UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

MARCELO LUPION POLETI

Análise morfométrica, radiográfica e molecular do
processo de reparo alveolar após a terapia
fotodinâmica antimicrobiana em ratos *Wistar*

Bauru
2009

MARCELO LUPION POLETI

Análise morfométrica, radiográfica e molecular do
processo de reparo alveolar após a terapia
fotodinâmica antimicrobiana em ratos *Wistar*

Dissertação apresentada à
Faculdade de Odontologia de Bauru
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Odontologia.

Área de concentração: Estomatologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Izabel Regina
Fischer Rubira-Bullen

Bauru
2009

FICHA TÉCNICA

Marcelo Lupion Poleti: Concepção, execução, texto, análise estatística.

Prof^a. Dr^a. Izabel Regina Fischer Rubira-Bullen: Concepção, orientação, análise radiográfica, revisão final.

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet: Concepção, orientação (Análise molecular).

Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis: orientação (análise morfométrica).

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato: Consultoria e orientação (dosimetria e mapeamento térmico).

Prof^a. Dr^a. Cristina Kurachi: Consultoria e orientação (dosimetria e mapeamento térmico).

Prof. Dr. José Roberto Pereira Lauris: análise estatística.

Tânia Mary Cestari: Execução (sacrifício dos animais), auxílio técnico (morfometria) e fotomicrografias.

Thais Maria Freire Fernandes: Execução, análise estatística, revisão e formatação do texto, figuras e fotografias.

Camila Lopes Cardoso: Execução, texto e fotografias.

Thiago José Dionísio: Auxílio técnico-laboratorial (PCR).

Clóvis Grecco: Auxílio experimental.

Renata Cordeiro Teixeira: Auxílio técnico (análise radiográfica).

Ana Cláudia de Araújo: Auxílio experimental.

Bruna Stuch Centurion: Auxílio experimental.

Carlos Eduardo Palanch Repeke: Desenho dos *primers*.

Daniele Santi Ceolin: Auxílio técnico-laboratorial (morfometria).

Patrícia de Sá Mortagua Germino: Auxílio técnico-laboratorial (morfometria).

Renata Carvalho Sathler: Revisão do texto, fotografias.

Daniel Selmo (Bonné): Formatação final, impressão e encadernação.

Poleti, Marcelo Lupion

P758a

Análise morfométrica, radiográfica e molecular do processo de reparo alveolar após a terapia fotodinâmica antimicrobiana em ratos *wistar* / Marcelo Lupion Poleti - Bauru, 2009.

191p. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Izabel Regina Fischer Rubira-Bullen

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Projeto de pesquisa aprovado pela Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da FOB-USP, em 13 de setembro de 2007, processo número 17/2007.

DADOS CURRICULARES

Marcelo Lupion Poleti

26 de abril de 1979

Nascimento

Santo Inácio, PR

Filiação

Antonio Poleti

Maria Ivone Lupion Poleti

2001-2004

Curso de Graduação em Odontologia
Faculdade de Odontologia de Bauru,
Universidade de São Paulo

2007-2009

Curso de pós-graduação em
Estomatologia, em nível de Mestrado,
pela Faculdade de Odontologia de Bauru,
Universidade de São Paulo

Salmos 91

- 1 *Aquele que habita no esconderijo do Altíssimo, à sombra do Onipotente descansará.*
2 *Direi do SENHOR: Ele é o meu Deus, o meu refúgio, a minha fortaleza, e nele
confiarei.*
- 3 *Porque ele te livrará do laço do passarinho e da peste perniciosa.*
4 *Ele te cobrirá com as suas penas, e debaixo das suas asas estarás seguro; a sua verdade
é escudo e broquel.*
- 5 *Não temerás espanto noturno, nem seta que voe de dia,*
6 *Nem peste que ande na escuridão, nem mortandade que assole ao meio-dia.*
7 *Mil cairão ao teu lado, e dez mil, à tua direita, mas tu não serás atingido.*
8 *Somente com os teus olhos olharás e verás a recompensa dos ímpios.*
9 *Porque tu, ó SENHOR, és o meu refúgio! O Altíssimo é a tua habitação.*
10 *Nenhum mal te sucederá, nem praga alguma chegará à tua tenda.*
11 *Porque aos seus anjos dará ordem a teu respeito, para te guardarem em todos os teus
caminhos.*
- 12 *Eles te sustentarão nas suas mãos, para que não tropeces com o teu pé em pedra.*
13 *Pisarás o leão e a áspide; calcarás aos pés o filho do leão e a serpente.*
14 *Pois que tão encarecidamente me amou, também eu o livrarei; pô-lo-ei num alto retiro,
porque conheceu o meu nome.*
- 15 *Ele me invocará, e eu lhe responderei; estarei com ele na angústia; livrá-lo-ei e o
glorificarei.*
- 16 *Dar-lhe-ei abundância de dias e lhe mostrarei a minha salvação.*

Dedico este trabalho...

A Deus

***Porque dele e por ele, e para ele, são todas as coisas; glória, pois,
a ele eternamente. Amém. Romanos 11:36***

Aos meus pais,

por simplesmente proporcionarem-me o melhor deles

A Thais,

por todo amor, carinho e dedicação a mim

Agradeço especialmente...

Aos Meus pais – Antonio e Ivone

Agradeço a Deus todos os dias pelo projeto que mais deu certo em minha vida: minha família e por me permitir ter os melhores pais do mundo!!.
AMO VOCÊS!

Aos meus irmãos – Haroldo, Elisangela, Renata e Fábio

Aos meus queridos irmãos, por todo apoio durante a realização deste sonho.

Ao meu sobrinho Samuel

Por ser uma benção em nossas vidas

A Thais,

Por existir em minha vida. Compartilhamos momentos maravilhosos juntos e a você devo todos os meus agradecimentos.

Ao Antonio, Sueli

Agradeço por terem me acolhido de uma forma tão especial. Junto com a Thais, formam minha família aqui. Obrigado por tudo

Aos meu avós, Nair, Maria e Juvenal; tios, Flávio e Sônia; primos, Fávio e Emanuele

Obrigado por cada palavra de incentivo, pelas orações.

A Família Freire, de Marília,

Sem o incentivo e as risadas de vocês as coisas ficariam mais difíceis.
Obrigado por me receberem tão bem

Minha gratidão não cabem em palavras...

Aos Professores.

A minha orientadora Dr^a Izabel Regina Fischer Rubira-Bullen por me fazer buscar o conhecimento e acreditar em mim. Agradeço pela paciência e principalmente pelos incentivos. Obrigado pelo aprendizado e pela confiança.

Agradeço aos professores **Dr. José Humberto Damante, Dr. Luiz Eduardo Montenegro Chinellato, Dr^a. Ana Lúcia Alvares Capellozza, Dr. Eduardo Sant'Ana, Dr. Osny Ferreira Júnior, Dr. Paulo Sérgio Perri de Carvalho e Dr. Eduardo Sanches** a oportunidade de realização do curso de Pós-graduação em Estomatologia na Faculdade de Odontologia de Bauru da USP; seus ensinamentos pessoais e profissionais, fundamentados no rigor científico e compromisso com a ciência levarei como lição. Sou grata pelo incentivo constante.

Ao Professor **Dr. Gustavo Garlet**, sua participação foi fundamental na execução deste trabalho, obrigado pela confiança e atenção.

Agradeço, os professores **Dr. Gerson Francisco de Assis, Dr. Vanderlei Salvador Bagnato, Dr^a. Cristina Kurachi, Dr. José Roberto Lauris, Dr. Rumio Taga**, por todo apoio, orientação e incentivo na realização deste trabalho.

Agradeço ainda,

A Tânia Cestari, Daniele Ceolin, Patrícia Germino, Thiago Dionísio e Clóvis, *sempre dispostos e atenciosos ao me ajudarem. Muito obrigado por tudo.*

A **todos os funcionários** do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia de Bauru, em especial à **Marília, Roque, Lú, Elza, Josi, Roberto, Fernanda e Alexandre**, pela prontidão com que sempre me atenderam.

Aos técnicos de Biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru **Erasmu; Luis; Richard e Elias** pela disponibilidade e atenção dispensada na parte experimental do trabalho.

Aos meus amigos **FOB USP**

Aos amigos do curso de Estomatologia, Gabriel, Elen, Manuela, Camila, Josiane, Etiene, Ana Cláudia, Cristiano, Fernando, Zanda, Renata, Martinha.

Aos amigos do curso de Ortodontia, Bruno, Camila, Fabiano, Francylle, Juliana, Luiz, Mariana, Michele, Nuria, Oscar, Ruben, Renata, Vanessa e Willian.

Aos amigos da XL, por todos os momentos maravilhosos que passamos juntos. Por terem feito parte da minha vida e demonstrarem que amizades verdadeiras são para o resto da vida.

Aos meus amigos do **PET**,

Por tudo que me proporcionaram. Levo comigo todo aprendizado e grandes amigos. Pela amizade e confiança. Vocês vão longe!

Ao professor **Carlos Ferreira dos Santos**. Por me desafiar a seguir o caminho da docência e por abrir tantas portas. Obrigado pelo carinho e amizade.

À **Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo**, na
pessoa do diretor **Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro** e do vice-diretor **Prof.
Dr. José Carlos Pereira**:

Agradeço por dar oportunidade a tantas pessoas e por acreditar nelas.

À **Prof. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado**,
Presidente da Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de
Bauru – USP.

Aos funcionários da pós-graduação, pela prontidão em ajudar.

Aos funcionários da Biblioteca, por manterem o acervo em tão
excelente estado e por me receberem sempre com um sorriso.

À **CAPES** e a FAPESP pela concessão do auxílio.

Resumo

RESUMO

Introdução: Com o aumento da resistência bacteriana à antibioticoterapia tornou-se necessário o desenvolvimento de técnicas antimicrobianas alternativas. Assim, na busca de novas metodologias contra microrganismos, estudos usando a Terapia Fotodinâmica (TFD) antimicrobiana tem sido realizados. **Objetivo:** Realizar análise morfométrica, radiográfica e molecular do processo de reparo alveolar após a TFD antimicrobiana em ratos *Wistar*. **Material e Métodos:** Foram utilizados 85 ratos, divididos nos seguintes grupos: GRUPO C: Animais com alvéolo não tratado (grupo controle); GRUPO S+L: Animais com alvéolo preenchido com soro fisiológico e tratado apenas com aplicação do Laser de baixa intensidade (660 nm), com fluência de 50 J/cm²; GRUPO ATO: Animais com alvéolo tratado apenas com aplicação tópica de azul de toluidina - O (ATO) na concentração de 100 µg/mL e GRUPO ATO+L: Animais com alvéolo tratado com aplicação tópica de azul de toluidina - O (ATO) na concentração de 100 µg/mL + aplicação de Laser de baixa intensidade (660 nm), com fluência de 50 J/cm². Os animais foram sacrificados aos 6, 15 e 28 dias pós-operatório. O mapeamento térmico foi realizado em um animal para confirmar a ausência de efeito térmico do Laser sobre o local irradiado. Foram realizadas as análises microscópicas: qualitativa e quantitativa de tecido conjuntivo, tecido ósseo, coágulo sanguíneo, vaso sanguíneo, infiltrado inflamatório e espaço vazio; radiográfica: por meio do valor de pixel e dimensão fractal e molecular: quantitativa da expressão de genes envolvidos no processo de reparo: colágeno tipo I (COL-I), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), *runt-related transcription factor 2* (RUNX2), osteocalcina (OCN) e fosfatase alcalina (ALP), por meio da PCR *Real Time*. **Resultados e Conclusão:** Os resultados demonstraram que a TFD antimicrobiana não atuou negativamente na evolução do processo de reparo alveolar; a análise radiográfica por meio dos valores de pixel pode ser usada como indicador para avaliar a neoformação óssea no processo de reparo alveolar em ratos; a expressão de VEGF pode ser usada como marcador molecular para a angiogênese no processo de reparo alveolar em ratos e a expressão de fosfatase alcalina pode ser usada como marcador molecular nos estágios iniciais do metabolismo ósseo no processo de reparo alveolar em ratos.

Palavras-chave: Alvéolo Dental. Fotoquimioterapia. Reação em Cadeia da Polimerase. Radiografia Dentária Digital. Histologia. Resistência Microbiana a Medicamentos.

Abstract

ABSTRACT

Morphometric, molecular and radiographic analysis of the alveolar repair process after antimicrobial photodynamic therapy in Wistar rats

Introduction: Antibiotics resistance made the development of antimicrobial alternative techniques necessary. Consequently, others alternatives such as antimicrobial photodynamic therapy (PDT) have been studied. **Objective:** The objectives were to perform morphometric, radiographic and molecular analyses of alveolar repair process in rats after antimicrobial photodynamic therapy. **Methods:** Eighty-five rats were used in this study, divided according to the following groups: C: untreated socket; S+L: socket treatment with physiologic saline solution and low intensity laser therapy (660nm - 50J/cm²); ATO: socket treatment with topic application of toluidine blue-O (100 µg/mL) and ATO+L: socket treatment with topic application of toluidine blue-O (100µg/ml) and low intensity laser therapy (660nm - 50J/cm²). The animals were sacrificed at a postoperative period of 6, 15 and 28 days. Thermal variation was carried out in an animal to confirm the absence of Laser thermal effect on irradiation area. Quantitative and qualitative microscopic analyses were performed to evaluate the connective tissue, bone tissue, blood clot, blood vessel, inflammatory infiltrate and empty space. Fractal and Pixel radiographic analysis were performed. A quantitative analysis was performed using a RealTimePCR to evaluate the genes expression involved Collagen Type I (COL-I), vascular endothelial growth factor (VEGF), runt-related transcription factor 2 (RUNX2), osteocalcin (OCN), alkaline phosphatase (ALP), in the alveolar repair process. **Results and Conclusions:** Based in the results, it can be concluded that antimicrobial photodynamic therapy did not act negatively in the socket bone repair evaluation. Pixel values analysis could be used as indicators to evaluate the dry socket bone neoformation. The VEGF molecular marker could be used as angiogenesis indicator to evaluate the dry socket bone neoformation as well as alkaline phosphatase as a molecular marker in the early stage of bone neoformation.

Key words: Tooth Socket. Photochemotherapy. Polymerase Chain Reaction. Radiography Dental Digital. Histology. Microbial Drug Resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Estrutura química do ATO.....	66
Figura 1.2	Produção da luz Laser	67
Figura 3.1 -	Preparo pré-cirúrgico	87
Figura 3.2 -	Instrumentos utilizados para a exodontia	87
Figura 3.3 -	Procedimento cirúrgico	88
Figura 3.4 -	Irrigação do alvéolo com soro fisiológico	89
Figura 3.5 -	Informações técnicas do ATO.....	90
Figura 3.6 -	Armazenamento e conservação do ATO	90
Figura 3.7 -	Azul de Toluidina – O (ATO)	91
Figura 3.8 -	Fonte de luz utilizada no experimento.....	92
Figura 3.9 -	Parâmetros adotados para aplicação do Laser.....	93
Figura 3.10 -	Termistor.	94
Figura 3.11 -	Mapeamento térmico	95
Figura 3.12 -	Mapeamento térmico para o Grupo S+L (Temperatura x tempo).....	95
Figura 3.13 -	Mapeamento térmico para o Grupo S+L (ΔT x Tempo)	96
Figura 3.14 -	Mapeamento térmico para o Grupo ATO+L (Temperatura x Tempo)	96
Figura 3.15 -	Mapeamento térmico para o Grupo ATO+L (ΔT x Tempo)	97
Figura 3.16 -	Obtenção das imagens radiográfica.....	99
Figura 3.17 -	Análise do histograma das imagens por meio do programa <i>ImageJ</i> ®	99
Figura 3.18 -	Imagem selecionada, menor variação na distribuição dos valores de pixel.	100
Figura 3.19 -	Padronização do tamanho das imagens.....	101
Figura 3.20 -	Desenho da ROI para as análises.	101

Figura 3.21- Análise dos valores de pixels por meio do programa <i>ImageJ</i> [®]	102
Figura 3.22 - <i>Layout</i> do programa <i>ImageJ</i> [®]	102
Figura 3.23 - Sequência do protocolo utilizado para a análise fractal	104
Figura 3.24 - Valor da dimensão fractal (D).....	104
Figura 3.25 - Sobreposição da imagem fractal sobre a imagem inicial	105
Figura 3.26 - Imagem da grade ou retículo de integração Zeiss II utilizado na análise microscópica quantitativa	106
Figura 3.27 - Espectrofotômetro Pharmacia (Ultrospec 2000).	108
Figura 3.28 - Aparelho MiniOpticon (BioRad - USA)	110
Figura 4.1 - Análise radiográfica por meio dos valores de pixel por grupo.....	115
Figura 4.2 - Análise radiográfica por meio dos valores de pixel por período de sacrifício.....	116
Figura 4.3 - Análise radiográfica por meio da dimensão fractal por grupo.....	117
Figura 4.4 - Análise radiográfica por meio da dimensão fractal por período de sacrifício.....	117
Figura 4.5 - Análise microscópica qualitativa por grupo – período 6 dias.....	119
Figura 4.6 - Análise microscópica qualitativa por grupo – período 15 dias	120
Figura 4.7 - Análise microscópica qualitativa por grupo – período 28 dias.	121
Figura 4.8 - Análise da densidade de tecido conjuntivo por grupo.	122
Figura 4.9 - Análise da densidade de tecido conjuntivo por período de sacrifício.....	123
Figura 4.10 - Análise da densidade de tecido ósseo por grupo.....	124
Figura 4.11 - Análise da densidade de tecido ósseo por período de sacrifício.	124
Figura 4.12 - Análise da densidade de coágulo sanguíneo por grupo.....	125

Figura 4.13 - Análise da densidade de coágulo sanguíneo por período de sacrifício.	126
Figura 4.14 - Análise da densidade de vaso sanguíneo por grupo.....	126
Figura 4.15 - Análise da densidade de vaso sanguíneo por período de sacrifício.....	127
Figura 4.16 - Análise da densidade de infiltrado inflamatório por grupo.....	128
Figura 4.17 - Análise da densidade de infiltrado inflamatório por período de sacrifício.	128
Figura 4.18 – Análise da densidade de espaço vazio por grupo.	129
Figura 4.19 – Análise da densidade de espaço vazio por período de sacrifício.....	130
Figura 4.20 - Análise da expressão de colágeno tipo I por grupo.....	131
Figura 4.21 - Cinética de expressão de colágeno tipo I.....	132
Figura 4.22 - Análise da expressão de VEGF por grupo	132
Figura 4.23 - Cinética de expressão de VEGF... ..	133
Figura 4.24 - Análise da expressão de RUNX2 por grupo.....	134
Figura 4.25 - Cinética de expressão de RUNX2.....	135
Figura 4.26 - Análise da expressão de osteocalcina por grupo.....	135
Figura 4.27 - Cinética de expressão de osteocalcina	136
Figura 4.28 - Análise da expressão de fosfatase alcalina por grupo	137
Figura 4.29 - Cinética de expressão de fosfatase alcalina	138
Figura 4.30 - Análise da correlação entre densidade de tecido ósseo e valor de pixel.	139
Figura 4.31 - Análise da correlação entre densidade de tecido ósseo e dimensão fractal.	139
Figura 4.32 - Análise da correlação entre densidade de tecido ósseo e expressão de colágeno tipo I.	141
Figura 4.33 - Análise da correlação entre densidade de tecido ósseo e expressão de RUNX2	142

Figura 4.34 - Análise da correlação entre densidade de tecido ósseo e expressão de osteocalcina.....	143
Figura 4.35 - Análise da correlação entre densidade de tecido ósseo e expressão de fosfatase alcalina	144
Figura 4.36 - Análise da correlação entre densidade de tecido conjuntivo e expressão de colágeno tipo I.	145
Figura 4.37 - Análise da correlação entre densidade de vaso sanguíneo e expressão de VEGF	146
Figura 4.38 - Análise da correlação entre densidade de coágulo sanguíneo e expressão de VEGF.	147

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Distribuição dos grupos, número de animais e períodos de sacrifício.....	86
Tabela 3.2 - Desenho dos <i>primers</i> utilizados na <i>Real Time</i> PCR para os diferentes alvos criados pelo programa <i>Primer Express</i> (<i>Applied Biosystem</i>).	110
Tabela 3.3 - Concentração dos <i>primers</i> e quantidades de <i>primer</i> , amostra de cDNA, SYBRGrenn e água MiliQ utilizadas em cada reação de <i>Real Time</i> PCR.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	porcentagem
®	registered sign
°C	grau Celsius
0	grau
>	maior
µL	microlitro
mA	miliAmpère
A	área
ALP	fosfatase alcalina
As-Ga	arsenieto de gálio
ATO	azul de toluidina O
Bit	binary digit (elemento binário)
Byte	binary term (unidade de memória do computador)
CCD	Charge Coupled Device (Dispositivo acoplado de carga)
CBFA-1	Core Binding Factor A-1
CCD	Charge Coupled Device (Dispositivo acoplado de carga)
CEEPA	Comissão de ética no ensino e pesquisa em animais
CePOF	Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica
c	centímetro
cm ²	centímetro quadrado
COL-1	colágeno tipo I
CT	ciclo limiar
D	dimensão fractal
DE	densidade de energia
DNA	Ácido Desossiribonucléico
DPEC	dietil pirocarbonato
EDTA	ácido etilenediaminotetracético
ERO	espécies reativas de oxigênio
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
g	grama
GaAlAs	Arsenieto de Gálio e Alumínio
HCL	ácido clorídrico
HE	Hematoxilina-eosina

He-Ne..... hélio – neônio

Hz.....	hertz
IL-1.....	Interleucina-1
J.....	Joule
kg.....	kilograma
L.....	Laser
LLLT.....	terapia laser de baixa intensidade
Lux.....	lúmen por metro quadrado
µg.....	micrograma
mg.....	miligrama
mm.....	milímetro
mL.....	mililitro
mW.....	miliwatt
NaCl.....	cloreto de sódio
nm.....	nanômetro
KVp.....	kilovoltagem
OCN.....	osteocalcina
p.....	nível de significância
P.....	potência
PB.....	pares de base
PCR.....	reação em cadeia da polimerase
pixel.....	picture element
pl/mm.....	pares de linha por milímetro
pH.....	potencial hidrogeniônico
PVC.....	cloreto de polivinila
r.....	correlação
RNA.....	ácido ribonucleico
RNAm.....	ácido ribonucléico mensageiro
RT.....	transcrição reversa
RUNX2.....	runt-related transcription factor 2
S.....	soro fisiológico
t.....	tempo
T.....	temperatura
Ta.....	temperatura de anelamento
TIFF.....	Tagged Image File Format
Tm.....	temperatura de melting
TFD.....	terapia fotodinâmica

TNT tecido-não-tecido
USP Universidade de São Paulo
VEGF fator de crescimento do endotélio vascular
W watt
y temperatura
 λ Comprimento de onda

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA.....	63
1.1 Resistência bacteriana	63
1.2 Terapia fotodinâmica	64
1.3 Terapia fotodinâmica antimicrobiana.....	64
1.4 Fotossensibilizador.....	66
1.5 Laser	66
1.6 Terapia Laser de baixa intensidade	68
1.7 Processo de reparo alveolar.....	68
1.8 Processo de reparo alveolar em ratos- análises microscópica, radiográfica e molecular	69
1.9 Radiografia digital e processamento de imagem.....	75
1.10 Justificativa.....	78
 2 PROPOSIÇÃO	 81
 3 MATERIAL E MÉTODOS	 85
3.1 Animais.....	85
3.2 Caracterização dos grupos experimentais	85
3.3 Exodontia do incisivo superior direito	86
3.4 Agente Fotossensibilizador	89
3.5 Fonte de Luz	91
3.6 Mapeamento térmico.....	94
3.6.1 Mapeamento térmico para o Grupo S+L.....	95
3.6.2 Mapeamento térmico para o Grupo ATO+L.....	96
3.7 Coleta e Processamento para a Análise das Amostras	97
3.7.1 Avaliação por meio de radiografia digital	97
3.7.1.1 Descrição do Sistema <i>Visualix® eHD</i>	97
3.7.1.2 Obtenção das imagens radiográficas digitais	98

