

PAULO ESTEVES PINTO FARIA

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA DO
EFEITO DE FÁRMACOS FOTOSSENSÍVEIS ATIVADOS POR LED NO
REPARO ÓSSEO. ESTUDO EM COELHOS**

**Araçatuba – SP
2011**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”**

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA
ÁREA DE CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA BUCO-MAXILO-FACIAL**

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA
DO EFEITO DE FÁRMACOS FOTOSSENSÍVEIS
ATIVADOS POR LED NO REPARO ÓSSEO. ESTUDO EM
COELHOS**

PAULO ESTEVES PINTO FARIA

**Araçatuba - SP
2011**

Paulo Esteves Pinto Faria

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA DO
EFEITO DE FÁRMACOS FOTOSSENSÍVEIS ATIVADOS POR LED NO
REPARO ÓSSEO. ESTUDO EM COELHOS**

Orientador: Luiz Antonio Salata

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Odontologia – Área de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial.

**Araçatuba - SP
2011**

DEDICATÓRIA

À **Deus**, por me proporcionar uma vida cheia de alegrias, paz e muita saúde.

À meus avós **José de Faria e Olívia Esteves Pinto** e aos meus pais **José Jales Faria e Isa Esteves Pinto Faria** que nunca duvidaram do meu potencial e por me apoiarem nos momentos mais difíceis e, principalmente, por estarem comigo nos melhores. Obrigado pela dedicação, incentivo e inspiração para minha vida.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Ao Orientador Professor Dr. **Luiz Antonio Salata** pelo estímulo, amizade e companheirismo.

Ao Professor Dr. **Idelmo Rangel Garcia Junior**, pelo exemplo de profissionalismo e dedicação, que me possibilitaram adquirir novos conhecimentos. O meu sincero e eterno agradecimento.

Ao Professor Dr. **Oswaldo Magro Filho** pela competência, disponibilidade e amizade demonstrada durante todo este curso.

Ao Professor Dr. **Antonio Cláudio Tedesco**, pela disponibilidade em todos os momentos necessários.

À secretária do departamento de cirurgia e amiga **Cleide Lemes da Silva** pela proteção e carinho demonstrados.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, sob direção do Prof. Dr. **Pedro Felício Estrada Bernabé** e Prof^a. Adj. Dra. **Ana Maria Pires Soubhia**, pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, sob direção do Prof. Dr. **Oswaldo Luiz Bezzon** e Prof. Dr. **Valdemar Mallet da Rocha Barros**, pela oportunidade de desenvolver a pesquisa nesta unidade.

À Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial, professores **Tetuo Okamoto, Michel Saad Neto, Idelmo Rangel Garcia Júnior, Osvaldo Magro Filho e Alessandra Marcondes Aranega.**

Aos meus convidados: Professor Dr. Sérgio **Luiz Scombatti Souza** e o Professor Dr. **Liogi Iwaki Filho**, por dividirem neste momento final os seus conhecimentos e muito acrescentarem nesta pesquisa.

Aos colegas de turma do doutorado: **Jéssica Lemos Gulinelli, Thallita Pereira Queiroz e Francisley Ávila Souza** pela amizade e companheirismo.

Aos colegas de pós-graduação: **Abrahão, Albanir, Flávia, Marcos, Rodolpho, Heloísa, Cassiano, Pedro Ivo, Valter, Jônatas e Fernando** pelos momentos compartilhados, pela ajuda, carinho e amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Cirurgia Tetuo Okamoto, **Bernadete, Dirce e Gilmar** pela colaboração e amizade.

Aos funcionários da pós-graduação: **Diogo, Marina e Valéria**, pela ajuda e paciência nos problemas burocráticos.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo suporte financeiro ao projeto de pesquisa e por conceder bolsa de auxílio financeiro ao doutorado.

À minha irmã **Thaís Esteves Pinto Faria** e à minha avó **Alice Moura Faria**.

À minha esposa **Daniela Nair Borges Felipucci**, que está ao meu lado em todos os momentos de nossa vida, me oferecendo sempre sua paciência, bondade e amor. Muito obrigado!

A todas as pessoas que de alguma maneira contribuíram para que mais este passo fosse concluído em minha formação.

FARIA, PEP. **Avaliação histológica e histomorfométrica do efeito de fármacos fotossensíveis ativados por LED no reparo ósseo em coelhos.** 126f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2011.

Palavras-chave: Reparo ósseo, Terapia Fotodinâmica, Fármaco Fotossensível, LED

Resumo

A combinação de um fármaco fotossensível (FS) ativado por luz (vermelha, infravermelho ou ambas) forma uma das vertentes de aplicação da Terapia Fotodinâmica (TFD), que consiste na administração de um FS que posteriormente é ativado pela irradiação do LED ou Laser junto ao tecido, sendo que o FS ou a luz sozinhas, não apresentam citotoxicidade. O presente estudo teve por objetivos estabelecer o potencial regenerador do tecido ósseo para o reparo em calvária de coelho, utilizando três sistemas de liberação de drogas (DDS) de FS, estimulado pela combinação da fotobiomodulação de sistemas LED operando na faixa do visível e infravermelho. Foram utilizados 48 coelhos New Zealand White divididos em 3 grupos: Grupo LED 24/48 (dezoito coelhos) com aplicações de LED 24/48 horas após a cirurgia, Grupo LED 72/96 (dezoito coelhos) com aplicações de LED 72/96 horas após a cirurgia e Controle (doze coelhos) onde não houve aplicação de LED. Nos grupos experimentais foram realizadas 4 perfurações nas calvárias com preenchimento aleatoriamente de 1) Base em gel, 2) nanoemulsão carregada com FS, 3) lipossoma em gel com FS e 4) nanopartículas de albumina (BSA) carregada com FS. No grupo controle foram feitas duas perfurações, uma preenchida por osso autógeno e outra com coágulo. Dezesesseis animais foram submetidos à eutanásia em cada tempo experimental: 5 dias, 10 dias e 20 dias. Lâminas histológicas foram feitas a partir dos defeitos e o osso neoformado foi mensurado. O uso de FS nos DDS não foi efetivo para abreviar o tempo de reparo ósseo em calvária de coelhos nos intervalos de tempo deste estudo.

FARIA, PEP. **Photodynamic Therapy on bone healing in rabbits.** 126p. Thesis (PhD) - University of Dentistry, UNESP – São Paulo State University, Araçatuba, 2011.

