

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

ANA PAULA RAMOS BERNARDES DA SILVA

**ESTUDO *IN VITRO* DOS EFEITOS DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA NAS
CÉLULAS OSTEoblásticas DERIVADAS DA SUTURA PALATINA DE
RATOS APÓS EXPANSÃO RÁPIDA DA MAXILA**

Ribeirão Preto

2009

ANA PAULA RAMOS BERNARDES DA SILVA

**ESTUDO *IN VITRO* DOS EFEITOS DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA NAS
CÉLULAS OSTEoblÁSTICAS DERIVADAS DA SUTURA PALATINA DE
RATOS APÓS EXPANSÃO RÁPIDA DA MAXILA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção
do título de Mestre em Odontopediatria.

Orientador: Prof. Dra. Maria Bernadete Sasso Stuani

Ribeirão Preto

2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação

Serviço de Documentação Odontológica

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Silva, Ana Paula Ramos Bernardes

Estudo *in vitro* dos efeitos do laser de baixa potência nas células osteoblásticas derivadas da sutura palatina de ratos após expansão rápida da maxila. Ribeirão Preto, 2009.

64 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Odontopediatria

Orientador: Stuari, Maria Bernadete Sasso.

1. Laser de baixa intensidade. 2. Cultura de células. 3. Osteogênese.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Paula Ramos Bernardes da Silva

ESTUDO *IN VITRO* DOS EFEITOS DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA NAS CÉLULAS OSTEOLÁSTICAS DERIVADAS DA SUTURA PALATINA DE RATOS APÓS EXPANSÃO RÁPIDA DA MAXILA

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção
do título de Mestre em Odontopediatria.

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Á Deus, Senhor supremo da minha vida, o qual me permitiu realizar esse trabalho.

*Aos meus pais, **Silvio Ramos Bernardes da Silca e Maria Carolina Placca Bernardes da Silva**, pelo amor incondicional, paciência e incentivo incansável.*

*Aos meus irmãos **Silvio Ramos Bernardes da Silva Filho e José Eduardo Ramos Bernardes da Silva** que juntamente com meus pais tornaram muitas dos meus sonhos em realidade.*

*Dedico também aos amigos Professora **Maria Bernadete Sasso Stuani** por ter acreditado em mim e minha amiga "irmã" **Alice Dias Petri**, grandes responsáveis por essa fase ter sido vencida!*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*Aos meus pais **Silvio e Carolina**, pela formação não só profissional, mas também como pessoa. Foi à honestidade e a humildade de vocês que me ensinaram a ter caráter e força para superar os obstáculos de cada dia. Obrigada por respeitarem minhas decisões e participarem de maneira tão ativa em todas as fases da minha vida. Agradeço a Deus todos os dias por ter nascido neste lar! Amo vocês, sempre, e cada vez mais!*

*Ao meu irmão **Silvio** por participar da minha vida com sentimento fraternal e também paternal, que me propiciou crescer profissionalmente me apoiando em cada fase decisiva e importante da minha vida. Não tenho como descrever o tamanho de minha admiração por sua conduta ética, sua honestidade e sua disposição em ajudar para que nossos sonhos se tornem realidade.*

*Ao meu irmão **José Eduardo**, que sempre com muito amor não mediu esforços para ajudar na minha caminhada, seja com palavras ou um simples gesto de descontração.*

*A minha querida e super amiga **Alice Dias Petri** que com muita paciência e dedicação me ajudou e até abdicou um pouco de sua vida para me ajudar. Essa tese também é sua e seu nome deveria estar na capa! Obrigada por existir e participar plenamente da minha vida!*

*A professora **Maria Bernadete Sasso Stuani** pela paciência e por ter acreditado em mim mesmo distante.*

*As amigas **Adriana Sasso Stuani e Andrea Sasso Stuani** pelo empenho durante a execução da fase experimental deste trabalho, a colaboração de vocês foi fundamental.*

*As minhas eternas amigas “Espiروquetas”, **Carolina Mastrodomenico Magdalena, Flavia Adelfino Suaid, Alice Dias Petri, Bianca Mota dos Santos, Patrícia Costa Ferrante Cruz e Lúcia da Silva Reis**. A distância geográfica que nos separa não diminui em nada a cumplicidade de nossa amizade. Obrigada por compartilharem comigo as alegrias e as tristezas desta fase. É bom demais ser amiga de vocês!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do atual Diretor Prof. Dr. Osvaldo Luiz Bezzon e Vice-Diretor Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros. Aos docentes do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da FORP-USP: Prof. Dr. Adilson Thomazinho, Profa. Dra. Aldevina Campos de Freitas, Profa. Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz, Profa. Dra. Janete Cinira Bregagnolo, Prof. Dr. José Arnaldo Viana Cione, Prof. Dr. José Tarcísio de Lima Ferreira, Profa. Dra. Kranya Victoria Diaz Serrano, Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva, Profa. Dra. Maria Bernadete Sasso Stuani, Profa. Dra. Maria da Conceição Pereira Saraiva, Profa. Dra. Marlívia Gonçalves de Carvalho Watanabe, Profa. Dra. Mirian Aiko Nakane Matsumoto, Prof. Dr. Paulo Nelson Filho, Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra da Silva, Prof. Dr. Ricardo Henrique Alves da Silva, Profa. Dra. Sada Assed Prof. Dr. Wilson Mestriner Júnior.

Aos alunos da turma do curso de Mestrado e Doutorado do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da FORP-USP, Giselle de Ângelo Souza Leite, Lourdes Yanissely Garcia Olmedo, Marcela Perdiza, Cristina Bueno Brandão, Olívia Santos de Oliveira Verardo, Remberto Marcelo Argandoña Valdez, Rodrigo Machado da Silva, Rosângela Moraes Marques Sawan, Taiana de Melo Dias e Vanessa da rocha Bernardini Maldonado, Cristhiane Ristum Bagatin Rossi, Soraya Cheier Dib Gonçalves, Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva.

Ao Professor Adalberto Luiz Rosa, pela disponibilidade sempre que precisei.

A amiga Grasielle Crippa, que por alguns dias abdicou de um tempo com seus filhos para me ajudar na elaboração da tese o que foi fundamental.

Aos meus amigos de laboratório Roger Rodrigo Fernandes, Junia Ramos e Lucas Teixeira pela disponibilidade sempre que solicitados.

Aos amigos de trabalho Ana Lúcia Rodrigues da Silva, Fátima Aparecida Vian, Claudia Andrea Balabanian e Rodrigo Bertagna por sempre estarem dispostos a me ouvir e compartilhar minhas lamentações sempre com palavras de incentivo.

A todos que colaboraram para a realização deste trabalho, MUITO OBRIGADA!

" Há homens que lutam um dia e são bons.

Há outros que lutam um ano e são melhores.

Há os que lutam muitos anos e são muito bons.

Porém, há os que lutam toda a vida.

Esses são os imprescindíveis."

Bertolt Brecht

RESUMO

SILVA, Ana Paula Ramos Bernardes. **Estudo *in vitro* dos efeitos do laser de baixa potência nas células osteoblásticas derivadas da sutura palatina de ratos após expansão rápida da maxila.** 2009. p.64 Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

O laser de baixa potência é utilizado no tratamento odontológico visando diminuir o tempo do reparo ósseo. O osteoblasto quando diferenciado pouco prolifera, são as células precursoras que o fazem. Células precursoras de osteoblastos exercem um papel essencial nesse processo e o sucesso da formação óssea depende da sua adesão, proliferação celular e diferenciação osteoblástica. Os objetivos do presente trabalho foram avaliar a capacidade de adesão, proliferação e síntese de proteínas (proteína total e fosfatase alcalina), expressão do fenótipo osteoblástico (BSP, COL, OC e RUNX2) e formação de matriz mineralizada em células osteoblásticas derivadas da sutura palatina mediana de ratos e submetidos à disjunção ortopédica maxilar e aplicação de laser de baixa intensidade As-Ga-Al (DMC[®] Laser de aplicação pontual, com $\lambda = 830 \text{ nm}$, 56 J/cm^2). Após 24 horas, 48 horas e 7 dias da disjunção palatina e aplicação do laser de baixa potência, fragmentos ósseos da sutura palatina mediana foram submetidos à digestão enzimática para extração das células. As células foram cultivadas em garrafas T75 na presença de meio essencial mínimo suplementado com soro fetal bovino e substâncias que favorecem a diferenciação em osteoblastos: dexametasona, ácido ascórbico e β -glicerol fosfato (MTS 10%). Após confluência na superfície da garrafa, um número estimado de células ($2 \times 10^4/\text{poço}$) foi transportado para as placas de cultura, com 24 poços. Os grupos não irradiados serviram como controles. A avaliação da proliferação celular dos animais sacrificados após expansão rápida da maxila e aplicação do laser de baixa potência indicou que o grupo tratado com laser teve um aumento no número de células assim como na atividade de fosfatase alcalina, na expressão gênica e na mineralização em todos os

períodos estudados. Portanto os resultados obtidos indicam que o laser de diodo As-Ga-Al estimulou a formação de células osteoblásticas. Podemos concluir com esses resultados que a radiação do laser diodo de As-Ga-Al estimula a expressão do fenótipo osteoblástico em células derivadas do osso alveolar de ratos após expansão rápida da maxila.

Palavras-chave: laser de baixa potência, cultura de células, osteogênese.

ABSTRACT

SILVA, Ana Paula Ramos Bernardes. ***In vitro* study of the effects of low-level laser therapy on maxilar derived osteoblast cells rats palate suture after rapid maxillary expansion.** 2009. 64 p. Thesis (Master Degree) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

The low-power laser is used in dental treatment to reduce the time of bone healing. Differentiated osteoblasts have poor proliferation. It is rather done by osteoblast cell precursors. Precursor cells of osteoblasts exert a key role in the process of bone formation and its success depends on its adhesion, proliferation and differentiation. The objectives of this study were to evaluate the ability of adhesion, proliferation and synthesis of proteins (total protein and alkaline phosphatase) of osteoblastic cells derived from palatine suture median of rats that underwent orthopedic maxillary disjunction and application of low-intensity laser As-Ga-Al (DMC[®] Laser-off of application, with $\lambda = 830 \text{ nm}$, 56 J/cm^2), as well as the expression of the osteoblast phenotype (BSP, COL, OC and RUNX2) and the formation of mineralized matrix..After 24 hours, 48 hours and 7 days of the palate disjunction and application of the low-energy laser, bone fragments of the median palatine suture were submitted to enzyme digestion in order to extract the cells. The cells were grown in T75 bottles in the presence of minimum essential medium supplemented with fetal bovine serum and substances which favour the differentiation into osteoblasts: dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerol phosphate (10% MTS). After confluence on the surface of the cylinder, an estimated number of cells ($2 \times 10^4/\text{poço}$) were transported to the culture plates with 24 wells. The non-irradiated groups served as controls. The assessment of cell proliferation in animals sacrificed after the rapid expansion of maxilla application of low-energy laser indicated that the group treated with laser had an increase in the number of cells as well as of the activity of alkaline phosphatase, gene expression and mineralization in all periods studied. Therefore, the results

indicate that the laser diode of the As-Ga-Al stimulated formation of osteoblastic cells. We conclude that the radiation of the laser diode As-Ga-Al stimulates expression of osteoblast phenotype in cells derived from alveolar bone of rats after rapid expansion of the maxilla.

Key words: Low-level laser, culture cell, osteogenesis

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	PROPOSIÇÃO	26
3	MATERIAL E MÉTODO	27
	3.1 Amostragens (Seleção dos Animais)	27
	3.2 Anestesia dos Animais	29
	3.3 Instalação e Ativação do Dispositivo Ortodôntico para a Disjunção da Sutura Palatina Mediana	30
	3.4 Procedimento de irradiação com laser	32
	3.5 Sacrifício dos animais	33
	3.6 Culturas de células	34
	3.6.1 Proliferação Celular	35
	3.6.2 Medida de Fosfatase Alcalina (ALP)	35
	3.6.3 Formação de nódulos de matriz mineralizada	36
	3.6.4 Extração de RNA Total para PCR em tempo real	37
	3.6.5 Confeção da fita de DNA complementar (cDNA)	39
	3.6.6 Quantificação das mensagens por reações de Real Time PCR	39
	3.7 Análise estatística	41
4	RESULTADOS	42
	4.1 Proliferação Celular	42
	4.2 Atividades de Fosfatase Alcalina (ALP)	44
	4.3 Formação de nódulos de mineralização	45
	4.4 Expressão gênica avaliada por PCR em tempo real	48
5	DISCUSSÃO	50
6	CONCLUSÃO	57
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1 INTRODUÇÃO

A Palavra LASER é um acrônimo da língua inglesa: Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (Amplificação de luz por Emissão Estimulada de Radiação). É uma radiação eletromagnética, com características próprias que a diferem de uma luz comum por possuir um único comprimento de onda, com suas ondas propagando-se coerentemente no espaço e no tempo, carregando de forma colimada e direcionais altas concentrações de energia (FILHO, 2003; ZEZELL, 2001). A possibilidade de focalização em pequena área e a emissão de altas densidades de energia faz do laser um instrumento de grande interesse e importância para aplicações nas áreas da saúde, tanto no diagnóstico como na terapia (NICOLAU, 2001). Os equipamentos de raios lasers podem levar uma grande quantidade de energia aos tecidos com imensa precisão.

Desde o advento do primeiro aparelho de Raio Laser (Light Amplification by Stimulated of Radiation) criado em 1960 por Theodore Maim na California-USA (ALMEIDA-LOPES, 1998), utilizando o rubi como meio ativador, suas aplicações médicas e biológicas têm sido estudadas. A utilização do raio laser na odontologia teve seu início na década de 60 e desde então diversos estudos (TAKEDA 1988, KANA et AL 1981; SAITO et al 1997; OLIVEIRA et al 1997; KAWASAKI et al 2000; FREITAS 2001; PINHEIRO et al 1998; UEDA et al 2001; LIRANI 2004) têm avaliado o seu emprego em diferentes tratamentos do complexo maxilo-facial.

Várias classificações têm sido propostas para os diferentes tipos de lasers. De acordo com a classificação mais ampla os lasers são divididos em dois grandes grupos: os lasers não-cirúrgicos, ou LILT (Low-Intensity Laser Therapy), e os lasers cirúrgicos ou HILT (High-Intensity Laser Therapy), que podem ainda ser classificados quanto à forma de emissão da radiação em contínuos, pulsáteis e Q-Switched, podendo conter como meio ativos elementos

sólidos, líquidos gasosos ou mistos (PINHEIRO, 1998).

Um sistema laser pode operar em regime contínuo (CW) ou pulsado. A emissão contínua pode ser monitorada por meio da sua potência, e em alguns equipamentos comerciais pode ser interrompida, de forma a alternar sua emissão. Os lasers pulsados emitem pulsos na ordem de milissegundos a microssegundos, porém, alguns podem emitir pulsos mais curtos, da ordem de nanossegundos até submicrossegundos. Operando em regime de Chaveamento-Q (Q-switched), os que emitem pulsos ultracurtos da ordem de picossegundos e femtossegundos operam em regime de travamento de modos (Mode-Locked), e podem ser monitorados pela sua energia de pulso e sua potência média (ZEZELL, 2001).