3.7.1.3 Análise dos valores de pixels e fractal.....	100
3.7.1.4 Análise dos valores de pixels	102
3.7.1.5 Análise fractal	102
3.7.2 Preparo das amostras para análise microscópica	105
3.7.3 Preparo das amostras para análise molecular	107
3.7.3.1 Extração de RNA.....	107
3.7.3.2 Quantificação do RNA total	108
3.7.3.3 Avaliação da qualidade do RNA total	108
3.7.3.4 Transcrição reversa (RNA em cDNA)	109
3.7.3.5 Reações em cadeia da polimerase em tempo real (<i>Real Time</i> PCR)	109
3.7.4 Análise Estatística	112

4 RESULTADOS..... 115

4.1 Análise radiográfica.....	115
4.1.1 Análise dos valores de pixel.....	115
4.1.2 Análise fractal	116
4.2 Análise Microscópica.....	118
4.2.1 Análise qualitativa	118
4.2.1.1 Imagens dos alvéolos de cada grupo, aos 6 dias.....	119
4.2.1.2 Imagens dos alvéolos de cada grupo, aos 15 dias.....	120
4.2.1.3 Imagens dos alvéolos de cada grupo, aos 28 dias.....	121
4.2.2 Análise quantitativa	122
4.2.2.1 Tecido Conjuntivo	122
4.2.2.2 Tecido Ósseo	123
4.2.2.3 Coágulo Sanguíneo.....	125
4.2.2.4 Vaso Sanguíneo	126
4.2.2.5 Infiltrado inflamatório	127
4.2.2.6 Espaço Vazio.....	129

4.3 Análise Molecular	130
4.3.1 Colágeno tipo I	131
4.3.2 VEGF	132
4.3.3 RUNX 2	134
4.3.4 Osteocalcina	135
4.3.5 Fosfatase Alcalina	137
4.4 Correlações	138
4.4.1 Densidade de tecido ósseo X valor de pixel	139
4.4.2 Densidade de tecido ósseo X dimensão fractal	140
4.4.3 Densidade de tecido ósseo X expressão de colágeno tipo I	141
4.4.4 Densidade de tecido ósseo X expressão de RUNX2	142
4.4.5 Densidade de tecido ósseo X expressão de osteocalcina	143
4.4.6 Densidade de tecido ósseo X expressão de fosfatase alcalina ...	144
4.4.7 Densidade de tecido conjuntivo X expressão de colágeno tipo I .	145
4.4.8 Densidade de vaso sanguíneo X expressão de VEGF	146
4.4.9 Densidade de coágulo sanguíneo X expressão de VEGF	147
 5 DISCUSSÃO	 151
5.1 A importância do tema	151
5.2 Metodologia	152
5.3 Dos Resultados	158
5.3.1 Tecido ósseo, análise do valor de pixel, fractal, e expressão de marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo	160
5.3.2 Tecido Conjuntivo e a expressão de colágeno tipo I	163
5.3.3 Vaso Sanguíneo e a expressão de VEGF	164
5.3.4 Coágulo sanguíneo e a expressão de VEGF	165
5.3.5 Infiltrado inflamatório	166
5.3.6 Espaço vazio	167
5.4 Sugestões para trabalhos futuros	167

6 CONCLUSÕES	171
REFERÊNCIAS	175
ANEXOS	191

1 Introdução e Síntese Bibliográfica

1 INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

Para facilitar o entendimento do objetivo deste trabalho, a apresentação desta seção será realizada por tópicos:

- Resistência bacteriana;
- Terapia fotodinâmica;
- Terapia fotodinâmica antimicrobiana;
- Fotossensibilizador;
- Laser;
- Terapia Laser de baixa intensidade;
- Processo de reparo alveolar;
- Processo de reparo alveolar em ratos- análises microscópica, radiográfica e molecular;
- Radiografia digital e processamento de imagem.

1.1 Resistência bacteriana

A descoberta da penicilina por Alexander Flemming em 1928 revolucionou a história da medicina. Porém, anos mais tarde, descobriu-se que alguns microrganismos eram resistentes àquela substância. O próprio Alexander Flemming, em entrevista à rádio BBC de Londres em 1945, já alertava que “o tratamento seria decepcionante se a penicilina não fosse utilizada em microrganismos vulneráveis a ela e se a dose indicada e a duração do tratamento não fossem respeitadas” (FLEMMING, 1955). Entende-se por resistência bacteriana a drogas, a capacidade herdada ou adquirida que permite que um microrganismo sobreviva na presença de determinado antibiótico, ou seja, permite que não sofra influência da droga independentemente de sua concentração (KLEINFELDER, 1999).

Em Odontologia, há um crescente aumento da resistência bacteriana ao uso dos antibióticos (QUIRYNEN, TEUGHELS, STEENBERGHE, 2003). Em virtude disso, a comunidade científica tem se empenhado muito em pesquisas sobre a decodificação do DNA bacteriano, sobre a resistência aos antibióticos (MARSH,

MARTIN, 2005) e sobre a descoberta de tratamentos alternativos, como a terapia fotodinâmica antimicrobiana (WILSON, 2004; KONOPKA; GOSLINSKI, 2007).

1.2 Terapia fotodinâmica

Recentemente, temos observado que a comunidade científica mundial tem dado atenção especial à Terapia Fotodinâmica (TFD), conhecida também como PDT (*Photodynamic therapy*, do inglês). A TFD foi inicialmente descrita na área médica por promover ação letal sobre células do câncer (TOMASELLI *et al.*, 2001), sendo um procedimento aprovado pela U.S Food and Drug Administration (FDA) e por inúmeras agências de saúde no mundo (DOUGHERTY, 2002). Atualmente, tem sido empregada também em Odontologia, sobretudo em Periodontia (DOUGHERTY, 2002) e Endodontia (GARCEZ, *et al* 2007; GARCEZ, *et al.*, 2008) com grandes perspectivas no controle antimicrobiano (WILSON, 2004; KONOPKA; GOSLINSKI, 2007). Portanto é uma modalidade terapêutica amplamente estudada para o tratamento de injúrias pré-malignas, malignas, infecciosas e degenerativas (SHACKLEY, *et al.*, 1999).

1.3 Terapia fotodinâmica antimicrobiana

A TFD antimicrobiana, também conhecida por quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (WAINWRIGHT *et al.*, 1999), mostra-se efetiva, *in vitro* e *in vivo*, contra bactérias, incluindo cepas resistentes à determinadas drogas (USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2001), fungos (SOUZA *et al.*, 2006) e vírus (WAINWRIGHT *et al.*, 2003).

Esta terapia fundamenta-se na hipótese de que a luz, em espectros vermelho ou infravermelho, possa interagir com drogas fotossensibilizadoras (cromóforos) (CHAN, LAI, 2003; SHIBLI, *et al.*, 2003). Por causa da absorção da luz, o corante inicia uma série de reações químicas que levam a produção direta ou indireta de oxigênio singleto e outras espécies reativas de oxigênio (radicais superóxido, hidroxila e peróxido de hidrogênio) - ERO, produtos que causam danos a

microrganismos (HAMBLIN; HASAN, 2004; KONOPKA; GOSLINSKI, 2007; DONNELLY *et al.*, 2007).

No mecanismo de ação da TFD antimicrobiana, o oxigênio singleto representa um estado eletronicamente excitado do oxigênio molecular, pois é formado por meio da transferência de energia do fotossensibilizador para o oxigênio molecular, creditada por alguns autores (KIM; KIM PARK, 2002), como a maior responsável pelo efeito fotodinâmico. Ele é produzido nas células tanto em condições fisiológicas, quanto em condições fisiopatológicas. É extremamente reativo e pode danificar sistemas biológicos por meio da oxidação de macromoléculas, incluindo lipídios, ácido nucléico e proteínas (NÚÑEZ, 2007).

As ERO podem atuar em diferentes componentes celulares, usualmente por sua alta reatividade as ERO atuam sobre o componente mais próximo. Os danos causados em microorganismos podem ser intercalação do fotossensibilizador com DNA e posterior oxidação da base guanina, peroxidação de lipídeos das membranas plasmáticas, inibição da síntese de proteínas por danos a estruturas celulares. Todos estes danos são causados pela oxidação ou redução dos componentes celulares, ou pela formação de espécies radicalares (MAISCH, 2007).

A efetividade da PDT antimicrobiana é marcadamente dependente da composição do revestimento bacteriano. De forma geral, as bactérias Gram-positivas são mais susceptíveis a ação da PDT do que as bactérias Gram-negativas (WAINWRIGHT, 1998; USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2001; USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 20003). O papel da membrana externa presente no revestimento das bactérias Gram-negativas tem sido objeto de estudo e evidências apontam para sua importância na resistência destes microorganismos contra fatores de defesas humorais e na resistência antimicrobiana (MALIK; LADAN; NITZAN, 1992).

Para tanto, inúmeros agentes fotossensibilizadores tem sido utilizados (KÖMERICK, 2003; PHOENIX *et al.*, 2003; NEUGEBAUER; JOZSA; KÜBLER, 2004). Dentre estes, destacam-se o azul de toluidina O (ATO), cristal violeta, ftalocianina dissulfonada de alumínio, hematoporfirinas, tionina, protoporfirina e azul de metileno.

1.4 Fotossensibilizador

O azul de toluidina O (ATO), um composto fenotiazínico de cor azul cujo comprimento de onda de absorção ocorre na região do vermelho visível ($\lambda = 630 \text{ nm}$), tem apresentado resultados satisfatórios como fotossensibilizador na TFD antimicrobiana, devido à sua comprovada ação antimicrobiana (BHATTI, et al., 1997; USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2001; SOUZA et al., 2006; WAINWRIGHT et al., 2003), disponibilidade e baixa toxicidade. Ele é formado por um esqueleto tricíclico simples (**Figura 1.1**), sendo que, seu tamanho e forma linear, os tornam ideais para intercalação com ácidos nucleicos (NÚÑEZ, 2007).

Figura 1.1 – Estrutura química do ATO (FONTE: WWW.sigma-aldrich.com)

1.5 Laser

O advento do Laser (L) por Theodore Maiman em 1960, cujo meio ativo era o Rubi, trouxe uma nova opção terapêutica na área de prevenção, terapêutica e cirúrgica. A palavra LASER é um acrônimo de origem inglesa que significa “*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*”, ou seja, amplificação da luz por emissão estimulada de radiação (MELLO; MELLO, 2001).

A luz Laser é monocromática, composta por fótons de mesmo comprimento de onda e cor. Esta característica é importante devido à absorção seletiva dos tecidos. Além disso, seus fótons são coerentes e propagam-se na mesma direção. A colimação é outra característica que distingue o Laser de outras fontes luminosas. Este diferencial é, possível através da unidirecionalidade e paralelismo da luz ao eixo do tubo que produz esta energia, possibilitando uma divergência angular muito

pequena e conseqüente capacidade de concentração do feixe de luz em um ponto focal (GENOVESE, 2000).

Para produzir a luz laser, os aparelhos devem possuir alguns componentes básicos (**Figura 1.2**). Uma fonte externa utiliza de uma energia elevada para excitar os átomos através do bombeamento do meio ativo. O meio ativo é constituído por materiais (sólidos, semi-sólidos, líquidos, gasosos, semicondutores e excímeros) que podem produzir a radiação Laser. Os átomos emitem fótons que se propagam em várias direções dentro da chamada cavidade ressonante. A cavidade ressonante nada mais é que um tubo contendo espelhos em suas extremidades, sendo um refletivo e outro semi-refletivo. Os fótons emitidos que se propagam paralelamente ao eixo da cavidade ressonante têm grande possibilidade de encontrar outro átomo excitado e estimular a emissão de fótons adicionais coerentes, amplificando e gerando um grande fluxo de luz de alto nível energético (GENOVESE, 2000).

Figura 1.2 – Produção da luz Laser (FONTE: Corazza, 2005)

Com esta nova conquista da ciência, os primeiros relatos e publicações da utilização do Laser foram para a obtenção da fotocoagulação, com Laser de alta intensidade, em cirurgia de retina (ZARET *et al.*, 1963).

1.6 Terapia Laser de baixa intensidade

Nos últimos anos, a utilização do Laser de baixa intensidade (LLLT – *Low Level Laser Therapy*, do inglês) ganhou destaque pela sua ação biomoduladora. Dois meios ativos bastante utilizados nas irradiações do laser de baixa intensidade são a mistura gasosa de hélio e neônio (He-Ne) ou os semicondutores diodo de arsenieto de gálio (As-Ga), arsenieto de gálio e alumínio (GaAlAs) e, finalmente, índio e fósforo (AlGaInP) que produzem radiação na faixa situada entre 630 e 950 nm (BAXTER, 1994). A adição de alumínio na mistura de arsenieto de gálio permite a produção de lasers visíveis na faixa do vermelho. Este laser supostamente apresenta potencial terapêutico elevado em lesões superficiais e profundas, através de um regime de emissão contínua com comprimento de onda variando entre 620 e 830 nm (GENOVESE, 2000).

O valor terapêutico do LLLT é altamente controverso, variando desde o efeito placebo (RYDEN *et al.*, 1994) à sua ação bactericida (COOB *et al.*, 1992; DOBSON; WILSON, 1992; WILSON; MIA, 1993; WILSON, 1994; ROONEY *et al.*, 1994; WILSON *et al.*, 1995; HATIT *et al.*, 1996; RADVAR *et al.*, 1996; KATO; KUSAKARI; HOSHINO, 1998; BACH *et al.*, 2000; DEPPE *et al.*, 2001; KREISLER *et al.*, 2002; MAIORANA; SALINA; SANTORO, 2002; NUSSBAUM; LILGE; MAZZULLI, 2002; GAD, 2004. WILSON, 2004; KONOPKA; GOSLINSKI, 2007), à prevenção eficaz da cárie dental (SLUZHAEV; KUZAKOVA, 1989) e à sua efetividade no processo de reparo (MESTER *et al.*, 1968).

No entanto, trabalhos que avaliam a TFD antimicrobiana em processo de reparo alveolar são escassos. Para melhor compreensão deste trabalho iremos, a seguir, explicar como ocorre o processo de reparo alveolar.

1.7 Processo de reparo alveolar

O primeiro autor a descrever o processo de reparo alveolar foi Euler (1923), que revelou, histológica e radiograficamente, as alterações ocorridas em alvéolos de cães.

Em 1987, Carvalho e Okamoto definiram de uma forma geral o processo de reparo alveolar, como o conjunto das reações teciduais desencadeadas no interior do alvéolo logo após a exodontia. O objetivo do organismo, segundo os autores, é preencher o alvéolo dental com tecido ósseo neoformado.

Assim, vários estudos experimentais, buscando definir cronologicamente as reações teciduais deste processo em animais de laboratório, foram e tem sido realizados. No entanto, o cão (CAFLIN, 1936; HUEBSCH; HANSEN, 1969; ISAKA *et al.*, 2001; SANTOS-PINTO, 1964), o macaco (SIMPSON, 1960; SIMPSON, 1969) e o rato (GUGLIELMOTTI; CABRINI, 1985; JOHANSEN, 1970) são os mais pesquisados. Apesar da variação na cronologia do processo de reparo alveolar entre homem e animais, os eventos são muitos semelhantes, sendo possível definir as principais características comuns da histogênese do reparo (AMLER, 1969; HUEBSCH *et al.*, 1952; SIMPSON, 1969).

Diversas metodologias tem sido empregadas no estudo do processo de reparo alveolar: fluorescência microscópica (ASTRAND; CARLSSON, 1969; BOYNE, 1966), marcação radioativa (TODO, 1968), radiografias (JOHANSEN, 1970; JOHANSEN; GILHUUS-MOE, 1969; SANTOS-PINTO, 1964), histoquímica (AMLER; JOHNSON; SALMAN, 1960), histométrica (CARVALHO; BOMBONATO; BRENTGANI, 1997; ISAKA *et al.*, 2001; RODRIGUES, 2007; CARDOSO, 2009), histológica (AMLER; JOHNSON; SALMAN, 1960; 1983; CAFLIN, 1936; GUGLIELMONTTI; CABRINI, 1985) e molecular (CARDOSO, 2009). Estas metodologias tem sido relevantes na maioria dos trabalhos, sejam associadas ou não a mais de um método de estudo.

Porém, para objetivo que se propõe o trabalho, vamos limitar aos estudos do processo de reparo alveolar em ratos.

1.8 Processo de reparo alveolar em ratos- análises microscópica, radiográfica e molecular

Quando se observa detalhadamente o processo de reparo alveolar, nota-se que, logo após a formação do coágulo sanguíneo no interior do alvéolo, este apresenta uma distribuição irregular de células (HUEBSCH *et al.*, 1952). Células inflamatórias migram para a parte superficial do coágulo sanguíneo que se

apresenta exposto à saliva (SIMPSON, 1969). No término do primeiro dia, a característica mais evidente é a presença de uma rede de fibrina recobrendo a superfície do coágulo (BOYNE, 1966; JOHANSEN, 1970)

Após 24 horas, inicia-se a organização do coágulo sanguíneo, que sofre gradualmente, uma invasão de fibroblastos originados por mitose dos fibroblastos pré-existentes e por diferenciação de células adventícias, ambos presentes no ligamento periodontal remanescente aderido às paredes alveolares. Além das células presentes no ligamento periodontal remanescente existe a participação de fibroblastos endósseos e miofibroblastos (JOHANSEN, 1970; LIN; MCCULLOCH; CHO, 1994; SIMPSON, 1969). Ao mesmo tempo, ocorre a proliferação de células endoteliais, originando novos vasos sanguíneos, como foi descrito por Noma (1967).

No segundo dia do processo de reparo, Johansen (1970) observou, histologicamente, uma maior organização do coágulo, que já se transformava em tecido de granulação, o qual preencheu rapidamente todo o alvéolo. Numerosos fibroblastos migram do ligamento periodontal para o coágulo e continuam a se proliferar, iniciando a síntese de pró-colágeno (LIN; MCCULLOCH; CHO, 1994). Ainda, Smith (1974) constatou que células mesenquimais invadiram o terço apical. Observou também um aumento da espessura do periósteo em muitas camadas, provocado pelas células osteoprogenitoras.

Ao terceiro dia de pós-operatório, Barroso; Santos-Pinto; Okamoto (1972) descreveram, após análise histológica, a presença de fibroblastos jovens e vasos sanguíneos neoformados que sintetizam fibras colágenas e substância fundamental amorfa, caracterizando a fase de desenvolvimento do tecido conjuntivo.

A partir do quarto dia, os osteoblastos originados a partir de células osteoprogenitoras depositam matriz orgânica, formando um tecido osteóide. A seguir, com a mineralização deste último, são constituídas as trabéculas ósseas. Tanto a formação do tecido de granulação como a formação do tecido osteóide são concêntricos, utilizando, principalmente as expensas dos restos do ligamento periodontal (CARVALHO; OKAMOTO, 1987). Ainda neste período, Smith (1974) observou, radiograficamente, a lâmina dura como uma linha radiopaca claramente definida, e o alvéolo com imagem radiolúcida aparentemente uniforme.

Por volta do quinto dia, a membrana periodontal foi substituída por tecido conjuntivo (HUEBSCH *et al.*, 1952). Ocasionalmente são notadas algumas fibras remanescentes que perderam sua orientação normal (SMITH, 1974). A osteogênese

é contínua, assim como a atividade osteoclástica nas margens alveolares (AMLER, 1969; JOHANSEN, 1970). Radiograficamente há um aumento discreto na radiopacidade da porção central do terço apical alveolar e a lâmina dura continua claramente visível (SMITH, 1974).

No sexto dia, observa-se, histologicamente, a presença de um tecido conjuntivo neoformado imaturo, bem vascularizado e rico em fibroblastos nas proximidades da parede alveolar e em todo o alvéolo. Ainda existe coágulo sanguíneo na região central do alvéolo, com macrófagos em seu interior (BARROSO; SANTOS-PINTO; OKAMOTO, 1972). Rodrigues (2007) e Cardoso (2009) realizaram estudo morfométrico e relataram que a maior densidade nesse período do processo de reparo alveolar era de tecido conjuntivo.

Okamoto *et al.* (1994) descreveram as características morfológicas de todo alvéolo, após uma semana do início do processo de reparo. Os terços médio e apical possuíam trabéculas ósseas neoformadas isoladas e com intensa atividade osteoblástica. Em adição, foram observadas áreas de coágulo organizado, com presença de fibroblastos, vasos sanguíneos neoformados e macrófagos. No terço cervical, o coágulo apresentava-se menos organizado e com muitos macrófagos, alguns linfócitos e fibroblastos.

No décimo dia, o tecido conjuntivo estava mais maduro (HUEBSCH *et al.*, 1952), possuía boa vascularização, estava rico em fibroblastos e apresentava atividade osteoblástica mais intensa (OKAMOTO *et al.*, 1994). O osso imaturo continuou seu crescimento a partir das paredes laterais e ocupou cerca de metade do alvéolo (HUEBSCH *et al.*, 1952), apesar das trabéculas ósseas não estarem bem organizadas (OKAMOTO; RUSSO, 1973; OKAMOTO *et al.*, 1994; SMITH, 1974). No terço cervical, a osteogênese foi mais discreta e trabéculas finas ocupavam um quarto da área (OKAMOTO *et al.*, 1994). Radiograficamente, a lâmina dura ainda estava visível, ocorrendo um aumento da radiopacidade em quase toda área do alvéolo (SMITH, 1974).

No período entre 13 e 16 dias, quase todo o alvéolo estava preenchido por osso (GUGLIELMOTTI; CABRINI, 1985; HUEBSCH *et al.*, 1952; OKAMOTO; RUSSO, 1973). Existia ainda uma neoformação óssea progressiva e uma melhor organização trabecular (OKAMOTO; RUSSO, 1973). Ao mesmo tempo ocorria remodelação da crista do rebordo (SMITH, 1974) com sinais de reabsorção em seu topo. O epitélio assemelhava-se à mucosa circundante (HUEBSCH *et al.*, 1952),

mostrava-se bem queratinizado e com as fibras colágenas orientadas de forma paralela à membrana basal (SMITH, 1974). Rodrigues (2007) e Cardoso (2009) relataram que a maior densidade nesse período do processo de reparo ainda era de tecido conjuntivo. Ainda neste período, Smith (1974) observou radiograficamente que o alvéolo dental estava quase todo preenchido por uma substância radiopaca, sendo tênue o limite entre o osso alveolar e a lâmina dura.

Aos 21 dias, Smith (1974) observou, que o tecido ósseo preenchia todo o alvéolo e o periósteo retornara à sua aparência normal. Radiograficamente, o espaço radiolúcido encontrava-se substituído por um novo tecido de radiopacidade semelhante ao tecido ósseo adjacente. Alguns autores consideram que neste momento houve a conclusão do processo de reparo alveolar (OKAMOTO; RUSSO, 1973).

Aos 28 dias, foi observado, que os três terços do alvéolo encontravam-se preenchidos por trabéculas ósseas espessas e com canais medulares bem definidos (POI, 1996). Além deste achado, Bodner *et al.* (1993) evidenciaram, neste mesmo período, a remodelação da crista alveolar. Rodrigues (2007) e Cardoso (2009) relataram nesta fase de reparo alveolar que o predomínio de densidade era de tecido ósseo.