Key-words: Bone healing, Photodynamic Therapy, Photosensitivity Drug, LED

Abstract

The combination between photosensitizer substances with laser or LED (light emitting diode) form the photodynamic therapy (PDT) basis that consists of photosensitivity drug activated by low frequency light. This mechanism is used in soft tissue healing process to improve the oxygen tension leading to a fast revascularization. The objective of this study was to evaluate the effects of photosensitivity drugs activated through LED on bone healing process. Forty eight New Zealand White rabbits were underwent to four bicortical calvaria defects made by 6.0 mm trephine drill. The defects were randomly filled up with (1) Gel, (2) Nanoemulsion + photosensitizer drug, (3) Liposome + photosensitizer drug, (4) NPS (nanostructure polymeric system) + photosensitizer drug. After 24/48 hours or 72/96 hours a LED were applied on all the rabbits. Sixteen animals were sacrificed, respectively, at 5, 10 and 20 days after surgery. Histological slides were prepared from each experimental site for histomorphometry and histological analysis. Bone graft was significant higher bone level in all experimental time points.. At 10 days liposome showed higher bone level than Gel ($p=0,0161$). However on 20 days, no difference was detected between the materials. The use of photosensitizer drugs activated by LED demonstrated do not achieve the stimulate bone formation on later time points on thsi presente study.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Fotografia mostrando a calvária do coelho. A incisão foi realizada horizontalmente pela sutura mediana.....68
- Figura 2. Fotografia mostrando a exposição da calvária do coelho.....68
- Figura 3. Fotografia mostrando os defeitos realizados com trefina na calvária de coelho.....69
- Figura 4. Fotografia mostrando a instalação dos materiais nos defeitos de calvária.....69
- Figura 5. Fotografia mostrando os defeitos no grupo controle.70
- Figura 6. Fotografia mostrando a sutura com poligalactina 910 em planos após instalação dos materiais.....70
- Figura 7. Fotografia mostrando a sutura da pele com fio de nylon 5-0.....71
- Figura 8. Fotomicrografia histológica mostrando o retângulo padronizado para mensurar a quantidade de tecido ósseo formado no interior do defeito.....71
- Figura 9. Fotomicrografia histológica mostrando a área de tecido ósseo selecionada em azul para a obtenção das medidas histomorfométricas.....72
- Figura 10. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito do grupo de nanoemulsão aos 5 dias utilizando LED 24/48 horas.....72
- Figura 11. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito do grupo tratado pela nanoemulsão aos 5 dias com aplicação de LED 24/48 horas.....73

Figura 12. Fotomicrografia histológica mostrando em defeito preenchido por nanoemulsão e irradiado com LED 24/48 horas.....	73
Figura 13. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido por lipossoma aos 5 dias com irradiação de LED 24/48 horas.....	74
Figura 14. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito tratado por lipossoma aos 5 dias com aplicação de LED 24/48 horas.....	74
Figura 15. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito tratado por lipossoma aos 5 dias com aplicação de LED 24/48 horas.....	75
Figura 16. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito tratado pela base em gel aos 5 dias com aplicação de LED 24/48 horas.....	75
Figura 17. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito tratado pela base em gel aos 5 dias com aplicação de LED 24/48 horas.....	76
Figura 18. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito tratado pela base em gel aos 5 dias com aplicação de LED 24/48 horas.....	76
Figura 19. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito tratado com BSA aos 5 dias com aplicação de LED 24/48 horas.....	77
Figura 20. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito tratado com BSA aos 5 dias e aplicação de LED 24/48 horas.....	77

Figura 21. Fotomicrografia histológica mostrando defeito tratado com BSA aos 5 dias com aplicações de LED 24/48 horas.....	78
Figura 22. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido pela nanoemulsão aos 10 dias com aplicação de LED 24/48 horas.....	78
Figura 23. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito tratado com nanoemulsão aos 10 dias com aplicação de LED 24/48 horas.....	79
Figura 24. Fotomicrografia histológica mostrando aos 10 dias de tratamento com nanoemulsão e aplicação de LED 24/48.....	79
Figura 25. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido por lipossoma aos 10 dias com aplicação de LED 24/48 horas.....	80
Figura 26. Fotomicrografia histológica mostrando defeito preenchido por lipossoma aos 10 dias com aplicação de LED 24/48 horas.....	80
Figura 27. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido por lipossoma aos 10 dias com aplicação de LED 24/48 horas.....	81
Figura 28. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido pela base em gel aos 10 dias com irradiação de LED 24/48 horas.....	81
Figura 29. Fotomicrografia histológica mostrando defeito preenchido pela base em gel aos 10 dias com irradiação de LED 24/48 horas.....	82
Figura 30. Fotomicrografia histológica mostrando defeito preenchido pela base em gel aos 10 dias com irradiação de LED 24/48 horas.....	82
Figura 31. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido por BSA aos 10 dias com irradiação LED 24/48 horas.....	83

Figura 32. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido por BSA aos 10 dias com irradiação LED 24/48 horas.....	83
Figura 33. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido por BSA aos 10 dias com irradiação LED 24/48 horas.....	84
Figura 34. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido por nanoemulsão aos 20 dias com irradiação LED 24/48 horas.....	84
Figura 35. Fotomicrografia histológica mostrando defeito tratado com nanoemulsão aos 20 dias com irradiação LED 24/48 horas.....	85
Figura 36. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido por nanoemulsão aos 20 dias com irradiação LED 24/48 horas.....	85
Figura 37. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito tratado por lipossoma aos 20 dias com irradiação LED 24/48 horas.....	86
Figura 38. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido por lipossoma aos 20 dias com irradiação LED 24/48 horas.....	86
Figura 39. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido por lipossoma aos 20 dias com irradiação LED 24/48 horas.....	87
Figura 40. Fotomicrografia histológica mostrando o preenchimento do defeito com BSA aos 20 dias e irradiado com LED 24/48 horas.....	87
Figura 41. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito tratado com BSA aos 20 dias com irradiação LED 24/48 horas.....	88

Figura 42. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido pela BSA aos 20 dias com irradiação LED 24/48 horas.....	88
Figura 43. Fotomicrografia histológica da base em gel aos 20 dias com aplicação de LED 24/48 horas.....	89
Figura 44. Fotomicrografia histológica da base em gel aos 20 dias com irradiação LED de 24/48 horas.....	89
Figura 45. Fotomicrografia histológica da base em gel aos 20 dias ativada por LED 24/48 horas.....	90
Figura 46. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido por nanoemulsão aos 5 dias com aplicação de LED 72/96 horas.....	90
Figura 47. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito utilizando nanoemulsão aos 5 dias com aplicação de LED 72/96 horas.....	91
Figura 48. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito utilizando nanoemulsão aos 5 dias com aplicação de LED 72/96 horas.....	91
Figura 49. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito tratado por lipossoma aos 5 dias com aplicação de LED 72/96 horas.....	92
Figura 50. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito tratado com lipossoma aos 5 dias e aplicação de LED 72/96 horas.....	92
Figura 51. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito tratado com lipossoma aos 5 dias e aplicação de LED 72/96 horas.....	93
Figura 52. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido por BSA aos 5 dias e irradiação LED 72/96 horas.....	93

Figura 53. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito tratado por BSA aos 5 dias e irradiação LED 72/96 horas.....	94
Figura 54. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido por BSA aos 5 dias e irradiação LED 72/96 horas.....	94
Figura 55. Fotomicrografia histológica mostrando a base de gel em 5 dias com aplicação de LED 72/96 horas.....	95
Figura 56. Fotomicrografia histológica mostrando a base de gel em 5 dias com aplicação de LED 72/96 horas.....	95
Figura 57. Fotomicrografia histológica mostrando a base de gel em 5 dias com aplicação de LED 72/96 horas.....	96
Figura 58. Fotomicrografia histológica mostrando a base do defeito tratado com nanoemulsão aos 10 dias com irradiação LED 72/96 horas.....	96
Figura 59. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito tratado com nanoemulsão aos 10 dias com irradiação LED 72/96 horas.....	97
Figura 60. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito tratado com nanoemulsão aos 10 dias com irradiação LED 72/96 horas.....	97
Figura 61. Fotomicrografia histológica mostrando a base do defeito preenchido por lipossoma aos 10 dias com irradiação LED 72/96 horas.....	98