Os lasers terapêuticos mais utilizados nas décadas de 70 e 80 foram os de He-Ne (Hélio-Neodímio) com emissão de luz na região do visível (vermelho), sendo que nessa região do espectro eletromagnético, a radiação laser apresenta pequena penetração nos tecidos biológicos, o que limita a sua utilização. Outra limitação desse tipo de laser era sua grande dimensão e o fato do seu meio ativo estar contido em ampolas de vidro que poderiam se romper facilmente, além de o gás Hélio permear rapidamente a parede da ampola, reduzindo drasticamente o tempo de vida destes aparelhos. A partir do final da década de 70 surgiram os diodos lasers semicondutores, sendo o primeiro constituído de um cristal de Arsenieto de Gálio (As-Ga), tendo inúmeras vantagens sobre o laser de He-Ne (Hélio-Neônio) como menor dimensão, maior penetração no tecido biológico, além de o dispositivo operar em forma contínua ou pulsada, enquanto que o He-Ne só opera em modo contínuo (ALMEIDA-LOPES, 1999).

Os diodos são usados para gerar os lasers, e de acordo com o que for usado teremos um laser vermelho ou um infravermelho, sendo suas ações sobre os tecidos também variadas. Do ponto de vista físico, são semicondutores sólidos; parecem sanduíches: o pão é sempre o mesmo (geralmente As-Ga-Al), o que variam é os recheios (agentes operantes), o que

modificam suas ações nos tecidos. Atualmente, os lasers não cirúrgicos mais utilizados são os de diodo, podendo ter um comprimento de onda variando de 635 nm a 850 nm, com potências mais elevadas, propiciando um tratamento mais rápido e eficaz (BRUGNERA; ZANIN, 1998).

O uso do laser de As-Ga-Al tem aumentado consideravelmente nos últimos 10 anos. Este tipo de laser é conhecido por ter alta profundidade de penetração em comparação com outros tipos o que o torna uma ferramenta de penetração clínica de grande eficiência (NISSAN et al., 2006).

Os primeiros sucessos com a aplicação clínica do laser de baixa intensidade foram obtidos em estudos relatados por Mester em 1966. Desde então diversos estudos têm sido realizados visando estudar os efeitos fotobiológicos e fotoquímicos do laser de baixa intensidade (TAKEDA, 1988).

Na odontologia os dois tipos de lasers (laser de alta potência, ou cirúrgico, e laser de baixa potência ou terapêutico) são utilizados. Os de alta potência têm ação de corte, vaporização, desnaturação de proteínas e coagulação de vasos, sendo indicado em cirurgias de tecidos moles bucais, fotopolimerização de resinas, clareamento dental e remoção de tecido cariado. O laser terapêutico possui efeitos antiinflamatórios e analgésicos e modula a reparação tecidual, acelerando a cicatrização. Os efeitos bioestimulatórios do laser de baixa potência têm sido descritos em diversas situações clínicas, sendo efetivo na aceleração da cicatrização de tecidos moles e no controle de sintomatologia dolorosa crônica (MESTER et al., 1985). O laser de baixa potência tem ainda várias outras aplicações, podendo ser empregado como auxiliar terapêutico na hipersensibilidade dentinária, em lesões traumáticas da mucosa, gengivites, periodontites, pericementites, herpes simples entre outros (NANAMI et al., 1993; NEIBURGER, 1997). Por exercer seus efeitos também em tecido duro, acelerando a reparação óssea, o uso do laser de baixa potência também poderia ser proposto

em tratamento ortodôntico, extração dental, cirurgia ortopédica e implantes entre muitos outros procedimentos que seriam beneficiados por seu potencial bioestimulatório (SAITO et al., 1997; KAWASAKI et al., 2000). O laser de baixa intensidade ainda pode promover: maior velocidade de cicatrização e reparo, aceleração da neovascularização, oclusão de feridas, maior formação do tecido de granulação, maior número de fibroblastos, maior número de fibras colágenas, aumento na síntese de ATP, liberação de histamina pré-formada, redução do pH intracelular e alterações na proliferação e motilidade celular, fagocitose e resposta imune (KITCHEN; PARTRIDGE, 1991; VEÇOSO, 1993).

Alguns estudos *in vivo* com irradiação de laser de baixa potência para regeneração óssea demonstraram uma aceleração em fraturas ósseas (tíbia) de ratos e camundongos e também na expansão da sutura palatina e na movimentação dentária destes.

O comprimento de onda de um laser determina o modo de interação laser-tecido. Assim, dependendo da estrutura celular que se deseja atingir, é utilizado o comprimento de onda mais apropriado. O comprimento de onda referente ao laser visível (vermelho) é indicado para terapia de tecidos mais superficiais, como a pele, mucosas, já comprimentos de onda referente ao infravermelho, devido à maior profundidade de penetração, pode interagir com estruturas mais profundas (FILHO, 2003).

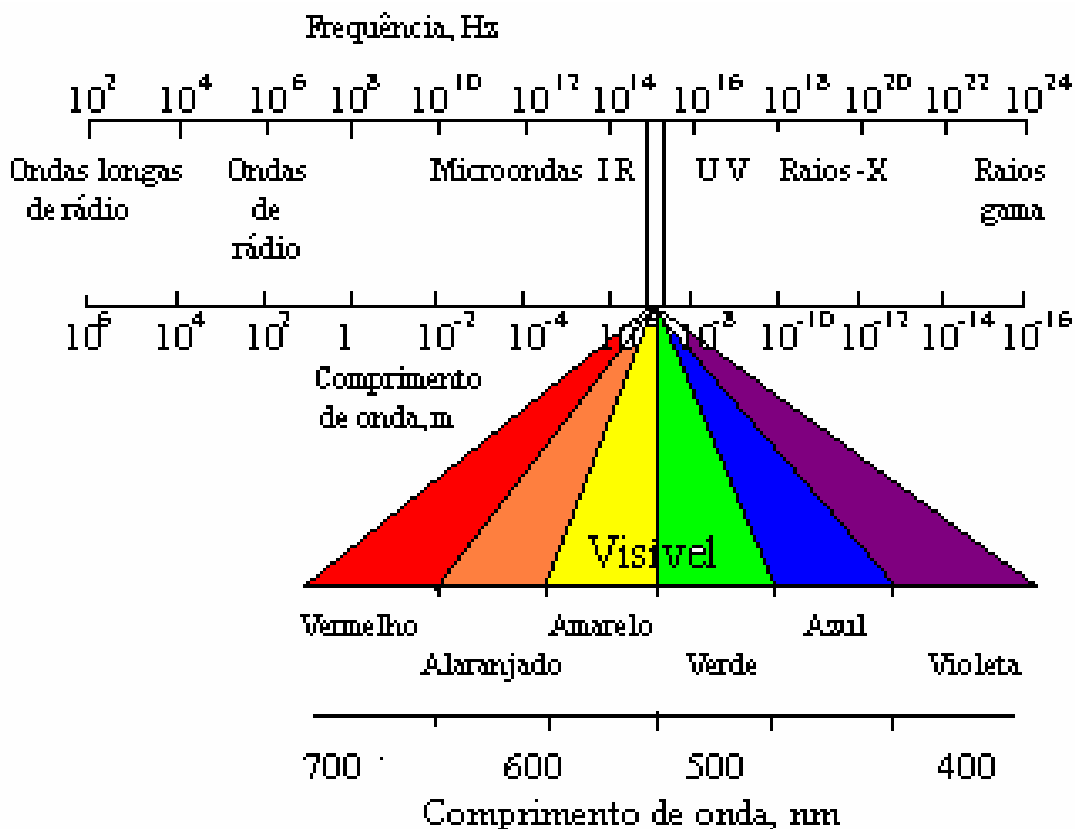


Figura 1. Espectro Eletromagnético (PINHEIRO, 1998).

Quando a luz laser incide em um tecido biológico, uma parte da luz é refletida, e uma parte da luz remanescente e que foi transmitida é espalhada dentro do tecido, e ainda, outra é transmitida. Parte da luz remanescente é absorvida, tanto pela água no tecido ou por algum outro cromóforo absorvedor, como a hemoglobina e melanina e citocromos da cadeia respiratória nas mitocôndrias (FILHO, 2003).

Os efeitos biológicos dos lasers que operam em baixa intensidade dependem principalmente de sua monocromaticidade e fluência (dose de energia), assim como da fase de crescimento celular em que as células recebem irradiação. Esses processos podem manifestar-se clinicamente de três formas: diretamente na célula, produzindo um efeito primário ou imediato, aumentando o metabolismo celular ou aumentando a síntese de endorfinas e diminuindo a liberação de transmissores nosceptivos; como a bradicinina e a serotonina, na

estabilização da membrana celular; onde clinicamente observa-se uma ação estimulante analgésica dessa terapia, havendo também um efeito secundário ou indireto do aumento do fluxo sanguíneo e a drenagem linfática. Além disso, observa-se também uma ação mediadora do laser na inflamação, ativando o sistema imunológico devido a seus efeitos terapêuticos gerais ou tardios (FILHO, 2003).

A radiação laser deve ser absorvida para produzir uma mudança física e/ou química, que resulte em uma resposta biológica, e uma vez que essa é observada, determina-se a dose ótima de irradiação em um dado comprimento de onda. Devem-se considerar os seguintes parâmetros: escolha do comprimento de onda/tipo laser ideal para cada tratamento; densidade de potência (intensidade, watts/cm^2), tipo de regime de operação do laser, frequência do pulso e tipo de tratamento. É importante conhecer a potência média do laser para o cálculo da dose a ser administrada. Quando o regime do laser é pulsado, a potência varia entre um valor máximo e zero, e, portanto, a potência média do laser é significativa para o cálculo da dose. Caso o regime do laser seja contínuo, a potência do laser permanece constante por todo período de tempo e é igual à potência média. A dose do tratamento é o parâmetro mais importante, por se tratar da grandeza física que avalia a possibilidade de inibição ou manifestação de efeitos. A dose é a quantidade de energia por unidade de área transferida à matéria e geralmente é medida em joules por centímetro quadrado (J/cm^2). O tempo de exposição de tratamento pode ser calculado pela seguinte expressão: $t = D \times A/p$, onde **t** é o tempo em segundos, **D** a dose em J/cm^2 , **A** área em cm^2 e **P** a potência medida em Watts (RIBEIRO, 2001).

O maior número de estudos realizados com a terapia laser de baixa potência foi direcionado na avaliação da reparação de feridas cutâneas. Entretanto, alguns autores se propuseram a investigar a ação do laser sobre o tecido ósseo (BARUSHKA; YAAKOBI; ORON, 1995), os quais têm descrito resultados positivos da interferência do laser de baixa

potência sobre o reparo de tecido ósseo (FILHO, 2003).

Um dos primeiros trabalhos realizados em tecido ósseo verificou aumento de 22% na síntese de ATP mitocondrial, após a terapia com laser de baixa potência em alvéolo dentário em reparação. A elevação na taxa de ATP aumentaria o metabolismo celular contribuindo para a reparação alveolar (BENEDICENTI et al., 1983). Além disso, outros autores observaram que a laserterapia reduz o tempo de reparação em defeitos ósseos cirurgicamente provocados (BOGATOVI et al. 1983).

Em osso alveolar, o efeito da irradiação laser semicondutor diodo de Ga-As (904 nm, 25 mw/cm² 20 J/cm²) após extração de molar de ratos induziu uma aceleração no processo de reparo alveolar (TAKEDA, 1998). Estudos indicam que o laser He-Ne verde (550 nm) não causou nenhum benefício significativo no processo de reparo (PICON et. al., 1998).

Entretanto, observou-se que a irradiação com laser após a extração dentária ao longo da parede óssea vestibular e lingual, induz aceleração da coagulação, diminuição do desconforto pós operatório, e aceleração do reparo ósseo (GARCIA et.al; PICON et. al, 1998). Diferentes frequências da radiação laser de baixa potência (diodo 670 nm e He-Ne 632,8 nm) foram avaliadas no processo de reparo após extrações de molares em humanos e o nível de IgA (imunoglobulina A) e albumina na saliva e mudanças na densidade óssea do alvéolo foram monitorados. Diferenças significativamente maiores nos níveis de IgA e albumina foram observadas no grupo irradiado quando comparadas ao grupo controle. A densidade óssea analisada por radiografia digital, seis meses após o tratamento cirúrgico não foi diferente nos grupos irradiados e controle. A irradiação laser de He-Ne não influenciou o processo de osteointegração (KUCEROVA et.al, 1997).

Estudos “*in vitro*” indicaram que a radiação laser causou um aumento no número de células osteoblásticas diferenciadas bem como na formação óssea nodular pela estimulação da proliferação de células osteoprogenitoras (OSAWA et. al,1995). No tecido ósseo a irradiação

com laser de baixa potência aumentou a vascularização e do número de trabéculas em tibia fraturada de ratos (TRELLES; MAYAYO et al., 1987).

O efeito do laser de baixa potência também foi avaliado no reparo ósseo cortical na tibia de ratos onde se observou que o reparo ósseo na tibia era diretamente proporcional à radiação laser de He-Ne (YAAKOBI; MALTZ; URON 1996).

Os efeitos da radiação laser de As-Ga-Al (830 nm), na regeneração óssea após a disjunção palatina em ratos com dose de 35,3 J/cm² e potência 100 mw, avaliada por histomorfometria, indicou aceleração significativa no grupo irradiado por 7 dias, sendo esse aumento dose-dependente. A irradiação durante o período inicial da expansão (0-2 dias) foi mais efetiva, visto que posteriormente (dias quatro a seis) a irradiação não teve qualquer efeito sobre a regeneração óssea. Os achados sugerem que a irradiação laser de baixa potência pode acelerar a regeneração óssea na sutura palatina durante a expansão rápida da maxila sendo este efeito não dependente apenas da dose de radiação de laser total, mas também do tempo e frequência de irradiação. Os autores sugerem que a terapia laser de baixa potência pode ter benefício terapêutico, na inibição da recidiva e na diminuição do período de contenção por acelerar a regeneração óssea na sutura palatal mediana (SAITO; SHIMIZU et al., 1997).

O laser He-Ne aplicado na tibia de ratos Wistar após fratura cirúrgica, induziu a formação de um trabeculado ósseo mais espesso, indicando aumento na atividade osteoblástica (FREITAS et al., 2000). O efeito bioestimulatório da terapia laser de baixa potência no tecido ósseo no processo de reparação em fêmur de ratos irradiados com laser diodo As-Ga-Al (660 nm), 10 J/cm² demonstraram no grupo irradiado uma superfície osteoblástica maior que no grupo controle. No grupo controle com 25 dias observou-se uma diminuição acentuada na remodelação óssea quando comparado com o irradiado. A taxa de aposição óssea-mineral foi maior no grupo irradiado. Os resultados sugerem que a terapia

laser de baixa potência na dose utilizada não altera a microarquitetura óssea, no entanto, promove estimulação da remodelação óssea (NICOLAU, 2001).

Estudos utilizando análise morfométrica da quantidade de osso neoformado em fêmur de ratos fraturados cirurgicamente indicaram que a terapia laser de baixa potência induz maior área de mineralização indicando que o laser acelera o reparo ósseo (SILVA-JUNIOR et al., 2002). Outros estudos indicaram que o laser induziu aumento na ALP/TP, Ca e NO nos fêmures de ratos fraturados.