De acordo com Carvalho e Okamoto (1987), o reparo alveolar será considerado completo quando o alvéolo estiver preenchido por tecido ósseo neoformado e quando a crista alveolar estiver remodelada, proporcionando um equilíbrio dinâmico osteoclástico-osteoblástico e quando o novo osso estiver em condições de suportar novos estímulos. Isto pode ser observado por volta do sétimo mês (210 dias) após a exodontia (OKAMOTO; RUSSO, 1973).

Dados relativos à cinética de expressão de genes relacionados ao processo de reparo alveolar (colágeno tipo I, VEGF, RUNX2, osteocalcina e fosfatase alcalina) na literatura são escassos, sendo estudado até o momento apenas por Cardoso (2009).

Na fase inicial do processo de reparo do tecido conjuntivo predomina a formação de colágeno, principalmente do tipo I (COL-I), um dos principais constituintes dos tecidos e uma proteína de importância fundamental na constituição da matriz extracelular, sendo responsável por grande parte de suas propriedades físicas (COTRAN, 1996). Cardoso (2009) em seu estudo da cinética de expressão de COL-I não encontrou diferença estatisticamente significativa para os períodos de reparo

alveolar 6, 15 e 28 dias.

Um dos mais importantes fatores pró-angiogênicos já identificados é o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (FERRARA, 2000). O VEGF foi isolado pela primeira vez em 1983 como um potente fator indutor do aumento da permeabilidade vascular sendo 10.000 vezes mais potente que a histamina (CULLINAN-BOVE; KOOS, 1993; BROWN, 1997). Em 1989, identificou-se seu efeito mitótico sobre células do endotélio vascular e a molécula recebeu sua atual denominação. O VEGF pode ser produzido por macrófagos, linfócitos T, ou mesmo por células do tecido conjuntivo, e sua produção pode ser aumentada em condições de hipóxia, durante o processo de reparo dessas lesões. O VEGF estimula a angiogênese direta e indiretamente. Além de ser um potente mitógeno de células endoteliais e de atuar como inibidor de apoptose dessas células, o VEGF aumenta a expressão celular de metaloproteinases, degradando a matriz extracelular e facilitando a penetração dos vasos neoformados no tecido, ao mesmo tempo em que diminui a expressão endotelial dos inibidores de metaloproteinases. O VEGF também possui efeito pró-inflamatório, neuroprotetor, e é um fator importante na estabilização e remodelação vascular (CULLINAN-BOVE; KOOS, 1993; COTRAN, 1996; BROWN, 1997; FERRARA, 2000). Cardoso (2009) em seu estudo da cinética de expressão de VEGF não encontrou diferença estatisticamente significativa para os períodos de reparo alveolar em 6, 15 e 28 dias.

Os marcadores moleculares do metabolismo ósseo podem ser divididos em marcadores de formação, que refletem a atividade dos osteoblastos, e os de reabsorção, que refletem a atividade dos osteoclastos. Dentre os primeiros destacam-se a fosfatase alcalina óssea e a osteocalcina. Dentre os últimos os fragmentos derivados da reabsorção do colágeno, como as piridinolinas e os telopeptídeos carboxi e amino terminais (VIEIRA, 1999).

A fosfatase alcalina, o colágeno tipo I e a osteocalcina são marcadores bioquímicos de formação no metabolismo ósseo, sendo os dois primeiros marcadores dos estágios iniciais de diferenciação osteoblástica, e o último, dos estágios mais avançados (CARDOSO, 2009).

A fosfatase alcalina é uma enzima codificada pelo gene, tecido não-específico, A1P, localizado no cromossoma 1. A isoenzima óssea é um peptídeo de 507 aminoácidos, cuja sequência é exatamente igual à da isoenzima hepática: a diferença entre elas se dá na glicosilação, um fenômeno pós-tradução. Em condições normais,

as duas formas predominantes em circulação (>90% do total) de fosfatase alcalina são a óssea e a hepática, em quantidades equivalentes. A outra forma circulante, em concentrações significativas, é a forma intestinal, que representa menos de 5% do total. A fosfatase alcalina é uma ectoenzima, ou seja, está localizada na superfície externa da célula onde exerce sua atividade. Quando ancorada na superfície celular, a enzima está na forma de um tetrâmero, sendo que, quando liberada para a circulação, por ação das fosfolipases C e D, esta se faz na forma dimérica (VIEIRA, 1999). Cardoso (2009) em seu estudo da cinética de expressão de fosfatase alcalina encontrou diferença estatisticamente significativa para os períodos de reparo alveolar em 6, 15 e 28 dias, sendo o período de maior expressão aos 15 dias.

A osteocalcina é um peptídeo secretado por osteoblastos maduros, condrócitos hipertrofiados e odontoblastos (VIEIRA, 1999; GUNDBERG, 2000). Apesar de ser primariamente depositada na matriz óssea recém-formada, uma pequena fração entra em circulação, caracterizando essa proteína como marcador da atividade osteoblástica. Apesar de ser depositada em quantidades significativas na matriz óssea, sendo uma das proteínas não-colagenosas mais abundantes, a osteocalcina não é um marcador de reabsorção óssea, pois é totalmente destruída quando da reabsorção promovida pelos osteoclastos. Adicionalmente, estudos indicam que o aparecimento e aumento da produção dessa proteína são coincidentes com o início do processo de mineralização. Assim, a produção de osteocalcina é marcador de osteoblasto maduro (VIEIRA, 1999; GUNDBERG, 2000). Outros estudos, *in vitro* e *in vivo*, sugerem que a osteocalcina tenha importante papel no recrutamento e diferenciação dos osteoclastos (CHENU, 1994). Cardoso (2009) em seu estudo da cinética de expressão de osteocalcina durante o processo de reparo alveolar encontrou diferença estatisticamente significativa apenas quando comparado o período 15 dias com os períodos 6 ou 28 dias, sendo o período de maior expressão de osteocalcina aos 15 dias.

A cinética de expressão de RUNX2 (runt-related transcription factor 2) ou CBFA-1 (Core Binding Factor A-1) também foi estudada por Cardoso (2009), sendo um fator de transcrição que controla a diferenciação osteoblástica, essencial para a formação óssea membranosa e endocondral (SOARES, 2005). É um membro da família RUNX de fatores da transcrição (DATTA et al., 2009) e é essencial para a diferenciação osteoblástica e para a morfogênese esquelética. Cardoso (2009) em seu estudo da cinética de expressão de RUNX2 durante o processo de reparo alveolar

encontrou diferença estatisticamente significativa apenas quando comparado o período 6 dias com o período 15 dias, sendo o período de maior expressão de RUNX2 aos 15 dias.

Diversos fatores podem estar presentes e influenciar o processo de reparação tecidual nas diferentes fases citadas anteriormente. Estes fatores podem ser sistêmicos, decorrentes da desnutrição (deficiências vitamínicas), de condições metabólicas, circulatórias e hormonais. Os fatores locais são representados por traumas, presença de corpos estranhos, tamanho, localização e tipo da ferida e a inflamação e infecção (BIRN, 1973).

1.9 Radiografia digital e processamento de imagem

A utilização da radiografia vem se tornando cada vez mais essencial para a prática odontológica. Porém, os filmes radiográficos convencionais apresentam duas grandes desvantagens se comparados aos sistemas digitais: uma maior dose de radiação e a necessidade do processamento químico. Neste contexto, surgiu em 1987, o primeiro sensor digital intrabucal para radiografias, e este se tornou uma alternativa à radiografia convencional. Esse novo sistema foi a Radiovisiografia (RVG-Trophy Radiologie, Vincennes, France), que acoplava um equipamento de raios-X convencional aos recursos de informática. Este sensor tem face ativa de tamanho reduzido, apesar de o volume externo ser maior que o do filme periapical. Possui um fio condutor junto de onde se conecta o chip ao restante do equipamento, permitindo que a imagem seja exibida imediatamente após a sensibilização do sensor pelos raios-X, sempre objetivando produzir radiografias de melhor qualidade com uma dose de radiação reduzida (HORNER et al., 1990, MOUYEN et al., 1989, NELVIG; WING; WELANDER, 1992; VERSTEEG; SANDERINK; VAN DER STELT, 1997).

A imagem digital é uma matriz numérica resultante da conversão de um sinal analógico para um sinal digital onde cada ponto de informação, ou pixel, recebe uma orientação espacial e de densidade no sistema de memória digital através do “byte” (“binary term” – unidade de memória do computador) ou “bits” (seqüência de dígitos binários), que pode ser tanto 1 (representando a presença de um pulso elétrico) quanto 0 (representando a ausência desse pulso de eletricidade). Na Odontologia,

cada byte geralmente contém 8 bits, permitindo um máximo de 256 possíveis combinações de 0 e 1 ($2^8=256$) ou níveis de cinza, sendo o zero correspondente à cor preta e o 255 à cor branca, na maioria dos sistemas. Esta seqüência é armazenada na memória do computador e, quando a imagem for requerida, cada pixel é decodificado e a imagem é exibida no monitor, mostrando o nível de cinza correspondente à sua seqüência binária (FARMAN; SCARFE, 1994).

Desta forma, a variedade de informação possível para cada pixel depende do número de bits em cada byte (KHADEMI, 1996, MOLTENI, 1993, MOUYEN et. al., 1989, VELDER; SANDERINK; VAN DER STELT, 1996). Nos sistemas que operam com 12, 16 ou 32 bits para cada byte, temos uma maior faixa de valores de cinza, entretanto consomem mais memória do computador para armazenar as informações (VERSTEEG; SANDERINK; VAN DER STELT, 1997).

Uma vantagem de um pixel poder exibir 256 ou mais tons de cinza pode consistir no fato de que é possível transformar as diferentes tonalidades de cinza em cores diferentes, utilizando os próprios recursos dos sistemas digitais. É sabido que o olho humano distingue melhor diferentes cores do que diferentes tons de cinza, o que facilita na diferenciação entre áreas mais ou menos densas (MEIER et al. 1996, SARMENTO; PRETTO; COSTA, 1999).

Outro ganho é a possibilidade de mensurar a média dos valores de pixels da área selecionada na imagem, quando se obtém a correspondência numérica de tais tons. Essa medida, se a imagem oferecer uma maior quantidade de tons de cinza, aumenta a capacidade de detectar diferenças sutis de densidade, mesmo que imperceptíveis ao olho humano (SARMENTO; PRETTO; COSTA, 1999).

O pixel pode sofrer alteração no seu valor dependendo do objeto radiografado (PIETROBELLI et al., 1996) e do tipo de simulador de tecido utilizado (CASATI; TAVANO; FREITAS, 1969, COOK; CUNNINGHAM, 1995).

A técnica radiográfica digital é semelhante à convencional, mas a fase do processamento na câmera escura é substituída pelo computador, o que elimina os erros inerentes a essa fase. Vários sensores passaram a ser confeccionados (FARMAN; FARMAN, 2005; WENZEL; KIRKEVANG, 2005), podendo estes serem expostos diretamente aos raios-X, como no sistema Visualix® (Gendex Dental System, Milano, Italy), demonstrando ser o mais rápido dos sensores (MOLTENI, 1993).

As principais desvantagens da utilização do sistema digital seriam o alto custo inicial e tamanho do sensor no caso dos CCDs (Dispositivo de Carga Acoplada), que apresentam tamanho reduzido e volume acentuado além de rigidez quando comparado ao filme (GRONDAHL, 1992, VANDRE; WEBBER, 1995, VERSTEEG; SANDERINK; VAN DER STELT, 1997).

As imagens obtidas através do sensor eletrônico são arquivadas no computador, podendo ser manipuladas em programas adequados. Antes do desenvolvimento de tais sistemas digitais diretos de imagem, as radiografias eram digitalizadas indiretamente. Com o advento da imagem digital vieram suas vantagens; tornou-se possível o pós-processamento e a troca de informações radiográficas com grande facilidade e vários programas têm sido desenvolvidos e aprimorados com o intuito de facilitar e ampliar essas técnicas (GRONDAHL, 1992, VERSTEEG; SANDERINK; VAN DER STELT, 1997).

Esses programas dos sistemas digitais são capazes de realizar várias tarefas, como alterar brilho e contraste, girar a imagem, inverter a escala de cinza e aplicar pseudocores sobre os diferentes tons de cinza. Podemos, ainda, fazer medidas lineares e angulares (NELVIG; WING; WELANDER, 1992). O objetivo do pós-processamento é selecionar as informações que são úteis ao diagnóstico e descartar as que não são importantes, sem gerar novas informações. Uma radiografia de qualidade é fundamental para um diagnóstico correto. Para isso, devemos buscar sempre radiografias com adequado contraste, brilho e resolução (SANDERINK, 1993, VERSTEEG; SANDERINK; VAN DER STELT, 1997). O uso dessas ferramentas, dentre elas as análises do valor de pixel e fractal, tem levado à possibilidade de manipulação da imagem, permitindo a obtenção de melhor qualidade e permitindo a detecção de alterações ósseas muito sutis (SARMENTO; RUBIRA, 1998; ATTAELMANAN; BORG; GRONDAHL, 2000).

A análise do valor de pixel, por diferentes programas, tem demonstrado resultados satisfatórios (TEIXEIRA, 2007), assim como a análise fractal, que é baseada na dimensão fractal do objeto, sendo um método de processamento de imagem digital usado para descrever formas e estruturas complexas, demonstrando ser um bom indicador de alterações morfológicas ósseas (HILDEBOLT, *et al.*, 1992; KORSTJENS, *et al.*, 1995; SHROUT, *et al.*, 2000; JETT, *et al.*, 2004).

1.10 Justificativa

Portanto, devido à escassez de evidências científicas *in vivo*, observou-se a necessidade do desenvolvimento do presente estudo avaliando os efeitos da TFD no processo de reparo alveolar, por meio das análises radiográfica, morfométrica e molecular do processo de reparo alveolar. Assim, resultados mais consistentes para aplicabilidade clínica da técnica poderão ser oferecidos, minimizando o risco potencial para os pacientes.

2 Proposição

2. PROPOSIÇÃO

Diante desta realidade, nos propusemos a avaliar o processo de reparo alveolar após a terapia fotodinâmica antimicrobiana por meio das seguintes análises:

- ✓ Radiográfica, por meio dos valores de pixel e dimensão fractal;
- ✓ Morfométrica, qualitativa e quantitativa de tecido conjuntivo, tecido ósseo, coágulo sanguíneo, vaso sanguíneo; infiltrado inflamatório e espaço vazio;
- ✓ Molecular, por meio da expressão de colágeno tipo I, VEGF, RUNX2, osteocalcina e fosfatase alcalina por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real.

Além disso, realizar correlações das variáveis entre as análises que atuam na mesma fase do reparo alveolar.

3 Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo recebeu a aprovação da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais (CEEPA) da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB-USP), e encontra-se protocolado sob o nº 17/2007.

3.1 Animais

Foram utilizados, neste experimento, 85 ratos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, *Wistar*) machos provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB-USP), com 60 dias de idade e peso médio de 266,01 g. Foram utilizados somente ratos machos para evitar influência das variações hormonais sobre o processo de reparo alveolar. Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno, em número de 5 animais por caixa, e forradas com maravalha esteril. A alimentação foi realizada com ração sólida (Ração Ativada Produtor - Anderson & Clayton S.A.) e água *ad libitum*, com exceção das primeiras 24 horas pós-cirurgia, quando a alimentação foi triturada. Os animais foram mantidos à temperatura ambiente média de 22°C e iluminação artificial variando de 5-60 Lux, sendo fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro, considerando o período de luz das 6 às 18 horas. Além disso, o local apresentava sistema de exaustão de aproximadamente 15 trocas de ar por hora e umidade relativa de 45 a 75%.

3.2 Caracterização dos grupos experimentais

Após a marcação numérica de todos os animais, realizou-se a pesagem dos ratos visando à observação dos seus padrões de crescimento e desenvolvimento.

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais, diferenciados de acordo com o experimento realizado no alvéolo, após o procedimento cirúrgico.

A seguir, estão descritos os quatro grupos experimentais:

- **GRUPO C:** Animais com alvéolo não tratado (grupo controle);
- **GRUPO S+L:** Animais com alvéolo preenchido com soro fisiológico e tratado apenas com aplicação do laser de baixa intensidade (660 nm), com fluência de 50 J/cm²;
- **GRUPO ATO:** Animais com Alvéolo tratado apenas com aplicação tópica de azul de toluidina-O (ATO) na concentração de 100 µg/mL;
- **GRUPO ATO+L:** Alvéolo tratado com aplicação tópica de azul de toluidina-O (TBO) na concentração de 100 µg/mL + aplicação de Laser de baixa potencia (660 nm), com fluência de 50 J/cm².

A seguir, estão descritos a distribuição dos grupos, número de animais e períodos de sacrifício dos grupos experimentais (**Tabela 3.1**).

Tabela 3.1 - Distribuição dos grupos, número de animais e períodos de sacrifício.

Grupo/Tempo de sacrifício	6 dias	15 dias	28 dias
Grupo C	7	7	7
Grupo S+L	7	7	7
Grupo ATO	7	7	7
Grupo ATO+L	7	7	7

3.3 Exodontia do incisivo superior direito

Para a realização dos procedimentos cirúrgicos os animais foram anestesiados e sedados com uma combinação de cloridrato de ketamina (Dopalen, Vetbrands®, Brasil, 25 mg/kg) e cloridrato de xilazina (Anasedan, Vetbrands®, Brasil 10 mg/kg), via intramuscular. Após a confirmação de ausência de reflexo, os animais

foram colocados em uma bancada previamente forrada com TNT (Tecido Não Tecido). Sobre os animais foi então colocado um campo cirúrgico descartável confeccionado com esse mesmo material. Após a antissepsia da área cirúrgica com gluconato de clorexidina 0,12 % (PerioGard, Colgate - Palmolive®, Brasil) (**Figura 3.1**), o incisivo superior direito de cada animal foi extraído com a utilização de instrumentos adaptados para esse procedimento (OKAMOTO; RUSSO, 1973). Foi utilizada uma espátula devidamente afiada para desinserção dos tecidos moles e luxação do dente e uma pinça previamente adaptada para a apreensão e exodontia (**Figuras 3.2 e 3.3**).

Figura 3.1- Preparo pré-cirúrgico. A) Animal posicionado no campo cirúrgico descartável; **B)** Antissepsia da área cirúrgica com gluconato de clorexidina 0,12 %.

Figura 3.2 – Instrumentos utilizados para a exodontia. A) e B) Espátula utilizada para a exodontia, especificamente na desinserção dos tecidos moles e na luxação do dente; **C)** Pinça utilizada na apreensão e exodontia.

Na seqüência, foi provocada isquemia alveolar, pela introdução de um cone de papel absorvente (Sybon-Kerr, segunda série) durante 1 minuto, ou até que houvesse a comprovação clínica de ausência de sangramento (**Figura 3.3 H e I**), embebido em Adrenalina (PETERSON, 2000) a 1:1000 (Ariston Indústria Química Farmacêutica Ltda.). Após a retirada do cone, os animais permaneceram em observação por 60 a 90 segundos, com o objetivo de se comprovar a ausência de coágulo sanguíneo no interior dos alvéolos (RODRIGUES, 2007; CARDOSO, 2009).

Figura 3.3- Procedimento cirúrgico. A e B) Posicionamento do instrumento e luxação do incisivo central superior direito; **C)** Posicionamento da pinça utilizada na exodontia; **D e E)** Exodontia; **F)**

Alvéolo após exodontia; **G)** Incisivo central superior direito; **H)** Introdução de um cone absorvente embebido em adrenalina 1:1000 no alvéolo e **I)** Ausência de sangramento.

Após a isquemia, o alvéolo foi irrigado com soro fisiológico, durante esse procedimento colocou-se uma gaze seca na boca do animal para se evitar a aspiração da solução (**Figura 3.4**). Em seguida, foram estimulados o sangramento, por meio da curetagem do alvéolo com auxílio de uma cureta, e a formação do coágulo, por meio da compressão digital do alvéolo com gaze umedecida em soro fisiológico (PETERSON, 2000). Esse procedimento foi realizado em todos os grupos para padronização da pesquisa.

Para o Grupo controle (C), utilizou-se apenas os procedimentos descritos acima sem nenhuma interferência das terapias escolhidas.

Figura 3.4 - Irrigação do alvéolo com soro fisiológico.

3.4 Agente Fotossensibilizador

O agente fotossensibilizador utilizado no estudo foi o azul de toluidina – O (ATO) (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) na concentração de 100 µg/mL, segundo Kömerik (2003) para o grupo ATO e ATO + L, cujas informações técnicas encontram-se na **Figura 3.5**.

Figura 3.5 - Informações técnicas do ATO. (FONTE: www.sigmaaldrich.com)

Para preparar 500 mL da solução na concentração desejada (100 µg/mL) utilizou-se:

- ✓ 500 mL de água milli-Q
- ✓ 2,25 g de NaCl
- ✓ 0,05 g de TBO

Primeiramente, diluiu-se o NaCl em água Mili-Q e em seguida o ATO. A solução foi preparada no dia anterior do experimento, armazenada em vidro de cor âmbar e conservada em geladeira (**Figura 3.6**).

Figura 3.6 – Armazenamento e conservação do ATO.

O ATO foi aplicado dentro do alvéolo com auxílio de uma seringa descartável, até o completo preenchimento, e aguardado o tempo de 10 minutos (**Figura 3.7**), segundo Kömerik (2002), seja para aplicação do Laser (Grupo ATO + L) ou para remoção do corante (Grupo ATO).

Figura 3.7- Azul de Toluidina – O (ATO). A) Aplicação do ATO; B) Alvéolo após aplicação do ATO.

Para o Grupo ATO, após este período, o alvéolo foi irrigado com soro fisiológico e para o Grupo ATO + L procedeu-se a aplicação de Laser.

3.5 Fonte de Luz

A fonte de luz utilizada neste estudo é o Twin Laser[®] (MMOptics, São Carlos, SP, Brasil), previamente calibrado pelo fabricante (**Figura 3.8**). Esse equipamento possui dois comprimentos de onda, um no espectro vermelho visível (660 nm) e outro no infravermelho (780 nm).

Para esta pesquisa foi utilizado apenas o comprimento de onda vermelho visível (660 nm) em virtude do comprimento de onda de absorção do ATO (626 nm).

O aparelho adotado neste estudo opera com os seguintes parâmetros:

- ✓ Meio ativo: Arsenieto de Gálio e Alumínio (GaAlAs)
- ✓ Alimentação: 127-220 V ~ / 50 - 60 Hz;
- ✓ Comprimentos de onda da luz: 660 nm (vermelho visível);
- ✓ Potência óptica útil (saída da ponteira): 40 mW;

- ✓ Área do feixe de saída: 0,04 cm²;
- ✓ Irradiância máxima= 1000 mW/cm²;
- ✓ Temporizador ajustável.

Figura 3.8 - Fonte de luz utilizada no experimento

A densidade de energia ou fluência foi calculada a partir da fórmula ilustrada a seguir:

$$DE = (P \times T) / A$$

onde,

DE= densidade de energia (J/cm²)

P= potência (W)

T= tempo (s)

A= área estimada (cm²)

Assim, a densidade total foi de 50 J/cm² (KÖMERIK, 2003), sendo o tempo de irradiação de 600s. O modelo de aplicação do Laser foi pontual de contatos, ou seja, um único ponto e Laser em contato com o alvéolo. Além disso, a caneta foi posicionada a 90° sobre o alvéolo (LOW; REED, 2001). Esses parâmetros foram adotados para administrar uniformemente a densidade de energia e evitar a dispersão de energia enviada para o tecido (**Figura 3.9**). Os sistemas de emissores do Laser foram envoltos por um filme de PVC para evitar a contaminação dos

animais (CORAZZA, 2005).

Figura 3.9 – Parâmetros adotados para aplicação do Laser.

Para o Grupo S+L, após a isquemia, o soro fisiológico foi aplicado dentro do alvéolo com auxílio de uma seringa descartável, até o completo preenchimento, e aguardado o tempo de 10 minutos, assim como foi realizado para o Grupo ATO, para a aplicação do laser.

