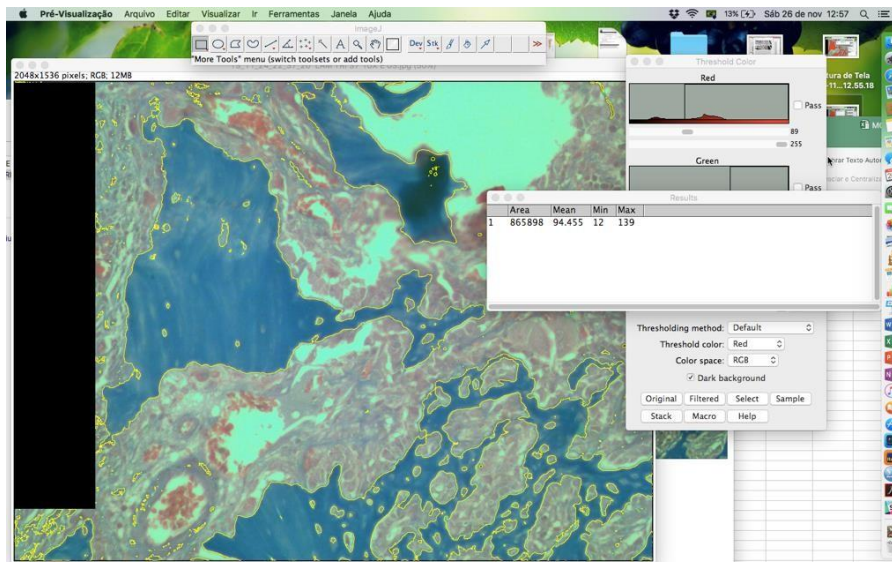


Figura 2: (A) Metodologia de contagem de osteócitos usando o "contador de células" plugin - mancha HE. (B) Matriz óssea recém formada em azul devido à mancha de colágeno - mancha Trichrome de Mallory (ampliação original 100 x)

3.7 Análise Estatística

Os dados foram submetidos a teste de normalidade Shapiro-Wilk e depois analisados com teste t , apropriado para avaliação das diferenças entre o grupo controle e o laser em baixa intensidade. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

Toda análise dos dados foi realizada com o software SPSS® (SPSS statistics v23, USA).

4. RESULTADOS

4.1 Artigo 1

Os resultados desse trabalho foram enviados para publicação na revista Laser in Medical Science (anexo III).

5. DISCUSSÃO

O presente estudo testou a hipótese que a fotobioestimulação com laser em baixa intensidade poderia favorecer o reparo ósseo de alvéolos de animais espontaneamente hipertensos. Foram aplicadas duas doses de irradiação, uma no pós-operatório imediato e outra aos sete dias pós-cirúrgico e avaliou-se a inflamação, necrose, epitelização, deposição de matriz óssea e número de osteócitos aos 7, 14, 30 e 60 dias, sem diferenças estatísticas entre os grupos.

Esse resultado vai ao encontro dos achados de Bouvet-Gerbetaz et al., 2009, que aplicaram FBM com laser de 808 nm, fluência de 4 J/cm², 3 vezes por semana em células da medula óssea de murinos, e não encontram diferença na proliferação e diferenciação dessas células.³⁰

Outra parte da literatura comprova o benefício da aplicação do laser em alvéolos recém extraídos,^{18,19,21,25,26,27} esses estudos aplicaram o laser em 2 ou 3 sessões semanais, e muitos usaram uma dose maior. Talvez a variação dos parâmetros do laser possa se mostrar benéfica para o reparo alveolar.

Nosso grupo parte do princípio de sempre tentar pesquisar qual seria o mínimo de aplicações do laser para se obter o máximo de resultados positivos no reparo^{31,32,33,34} e o presente trabalho seguiu essa premissa, que o mínimo de aplicações seria uma no pós operatório imediato e outra dali sete dias para a remoção dos pontos. Em estudos futuros, será válido aplicar mais sessões semanais, considerando que não houve benefício no reparo com o protocolo proposto nesse trabalho.

A escolha destes parâmetros é fundamental para a obtenção de um bom resultado com laser em baixa intensidade, sendo os mais significativos a escolha do comprimento de onda do laser, densidade de energia (dose ou fluência total) e a densidade de potência (intensidade), utilizada, número de tratamentos e as características ópticas do tecido.³

Esse é o primeiro estudo que avalia a FBM em extrações de animais hipertensos. Essa é uma linhagem que se reproduz pouco e a mortalidade dos filhotes é alta, dessa forma, neste experimento o mesmo animal foi utilizado como controle o que diminui o número de animais a ser utilizado e diminui as variáveis do experimento, uma vez que esses animais são muito estressados por sua própria carga genética, e modificações no meio ambiente, como sons,

temperatura, tipo da ração podem fazer com que os resultados sejam diferentes.

A escolha de se trabalhar com ratas veio de uma normativa no Instituto Nacional de Saúde do Estados Unidos (NIH - NOT-OD-15-102 de 2015), que recomenda o uso de fêmeas e machos nos experimentos, uma vez que a variabilidade de gêneros faz parte dos processos de saúde e doença e que precisam ser considerados nos estudos científicos.

Dois limitações desse trabalho foram não avaliar a presença dos osteoclastos pela técnica histoquímica de TRAP e a outra foi não se avaliar a densidade óssea por microCT. Estudos futuros irão sanar essas deficiências.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que nas condições do estudo, a aplicação de LBI não interferiu no reparo ósseo de alvéolos de ratos espontaneamente hipertensos.

7. Bibliografia

- 1- VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010) VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. Arq Bras Cardiol. 2010; Supl. Vol.1 pp: 1-40
- 2- Chin VK¹, Shinagawa A, Naclério-Homem Mda G. Bone healing of mandibular critical-size defects in spontaneously hypertensive rats. Braz Oral Res. 2013 Sep-Oct; vol 27(5) pp: 423-30.
- 3- Manrique N¹, Pereira CC, Garcia LM, Micaroni S, Carvalho AA, Perri SH, Okamoto R, Sumida DH, Antoniali C. Alveolar bone healing process in spontaneously hypertensive rats (SHR). A radiographic densitometry study. J Appl Oral Sci. 2012 Mar-Apr; vol. 20(2) pp: 2227.
- 4- Bastos MF¹, Brilhante FV, Bezerra JP, Silva CA, Duarte PM. Braz Oral Res. Trabecular bone area and bone healing in spontaneously hypertensive rats: a histometric study. 2010 Apr-Jun vol. 24(2) pp:170-6.
- 5- Cesarino CB, Cipullo JP, Martin JFV, Ciorlia LA, Godoy MRP, Cordeiro JA, Rodrigues IC. Prevalência e fatores sociodemográficos em hipertensos de São Jose do Rio Preto. Arq Bras Card. 2008; vol.91 pp:31-5.
- 6- . Rosário TM, Scala LCNS, Frana GVA, Pereira MRG, Jardim PCBV. Prevalência, controle e tratamento da hipertensao arterial sistemica em Nobres, MT. Arq Bras Card. 2009; vol. 93 pp: 672-8.
- 7- Pereira M, Lunet N, Azevedo A, Barros H. Differences in prevalence, awareness, treatment and control of hypertension between developing and developed countries. J Hypertension. 2009;vol. 27 pp: 963-75.
- 8- Nobre F, Coelho EB, Lopes PC3, Tufik J. M. Geleilete. - Hierpetensão arterial sistêmica primaria. Essential Arterial Hypertension. Medicina (Ribeirão Preto) 2013;vol.46(3) pp: 256-72
- 9- Ferreira J S e Aydos RD . Prevalência de hipertensão arterial em crianças e adolescentes obesos. Prevalence of hypertension among obese children and adolescents .Ciência & Saúde Coletiva, 2010;vol.15(1) pp:97-104.
- 10- D. Mion Jr, A.M. G. Pierin, A. Guimarães. Tratamento da hipertensão arterial-respostas de médicos brasileiros a um inquerito. Trabalho realizado na Liga de

Hipertensão do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP; Instituto Central do Hospital das Clínicas Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, SP. Rev Ass Med Brasil 2001; vol 47(3) pp: 249-54.