Estudos utilizando laser de baixa potência no processo de reparo ósseo de fêmur de ratos indicaram maior velocidade no reparo ósseo no defeito foram maiores no grupo irradiado. Estes resultados sugerem que a terapia laser de baixa potência pode apresentar um efeito positivo no reparo de defeitos ósseos (GUZARDELLA et al., 2002).

Doses diárias de radiação laser de He-Ne foram aplicadas no reparo de feridas cirúrgicas na tíbia de ratos. A organização das fibras colágenas na matriz óssea e a histologia do tecido foram avaliadas usando um método de polarização Picrosirius e Tricrome de Masson. Após 7 dias houve um aumento significativo na área trabecular neoformada na tíbia comparada com o controle. A irradiação aumentou o número de osteoclastos hipertróficos quando comparada ao grupo controle. O método de polarização Picrosirius revelou faixas paralelas de fibras colágenas (fibras paralelas osso) no local do reparo no grupo de 14 dias irradiado indiferentemente da dose. Este resultado mostra que a LLT estimula o crescimento ósseo trabecular na área e concomitante invasão de osteoclastos durante há primeira semana, e acelera a organização da matriz colágena (alinhamento paralelo das fibras) numa segunda fase, não observada no controle, não irradiado neste mesmo período (GARAVELLO-FREITAS et al., 2003).

Foi verificada aceleração no processo de reparo ósseo com o uso do laser de baixa intensidade caracterizado pelo aumento do número e superfície de osteoblastos e maior

volume e superfície de osteóide, indicando o predomínio da fase de formação óssea 19 dias após a realização da osteotomia na tíbia de ratos (LIRANI, 2004).

Utilizando laser diodo As-Ga-Al no reparo de defeitos ósseos em ratos avaliou-se os efeitos da terapia laser de baixa potência. No grupo experimental o local foi irradiado imediatamente após a cirurgia e durante 6 dias consecutivos, o grupo controle recebeu o mesmo tratamento só que com o laser desligado. No grupo experimental a quantidade de cálcio, fósforo e proteínas foi significativamente maior que no controle, assim como a produção de angiogênese e formação de tecido conjuntivo. A terapia laser de baixa potência aumentou a formação óssea (KHADRA et al., 2004). O laser de baixa potência estimulou o reparo ósseo cortical na tíbia de ratos onde de maneira dose-dependente (YAAKOBI; MALTZ; URON 1996).

Investigando os efeitos da terapia laser de baixa potência com laser diodo de As-Ga-Al na estimulação da interação osso-implante na tíbia de coelhos Khadra et al (2004) submeteram os animais a irradiação. A avaliação histomorfométrica sugeriu que o grupo irradiado teve mais contato osso-implante que o controle, sendo as porcentagens de cálcio e fósforo significativamente maior no grupo irradiado, sugerindo que o processo de maturação óssea neste grupo foi mais rápido. Estes achados sugerem que a terapia laser de baixa potência tem efeito favorável no reparo e consolidação de implantes de titânio.

O estudo do mecanismo da ação do laser no tecido ósseo favoreceria o melhor entendimento dos efeitos terapêuticos do laser e poderia contribuir para que as aplicações clínicas tornem-se mais seguras e eficazes. O mecanismo de reparação óssea em condições normais ocorre inicialmente por um aumento da atividade osteoblástica, formando rapidamente tecido ósseo imaturo, matriz orgânica, seguida pelo depósito de sais de cálcio. Os osteoclastos secretam fibras colágenas e substância fundamental amorfa que constituem tecido ósseo não mineralizado, ou osteóide, passível de mineralização posterior (NICOLAU, 2001).

Qualquer lesão óssea (fratura, defeito, fixação de implantes, interrupção do suprimento sanguíneo) ativa a regeneração óssea local pela liberação de fatores de crescimento (FC) e indutores. O osso é uma das fontes mais ricas em fatores de crescimento. O reparo em defeitos ósseos é um bom modelo para o estudo da regeneração óssea. A formação óssea inicia-se dois dias após a lesão, sendo totalmente preenchido por osso compacto após quatro semanas (NICOLAU, 2001).

Alguns estudos experimentais em animais e observações clínicas indicaram que a luz laser acelera o processo de reparação tecidual, induzindo a atividade mitótica celular, modificando a densidade capilar e aumentando a síntese de colágeno além de acelerar no processo de cicatrização, pela transformação de fibroblastos em miofibroblastos (POURREAU-SCHNEIDER et al., 1989; POURREAU-SCHNEIDER et al, 1990).

Foi avaliado histologicamente os efeitos da terapia laser de baixa potência (830 nm) no reparo de defeitos ósseos padronizados em fêmur de ratos associado a enxerto ósseo bovino inorgânico o qual evidenciou um maior avanço no reparo dos grupos irradiados quando comparados ao controle, caracterizado por um aumento na formação óssea e quantidade de fibras colágenas ao redor do enxerto. (PINHEIRO et al., 2003).

Apesar de o mecanismo de ação do raio laser sobre a reparação óssea não estar totalmente esclarecido, acredita-se que ele provavelmente possa estimular as células mesenquimais indiferenciadas, presentes no remanescente do ligamento periodontal e, conseqüentemente, promover maior diferenciação celular osteoblástica, o que promoveria formação óssea alveolar mais intensa, conforme observado por Garcia et al (1996) onde se verificou uma aceleração da cronologia dos eventos biológicos da reparação de feridas de extração dental em ratos após a radiação com laser diodo de Arsênio e Gálio (904 nm, 10 w. 500-3700 Htz).

Avaliando os efeitos da irradiação laser de baixa potência na movimentação dentária em ratos, o laser de As-Ga-Al foi usado para irradiar essa área; a quantidade de osso formado,

a proliferação celular no lado de tração e o número de osteoclastos no lado de pressão foram significativamente maiores no grupo irradiado. Os achados sugerem que a irradiação laser de baixa potência pode acelerar a movimentação dentária acompanhada por remodelação óssea alveolar (KAWAZAKI; SHIMIZU, 2000). Nesta mesma linha de pesquisa um estudo para investigar os efeitos do laser de baixa potência na movimentação dentária e remodelação óssea alveolar em coelhos foi realizado. O lado esquerdo serviu como controle, e o direito como experimental, recebendo irradiação com laser de baixa potência. O maior deslocamento dentário medido através de análise computadorizada foi mais evidente no grupo irradiado. Segundo os autores a radiação laser de baixa potência promoveu maior movimentação dentária e remodelação óssea alveolar (SUN et al., 2001).

Tratamento ortodôntico tem sua importância baseada na reabilitação estética e funcional no sistema mastigatório. É o resultado de forças ortodônticas que promovem a remodelação de osso alveolar. O movimento dentário deve ser o mais leve possível para prevenir efeitos colaterais como necrose óssea ou reabsorção radicular. Do ponto de vista dos pacientes, acelerar a movimentação dental é desejável, pois a duração do tratamento freqüentemente é muito longa podendo levar vários anos. A terapia com laser de baixa potência é uma simples técnica que além de ser de baixo custo e de ser utilizada em vários tratamentos pode ser utilizada para acelerar a reparação óssea. Alguns autores sugerem que o laser de baixa potencia pode acelerar a movimentação dentária em animais experimentais com boa qualidade óssea aumentando a produção e a diferenciação de osteoclastos (CRUZ et al., 2004).

Os efeitos da radiação laser de baixa potência com As-Ga-Al (609 nm) em culturas de células ósseas com densidade de energia de $1,6 \text{ J/cm}^2$, durante 60 segundos, com potência de 21 mw, analisadas em três, cinco e sete dias; demonstrou que o grupo irradiado apresentava crescimento superior ao controle, sendo a produção de matriz óssea e intensidade de fluorescência significativamente maior no grupo irradiado após, oito, 12 e 16 dias, quando

comparadas ao controle (DORTBUDAK; HASS; MAILATH-POKORNY, 2002).

Estudos *in vitro* foram realizados para determinar o efeito da terapia laser de baixa potência na formação óssea em células osteoblásticas de ratos. O laser diodo de As-Ga-Al (830nm, 500 mW, 0.48-3.84 J/cm²) foi utilizado com irradiação contínua e irradiação pulsada. A irradiação laser em todos os grupos estimulou a proliferação celular, a formação óssea, a atividade da fosfatase alcalina, e a expressão do gene ALP (fosfatase alcalina) quando comparado ao grupo controle. Concluiu-se neste estudo que a terapia laser de baixa potência estimulou a formação óssea *in vitro* e que a frequência do pulso é um fator importante na resposta biológica de formação óssea (UEDA; SHIMIZU, 2003).

Estudos *in vitro*, indicaram que o laser diodo AS-Ga-Al aumentou o número de nódulos de mineralização de maneira dose-dependente (OZAWA et al, 1998), aumentou a atividade da ALP e expressão da osteocalcina (FUKUHARA et al., 2006).

Segundo Baibekov (2001) a terapia com laser induz mudanças nas células simulando um processo de reparação e normalização de parâmetros imunológicos. No entanto, devido aos mecanismos de ação do laser em osso não serem totalmente elucidados, a terapia clínica com laser não pode ser aplicada eficientemente. Estudos são, portanto necessários para a compreensão dos efeitos do laser em osso para a elaboração de um protocolo satisfatório. Desta forma neste trabalho estudou-se o efeito do laser em células de linhagem originada de cultura primária da sutura palatina mediana após a disjunção maxilar em ratos apresentando o fenótipo normal de osteoblastos. Deboni (1995) mostrou que estas células podem ser usadas como um sistema para estudar a proliferação e diferenciação celular, fisiologia óssea e hormonal, fatores de crescimento e outros efeitos de citocinas sobre a função e diferenciação dos osteoblastos. Porém a cultura de células explantadas da sutura palatina mediana após as disjunções ortopédicas da maxila e submetidas à aplicação do laser de baixa potência ainda não foi verificada.

2 PROPOSIÇÃO

Este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito do laser de baixa potência sobre a proliferação e expressão do fenótipo osteoblástico das células derivadas da sutura palatina da maxila após expansão rápida em ratos.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Amostras (Seleção dos Animais)

Foram utilizados 40 ratos da raça Wistar (*Rattus norvegicus*, *albinus*) machos jovens (seis semanas de vida). Os ratos foram fornecidos pelo Biotério I da Faculdade de Odontologia de São Paulo – câmpus Ribeirão Preto - FORP-USP. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em animais da FORP – USP (CEUA) tendo como protocolo nº 07.1.1218.53.9. Antes do início do experimento, os ratos foram submetidos à triagem por parte de médicos veterinários da referida instituição. Foram selecionados apenas animais sadios sem qualquer alteração do metabolismo ósseo e em lotes com idade e peso aproximados. Animais machos foram selecionados para eliminar qualquer variabilidade hormonal devido ao ciclo reprodutivo das fêmeas. O estado de saúde de cada rato foi avaliado por peso corpóreo diariamente monitorado por mais de uma semana antes do início da pesquisa.

Esses animais foram submetidos à disjunção maxilar e aplicação de laser de baixa potência pelos períodos abaixo relacionados (quadro 1). Cada grupo contou com cinco animais.

PERÍODO DA MORTE DO ANIMAL E EXTRAÇÃO DAS CÉLULAS APÓS A EXPANSÃO RÁPIDA DA MAXILA	
Disjunção (experimental não irradiado)	Disjunção + laser (experimental irradiado)
24 horas	24 horas * (54 J/ cm ²)
48 horas	48 horas * (54 J/ cm ²)
7 dias	7 dias * (54 J/ cm ²)

QUADRO 1: Distribuição dos animais por grupo

* uma única aplicação de laser no dia da instalação do aparelho.

A escolha deste animal baseou-se principalmente na disponibilidade, facilidade de manipulação, possibilidade de padronização da amostra e por ter sido utilizado em vários outros estudos como de Baumrind (1969); Hong, Yamane, Kuwahara et al. (1992); Brudvik; Rygh (1993a); Sawada, Shimizu (1996); Saito, Shimizu (1997); Hughes, King (1998), visando uma análise comparativa.

Durante o período experimental os animais permaneceram em gaiolas plásticas específicas para este fim. Forradas com raspa de madeira (maravalha de pinus), ou seja, material totalmente inofensivo, atóxico, absorvente, isolante térmico, sem pó, não comestível pelos animais e livre de peças pontiagudas, e com locais apropriados para a colocação de água e alimento. Cada gaiola tinha um número máximo de cinco animais. A maravalha tem a finalidade de absorver a urina dos animais e a água derramada no interior da gaiola, mantendo o fundo da gaiola-viveiro seco e, foi substituída diariamente, fornecendo assim as condições apropriadas de higiene necessária ao bem-estar e saúde dos animais.

Os animais foram mantidos no biotério de experimentação animal da FORP – USP e alimentados com dieta padrão constituída por ração moída (Labina – Purina) a fim de se evitar eventuais danos ao aparelho ortodôntico durante a mastigação. Foi feita a troca diária da ração prevenindo a proliferação de fungos, provocada pela exposição prolongada do alimento ao meio ambiente. Água *ad libitum* foi fornecida utilizando dispensadores apropriados, adaptados à gaiola-viveiro (Figura 2), com bico de aço inoxidável, com capacidade de 500 ml, para garantir suprimento constante de água aos animais. Da mesma forma que a ração, a água foi trocada diariamente.



Figura 2: Fotografia do modelo animal, no interior da gaiola-viveiro, que foi utilizado na pesquisa.

Não foram usadas substâncias desinfetantes durante a limpeza das gaiolas, para não causar quaisquer interferências no experimento. O fotoperíodo foi controlado com intervalos de dia-noite de 12 horas, para evitar alterações no ciclo metabólico e a temperatura da sala do biotério foi mantida entre 21° e 23°C, ideal para o crescimento e desenvolvimento dos animais. O local foi mantido constantemente arejado e limpo.

Durante a fase experimental, cada animal recebeu marcação individual, servindo para diferenciá-los dentro de seu próprio grupo e dos animais de outros grupos facilitando a sua identificação no momento do sacrifício. Além disso, cada gaiola-viveiro tinha uma identificação com uma ficha-cartão com a especificação do grupo a qual pertenciam os animais e o período (data/horário) de instalação do aparelho e do sacrifício a ser realizado posteriormente.

3.2 Anestesia dos Animais

Todos os procedimentos nos animais foram realizados sob sedação com Ketamina (anestésico Ketamina Agener) e Xylazina (relaxante muscular Dopaser) numa proporção 1:2 respectivamente 1 ml/Kg por via intramuscular a fim de evitar ansiedade e/ou dor.

3.3 Instalação e Ativação do Dispositivo Ortodôntico para a Disjunção da Sutura Palatina Mediana

O mecanismo de força foi constituído de um anel de 1,5 mm de largura confeccionado com fio de aço inoxidável de 0,5mm de diâmetro (Morelli) entre os incisivos superiores (Figura 3) semelhante ao apresentado na literatura por Sawada, Shimizu (1996) e Saito, Shimizu (1997). Isso foi feito com o intuito de possibilitar a correta calibração e padronização da força empregada em todos os animais, e permitir a disjunção da sutura palatina mediana. Todos os ratos do Grupo Experimental e controle foram submetidos à disjunção da sutura palatina.