Para o Grupo ATO+L, após a isquemia, o ATO foi aplicado dentro do alvéolo com auxílio de uma seringa descartável, até o completo preenchimento, e aguardado o tempo de 10 minutos, assim como foi realizado para o Grupo ATO, para a aplicação do laser.

Para os Grupo S+L e TBO+L, após a irradiação, o alvéolo recebeu os mesmos cuidados que o grupo controle (**Figura 3.4**).

A pesquisa somente foi realizada após a confirmação de ausência de variação térmica significativa ($> 10^{\circ}\text{C}$ para o tecido ósseo) de acordo com Fontana et al., (2004).

3.6 Mapeamento térmico

O objetivo deste teste inicial foi analisar a variação da temperatura no interior do alvéolo, por meio de um termistor (**Figura 3.10**), durante a irradiação a Laser, tanto para o Grupo S+L como para o Grupo AOT+L. Nesse sentido, a principal preocupação foi a de desconsiderar o efeito térmico do Laser sobre o local irradiado (FERREIRA, 2003).

O experimento foi realizado no CePOF (Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica) da USP - São Carlos, sob a orientação do Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato e da Prof^a. Dr^a. Cristina Kurachi, ambos do Instituto de Física - Departamento de Física e Ciência dos Materiais da USP - São Carlos.

Neste experimento foi utilizado 01 animal macho (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*) e para a exodontia do incisivo superior direito seguiu-se o protocolo já descrito anteriormente.

O termistor é formado por semi-condutores sensíveis a temperatura que detecta a diferença de potencial elétrico local e que por meio da fórmula a seguir o valor é convertido em temperatura(°C).

$$T = 25,4258 + (2,25065 \times DF)$$

onde

T= temperatura (°C);

DP= diferença de potencial

Figura 3.10 – Termistor. A) Visão aproximada do termistor; **B)** sua posição dentro do alvéolo.

3.6.1 Mapeamento térmico para o Grupo S+L

Após a exodontia, o interior do alvéolo foi preenchido com soro fisiológico e o termistor foi posicionado aproximadamente 2 mm dentro do alvéolo em contato com a parede alveolar vestibular (**Figura 3.11**). Os parâmetros de irradiação adotados seguiram o protocolo descrito para o grupo S+L.

Figura 3.11- Mapeamento térmico.

O resultado do mapeamento térmico para o Grupo S+L (**Figura 3.12**) demonstrou temperatura mínima de 35,75 °C (tempo 0s) e temperatura máxima de 37,91 °C (tempo 472s).

Figura 3.12 – Mapeamento térmico para o Grupo S+L (Temperatura x tempo). Após a exodontia, o mapeamento térmico foi realizado para o Grupo S+L por meio de um termistor colocado dentro do alvéolo e o resultado interpretado pela conversão dos valores (volts em °C). Os resultados

apresentados representam a temperatura no interior do alvéolo durante todo o tempo de iluminação a Laser.

Portanto, o mapeamento térmico para o Grupo S+L demonstrou variação máxima de temperatura de $2,16^{\circ}\text{C}$ como pode ser visto na **Figura 3.13**.

Figura 3.13 – Mapeamento térmico para o Grupo S+L ($\Delta T \times \text{Tempo}$). Após a exodontia, o mapeamento térmico foi realizado para o Grupo S+L por meio de um termistor colocado dentro do alvéolo e o resultado interpretado pela conversão dos valores (volts em $^{\circ}\text{C}$). Os resultados apresentados representam a variação de temperatura (ΔT) para o Grupo S+L no interior do alvéolo durante todo o tempo de iluminação a Laser.

3.6.2 Mapeamento térmico para o Grupo ATO+L

Após a exodontia, o interior do alvéolo foi preenchido com ATO e o termistor foi posicionado aproximadamente 2 mm dentro do alvéolo em contato com a parede alveolar vestibular. Os parâmetros de irradiação adotados seguiram o protocolo descrito para o grupo ATO.

O resultado do mapeamento térmico para o Grupo ATO+L (**Figura 3.14**) demonstrou temperatura mínima de $34,78^{\circ}\text{C}$ (tempo 0s) e temperatura máxima de $39,00^{\circ}\text{C}$ (tempo 564s).

Figura 3.14 – Mapeamento térmico para o Grupo ATO+L (Temperatura x Tempo). Após a exodontia, o mapeamento térmico foi realizado para o Grupo ATO+L por meio de um termistor colocado dentro do alvéolo e o resultado interpretado pela conversão dos valores (volts em $^{\circ}\text{C}$). Os

resultados apresentados representam a temperatura no interior do alvéolo para o Grupo ATO+L durante todo o tempo de iluminação a Laser.

Portanto, o mapeamento térmico para o Grupo ATO+L demonstrou variação máxima de temperatura de 4,22°C como pode ser visto na **Figura 3.15**.

Figura 3.15 – Mapeamento térmico para o Grupo ATO+L (ΔT x Tempo). Após a exodontia, o mapeamento térmico foi realizado para o Grupo ATO+L por meio de um termistor colocado dentro do alvéolo e o resultado interpretado pela conversão dos valores (volts em °C). Os resultados apresentados representam a variação de temperatura (ΔT) no interior do alvéolo para o Grupo ATO+L durante todo o tempo de iluminação a Laser.

3.7 Coleta e Processamento para a Análise das Amostras

Os animais foram sacrificados aos 6, 15 e 28 dias após cirurgia experimental por aprofundamento da anestesia, via intramuscular. Os períodos de sacrifício foram selecionados baseados em trabalhos prévios realizados no Departamento de Estomatologia da FOB-USP (RODRIGUES, 2007; CARDOSO, 2009).

Em cada período, foram sacrificados 28 animais, (8 animais por grupo) sendo que, de cada grupo, 4 animais foram para a análise microscópica e 3 para a análise molecular, escolhidos aleatoriamente.

3.7.1 Avaliação por meio de radiografia digital

3.7.1.1 Descrição do Sistema Visualix® eHD

O sistema Visualix® eHD, Dentsply/Gendex, é constituído por um sensor CCD, (Dispositivo de Carga Acoplada) cujos os fotossítios são recobertos por uma camada de iodeto de cézio, um material luminescente que aumenta a interação do

sensor com os raios X, e carbono amorfo. Para obter imagens de alta resolução o tamanho do pixel é de 19,5 micrômetros, o que proporciona uma resolução espacial de 25,6 lp/mm (Gendex)

3.7.1.2 Obtenção das imagens radiográficas digitais

Para a obtenção das imagens radiográficas foi realizado um teste piloto cujo objetivo foi estabelecer o tempo de exposição e o simulador de tecido mole mais adequado para o experimento. Para isso, foi desenvolvido um suporte com base fixa de isopor para que fosse adaptado, sempre na mesma posição, o sensor, a escala de densidade de alumínio (penetrômetro de alumínio composto por sete degraus de 8 mm de largura sendo que foram utilizados os degraus 1, 2, 3 e 4 com altura de 01, 03, 05 e 07 mm, respectivamente) e o simulador de tecido mole. O sensor foi posicionado no suporte de tal forma que a parte plana coincidissem com a base do suporte. O penetrômetro foi posicionado no sentido horizontal do longo eixo do sensor e o simulador de tecido mole posicionado a 13 mm do sensor (**Figura 3.16**).

Desta forma, após a fixação, uma peça foi exposta aos raios X utilizando o aparelho radiográfico X-707 (Yoshida Dental MFC Co. Ltd., Tóquio, Japão) utilizando parâmetros, 70 kVp, 7 mA, distância foco-filme de 30 cm e tempo de exposição variando de 0,05 a 0,10 segundos associado ou não a diferentes simuladores de tecido mole (sem simulador; acrílico; 5 mm de cera utilidade; acrílico + cera utilidade; 1 mm de cera rosa número 9; 2 mm de cera rosa número 9). O cabeçote do aparelho foi direcionado perpendicularmente a peça cirúrgica (**Figura 3.16 F**). As imagens obtidas a partir do sensor foram exportadas do próprio programa e salvas no formato TIFF.

Figura 3.16 – Obtenção das imagens radiográficas. A) Aparelho Visualix®, Dentsply/Gendex com sensor CCD; B) Penetrômetro de alumínio; C) Suporte de isopor como base para o sensor e penetrômetro; D) Posicionamento da peça; E) Simulador de tecido mole; F) Cabeçote do aparelho perpendicular a base.

A escolha do tempo exposição e simulador de tecido mole foi baseada na análise do histograma de cada imagem por meio do programa *ImageJ*® (NIH/USA), versão 1.40. Foi considerada adequada à imagem que apresentasse a menor variação na distribuição de pixel, ou seja, distribuição homogênea dos valores de pixel (**Figura 3.17**).

Figura 3.17 – Análise do histograma das imagens por meio do programa *ImageJ*®

Assim, de acordo com os critérios de seleção previamente estabelecidos, os parâmetros adotados para a realização da pesquisa foram:

- tempo de exposição= 0,05s e
- simulador de tecido mole= cera utilidade (**Figura 3.18**).

Figura 3.18 - Imagem selecionada, menor variação na distribuição dos valores de pixel.

Desta forma, todas as peças do experimento foram radiografadas seguindo as mesmas descrições acima.

3.7.1.3 Análise dos valores de pixels e fractal

A sala foi escurecida durante a análise das imagens radiográficas, para melhor observação. As imagens foram abertas em um computador que opera com plataforma Windows®, com monitor de 15 polegadas e tela plana. Após à abertura da primeira imagem, procedeu-se a padronização do tamanho de todas as imagens por meio *Set Scale*. Esse recurso possibilita, conhecendo o tamanho real do objeto, a padronização das imagens. Assim, uma reta foi traçada sobre a imagem correspondente ao degrau da escala de densidade de alumínio cuja largura real do degrau possuía 8 mm (**Figura 3.19**).

Figura 3.19 – Padronização do tamanho das imagens.

Em cada uma das imagens, a região de interesse (ROI) representou o desenho da dimensão da imagem radiográfica de todo alvéolo. Assim, a ROI foi aberta ocupando a região interna do alvéolo, limitada pela lâmina dura, e salva para que seu tamanho e formato fossem mantidos para as análises por valor de pixel e dimensão fractal (**Figura 3.20**).

Figura 3.20 – Desenho da ROI para as análises.

Estes procedimentos foram realizados tanto para determinar o valor de pixel quanto à dimensão fractal.

3.7.1.4 Análise dos valores de pixels

O examinador analisou os valores de pixel das imagens no programa *ImageJ*[®] (NIH/USA), versão 1.40. O histograma do software *ImageJ*[®] forneceu os dados sobre a área, média e desvio-padrão dos valores dos pixels numa escala de 8 bits, atribuindo o valor zero para o nível mais escuro de cinza (preto) e duzentos e cinquenta e cinco, para o mais claro (branco) como observado na **Figura 3.21**.

Figura 3.21- Análise dos valores de pixels por meio do programa *ImageJ*[®].

3.7.1.5 Análise fractal

A análise fractal foi realizada por meio da dimensão fractal. Utilizou-se o programa *ImageJ*[®], versão 1.40, conforme o *Layout* (**Figura 3.22**) e a descrição do protocolo utilizado seguiu a sequência descrita abaixo e ilustrada pela **Figura 3.23**.

Figura 3.22 – Layout do programa ImageJ®

A) Primeiramente a imagem e a ROI foram abertas

(File → Open → Selecionar a imagem e a ROI).

A ROI foi duplicada aplicando-se *Duplicate*

(Image → Duplicate);

B) Em seguida, toda imagem fora da ROI foi removida aplicando-se *Clear Outside*;

(Edit → Clear Outside)

C) Para que a imagem final da dimensão fractal fosse correspondente ao trabeculado ósseo a imagem foi invertida aplicando-se *Invert*;

(Edit → Invert)

D) O brilho e contraste da imagem foi ajustada automaticamente aplicando-se *Enhance / Equalise*;

(Process → Enhance contrast → Saturated Pixels: 0% → Selecionar Equalize Histogram → OK)

E) Uma cópia suavizada da imagem foi obtida aplicando-se *Unsharp Mask 5 / 0.9*;

(Process → Filters → Unsharp Mask → Radius: 5 Pixels → Mask Weight: 0.90 → OK)

F) Em seguida, toda imagem fora da ROI formada durante os passos anteriores foi removida novamente aplicando-se *Clear outside*;

(Edit → Clear outside)

G) A imagem foi convertida em binária aplicando-se *Make binary*;

(Process → Binary → Make Binary)

H) Para a remoção do ruído da imagem foi aplicado 2x o *Despeckle*;

(Process → Noise → Despeckle)

(Process → Noise → Despeckle)

I) A imagem foi convertida em esquelonizada aplicando o *Skeletonize*;

(Process → Binary → Skeletonize)

J) Por fim, a dimensão fractal foi obtida utilizando o *Fractal Box Counting*.

(Analyse → Tools → Fractal Box Counting → OK)

A dimensão fractal é representada pelo valor de D (**Figura 3.24**).

Figura 3.23 – Sequência do protocolo utilizado para a análise fractal. A) Duplicação da ROI; **B)** Remoção da imagem externa a ROI; **C)** Imagem Invertida; **D)** Ajuste de brilho e contraste; **E)** Cópia suavizada; **F)** Remoção da imagem externa ao alvéolo; **G)** Imagem binária; **H)** Eliminação do ruído; **I)** Eliminação de ruído e **J)** Imagem eskeletonizada.

Figura 3.24 – Valor da dimensão fractal (D)

Por fim, podemos observar a sobreposição da ROI da imagem radiográfica inicial (A) com a imagem fractal na **Figura 3.25**.

Figura 3.25 – Sobreposição da imagem fractal sobre a imagem inicial

3.7.2 Preparo das amostras para análise microscópica

Após o sacrifício, foram removidas as maxilas dos animais com o auxílio de lâminas para micrótomo, seccionando-as à distal dos terceiros molares. Em seguida, foram separadas na rafe palatina e os tecidos moles em excesso das hemimaxilas direita removidos com o auxílio de uma lâmina de bisturi número 15. As peças foram fixadas em formalina tamponada a 10%. No dia seguinte foram obtidas imagens radiográficas por meio de um sistema digital direto, como descrito no item obtenção das imagens radiográficas, antes de dar início à desmineralização em solução de EDTA. Essas imagens foram obtidas com objetivos de controlar o grau de desmineralização das peças coletadas para análise microscópica bem como para análises radiográficas por pixel e fractal, já descritas anteriormente.

As peças permaneceram em solução aquosa de EDTA pH 7,2 (solução contendo 4,13% de Titriplex III[®], Merck, Alemanha, e 0,44% de hidróxido de sódio, LabSynth[®], Diadema, Brasil, diluídos em água destilada) por 60 dias, sendo que a solução era substituída a cada 7 dias. Ao final dos 60 dias, foram obtidas novas imagens radiográficas de todas as peças. Constatada radiograficamente a desmineralização, as peças foram desidratadas em álcool 70° e álcool absoluto (LabSynth[®], Diadema, Brasil) e diafanizadas em xilol (LabSynth[®], Diadema, Brasil

até a inclusão das mesmas em blocos de resina sintética + parafina (Histosec[®], Merck, Alemanha).

Cortes semi-seriados de 5 µm de espessura foram obtidos no sentido longitudinal dos alvéolos utilizando-se um micrótomo Jung RM 2045 (Leica[®]). As lâminas foram montadas adequadamente, coradas com hematoxilina de Harris e eosina de Lison, e analisadas microscopicamente. Para análise descritiva (qualitativa), foi utilizado um microscópio óptico binocular (Olympus Optical do Brasil Ltda, modelo CH-2), com objetiva de aumento de até 40x.

Para a análise quantitativa, utilizou-se uma ocular Zeiss Kpl de 8x (Carl Zeiss MicroImaging Inc.), como observado na **Figura 3.26** contendo uma grade ou retículo de integração Zeiss II, constituída por 10 linhas paralelas com 100 pontos simetricamente distribuídos dentro dessa área quadrangular.

Figura 3.26– Imagem da grade ou retículo de integração Zeiss II utilizado na análise microscópica quantitativa

Em cada alvéolo foram observados 45 campos microscópicos distintos, com aumento de 40x, 15 em cada terço do alvéolo (apical, médio e cervical), após randomização ou amostragem sistemática, na qual os campos foram escolhidos a intervalos regulares em cada corte, de maneira a se obter uma amostra representativa de toda área do corte (WEIBEL, 1969). As estruturas histológicas quantificadas pela análise histométrica do reparo alveolar foram: tecido conjuntivo, tecido ósseo, coágulo sanguíneo, vaso sanguíneo, infiltrado inflamatório e espaço vazio.

3.7.3 Preparo das amostras para análise molecular

3.7.3.1 Extração de RNA

Após o sacrifício, foram removidas as maxilas dos 3 animais restantes de cada grupo com o auxílio de lâminas para micrótomo, seccionando-as à distal dos terceiros molares. Em seguida, foram separadas na rafe palatina e os tecidos moles em excesso das hemimaxilas direita removidos com o auxílio de uma lâmina de bisturi número 15. A região do alvéolo do dente incisivo superior direito foi dissecada com auxílio de lâminas para micrótomo e tesouras de tal forma a remover o excesso de osso ao redor do alvéolo. O material coletado foi armazenado seguindo a recomendação do fabricante, como previamente descrito (GARLET *et al.*, 2006), em tubos de microcentrífuga contendo 1mL de Trizol[®] (Invitrogen, EUA), sendo agitadas por 30 segundos e deixadas em temperatura ambiente por 5 minutos. As amostras foram congeladas a -80°C, no Centro Integrado em Pesquisas (CIP) da FOB/USP.

No momento da extração do RNA, os tubos foram descongelados e os alvéolos foram picotados com a ajuda de uma tesoura e seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante (Invitrogen, EUA). Em seguida, os tubos contendo os alvéolos já triturados foram agitados em *vórtex* por 30 segundos, deixados à temperatura ambiente por 5 minutos e adicionado 0,2 mL de clorofórmio (Sigma). Os tubos foram agitados por 10 segundos, sendo em seguida centrifugados a 13.000 rpm por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa (camada superior) foi recuperada em alíquotas de 400µL, que foram colocadas em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL contendo 400µL de isopropanol. Os tubos foram agitados por 10 segundos e deixados em repouso à temperatura ambiente por 10 minutos. Os tubos foram congelados a -20°C durante toda a noite. No dia seguinte, os tubos foram descongelados e após centrifugação a 13.000 rpm por 15 minutos a 4°C, o precipitado de RNA foi obtido e, em seguida, o sobrenadante foi descartado e ao precipitado adicionado 1mL de etanol 75% em água com dietil pirocarbonato 0,1% (DEPC), agitando-se vigorosamente. Foi realizada nova centrifugação a 8.000 rpm por 5 minutos a 4°C, descartando-se o sobrenadante e repetindo-se outra centrifugação com 1 mL de etanol 100% a 8.000 rpm por 5 minutos a 4°C. Para nova

dissolução do RNA total, os tubos de microcentrífuga receberam um volume de 50 μL de água tratada com DEPC 0,1% e foram incubados a 65°C por 15 a 30 minutos até a dissolução dos precipitados. Para permitir a secagem das amostras, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram deixados abertos em temperatura ambiente por 5 minutos dentro de uma capela de fluxo laminar vertical (para impedir a contaminação das amostras) e acrescentado, em seguida, 12 μL de água MiliQ em 0,1% DEPC.

3.7.3.2 Quantificação do RNA total

A concentração de RNA total nas amostras foi determinada por diluição do RNA (fator de diluição conhecido, igual a 0,25) e leitura da absorbância da amostra em cubetas de quartzo em espectrofotômetro Pharmacia (Ultrospec 2000) (**Figura 3.27**) no comprimento de onda de 260 nm (A_{260}). A fórmula para calcular a concentração de RNA total foi a seguinte: $(\text{RNA}) = A_{260} \times 40 \times \text{fator de diluição conhecido}$, sendo o resultado expresso em $\mu\text{g/mL}$ (SANTOS, 2002).

Figura 3.27 – Espectrofotômetro Pharmacia (Ultrospec 2000).

3.7.3.3 Avaliação da qualidade do RNA total

A qualidade do RNA total nas amostras foi determinada pela diluição do RNA em Tris-HCl (10 mM, pH 7,8) e leitura da absorbância das amostras em

cubetas de quartzo em espectrofotômetro Pharmacia (Ultrospec 2000) (**Figura 3.27**) nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm (A_{260} e A_{280}). A relação A_{260}/A_{280} foi calculada, sendo considerados aceitáveis os valores entre 1,9 e 2,1, indicando ausência de DNA nas amostras analisadas.

3.7.3.4 Transcrição reversa (RNA em cDNA)

Foram utilizados 5 µg de RNA total das amostras para a transcrição em DNA complementar (cDNA) por meio da enzima transcriptase reversa (Kit de transcrição reversa - Superscript III, Invitrogen®, EUA). Aos tubos contendo o RNA foi adicionado 0,2 µL de hexadeoxinucleotídeos (dNTPs) e 1 µL de Oligo dT *primer*, sendo essa mistura incubada a 65°C por 5 minutos e em seguida colocados em gelo por 1 minuto. Portanto, o volume total após a primeira incubação foi de 13 µL por tubo. Após a primeira incubação foi colocado no tubo 1 µL de DTT, 1 µL de água MiliQ em DEPEC 0,1 %, 1 µL da enzima transcriptase reversa e 4 µL do Tampão e incubado a 50°C por 1 hora, seguido de outra incubação a 70°C por 15 minutos para paralisar a reação. Assim, o volume final por tubo após a transcrição reversa foi de 20 µL.

3.7.3.5 Reações em cadeia da polimerase em tempo real (*Real Time PCR*)

A quantificação da expressão de RNAm (RNA mensageiro) codificando genes de fatores integrantes do reparo alveolar (osteocalcina, fosfatase alcalina, RUNX2, VEGF) foi realizada por meio de reações da *Real Time PCR*, utilizando-se o sistema SYBRGreen (Invitrogen®, EUA) em um aparelho MiniOpticon (BioRad - USA) (**Figura 3.28**), segundo descrito por Garlet *et al.* (2006).

Figura 3.28 – Aparelho MiniOpticon (BioRad - USA)

Pares de *primers* adequados para cada uma das reações de amplificação foram criados a partir de sequências de RNAm para os genes alvo, utilizando-se o programa *Primer Express* (Applied Biosystems), os quais se encontram descritos, assim como as propriedades de cada reação, na **Tabela 3.2**.

Tabela 3.2 – Desenho dos *primers* utilizados na *Real Time* PCR para os diferentes alvos criados pelo programa *Primer Express* (Applied Biosystem).

Alvo	(Pb); (Ta); (Tm)	Sense (5'-3')	Anti-sense (5'-3')
<i>β-actina</i>	Pb 150, Ta 60, Tm 82	ATTGAACACGGCATTGTCACC	GGTCATCTTTTCACGGTTGGC
<i>OCN</i>	Pb 57, Ta 61, Tm 83	TACAAGCGCATCTATGGCACC	TGTGCCGTCCTACTTTTCGAG
<i>ALP</i>	Pb 57, Ta 61, Tm 83	CGAGCAGGAACAGAAGTTTGC	TGGCCAAAAGGCAGTGAATAG
<i>RUNX2</i>	Pb 53, Ta 60, Tm 81	TTCAAGGTTGACCCTCGGA	AGATCGTTGAACCTGGCCACT
<i>VEGF</i>	Pb172, Ta 61, Tm 81	GCCCATGAAGTGGTGAAGTT	ACTCCAGGGCTTCATCATTG

Pb: tamanho do fragmento amplificado em pares de bases, **Ta:** temperatura de anelamento dos *primers* em °C, **Tm:** temperatura de *melting* em °C, ou seja, temperatura em que aproximadamente 50% das moléculas já estão desnaturadas.