11- Gehrke, AS. Avaliação in vivo dos efeitos do resveratrol em processos de neoformação óssea em coelhos. Tese de Doutorado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. 2010.

12- Di Chen, Ming Zhao and Gregory R. Mundy. Bone Morphogenetic Proteins. Growth Factors, December 2004 Vol. 22 (4), pp. 233–241.

13- Lindhe J , Cardaropoli G,Araújo M. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites.An experimental study in dogs . Journal of clinical Periodontology, September 2003 Vol 30(9) ,pp 809–818 .

14- Pereira AC, Fernandes RG, Carvalho YR, Balducci I, Faig-Leite H. Bone Healing in Drill Hole Defects in Spontaneously Hypertensive Male and Female Rats' Femurs. A Histological and Histometric Study. June 1, 2006. UNESP - São José dos Campos, SP, Brazil.

15- Bastos MF, Vasconcelos de Araújo I, Vilhena Brilhante F, Pires AG, Dias Gonçalves TE, Napimoga MH, Marques MR, Duarte PM. Effects of lercanidipine on bone density and bone repair in spontaneously hypertensive rats. Implant Dent, 2013 Feb vol;22(1) pp:49-54.

16- Fazan VPS, Kalil ALR, Alcântara ACL, Genari AB, Tavares MR, Rodrigues AR, Salgado HC. Espontaneamente hipertensos e neuropatias periféricas. Medicina, Ribeirão Preto, 2006. 39(1):39-50.

17- Nayer S. AboElsaad & Mena Soory & Laila M. A. Gadalla & Laila I. Ragab & Stephen Dunne & Khaled R. Zalata & Chris Louca. Effect of soft laser and bioactive glass on bone regeneration in the treatment of bone defects (an experimental study). Lasers Med Sci 2009; vol. 24 pp:527–533.

18- Tomimura S, Bianca Passos Assumpção Silva BPA, Sanches IC, Canal M, Colombo FC , Conti FF, De Angelis K, Chavantes MC. Hemodynamic Effect of Laser Therapy in Spontaneously Hypertensive Rats. Arq Bras Cardiol. 2014 Aug;vol.103(2) pp:161-4.

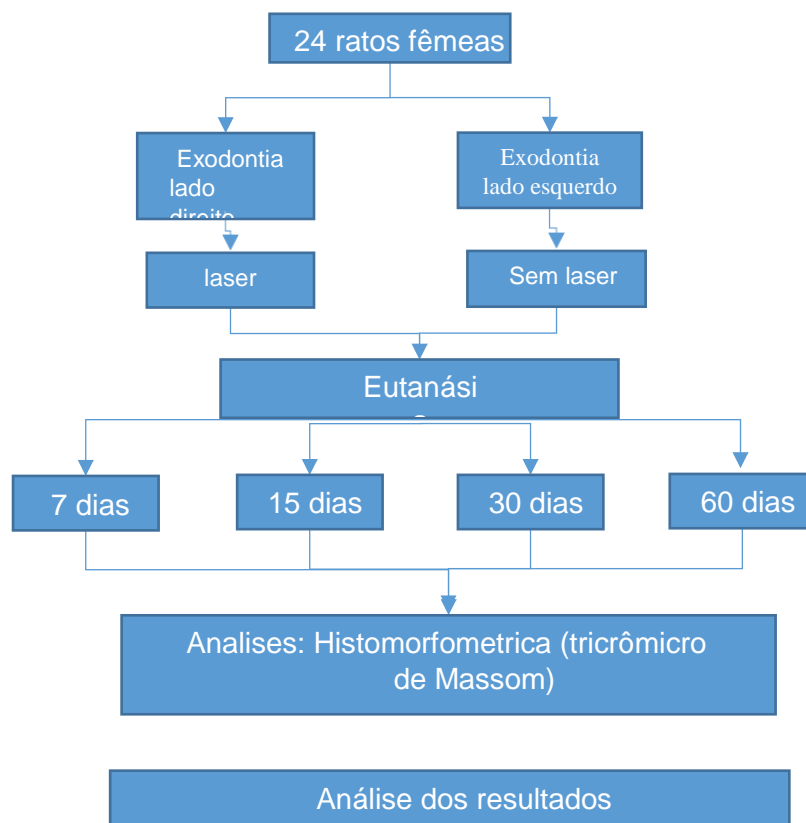
- 19- Oliveira RF, Zangaro RA, Soares CP. Evaluation of Low-Level Laser Therapy of Osteoblastic Cells. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2008; Vol 26(4).
- 20- Ozawa Y, Shimizu N, Kariya G, Abiko Y. Low-energy laser irradiation stimulates 246 nodule formation at early stages of cell in rat calvarial cells. *Bone*. 1998 Apr;22(4):347–54.
- 21- Ebrahimi T, Moslemi N , Rokn AR , Heidari M , Nokhbatolfoghahaie H, Fekrazad R. The Influence of Low-Intensity Laser Therapy on Bone Healing. *Journal of Dentistry*, 2012; Tehran University of Medical Sciences, Vol.9 (4).
- 22- Shakouri SK , Soleimanpour J, Salekzamani Y , Oskuie MR. Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process. *Lasers Med Sci* ,2010; vol25 pp: 73–77 .
- 23- Fukuoka H, Daigo Y, Enoki N, Taniguchi K, Sato H. Influence of carbon dioxide laser irradiation on the healing process of extraction sockets. *Acta Odontol Scand*. 2011 Jan; 69 (1): 33-40.
- 24- Park JB, Ahn SJ, Kang YG, Kim EC, Heo JS, Kang KL. Effects of increased low-level diode laser irradiation time on extraction socket healing in rats. *Lasers Med Sci*. 2015 Feb;30(2):719-26..
- 25- Mergoni G, Vescovi P, Sala R, Merigo E, Passerini P, Maestri R, Corradi D, Govoni P, Nammour S, Bianchi MG. The effect of laser therapy on the expression of osteocalcin and osteopontin after tooth extraction in rats treated with zoledronate and dexamethasone. *Support Care Cancer*. 2016 Feb;24(2):807-13.
- 26- Nissan J, Assif D, Gross MD, Yaffe A , Binderman I . Effect of low intensity laser irradiation on surgically created bone defects in rats. *Journal of Oral Rehabilitation* 2006 vol 33 pp: 619–624.
27. Pretel H, Lizarelli RFZ, Ramalho LTO. Effect of Low-Level Laser Therapy on Bone Repair: Histological Study in Rats. *Lasers in Surgery and Medicine*.2007; Vol. 39 pp: 788–796 .
28. Kumar GL, Kiernan JA."Special stains and H&E." 2nd edition. Dako: Carpinteria, CA, USA, 2010.