Figura 62. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido por lipossoma aos 10 dias com irradiação LED 72/96 horas.....	98
Figura 63. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido por lipossoma aos 10 dias com irradiação LED 72/96 horas.....	99
Figura 64. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito tratado com BSA aos 10 dias e irradiação LED 72/96 horas.....	99
Figura 65. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido por BSA aos 10 dias com irradiação LED 72/96 horas.....	100
Figura 66. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido por BSA aos 10 dias com irradiação LED 72/96 horas.....	100
Figura 67. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido base em gel aos 10 dias com irradiação LED 72/96 horas.....	101
Figura 68. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido base em gel aos 10 dias com irradiação LED 72/96 horas.....	101
Figura 69. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido base em gel aos 10 dias com irradiação LED 72/96 horas.....	102
Figura 70. Fotomicrografia histológica mostrando o preenchimento do defeito por nanoemulsão aos 20 dias com irradiação LED 72/96 horas.....	102

Figura 71. Fotomicrografia histológica mostrando defeito preenchido por nanoemulsão aos 20 dias com irradiação LED 72/96 horas.....	103
Figura 72. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito tratado com nanoemulsão aos 20 dias com irradiação LED 72/96 horas.....	103
Figura 73. Fotomicrografia histológica mostrando o preenchimento do defeito por lipossoma aos 20 dias com irradiação LED 72/96 horas.....	104
Figura 74. Fotomicrografia histológica do defeito preenchido por lipossoma aos 20 dias com irradiação LED 72/96 horas.....	104
Figura 75. Fotomicrografia histológica do defeito preenchido por lipossoma aos 20 dias com irradiação LED 72/96 horas.....	105
Figura 76. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido por BSA aos 20 dias com aplicação de LED 72/96 horas.....	105
Figura 77. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido por BSA aos 20 dias com irradiação de LED 72/96 horas.....	106
Figura 78. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido por BSA aos 20 dias com irradiação de LED 72/96 horas.....	106

Figura 79. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito tratado pela base em gel aos 20 dias com aplicação de LED 72/96.....	107
Figura 80. Fotomicrografia histológica mostrando a base em gel aos 20 dias com irradiação LED 72/96 horas.....	107
Figura 81. Fotomicrografia histológica mostrando a base em gel aos 20 dias com irradiação LED 72/96 horas.....	108
Figura 82. Fotomicrografia histológica da área do defeito ósseo após 5 dias de reparo ósseo no grupo controle com coágulo.....	108
Figura 83. Fotomicrografia histológica mostrando o coágulo aos 5 dias.....	109
Figura 84. Fotomicrografia histológica do osso autógeno aos 5 dias.....	109
Figura 85. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito ósseo aos 10 dias preenchido somente com coágulo.....	110
Figura 86. Fotomicrografia histológica do grupo controle preenchido com coágulo aos 10 dias.....	110
Figura 87. Fotomicrografia histológica do grupo controle utilizando coágulo aos 10 dias.....	111
Figura 88. Fotomicrografia histológica mostrando osso autógeno (OA) aos 10 dias.....	111
Figura 89. Fotomicrografia histológica de osso autógeno aos 10 dias.....	112
Figura 90. Fotomicrografia histológica de osso autógeno aos 10 dias.....	112

Figura 91. Fotomicrografia histológica mostrando o grupo controle com coágulo aos 20 dias.....	113
Figura 92. Fotomicrografia histológica do grupo controle usando coágulo aos 20 dias.....	113
Figura 93. Fotomicrografia histológica do grupo controle usando coágulo aos 20 dias.....	114
Figura 94. Fotomicrografia histológica de osso autógeno aos 20 dias.....	114
Figura 95. Fotomicrografia histológica de osso autógeno aos 20 dias.....	115
Figura 96. Fotomicrografia histológica de osso autógeno aos 20 dias.....	115
Gráfico 1. Gráfico resultados histomorfometria LED após 24/48 horas.....	116
Gráfico 2. Gráfico resultados histomorfometria do LED após 72/96 horas.....	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tabela demonstrando as diferenças estatísticas dos resultados da histomorfometria.

*Letras diferentes representam diferença estatística.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AICIPc - cloro-alumínio-ftalocianina

ATP – Trifosfato de adenosina

BSA - Partículas de soro albumina bovina

CEUA - Comissão de Ética no uso de Animais

DDS – Drug delivery system

EDTA – “Ethylenediamine tetraacetic acid”

FS – Fármaco fotossensível

INPI - Instituto Nacional de Propriedade Industrial

Laser – “light amplification by stimulated emission of radiation”

LED – “light emitting diode”

Lip - Lipossoma

Ltda – Limitada

Nano – Nanoemulsão

PVPI – Polivinil Pirrolidona iodo

ROI – Região de interesse

TFD – Terapia fotodinâmica

VEGF - fator de crescimento vascular endotelial

LISTA DE SÍMBOLOS

μL – Microlitro

μM – Micromolar

$^1\text{O}_2$ – Oxigênio singlete

cm – Centímetro

CO – Monóxido de carbono

E – Energia

J – Joule

kg - Kilograma

kHz - KiloHertz

mg - Miligrama

min – Minuto

ml - Mililitro

mm - Milímetro

mmolL^{-1} – Milimolar

mW - Miliwatt

nm – Nanometro

NO – Óxido nítrico

$^{\circ}\text{C}$ – Graus Celsius

p - Nível de significância

P – Potência

pH - Potencial hidrogeniônico

rpm – Rotações por minuto

s – Segundo

t– Tempo

TM – “Trade mark”

W – Watts

SUMÁRIO

Introdução.....	25
Proposição.....	30
Material e Métodos.....	32
Resultados.....	41
Discussão.....	46
Conclusão.....	55
Referências.....	57
Figuras.....	67
Tabela.....	117
Anexos.....	119

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Vários estudos clínicos e experimentais¹⁻¹¹, relatam o potencial de aceleração da regeneração tecidual através de irradiação com sistemas Laser “light amplification by stimulated emission of radiation” ou do tipo LED “light emitting diode”, ambos operando em baixa intensidade de energia. Resultados *in vitro* da irradiação com lasers de baixa intensidade demonstraram estimulação significativa na formação de matriz óssea em culturas de osteoblastos⁴. Particularmente, a irradiação *in vitro* de culturas osteoblásticas aumentaram tanto a proliferação celular, especialmente do nódulo formador da célula da linhagem de osteoblastos, como a diferenciação celular, resultando no crescimento da matriz óssea¹². No estudo de Stein¹³ e colaboradores (2005), a irradiação de laser de baixa intensidade promoveu a proliferação e maturação de osteoblastos humanos. Por outro lado, estudos experimentais *in vivo* sugeriram a aceleração do reparo em defeitos ósseos padronizados e em fraturas artificiais¹⁻³. Irradiações com laser de baixa intensidade demonstraram efeitos positivos sobre a maturação do osso peri-implantar e a osseointegração de implantes dentários^{7,8,14,15}.

A combinação de um fármaco fotossensível (FS) ativado por luz (vermelha, infravermelho ou ambas) forma uma das vertentes de aplicação da Terapia Fotodinâmica (TFD), que consiste na administração de um FS que posteriormente é ativado pela irradiação do LED ou Laser junto ao tecido, sendo que o FS ou a luz sozinhas, não apresentam citotoxicidade. Essa técnica inovadora tem sido utilizada com sucesso no tratamento de câncer de pele^{16,17}, baseado na evidência de que o fármaco possui baixa toxicidade na ausência de luz e tendência de acumular-se no tecido doente quando estimulado com laser. Nos casos de tratamento de câncer, a luz (tipicamente de 600 a 800 nm) ativa o fármaco que na presença de oxigênio gera oxigênio singlete (1O_2) que é uma espécie altamente reativa que interage de

forma a oxidar vários substratos, que desencadeiam reações com substratos biológicos, levando à interrupção do crescimento tecidual desorganizado.