Na montagem do dispositivo para disjunção foram utilizados alicates nº 139, alicate ortodôntico para corte de fio grosso (Dentaurum), espelho bucal (Duflex), sonda exploradora nº5 (Duflex) e calcador de anéis (SSW). Todos os dispositivos ortodônticos foram confeccionados e instalados pelo mesmo operador e assistente, seguindo sempre o mesmo protocolo.



Figura 3: Fotografia do posicionamento do aparelho ortodôntico entre os incisivos centrais superiores do rato que foi utilizado no estudo.

Previamente a montagem do dispositivo para a disjunção maxilar foi preparada a superfície dos incisivos para aumentar a retenção e estabilizar o anel a ser confeccionado para

inserir-lo entre os incisivos superiores. Foi utilizada uma broca esférica diamantada nº 1011 (K.G. Sorensen) em motor de alta rotação (Dabi-Atlante) para confeccionar sulcos rasos, apenas no esmalte, no terço gengival das faces vestibular e distal dos incisivos superiores. Em seguida foi realizada profilaxia dos incisivos com pasta de pedra-pomes misturada com água aplicada em taça de borracha (Viking) em contra-ângulo adaptado ao micromotor (Dabi-Atlante) por 15 segundos. Procedeu-se a lavagem com spray (água-ar) e a secagem com ar proveniente da seringa tríplice e, condicionamento do esmalte nos incisivos utilizando ácido ortofosfórico a 37% em forma de gel (3M), durante 60 segundos, conforme recomendações do fabricante.

Na seqüência procedeu-se novamente, a lavagem e secagem das superfícies dentárias, por 15 segundos, com o auxílio da seringa tríplice. O agente de união (Primer e Bond 2.0 – Dentsply) foi aplicado sobre a superfície condicionada do esmalte e fotopolimerizado com luz halógena por 20 segundos com auxílio do aparelho Heliomat II (Vigodent). A resina fotopolimerizável (Transbond-ETM) foi adaptada sobre o segmento de fio nas faces vestibular e distal recobrando-o e, em seguida foi induzida a polimerização por meio de luz halógena, com comprimento de onda de 470 nm (Heliomat II, Vigodent), durante 30 segundos, dirigida em orientação oclusal, vestibular, mesial e distal de cada incisivo. Para compensar o desgaste decorrente do contínuo hábito roedor dos animais, várias camadas de resina foram fotopolimerizadas sobre o grampo. A espessura do anel de aço inoxidável foi determinada com base em resultados de um estudo preliminar (Sawada; Shimizu 1996) que indicou que 1,5mm de disjunção entre os incisivos induzem a taxa máxima de disjunção na sutura palatina mediana sem diminuição contínua do peso corpóreo do animal. O local de aplicação do laser de baixa potência também foi determinado em base de resultados de estudo anterior (Sawada; Shimizu 1996) que indicam que a sutura palatina mediana exibiu disjunção paralela.

Após a ativação inicial, o aparelho não recebeu outra ativação adicional durante o experimento e seu correto posicionamento foi conferido diariamente, quanto à posição, à estabilidade e à necessidade de correções na eventualidade de estar causando injúrias à mucosa oral do animal.

O peso corporal dos animais foi obtido no início da pesquisa (dia 0) e antes do sacrifício utilizando-se balança de precisão (Marte), com o objetivo de observar quaisquer alterações de peso relacionadas à alimentação e/ou às condições experimentais. Todos os procedimentos operatórios foram realizados na sala de Cirurgia Experimental do Biotério de pequenos animais da FORP – USP, sob condições de higiene adequadas e, pelos mesmos operadores.

3.4 Procedimento de irradiação com laser

Como fonte de laser de baixa-potência, um dispositivo de laser de diodo de alumínio-gálio-arsenieto (Al-Ga-As) (DMC[®] – São Carlos – SP) foi utilizado. As especificações técnicas deste dispositivo de laser são como segue: variáveis - comprimento de onda: 830 nm; aplicação pontual, portanto invisível e estando na faixa do infravermelho próximo; 100 a 700 mW. Onda contínua a 100 mW de potência e a densidade de energia utilizada foi de 54 J/segundos/cm² (TAKEDA 1988; ORIKASA, SHIMAKURA, KUSAKARI 1989; NAGASAWA, KATO, NEGISHI, 1991). No caso do feixe de laser, a grandeza é a energia luminosa (medida em Joules) e a área é aquela abrangida pelo ângulo sólido formado pelo feixe sobre a superfície de aplicação (medida em cm²), que nesse aparelho de aplicação pontual, é fixa (6 mm²) (Quadro 2).

Protocolo de Irradiação Laser (diodo As-Ga-Al):

Parâmetros de irradiação	Valores
Densidade de Energia (DE)	54 J/cm ²
Potência	100 mw
Comprimento de onda(λ)	830 nm
Cor	Invisível (IV)
Regime de emissão	Contínuo
Diâmetro fibra óptica	0,6 mm
Distância da mucosa	Em contato/ método pontual
Tempo	47 seg/ponto único e aplicação

Quadro 2- Protocolo usado para a irradiação de laser nos animais.

A ponta do laser era composta por uma fibra óptica 0,6 mm de diâmetro, e a irradiação foi aplicada sob anestesia, colocando a extremidade da ponta da fibra óptica em contato com a mucosa palatal na linha média e o ponto mediano entre as extremidades anteriores de incisivos e papila incisiva (Figura 4).

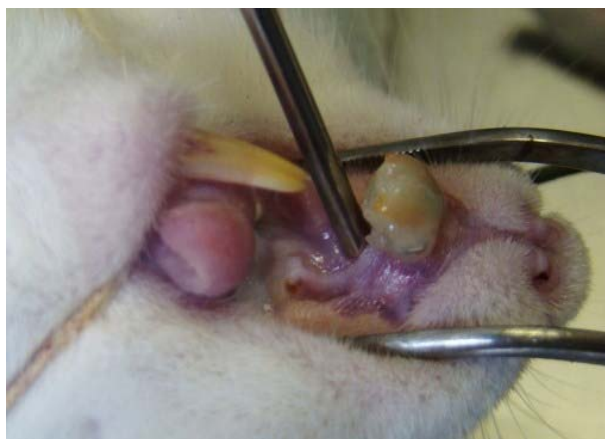


Figura 4: Vista oclusal durante irradiação de laser na sutura palatina mediana em rato. A irradiação foi executada colocando a ponta de fibra óptica (seta preta) em contato com o tecido para prevenir reflexão da ponta de laser na superfície de tecido.

3.5 Sacrifício dos animais

O sacrifício dos animais foi realizado com injeção intraperitoneal de uma superdose de hidrato de cloral a 10% (0,6 ml/100g de peso corporal). Após o sacrifício, fragmentos ósseos

dos lados direito e esquerdo da maxila, contendo a sutura palatina mediana, foram removidos. Tesoura cirúrgica curva foi utilizada para remoção da maxila e, os fragmentos foram então imediatamente colocados em meio de lavagem (meio total suplementado contendo uma concentração de 10% a mais de antibióticos – gentamicina, dexametazona, vancomicina, ampicilina e fungizona) e foram enxaguados com 3 banhos de 15 minutos neste mesmo banho.

3.6 Culturas de células

Células da linhagem osteoblástica foram obtidas de osso da sutura palatina de ratos Wistar. As células foram isoladas e cultivadas de acordo com a combinação de métodos descritos por Mailhot e Borke (1998) e Maniatopoulos e cols. (1988). Os explantes de tecido ósseo foram submetidos a seis digestões enzimáticas sequenciais em tubos de centrífuga estéreis contendo solução de colagenase tipo II (Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) a 1 mg/ml, por períodos de 30 minutos a 37°C, sob agitação constante. Os sobrenadantes 1 e 2 foram desprezados e aqueles das quatro últimas digestões, transferidos para tubo de centrífuga contendo meio de cultura e centrifugados a 2000 rpm por 5 minutos. As células isoladas e os explantes remanescentes foram misturados e cultivados em MEM (meio essencial mínimo), modificação alfa (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 50 µg/ml de vancomicina (Acros, Pittsburg, PA, EUA), 20 µg/ml de ampicilina (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA), 0,3 µg/ml de fungizona (Gibco), 5 µg/ml de ácido ascórbico (Gibco), dexametazona 10^{-7} M (Sigma) e 7 mM de beta-glicerofosfato (Sigma, St. Louis, MO, EUA) em frascos de cultura de 75 cm² (Corning Incorporated, Costar, Corning, NY, EUA). Na subconfluência, foi removido o meio de cultura e adicionada solução de tripsina a 0,25% (Gibco) e EDTA a 1 mM (Gibco) para obtenção de suspensão de células. Em seguida, as

células foram plaqueadas numa quantidade de 2×10^4 células/poço em placas individuais de poliestireno (Corning Incorporated) de 24 poços. As subculturas foram mantidas por períodos de até 17 dias e sua progressão foi avaliada em microscópio de fase invertido (Axiovert 25, Zeiss, Jena, Alemanha). O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias. Durante todo o tempo de cultivo as células foram mantidas a 37°C e atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico.

3.6.1 Proliferação Celular

As células foram cultivadas por períodos de 3, 7, 10 dias quando o meio foi removido, os poços lavados três vezes com solução salina tamponada com fosfato aquecida a 37°C para remover as células não aderidas. Em seguida, os poços foram preenchidos com 1,0ml de solução enzimática composta de EDTA 1mM, colagenase I 3mg/mL e tripsina 0,25%. Esta solução enzimática visa remover as células aderidas, etapa monitorada pela observação em microscópio de fase invertido.

Amostras dessa suspensão de células em solução enzimática foram incubadas por 5 minutos com o mesmo volume de azul de tripan 1% (Sigma) e, posteriormente, foram contadas utilizando um hemocitômetro. Para cada tempo, a proliferação foi expressa como o número total de células por poço.

3.6.2 Medida de Fosfatase Alcalina (ALP)

A atividade de ALP foi avaliada após 7 e 14 dias em cultura. A atividade de ALP foi avaliada por meio da liberação de timolftaleína pela hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, usando um kit comercial (Labtest, MG, Brasil). O meio de cultura foi removido e os

poços lavados três vezes com PBS aquecida a 37°C. A seguir, os poços foram preenchidos com 2 ml de água deionizada e as placas submetidas a 5 ciclos de choques térmicos, que consistiram na exposição da placa em ambiente a -20°C por 20 minutos, seguida de 15 minutos a 37°C. Isso resulta na lise das células e liberação do seu conteúdo na solução de água destilada. Foram utilizados tubos de ensaio branco, padrão e testes. Em todos os tubos foram adicionados 50 µL de substrato e 500 µL de tampão. No tubo padrão foi acrescentado 50 µL da solução padrão. Os tubos foram mantidos a 37°C por 2 minutos. Em seguida, foi adicionado, em cada tubo teste, 50 µL dos lisados celulares e os tubos foram mantidos a 37°C por 10 minutos. Após esse período foi adicionado em todos os tubos, branco, padrão e testes 2 ml do reagente de cor e em seguida a absorbância foi avaliada em um espectrofotômetro CE3021 utilizando o comprimento de onda de 590 nm. A atividade de ALP, expressa em µmol de timoftaleína/h/ml, foi calculada a partir da medida do tubo padrão. Os dados foram normalizados pelo conteúdo de proteína total e expressos como umol de timolftaleína/h/mg de proteína.

3.6.3 Formação de nódulos de matriz mineralizada

Para a coloração da matriz mineralizada foi utilizado o corante vermelho de alizarina (Sigma). Após as células terem sido cultivadas por um período de 17 dias, os poços foram fixados com solução de formalina 10% por 24 horas, e após esse período desidratadas em soluções crescentes de álcool (30, 50, 70, 90, 96%); mantendo cada solução em contato com o material por 1 hora e processados para coloração com vermelho de alizarina, que colore em vermelho os nódulos de mineralização, ricos em cálcio. Após a última hora, a solução foi completamente removida e as placas mantidas semi-abertas até a secagem total do material. Quando as placas se apresentavam completamente secas os poços foram preenchidos e mantidos durante 8 minutos em uma solução de vermelho de alizarina. Após esse período o

excesso de corante foi removido pela lavagem abundante do material com água bidestilada e as placas novamente foram mantidas semi-abertas até a secagem.

Para a quantificação de marcação, 280 μL de ácido acético a 10% foram adicionados a cada poço, e a placa foi incubada à temperatura ambiente por 30 minutos sob agitação. A camada de células foi então raspada da placa e transferida para um microtubo de centrífuga de 1,5 mL. Após vortexado em 30 segundos as suspensões foram recobertas por uma camada de 100 μL de óleo mineral e aquecidas a exatamente 85°C por 10 minutos, e transferidas para o gelo por 5 minutos. Foi tomado cuidado para que os tubos não fossem abertos até totalmente resfriados. A suspensão foi então centrifugada a 20000 rpm (rotações por minuto) por 15 minutos e 100 μL do sobrenadante foi removido para um novo microtubo de 1,5 mL. Logo após, 60 μL de Hidróxido de Amônio a 10% foi adicionado para neutralizar o ácido. Aliquotas de 150 μL do sobrenadante foram lidas em triplicata num comprimento de onda de 405 nm em uma placa de 96 poços e determinada a intensidade de marcação.

3.6.4 Extração de RNA Total para PCR em tempo real

O RNA foi extraído das células para realização dos experimentos de PCR em tempo real divididos em 2 experimentos. No primeiro experimento o RNA foi extraído após 10 dias da subcultura obtida a partir de fragmentos ósseos de animais mortos 24 horas após a expansão rápida da maxila e exposição ao laser de baixa potência com seu respectivo controle. No segundo experimento o RNA foi extraído aos 14 dias da subcultura obtida a partir de fragmentos ósseos de animais mortos 48 horas após a disjunção e exposição ao laser e seu respectivo controle.