29. Oliveira, PGFP .Avaliação histomorfométrica, imunohistoquímica e imunoenzimática do efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana na doença periodontal. Estudo in vivo em ratos. Tese de Mestrado . 2014 .Ribeirão Pretos.
- 30- 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.
- 31- Núñez Sc, França Cm, Silva DF, Nogueira GE, Prates RA, Ribeiro MS. The influence of red laser irradiation on burn healing in rats. *Lasers Med Sci.* 2013 Feb; 28 (2): 633-41
- 32- Loura Santana C, Silva Dde F, Deana Am, Prates Ra, Souza Ap, Gomes Mt, Azevedo Sampaio BP, Shibuya JF, Bussadori SK, Mosque-Ferrari RA, Fernandes KP, França CM. Tissue responses to postoperative laser therapy in diabetic rats submitted to excisional wounds. *PLoS One.* 2015 Apr 24; 10 (4): e0122042.
- 33- Loura Santana C, Fátima Teixeira Silva D, De Souza AP, Jacinto MV, Bussadori SK, Mosque-Ferrari RA, Fernandes KP, France Cm. Effect of laser therapy on immune cells infiltrates after excisional wounds in diabetic rats. *Lasers Surg Med.* 2016 Jan; 48 (1): 45-51. Doi: 10.1002 / lsm.22445.
- 34- França CM, Anders JJ, Lanzafame RJ. Photobiomodulation in Wound Healing: What Are We Not Considering? *Photomed Laser Surg.* 2016 Feb; 34 (2): 51-2.
- 35- Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977;vol 33 pp:159-74.
- 36- Estudo da presença de osteonecrose na mandíbula após exodontia de molares em ratos tratados com alendronato de sódio. Tese de Doutorado 2010, São Paulo.
- 37- Ricci R. Estudo in vitro da biomodulação de células endoteliais em respostas a diferentes dosimetrias do laser de semiconductor InGaAlP[dissertação]. São José dos Campos (SP); UNIVAP; 2003.

- 38- Ghamsari, S.M.; Taguchi, K.; Abe, N.; Acorda, J.A.; Sato, M.; Yamada, H. 1987. Evaluation of low level laser therapy on primary healing of experimentally induced full thickness teat wound in cattle. *Veter. Sur.*, 26:114-120.
- 39- J,Kert.; L Rose. *Low Level Laser Therapy. Scandinavian Medical Laser. Rosenberg Bogtryk Ballerup, Denmark, Copenhagen, 1989.*
- 40- Ribeiro, M.S.; Teixeira Da Silva, D.; De Araújo, CEN.; De Oliveira, SF.; Pelegrini, CMR.; Zorn, TMT.; Zezel, M. Effects of Low-Intensity Polarized Visible Laser Radiation on Skin Burns: A Light Microscopy Study. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery.* v.22, n.1, p. 59-66, 2009.
- 41- Robbins, S. L.; Cotran, R. S ; Kumar, V. *Reparo: Crescimento Celular, Regeneração e Cicatrização de Feridas. Patologia Básica, ed. Guanabara Koogan, cap.3, p.40-50.*
- 42- Pretel H, Lizarelli RFZ, Ramalho LTO. Effect of Low-Level Laser Therapy on Bone Repair: Histological Study in Rats. *Lasers in Surgery and Medicine.* 2007; Vol. 39 pp: 788–796 .
- 43- Oliveira, PGFP .Avaliação histomorfométrica, imunohistoquímica e imunoenzimática do efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana na doença periodontal. Estudo in vivo em ratos. Tese de Mestrado . 2014 .Ribeirão Pretos.
- 44- Estudo da presença de osteonecrose na mandíbula após exodontia de molares em fratos tratados com alendronato de sódio. Tese de Doutorado 2010, São Paulo.

8. Anexos

8.1 Anexo I - Fluxograma



8.2 Anexo II - CONCEA



Protocolo de Pesquisa referente ao Projeto nº AN0032/2015

Título do Projeto: Efeitos do laser de baixa potência na biomodulação óssea após extração dental em ratos espontaneamente hipertensos (SHR)

Orientador: Cristiane Miranda França

Aluno: Giuliana Giovinazzo Anselmo Ramos

Objetivos.

Gerais: Avaliar o efeito da laserterapia no processo de reparo /neoformação óssea em ratos espontaneamente hipertensos

Específicos:

- Avaliar se a laserterapia, influencia positivamente nos aspectos histomorfométricos e histoquímicos no reparo ósseo após extração dentária em modelo animal espontaneamente hipertenso.
- Avaliar a laserterapia na biomodulação na classificação da inflamação e sua resolução durante o reparo alveolar de animais hipertensos.

Método.

A Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) é considerada como uma síndrome poligênica, multifatorial, adicionada a fatores ambientais, vasculares, hormonais, renais e neurais caracterizada pelo aumento da resistência vascular periférica e fluxo sanguíneo. Os valores de pressão arterial (PA) são superiores a 140/90 mmHg. A HAS interfere no tecido ósseo, por afetar o sistema de regulação de cálcio induzindo uma perda de massa óssea importante, e isso oferece alterações e riscos para tratamentos odontológicos, em especial, os que envolvem manutenção e neoformação óssea como exodontias e cirurgias orais maiores. A bioestimulação com laser de baixa intensidade, tem sido muito empregada, por criar uma série de efeitos positivos que aceleram a cicatrização de defeitos ósseos in vivo e in vitro, estimula o fluxo sanguíneo, recrutamento e ativação de osteoblastos, osteossíntese, e diminuição da atividade osteoclástica e também promovendo ação antiinflamatória. O objetivo desse estudo é avaliar a quantidade e qualidade óssea em ratos hipertensos submetidos a exodontia de molar e verificar se a fotobiomodulação com laser em baixa intensidade favorece o remodelamento ósseo. Para o estudo serão utilizados 48 ratos espontaneamente hipertensos SHR do gênero feminino, onde será realizado a exodontia dos molares direito e esquerdo na mandíbula, e no alvéolo lado direito será aplicado a laserterapia (Therapy XT, DMC, São Carlos, Brasil), segundo os seguintes parâmetros: λ : 808 (\pm 10) nm, P= 100 mW, área do feixe: 0,126 cm², tempo= 40 segundos, energia total= 4 J, densidade de potência= 0,8 W/cm², densidade de energia 32 J/cm². Os alvéolos do lado direito servirão como controle contralateral e não serão tratados. Serão eutanasiados 06 animais em 4 tempos diferentes: 7, 14, 30 e 60 dias após a extração dental. Para minimizar o uso de mais animais, o controle será feito no mesmo animal usando a hemimandíbula contralateral à tratada, onde as 6 mandíbulas serão processadas para análises histológicas. Serão feitas análises clínicas histológicas, histomorfométricas e histoquímicas. Os resultados obtidos serão submetidos à análise estatística apropriada.

Animais (procedência, raça, linhagem, número de animais, peso, sexo).