Os resultados altamente promissores com o uso de TFD têm gerado recentemente um incremento do desenvolvimento e da síntese de novos fármacos. Assim, outros FS (clorinas e bacterioclorinas, derivados do silício ftalocianina e outros) apresentam propriedades diferenciadas daquelas tradicionalmente utilizadas em tratamento de cânceres.

As ftalocianinas foram consideradas excelentes FS para a TFD devido a sua grande estabilidade e pureza química. Possuem também alta absorção de luz nos comprimentos de onda de 600 a 800 nm, exatamente na janela terapêutica da TFD, além de baixa toxicidade *in vitro*¹⁸.

A maioria dos FS são compostos hidrofóbicos e, embora a natureza lipofílica seja uma característica importante - facilitando a passagem desses compostos através das membranas celulares - a baixa solubilidade em água (meio fisiológico) dificulta, entretanto, sua administração sistêmica. Dessa forma, o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos, chamados de “*drug delivery systems*” (DDS), adequados como lipossomas, nanoemulsões, microesferas e nanopartículas se torna necessário, pois possibilita a utilização dos FS pela via intracelular.

O sistema de liberação ideal deve ser capaz de acumular seletivamente o FS no tecido alvo para que ocorra pouca ou nenhuma retenção pelas células adjacentes ao tecido alvo. Além disso, os DDS devem ser capazes de incorporar o FS sem a perda ou alteração de sua atividade. Estes sistemas são biodegradáveis e não alergênicos^{19,20}. A velocidade e a extensão da incorporação no tecido alvo é claramente influenciada pelas propriedades físico-químicas do FS e pelo modo de liberação do fármaco.

Outra razão para a utilização de DDS para incorporação dos FS é permitir que estes sejam administrados na sua forma monomérica²¹. Isso porque devido a sua estrutura química,

a maioria dos FS tende a se agregar em meio aquoso de forma a diminuir o contato das moléculas hidrofóbicas com a água. E esta característica é um dos fatores que diminui a sua eficiência *in vivo*, pois ocasiona uma diminuição da biodisponibilidade e limitação das propriedades fotofísicas, como conversões internas não radiativas, diminuição do tempo de vida do estado triplete e redução da capacidade de fotoexcitação^{22,23}.

Vários sistemas de liberação têm sido propostos como excelentes veículos para compostos fototóxicos instáveis em meio biológico^{24,25}. Dentre estes sistemas foram selecionados para este trabalho os lipossomais, nanoemulsões e as nanopartículas, uma vez que estes sistemas permitem solubilizar fármacos hidrofóbicos em água, mantendo suas características físico-químicas e, além disso, promovem uma distribuição seletiva nos tecidos²⁶.

A ativação dos FS depende diretamente da utilização do LED ou Laser emitindo luz em um comprimento de onda capaz de ativar o FS. A interação da luz com o FS induz a uma série de processos fotofísicos e fotoquímicos envolvendo estados eletrônicos das moléculas de FS, decorrente da interação da reação eletromagnética com a matéria.

Após a absorção de um fóton de luz, o FS passa a popular um estado eletrônico excitado singlete mais energético o que pode então, desencadear interações fotoquímicas²⁷.

Portanto, o sistema de irradiação utilizado possui importante papel na ativação do FS incorporado no DSS. Estes sistemas podem emitir na faixa do visível do espectro eletromagnético, entre 600 a aproximadamente 780 ou 820 nm. A energia dos fótons aumenta a medida em que o comprimento de onda diminui; inversamente, a penetração nos tecidos aumenta com o maior comprimento de onda²⁸. Assim, alguns casos podem se beneficiar do baixo comprimento de onda, no qual a maioria da energia é absorvida na superfície, e em outras condições com maiores comprimentos de onda, permitir uma maior penetração nos tecidos.

A modulação da dose terapêutica e da concentração do ativo levam a condições propícias para a bioestimulação do metabolismo celular. Estudos comprovaram a eficácia da TFD na aceleração da cicatrização de feridas produzidas em tecidos moles^{29,30,31}, assim como para a diminuição de patógenos causadores da doença periodontal e peri-implantite³². Entretanto, não existem estudos na literatura que tenham testado FS e suas possíveis interações com o tecido ósseo *in vivo*.

Considerando os efeitos positivos em modelos de cicatrização de tecidos moles observados em estudos anteriores^{29,33-38}, acredita-se que esses FS associados à combinação de luz visível e infra-vermelha possam acelerar o processo de reparo em defeitos ósseos.

PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve por objetivos estabelecer um protocolo para o potencial regenerador do tecido ósseo para o reparo em calvária de coelho, utilizando lipossomas em gel, nanoemulsão e partículas de BSA como DDS, estimulado pela combinação da fotobiomodulação de sistemas LED operando na faixa do visível e infravermelho.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 48 coelhos New Zealand White do sexo masculino, com seis meses de idade, pesando entre 3,5 e 4,0 kg. Os coelhos foram alojados em gaiolas individuais tendo livre acesso à ração e água durante todo o experimento. Este protocolo experimental (08186532) foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais – CEUA – da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, onde foram realizados os experimentos.

Os animais foram divididos em 3 grupos: Grupo LED 24/48 (dezoito coelhos) com aplicações de LED 24/48 horas após a cirurgia, Grupo LED 72/96 (dezoito coelhos) com aplicações de LED 72/96 horas após a cirurgia e Controle (doze coelhos) onde não houve aplicação de LED. No Grupo LED 24/48 foram realizadas 4 perfurações nas calvárias com preenchimento aleatoriamente de 1) Base em gel, 2) nanoemulsão carregada com FS, 3) lipossoma carregada com FS e 4) nanopartículas de albumina (BSA) carregada com FS. Como FS foi utilizado um derivado de silício ftalocianina para todas as formulações. Após 24 horas do procedimento cirúrgico foi aplicado infravermelho e, após 48 horas, foi aplicado luz visível. O Grupo LED 72/96 foi dividido da mesma maneira, com 4 defeitos na calvária, contudo a aplicação da luz visível ocorreu após 72 horas do procedimento cirúrgico, enquanto que a aplicação da luz infravermelho ocorreu após 96 horas. Já no grupo Controle foram realizados apenas dois defeitos na calvária, com preenchimento aleatório de osso autógeno da própria calvária e coágulo, sem utilização de LED.

Procedimentos Cirúrgicos

Os animais foram sedados com Acepromazina (2,0 mg/mL), 1,0 mg/Kg via intramuscular e anestesiados com a associação de Xilazina (20 mg/mL), 5,0 mg/Kg, intramuscular profunda e Ketamina (50 mg/mL), 25,0 mg/Kg, intramuscular profunda. A antibioticoterapia foi de Oxitetraciclina (1,0 g/10mL) 0,2 mL/Kg via intraperitoneal.

Após tricotomia sobre a calvária, foi realizada a antissepsia da pele do animal (Figura 1) com solução tópica de iodo (PVPI - Rioquímica Ltda, São José do Rio Preto, Brasil), e uma incisão linear em pele sobre a sutura mediana permitiu que fosse feita divulsão dos tecidos musculares até o descolamento do retalho em espessura total expondo totalmente a calota craniana (Figura 2).

Os defeitos foram realizadas com uma trefina medindo 6,0 mm de diâmetro externo (Figura 3) (3i™ Implant Innovations Ltda, USA), a uma distância de 5,0 mm entre si, sob irrigação abundante de solução fisiológica 0,9%. Os materiais em forma de gel foram acondicionados em seringas de 1,0 ml em capela de fluxo, a fim de evitar contaminação e posteriormente foram devidamente identificados. Cada seringa foi utilizada para um único defeito, sendo descartada após seu uso. A BSA, como sendo um pó, foi colocada em um tubo tipo Eppendorf 3810 (Eppendorf do Brasil Ltda. São Paulo – Brasil) em porções individuais e aplicada diretamente sobre o defeito utilizando uma cureta para sua adaptação na cavidade. Para o grupo controle foi utilizado o mesmo procedimento cirúrgico, no entanto somente dois defeitos foram feitos por coelho. O osso removido para criação do defeito foi usado para o preenchimento do defeito contralateral (Grupo controle – osso autógeno) (Figura 5).