A extração do RNA total foi iniciada utilizando-se o reagente Trizol LS (Invitrogen Corporation, EUA). As células foram lavadas com 10 ml de solução salina tamponada com

fosfato (PBS, Gibco) e incubadas com cerca de 8 ml de Trizol LS por 30 minutos à temperatura ambiente. A seguir, a solução foi transferida para um tubo de centrífuga de 15 ml, aos quais foram adicionados 1,6 mL de solução salina 0,9% previamente tratada com dietilpirocarbonato -DEPC- (Acros, EUA) e 1,6 mL de clorofórmio (Merck, Alemanha). Os tubos foram agitados por 30 segundos e mantidos a temperatura ambiente por 5 minutos. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 12000g durante 15 minutos a 4°C. As fases aquosas (superior) foram coletadas em tubos limpos e o RNA precipitado com 5 mL de isopropanol (Merck) durante, no mínimo, 24 horas a -20°C. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 12000g (giros) por 10 minutos a 4°C. O precipitado formado foi lavado por duas vezes com etanol 70% (Merck) e centrifugado a 7500 g por 5 minutos. Na última lavagem, os tubos foram vertidos e deixados secar a temperatura ambiente por 5-10 minutos. Os precipitados foram dissolvidos em 20 µL de água previamente tratada com DEPC. Em seguida 3 µg de RNA foram submetidos ao tratamento com DNase (Invitrogen) conforme recomendação do fabricante. Para isso, foram adicionados à amostra 1 µl de tampão, 1 unidade de DNase livre de RNase, e o volume foi ajustado em 10 µl com água DEPC. A amostra foi submetida a 37°C por 1 hora no termociclador. O RNA foi novamente quantificado e 1 µg foi utilizado para a confecção do cDNA. A avaliação da integridade do RNA foi confirmada por meio de eletroforese em gel de agarose desnaturante a 1,5% (m/v). O gel foi preparado dissolvendo-se 3g de agarose (Gibco) em 144 ml de água DEPC. Em seguida, a mistura foi incubada em banho-maria a 65°C e, então, adicionada: 20 ml de tampão de corrida [10× – acetato de sódio (Merck) 50 mM, EDTA (Merck) 5 mM, ácido morfolinopropanalsulfônico (Sigma) 100 mM e 36 ml de formaldeído 12,3 M (Merck)]. A mistura foi acondicionada em recipientes adequados para moldagem do gel.

Ao RNA total (2 µg) foram adicionados 2 µl de tampão de corrida (5×), 3,5 µl de formaldeído 12,3 M e o volume foi ajustado em 10 µl com formamida (Merck). A mistura foi

mantida a 85°C por 10 minutos e, em seguida, resfriada a 4°C. No momento da aplicação das amostras no gel foram adicionados 2 µl de brometo de etídeo (10 mg/ml – Sigma). A eletroforese foi conduzida a 80 v durante 1 a 2 horas, utilizando tampão de corrida 1×. Após esse período, o gel foi visualizado por iluminação ultravioleta (UV) a 300 nm. A caracterização de RNA mensageiro (RNAm) de boa qualidade foi verificada pela visualização de duas subunidades ribossômicas características nos eucariotos (18S e 28S). tratados com DNase de acordo com as especificações estocados no freezer a -80°C.

3.6.5 Confeção da fita de DNA complementar (cDNA)

Em seguida, o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 2µg de RNA, pela reação de transcrição reversa, com a utilização do kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystem). Reações em cadeia da polimerase (PCRs) foram realizadas utilizando a enzima *Taq* polimerase (Gibco) no termociclador PTC-100 (MJ Research, Watertown, MA). As condições básicas da reação foram: 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 42°C e 2 minutos a 72°C, acrescidos de um passo de extensão final de 7 minutos a 72°C. Todas as amostras também foram submetidas a reações para a detecção de RNA mensageiro para o gliceraldeído fosfato desidrogenase (GADPH) um gene de expressão constitutiva, utilizado como controle positivo da reação de amplificação. Uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada par das seqüências dos *primers* utilizados.

3.6.6 Quantificação das mensagens por reações de Real Time PCR

A expressão quantitativa de genes de fatores de transcrição foi analisada através de reações de Real Time PCR, utilizando-se o sistema SYBR Green e o aparelho CFX 96 Bio-

Rad (CA). Esse sistema realiza as reações de amplificação, detecção e quantificação as amostras através de nucleases fluorogênicas utilizadas na reação, sendo a expressão normalizada com base em controles endógenos. *Primers* adequados para tais reações foram criados a partir do programa Primer Express (Applied Biosystems, Warrington, UK), específico para esta tarefa (Tabela 2). O DNA complementar (2,5 ng/reação) sintetizado a partir do RNA mensageiro e *primers* específicos (1-2 µg/reação) foram utilizados juntamente com reagentes SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK), como determinado pelo fabricante. As reações compreenderam 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, e quarenta ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 56°C, além de um ciclo final de vinte minutos, com temperatura crescente de 60 a 95°C, para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação. As condições de PCR para cada *primer* utilizado foram padronizadas de acordo com a concentração do *primer*, ausência de formação de dímeros e eficiência de amplificação dos genes alvos e controle interno (gene constitutivo). A positividade das reações foi determinada baseada em controles negativos, ou seja, animais que não sofreram nenhuma intervenção experimental. Os resultados foram analisados com base no valor de TC (ciclo limiar) ou linha de corte, definido após a reação, sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos onde a amplificação atingiu um dado limiar, que permitiu a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. Os cálculos para determinação da expressão relativa dos genes alvo foram realizados utilizando o método $\Delta\Delta C_t$ (Livak e cols, 2001), normalizando os dados em relação à expressão constitutiva de GAPDH em cada amostra. As seqüências dos genes utilizados estão expressas no quadro 3.

Alvo*	Sequência Sense and anti-sense	T.A. (°C)	T.M. (°C)	Produto
GADPH	AAATGCTTCTAGGCGGACTG GGTTTTGTCAAAGAAAGGGTG	58	78	60
ALP	CCAACCTCATTTGTGCCAGAG CAGGGCATTTCCTCAAGGTCTC	57	74	75
RUNX2	CACAAACAACCACAGAACCAC TTGCTGTCCTCCTGGAGAAA	56	77	137
COL	CCAACGAGATCGAGCTCAGG GACTGTCTTGCCCCAAGTTCC	61	83	113
OC	GCAGACACCATGAGGACCCT CCGGAGTCTATTCACCACCTTACTG	61	83	153
BSP	CTACTTTTATCCTCCTCTGAAACGGTT GCTAGCGGTTACCCCTGAGA	59	81	202

*GADPH - gliceraldeído fosfato desidrogenase; ALP – fosfatase alcalina; RUNX2 – runt related factor 2; OC – osteocalcina; COL – colágeno tipo 1 alfa I; BSP – sialoproteína óssea;

TA – Temperatura de Anelamento

TM – Temperatura de Melting

bp – Produto

Quadro 3- Sequências de *primers* e propriedades da reação

3.7 Análise estatística

Para grupo foi realizado um experimento, utilizando-se para isso células de cinco ratos para cada grupo. Para cada grupo experimental e para cada parâmetro as avaliações foram realizadas em quintuplicata. Os dados foram submetidos à Análise de Variância (Two Way - ANOVA), seguida do teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Proliferação Celular

A avaliação da proliferação celular dos animais sacrificados após 24 horas da expansão rápida da maxila e aplicação do laser indicou que o tratamento com laser de baixa potencia aumentou o número de células aos 7 ($p= 0, 0002$) e 10 ($p=0, 0002$) dias de cultura, porém não alterou o número de células aos 3 dias (Figura 5).

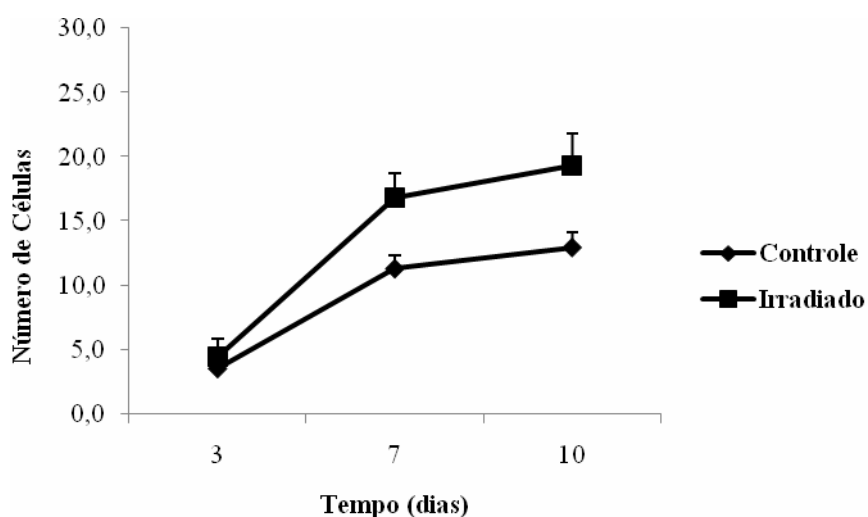


Figura 5- Efeito da radiação laser na proliferação de células osteoblásticas derivadas de fragmentos de osso de ratos cultivadas por 3,7 e 10 dias.

A avaliação da proliferação celular dos animais sacrificados após 48 horas da expansão rápida da maxila e aplicação do laser de baixa potência indicou que o grupo tratado com laser teve um aumento no número de células no 10º dia ($p=0,0001$) após a cultura celular, porém não alterou no 3º e 7º dias (Figura 6).

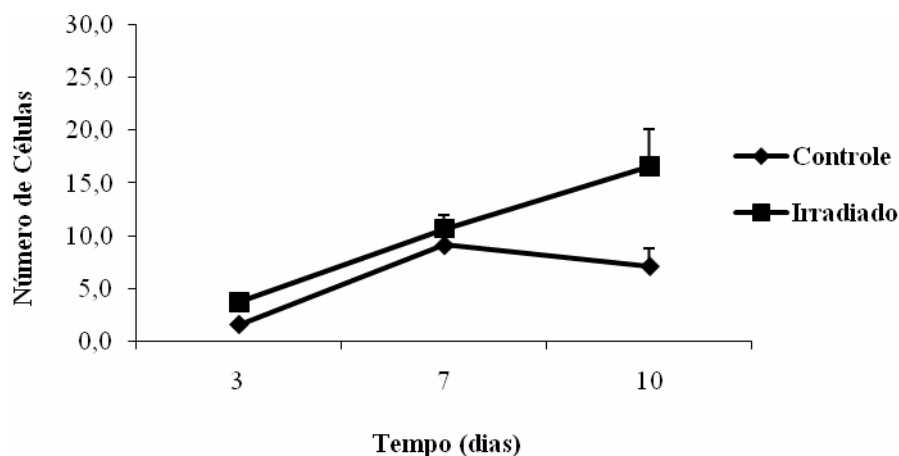


Figura 6- Efeito da radiação laser na proliferação de células osteoblásticas derivadas de fragmentos de osso de ratos cultivadas por 3,7 e 10 dias.

A avaliação da proliferação celular dos animais sacrificados após 7 dias da expansão rápida da maxila e aplicação do laser de baixa potencia que no grupo tratado com laser houve um aumento no número de células no 10º dia pós cultura ($p=0,010$), porém não ocorreu o mesmo no 3º e 7º dias (Figura 7).

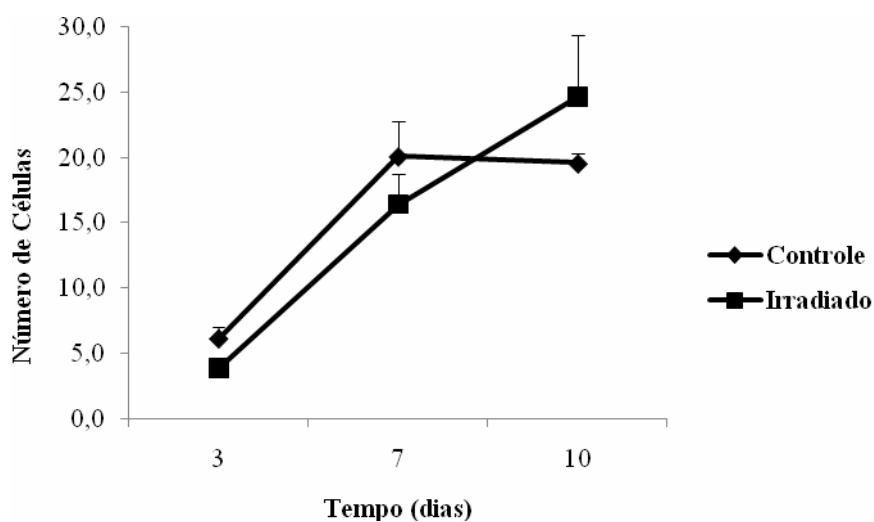


Figura 7 - Efeito da radiação laser na proliferação de células osteoblásticas derivadas de fragmentos de osso de ratos cultivadas por 3,7 e 10 dias.

4.2 Atividades de Fosfatase Alcalina (ALP)

A atividade da ALP nos animais de 24 hs após a expansão rápida da maxila foi maior no grupo irradiado no 7º dia de cultura ($p=0,001$) e no 14º dia de cultura do que o grupo não irradiado (Figura 8).

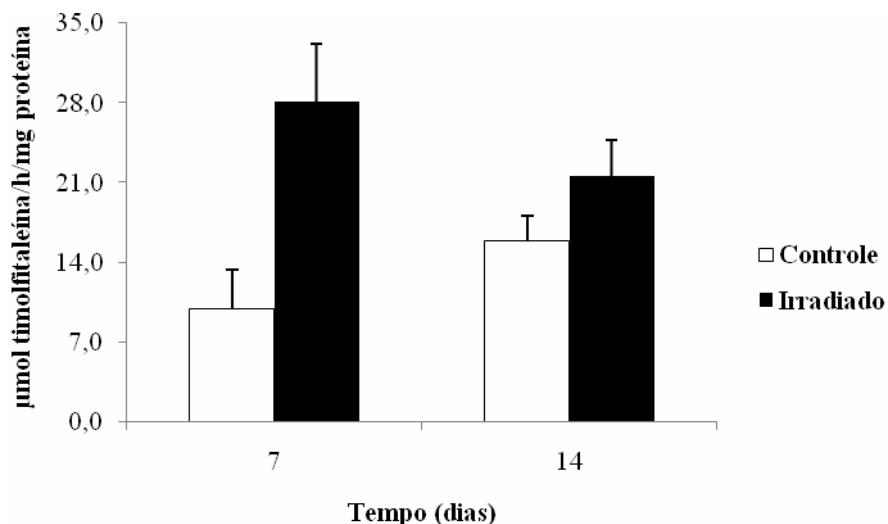


Figura 8- Efeito da radiação laser na atividade de ALP de células osteoblásticas derivadas de fragmentos de osso de ratos cultivadas por 7 e 14 dias.

A atividade de ALP nos animais de 48 horas de cultura após expansão rápida da maxila foi maior no grupo irradiado no 7º dia e no 14º dia com $p=0,0001$ (Figura 9).

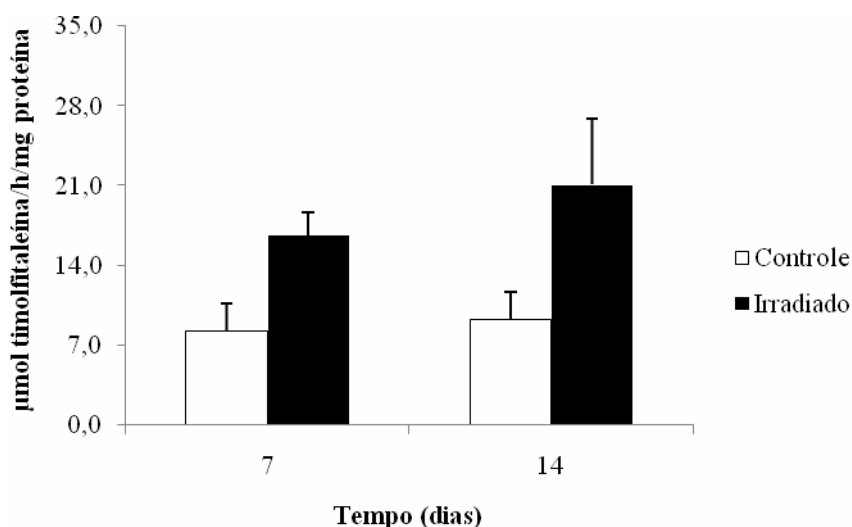


Figura 9- Efeito da radiação laser na atividade de ALP de células osteoblásticas derivadas de fragmentos de osso de ratos cultivadas por 7 e 14 dias.