Para todas as reações de *Real Time* PCR, foram utilizados 13 µL do reagente SYBRGreen Master Mix (Invitrogen®, EUA - que contém o fluoróforo SYBRGreen). Uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada par das seqüências dos *primers* utilizados. As demais informações encontram-se na **Tabela 3.3**

Tabela 3.3 – Concentração dos *primers* e quantidades de *primer*, amostra de cDNA, SYBRGreen e água MiliQ utilizadas em cada reação de *Real Time* PCR.

Alvo	Concentração do <i>primer</i>	Quantidade de <i>primer</i>	Quantidade de Amostra de cDNA	Quantidade de SYBRGreen	Quantidade de água MiliQ
<i>β-actina</i>	0,04 µM	2 µL	1 µL	13µL	9 µL
<i>OCN</i>	0,2 µM	1 µL	1 µL	13µL	10 µL
<i>ALP</i>	0,2 µM	1 µL	1 µL	13µL	10 µL
<i>RUNX2</i>	0,2 µM	1 µL	1 µL	13µL	10 µL
<i>VEGF</i>	0,5 µM	1 µL	1 µL	13µL	10 µL
<i>Controle negativo</i>	De acordo com o alvo	1 µL	–	13 µL	11 µL

Previamente, as reações de *Real Time* PCR foram otimizadas com relação às concentrações ideais de cada par de *primers* e temperatura de anelamento, de modo a maximizar eficiência e a especificidade de amplificação (Falta falar da curva de dissociação).

Os resultados foram analisados com base no valor de CT (*cicle threshold* – ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos em que a amplificação atinge um dado limiar durante a fase de amplificação exponencial da PCR, que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado em relação

ao nível de expressão de um gene constitutivo. A especificidade das reações foi confirmada pela curva de dissociação (T_m).

As reações de extração de RNA, quantificação do RNA total, avaliação da qualidade do RNA total, transcrição do RNA em cDNA foram realizadas no Laboratório de Farmacologia e as reações em cadeia da polimerase em tempo real (*Real Time PCR*) foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular, da disciplina de Histologia, ambos os Laboratórios do Departamento de Ciências Biológicas da FOB/USP.

3.7.4 Análise Estatística

Para a comparação estatística dos resultados encontrados nos grupos e períodos nas análises microscópica, radiográfica e molecular analisadas foi realizado inicialmente o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Todas as variáveis apresentaram distribuição normal, aplicando-se, portanto, os testes paramétricos Análise de Variância (ANOVA) a dois critérios (grupo e período de sacrifício) seguido do teste de Tukey para comparações múltiplas entre o grupos e/ou períodos quando da constatação de diferença estatisticamente significativa.

A análise de possíveis correlações entre as variáveis atuantes na mesma fase de processo de reparo alveolar foi realizada pelo teste de Correlação de Pearson. Somente para correlação entre as análises microscópica e molecular foi utilizado o valor da média dos grupos em virtude de não ser o mesmo animal correspondente.

Todos os testes foram aplicados por meio do programa *Statistica* for Windows 6.0 (*Statistica for Windows 6.0 Copyright StatSoft, Inc. Tulsa, Okla, USA*). (<http://www.statsoft.com>), adotando nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4 Resultados

4 Resultados

Para melhor compreensão, os resultados serão divididos em tópicos de acordo com o tipo de análise empregada (radiográfica, microscópica e molecular) e apresentados em forma de figuras.

4.1 Análise radiográfica

Após o sacrifício, foi realizada a análise radiográfica dos valores de pixel e fractal, detalhadas a seguir.

4.1.1 Análise dos valores de pixel

Os resultados provenientes da análise radiográfica dos valores de pixel foram obtidos a partir da média dos valores de pixel das ROIs analisados por meio do programa *ImageJ*®. Cada ROI representou o desenho da dimensão da imagem radiográfica de todo alvéolo. Os resultados, média e desvio padrão, estão apresentados em gráficos e divididos por grupos e períodos de sacrifícios estudados para facilitar o entendimento. Os dados foram analisados estatisticamente por comparações intergrupos e intragrupos, por período de sacrifício (6, 15 e 28 dias).

A análise dos valores de pixel por grupo não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,464$) (**Figura 4.1**).

Figura 4.1 – Análise radiográfica por meio dos valores de pixel por grupo. Após obtenção das imagens radiográficas o valor médio de pixel da ROI foi calculado utilizando o programa *ImageJ*®. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ DP por grupo.

Em nossos resultados da análise dos valores de pixel por período de sacrifício (**Figura 4.2**) observamos diferença estatisticamente significativa entre os períodos de sacrifício apenas para o Grupo C ($p = 0,020$). Porém, houve uma tendência a um aumento do valor de pixel para os períodos com o passar dos dias para os grupos S+L (86,35; 92,28; 93,66), ATO (82,81; 89,87; 102,37) e ATO + L (86,22; 87,00; 89,11).

Figura 4.2 – Análise radiográfica por meio dos valores de pixel por período de sacrifício. Após obtenção das imagens radiográficas o valor médio de pixel da ROI foi calculado utilizando o programa *ImageJ*®. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ DP de pixel por período de sacrifício. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas entre os períodos de sacrifício por grupo.

4.1.2 Análise fractal

Os resultados provenientes da análise fractal foram obtidos a partir da dimensão fractal das ROIs analisados por meio de ferramentas do programa *ImageJ*®. Cada ROI representa o desenho da dimensão da imagem radiográfica de todo alvéolo. Os resultados, média e desvio padrão, estão apresentados em gráficos e divididos por grupos e períodos estudados.

A análise dos valores da dimensão fractal por grupo (**Figura 4.3**) não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,900$) para todos os períodos analisados.

Figura 4.3 – Análise radiográfica por meio da dimensão fractal por grupo. Após obtenção das imagens radiográficas a dimensão fractal da ROI foi calculada utilizando o programa *ImageJ*[®]. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ DP da dimensão fractal por grupo.

Os resultados da análise fractal por período (**Figura 4.4**) apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p=0,017$) apenas para o Grupo ATO+L para o período de 28 dias quando comparado com os demais. Porém, houve uma tendência a um aumento para o grupo C (1,4531; 1,4556; 1,4617).

Figura 4.4 – Análise radiográfica por meio da dimensão fractal por período de sacrifício. Após obtenção das imagens radiográficas a dimensão fractal da ROI foi calculada utilizando o programa *ImageJ*[®]. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ DP da dimensão fractal por período de sacrifício. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas entre os períodos de sacrifício por grupo.

4.2 Análise microscópica

4.2.1 Análise qualitativa

Previamente à morfometria, foi realizada análise qualitativa das lâminas de cada grupo no intuito de conhecer a morfologia do alvéolo dentário dos animais e estruturas presentes. Foram encontradas semelhanças entre todos os grupos para as variáveis estudadas. A análise morfométrica coincidiu com os achados da análise qualitativa, portanto foram selecionadas algumas áreas mais representativas dos alvéolos dentários de cada grupo.

As estruturas representadas foram identificadas como: tecido conjuntivo **(TC)**, tecido ósseo **(TO)**, coágulo sanguíneo **(CS)**, vasos sanguíneos **(VS)**, célula inflamatória **(*)**.

4.2.1.1 Imagens dos alvéolos por grupo, aos 6 dias.

Figura 4.5 – Análise microscópica qualitativa por grupo – período 6 dias. Após obtenção das lâminas foi realizada análise microscópica qualitativa de cada grupo por período de sacrifício no intuito de conhecer a morfologia do alvéolo dentário dos animais e estruturas presentes utilizando um microscópio óptico binocular (Olympus Optical do Brasil Ltda, modelo CH-2), com objetiva de aumento de até 40x. Os resultados apresentados representam imagens de cortes longitudinais de alvéolos corados em HE, de áreas mais representativas, por grupo. **A) Grupo C:** imagem demonstra tecido ósseo neoformado imaturo (TO), tecido conjuntivo (TC) em permeio ao coágulo sanguíneo (C), * célula inflamatória e vários vasos sanguíneos (VS); **B) Grupo S+L:** imagem demonstra tecido ósseo neoformado imaturo (TO), tecido conjuntivo (TC) em permeio ao coágulo sanguíneo (C), * célula inflamatória e vários vasos sanguíneos (VS), organização tecidual semelhante ao Grupo C; **C) Grupo ATO:** imagem demonstra tecido ósseo neoformado imaturo (TO), tecido conjuntivo (TC) em permeio ao coágulo sanguíneo (C), * célula inflamatória e vários vasos sanguíneos (VS), organização tecidual semelhante ao Grupo C e **D) Grupo ATO+L:** imagem demonstra tecido ósseo neoformado imaturo (TO), tecido conjuntivo (TC), * célula inflamatória e vários vasos sanguíneos (VS), organização tecidual semelhante ao Grupo C. Essa imagem se destoa um pouco das demais, sobretudo na análise do tecido ósseo, devido à melhor coloração.

4.2.1.2 Imagens dos alvéolos por grupo, aos 15 dias.

Figura 4.6 – Análise microscópica qualitativa por grupo – período 15 dias. Após obtenção das lâminas foi realizada análise microscópica qualitativa de cada grupo por período de sacrifício no intuito de conhecer a morfologia do alvéolo dentário dos animais e estruturas presentes utilizando um microscópio óptico binocular (Olympus Optical do Brasil Ltda, modelo CH-2), com objetiva de aumento de até 40x. Os resultados apresentados representam imagens de cortes longitudinais de alvéolos corados em HE, de áreas mais representativas, por grupo. **A) Grupo C:** imagem demonstra tecido ósseo neoformado (TO), em permeio ao tecido conjuntivo (TC) e vários vasos sanguíneos (VS); **B) Grupo S+L:** imagem demonstra tecido ósseo neoformado (TO), em permeio ao tecido conjuntivo (TC) e vários vasos sanguíneos (VS); **C) Grupo ATO:** imagem demonstra tecido ósseo neoformado (TO), em permeio a grande quantidade de tecido conjuntivo (TC) e vários vasos sanguíneos (VS) e **D) Grupo ATO+L:** imagem demonstra tecido ósseo neoformado (TO), em permeio ao tecido conjuntivo (TC) e vários vasos sanguíneos (VS).

4.2.1.3 Imagens dos alvéolos por grupo, aos 28 dias.

Figura 4.7 – Análise microscópica qualitativa por grupo – período 28 dias. Após obtenção das lâminas foi realizada análise microscópica qualitativa de cada grupo por período de sacrifício no intuito de conhecer a morfologia do alvéolo dentário dos animais e estruturas presentes utilizando um microscópio óptico binocular (Olympus Optical do Brasil Ltda, modelo CH-2), com objetiva de aumento de até 40x. Os resultados apresentados representam imagens de cortes longitudinais de alvéolos corados em HE, de áreas mais representativas, por grupo. **A) Grupo C:** imagem demonstra tecido ósseo neoformado (TO), tecido conjuntivo (TC) e vários vasos sanguíneos (VS); **B) Grupo S+L:** imagem demonstra tecido ósseo neoformado (TO), tecido conjuntivo (TC) e vários vasos sanguíneos (VS), organização tecidual semelhante ao Grupo C; **C) Grupo ATO:** imagem demonstra tecido ósseo neoformado (TO), tecido conjuntivo (TC) e vários vasos sanguíneos (VS), organização tecidual semelhante ao Grupo C e **D) Grupo ATO+L:** imagem demonstra tecido ósseo neoformado (TO), tecido conjuntivo (TC) e vários vasos sanguíneos (VS), organização tecidual semelhante ao Grupo C.

4.2.2 Análise Quantitativa

Os resultados provenientes da análise quantitativa (morfometria) foram calculados a partir da média da densidade de cada estrutura encontrada nos cortes histológicos (tecido conjuntivo, tecido ósseo, coágulo sanguíneo, vaso sanguíneo, infiltrado inflamatório e espaço vazio), analisados por meio da microscopia óptica, por animal. A densidade foi calculada dividindo-se o total de pontos computados por 45 (número de campos microscópicos contados por alvéolo). Os resultados provenientes da análise descritiva, média e desvio padrão, estão apresentados em gráficos e divididos por estrutura, grupo e por período estudado. Os dados foram analisados estatisticamente por comparações intergrupos e intragrupos, por período de sacrifício (6,15 e 28 dias).

4.2.2.1 Tecido Conjuntivo

A análise dos valores da densidade de tecido conjuntivo por grupo **Figura 4.8** não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,614$).

Figura 4.8 – Análise da densidade de tecido conjuntivo por grupo. Após obtenção das lâminas o valor médio da densidade de tecido conjuntivo foi calculado utilizando ocular Zeiss Kpl de 8x com retículo de integração Zeiss II. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ DP por grupo.

A análise dos valores da densidade de tecido conjuntivo por período de sacrifício (**Figura 4.9**) apresentou diferença estatisticamente significativa apenas para o Grupo C ($p= 0,034$) entre os períodos de sacrifício 6 e 28 dias, com uma tendência a diminuição com o passar dos dias (67,14; 51,10; 42,21). Todavia, apesar de não significativa, também foi possível observar essa tendência a diminuição da densidade de tecido conjuntivo para os períodos de sacrifício 6,15 e 28 dias nos grupos ATO (55,35; 47,36; 44,18) e ATO+L (62,38; 50,90; 46,16), respectivamente.

Figura 4.9 – Análise da densidade de tecido conjuntivo por período de sacrifício. Após obtenção das lâminas o valor médio da densidade de tecido conjuntivo foi calculado utilizando ocular Zeiss Kpl de 8x com retículo de integração Zeiss II. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ DP por período de sacrifício dos animais. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas entre os períodos de sacrifício por grupo.

4.2.2.2 Tecido Ósseo

A análise dos valores da densidade de tecido ósseo por grupo (**Figura 4.10**) não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p= 0,480$).

Figura 4.10 – Análise da densidade de tecido ósseo por grupo. Após obtenção das lâminas o valor médio da densidade de tecido ósseo foi calculado utilizando ocular Zeiss Kpl de 8x com retículo de integração Zeiss II. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ DP por grupo.

A análise dos valores da densidade de tecido ósseo por período (**Figura 4.11**) apresentou diferença estatisticamente significativa ($p=0,000$) para todos os grupos quando comparado o período 6 dias com 15 ou 28 dias. Assim como, uma tendência a um aumento da densidade de tecido ósseo para os períodos com o passar dos dias para os grupos C (13,07; 39,01; 48,86) ATO (16,78; 44,37; 46,39), ATO+L (15,04; 38,95; 46,44).

Figura 4.11 – Análise da densidade de tecido ósseo por período de sacrifício. Após obtenção das lâminas o valor médio da densidade de tecido ósseo foi calculado utilizando ocular Zeiss Kpl de 8x com retículo de integração Zeiss II. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ DP por grupo. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas entre os períodos de sacrifício por grupo.

4.2.2.3 Coágulo Sanguíneo

A análise dos valores da densidade de coágulo sanguíneo por grupo (**Figura 4.12**) não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,879$).

Figura 4.12 – Análise da densidade de coágulo sanguíneo por grupo. Após obtenção das lâminas o valor médio da densidade de coágulo sanguíneo foi calculado utilizando ocular Zeiss Kpl de 8x com retículo de integração Zeiss II. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ DP por grupo.

A análise dos valores da densidade de coágulo sanguíneo por período (**Figura 4.13**) apresentou diferença estatisticamente significativa ($p=0,000$) para os Grupos S+L, ATO e ATO+L quando comparado o período 6 dias com 15 ou 28 dias. Houve uma diminuição nos valores das médias da densidade de coágulo sanguíneo para os períodos de sacrifício 6,15 e 28 dias para os grupos C (14,02; 3,59; 0,94) S+L (18,74; 2,53; 0,11) e ATO+L (17,94; 3,00; 1,30), respectivamente.

Figura 4.13 – Análise da densidade de coágulo sanguíneo por período de sacrifício. Após obtenção das lâminas o valor médio da densidade de coágulo sanguíneo foi calculado utilizando ocular Zeiss Kpl de 8x com retículo de integração Zeiss II. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ DP por grupo. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas entre os períodos de sacrifício por grupo.

4.2.2.4 Vaso Sanguíneo

A análise dos valores da densidade de vaso sanguíneo por grupo (**Figura 4.14**) não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,700$).

Figura 4.14 – Análise da densidade de vaso sanguíneo por grupo. Após obtenção das lâminas o valor médio da densidade de vaso sanguíneo foi calculado utilizando ocular Zeiss Kpl de 8x com retículo de integração Zeiss II. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ DP por grupo.

A análise dos valores da densidade de vaso sanguíneo por período (**Figura 4.15**) não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p= 0,999$). Porém, houve uma tendência a um aumento nos valores da densidade de vaso sanguíneo para os períodos de sacrifício 6,15 e 28 dias para os grupos C (4,90; 5,58; 7,70) e ATO (4,84; 6,08; 6,53),respectivamente.

Figura 4.15 – Análise da densidade de vaso sanguíneo por período de sacrifício. Após obtenção das lâminas o valor médio da densidade de vaso sanguíneo foi calculado utilizando ocular Zeiss Kpl de 8x com retículo de integração Zeiss II. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ DP por grupo.

4.2.2.5 Infiltrado inflamatório

A análise dos valores da densidade de infiltrado inflamatório por grupo (**Figura 4.16**) não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p= 0,826$).

Figura 4.16 – Análise da densidade de infiltrado inflamatório por grupo. Após obtenção das lâminas o valor médio da densidade de infiltrado inflamatório foi calculado utilizando ocular Zeiss Kpl de 8x com retículo de integração Zeiss II. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ DP por grupo.

A análise dos valores da densidade de infiltrado inflamatório por período (**Figura 4.17**) não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p=0,060$) para todos os grupos. Porém, houve uma tendência a diminuição nos valores das médias da densidade de infiltrado inflamatório para os períodos de sacrifício 6,15 e 28 dias para os grupos C (0,48; 0,24; 0,12) e ATO (0,62; 0,31; 0,26), respectivamente.

Figura 4.17 – Análise da densidade de infiltrado inflamatório por período de sacrifício. Após obtenção das lâminas o valor médio da densidade de infiltrado inflamatório foi calculado utilizando ocular Zeiss Kpl de 8x com retículo de integração Zeiss II. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ DP por grupo.

4.2.2.6 Espaço Vazio

A análise dos valores da densidade de espaço vazio por grupo (**Figura 4.18**) não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p= 0,689$).

Figura 4.18 – Análise da densidade de espaço vazio por grupo. Após obtenção das lâminas o valor médio da densidade de espaço vazio foi calculado utilizando ocular Zeiss Kpl de 8x com retículo de integração Zeiss II. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ DP por grupo.

A análise dos valores da densidade de espaço vazio por período (**Figura 4.19**) não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p= 0,060$) para todos os grupos. Porém, houve uma tendência a diminuição nos valores da densidade de infiltrado inflamatório para os períodos de sacrifício 6,15 e 28 dias para os grupos C (0,29; 0,15; 0,08), ATO (0,17; 0,10; 0,05) e ATO+L (0,25; 0,16; 0,07), respectivamente.

Figura 4.19 – Análise da densidade de espaço vazio por período de sacrifício. Após obtenção das lâminas o valor médio da densidade de espaço vazio foi calculado utilizando ocular Zeiss Kpl de 8x com retículo de integração Zeiss II. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ DP por grupo.

4.3 Análise molecular

A expressão quantitativa de genes relacionados ao processo de reparo alveolar selecionados (colágeno tipo I, VEGF, RUNX2, osteocalcina, fosfatase alcalina) foi analisada por meio da PCR *Real Time*.

Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (*cycle threshold* – ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos em que a amplificação das amostras atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras) que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. Todas as amostras também foram submetidas a reações para a detecção de RNA mensageiro para a beta-actina, um gene de expressão constitutiva, utilizado como controle positivo da reação de amplificação; assim como os níveis de expressão de beta-actina foram utilizados para a normalização dos níveis de expressão do gene alvo. Duas amostras negativas (água) também foram submetidas a reação com cada par dos *primers* utilizados. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ DP, da intensidade de expressão de RNAm para o gene alvo, normalizado pela expressão da beta-actina, obtidos de 3 animais de cada grupo para cada período de sacrifício.

4.3.1 Colágeno tipo I

A análise da expressão de colágeno tipo I por grupo (**Figura 4.20**) não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p= 0,551$).

Figura 4.20 – Análise da expressão de colágeno tipo I por grupo. Após a exodontia, os alvéolos foram coletados, o RNA total extraído e os níveis de expressão de colágeno tipo I foram analisados por meio da PCR *Real Time*. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ DP da intensidade de expressão de RNAm para o gene alvo por grupo, normalizado pela expressão da beta-actina.

Os resultados demonstraram que a cinética de expressão de colágeno tipo I também não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p= 0,921$) para todos os grupos (**Figura 4.21**). Ao compararmos a cinética de expressão de colágeno tipo I nos períodos 6,15 e 28 dias observamos uma tendência a um aumento na expressão para os grupos C (0,55; 1,18; 2,72) e S+L (0,28; 0,36; 0,95), respectivamente. Todavia, constatamos uma disposição diferente para o Grupo ATO que apresentou o maior valor de expressão de colágeno tipo I aos 15 dias (0,72; 1,07; 0,14) e para o Grupo ATO+L que apresentou um decréscimo no valor de expressão de colágeno tipo I (1,84; 0,24; 0,04).

Figura 4.21 – Cinética de expressão de colágeno tipo I. Após a exodontia, os alvéolos foram coletados, o RNA total extraído e os níveis de expressão de colágeno tipo I foram analisados por meio da PCR *Real Time*. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ DP da intensidade de expressão de RNAm para o gene alvo por período de sacrifício, normalizado pela expressão da beta-actina.

4.3.2 VEGF

A análise da expressão de VEGF por grupo (**Figura 4.22**) não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,500$).

Figura 4.22 – Análise da expressão de VEGF por grupo. Após a exodontia, os alvéolos foram coletados, o RNA total extraído e os níveis de expressão de VEGF foram analisados por meio da PCR *Real Time*. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ DP da intensidade de expressão de RNAm para o gene alvo por grupo, normalizado pela expressão da beta-actina.

A cinética de expressão de VEGF (**Figura 4.23**) apresentou diferença estatisticamente significativa ($p= 0,000$) apenas para o Grupo ATO+L quando comparado o período 6 dias com 15 ou 28 dias. Todavia, observamos que todos os grupos apresentam uma tendência de diminuição na cinética de expressão do VEGF com o aumento dos períodos (6,15 e 28 dias). Esse decréscimo na expressão fica evidente para os grupos C (15,15; 11,63; 3,63), ATO (15,64; 6,80; 2,49), ATO+L (24,80; 2,73; 2,11). Para o Grupo S+L também ocorreu um decréscimo no valor de expressão de VEGF do período 6 dias (14,79) para o 15 dias (2,19), porém, permaneceu constante no período 28 dias (2,19).

Figura 4.23 – Cinética de expressão de VEGF. Após a exodontia, os alvéolos foram coletados, o RNA total extraído e os níveis de expressão de VEGF foram analisados por meio da PCR *Real Time*. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ DP da intensidade de expressão de RNAm para o gene alvo por período de sacrifício, normalizado pela expressão da beta-actina.

4.3.3 RUNX2

A análise da expressão de RUNX2 por grupo (**Figura 4.24**) não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p= 0,486$).

Figura 4.24 – Análise da expressão de RUNX2 por grupo. Após a exodontia, os alvéolos foram coletados, o RNA total extraído e os níveis de expressão de RUNX2 foram analisados por meio da PCR *Real Time*. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ DP da intensidade de expressão de RNAm para o gene alvo por grupo, normalizado pela expressão da beta-actina.