Rato isogênico, SHR, 12 semanas de idade, pesando cerca de 300g.

Número de animais 24 fêmeas no total.

Condições de alojamento e nutrição.

Alimentação: Será utilizada ração para ratos (NUTRILAB CR-1*)

- o Fonte de água – filtrada (*ad libitum*)
- o Lotação - Número de animais/área – 4-5 animais
- o Exaustão do ar: sim

Medidas para evitar estresse e/ou dor nos animais.

O estresse que o animal sofrerá será somente para o procedimento da contenção para induzir anestesia geral. Ao passar a anestesia geral pode haver desconforto pela remoção de dois molares inferiores, não haverá restrição hídrica/alimentar.

Procedimento Anestésico e/ou Analgésico (incluir dose e vias de administração).

Fármaco	Quetamina (Dopalen, Vetbrands, Jacareí, SP)
Dose (UI ou mg/kg)	100 mg/kg
Via de administração	Intraperitoneal

Fármaco	Xilazina (Anasedan, Vetbrands, Jacareí, SP)
Dose (UI ou mg/kg)	10 mg/kg
Via de administração	Intraperitoneal

Fármaco	Dipirona
Dose (UI ou mg/kg)	50 mg / Kg
Via de administração	Subcutânea
Frequência	A cada 4 horas / Durante 3 dias

Eutanásia

Descrição	Será utilizado para método da eutanásia uma superdosagem de anestésico
Substância, dose, via	Quetamina 400mg/kg + Xilazina 40 mg/kg Via Intraperitoneal

Pertinência e valor científico do estudo proposto

A hipertensão arterial é uma patologia de condição de saúde pública, caso não diagnosticada e tratada oferece alterações e riscos para tratamentos odontológicos, em especial, os que envolvem manutenção e neoformação óssea, seu diagnóstico precoce e tratamento prévio, facilita e melhora o resultado quando realizado reabilitações orais. A prevalência dessa enfermidade é um problema de saúde pública mundial, e cerca de 50% a 60% não tem conhecimento da sua condição sistêmica. A hipertensão provoca uma série de alterações sistêmicas nos indivíduos que a apresentam, e tendo como fator modificador a intensidade e duração. Alterações na cicatrização e aposição óssea são prejudicadas nos indivíduos portadores de hipertensão. Assim sugerindo que ocorre uma alteração no metabolismo do cálcio, induzindo uma perda óssea. Deste modo, vários modelos experimentais

têm sido propostos, objetivando o avanço no conhecimento sobre os processos fisiopatológicos, assim como no descobrimento de novas opções terapêuticas. A laserterapia é eficaz, de baixo custo, sem efeitos colaterais e de possível utilização no tratamento.

Data de início: 04/06/2016

Data de término: 20/02/2017

Apresentado a este Comitê para análise ética, foi considerado:

(X) Aprovado, sendo que este projeto deverá permanecer arquivado por 05 (cinco) anos nesta Secretaria.

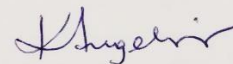
() Com pendência (relacionar), devendo o Pesquisador encaminhar as modificações sugeridas, e iniciar a coleta de dados somente após a aprovação do projeto por este Comitê.

() Não-Aprovado

Comentários:

-Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEUA – UNINOVE, o relatório final sobre a pesquisa (Lei Procedimentos para Uso Científico de Animais – Lei no 11.794-8 de outubro de 2008).

São Paulo, 25 de maio de 2016.



Prof. Dra. Kátia De Angelis
Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho

8.3 Anexo III - EFFECTS OF LOW INTENSITY LASER ON BONE HEALING AFTER MOLAR EXTRACTION IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS

Giuliana Giovinazzo Anselmo Ramos ^{1¶}, Murilo Rezende Alves, Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana¹, Márcia Cabral Oliveira¹, Karin Marie van der Heijden Cardenes², Cristiane Miranda França¹.

¹ Postgraduate Program in Biophotonics Applied to Health Sciences, University Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, São Paulo, Brazil

² School of Medicine, University Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, São Paulo, Brazil

* Corresponding author

Cristiane Miranda França

275 NW Lost Springs Terrace Unit 104

Portland, Oregon

97226

E-mail: cristiane321@gmail.com

ABSTRACT

Systemic Arterial Hypertension (SAH) is considered as a polygenic, multifactorial syndrome, due to environmental, vascular, hormonal, renal and neural factors, affecting 1 in 3 adults over 65 years. There is an association between hypertensive individuals and reduced bone mineral density. Biostimulation with low intensity laser (LBI) has anti-inflammatory activity, accelerates the healing of bone defects *in vivo* and *in vitro*, stimulates blood flow, recruitment and activation of osteoblasts, osteosynthesis, and decreased osteoclastic activity. The hypothesis of this work is that photobiomodulation with LBI improves bone repair after exodontia in hypertensive rats. For the study, 24 female spontaneously hypertensive SHR rats (200-250 g) were used in which the right and left lower molars were extracted. The left alveolus was the control and the right one received the laser therapy (Therapy XT, DMC, São Carlos, Brazil), according to the following parameters: λ : 808 (\pm 10) nm, P = 100 mW, beam area: 0.126 cm², time = 40 seconds, total energy = 4 J, power density = 0.8 W/cm², energy density 32 J/cm². Two applications were performed, one in the immediate postoperative period and the other on day 7. On days 7, 14, 30 and 60 the animals were euthanized and the mandible fragments sent for decalcification, paraffin inclusion, staining with hematoxylin & eosin and Mallory's trichrome. The samples were evaluated by a pathologist without knowledge of the groups, who analyzed the presence and type of inflammation, necrosis, bacteria, epithelialization, neoformed bone area and number of osteocytes. The data were evaluated with t-test (SPSS v23, IBM) and there was no statistical difference between the groups in any of the parameters evaluated. It is concluded that under the conditions of the study, the application of LBI did not interfere in the bone repair of alveoli of spontaneously hypertensive rats.

Key words: Hypertension, bone neoformation, lasers, low intensity light therapy, oral surgery

INTRODUCTION

Currently laser therapy or photobiomodulation (PBM) with low intensity laser can create a series of positive effects that accelerate the healing of bone defects *in vivo* and *in vitro*. The low intensity laser stimulates blood flow, recruitment and activation of osteoblasts, osteosynthesis, and decrease of osteoclastic activity and also promoting anti-inflammatory action.¹⁸

This therapy plays an important role in the activation of components of the cellular structure, converting light energy (irradiated) into photochemical energy, leading to biochemical reactions in the mitochondrial respiratory chain. PBM promotes changes in metabolism, thus inducing molecular, cellular and systemic changes, thus promoting an intracellular photobiological response, activating the production of adenosine triphosphate (ATP), nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS), changing the pumps Sodium and potassium, and facilitating membrane permeability. As a result, reduction of inflammatory process and edema, modification of micro- and macrovascular response, and better tissue repair are observed *in vivo* and clinically. In addition, low-power laser is a non-invasive, low-cost treatment.^{19, 20}