A atividade de ALP nos animais após a expansão rápida da maxila e com período de cultura de 7 dias foi maior no 7º dia e no 14º no grupo irradiado com $p=0,03$ (Figura 10).

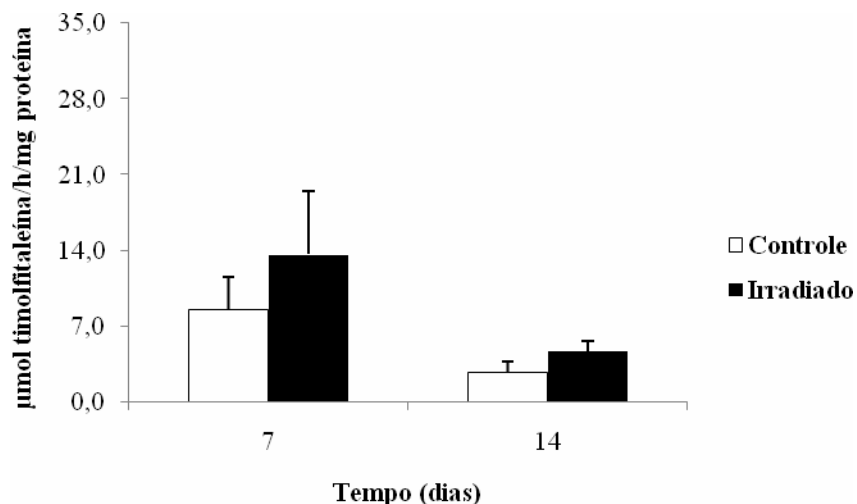


Figura 10- Efeito da radiação laser na atividade de ALP de células osteoblásticas derivadas de fragmentos de osso de ratos cultivadas por 7 e 14 dias.

4.3 Formação de nódulos de mineralização

A formação de matriz mineralizada avaliada pela incorporação do vermelho de alizarina aos 17 dias de cultura no grupo de 24 horas revelou maior formação de mineralização nas culturas irradiadas do que nas não irradiadas ($p<0,05$) (Figura 11).

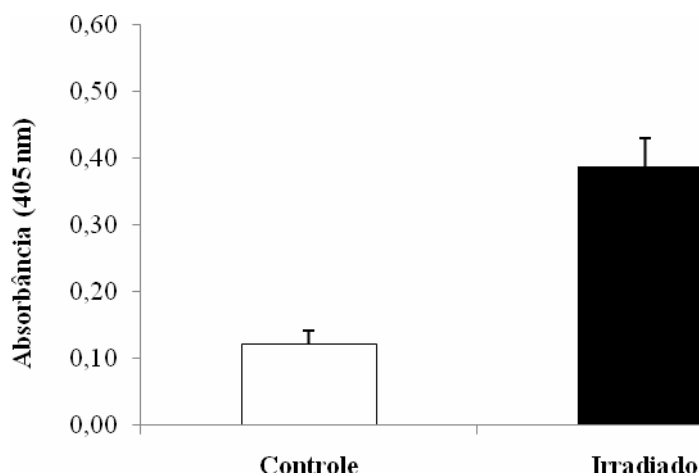


Figura 11- Efeito da radiação laser na formação da matriz mineralizada de células osteoblásticas derivadas de fragmentos de osso de rato cultivadas por 17 dias.

A formação de matriz mineralizada (figura 12) avaliada pela incorporação do vermelho de alizarina aos 17 dias de cultura no grupo de 48 horas revelou diferença significativa entre culturas irradiadas e não irradiadas ($p < 0,05$).

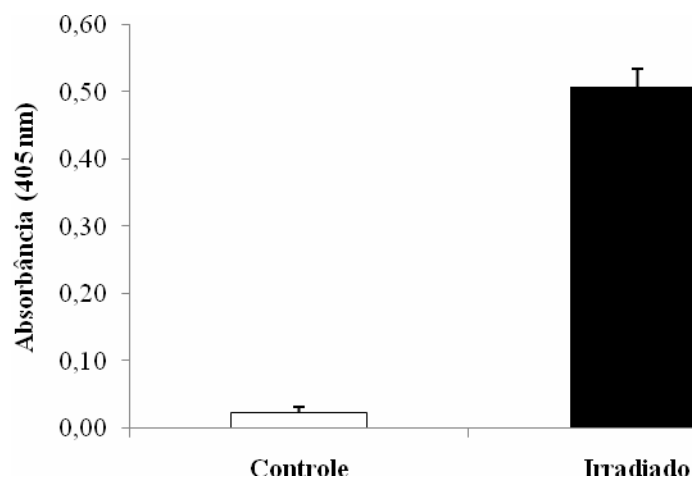


Figura 12- Efeito da radiação laser na formação da matriz mineralizada de células osteoblásticas derivadas de fragmentos de osso de rato cultivadas por 17 dias.

A formação de matriz mineralizada (figura 13) avaliada pela incorporação do vermelho de alizarina aos 17 dias de cultura no grupo de 7 dias revelou diferença significativa entre culturas irradiadas e não irradiadas ($p < 0,05$).

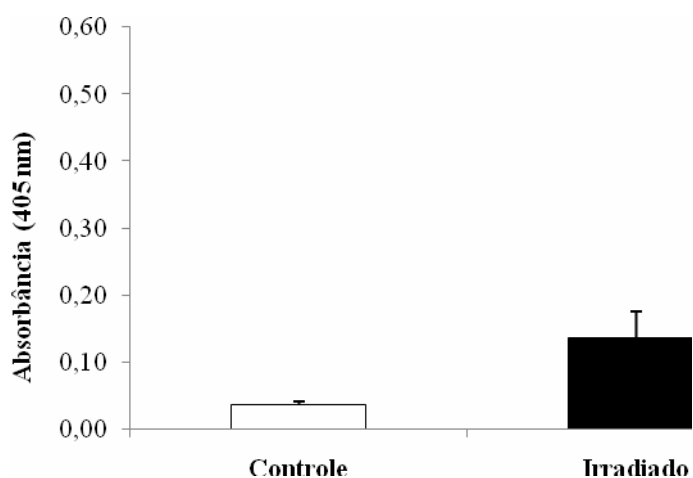


Figura 13- Efeito da radiação laser na formação da matriz mineralizada de células osteoblásticas derivadas de fragmentos de osso de rato cultivadas por 17 dias.

A seguir (figura 14) seguem-se fotos de culturas de células de todos os períodos correspondentes ao grupo de 7 dias.

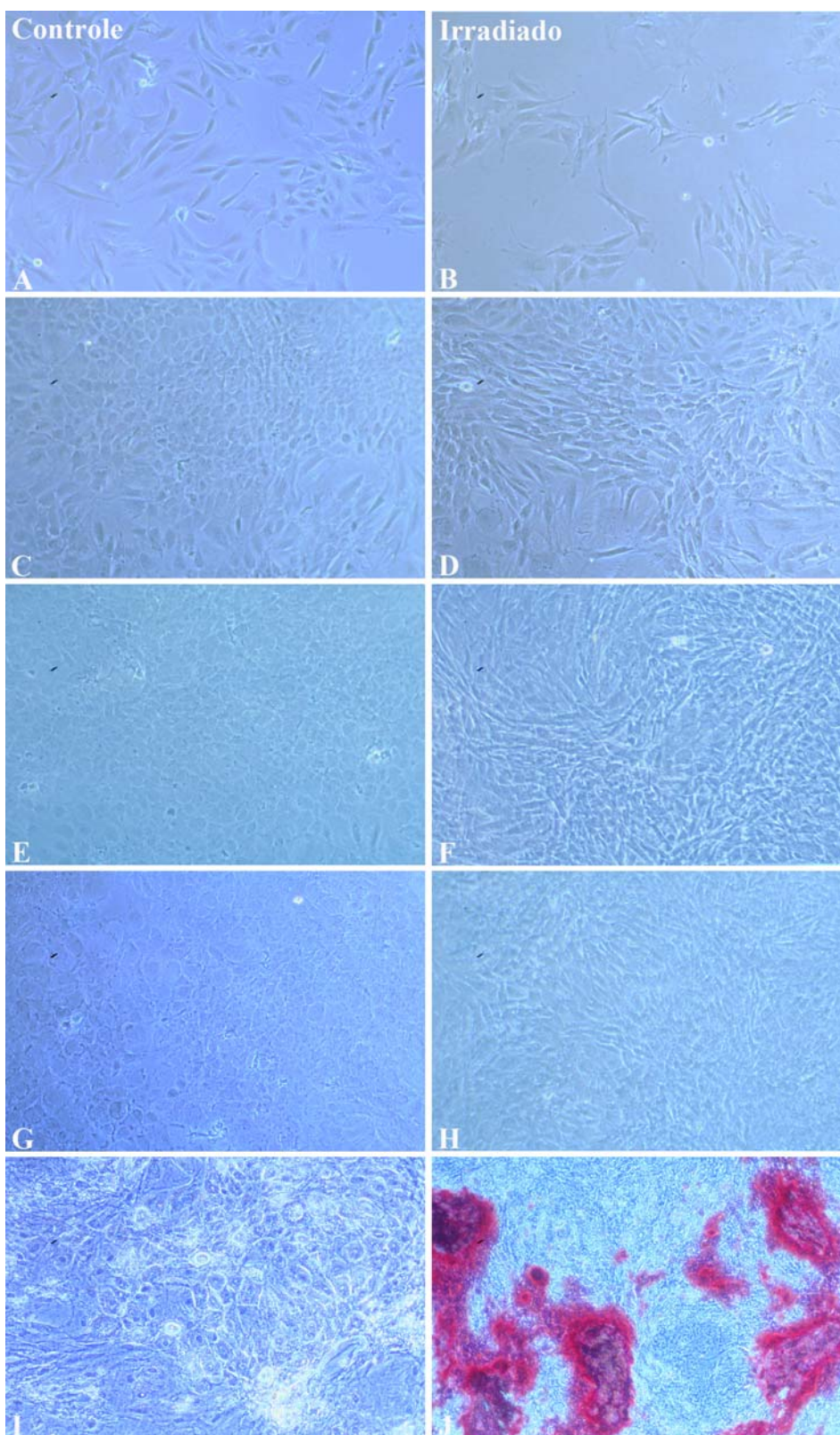


Figura 14. Cultura de células. Figuras A, C, E, G e I é grupo controle respectivamente 3, 7,10, 14 e 17 dias de cultura celular. Figuras B, D, F, H e J é grupo irradiado respectivamente 3, 7, 10, 14 e 17 dias de cultura celular. Todos observados e fotografados ao microscópio óptico na objetiva de 40 x. Figuras I e J foram submetidas à mineralização através do corante de vermelho de alizarina.

4.4 Expressão gênica avaliada por PCR em tempo real

O estudo da expressão gênica das células osteoblásticas obtidas a partir da sutura palatina após expansão rápida da maxila indicou que o laser, aplicado *in vivo*, após a expansão rápida da maxila aumentou a expressão relativa do RNA mensageiro para ALP ($p < 0,01$), RUNX2 ($p < 0,01$), COL ($p < 0,01$), OC ($p < 0,01$) e BSP ($p < 0,01$). O laser aumentou a expressão dos marcadores do fenótipo osteoblástico independentemente do momento da extração das células: após 24, 48 e 72 horas da expansão da maxila. O maior aumento na expressão relativa da ALP, COL, OC e BSP foram observados no grupo em que as células osteoblásticas foram extraídas 48 horas após a expansão rápida da maxila, seguida do grupo no qual as células foram extraídas após 24 horas e por último após 7 dias. A expressão relativa do RNAm para RUNX2 foi igualmente maior nas células osteoblásticas extraídas após 48 e 24 horas (Figura 15).

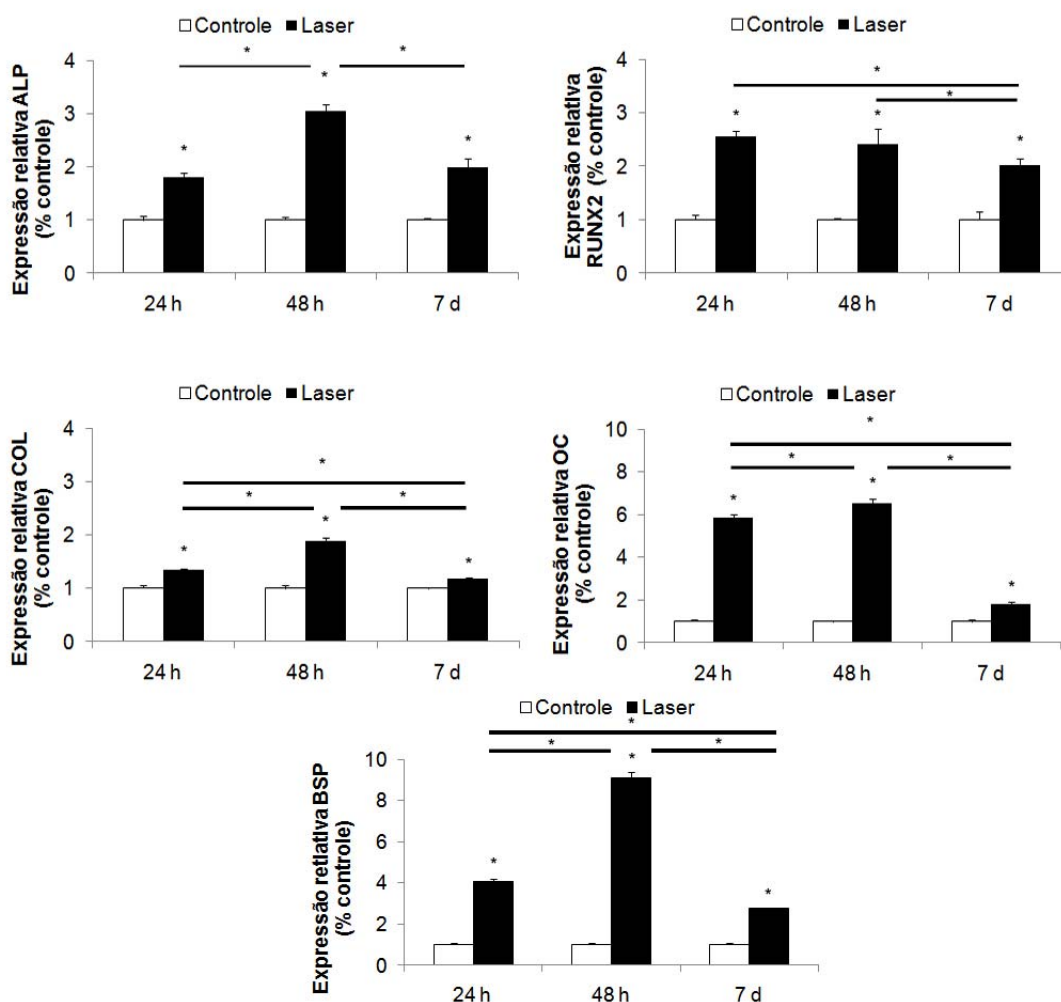


Figura 15. Expressão relativa do RNAm para ALP (fosfatase alcalina), RUNX2 (runt related factor 2), OC (osteocalcina), COL (colágeno tipo 1 alfa I) e BSP (sialoproteína óssea) na cultura de células osteoblásticas obtidas da sutura palatina após 24, 48 horas ou 7 dias da expansão rápida da maxila submetida ou não à uma única aplicação do laser diodo de As-Ga-Al.