Os resultados demonstraram que a cinética de expressão de RUNX2 (**Figura 4.25**) não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p= 0,296$). Ao compararmos a cinética de expressão de RUNX2 nos períodos 6,15 e 28 dias observamos uma tendência a um aumento na expressão mais evidente para os grupos C (0,42; 1,85; 3,44) e ATO (1,08; 1,75; 3,77), respectivamente. No entanto, para os grupos S+L e ATO+L, essa tendência não foi tão clara e é possível observar que o menor valor de expressão de RUNX2 foi aos 15 dias (0,44; 0,37; 0,51) e (1,85; 1,80; 3,07).

Figura 4.25 – Cinética de expressão de RUNX2. Após a exodontia, os alvéolos foram coletados, o RNA total extraído e os níveis de expressão de RUNX2 foram analisados por meio da PCR *Real Time*. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ DP da intensidade de expressão de RNAm para o gene alvo por período de sacrifício, normalizado pela expressão da beta-actina.

4.3.4 Osteocalcina

A análise da expressão de osteocalcina por grupo (**Figura 4.26**) não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,845$).

Figura 4.26 – Análise da expressão de osteocalcina por grupo. Após a exodontia, os alvéolos foram coletados, o RNA total extraído e os níveis de expressão de osteocalcina foram analisados por meio da PCR *Real Time*. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ DP da intensidade de expressão de RNAm para o gene alvo por grupo, normalizado pela expressão da beta-actina.

Os resultados evidenciaram que a cinética expressão de osteocalcina (**Figura 4.27**) não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p= 0,499$) nos períodos avaliados. No entanto, foi possível observar uma tendência a um aumento na expressão para o Grupo ATO (1,82; 2,47; 2,82). Para os grupos C e S+L, observou-se que o maior valor de expressão de osteocalcina ocorreu aos 15 dias (0,31; 4,58; 2,48 e 0,52; 1,97; 1,68). Diferentemente, para o Grupo ATO+L, observamos uma tendência a um decréscimo na expressão de osteocalcina (3,88; 3,22; 0,50).

Figura 4.27 – Cinética de expressão de osteocalcina. Após a exodontia, os alvéolos foram coletados, o RNA total extraído e os níveis de expressão de osteocalcina foram analisados por meio da *PCR Real Time*. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ DP da intensidade de expressão de RNAm para o gene alvo por período de sacrifício, normalizado pela expressão da beta-actina.

4.3.5 Fosfatase Alcalina

A análise da expressão de fosfatase alcalina por grupo (**Figura 4.28**) não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p= 0,648$).

Figura 4.28 – Análise da expressão de fosfatase alcalina por grupo. Após a exodontia, os alvéolos foram coletados, o RNA total extraído e os níveis de expressão de fosfatase alcalina foram analisados por meio da PCR *Real Time*. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ DP da intensidade de expressão de RNAm para o gene alvo por grupo, normalizado pela expressão da beta-actina.

Os resultados demonstraram que a cinética de expressão de fosfatase alcalina não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p= 0,178$) para todos os grupos (**Figura 4.29**). Ao compararmos a cinética de expressão de fosfatase alcalina nos períodos 6,15 e 28 dias observamos uma tendência a um decréscimo na expressão para os grupos ATO (3,95; 1,74; 0,21) e ATO+L (2,48; 0,43; 0,32). Observamos, para o Grupo C, que o maior valor de expressão de fosfatase alcalina para o período de sacrifício foi aos 15 dias (1,85; 3,05; 1,79). Diferentemente dessa cinética, para o Grupo S+L, observa-se que o menor valor de expressão de fosfatase alcalina foi aos 15 dias (3,64; 1,18; 2,31).

Figura 4.29 – Cinética de expressão de fosfatase alcalina. Após a exodontia, os alvéolos foram coletados, o RNA total extraído e os níveis de expressão de fosfatase alcalina foram analisados por meio da PCR *Real Time*. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ DP da intensidade de expressão de RNAm para o gene alvo por período de sacrifício, normalizado pela expressão da beta-actina.

4.4 Correlações

Foram investigadas, pelo teste de Correlação de Pearson, algumas correlações possíveis entre as variáveis, com o intuito de conhecer e comparar o comportamento de algumas variáveis atuantes na mesma fase do processo de reparo alveolar. Somente para correlação entre as análises microscópica e molecular foi utilizado o valor da média dos grupos em virtude de não ser o mesmo animal correspondente. Os testes foram aplicados por meio do programa *Statistica for Windows 6.0* (*Statistica for Windows 6.0 Copyright StatSoft, Inc. Tulsa, Okla, USA*). (<http://www.statsoft.com>).

As seguintes correlações foram realizadas:

- Densidade de tecido ósseo X valor de pixel;
- Densidade de tecido ósseo X dimensão fractal;
- Densidade de tecido ósseo X expressão de colágeno tipo I;
- Densidade de tecido ósseo X expressão de RUNX2;
- Densidade de tecido ósseo X expressão de osteocalcina;
- Densidade de tecido ósseo X expressão de fosfatase alcalina;

- Densidade de tecido conjuntivo X expressão de colágeno tipo I;
- Densidade de vaso sanguíneo X expressão de VEGF;
- Densidade de coágulo sanguíneo X expressão de VEGF.

Os resultados das correlações estão apresentados em gráficos indicando o valor de p e r. O nível de significância adotado foi de 5 % ($p < 0,05$).

4.4.1 Densidade de tecido ósseo X valor de pixel

O resultado da análise da correlação entre densidade de tecido ósseo e valor de pixel (**Figura 4.30**) demonstrou correlação positiva ($r = 0,629$) estatisticamente significativa ($p = 0,000$).

Figura 4.30 – Análise da correlação entre densidade de tecido ósseo e valor de pixel. Após os resultados das análises microscópicas e radiográficas, foi realizado o teste de correlação de Pearson para as variáveis densidade de tecido ósseo e valor de pixel. Os resultados apresentam a distribuição por animal dos valores correspondentes de densidade de tecido ósseo e valor de pixel e a correlação entre as variáveis estão representados pelos valores de p e r. *Diferença estatisticamente significativa.

4.4.2. Densidade de tecido ósseo X dimensão fractal

A correlação entre densidade de tecido ósseo e dimensão fractal (**Figura 4.31**) não demonstrou correlação estatisticamente significativa ($p = 0,205$).

Figura 4.31 – Análise da correlação entre densidade de tecido ósseo e dimensão fractal. Após os resultados das análises microscópicas e radiográficas, foi realizado o teste de correlação de Pearson para densidade de tecido ósseo e dimensão fractal. Os resultados apresentam a distribuição por animal dos valores correspondentes de densidade de tecido ósseo e dimensão fractal e a correlação entre as variáveis estão representados pelos valores de p e r .

4.4.3. Densidade de tecido ósseo X expressão de colágeno tipo I

A correlação entre densidade de tecido ósseo e expressão de colágeno tipo I (Figura 4.32) não demonstrou correlação estatisticamente significativa ($p = 0,916$).

Figura 4.32– Análise da correlação entre densidade de tecido ósseo e expressão de colágeno tipo I. Após os resultados das análises microscópicas e moleculares, foi realizado o teste de correlação de Pearson para densidade de tecido ósseo e expressão de colágeno tipo I. Os resultados apresentam os valores correspondentes de densidade de tecido ósseo e expressão de colágeno tipo I das médias por grupo e período de sacrifício e a correlação entre as variáveis estão representados pelos valores de p e r .

4.4.4 Densidade de tecido ósseo X expressão de RUNX2

A correlação entre densidade de tecido ósseo e expressão de RUNX2 (**Figura 4.33**) não demonstrou correlação estatisticamente significativa ($p = 0,127$).

Figura 4.33 – Análise da correlação entre densidade de tecido ósseo e expressão de RUNX2. Após os resultados das análises microscópicas e moleculares, foi realizado o teste de correlação de Pearson para densidade de tecido ósseo e expressão RUNX2. Os resultados apresentam os valores correspondentes de densidade de tecido ósseo e expressão de RUNX2 das médias por grupo e período de sacrifício e a correlação entre as variáveis estão representados pelos valores de p e r .

4.4.5 Densidade de tecido ósseo X expressão de osteocalcina

A análise da correlação entre densidade de tecido ósseo e expressão de osteocalcina (**Figura 4.34**) não demonstrou correlação estatisticamente significativa ($p = 0,615$).

Figura 4.34– Análise da correlação entre densidade de tecido ósseo e expressão de osteocalcina. Após os resultados das análises microscópicas e moleculares, foi realizado o teste de correlação de Pearson para densidade de tecido ósseo e expressão de osteocalcina. Os resultados apresentam os valores correspondentes de densidade de tecido ósseo e expressão de osteocalcina das médias por grupo e período de sacrifício e a correlação entre as variáveis estão representados pelos valores de p e r .

4.4.6 Densidade de tecido ósseo X expressão de fosfatase alcalina

A análise da correlação entre densidade de tecido ósseo e expressão de fosfatase alcalina (**Figura 4.35**) demonstrou correlação negativa ($r = -0,631$) estatisticamente significativa ($p = 0,028$).

Figura 4.35– Análise da correlação entre densidade de tecido ósseo e expressão de fosfatase alcalina. Após os resultados das análises microscópicas e moleculares, foi realizado o teste de correlação de Pearson para densidade de tecido ósseo e expressão de fosfatase alcalina. Os resultados apresentam os valores correspondentes de densidade de tecido ósseo e expressão de fosfatase alcalina das médias por grupo e período de sacrifício e a correlação entre as variáveis estão representados pelos valores de p e r . *Diferença estatisticamente significativa.

4.4.7 Densidade de tecido conjuntivo X expressão de colágeno tipo I

O resultado da análise da correlação entre densidade de tecido conjuntivo e expressão de colágeno tipo I (**Figura 4.36**) não demonstrou correlação estatisticamente significativa ($p = 0,845$).

Figura 4.36– Análise da correlação entre densidade de tecido conjuntivo e expressão de colágeno tipo I. Após os resultados das análises microscópicas e moleculares, foi realizado o teste de correlação de Pearson para as variáveis densidade de tecido conjuntivo e expressão de colágeno tipo I. Os resultados apresentam os valores correspondentes de densidade de tecido conjuntivo e expressão de colágeno tipo I das médias por grupo e período de sacrifício e a correlação entre as variáveis estão representados pelos valores de p e r .

4.4.8 Densidade de vaso sanguíneo X expressão de VEGF

O resultado da análise da correlação entre densidade de vaso sanguíneo e expressão de VEGF (**Figura 4.37**) demonstrou correlação negativa ($r = -0,664$) estatisticamente significativa ($p = 0,018$).

Figura 4.37– Análise da correlação entre densidade de vaso sanguíneo e expressão de VEGF. Após os resultados das análises microscópicas e moleculares, foi realizado o teste de correlação de Pearson para as variáveis densidade de vaso sanguíneo e expressão de VEGF. Os resultados apresentam os valores correspondentes de densidade de vaso sanguíneo e expressão de VEGF das médias por grupo e período de sacrifício e a correlação entre as variáveis estão representados pelos valores de p e r . *Diferença estatisticamente significativa.

4.4.9 Densidade de coágulo sanguíneo X expressão de VEGF

O resultado da análise da correlação entre densidade de coágulo sanguíneo e expressão de VEGF (**Figura 4.38**) demonstrou correlação positiva ($r= 0,867$) estatisticamente significativa ($p= 0,000$).

Figura 4.38– Análise da correlação entre densidade de coágulo sanguíneo e expressão de VEGF. Após os resultados das análises microscópicas e moleculares, foi realizado o teste de correlação de Pearson para as variáveis densidade de coágulo sanguíneo e expressão de VEGF. Os resultados apresentam os valores correspondentes de densidade de coágulo sanguíneo e expressão de VEGF das médias por grupo e período de sacrifício e a correlação entre as variáveis estão representados pelos valores de p e r . *Diferença estatisticamente significativa.

5 Discussão

5. DISCUSSÃO

5.1 A importância do tema

A terapia fotodinâmica é uma modalidade terapêutica que combina o uso de uma droga fotossensibilizadora e luz para causar morte celular. As drogas utilizadas para terapia fotodinâmica são conhecidas como fotossensibilizadores, ou corantes, e possuem pouca ou nenhuma toxicidade às células na ausência de luz (GAD, et al., 2004).

O uso terapêutico de radiação visível nas áreas da saúde aumentou consideravelmente no último século, devido, principalmente, ao desenvolvimento tecnológico e científico, sendo uma modalidade terapêutica amplamente estudada para o tratamento de injúrias pré-malignas, malignas, infecciosas e degenerativas (SHACKLEY, et al., 1999) .

No entanto, a TFD antimicrobiana, ou seja, a aplicação de luz e corantes para a inativação de microorganismos não é uma descoberta recente, porém, esta técnica não se disseminou na prática clínica, possivelmente devido à grande disponibilidade de agentes antimicrobianos desenvolvidos a partir do descobrimento da penicilina. Após a introdução da penicilina como agente terapêutico (FLEMMING, 1955), foram descobertas cepas de bactérias patogênicas resistentes a este agente. A partir de então, começou um fenômeno cíclico: tão logo um novo agente antibiótico era introduzido na terapêutica, bactérias resistentes ao seu mecanismo de ação eram isoladas (PHONEFIX, et al., 2003).

Em Odontologia, em virtude do crescente aumento da resistência bacteriana ao uso dos antibióticos (QUITYNEN, TEUGHELS, STEENBERGHE, 2003), a TFD tem sido empregada com grandes perspectivas no controle antimicrobiano (WILSON, 2004; KONOPKA; GOSLINSKI, 2007) em Periodontia (DOUGHERTY, 2002) e Endodontia (GARCEZ, et al 2007; GARCEZ, et al., 2008). Portanto, isso justifica a realização desta pesquisa, oferecendo assim resultados mais consistentes para aplicabilidade clínica da técnica, minimizando o risco potencial para os pacientes.

5.2. Metodologia

O rato (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) foi o animal escolhido por ser acessível, de fácil manuseio e sua manutenção mais barata quando comparada com cães. A utilização de ratos em experimentos de análise do processo de reparo alveolar oferece algumas vantagens, como a facilidade de obtenção dos animais, o que permite, também, um melhor controle genético, padronização do experimento, facilidade de repetições e amostras com grande número de animais com padronização da alimentação (MARTINS-ORTIZ, 2004).

Todos os animais utilizados nesta pesquisa foram provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB-USP), onde lá foram mantidos em boas condições de alimentação, temperatura, luminosidade, ar e ruído. Além disso, os animais foram pesados antes da exodontia, peso médio 266,1 g, e no dia do sacrifício, peso médio 306,6 g, demonstrando aumento do valor médio de peso dos animais. Realizamos também essa mesma análise por animal, e o resultado demonstrou que não houve animal com diminuição do peso, antes da exodontia e no dia do sacrifício. Acreditamos que isso se deva as boas condições oferecidas aos animais.

O modelo experimental utilizando estes animais, apesar do tamanho reduzido, possibilita condições adequadas para a exodontia e tratamento alveolar em razão da facilidade de obtenção e de controle pós-operatório e da relativa facilidade de execução da técnica cirúrgica descrita por OKAMOTO e RUSSO (1973). A anestesia realizada nessa pesquisa foi intramuscular, pois acredita-se ser esta adequada para um maior tempo de procedimento (ANAN, et al., 1991).

A utilização do campo cirúrgico descartável, em nosso caso confeccionado de TNT, foi adotada como medida de prevenção para evitar a contaminação imediata do alvéolo durante e imediatamente após a exodontia, visto que os animais enquanto estavam passando pelo procedimento cirúrgico e sob efeito da anestesia geral faziam micção. Em nossa pesquisa não observamos a contaminação dos alvéolos que evoluíssem para alveolite, acreditamos que essa conduta adotada tenha contribuído para isso.

A idade do animal, 60 dias, foi escolhida, pois os animais nessa idade correspondem a um adulto jovem (PORTER, 1967) e por ser usado na maioria dos

estudos, facilitando possíveis comparações (RODRIGUES, 2007; CARDOSO, 2009). Em trabalho prévio realizado por nossa equipe, podemos observar maior dificuldade na realização da exodontia em ratos Wistar e, conseqüentemente, maior índice de fratura radicular quando comparamos animais de 60 dias de idade com animais de 90 dias. Isso pode ser explicado pelo crescimento e desenvolvimento do animal, causando maior resistência em virtude da acentuada curvatura do incisivo superior do animal. Em nossa pesquisa, optamos por uma cirurgia com experiência em exodontia desse dente, acreditamos que os resultados poderiam ser diferentes caso isso não fosse possível em virtude do trauma local durante o procedimento cirúrgico e, conseqüentemente, aumentando a resposta inflamatória e podendo atrasar o processo de reparo alveolar.

A seleção apenas por animais machos foi importante para evitar a influência das variações hormonais sobre o processo de reparo alveolar (RODRIGUES, 2007; CARDOSO, 2009).

Desde a primeira descrição do processo de reparo alveolar por Euler (1923), vários estudos experimentais têm sido realizados, buscando definir cronologicamente as reações teciduais deste processo em animais de laboratório, sendo o rato um dos mais pesquisados pelas razões descritas anteriormente (GUGLIELMOTTI; CABRINI, 1985; JOHANSEN, 1970; OKAMOTO; RUSSO, 1973; RODRIGUES, 2007; CARDOSO, 2009). Além disso, apesar de haver variação cronológica do processo de reparo alveolar entre homem e animais, sabe-se que os eventos são muitos semelhantes, (AMLER, 1969; HUEBSCH et al., 1952; SIMPSON, 1969).

A cronologia de reparo alveolar no rato está bem estabelecida na literatura, sobretudo microscopicamente (AMLER et al., 1960; OKAMOTO; RUSSO, 1973; SMITH, 1974; ISAKA et al., 2001; AMLER et al., 1960; CLAFIN, 1936; GUGLIELMONTTI; CABRINI, 1985; SIMPSON, 1969; RODRIGUES, 2007; CARDOSO, 2009), porém resultados moleculares são escassos (CARDOSO, 2009).

Os períodos de análises do processo de reparo alveolar foram selecionados baseados em trabalhos prévios realizados no Departamento de Estomatologia da FOB-USP (RODRIGUES, 2007; CARDOSO, 2009).

A caracterização dos grupos experimentais, ou seja, o desenho do experimento foi dividido em quatro grupos.

O Grupo C representou nosso controle. Em todos animais após a exodontia

foi provocada isquemia alveolar com Adrenalina 1:1000 por meio de um cone de papel absorvente. Esse procedimento foi adotado em todos os grupos para padronização do experimento. Isso porque, como nosso objetivo principal foi analisar o efeito da TFD antimicrobiana sobre o processo de reparo alveolar, o uso do ATO sem causar a isquemia seria inviável. Matevski (2003) demonstrou em seu estudo que a TFD tem seu efeito afetado negativamente pela presença de sangue, pois pode refletir ou absorver a luz atuando como uma barreira protetora às bactérias impedindo tanto a ação do Laser quanto do fotossensibilizador. Por outro lado, quando a isquemia é provocada em excesso pode interferir negativamente no processo de reparo alveolar como descrito por Birn (1973). Desta forma, para evitar complicações durante o processo de reparo que contra-indicariam o uso imediato da TFD, três decisões foram tomadas: 1) A escolha do vasoconstritor, a adrenalina foi escolhida por ser o menos tóxico (PETERSON, 2000); 2) Forma de aplicação do vasoconstritor: uso o do papel absorvente embebido em adrenalina foi importante para controle da hemostasia, comprovado clinicamente, tanto farmacologicamente, pela ação da adrenalina, como fisicamente, funcionando como uma barreira física propriamente dita dificultando a formação do coágulo sanguíneo e 3) Cuidados com alvéolo: após a isquemia, o alvéolo foi irrigado com soro fisiológico para diluição do vaso constritor, e estimulado o sangramento, com auxílio de uma cureta, e a formação do coágulo sanguíneo, por meio da compressão digital com gaze. É importante ressaltar o cuidado que se teve ao irrigar o alvéolo, para esse procedimento colocou-se uma gaze seca na boca do animal para se evitar a aspiração da solução. Portanto, o que fizemos nesta fase foi seguir os princípios básicos de cirurgia (PETERSON, 2000). Assim, acreditamos que esses procedimentos somado ao controle de biossegurança contribuíram para redução de infiltrado inflamatório durante o processo de reparo em nossa pesquisa. Portanto, o Grupo C foi formado para servir de comparação com os demais grupos descartando os efeitos inerentes ao vaso constritor utilizado para o controle da hemostasia.

O Grupo S+L foi formado com objetivo de avaliar isoladamente o efeito do Laser sobre o processo de reparo alveolar. No entanto, foi necessário o preenchimento do alvéolo com soro fisiológico, pois o efeito térmico é diferente se o alvéolo estivesse seco. Após a isquemia, o alvéolo foi preenchido com soro fisiológico e aguardado o tempo de 10 minutos para aplicação do Laser. A padronização desse tempo foi em virtude do tempo para absorção do ATO para o

Grupo ATO+L (KÖMERICK, et. al. 2002). O Laser usado na pesquisa foi o Twin Laser® (MMOptics, São Carlos, SP, Brasil), de baixa intensidade no espectro visível ($\lambda = 660$ nm) e previamente calibrado pelo fabricante. Como objetivamos avaliar o efeito isoladamente do efeito do Laser, aguardar este tempo para Grupo S+L foi fundamental.

O Grupo ATO foi formado com objetivo de avaliar isoladamente o efeito do ATO (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) sobre o processo de reparo alveolar, já que este constitui uma das etapas da TFD. Após a isquemia, o alvéolo foi preenchido com o ATO na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ (KÖMERICK, 2003) e aguardado o tempo de 10 minutos (KÖMERICK, et. al. 2002). A padronização desse tempo foi em virtude do tempo para absorção do ATO.

Já o Grupo ATO+L constitui propriamente dito a TFD. Após a isquemia, o alvéolo foi preenchido com o ATO na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ (KÖMERICK, 2003) e aguardado o tempo de 10 minutos (KÖMERICK, et. al. 2002). A padronização desse tempo foi também em virtude do tempo para absorção do ATO.

Assim, com a formação dos grupos S+L e ATO, foi possível avaliar o efeito individual do Laser e do ATO e compará-los com o efeito da associação (Grupo ATO+L) sobre o processo de reparo alveolar.

O agente fotossensibilizador, o ATO (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) utilizado nos grupos ATO e ATO+L, foi escolhido em virtude dos inúmeros trabalhos demonstrando sua comprovada ação antimicrobiana, baixa toxicidade e disponibilidade (USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2001; SOUZA et al., 2006; WAINWRIGHT et al., 2003). O preparo da solução, bem como sua concentração final, foi baseado em trabalhos prévios, como o de Kömerick (2003). A aplicação do ATO por meio de seringa descartável permitiu controle adequado da quantidade de solução, até o completo preenchimento do alvéolo. Esse procedimento somado ao controle da hemostasia permitiu que a solução entrasse em contato com toda a superfície do alvéolo. O tempo aguardado para absorção do ATO está de acordo com Kömerick et. al. (2002). Nesse trabalho foi avaliado a biodistribuição histológica do ATO, e os autores não encontraram alterações teciduais utilizando 200 $\mu\text{g/mL}$ de ATO e tempo de absorção de 10 minutos. O comprimento de onda de absorção do ATO utilizado encontra-se na região de espectro vermelho visível ($\lambda = 626$ nm), permitindo seu uso em TFD antimicrobiana associado ao Laser de baixa intensidade.