The use of FBM in bone cells was first published in 1998 by Ozawa et al., in which it irradiated rat osteoblasts and observed formation of mineralization nodules.[ref] Thereafter, several studies have demonstrated a biostimulating effect on bone stem cells and acceleration of bone repair. Ebrahimi et al., 2012, conducted a systematic review of the literature on the subject and concluded that there is great variability in study methods and dose parameters, so the results are difficult to compare. However, the authors concluded that in most cases FBM can accelerate bone repair at sites of bone fractures, osteogenic distraction and distraction in animal models. The diode laser was the most studied, with wavelengths used ranging from 633 to 904 nm.²²

According to Shakouri, et. Al 2010 showed benefits of the use of low intensity laser at the wavelength of 830 nm (near infrared), also having a proliferation of osteoblasts and affecting calcium transport during the new bone formation, thus also being effective in the cicatrization process Bone.²⁴

Fukuoka et al., studied the effects of the low-intensity laser in a single application in the alveoli after the exodontia. The tissue was evaluated 6 hours, 3, 7 and 21 days and either authors observed that the alveolar ridge was larger in the irradiated groups than in the controls and that there were more smooth muscle actin positive cells in the control than in the irradiated groups, concluding that The laser induces different characteristics in the repair process, suggesting a beneficial effect in the same.⁴²

In an attempt to clarify the influence of laser parameters on dental alveolar repair, Park et al. Investigated the effects of irradiation time on the expression of genes and proteins related to bone remodeling. The alveoli were irradiated with diode laser, 980 nm for 0, 1, 2, or 5 minutes for 3 or 7 days. The highest level of expression of the osteocalcin, collagen I, platelet derived growth factor and vascular endothelial growth factor genes was observed at the 5-minute application.²³

The neodymium laser (Nd: YAG), 1064 nm, 1.25 W, 15 Hz and 5 minutes of exposure (14.37 J/cm^2) increased the expression of osteocalcin but not of osteopontin during the repair of alveoli of Animals with altered systemic conditions, as in the case of osteonecrosis-related medication, zoledronate and dexamethasone, as studied by Mergoni et al., 2016.

The power density is important in the FBM of bone repair. Nissan et al., 2006 studied the effect of two doses: 4 and 22.4 mW/cm^2 applied daily for 3 minutes for 1, 2 or 4 weeks. It was observed that the group receiving the lowest dose had an increase in calcium at the site of the surgical defect, but not in alkaline phosphatase.^{25, 26}

There are several protocols for irradiating the alveolus after surgery, generally the wavelength ranges from 660 nm to 830 nm (red and infrared), where a single dose application is suggested after dental surgical procedure.²⁷

Based on these studies, the hypothesis proposed for this work is that low intensity laser irradiation may improve the repair of alveoli of spontaneously hypertensive rats.

MATERIAL AND METHODS

The study consisted of 24 spontaneously hypertensive female SHR rats (12 weeks of age, born and kept in the Nove de Julho University Vivarium at constant temperature of 22-25 °C, 12h cycle - light/dark, relative humidity of 50-60%, and water ad libitum).

Experimental procedures

The 24 animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of Quetamine (100 mg/kg - Dopalen, Vetbrands, Jacareí, SP) and Xilazine (10 mg / kg- Anasedan, Vetbrands, Jacareí, SP). The lower right and left molars were removed surgically with a lever and a hollenback. Immediately after surgery the alveolus on the left side received PBM with low intensity laser (Therapy XT, DMC, São Carlos, Brazil), according to the following parameters: λ : 808 (\pm 10) nm, P = 100 mW, beam area: 0.126 cm², time = 40 seconds, total energy = 4 J, power density = 0.8 W/cm², energy density 32 J/cm². The right side alveoli served as contralateral control and was not treated. Afterwards, the animals were placed on a thermal mattress until anesthetic return to avoid hypothermia and 50 ml/kg of dipyrone solution was administered subcutaneously to avoid postoperative discomfort. Animals were monitored daily for their water intake, feed intake and weekly for weight and blood pressure.

Clinical evaluation

Clinically the animals were evaluated for the presence of oral ulcer, edema, pus or fistula, as well as presence of pain or altered weight and behavior.

Euthanasia and material processing

After 7, 15, 30 and 60 days counted from the exodontia, 6 animals (at each time of euthanasia) were weighed and a lethal dose of anesthetic (Quetamine 400mg/kg + Xilazine 40 mg/kg intraperitoneal) was administered. After the euthanasia was performed, the jaw region was tricotomized, dissected with the removal of the operated region and surrounding soft tissues, using a handpiece and Carborundum disc (Carborundum Dentorium - Labordental Disc). The bone fragments of the hemi-jaws were fixed in 10% buffered formalin solution for a period of 24 to 48 hours and then each piece was wrapped in an identified gauze

and suspended in a Becker vessel containing EDTA (ethylenediamine tetra Acetic acid-Merck) at 4%, pH 7.4 for fifteen days for descalcification. Then the material was routinely processed for paraffin inclusion, and staining with hematoxylin and eosin (HE) and Mallory's trichrome with longitudinal histological sections along the mandibular axis for visualization of the whole alveolus and neoformed bone tissue.

Histological analysis of bone repair

The photographed histological samples were evaluated by two calibrated researchers, without previous knowledge of the groups, with a concordance index above 0.81 (optimal). The parameters of the random repair evaluated were: amount of necrotic bone, amount of bone matrix, presence or absence of ulceration, inflammation, and granulation tissue according to the methodology proposed by Kumar, 2010 ²⁹. Inflammation was assessed according to the amount and quality, type and distribution of the inflammatory cell infiltrate. Qualitatively, inflammation was classified as acute (predominance of infiltration neutrophils), chronic (predominance of infiltrating mononuclear cells, such as macrophages and lymphocytes) and mixed (the presence of both acute and chronic process cells in similar proportions).

Bone histomorphometry

The osteocytes were counted in the HE stained samples using the "cell counter plugin of the ImageJ software (free software, NIH, USA) (Figure 2C). The area of newly formed bone was evaluated by a pathologist with no knowledge of the samples, who analyzed the histological cuts stained with Mallory's Trichrome, with the aid of the "threshold" plugin of the ImageJ software. The collagen fibers and the bone matrix were seen in blue (Figure 2B). ³⁰

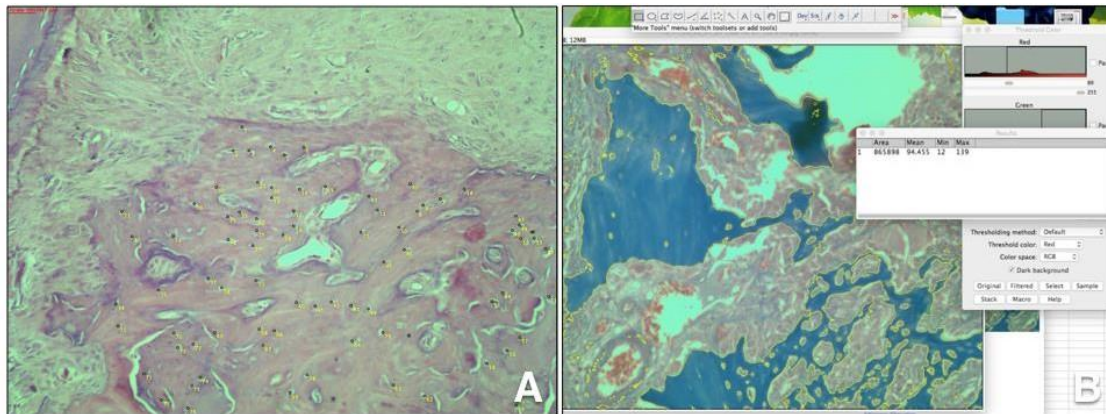


Figure 1: (A) Methodology of osteocyte counting using the “cell counter” plugin – HE stain. (B) Newly formed bone matrix in blue due to collagen stain – Mallory’s Trichrome stain (original magnification 100 x)

Statistical analyzes

Data was submitted to the Shapiro-Wilk test and were considered parametric. Therefore the *t*-test was used with a level of significance of 0.05 (statistics v23, USA).