Após a inserção dos materiais nos defeitos (Figura 4), os tecidos rebatidos foram suturados (Figura 6) utilizando-se fio de sutura Vicryl™ 3-0 (Ethicon Ltda., Brasil). A pele foi suturada (Figura 7) com pontos simples utilizando-se fio de sutura Mononylon™ 4-0 (Ethicon Ltda., Brasil).

Todos os animais receberam antiinflamatórios (Buprenorfina – 0,3 mg/ml, 0,02 mg/kg via intramuscular e Cetoprofeno – 50,0 mg/mL, 3,0 mg/Kg, via intramuscular) nos primeiros três dias de pós-operatório e foram inspecionados diariamente com o intuito de se verificar sinais clínicos de complicações ou reações adversas.

Dezesseis animais (seis do Grupo LED 24/48, seis do Grupo LED 72/96 e quatro do grupo controle) foram submetidos à eutanásia em cada tempo experimental: 5 dias, 10 dias e 20 dias, respectivamente, utilizando inalação de monóxido de carbono (CO).

Tratamento com Luz Visível e Infravermelho

O aparelho utilizado para a irradiação dos animais foi calibrado anteriormente a sua utilização através de um “power meter” (Coherent Inc., Santa Clara, CA, USA) objetivando a padronização nas aplicações, utilizando a fórmula $P = E/t$, onde P=potência, E=energia e t=tempo para calcular o tempo de aplicação para cada tipo de luz utilizada, sendo:

Visível: comprimento de onda = 633 nm, dose = 3J, potência = 58mW e tempo de irradiação = 3min 45s.

Infravermelho: comprimento de onda = 830 nm, dose = 1,5 J, potência = 60mW e tempo de irradiação = 2min.

A aplicação do LED de baixa potência foi realizada com o auxílio de um dispositivo de madeira, semelhante a uma caixa para contenção do coelho, no qual o animal era mantido estável sem uso de sedativos. O protocolo utilizado seguiu o que foi descrito anteriormente:

Grupo LED 24/48: 24 horas da cirurgia aplicação do LED infra-vermelho com potência = 1,5W, tempo de irradiação = 2min. Após 48 horas da cirurgia aplicação do LED visível com potência = 58 mW e tempo de irradiação = 3min 45s.

Grupo 72/96 horas: 72 horas da cirurgia aplicação do LED infravermelho com potência = 1,5 W e tempo = 2 min. Após 96 horas da cirurgia aplicação do LED visível com potência = 58 mW e tempo = 3min 45s.

Os intervalos de tempo para aplicação do sistema LED foram estipulados segundo o protocolo de bioestimulação proposto por Tedesco³⁹ e colaboradores (2007), onde foi estabelecido o intervalo *in vitro* para ativação celular (“delay”), de 3 a 5 dias. Como o

metabolismo ósseo dos coelhos é três vezes mais rápido do que o humano⁴⁰ foi realizada a aplicação do LED a partir de 24 e 72 horas da cirurgia.

Preparo do Lipossoma

O fármaco fotossensível utilizado no preparo das formulações lipossomais foi a cloro-alumínio-ftalocianina (AlClPc), que apresenta absorção máxima em 674 nm.

A AlClPc incorporada aos sistemas lipossomais de L- α -fosfatidilcolina na concentração de 0,70 mmolL⁻¹ foi preparada pelo método de injeção conforme descrito por Kremer e colaboradores⁴¹ com pequenas modificações⁴².

Uma solução etanólica de 0,390 mL contendo 2,61 mg de L- α -fosfatidilcolina (0,70 mmolL⁻¹), e um volume adequado de fármaco fotossensível (AlClPc em etanol) a fim de se obter uma concentração final 5,0 μ M, foi injetado por uma bomba peristáltica de adição controlada em tampão fosfato pH 7,4 contido numa jaqueta termostaticada (volume final de 5,0 mL).

A solução tampão estava contida em um recipiente cilíndrico de 2,0 cm de diâmetro e a injeção foi realizada à aproximadamente 2,5 cm abaixo da superfície líquida. A injeção foi realizada a 57°C, que corresponde à temperatura de transição do lipídeo, sob agitação magnética na ausência de luz e com uma velocidade de 1,0 μ L/s (360 μ L/h).

Ao término do preparo da solução lipossomal, a mesma foi colocada em banho de gelo e então foi adicionado um polímero termo-sensível (na proporção de 25% massa/volume) para a formação do gel sob agitação magnética.

Preparo de nanoemulsão do tipo óleo em água para liberação controlada de ftalocianina de cloro e alumínio

A metodologia empregada para obtenção da formulação nanoestruturada baseou-se no método clássico de emulsificação espontânea descrito por Fessi⁴³ e colaboradores (1982) e no processo de nanoveiculação de fármacos fotossensíveis descrito por Primo⁴⁴ e colaboradores (2008).

Inicialmente preparou-se uma solução aquosa do biopolímero poloxamer 188 sob agitação magnética e temperatura de 25°C. Na sequência preparou-se uma solução orgânica de fosfatidilcolina de soja em acetona, sob agitação moderada à 55°C. Nesta fase orgânica adicionou-se uma fração do óleo triglicérido derivado de ácido capríco/caprílico para uma concentração final de 2,5 %, contendo o fármaco fotossensível ftalocianina de cloro e alumínio para uma concentração final de 0,05 mg/mL, dissolvido sob ação de banho ultrassônico. O processo de nanoemulsificação iniciou-se após a mistura destas fases sob agitação controlada na temperatura de 55°C. A etapa final de preparo das formulações consistiu na extração total do solvente orgânico à pressão reduzida e na temperatura de 60°C – 70°C, até atingir-se o volume final projetado para obtenção do sistema nanoestruturado. O material obtido apresentou diâmetro hidrodinâmico médio de 200 nm, índice de polidispersidade > 0,2 e estabilidade físico-química superior a 90 dias.

O processo tecnológico faz parte do pedido de patente número PI0706321-0 A2 depositado em 26/10/2007 no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI).

Preparo de nanopartículas de BSA associadas ao fármaco fotossensível

As amostras foram preparadas pelo método da desnaturação térmica, que envolve a formação de ligações cruzadas (“cross-linking”). Inicialmente, foi formada uma emulsão de pequenas gotas de albumina aquosa, seguido do aquecimento e conseqüente formação de ligações cruzadas covalentes. Após o resfriamento, ocorrem solidificação e isolamento das

partículas formadas. O preparo dessas partículas esta protegido pelo pedido de patente junto ao INPI (#PI 018080058380).

Na preparação das amostras o fármaco a ser encapsulado foi dissolvido ou disperso inicialmente em uma solução de albumina por 30 minutos sob agitação constante.

Preparação da solução de BSA : Sobre agitação constante dissolveu-se a BSA em água. A esta solução foi acrescentado o fármaco fotossensível na concentração desejada de forma gradual e com agitação constante.

Preparação da fase oleosa: Em um balão de fundo redondo de 100 mL contendo o óleo mineral + tensoativo zweteriônico + co-surfactante adicionou a solução de BSA associada ao fármaco fotossensível, com agitação constante pelo sistema ultra turrax por 40 minutos cada.