5 DISCUSSÃO

A radiação laser possui um comprimento de onda com capacidade para alterar o comportamento celular mesmo na ausência de aquecimento significativo. A dispersão da luz laser nos tecidos é muito complexa. Vários estudos indicam que o osso mostra aumento de proliferação celular osteoblástica e neoformação óssea em comparação com grupos não irradiados. Alterações mitocondriais também foram sugeridas como sendo responsáveis pelos resultados positivos da terapia com laser. A resposta fotobiológica pode ser devido à absorção de um determinado tipo de onda por alguns fotorreceptores moleculares desconhecidos que participa de reações metabólicas sobre a célula o que pode não estar diretamente relacionada à resposta a luz laser (PINHEIRO; GERBI; 2006).

Em função da diversidade metodológica dos estudos envolvendo a laserterapia, os resultados obtidos nos diferentes estudos não podem ser comparados (LUGER et al, 1998; TAKEDA, 1998; BARUSHKA et al, 1995). Mester, 1989 e Sarti et al, 1995 relataram que o laser de baixa potência possui efeito sistêmico, o que deve explicar os resultados negativos de outros autores que também utilizaram amostras de animais controle e irradiados no mesmo animal (DAVID et al, 1996). Considerando os efeitos sistêmicos da laserterapia, não é indicado utilizar o mesmo animal como controle nos estudos envolvendo laser.

No presente trabalho, foi avaliado o efeito da radiação do laser diodo de As-Ga-Al em osteoblastos derivadas do osso obtido da sutura palatina de ratos Wistar submetidos à disjunção palatina e subsequente radiação ou não de laser. Essa fonte de laser foi utilizada no presente estudo por tratar-se de equipamento indicado para uso Odontológico. As avaliações *in vitro*, possibilitaram o desenvolvimento de um estudo em ambiente controlado.

O efeito do laser de baixa potência tem sido relatado por diversos autores, no entanto seu mecanismo de ação ainda é controverso (FUKUHARA et al, 2006).

A dose utilizada no presente estudo (54 J/cm^2) bem como o período de aplicação foi selecionada baseada em outros estudos (TAKEDA 1988; ORIKASA, SHIMAKURA, KUSAKARI 1989; NAGASAWA, KATO, NEGISHI, 1991). Embora em tais estudos fosse utilizada a dose de densidade de energia próximo de 54 J/cm^2 , não há padronização de um protocolo a ser seguido.

Os períodos de avaliação foram selecionados de acordo com o estudo de Beck (2003), que mostrou utilizando culturas de células da linhagem MC3T3-E1, observou que a osteogênese *in vitro* se dá em um período de 21 dias divididos em 3 principais fases: período proliferativo (3°. ao 10°. dias), de diferenciação (7°. ao 14°. dias) e de formação de matriz mineralizada (14°. a 21°. Dias).

Os resultados do presente estudo sugeriram que, independentemente do tratamento ao qual foram submetidas, as células derivadas do osso da sutura palatina proliferaram e desenvolveram o fenótipo osteoblástico, uma vez que apresentaram atividade de ALP, formaram matriz mineralizada e expressaram proteínas e genes considerados marcadores do fenótipo osteoblástico (AUBIN et al. 1998; HASSAN et al., 2004; STEIN et al., 1996). No entanto, a radiação laser produziu diferenças significativas no comportamento das células que serão discutidas a seguir.

Os grupos controle seguiram o padrão de proliferação celular observado por Beck (2003) onde a partir do sétimo dia as células tendem a diminuir o crescimento, pois estão entrando na fase de diferenciação. Os grupos irradiados, porém, mantiveram uma atividade proliferativa aumentada mesmo após esse período, mostrando um possível efeito do laser sobre a proliferação, que parece diminuir com o tempo, pois no grupo morto 24 horas após a aplicação, o número de células no grupo irradiado era maior aos 7 e 10 dias, enquanto que os grupos mortos 48 horas e 7 dias após a aplicação esse aumento só pode ser observado aos 10 dias. Esse aumento na proliferação celular após exposição à radiação laser já foi relatado por

outros autores, utilizando células de diferentes linhagens (UEDA; SHIMIZU, 2003, OZAWA, 1998). No entanto Saito e Shimizu 1997 relataram que o laser de As-Ga-Al não influenciou nos testes de proliferação celular em ratos, assim como Coombe et al, 2001 que mostraram não haver aumento significativo da proliferação celular no grupo experimental irradiado. No entanto nesse estudo a dose aplicada foi feita *in vivo* e, portanto a dose é maior que as *in vitro*, pois as barreiras transpostas *in vivo* são maiores por incluírem vários tecidos. Saito e Shimizu 1997 expandiram a sutura palatina de ratos e acharam regeneração acelerada desde que essa aceleração não fosse feita em períodos tardio ou em dose única. Ueda e Shimizu, 2003 irradiaram com laser As-Ga-Al (83 ηm , 500 mW, 0,048 - 3,84 J/cm²) células da linhagem osteoblástica isoladas da calvária de fetos de ratos de quatro diferentes modos de irradiação: irradiação contínua, e irradiação pulsada com 1, 2, e 8-Hz. Eles relatam que vários efeitos foto-bioestimulatório do laser de baixa intensidade foram observados, porém esses efeitos se manifestaram de maneira diferente de acordo com vários fatores incluindo dose total de energia, fase de irradiação e densidade de potencia. Apesar desse e de outros estudos não deverem ser diretamente comparados com o nosso estudo, fica claro a influência do laser de baixa intensidade nas respostas biológicas. Coombe et al, 2001 irradiou células da linhagem de osteossarcoma humano (SAOS-2) com laser de diodo As-Ga-Al (830 ηm , potencia 90 mW, nível de energia 0,3,05,1,2 e 4 J) com uma dose única ou doses diárias durante 10 dias. No seu estudo, porém a irradiação não mostrou efeitos consistentes no comportamento das células. Além desses. Nicolau et al 2003, estudando atividade das células ósseas após irradiação com com laser de As-Ga-Al (660 ηm , 5 mW) e encontraram que a atividade foi mais alta nos grupos irradiados do que nos grupos controle em relação a volume ósseo, aposição mineral, osteoclastos e concluíram que a laserterapia aumenta a atividade das células ósseas (osteoblastos e osteoclastos) ao redor do local de reparo sem modificar a estrutura óssea.

A fosfatase alcalina é uma enzima expressa por osteoblastos durante sua atividade e é um marcador sistêmico da formação óssea. A presença da fosfatase alcalina é essencial para que ocorra o processo de mineralização (AUBIN et al. 1998). Independentemente do período em que as células foram extraídas da sutura palatina após a expansão da maxila e aplicação do laser, a laserterapia estimulou a expressão da ALP. O aumento na atividade da fosfatase alcalina (ALP) foi observado tanto pelo ensaio bioquímico como pelo estudo da expressão gênica que indicou aumento no RNA mensageiro para essa enzima. Esses resultados sugerem que o laser estimulou a diferenciação osteoblástica uma vez que atividade de ALP é considerada um bom marcador para a atividade osteoblástica (BARUSHKA et al 1995).

Alguns resultados corroboram para os achados desse trabalho como Guzzardella, 2002 que usando modelos *in vitro* observou uma alta atividade de ALP no grupo irradiado em relação ao grupo controle, o que foi observado também por Barushka, 1995 em modelos *in vivo*. Guzzardella et al, 2002 irradiou defeitos ósseos em fêmures de ratos com laser de As-Ga-Al (780 nm, potencia 1W, emissão pulsada na frequência de 200 Hz em 0 minutos, 300 J/cm², durante 10 dias consecutivos) seus achados na atividade de ALP/PT sugerem que a exposição ao laser estimula os osteoblastos mesmo porque foi observado uma aceleração do reparo nos defeitos observada *in vitro* após apenas 3 semanas. Barushka et al, 1995 irradiou defeitos em tibia de ratos com laser de He-Ne (632 nm, na potencia 6 mW, e dose de 31 J/cm²) onde foi observado uma associação entre picos da ALP e reparo ósseo. No entanto o tratamento com laser de baixa intensidade não teve efeito significativo nos achados de Nissan et al, 2006, pois não encontrou atividade de fosfatase alcalina em todos os grupos irradiados, indicando que não houve atividade osteoblástica no processo de neoformação óssea em implantes osseointegrados. Esses autores irradiaram defeitos ósseos em mandíbulas de ratos com laser de As-Ga-Al usando 4 e 24,4 mW de densidade de potencia (904nm em diferentes tempos 1,2 e 4 semanas) onde foi observado melhora no reparo da ferida devido à aceleração da

epitelização ao alto grau de vascularização e aumento da síntese de colágeno. Porém não observou aumento da atividade de fosfatase alcalina.

O estudo da expressão gênica de outros marcadores do fenótipo osteoblástico além da ALP corroborou a idéia de que o laser estimulou a diferenciação osteoblástica. O RUNX2 está associado ao processo da diferenciação osteoblástica (PREGIZER et al., 2008), e a BSP, OC e o COL estão relacionados ao processo de mineralização (AUBIN et al. 1998), sendo todos genes marcadores de atividade osteoblástica. Independentemente do período pós-operatório em que as células foram extraídas da sutura palatina, a expressão de RUNX2, COL, OC e BSP foi significativamente maior nas células obtidas dos animais submetidos ao tratamento com laser. Além disso, esse aumento é ainda mais evidente quando as células foram extraídas 48 horas após a expansão da maxila e aplicação do laser. O aumento na expressão dos marcadores de atividade osteoblástica sugere uma maior atividade das células submetidas à laserterapia. Os mecanismos envolvidos nesses efeitos estimulatórios do laser são controversos nas células existem cromóforos absorvedores de luz vermelha que são proteínas transportadoras de elétrons da cadeia respiratória celular, localizados nas cristas mitocondriais, representados por: citocromos, citocromos oxidase e flavoproteínas. Ao absorver a energia, essas proteínas desencadeiam um processo de oxidação das moléculas de NAD (dinucleotídeo de nicotinamida e adenina), altera o transporte de elétrons na cadeia respiratória, elevando a quantidade de ATP mitocondrial e a acidez do meio intracelular. Com a alcalinização do citoplasma, a permeabilidade da membrana plasmática aos íons cálcio se eleva e afeta o nível de nucleotídeos cíclicos envolvidos na síntese de DNA e RNA, o que altera as atividades celulares. Além disso, os incrementos de ATP modificam o metabolismo celular, fornecendo energia para inúmeras reações bioquímicas.

Os lasers infravermelhos atuam diretamente na abertura da bomba de sódio e potássio da membrana citoplasmática, de modo que a saída de íons sódio e a entrada de íons potássio

para o meio intracelular sejam favorecidas. Em virtude da alteração do potencial da membrana, efeitos fotofísicos e fotoelétricos promovem choques entre as células, favorecendo a síntese de ATP. Outro acontecimento relevante é o aumento da concentração citoplasmática de cálcio, mensageiro intracelular envolvido na duplicação e replicação das fitas de DNA e RNA, respectivamente (Passarela, 1984).

O aumento na expressão dos marcadores do fenótipo osteoblástico nas células derivadas dos animais submetidos à laserterapia é corroborado pelo aumento na mineralização. Em todos os períodos avaliados observou-se maior formação de matriz mineralizada no grupo irradiado, indicando que esse grupo apresentou maior proliferação, diferenciação bem como maior formação de matriz mineralizada. Esses resultados são consistentes com os resultados de Ozawa et al 1998 e Fukuhara 2006. Ozawa et al 1998, utilizaram células osteoblásticas isoladas de calvária de ratos e aplicaram o laser de As-Ga-Al (830nm, 500mW) em vários estágios da cultura de células relataram após irradiação de laser um aumento na proliferação celular estimulando um grande numero de nódulos ósseos e uma grande área de formação óssea em osteoblastos de calvária de ratos. Eles concluíram que as propriedades do laser não atuaram na osteossíntese por si, mas provavelmente criaram no ambiente, condições que aceleraram a reparação óssea. Esses estudos sugerem que a irradiação de laser deve estimular a proliferação e diferenciação em células da linhagem osteoblástica, aparentando ter efeito direto da irradiação em células osteoblásticas. Fukuhara, 2006 irradiou células de calvária de rato com laser de As-Ga-Al (905 nm; 1,25 J/cm²; 3,75 J/cm²; 6,25 J/cm²) e mostrou que o laser estimulou a formação de matriz mineralizada apenas quando aplicado em fases iniciais (fase osteoblástica de formação óssea) não sendo efetivo em fases tardias (fase de formação de matriz madura e mineralização). Além disso mostrou que a dose aplicada influencia nessa formação. Porém deve ser lembrado que na presente pesquisa a irradiação foi feita *in vivo*, ou seja, a luz laser para atingir o tecido ósseo deve ultrapassar

tecidos moles e vasos sanguíneos. E mesmo com estes anteparos biológicos foi observado um aumento na calcificação óssea como mostrado pelos resultados da mineralização corados com vermelho de alizarina no 17º dia de cultura onde for observado um elevado nível de significância entre o grupo controle e o irradiado ($p < 0,05$).

Os resultados preliminares da aplicação do laser *in vivo* e a observação do comportamento celular *in vitro* mostrou um efeito benéfico nesta metodologia. Mais estudos devem ser realizados visando o uso deste aparato em tratamentos clínicos.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicam que a radiação do laser diodo de As-Ga-Al estimula a expressão do fenótipo osteoblástico em células derivadas do osso alveolar de ratos após expansão rápida da maxila.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA-LOPES, L. Aplicações clínicas do laser não-cirúrgico. In: BRUGNERA, A. Jr; PINHEIRO, A. L. B. **Laseres na odontologia moderna**. São Paulo: Pancast, 1998a. p.99-120.

ALMEIDA-LOPES, L. Análise *in vitro* da Proliferação Celular de Fibroblastos de Gengiva Humana Tratados com Laser de Baixa Potência. 1999. 115 p. **Dissertação (Mestrado em Ciências)** – Universidade do Vale do Paraíba – São José dos Campos-SP. Orientador: Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro.

AUBIN, J.E. Advances in the osteoblast lineage. **Biochem Cell Biol**, v.76, n.6, p.889-910, 1998.

BAIBEKOV I.M., KHANAPIYAEV U. Kh. Healing of bone fractures of rat shin and some immunological indices during magnetic laser therapy and osteosynthesis by ilizarov method. **Bull. Experim. Biol. and Med.**2001, v. 131, n.4, april.