O Laser utilizado nos grupos S+L e ATO+L foi o Laser[®] (MMOptics, São Carlos, SP, Brasil), cujo comprimento de onda (660 nm) encontra-se dentro do espectro vermelho visível, e foi previamente calibrado pelo fabricante. Esse procedimento, pelo fabricante, foi importante para nos assegurar a real fluência utilizada na pesquisa. A escolha por essa fonte de luz e marca ocorreu em virtude do comprimento de onda de absorção do ATO ($\lambda = 626 \text{ nm}$), comprovação científica do uso do Laser de GaAlAs em TFD antimicrobiana (SHIBLI, et al., 2003; CHAN; LAI, 2003) e disponibilidade do aparelho na Disciplina de Odontopediatria da FOB-USP. A fluência ou densidade de energia foi calculada, após medir a área radicular do incisivo superior de rato *Wistar* extraído proveniente de outra pesquisa, utilizando-se a fórmula previamente descrita $DE = P \times T / A$. Os parâmetros adotados para aplicação do Laser, pontual de contatos e caneta posicionada a 90° sobre o alvéolo, para administrar uniformemente a densidade de energia e evitar a dispersão de energia enviada para o tecido, estão de acordo com os parâmetros adotados por Low; Reed, (2001). Além disso, a proteção da ponta da caneta dos emissores do Laser filme de PVC foi outra conduta de biossegurança adotado. (CORAZZA, 2005).

O mapeamento térmico foi o teste inicial e realizado no CePOF (Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica) da USP - São Carlos, cujo objetivo foi analisar a variação da temperatura no interior do alvéolo, por meio de um termistor, durante a irradiação a Laser, tanto para o Grupo S+L como para o Grupo AOT+L. Assim, realizamos o mapeamento térmico reproduzindo exatamente os parâmetros adotados para esses grupos que seriam utilizados na pesquisa. Desta forma, não havendo variação térmica significativa ($> 10 \text{ }^{\circ}\text{C}$) (FONTANA, et al., 2004) poderíamos desconsiderar o efeito térmico do Laser sobre o local irradiado (FERREIRA, 2003). Portanto, os resultados encontrados seriam inerentes ao procedimento técnico de exodontia e posterior tratamento dos alvéolos

Para a análise radiográfica, foi fundamental a realização do teste piloto para estabelecer o tempo de exposição (0,05 s) e o simulador de tecido mole (cera utilidade) mais adequado para o experimento em virtude de ser o primeiro trabalho utilizando imagem digital direta por meio do sistema Visualix®, Dentsply/Gendex, além das análises por pixel e fractal, todos em processo de reparo alveolar de rato. Tanto no teste piloto como em outros trabalhos realizados por nossa equipe, nossos resultados mostraram que em imagem digital não podemos trabalhar com o mesmo

tempo de exposição e/ou simulador de tecido mole para todos os objetos, principalmente quando o objetivo de obtenção da imagem digital é para pesquisa por meio das análises por pixel e/ou fractal. Isso porque quando a imagem digital é formada, e não segue os padrões adequados de tempo de exposição e/ou simulador de acordo com o tipo de sistema digital usado, ocorre à formação de pontos pretos na imagem, adicionando muito ruído a imagem, e durante o processo de análise dessas regiões são interpretadas quando da análise do processo de reparo ósseo pelo programa, em nosso caso o ImageJ® (NIH/USA), como ausência de osso, o que nem sempre é verdade. Portanto, acreditamos que em pesquisa que utilizam os sistemas digitais o ideal seria que para cada tipo de objeto foi realizado um teste piloto para determinar os parâmetros citados.

Nessa pesquisa, utilizamos uma placa de 5 mm de cera utilidade como simulador de tecido mole para mimetizar a condição natural do animal e padronizar a quantidade de tecido mole existente na peça. Diferentes materiais tem sido utilizados como simulador de tecido mole, sendo que o material escolhido está de acordo com outros autores (CASATI; TAVANO; FREITAS, 1969, COOK; CUNNINGHAM, 1995) Inicialmente, assim como realizado por Teixeira (2007) foram realizadas radiografias com e sem a simulação de tecido mole, comprovando a alteração dos valores de pixel existente entre ambas. Se o tecido mole do animal tivesse sido preservado, talvez uma maior ou menor quantidade do mesmo levasse a uma variação dos valores de pixels, pois a presença do tecido mole tende a diminuir a quantidade de radiação que chega ao sensor. Logo, se as quantidades de tecidos moles fossem diferentes entre uma mandíbula e outra, variações adicionais dos valores de pixels poderiam ocorrer.

Segundo Pietrobelli et al. (1996), um fenômeno de atenuação ocorre quando o sinal de fótons atravessa um elemento, componente químico ou solução e, então, é diminuído de intensidade espontaneamente através de interações anatômicas que ocorrem, levando à absorção e dissipação de tais fótons. Desta forma, temos que, quando um feixe de raios X incide sobre a maxila, a presença de tecidos moles nessa trajetória influencia o resultado dos valores de pixel.

Foi ainda utilizado, em todas as imagens radiográficas, um penetrômetro de alumínio, que pode ser utilizado para corrigir discrepâncias entre as imagens (JETT, et. al., 2004), em nossa pesquisa ele foi utilizado para padronização do tamanho de

todas as imagens durante o processo de abertura pelo programa ImageJ® (NIH/USA).

O uso do histograma no programa ImageJ® (NIH/USA), para escolha do tempo exposição e simulador de tecido mole, permitiu selecionar a imagem com menor variação do valor de pixel, ou seja, menor desvio-padrão.

Com os avanços da radiologia digital, o uso de ferramentas de análise dos sistemas digitais vem aprimorando a detecção de alterações ósseas, mesmo que estas sejam bastante sutis. E foi por essa razão que escolhemos realizar a análise do valor de pixels, por meio destes foi possível fazer uma análise quantitativa da imagem radiográfica digital (SARMENTO; RUBIRA, 1998; ATTAELMANAN; BORG; GRONDAHL, 2000).

O programa ImageJ® foi escolhido por ser um programa aberto e constantemente atualizado de fonte confiável (NIH/USA), podendo ser baixado gratuitamente da internet, além da facilidade no manuseio de suas ferramentas.

A análise morfométrica realizada nesta pesquisa está de acordo com outros autores (RODRIGUES, 2007; CARDOSO, 2009), mas com algumas modificações. Das variáveis estudadas em nossa pesquisa à única não analisada por Rodrigues (2007) foi o vaso sanguíneo. Já para Cardoso (2009), o espaço vazio.

Por fim, a realização da análise por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real está de acordo com Cardoso (2009), seguindo o mesmo protocolo de extração de RNA, análises da quantidade e qualidade de RNA total, transcrição reversa, primers e reações. Esse trabalho foi o primeiro a descrever a cinética de expressão de VEGF, colágeno tipo I, RUNX2, osteocalcina e fosfatase alcalina em processo de reparo alveolar.

5.3 Dos Resultados

O propósito deste estudo foi analisar o processo de reparo alveolar após a TFD antimicrobiana. Com os adventos da radiografia digital (sistema Visualix) e da biologia molecular (PCR Real Time) foi possível um estudo do processo de reparo alveolar após a TFD antimicrobiana em ratos, além do tradicional estudo morfométrico já muito bem estabelecido na literatura. Na PCR Real Time, sendo um recurso prático e rápido, o interesse em validar esse tipo de análise no estudo de

reparo alveolar é grande, em relação ao grande tempo de processamento histotécnico e análise morfométrica, necessário para a análise microscópica. Na microscopia observamos do que está ocorrendo nos tecidos no momento exato da análise, sendo possível quantificar e qualificar as estruturas. O mesmo ocorre na análise radiográfica, porém apenas quantificamos o tecido ósseo. Já a análise molecular nos permite quantificar a expressão de genes diretamente envolvidos no controle da formação, manutenção e/ou remodelação das estruturas observadas microscopicamente; portanto é possível que haja uma correlação entre as expressões desses genes e a presença dessas estruturas. Sendo assim, foram selecionados alguns fatores que atuam no metabolismo ósseo e reparo alveolar, como: osteocalcina, fosfatase alcalina, RUNX2, colágeno tipo I, VEGF, no intuito de correlacioná-los com as estruturas observadas microscopicamente: tecido ósseo, tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e coágulo sanguíneo. Além, do tecido ósseo para análises por pixel e fractal.

Em virtude da ausência de artigos que avaliaram o processo de reparo alveolar após a TFD, nossos resultados serão confrontados com o grupo controle de trabalhos que utilizaram a mesma metodologia, porém com outras finalidades.

5.3.1 Tecido ósseo, análise do valor de pixel, fractal, e expressão de marcadores moleculares do metabolismo ósseo

De acordo com o que se conhece do tecido ósseo no processo de reparo alveolar em condições normais (CARVALHO; BOMBONATO; BRENTGANI, 1997; ISAKA *et al.*, 2001; RODRIGUES, 2007; CARDOSO, 2009) podemos observar que, microscopicamente, o Grupo C (controle) apresentou o aumento gradativo esperado em todos os períodos, culminando numa maior densidade de tecido ósseo aos 28 dias. Nossos achados estão de acordo com trabalhos de Rodrigues (2007) e Cardoso (2009).

Resultado semelhante desse aumento da densidade de tecido ósseo neoformado, ao longo do tempo, foi observado também nos grupos ATO e ATO+L. A exceção ocorreu no Grupo S+L onde a maior média de densidade de tecido ósseo ocorreu no período 15 dias (**Figura 4.11**).

Quando o objetivo foi avaliar a densidade do tecido ósseo por meio de radiografias, o valor de pixel foi utilizado e pode-se observar que também houve uma tendência ao aumento do valor de pixel, com a evolução do processo de reparo. Isto ocorreu de uma forma geral em todos os grupos, com exceção do Grupo C, que teve um decréscimo no período 15 dias, seguido de um aumento aos 28 dias, cujo valor final apresentou valores semelhantes aos outros grupos e condizentes com período final do processo de reparo avaliado (**Figura 4.2**).

Já quando o objetivo foi avaliar a estrutura do trabeculado ósseo final por meio de radiografia, a dimensão fractal foi utilizada e pode-se observar que também houve uma tendência ao aumento da dimensão fractal, com a evolução do processo de reparo, com exceção dos grupos ATO e ATO+L, que para ambos teve um decréscimo no período 15 dias, seguido de um aumento aos 28 dias, cujo valor final apresentou valores semelhantes aos outros grupos e condizentes com período final do processo de reparo avaliado (**Figura 4.4**).

O RUNX2 é um fator de transcrição responsável pelo estímulo da diferenciação de células precursoras em osteoblastos e consequentemente formação de tecido ósseo, e que pode ser utilizado como marcador da diferenciação e atividade de osteoblastos (DATTA, *et al.*, 2009). Este marcador foi utilizado com intuito de quantificar a expressão desse gene no processo de reparo alveolar. A

análise de expressão de RUNX2 não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos (**Figura 4.24**), assim como na cinética de expressão entre os períodos analisados. No entanto, podemos observar uma tendência a um aumento da expressão deste gene do período de 6 para 15 dias como era esperado (CARDOSO 2009), ou seja, a medida que a expressão de RUNX2 vai aumentando, ocorre também um aumento de tecido ósseo verificado microscopicamente. Normalmente, ocorre um decréscimo do RUNX2 após o pico máximo de estímulo, observado no trabalho de Cardoso (2009) aos 15 dias. Neste trabalho, não foi encontrado este decréscimo e especula-se que essa diferença entre os trabalhos ocorreu devido à grande variabilidade do período 28 dias neste estudo, que pode ser observado pelo alto desvio-padrão (**Figura 4.25**).

A osteocalcina, uma das proteínas não colagenosas caracteristicamente produzidas pelos osteoblastos, também é um marcador molecular de tecido ósseo que expressa a formação óssea (CHENU, 1994; VIEIRA, 1999; GUNDBERG, 2000). Este marcador foi utilizado para auxiliar o entendimento das reações que ocorreram durante o processo de formação óssea. A análise de expressão de osteocalcina não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos (**Figura 4.26**), assim como na cinética de expressão entre os períodos analisados. Apesar de não ter ocorrido diferença significativa cabe observar que a cinética de expressão de osteocalcina foi semelhante ao ocorrido para o RUNX2, com um aumento do período 6 para os 15 dias (CARDOSO, 2009), com exceção do Grupo ATO+L. Como era esperado de acordo com Cardoso (2009), foi observado a diminuição da expressão de osteocalcina após os 15 dias para os Grupos C, S+L e ATO+L (**Figura 4.27**).

A fosfatase alcalina é outro marcador molecular da formação óssea e está relacionada à mineralização óssea (VIEIRA, 1999). Assim como para os outros dois marcadores também não ocorreu diferença estatisticamente significativa entre os grupos (**Figura 4.28**) e a cinética de expressão entre os períodos (**Figura 4.29**). Porém, foi interessante observar que a cinética de expressão da fosfatase alcalina para o Grupo C foi semelhante à cinética esperada para o processo de reparo, apresentando um aumento até os 15 dias e a seguir um decréscimo, como era esperado por atuar principalmente nos estágios iniciais da diferenciação de osteoblastos. Os outros grupos apresentaram uma cinética diferente, com o pico máximo de expressão aos 6 dias (**Figura 4.29**).

O colágeno tipo I, assim como a fosfatase alcalina, também é um marcador de formação do tecido, atuando nos estágios iniciais de diferenciação e atividade osteoblástica. Assim como para a fosfatase alcalina também não ocorreu diferença estatisticamente significativa entre os grupos (**Figura 4.20**) e a cinética de expressão entre os períodos (**Figura 4.21**). Apesar de não ter ocorrido diferença significativa cabe ressaltar que na cinética de expressão de colágeno tipo I houve um aumento na expressão desse marcador do período 6 para os 15 dias, com exceção do Grupo ATO+L. A seguir houve um decréscimo para os Grupos ATO e ATO+L, como era esperado (CARDOSO, 2009), assim como ocorreu para a expressão de fosfatase alcalina, por atuar principalmente nos estágios iniciais da diferenciação de osteoblastos (**Figura 4.21**).

Portanto, após a análise radiográfica, morfométrica e da expressão dos marcadores bioquímicos do tecido ósseo, acredita-se que os diferentes tratamentos empregados neste estudo não interferiram negativamente na formação óssea. Sendo assim, tomou-se a iniciativa de realizar as correlações dos marcadores bioquímicos e das características radiográficas com a formação do tecido ósseo na tentativa de evidenciar possíveis correlações.

A comparação da densidade de tecido ósseo com os valores de pixel foi realizada visando identificar uma possível correlação entre a variável microscópica com o tipo de análise radiográfica. Como era esperado, os resultados desta pesquisa mostraram essa correlação positiva ($r= 0,629$ / $p= 0,000$) (**Figura 4.30**). Teixeira (2007) encontrou essa correspondência entre o aumento da densidade do tecido ósseo e os valores de pixel, pois sabe-se que quanto maior a quantidade de tecido ósseo presente, maior o valor de pixel.

Já a comparação da densidade de tecido ósseo com a dimensão fractal foi realizada buscando avaliar uma possível correlação entre a variável microscópica com esse tipo de análise radiográfica, já que alguns estudos revelam a possibilidade de se usar a análise fractal para a caracterização do padrão do trabeculado ósseo (HILDEBOLT, et al., 1992; KORSTJENS, et al., 1995; SHROUT, et al., 2000; JETT, et al., 2004;). Nossos resultados demonstraram que a correlação não foi estatisticamente significativa (**Figura 4.31**), acredita-se que isso tenha ocorrido em virtude da morfologia óssea do animal estudo apresentada radiograficamente, sobreposição de estruturas, e microscopicamente, por meio dos cortes obtidos.

Comparando a densidade de tecido ósseo com marcadores moleculares do metabolismo ósseo, foi obtida uma correlação negativa ($r = -0,631$ / $p = 0,028$) entre a formação de tecido ósseo e a fosfatase alcalina (**Figura 4.35**), corroborando com as expectativas iniciais de ser um marcador bioquímico de formação no metabolismo ósseo atuante nos estágios iniciais de diferenciação osteoblástica. Já para os demais marcadores analisados, apesar de estarem presentes durante o processo de reparo, não houve correlação com a densidade de tecido ósseo.

5.3.2 Tecido Conjuntivo e a expressão de colágeno tipo I

Contrariamente ao que ocorreu microscopicamente com o tecido ósseo, podemos observar que o tecido conjuntivo, no Grupo C (controle), apresentou um decréscimo gradativo esperado em todos os períodos, culminando numa menor densidade de tecido conjuntivo aos 28 dias (**Figura 4.8**). Assim, observa-se que à medida que aumenta a densidade de tecido ósseo diminui a de tecido conjuntivo. Esses resultados estão de acordo com trabalhos de Rodrigues (2007) e Cardoso (2009).

Resultado semelhante desse decréscimo de densidade de tecido conjuntivo, ao longo do tempo, foi observado também nos grupos ATO e ATO+L. A exceção ocorreu no Grupo S+L onde a menor média de densidade de tecido conjuntivo ocorreu no período 15 dias (**Figura 4.9**). Assim, especula-se que tenha ocorrido nesse grupo uma evolução mais rápida no processo de reparo alveolar do período 6 para 15 dias demonstrado pelo menor valor da média de tecido conjuntivo aos 15 dias, e por outro lado, maior valor da média de tecido conjuntivo.

A expressão de colágeno tipo I, foi utilizado com intuito de quantificar a expressão desse gene no processo de reparo alveolar, pois além de ser usado como marcador bioquímico do metabolismo ósseo em fase inicial, é também fundamental na constituição da matriz extracelular do processo de reparo do tecido conjuntivo onde predomina a formação de colágeno (COTRAN, 1996). Assim, a análise de expressão de Colágeno tipo I não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos (**Figura 4.20**) e cinética de expressão entre os períodos (**Figura 4.21**). Apesar de não ter ocorrido diferença significativa

cabe ressaltar que na cinética de expressão de colágeno tipo I houve uma tendência ao aumento na expressão desse marcador do período 6 para os 15 dias, com exceção do Grupo ATO+L. A seguir houve uma tendência ao decréscimo para os Grupos ATO e ATO+L, como era esperado (CARDOSO, 2009) (**Figura 4.21**).

A densidade de tecido conjuntivo com a expressão de colágeno tipo I foi realizada buscando avaliar uma possível correlação entre a variável microscópica com esse tipo de marcador. Nossos resultados demonstraram que a correlação não foi estatisticamente significativa (**Figura 4.36**), corroborando com os resultados de Cardoso (2009). Acreditamos que isso tenha ocorrido, pois esse marcador não é específico para o tecido conjuntivo, pois é também um marcador bioquímico de formação no metabolismo ósseo atuante nos estágios iniciais de diferenciação osteoblástica.

Dessa forma, a ausência de correlação entre a expressão de colágeno tipo I e as variáveis morfométricas do tecido conjuntivo e tecido ósseo, provavelmente, se deva à presença de colágeno em ambos os tecidos, que apresentam um comportamento distinto ao longo do processo de reparo. Isso sugere que a análise dos níveis de RNAm para colágeno tipo I não é um bom marcador para análise do reparo alveolar, assim como encontrado por Cardoso (2009).

5.3.3 Vaso Sanguíneo e a expressão de VEGF

Analizando microscopicamente a densidade de vaso sanguíneo, podemos observar que o Grupo C (controle), apresentou um aumento gradativo esperado em todos os períodos, corroborando com os resultados de Cardoso (2009), culminando numa maior densidade de vaso sanguíneo aos 28 dias, apesar da maior variabilidade nesse período observado pelo desvio-padrão (**Figura 4.14**).

Resultado semelhante desse aumento da densidade de vaso sanguíneo, ao longo do tempo, foi observado também no grupo ATO. As exceções ocorreram no Grupo S+L, onde houve uma tendência ao decréscimo do período 6 para 15 dias e em seguida uma tendência ao aumento para o período 28 dias, e no Grupo ATO+L, onde houve uma tendência ao aumento do período 6 para 15 dias e em seguida uma tendência ao decréscimo para o período 28 dias (**Figura 4.15**).

O VEGF pode ser produzido por macrófagos, linfócitos T, ou mesmo por células residentes do tecido conjuntivo, e sua produção pode ser aumentada em condições de hipóxia, em lesões teciduais e durante o processo de reparo dessas lesões (CARDOSO, 2009). Assim, por essas razões, esse marcador foi utilizado com intuito de quantificar a expressão desse gene no processo de reparo alveolar.

A análise da expressão de VEGF não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos (**Figura 4.22**), porém para a cinética de expressão do VEGF entre os períodos analisados houve diferença estatisticamente significativa para o Grupo ATO+L quando comparado o período 6 dias com 15 ou 28 dias (**Figura 4.23**). Podemos observar de uma forma geral que houve uma tendência ao decréscimo da expressão deste gene do período de 6 para 28 dias, apesar da maior variabilidade no período 6 dias do Grupo C. Esses resultados não estão de acordo com os resultados de Cardoso (2009), onde foi encontrada a menor média de expressão aos 15 dias (**Figura 4.23**).

A densidade de vaso sanguíneo com a expressão de VEGF foi realizada buscando avaliar uma possível correlação entre a variável microscópica com esse tipo de marcador. Nossos resultados demonstraram que houve correlação negativa ($r = -0,664 / p = 0,018$), ou seja, a media que houve o aumento da densidade de vaso sanguíneo houve o decréscimo da expressão de VEGF (**Figura 4.37**). Resultados diferentes foram encontrados por Cardoso (2009). Sabe-se que VEGF está presente quando existe proliferação vascular e que nos estágios iniciais vasculares da inflamação está em maior quantidade (CULLINAN-BOVE; KOOS, 1993; COTRAN, 1996; BROWN, 1997; FERRARA, 2000), corroborando com nossos achados.

5.3.4 Coágulo sanguíneo e a expressão de VEGF

O coágulo sanguíneo se forma nos estágios iniciais do reparo. É um tecido transitório essencial que serve de matriz para a substituição de um novo tecido. Analisando microscopicamente a densidade de coágulo sanguíneo, podemos observar que o Grupo C (controle), apresentou um decréscimo gradativo esperado em todos os períodos, corroborando com os resultados de Rodrigues (2007) e Cardoso (2009), culminando numa menor densidade de coágulo sanguíneo aos 28

dias, apesar da maior variabilidade nesse período observado pelo desvio-padrão (**Figura 4.12**).

Resultado semelhante desse decréscimo da densidade de coágulo sanguíneo, ao longo do tempo, foi observado nos grupos S+L e ATO+L. A exceção ocorreu no Grupo ATO, onde houve uma tendência ao decréscimo do período 6 para 15 dias e em seguida um pequeno aumento para o período 28 dias, porém mantendo uma densidade nesse período semelhante aos demais grupos (**Figura 4.13**). O decréscimo foi estatisticamente significativo para os grupos S+L, ATO e ATO+L somente quando comparado o período 6 dias com 15 ou 28 dias. Não houve diferença significativa na comparação entre os grupos (**Figura 4.12**).

A densidade de coágulo sanguíneo com a expressão de VEGF foi realizada buscando avaliar uma possível correlação entre a variável microscópica com esse tipo de marcador. Nossos resultados demonstraram que houve correlação positiva ($r = 0,867$ / $p = 0,000$), ou seja, a media que houve o decréscimo da densidade de coágulo sanguíneo ao longo do período do processo de reparo alveolar houve também o decréscimo da expressão de VEGF (**Figura 4.38**). Resultados diferentes foram encontrados por Cardoso (2009), onde não foi encontrado correlação. Essa diferença ocorreu porque apesar de ambos os trabalhos terem ocorrido um decréscimo semelhante da densidade de coágulo sanguíneo a cinética de expressão de VEGF foi diferente. Nossos resultados corroboram com outros autores (CULLINAN-BOVE; KOOS, 1993; COTRAN, 1996; BROWN, 1997; FERRARA, 2000), pois sabe-se que o VEGF está presente quando existe proliferação vascular e que nos estágios iniciais vasculares da inflamação está em maior quantidade, e isso ocorre a medida que diminui a densidade de coágulo sanguíneo.