Em outro balão de fundo redondo de 100 mL contendo o óleo vegetal + tensoativo aniônico pré-aquecido a 60°C adicionar-se a emulsão resultante com agitação constante por 40 minutos. Ao término da adição manteve-se o aquecimento e a agitação no sistema ultra turrax por aproximadamente 5 min.

Lavagem das nanopartículas: Após o resfriamento da solução em temperatura ambiente com agitação magnética, as nanopartículas foram lavadas com solvente orgânico três vezes e centrifugadas a 8000 rpm por 40 minutos a 25°C, e então, elas foram colocadas em um desecador para retirada total do solvente residual.

Preparo para Microscopia e Histomorfometria

O segmento da calota craniana que contém os defeitos foi removido e cada sítio implantado foi separado em amostras individuais. Cada amostra obtida foi destinada a processamento em parafina para análise histológica.

Processamento Histológico:

Blocos ósseos foram fixados em formalina tamponada 10% por 24 horas. Após a fixação foi realizada a descalcificação das peças com EDTA 7,4% com trocas duas vezes por semana, seguido por desidratação através de uma seqüência de álcoois com concentração crescente (70 a 100% de 2 em 2 horas). Após desidratação foi realizada a diafanização através da colocação das peças em xilol (três soluções de 2 em 2 horas) até ficarem transparentes. Após esta etapa, foi realizada a impregnação em parafina em estufa 60°C com três banhos de 90 minutos. Posteriormente as peças foram incluídas em parafina. Os blocos de parafina contendo as peças foram submetidos a cortes seriados de 14 µm de espessura e posteriormente montados em lâminas de vidro e coradas com Tricrômio de Mallory.

Análise Histológica

Utilizando microscopia de luz (Leica DMLB™, Alemanha), foi analisado o interior do defeito objetivando observar a presença de células inflamatórias ou multinucleadas; a distribuição de tecido conjuntivo frouxo; e a integridade do osso neoformado.

Histomorfometria

A análise histomorfométrica teve por objetivo mensurar o percentual de osso formado no interior do defeito, utilizando o programa de análise de imagem (QWin™, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Germany) em microscópio (DMLB™ microscope, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Germany). Para a padronização da mensuração foi criado com auxílio do software um retângulo medindo 6,0 mm x 3,5 mm (Figura 8), ou seja, reproduzindo as dimensões do defeito realizado com a trefina. Este retângulo foi padronizado e serviu como região de interesse (ROI) para o cálculo em porcentagem da área de tecido ósseo no seu interior (Figura 9).

Estatística

Os dados obtidos na histomorfometria foram comparados e a diferença entre os tratamentos foi avaliada pelo software AnalystSoft, StatPlus:mac - statistical analysis program for Mac OS. Version 2008. Análise de variância “one-way” foi utilizada (ANOVA), com teste de normalidade complementada pelo teste de Fischer. Os testes estatísticos foram aplicados para comparar a quantidade de osso formado no interior dos defeitos com dois tempos de fotobioestimulação com LED em três tempos experimentais diferentes. Os resultados foram considerados diferentes estatisticamente quando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

Todos os animais suportaram as cirurgias e não foram identificadas quaisquer complicações no período pós-operatório.

Os resultados da avaliação histomorfométrica em relação à formação óssea nos defeitos em calvária são apresentados nos Gráficos 1 e 2. E as diferenças estatísticas estão na Tabela 1.

Histomorfometria

Grupo Controle

O tratamento com osso autógeno - utilizado como controle positivo do experimento - resultou em maior quantidade de tecido ósseo no interior do defeito em todos os tempos experimentais, quando comparado o tempo de avaliação inicial de 5 dias com 10 dias ($p = 0,00001$) e 20 dias ($p = 0,0002$). Todos os outros tratamentos, independente do tempo experimental ou do momento de aplicação do LED, foram significativamente menores que o resultado do osso autógeno ($p \leq 0,05$).

O presença de apenas coágulo na cavidade resultou em curva ascendente a partir do décimo dia, atingindo seu pico máximo em 20 dias, com 23,13% de formação óssea no defeito. Neste grupo, foram detectadas diferenças estatísticas entre os tempos experimentais 5 dias e 20 dias ($p = 0,0001$) e entre 10 dias e 20 dias ($p = 0,0006$). Ao comparar o coágulo com os DDS houve diferença estatística em relação aos quatro materiais testados apenas aos 20 dias, independentemente do tempo de aplicação do LED ($p \leq 0,05$).

Grupo LED 24/48 horas

Todos os materiais fotossensibilizados neste grupo não apresentaram evolução satisfatória entre os tempos de reparo ($p \geq 0,05$).

Grupo LED 72/96 horas

Neste grupo ocorreu o maior pico de formação óssea entre todos os DDS testados; lipossoma aos 10 dias com 17,09% de formação óssea no defeito. Entre os DDS a única diferença significativa foi observada entre o lipossoma e a base em gel aos 10 dias ($p = 0,0161$).

LED 24/48 horas x LED 72/96 horas

Ao comparar os tratamentos em relação ao tempo de aplicação do LED houve diferença significativa aos 10 dias do lipossoma com LED 72/96 horas em relação à base de gel com LED 24/48 horas ($p = 0,0158$).

Análise histológica

LED 24/48 horas

Aos 5 dias de pós-operatório os defeitos apresentavam-se preenchidos por tecido conjuntivo com a presença de grande quantidade de matriz osteóide com forte atividade osteoblástica quando utilizado a nanoemulsão (Figuras 10, 11 e 12) e o lipossoma (Figuras 13, 14 e 15). Diferentemente, a base em gel (Figuras 16, 17 e 18) e a BSA (Figuras 19, 20 e 21) apresentavam o preenchimento por tecido conjuntivo somente na porção basal do defeito com poucas hemácias em seu interior.

Após 10 dias de pós-operatório o grupo tratado por nanoemulsão (Figuras 22, 23 e 24) apresentou como característica o preenchimento de tecido conjuntivo e osso imaturo envolvido por osteoblastos, principalmente na porção superior. No centro do defeito ainda foram encontradas algumas hemácias. Já no grupo tratado pelo lipossoma (Figuras 25, 26 e 27) ocorreu uma menor formação de tecido ósseo. O emprego de base em gel (Figuras 28, 29 e 30) e da BSA (Figuras 31, 32 e 33) resultaram em preenchimento do defeito por tecido conjuntivo e reduzido número de pontos de matriz osteóide em seu interior.

Aos 20 dias de pós-operatório o uso da nanoemulsão (Figuras 34, 35 e 36) resultou em formações de tecido conjuntivo e de tecido ósseo neoformado a partir das extremidades do defeito. Este tecido ósseo era circundado por uma linha ativa de osteoblastos. No grupo tratado com lipossoma (Figuras 37, 38 e 39) a base do defeito estava formada por trabéculas ósseas espessas, enquanto que a porção superior era formada por tecido osteóide a partir de uma linha de osteoblastos. Nos defeitos tratados com a BSA (Figuras 40, 41 e 42) ocorreu o preenchimento por tecido conjuntivo com trabéculas ósseas neoformadas próximas às laterais do defeito. Por outro lado, o reparo ósseo no grupo com base em gel (Figuras 43, 44 e 45) apresentou pouco preenchimento tecidual, principalmente com tecido de granulação no interior do defeito.

LED 72/96 horas

Nos grupos tratados com nanoemulsão (Figuras 46, 47 e 48), lipossoma (Figuras 49, 50 e 51) e BSA (Figuras 52, 53 e 54) aos 5 dias apresentavam o preenchimento por tecido conjuntivo com grande concentração de hemácias na porção superior e formação de matriz osteóide, principalmente nas paredes laterais do defeito. No grupo tratado com a base em gel (Figuras 55, 56 e 57) o defeito se apresentava preenchido principalmente por hemácias.