BARUSHKA, O; YAAKOBI T.; ORON, U. Effect of Low-Energy Laser (He-Ne) Irradiation on the Process of Bone Repair in the Rat Tibia. **Bone**. v. 16, nº 1, p. 47-55, 1995

BAUMRIND S., A reconsideration of the propriety of the "pressure-tension" hypothesis. **Am J Orthod**. 1969 Jan; 55(1):12-22.

BECK, G.R.Jr. Inorganic phosphate as a signaling molecule in osteoblast differentiation. **J Cell Biochem**, v.90, n.2, p.234-243, Oct. 2003.

BENEDICENTI A. **Manuale di Laser-Terapia del Cavo Orale**. Ed. Maggioli, Rimini, 1982

BOGATOV, V.V.; DAVYDOV, B.N.; SOLO, V. A. Regeneration of bone tissue after laser osteotomy of mandibule. **Stomatologia, Mosk**. v. 62, p. 12-14, 1983.

BRUDVIK P., RYGH P. The initial phase of orthodontic root resorption incident to local compression of the periodontal ligament. **Eur J Orthod**. 1993 Aug; 15(4):249-63.

BRUGNERA J. A.; ZANIN, F. Tratamento da hipersensibilidade dentinária. In: **Lasers na Odontologia Moderna**, Brugnera J.A. PINHEIRO, A.L.B. -São Paulo:Pancast, 1998, cap.19, p.297-306.

COOMBE, A.R.; HO, C-T.G.; PHILIPS, J.R.; CHAPPLE, C.C.; YUM, L.W.P.; DARENDELILER, M.A.; HUNTER, N. The effects of low level laser irradiation on osteoblastic cells. **Clin. Orthod. Res.**, v.4, n.1, p.3-14, Feb. 2001.

CRUZ R.D. et al. Effects of low-intensive laser therapy on the orthodontic movement velocity of human teeth: A preliminary study. **Laser in Surg. and Med.**, 2004, n 35, p 117-120.

DAVID R, NISSAN M, COHEN I, SOUDRY M (1996) Effect of lowpower HeNe laser on fracture healing in rats. **Lasers Surg Med** 19:458–464.

DEBONI NCZ. Obtenção e caracterização de linhagem de células osteoblásticas. 1995. -f. **Tese (Doutorado em Patologia Bucal)**-Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

DÖRTBUDAK, O; HASS, R.; MAILATH-POKORNY, G. Effect of low-power laser irradiation on bony implant sites. **Clin. Oral Impl. Res.** I 3, p. 288-292, 2002.

FILHO, C.T. Avaliação Biomecânica da Ação da Radiação Laser em Baixa Intensidade no Processo de Osteointegração de Implantes de Titânio Inseridos em Tibia de Coelhos, 2003. **Dissertação (Mestrado X)** - Faculdade de Odontologia. Universidade de São Paulo, São Paulo.

FREITAS A.C., PINHEIRO A.L., MIRANDA P., THIIERS F.A., VIEIRA A.L. Assessment of anti-inflammatory effect of 830nm laser light using C-reactive protein level. **Braz. Dent. J.**, v.3, n. 12, p. 187-90, 2001.

FUKUHARA, E.; GOTO, T.; MATAYOSHI, T.; KOBAYASHI, S.; TAKAHASHI, T. Optimal Low-Energy Laser Irradiation Causes Temporal G2/M Arrest on Rat Calvarial Osteoblasts. **Calcif Tissue Int**, v.79, n.6, p.443-50, Dec. 2006.

GARAVELLO-FREITAS, I.; *et al.* Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 70, p. 81-89, 2003.

GARCIA V.G; et.al. Influência do número de aplicações de raio laser de bioestimulação sobre a reparação de feridas de extração dentária. Estudo Histológico em Ratos. **Rer. Facud. Odontol. Lins.** v. 12, nº 1, p. 29-37, jan/abr. 2000.

GUZZARDELLA, G.A.; *et al.* Stimulation on Bone Defect Healing: An In Vitro Study. **Lasers Med. Sci.** v. 17, p. 216-220, 2002.

HASSAN, M.Q.; JAVED, A.; MORASSO, M.I.; KARLIN, J.; MONTECINO, M.; VAN WIJNEN, A.J.; STEIN, G.S.; STEIN, J.L.; LIAN, J.B. Dlx3 transcriptional regulation of osteoblast differentiation: temporal recruitment of Msx2, Dlx3, and Dlx5 homeodomain proteins to chromatin of the osteocalcin gene. **Mol Cell Biol.**, v.24, n.20, p.9248-61, Oct. 2004.

HONG RK, YAMANE A, KUWAHARA Y, CHIBA M. The effect of orthodontic retention on the mechanical properties of the periodontal ligament in the rat maxillary first molar. **J Dental Res** 1992; 71; 1350-54.

HUGHES B, KING GJ. Effect of orthodontic appliance reactivation during the period of peak expansion in the osteoclast population. **Anat Rec** 1998; 251:80-6.

KANA, J. S. & HUTSCHENREITER, G. Effect of low-power laser radiation on healing of open skin wounds in rats. **Arch.Surg**: v. 116, p. 293-296, 1981.

KARU TI, PYATIBRAT LV, KALENDU GS, ESENALIEV RO. Effects of monochromatic low-intensity light and laser irradiation on adhesion of HeLa cells in vitro. **Lasers Surg Med.** 1996; 18(2):171-7.

KATO S, NEGISHI K, TERANISHI T, ISHITA S. The use of the carp retina in neurobiology: its uniqueness and application for neural network analyses of the inner retina. **Prog Neurobiol.** 1991; 37(4):287-327.

KAWASAKI K., SHIMIZU N. Effects of low-energy laser irradiation on bone remodeling during experimental tooth movement in rats. **Lasers Surg Med**, New York, v. 26, n. 3, p. 282-291, 2000.

KHADRA, M.; HAANAES, H.R.; ELLINGSEN, J.E; LYNGSTADAAS, S.P. Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy. **Oral Surg. Oral Med. Pathol. Oral Radiol. Endod.** v. 97, n. 6, p. 693-700, Jun. 2004.

KHADRA, M.; LYNGSTADAAS, S.P.; HAANÆSA, H.R.; MUSTAFAC, K. Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. **Biomaterials**, v.26, n.17, p.3503–9, Jun. 2005.

KITCHEN, S.S.; PARTRIDGE, C. J. A review of low laser level therapy physiotherapy, v.77, n. 3 p.161-168, mar.1991.

KUCEROVÁ, H.; DOSTALOVA, T.; HIMMLOVA, L.; BARTOVA, J.; MAZANEK, J. Low-level laser therapy after Molar Extraction. **J. Clin. Laser Med. Surg.** v.18, n.6, p.309-315, 2000.

LIRANI, A.P.R. Estudo Comparativo do ultra-som e do laser de baixa intensidade no reparo ósseo de tibia de rato. 2004. 109 p. **Dissertação (Mestrado em Bioengenharia)** - Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. Orientador: Prof. Dr. Orivaldo Lopes da Silva.

LIZARELLI, R.F.Z. Protocolo Clínico Odontológico. Uso do laser de baixa intensidade. **MM Optics Ltda.** 3ª. Edição - Janeiro, 2007.

LUGER EJ, ROCHKING S, WOLLMAN Y, KOGAN G (1998) Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. **Lasers Surg Med** 22:97–102.

MAILHOT JM., BORKE JL. An isolation and in vitro culturing method for human intraoral bone cells derived from dental implant preparation sites. **Clin Oral Implants Res.** 1998 Feb; 9(1):43-50.

MESTER, E.; MESTER, A. F.; MESTER, A. The biomedical effects of laser application. **Lasers Surg Med**, New York, v. 5, n. 1, p. 31-39, 1985.

MESTER A.F, MESTER A. (1989). Wound healing. **Laser Ther** 1:7

MANIATOPOULOS, C.; SODEK, J.; MELCHER, A. H. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. **Cell Tissue Res**, Berlin, v. 254, n. 2, p. 317-330, Nov. 1988.

NAGASAWA, A. Bone regeneration effect of low level lasers including argon laser. **Laser Ther**, v. 3, p. 59-62, 1991.

NANAMI, T.; SHIBA, H.; IKEUCHI, S.; NAGAI, T.; ASANAMI, S., SHIBATA, T. Clinical applications and basic studies of laser in dentistry and oral surgery. **Keio J Med**, Tokyo, v. 42, n. 4, p. 199-201, Dec. 1993.

NEIBURGER, E. J. Accelerated healing of gingival incisions by the helium-neon diode laser: A preliminary study. **Gen Dent**, Chicago, v. 45, n. 2, p. 116-170, Mar. /Apr. 1997.

NICOLAU, R.A. Efeito do Laser de Baixa Potência (As-Ga-Al) em tecido ósseo de rato submetido à lesão, analisado por histomorfometria óssea. Universidade do Vale do Paraíba. 2001. 100 p. **Dissertação (Mestrado EM Engenharia Biomédica)** – Universidade do Vale do Paraíba - São José dos Campos, SP. Orientadores: Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro (Univap); Prof^ª. Dr^ª. Vanda Jorgetti (USP).

NISSAN J., et al. Effect of low intensity laser irradiation on surgically created bony defects in rats. 2006. **J. Oral. Rehabil.** n.33, p.619-624.

OLIVEIRA, J.A.G.P, et al. Ação da irradiação laser (arsênio-gálio) sobre a cronologia do processo de reparo em feridas cutâneas- estudo histológico em ratos. **ROBRAC**, v.6, p.28-31, 1997.

ORIKASA N; SHIMAKURA M; KUSAKARI H. Effects of Al-Ga-As laser in bone histomorphometry. In: Yamamoto H, Atsumi K, Kusakari H, editors. **Lasers in dentistry**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1989:105-9.

OZAWA Y. *et al.* Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone formation in vitro. In: Altshuler GB, Blankenau RJ, Wigdor HÁ, editors. **Advanced Laser Dentistry**. Proc SPIE 1984:281-288; 1995.

OZAWA Y.; SHIMIZU, N.; KARIYA. G.: ABIKO. Y. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. **Bone, Elmsford**. v. 22. n. 4, p. 347-354, Apr. 1998.

PASSARELLA, S., CASAMASSINA, E., MOLINARI, S., PASTORE, D., QUAGLIARIELLO, E., Catalano IM, Cingolani A. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. **FEBS Lett**. 1984 Sep 17; 175(1):95-9.

PINHEIRO, A.L.B. Evolução Histórica e Classificação dos Lasers. In: BRUGNERA JÚNIOR, A. ; PINHEIRO, A.L.B. **Lasers na Odontologia Moderna**, São Paulo: Pancast, 1998 p.19-26.

PINHEIRO, A.L.B; LIMEIRA-JUNIOR, F. A; GERBI, M.E.M.M.; RAMALHO, L.M.P.; MARZOLA, C.; PONZI, E.A.C.; SOARES, A.O.; CARVALHO, L.C.B.; LIMA, H.C.V.; GONÇALVES, T.O. Assesment of bone repair following the use of inorganic bone graft Gen-ox Inorganic and membrane associated or not with 830nm laser light. **International Congress Series**. 1248 p.445-447, 2003.

POGREL, M.; CHEN, J.W.; ZHANG, K. Effects of low-energy Gallium-Aluminium-Arsenide laser irradiation on culture fibro-blasts and keratinocytes. **Laser Surg. Med.** v.4, p. 426-432, 1997.

POURREAU-SCHNEIDER, N.: AHMED. A.; DOUDRY, M.; JACQUEMIER, J.; KOPP, F.; FRANQUIN, J. C.: MARTIN. P. M. Helium-Neon laser treatment transforms fibroblasts Into miofibroblasts. **Am J Pathol, Philadelphia**, v.137, n.1, p.171-178. Jul. 1990.

POURREAU-SCHNEIDER. N.: SOUDRY. M.: REMUSAT. M.; FRANQUIN, J. C.; MARTIN. P. M. Modifications of growth dynamics and ultrastructure after helium-neon laser treatment of human gingival fibroblast. **Quintessence Int Berlin**, v. 20. n. 12, p. 887-893, Sep. 1989.

PREGIZER S, BANIWAL SK, YAN X, BOROK Z, FRENKEL B. Progressive recruitment of Runx2 to genomic targets despite decreasing expression during osteoblast differentiation. **J Cell Biochem.**, v.105, n.4, p.965-70, Sep. 2008.

READ SM.; NORTHCODE DH. Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue dye-binding assay for protein. **Anal Biochem.** 1981 Sep 1; 116(1):53-64.

RIBEIRO M.S. **Curso clínico de laser em odontologia**. Apostila de curso FUNDECTO. São Paulo, USP, 2001.

SAITO, S.; SHIMIZU, N. Stimulatory effects of low-power laser irradiation on boné regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, Saint Louis, v. 111, n. 5, p. 525-532, May. 1997.

SARTI MA, VILLAPLANA LA, TRELLES MA, SMITH V, FERRES E, MONTESINOS M (1995) Transformations in type II leydig cells in the rat after anterior pituitary irradiation with low incident levels of HeNe laser energy. **Laser Ther** 7:119–122.

SAWADA M, SHIMIZU N. Stimulation of bone formation in the expanding mid-palatal suture by transforming growth factor-1 in the rat. **Eur J Orthod** 1996; 18:169-79.

SILVA JÚNIOR. A. N.; *et al.* Computadorized Morohometric Assessment of the Effect of Low-Level Laser Therapy on Bone Repair: Experimental Animal Study. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**. v. 20, nº 2, p. 83-87, 2002.

SUN, X.; ZHU, X.; XU, C.; YE, N.; ZHU, H. Effects of low energy laser on tooth movement and remodeling of alveolar bone in rabbits. **Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi**. v.19, n. 5, p. 290-3. oct. 2001.

STEIN, G.S.; LIAN, J.B.; STEIN, J.L.; VAN WIJNEN, A.J.; MONTECINO, M. Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. **Physiol Rev.**, v.76, n.2, p.593-629, Apr. 1996.

TAKEDA Y. Irradiation effect of low-energy laser on alveolar bone after tooth extraction: experimental study in rats. **Int J Oral Maxillofac Surg** 1988; 17:388-91

TRELLES, M. A.; MAYAYO, E. Boné fracture consolidates faster with low-power laser. **Lasers Surg Med**, New York, v. 7, n. 1, p. 36-45, 1987.

UEDA Y.; SHIMIZU, N. Pulse irradiation of low-power laser stimulates bone nodule formation. **J Oral Sei**, Tokyo, v. 43, n. 1, p. 55-60, Mar. 2001.

UEDA, Y.; SHIMIZU, N. Effects of Pulse Frequency of Low-Level Laser Therapy (LLLT) on Bone Nodule Formation in Rat Calvarial Cells. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v.21, n.5, p. 271-277, Oct. 2003.

VEÇOSO, M. C. Laser em traumatologia. In: **Laser em Fisioterapia**. São Paulo: Editora Lovise, p.65, 1993.

ZEZELL, D. M. Curso Clínico de Laser em Odontologia, apostila de curso **FUNDECTO-USP**, São Paulo, 2001.

YAAKOBI T.; MALTZ, L.; ORON, U. Promotion of Bone Repair in the Cortical Bone of the Tibia in Rats by Low Energy Laser (He-Ne) Irradiation. **Calcified Tissue International**. v. 59, nº 4, p. 297-300, 1996.