5.3.5 Infiltrado inflamatório

A resposta inflamatória desencadeada pela exodontia, que faz parte das primeiras fases do processo de reparo alveolar (CARDOSO, 2009)

Analisando microscopicamente a densidade de infiltrado inflamatório, podemos observar que o Grupo C (controle), apresentou um decréscimo gradativo esperado em todos os períodos, corroborando com os resultados de Rodrigues

(2007) e Cardoso (2009), culminando numa menor densidade de infiltrado inflamatório aos 28 dias (**Figura 4.16**).

Resultado semelhante desse decréscimo da densidade de infiltrado inflamatório, ao longo do tempo, foi observado no Grupo ATO, apesar da maior variabilidade no período 6 dias. As exceções ocorreram nos grupo S+L e ATO+L, onde houve uma tendência ao decréscimo do período 6 para 15 dias e em seguida um pequeno aumento para o período 28 dias, porém mantendo uma densidade nesse período semelhante aos demais grupos. Não houve diferença significativa na comparação entre os grupos (**Figura 4.17**).

5.3.6 Espaço vazio

Analisando microscopicamente a densidade de espaço vazio, podemos observar que o Grupo C (controle), apresentou um decréscimo gradativo esperado em todos os períodos, corroborando com os resultados de Rodrigues (2007), culminando numa menor densidade de espaço vazio aos 28 dias (**Figura 4.18**).

Resultado semelhante desse decréscimo da densidade de espaço vazio, ao longo do tempo, foi observado nos grupos S+L e ATO+L, apesar da maior variabilidade nesse grupo nos períodos 6 e 15 dias. A exceção ocorreu no Grupo S+L, onde houve uma tendência ao decréscimo do período 6 para 15 dias e em seguida não se alterou para o período 28 dias, porém mantendo uma densidade nesse período semelhante aos demais grupos (**Figura 4.19**). Não houve diferença significativa na comparação entre os grupos (**Figura 4.29**).

5.4 Sugestões para trabalhos futuros

- ✓ Realizar a mesma metodologia empregada neste estudo, porém substituindo a fonte de luz para o LED, por sua característica de luz não colimada e menor custo, quando comparado ao Laser;
- ✓ Realizar a TFD antimicrobiana em processo de reparo alveolar em molares de ratos, por exemplo, seguindo o protocolo de exodontia preconizado por

Zecchin et al. (2007);

- ✓ Realizar a TFD antimicrobiana em processo de reparo alveolar após indução de lesão periapical e exodontia em molares de ratos, por exemplo, seguindo o protocolo de indução de lesão periapical preconizado por Anan et al. (1991). Acreditamos que a resposta da TFD antimicrobiana possa ser superior frente ao estresse tecidual provocado pela lesão periapical quando comparado sem lesão. A análise molecular poderá ser usada neste caso para avaliar tanto a evolução do processo de reparo alveolar quanto o efeito antimicrobiano, quantificando por meio da PCR Real Time bactérias previamente identificadas.
- ✓ Testar outros protocolos de processamento de imagens digitais que possam ser aplicáveis em processo de reparo alveolar.

6 Conclusões

6. CONCLUSÃO

Com base na metodologia empregada neste estudo e nos resultados obtidos por meio das análises microscópica, radiográfica e molecular, podemos concluir que:

- ✓ A TFD não atuou negativamente na evolução do processo de reparo alveolar em ratos;
- ✓ Análise radiográfica por meio dos valores de pixel pode ser usada como indicador para avaliar a neoformação óssea em processo de reparo alveolar, em ratos, nos períodos estudados;
- ✓ Análise molecular da expressão de VEGF pode ser usada como marcador para a angiogênese em processo de reparo alveolar, em ratos, nos períodos estudados;
- ✓ Análise molecular da expressão de fosfatase alcalina pode ser usada como marcador nos estágios iniciais do metabolismo ósseo em processo de reparo alveolar, em ratos, nos períodos estudados.

Referências

REFERÊNCIAS

Amler MH. The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1969;27(3):309-18.

Amler MH, Johnson PL, Salman I. Histological and histochemical investigation of human alveolar socket healing in undisturbed extraction wounds. J Am Dent. Assoc. 1960;61(1):32-44.

Anan H, Akamine A, Hara Y, Maeda K, Hashiguchi I, Aono M. A histochemical study of bone remodeling during experimental apical periodontitis in rats. J Endod 1991;17(7):332-7.

Attaelmanan A, Borg E, Grondahl HG. Digitisation and display of intra-oral films. Dentomaxillofac Radiol 2000;29(2):97-102.

Astrand P, Carlsson GE. Changes in the alveolar process after extractions in the white rat: a histologic and fluorescence microscopic study. Acta Odontol Scand. 1969;27(1):113-27.

Bach G, Neckel C, Mall C, Krekeler, G. Conventional versus laser assisted therapy of periimplantitis: a five-year comparative study. Implant Dent. 2000;9(3):247-51.

Barroso JS, Santos-Pinto R, Okamoto T. Efeitos do 6-propil-2-tiouracil no processo de reparo em feridas de extração dental: estudo histológico em ratos. Rev Fac Odontol Araçatuba. 1972;1(1):71-82.

Baxter GD. Therapeutic lasers: theory and practice. New York: Churchill Livingstone; 1994.

Bhatti M, et al. Effect of dosimetric and physiological factors on the lethal photosensitization of porphyromonas gingivalis in vitro. Photochem Photobiol. 1997;65(6):1026-31.

Birn H. Etiology and pathogenesis of fibrinolytic alveolitis ("dry socket"). Int J Oral Surg. 1973;2:211-63.

Bodner L, et al. Extraction site healing in rats: a radiologic densitometric study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1993;75(3):367-72.

Boyne JP. Osseous repair of the postextraction alveolus in man. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1966;21(6):805-13.

Brown LF, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. EXS. 1997;79:233-69.

Caflin RS. Healing of disturbed and undisturbed extraction wounds. J Am Dent Assoc. 1936;23(6):945-59.

Cardoso CL. Análise morfométrica e molecular da alveolite induzida em ratos com diferentes modalidades de tratamento. [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2009.

Carvalho ACP, Okamoto T. Reparação do alvéolo dental. In: Carvalho ACP, Okamoto T. Cirurgia bucal: fundamentos experimentais aplicados à clínica. São Paulo: Panamericana; 1987. p. 55-80.

Carvalho TLL, Bombonato KF, Brentegani LG. Histometric analysis of rat alveolar wound healing. Braz Dent J. 1997;8(1):9-12.

Casati LA, Tavano O, Freitas JAS. Estudo comparativo entre alguns materiais como substitutos para o tecido mole, no qual concerne à absorção de Raios X e emissão de radiação secundária. Estomatologia & Cultura 1969;3(2):153-66.

Chan Y, Lai CH. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. Lasers Med Sci. 2003;18(1):51-5.

Chenu C, et al. Osteocalcin induces chemotaxis, secretion of matrix proteins and calcium-mediated intracellular signaling in human osteoclast-like cells. *J Cel Biol*. 1994;127:1149-58.

Cobb CM, McCawley TK, Killoy WJ. A preliminary study on the effects of the Nd:YAG laser on root surfaces and subgingival microflora in vivo. *J Periodontol*. 1992;63:701-7.

Cook JE, Cunningham JL. The assessment of fracture healing using dual xray absorptiometry: a feasibility study using phantoms. *Phys Med Biol* 1995;40(1):119-36.

Corazza AV. Fotobiomodulação comparativa entre o Laser e LED de baixa intensidade na angiogênese de feridas cutâneas de ratos. [dissertação]. São Carlos (SP): Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo; 2005.

Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, Scroen FJ. *Patologia Estrutural e Funcional*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996.

Cullinan-bove K, Koos RD. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in the rat uterus: rapid stimulation by estrogen correlates with estrogen-induced increases in uterine capillary permeability and growth. *Endocrinology*. 1993;133(2):829-37.

Datta H K, Ng W F, Walker J A, Tuck S P, Varanasi S S. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol*. 2008;61;577-87.

Deppe H, Horch HH, Henke J, Donath K. Per-implant care of ailing implants with the carbon dioxide laser. *Int J Oral Maxilofac Implants*. 2001;16(5):659-67.

Dobson J, Wilson M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. *Arch Oral Biol*. 1992;37(11):883-87.

Donnelly RF, et al. Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. J Photochem Photobiol B: Biol. 2007;86:59-69.

Dougherty TJ. An update on photodynamic therapy applications. J Clin Laser Med Surg. 2002;20(1):3-7.

Euler H. Heilung von extractions wunden: line tue experimentalle studie. Dtsch Mschr Zahnheilk. 1923;41:687-700.

Farman AG, Farman T. A comparasion of 18 different x-ray detectors currently used in dentistry. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005;99(4):485-89.

Ferrara N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. Recent Prog Horm Res. 2000;55:15-35.

Ferreira J. Análise da necrose em tecidos normais fotossensibilizados pós terapia fotodinâmica: estudo *in vivo*. [dissertação]. Ribeirão Preto (SP): Faculdade de Medicina de Ribeirão, Universidade de São Paulo; 2003.

Flemming A. 1955: Farewell to scientist who discovered penicillin [cited 2006 May]. Disponível em:<http://news.bbc.co.uk/onthisday/hi/dates/stories/march/11/newsid_2538000/2538043.stm>. Acesso em: 12 abr. 2009.

Gad F, et al. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(6):2173-8.

Garcez AS, Ribeiro MS, Tegos GP, Nuñez SC, Jorge AOC, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection, Lasers Surg Med 2007;39:59–66.

Garcez AS, Nuñez SC, Hamblin MR, Ribeiro MS. Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. J Endod. 2008;34(2):138-42.

Garlet GP, et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. Oral Microbiol Immunol. 2006;21(1):12-20.

Gendex. Disponível em: <<http://www.gendex.com/downloads/brochures/digitalimaging/ehdsellsheet.pdf>>. Acesso em: 11 abr. 2009.

Genovese WJ. Laser de baixa intensidade: aplicações terapêuticas em odontologia. São Paulo: Lovise; 2000.

Grondahl HG. Digital radiology in dental diagnosis: a critical view. Dentomaxillofac Radiol. 1992;21(4):198-202.

Guglielmotti MB, Cabrini RL. Alveolar wound healing and ridge remodeling after tooth extraction in the rat: a histologic, radiographic and histometric study. J Oral Maxillofac Surg. 1985;43(5):359-64.

Gundberg CM. Biochemical markers of bone formation. Clin Lab Med. 2000;20(3):489-501.

Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? Photochem Photobiol Sci. 2004;3:436-50.

Hatit BY, Blum R, Severin C, Maquin M, Jabro MH. The effects of a pulsed Nd:YAG laser on subgingival bacterial flora and on cementum: na in vitro study. J Clin Laser Med Surg. 1996;14(3):137-43.

Hildebolt CF, Zerbolio Jr. DJ, Shrout MK, Ritzi S, Gravier MJ. Radiometric Classification of Alveolar Bone Health. J Dent Res. 1992;71(9):1594-97.

Horner K, Shearer AC, Walker A, Wilson NH. Radiovisiography: an initial evaluation. Br Dent J. 1990;168(6):244-8.

Huebsch RF, et al. The healing process following molar extraction: I. normal male rats. J Oral Surg. 1952;5(8):864-76.

Huebsch RF, Hansen LS. A histopathologic study of extraction wounds in dogs. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1969;28(2):187-96.

Isaka J, et al. Participation of periodontal ligament cells with regeneration of alveolar bone. J Periodontol. 2001;72(3):314-23.

Jett S, Shrout MK, Mailhot JM, Potter BJ, Borke JL. An evaluation of the origin of trabecular bone patterns using visual and digital image analysis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004;98(5):598-604.

Johansen JR. Repair of the post-extraction alveolus in the Wistar rat: a histologic and autoradiographic study. Acta Odontol Scand. 1970;28(4):441-61.

Johansen JR Gilhuus-Moe, O. Repair of the post-extraction alveolus in the guinea pig: a histologic and autoradiographic study. Acta Odontol Scand. 1969;27(3):249-62.

Kato T, Kusakari H, Hoshino E. Bactericidal efficacy of carbon dioxide laser against bacteria-contaminated titanium implants and subsequent cellular adhesion to irradiated area. Laser Surg Med. 1998;23(5):299-309.

Khademi JA. Digital images & sound. J Dent Educ. 1996;60(1):41-6.

Kim SY, Kim EJ, Park J-W. Control of singlet oxygen-induced oxidative damage in *Escherichia coli*. J. Biochem Mol Biol. 2002;35(4):353-57.

Kleinfelder JW, Muller RF, Lange DE. Antibiotic susceptibility of putative periodontal pathogens in advanced periodontitis patients. J Clin Periodontol. 1999;26:347-51.

Kömerik N, et al., Fluorescence biodistribution and photosensitizing activity of toluidine blue o on rat buccal mucosa. *Lasers Med Sci.* 2002;17:86-92.

Kömerik N. In vitro killing of *Porphyromonas gingivalis* by Toluidine blue mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrobial Agents Chemotherapy.* 2003;47(3):932-40.

Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res.* 2007;86(8):694-707.

Korstjens CM, Geraets GM, Van Ginkel FC, Prahl-Andersen B, Van Der Stelt PF, Burger EH. Longitudinal Analysis of Radiographic Trabecular Pattern by Image Processing. *Bone.* 1995;17(6):527-32.

Kreisler M, et al., Effect of stimulated CO₂ and GaAlAs laser surface decontamination on temperature changes in Ti-plasma sprayed dental implants. *Lasers Surg Med.* 2002;30(3):233-39.

Lin WL, McCulloch CA, Cho ML. Differentiation of periodontal ligament fibroblasts into osteoblasts during socket healing after tooth extraction in the rat. *Anat Rec.* 1994;240(4):492-506.

Low J, Reed A. Eletroterapia explicada: princípios e prática. São Paulo Manole, p 472.

Maiorana C, Salina S, Santoro F. Treatment of periimplantitis with diode laser: A clinical report. *J Oral Laser Applications.* 2002;2:121-27.

Maisch T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Lasers Med Sci.* 2007;22:83-91.

Malik Z, Ladan H, Nitzan Y. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions. *J Photochem Photobiol B: Biol.* 1992;14:262-66.

Marsh P, Martin MV. Microbiologia oral. 4^a ed. São Paulo: Santos; 2005

Mello JB, Mello GPS. Laser em odontologia. São Paulo: Santos; 2001.

Martins-Ortiz MF. Influência dos bisfosfonatos na movimentação dentária induzida, na frequência e nas dimensões das reabsorções radiculares associadas. [tese]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2004.

Matevski D, et al. Lethal photosensitization of periodontal pathogens by a red-filtered Xenon lamp *in vitro*. J Periodont Res. 2003;38:428-35.

Meier AW, Brown CE, Miles DA, Analoui M. Interpretation of chemically created periapical lesions using direct digital imaging. J Endod. 1996;22(10):516-20.

Mester E, et al. The stimulating effect of low power laser rays on biological systems. Laser Rev. 1968;(1):3.

Molteni R. Direct digital dental x-ray imaging with visualix/VIXA. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1993;76(2):235-43.

Mouyen F, Benz C, Sonnadend E, Lodter JP. Presentation and physical evaluation of RadioVisioGraphy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1989;68(2):238-42.

Nelvig P, Wing K, Welander U. Sens-A-Ray: a new system for direct digital intraoral radiography. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1992;74(6):818-23.

Neugebauer J, Jozsa M, Kübler A. Die antimikrobielle photodynamische therapie zur prävention der alveolären ostitis und des dolor post extractionem. Mund Kiefer GesichtsChir. 2004;(8)350–55.

Noma H. Experimental studies on vascularization of blood vessels and its subsequent changes in the newly grown vessels in post-exodontic wounds. I. Normal simple extraction wounds. Bull Tokyo Dent Coll. 1967;8(1):22-40.

Núñez SC. Estudo da dinâmica de fotodegradação e agregação das fenotiazinas azul de metileno e azul de orto-toluidina com relação à eficiência fotodinâmica. [tese]. São Paulo (SP): Instituto de pesquisas energéticas e nucleares, Universidade de São Paulo; 2007.

Nussbaum E, Lilge L, Mazzulli T. Effects of 630, 660, 810 and 905 nm laser irradiation delivering radiant exposure of 1-50 J/cm² on three species of bacteria *in vitro*. J Clin Laser Med Surg. 2002;20(6):325-33.

Okamoto T, Russo MC. Wound healing following tooth extraction. Histochemical study in rats. Rev Fac Odontol Araçatuba. 1973;2(2):153-64.

Okamoto T, et al. Implante de esponja de fibrina em alvéolos dentais: estudo histomorfológico em ratos. R G O. 1994;42(1):37-43.

Peterson LJ, Ellis E, Hupp JR, Tucker MR. Cirurgia oral e maxilofacial. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

Phoenix DA, Sayed Z, Hussain S, Harris F, Wainwright M. The phototoxicity of phenothiazinium derivatives against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. FEMS Immunol Med Microbiol. 2003; 39:17-22.

Pietrobelli A, Formica C, Wang Z, Heymsfield SB. Dual-energy X-ray absorptiometry body composition model: review of physical concepts. Am J Physiol 1996;271(6):E941-51.

Poi WR. Influência da pasta à base de metronidazol a 10% e lidocaína a 2% sobre o processo de reparo em alvéolo dental infectado: análise histológica e histométrica em ratos. [tese]. Araçatuba (SP): Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista; 1996.

Porter G. The norway rat (*Rattus norvegicus*). In: Lanne-Petter W, et al. The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals. 3rd ed London: Livingstone; c1967. p. 353-90.

Quirynen M, Teughels W, Van Steenberghe D. Microbial shifts after subgingival debridement and formation of bacterial resistance when combined with local or systemic antimicrobials. *Oral Diseases*. 2003;9(Suppl. I):30-7.

Radvar M, et al. Na evaluation of the Nd:YAG laser in periodontal pocket therapy. *Br Dent J*. 1996;180(2):57-62.

Rodrigues, MTV. Estudo histológico e histométrico da influência da pasta à base de metronizadol a 10% e lidocaína a 2% comparada à irrigação com iodeto de sódio a 2% associado ao peróxido de hidrogênio 10 vol. sobre o processo de reparo em alvéolos dentários infectados de ratos. [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2007.

Rooney J, Midda M, Leeming J. A laboratory investigation of the bactericidal effect of a NdYAG laser. *Br Dent J*. 1994;176(2):61-4.

Ryden H, et al. Effect of low levelenergy laser irradiation on gingival inflammation. *Swed Dent J*. 1994;18(2):35-41.

Santos CF, Oliveira EB, Salgado MC, Greene AS. Molecular cloning and sequencing of the cDNA for rat mesenteric arterial bed elastase-2, an angiotensin II-forming enzyme. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2002;39:628-35.

Santos-Pinto R. Mineralização no processo de reparo em feridas de extração dental em cães: estudo radiográfico e microscópico. [tese]. Araçatuba (SP): Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista; 1964.

Sarmiento VA, Rubira IRF. Mensuração da densidade óptica apical – uma proposta para diagnóstico diferencial em endodontia, *JBC*. 1998;2(12):65-68.

Sarmiento VA, Pretto SM, Costa NP. Entendendo a imagem digitalizada. *Rev Odonto Ciência*. 1999;14(27):171-78.

Shackley DC, Whitehurst C, Clarke NW, Betts C, Moore JV. Photodynamic Therapy. *J R Soc Med*. 1999;92:562-65.

Shibli JA, et al., Treatment of ligature-induced peri-implantitis by lethal photosensitization and guided bone regeneration: A preliminary histologic study in dogs. J Periodontol. 2003;74(3):338-45.

Shrout MK, Hildebolt CF, Potter BJ, Comer RW. Comparison of 5 Protocols Based on Their Abilities to Use Data Extracted From Digitized Clinical Radiographs to Discriminate Between Patients With Gingivitis and Periodontitis. J Periodontol 2000;71(11):1750-5.

Sluzhaev IF, Kuzakova GM. The effect of helium-neon laser light on the degree of dental caries in children on a outpatient register. Stomatologia 1989;68(6):58-60.

Simpson HE. Experimental investigation into the healing of extraction wound in macacus rhesus monkeys. J Oral Surg Anesth. 1960;18:391-99.

Simpson HE. The healing of extraction wounds. Braz Dent J. 1969;126(12):550-7.

Smith N. A comparative histological and radiographic study of extraction socket healing in the rat. Aust Dent J. 1974;19(4):250-4.

Soares AF, Freitas TMC, Nest MAM, Silva MAM, de Medeiros AMC, So LB. Displasia cleidocraniana: relato de caso clínico. Rev Brasileira de Patologia Oral. 2005;4(1):38-4.

Souza SC, Junqueira JC, Balducci I, Koga-Ito CY, Munin E, Jorge AOC. Photosensitization of different Candida species by low power laser light. J Photochem Photobiol B: Biol. 2006; 83:34-8.

Teixiera RC. Análise radiográfica e histopatológica da inflamação pulpar e reabsorção óssea periapical induzidas em ratos Wistar. [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2007.

Todo H. Healing mechanism of tooth extraction wounds in rats I: initial cellular response to tooth extraction in rats studied with 3H thymidine. Arch Oral Biol. 1968;13(12):1421-7.

Tomaselli F, et al. Acute effects of combined photodynamic therapy and hyperbaric oxygenation in lung câncer – a clinical pilot study. Lasers Surg Med. 2001;28:399-403.

Usacheva M, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidina blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. Lasers Surg Med. 2001;29:165-73.

Usacheva M, Teichert MC, Biel MA. The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. J Photochem Photobiol B: Biol. 2003;71:87-98.

Vandre RH, Webber RL. Future trends in dental radiology. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1995;80(4):471-8.

Velders XL, Sanderink GC, Van der Stelt PF. Dose reduction of two digital sensor systems measuring file lengths. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1996;81(5):607-12.

Versteeg CH, Sanderink GC, Van der Stelt PF. Efficacy of digital intra-oral radiography in clinical dentistry. J Dent. 1997;25(3-4):215-24.

Vieira JGH. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. Arq Bras Endocrinol Metab. 1999;43(6):415-22.

Wainwright M, et al. Photobactericidal activity of methylene blue derivatives against vancomycin-resistant Enterococcus spp. J Antimicrob Chemother. 1999;44(6):823-5.

Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy. J Antimicrob Chemother. 1998;42:13-28.

Wainwright M. Local treatment of viral disease using photodynamic therapy. *Int J Antimicrob Agents*. 2003;21:510-20.

Weibel ER. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int Rev Cytol*. 1969;26:235-302.

Wenzel A, Kirkevang LL. High resolution charge-coupled device sensor vs. medium resolution photostimulable phosphor plate digital receptors for detection of root fractures in vitro. *Dental Traumatology*. 2005;21:32-5.

Wilson M. Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related diseases. *Int Dent J*. 1994;44(2):181-9.

Wilson M. Lethal photosensitization of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobio Sci*. 2004;3:412-8.

Wilson M, et al. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. *J App Bacteriol*. 1995;78(3):569-74.

Wilson M, Mia N. Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. *J Oral Pathol Med*. 1993;22(8):354-7.

Zaret MM, et al. Laser Photocoagulation of the eye. *Arch Ophtalmol Fr*. 1963;64:96-104.

Anexo

ANEXO A- Autorização da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais
Fone: (14)3235-8356
e-mail: mferrari@fob.usp.br

CEEPA-Proc. Nº 17/2007

Bauru 17 de setembro de 2007.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **"Análise morfométrica, molecular e radiográfica da terapia fotodinâmica antimicrobiana após exodontia em ratos wistar"**, de autoria de Marcelo Lupion Poleti, sob sua orientação foi enviado ao relator para avaliação.

O parecer do Relator **aprovando** o projeto foi aceito em reunião desta Comissão realizada no dia 13 de setembro de 2007.

Atenciosamente,

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e
Pesquisa em Animais

Profª Drª Izabel Regina Fischer Rubira-Bullen
Docente do Departamento de Estomatologia

Marcelo Lupion Poleti