Aos 10 dias, a nanoemulsão (Figuras 58, 59 e 60) e o lipossoma (Figuras 61, 62 e 63) resultaram em uma linha de trabéculas ósseas espessas na base dos defeitos e trabéculas ósseas recém formadas. No grupo tratado pela BSA (Figuras 64, 65 e 66) predominou a presença de tecido conjuntivo junto com formação de linha de osteoblastos a partir das laterais do defeito. Os defeitos tratados com a base em gel (Figuras 67, 68 e 69) mostraram a presença de tecido conjuntivo frouxo com poucas hemácias em seu interior.

Aos 20 dias, a nanoemulsão (Figuras 70, 71 e 72) e o lipossoma (Figuras 73, 74 e 75) apresentaram o preenchimento do defeito por trabéculas ósseas neoformadas ainda envolvidas

por expressiva porção medular. Nos defeitos tratados com a BSA (Figuras 76, 77 e 78) foram observadas uma grande parte de tecido conjuntivo e algumas porções de osso imaturo. A base em gel (Figuras 79, 80 e 81) aos 20 dias apresentou tecido conjuntivo no seu interior, sem nenhum indício de formação de matriz osteóide.

Controle

Aos 5 dias o grupo coágulo (Figuras 82 e 83) encontrava-se preenchido predominantemente por hemácias. Uma tênue rede de fibrina já podia ser identificada nesse estágio indicando início de formação de tecido de granulação. No grupo osso autógeno (Figura 84) a cavidade aparecia completamente preenchida por osso.

Aos 10 dias o coágulo (Figuras 85, 86 e 87) apresentava na região central do defeito o povoamento por tecido conjuntivo neoformado oriundo da rede de fibrina formada anteriormente. Ainda havia a presença de hemácias nas laterais do tecido. A partir das laterais do defeito o tecido conjuntivo neoformado invaginou em direção ao centro, preenchido ainda pela rede de fibrina e presença de hemácias. Na porção lateral do defeito, havia formação de um tecido osteóide cercado por hemácias. No defeito preenchido por osso autógeno (Figuras 88, 89 e 90) predominou um padrão de absorção óssea na porção superior. Nas porções laterais do defeito verificou-se a presença de osso neoformado junto às paredes laterais do defeito.

Após 20 dias, o grupo coágulo (Figuras 91, 92 e 93) era caracterizado por presença de trabéculas ósseas neoformadas no centro do defeito, envoltas pela porção medular do osso. Já no grupo osso autógeno (Figuras 94, 95 e 96) evidenciou-se o preenchimento do defeito ósseo como resultado da incorporação de fragmentos do osso enxertado e formação de osso lamelar no limite do defeito ósseo.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Por se tratar do desenvolvimento de uma nova tecnologia, não há trabalhos na literatura que abordem as variáveis juntas em um único estudo. Os estudos disponíveis na literatura utilizam o processo da fotobiomodulação de maneira isolada em trabalhos com reparo ósseo, ou então, quando estão associadas a um FS, os estudos foram realizados in vitro por meio de cultura de células ósseas e in vivo para cicatrização de feridas em pele ou controle do câncer^{19-23,26,45,46}.

O presente estudo teve como objetivos investigar o uso de 3 diferentes sistemas de DDS (lipossoma, nanoemulsão e BSA), juntamente com um FS derivado de ftalocianina, tendo como fonte de luz LED visível e infravermelho aplicado 24/48 horas ou 72/96 horas após a confecção de defeitos de 6,0 mm de diâmetro em calvária de coelhos, na tentativa de acelerar o processo de reparo ósseo.

O grupo controle não teve aplicação de LED a fim de evitar um resultado falso positivo, pois alguns estudos^{47,48} demonstraram que a biomodulação pode estimular positivamente o processo de remodelação óssea.

A fonte de luz escolhida para este estudo foi o LED, que são semicondutores complexos que convertem corrente elétrica em um incoerente e estreito espectro de luz, possuindo também um grande aumento em luminosidade e eficiência energética. Essa luz emitida é mensurada em comprimento de onda e é expressa em unidades de nanômetros (nm). Diferentes comprimentos de onda possuem diferentes cromóforos - substância que tem muitos elétrons capazes de absorver energia ou luz visível – e que podem ter vários efeitos nos tecidos. Os comprimentos de onda são divididos pela cor associada como azul (400-470 nm), verde (470-550 nm), vermelho (630-700 nm) e infravermelho (700-1200 nm). A absorção estimulada da radiação equivale à energia transportada pelo fóton, sendo esta absorção específica para comprimento de onda o que determina qual o tipo de tecido irá

preferencialmente absorver a radiação incidente e a profundidade de penetração desta energia. Geralmente, quanto maior o comprimento de onda, maior a penetração da luz nos tecidos^{49,50,51}.

A escolha de LED, ao invés de um laser como ativador do princípio da TFD neste trabalho, ocorreu pois não há diferença significativa entre as luzes usadas para fotoestimulação, seja ela gerada por laser ou por um LED. No entanto, o fundamental é que o comprimento de onda seja o mesmo para as duas fontes de luz, não sua fonte ou coerência dos feixes⁵². O LED emite mais delicadamente o mesmo comprimento de onda comparado ao laser com uma substancial redução de energia. O LED não emite energia para danificar os tecidos e não tem o mesmo risco de injúria ocular que o laser apresenta. Outra vantagem em relação ao laser é a possibilidade do LED em combinar a disposição de comprimentos de onda em vários tamanhos diferentes⁵³.

Os resultados da histomorfometria do presente trabalho apontaram que a fotobiomodulação teve uma tendência a ser mais efetiva se utilizada após 72/96 horas do procedimento cirúrgico, no tempo de 10 dias utilizando o lipossoma como DDS. O resultado negativo da ativação LED após 24/48 horas pode estar relacionado principalmente a precoce fotoestimulação, visto que mesmo utilizando o comprimento de onda e a dose de radiação corretos o efeito nas células pode não ter ocorrido da maneira esperada. A magnitude do efeito da fototerapia depende diretamente do estado fisiológico da célula no momento da irradiação. Quando utilizado muito precocemente, a proliferação celular está ativa e a regeneração dos tecidos está ocorrendo de maneira normal e o efeito da irradiação poderá ser mínimo ou inexistente. A luz só estimulará a proliferação celular se estas estiverem apresentando algum tipo de deficiência no período da irradiação. Se uma célula está totalmente funcional, não há nada que a fotoestimulação possa fazer para acelerar ou melhorar como benefício terapêutico⁵². Portanto os efeitos da fotobiomodulação dependem do padrão

fisiológico celular no tempo da irradiação ou do efeito da luz durante a fase inicial da proliferação e inicial diferenciação das células indiferenciadas. Entretanto isto não ocorre durante períodos mais avançados⁵⁴.

Os DDS utilizados neste estudo apresentaram resultados semelhantes quando estimulados com LED após 24/48 horas. O lipossoma e a nanoemulsão obtiveram um pico maior de formação óssea, comparado ao coágulo, quando aplicado LED após 72/96 horas aos 10 dias. A BSA obteve resultado estável inexpressivo em todos os tempos experimentais independente do tempo de aplicação do LED. Sendo a BSA derivada de polímeros biodegradáveis, possui como característica a permanência de sua forma até mesmo depois que o fármaco é completamente liberado, o que talvez tenha sido prejudicial ao processo de reparo, retardando o processo fisiológico.