RESULTS

None of the animals presented oral ulcer, edema, pus or fistula, in case of presence of post-operative pain, the analgesics were prescribed.

At all experimental days all animals presented epithelization; no necrosis or empty osteocytic lacunae were observed.

The parameters of the random repair evaluated were: amount of necrotic bone, amount of bone matrix, presence or absence of ulceration, inflammation, osteoblasts in activity and osteoclasts, granulation

At Day 7 both sides presented granulation tissue, osteoclasts and bone remodeling (Figure 2)

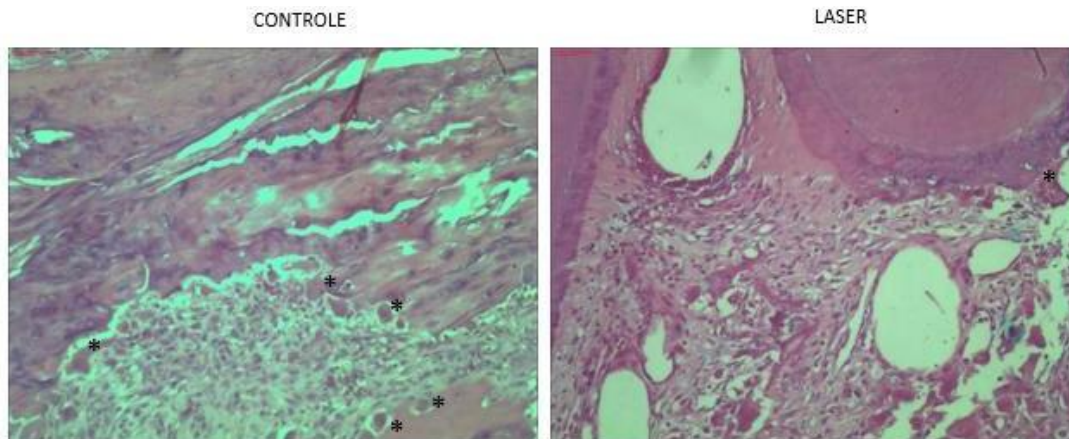


Figure 2: Photomicrography of the alveoli under repair at 7 days showing intense remodeling, osteoclasts (*), presence of mononuclear cells and blood vessels. (Hematoxylin and eosin, 100 x original magnification)

At days 14, 30 and 60 a newly formed bone, characterized by bone trabeculae circumscribed by dense connective tissue could be observed in all specimens, with similarity between laser and control sites ($p = 0,14$ *t*-test). Figure 3 shows The area of newly formed bone in 14 days and in 60 days showing no difference between the groups ($p = 0.32$ and $p = 0.46$, respectively, *t*-test).

The results of day 30 and 60 were similar, so only the analyses of day 60 will be shown hencefore (Figures 4)

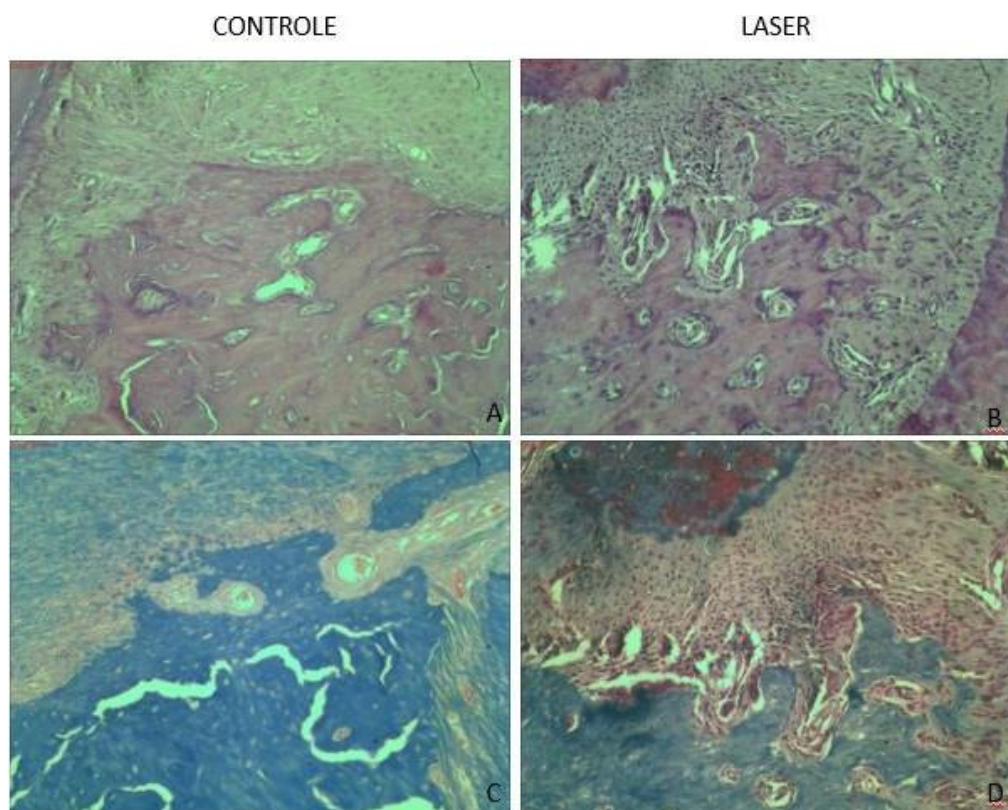


Figure 3: Photomicrography of alveoli repaired at 60 days showing similar bone synthesis in both groups ($p = 0.48$). Blades A and B stained with hematoxylin and eosin. Blades C and D stained with Masson's trichrome, showing the mature bone collagen in blue and fibroblasts in red. (Original 40x magnification)

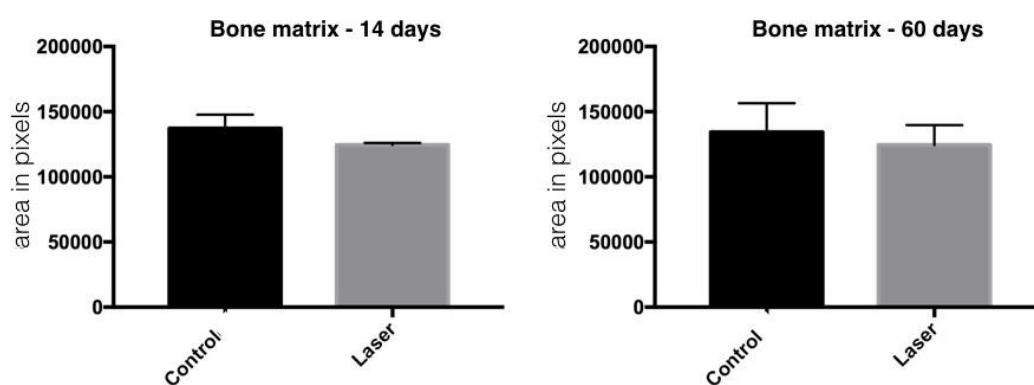


Figure 4: Statistical analyzes of the bone matrix area in pixels showing no difference between the groups at Day 14 and 60 ($p = 0.32$ and $p = 0.46$, respectively, t -test)

At day 60 the osteocytes were counted and there was no difference between the laser and control group (Figure 5)

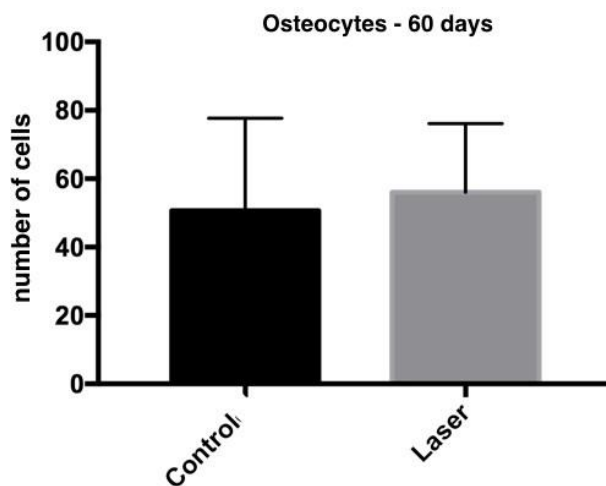


Figure 5: Osteocyte count at Day 60 showing similarity between the groups (p – 0.33, *t*-test)

Discussion:

The present study tested the hypothesis that low intensity laser photobimodulation could favor the bone repair of spontaneously hypertensive animal alveoli after tooth extraction. Two doses of irradiation were applied, one in the immediate postoperative period and the other seven days postoperatively. Inflammation, necrosis, epithelization, bone matrix deposition and number of osteocytes were evaluated at 7, 14, 30 and 60 days. There was no statistical differences between groups.

This results are in line with the findings of Bouvet-Gerbettaz et al., 2009, which applied PBM with 808 nm laser, 4 J/cm² fluency, 3 times a week in murine bone marrow cells, and found no difference in proliferation and differentiation of these cells.³⁷

Another part of the literature demonstrates the benefit of laser application in newly extracted alveoli, [citing reference numbers], these studies applied the laser in 2 or 3 weekly sessions, and many used a larger dose. Perhaps the variation of laser parameters may prove to be beneficial for alveolar repair.

Our group tries to investigate the minimum number of laser applications to obtain maximum positive results in the tissue repair.^{38,39,40,41}

The present study followed this premise, that the minimum of applications would be one in the immediate postoperative and another seven days for the removal of the points. In future studies, it will be valid to apply more weekly sessions, considering that there was no benefit in the repair with the protocol proposed in this research.

The choice of these parameters is fundamental to obtain a good result with low intensity laser, the most significant being the choice of laser wavelength, energy density (dose or total fluence) and power density (intensity), number of treatments and the optical characteristics of the tissue.³

This is the first study that evaluates PBM in extractions of hypertensive animals. This is a lineage that with low reproductive rates and high mortality of the newborns, so, this experiment was designed to use the same animal as control, which decreases the number of animals to be used and decreases the variables of the experiment, since these animals are very stressed by their own genetic background, and changes in the environment, such as sounds, temperature, and type of food, can make the results differ.

The choice of working with rats came from a policy in the United States National Institutes of Health (NIH - NOT-OD-15-102 of 2015), which recommends the use of females and males in the experiments, since the variability of gender are part of health and disease processes and need to be considered in scientific studies.

Two limitations of this study were not to evaluate the presence of osteoclasts by the histochemical technique of TRAP and the other was not to evaluate the bone density by microCT. Future studies will remedy these shortcomings.

CONCLUSION

It is concluded that, under the conditions of the study, the application of LBI did not interfere in the bone repair of alveoli of spontaneously hypertensive rats.

REFERENCES

1. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010) VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. Arq Bras Cardiol. 2010; Supl. Vol.1 pp: 1-40
2. Chin VK¹, Shinagawa A, Naclério-Homem Mda G. Bone healing of mandibular critical-size defects in spontaneously hypertensive rats. Braz Oral Res. 2013 Sep-Oct; vol 27(5) pp: 423-30.
3. Manrique N¹, Pereira CC, Garcia LM, Micaroni S, Carvalho AA, Perri SH, Okamoto R, Sumida DH, Antoniali C. Alveolar bone healing process in spontaneously hypertensive rats (SHR). A radiographic densitometry study. J Appl Oral Sci. 2012 Mar-Apr; vol. 20(2) pp: 2227.
4. Bastos MF¹, Brilhante FV, Bezerra JP, Silva CA, Duarte PM. Braz Oral Res. Trabecular bone area and bone healing in spontaneously hypertensive rats: a histometric study. 2010 Apr-Jun vol. 24(2) pp:170-6.
5. Cesarino CB, Cipullo JP, Martin JFV, Ciorlia LA, Godoy MRP, Cordeiro JA, Rodrigues IC. Prevalência e fatores sociodemográficos em hipertensos de São Jose do Rio Preto. Arq Bras Card. 2008; vol.91 pp:31-5.
6. . Rosário TM, Scala LCNS, Frana GVA, Pereira MRG, Jardim PCBV. Prevalência, controle e tratamento da hipertensão arterial sistêmica em Nobres, MT. Arq Bras Card. 2009; vol. 93 pp: 672-8.
7. Pereira M, Lunet N, Azevedo A, Barros H. Differences in prevalence, awareness, treatment and control of hypertension between developing and developed countries. J Hypertension. 2009;vol. 27 pp: 963-75.
8. Nobre F, Coelho EB, Lopes PC³, Tufik J. M. Geleilate. - Hierpetensão arterial sistêmica primaria. Essential Arterial Hypertension. Medicina (Ribeirão Preto) 2013;vol.46(3) pp: 256-72
9. Ferreira J S e Aydos RD . Prevalência de hipertensão arterial em crianças e adolescentes obesos. Prevalence of hypertension among obese children and adolescents .Ciência & Saúde Coletiva, 2010;vol.15(1) pp:97-104.

10. D. Mion JR, A.M. G. Pierin, A. Guimarães. Tratamento da hipertensão arterial- respostas de médicos brasileiros a um inquerito. Trabalho realizado na Liga de Hipertensão do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP; Instituto Central do Hospital das Clínicas Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, SP. Rev Ass Med Brasil 2001; vol 47(3) pp: 249-54.
11. [Gehrke, AS](#). **Avaliação in vivo dos efeitos do resveratrol em processos de neoformação óssea em coelhos**. Tese de Doutorado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. 2010.
12. Di Chen, Ming Zhao and Gregory R. Mundy. Bone Morphogenetic Proteins. Growth Factors, December 2004 Vol. 22 (4), pp. 233–241.
13. Lindhe J , Cardaropoli G,Araújo M. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites.An experimental study in dogs . Journal of clinical Periodontology, September 2003 Vol 30(9) ,pp 809–818 .
14. Pereira AC, Fernandes RG, Carvalho YR, Balducci I, Faig-Leite H. Bone Healing in Drill Hole Defects in Spontaneously Hypertensive Male and Female Rats' Femurs. A Histological and Histometric Study. June 1, 2006. UNESP - São José dos Campos, SP, Brazil.
15. Bastos MF¹, Vasconcelos de Araújo I, Vilhena Brilhante F, Pires AG, Dias Gonçalves TE, Napimoga MH, Marques MR, Duarte PM. Effects of lercanidipine on bone density and bone repair in spontaneously hypertensive rats. Implant Dent, 2013 Feb vol;22(1) pp:49-54.
16. Manrique N, Pereira CC, Luvizuto ER, Sánchez Mdel P, Okamoto T, Okamoto R, Sumida DH, Antoniali C. Hypertension modifies OPG, RANK, and RANKL expression during the dental socket bone healing process in spontaneously hypertensive rats.Clin Oral Investig. 2015 Jul; vol19(6) pp:1319-1327.
17. Liang H, Ma Y, Pun S, Stimpel M, Jee WS. Aging- and ovariectomy-related skeletal changes in spontaneously hypertensive rats. Anat Rec. 1997; vol.249 pp:173-80.
18. Nayer S. AboElsaad & Mena Soory & Laila M. A. Gadalla & Laila I. Ragab & Stephen Dunne & Khaled R. Zalata & Chris Louca. Effect of soft laser and

bioactive glass on bone regeneration in the treatment of bone defects (an experimental study). *Lasers Med Sci* 2009; vol. 24 pp:527–533.

19. Tomimura S, Bianca Passos Assumpção Silva BPA, Sanches IC, Canal M, Colombo FC, Conti FF, De Angelis K, Chavantes MC. Hemodynamic Effect of Laser Therapy in Spontaneously Hypertensive Rats. *Arq Bras Cardiol.* 2014 Aug;vol.103(2) pp:161-4.

20. Oliveira RF, Zangaro RA, Soares CP. Evaluation of Low-Level Laser Therapy of Osteoblastic Cells. *Photomedicine and Laser Surgery.* 2008; Vol 26(4).

21. Bae Kim Y, Son J, Zigang GE, Seok-Hwa Choi, Kim G. Bone Healing Effects of Diode Laser (808 nm) on a Rat Tibial Fracture Model. *In vivo* 2012 Vol 26:, pp: 703-710.

22. Ebrahimi T, Moslemi N, Rokn AR, Heidari M, Nokhbatolfoghahaie H, Fekrazad R. The Influence of Low-Intensity Laser Therapy on Bone Healing. *Journal of Dentistry*,2012; Tehran University of Medical Sciences, Vol.9 (4).

23. Lins RDAU, Euler Dantas M², Lucena KCR, Catão MHCV, GarciaAFG, Neto LGC. Biostimulation effects of low-power laser in the repair process* Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo. *An. Bras. Dermatol.* Rio de Janeiro Nov/Dez 2010; vol 85(6).

24. Shakouri SK, Soleimanpour J, Salekzamani Y, Oskuie MR. Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process. *Lasers Med Sci*, 2010; vol25 pp: 73–77.

25. Merli LAS, Medeiros VP, Toma L, Reginato RD, Katchburian E, Nader HB, Faloppa F. The Low Level Laser Therapy Effect on the Remodeling of Bone Extracellular Matrix - *Photochemistry and Photobiology*, 2012, vol 88 pp:1293–1301.

26. Nissan J, Assif D, Gross MD, Yaffe A, Binderman I. Effect of low intensity laser irradiation on surgically created bony defects in rats. *Journal of Oral Rehabilitation* 2006 vol 33 pp: 619–624.

27. Pretel H, Lizarelli RFZ, Ramalho LTO. Effect of Low-Level Laser Therapy on Bone Repair: Histological Study in Rats. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2007; Vol. 39 pp: 788–796 .
28. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; vol 33 pp:159-74.
29. Kumar GL, Kiernan JA. "Special stains and H&E." 2nd edition. Dako: Carpinteria, CA, USA, 2010.
30. Oliveira, PGFP .Avaliação histomorfométrica, imunohistoquímica e imunoenzimática do efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana na doença periodontal. Estudo in vivo em ratos. Tese de Mestrado . 2014 .Ribeirão Pretos.
- 31- Estudo da presença de osteonecrose na mandíbula após exodontia de molares em fratos tratados com alendronato de sódio. Tese de Doutorado 2010, São Paulo.
32. Ricci R. Estudo in vitro da biomodulação de células endoteliais em respostas a diferentes dosimetrias do laser de semicondutor InGaAlP [dissertação]. São José dos Campos (SP); UNIVAP; 2003.
33. Ghamsari, S.M.; Taguchi, K.; Abe, N.; Acorda, J.A.; Sato, M.; Yamada, H. 1987. Evaluation of low level laser therapy on primary healing of experimentally induced full thickness teat wound in cattle. *Vet. Sur.*, 26:114-120.
34. J, Kert.; L Rose. Low Level Laser Therapy. Scandinavian Medical Laser. Rosenberg Bogtryk Ballerup, Denmark, Copenhagen, 1989.
35. RIBEIRO, M.S.; Teixeira Da Silva, D.; De Araújo, CEN.; De Oliveira, SF.; Pelegrini, CMR.; Zorn, TMT.; Zezel, M. Effects of Low-Intensity Polarized Visible Laser Radiation on Skin Burns: A Light Microscopy Study. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*. v.22, n.1, p. 59-66, 2009.
36. Robbins, S. L.; Cotran, R. S ; Kumar, V. Reparo: Crescimento Celular, Regeneração e Cicatrização de Feridas. *Patologia Básica*, ed. Guanabara Koogan, cap.3, p.40-50.

37. Bouvet-Gerbettaz 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.
38. Núñez Sc, França Cm, Silva DF, Nogueira GE, Prates RA, Ribeiro MS. The influence of red laser irradiation on burn healing in rats. *Lasers Med Sci.* 2013 Feb; 28 (2): 633-41
39. Loura Santana C, Silva Dde F, Deana Am, Prates Ra, Souza Ap, Gomes Mt, Azevedo Sampaio BP, Shibuya JF, Bussadori SK, Mosque-Ferrari RA, Fernandes KP, França CM. Tissue responses to postoperative laser therapy in diabetic rats submitted to excisional wounds. *PLoS One.* 2015 Apr 24; 10 (4): e0122042.
40. Loura Santana C, Fátima Teixeira Silva D, De Souza AP, Jacinto MV, Bussadori SK, Mosque-Ferrari RA, Fernandes KP, France Cm. Effect of laser therapy on immune cells infiltrates after excisional wounds in diabetic rats. *Lasers Surg Med.* 2016 Jan; 48 (1): 45-51. Doi: 10.1002 / lsm.22445.
41. França CM, Anders JJ, Lanzafame RJ. Photobiomodulation in Wound Healing: What Are We Not Considering? *Photomed Laser Surg.* 2016 Feb; 34 (2): 51-2.
42. Fukuoka H, Daigo Y, Enoki N, Taniguchi K, Sato H. Influence of carbon dioxide laser irradiation on the healing process of extraction sockets. *Acta Odontol Scand.* 2011 Jan; 69 (1): 33-40.