O lipossoma foi um dos sistemas que conseguiu uma formação óssea (17,09%) maior que o coágulo (10,61%) em dez dias no Grupo LED 72/96, contudo aos 20 dias sua média de osso no defeito diminuiu (13,12%) enquanto que a do grupo tratado com coágulo chegou a 23,13%. Este DDS têm como característica solubilizar fármacos hidrofóbicos em água, mantendo suas características físico-químicas, promovendo uma distribuição seletiva nos tecidos²⁶. Lipossomas têm sido amplamente utilizados pela indústria farmacêutica em muitas aplicações, para a entrega de uma variedade de princípios ativos^{55,56}, porque são de fácil preparação, apresentam baixo custo, e sua produção é possível em um processo “*scale-up*”.

Os lipossomas têm sido largamente estudados na medicina e em campos relacionados como sistemas de liberação de agentes terapêuticos *in vivo*⁵⁷ ou mesmo como modelos para membranas biológicas⁵⁸. O mecanismo de ação da fotobiomodulação por LED não é totalmente compreendido. A hipótese mais provável é a absorção de fótons de luz com comprimento de onda específico estimulando os citocromos mitocondriais (enzima Citocromo c oxidase), que é responsável pelo aumento da produção de trifosfato de adenosina (ATP).

Nos tecidos dos mamíferos existem 3 tipos de moléculas fotorreceptoras: hemoglobina, mioglobina e citocromo c oxidase. Destes três, o citocromo c oxidase é o único envolvido no metabolismo e produção de energia, mais conhecido como complexo IV devido ao transporte de elétrons localizado junto a mitocôndria, ocorrendo a formação de um potencial quimiosmótico que é usado pela ATP sintase para a formação de ATP. Portanto, o citocromo c oxidase tem sido considerado o fotorreceptor molecular dos efeitos biológicos na fotobiomodulação⁵⁹. Esta enzima permite um melhor funcionamento celular especialmente em células com uma condição metabólica deficitária. O ATP acelera a mitose, melhora a cicatrização tecidual, estimula o reparo ósseo, aumenta a ação antiinflamatória, nivela a produção de fibroblastos com a normalização do colágeno e fibras elásticas depositadas no tecido cicatrizado. O efeito estimulante da luz no osso ocorre durante a fase inicial de proliferação de fibroblastos e osteoblastos como também na fase inicial da diferenciação de células mesenquimais. Como os osteoblastos podem ser recrutados principalmente nos limites dos defeitos ósseos por células indiferenciadas, a irradiação com LED pode estimular o aumento da população celular na região e/ou a maturação de osteoblastos^{60,61,62}.

Outra reação à fotobioestimulação é a estimulação da angiogênese através do aumento da produção de ATP, ativação da ATPase e conversão do ATP em adenosina. A adenosina estimula a conversão de monofosfato de adenosina em óxido nítrico (NO) – O endotélio usa o NO para comandar o relaxamento do músculo liso da parede dos vasos sanguíneos, fazendo com que este dilate, aumentando assim o fluxo sanguíneo e diminuindo a pressão arterial⁶³ - ou ao fator de crescimento vascular endotelial (VEGF)⁶⁴. A produção de fatores de crescimento e de outros mediadores angiogênicos influenciam na diferenciação dos osteoblastos. A hipóxia local leva a uma regularização da produção de fatores angiogênicos e seus receptores tentam restaurar o suprimento sanguíneo local. Portanto, a resposta vascular à fotobioestimulação pode ser uma das responsáveis pelo mecanismo dos resultados positivos

desta terapia. No trabalho de Kobu⁶⁵ e colaboradores (1999) foi demonstrado em tecidos fotobioestimulados o aumento de aproximadamente 80% do fluxo sanguíneo intraósseo e 15% da tensão de oxigênio. Sendo a vascularização um importante e decisivo fator no processo de reparo ósseo e analgesia da sintomatologia dolorosa, o aumento da vascularização decorrente da aplicação de LED é um dos possíveis mecanismos de efetividade clínica desta terapia, seja aumentando a velocidade do reparo ósseo ou diminuindo a sintomatologia dolorosa⁶⁶.

A utilização da combinação de luzes visível e infravermelho pelo sistema LED objetivou alcançar uma profundidade nos tecidos suficiente para ativação do FS no defeito ósseo, para tanto foi escolhida a associação de dois tipos de coloração de luz emitida pelo LED, visível e infravermelho. A luz Visível ou vermelha foi aplicada em um comprimento de onda de 633 nm, dose de 3J, potência de 58mW e tempo de irradiação de 3min 45s. Já o Infravermelho foi aplicado em comprimento de onda de 830 nm, dose de 1,5 J, potência de 60 mW e tempo de irradiação de 2 min. O estudo in vitro de Stein¹³ e colaboradores (2005) demonstrou que comprimento de onda de 632,8 nm promoveu a proliferação e a diferenciação de osteoblastos humanos, e comprimento de onda de 830 nm obteve um efeito acentuado na proliferação de osteoblastos. De acordo com o trabalho de Simpson⁵⁰ e colaboradores (1998) a penetração da luz nos tecidos ocorre de 1,0 a 6,0 mm em 630 nm (visível) e até 16,0 mm de 700 a 900 nm (infravermelho). Tendo como base esta afirmativa a escolha do tipo de luz está ligado diretamente ao seu comprimento de onda, e sua associação poderia ser benéfica, aumentando a possibilidade do reparo ósseo ocorrer completamente em tempos precoces.

No trabalho de Shakouri⁶⁷ e colaboradores (2010) foi avaliado o processo de reparo em fraturas de tíbia de coelhos, iniciando a aplicação de laser a partir do 4º dia pós-operatório diariamente por 4 semanas utilizando 4 J/cm, 780 nm, 5 min por dia. Talvez o resultado do aumento significativo do calo ósseo formado no lado irradiado possa ser atribuído não só pelas propriedades da luz, como também pela repetição da aplicação do laser. Em nosso

trabalho os valores para irradiação foram semelhantes, como o comprimento de onda (633 – 830 nm) e a potência (1,5 – 3 J), entretanto não houve repetição na aplicação do LED, sendo utilizada uma aplicação para cada comprimento de onda (visível e infravermelho). Ainda assim em nosso trabalho o único resultado maior que o grupo controle, utilizando coágulo, ocorreu na utilização de LED após 72/96 horas, mesmo assim não houve significância estatística, o que indica ter sido somente uma tendência. A falta de repetições na aplicação das luzes pode ter influenciado negativamente nos resultados deste trabalho, visto que outros estudos utilizando somente a luz, sem o FS^{47,66-70} obtiveram resultados positivos em relação ao reparo ósseo utilizando repetidas fotobioestimulações em seus experimentos.

Em estudo específico sobre a quantidade de doses necessárias para a fotoestimulação em ligamento de joelho⁷¹, os autores relataram que houve um melhor resultado no grupo que recebeu nove doses de fotoestimulação a laser com comprimento de onda de 660 nm, média de energia 8,8 mW, pulso 10 kHz e dosagem de 3,5 J/cm² quando comparado ao grupo que recebeu uma única dose com comprimento de onda de 660 nm, média de energia de 8,8 mW, pulso 10 kHz e dosagem de 31,6 J/cm². Em outros estudos^{72,73,74} utilizando duas aplicações de luz realizados em articulações (joelho ou fêmur) os resultados foram semelhantes ao do presente trabalho, não havendo aceleração no processo de reparo nos defeitos ósseos criados. Em trabalhos usando LED^{48,75,76} os resultados corroboram com os trabalhos anteriores, mostrando que mesmo que a fonte de luz mude, as repetições das aplicações deverão ser mantidas para que o tratamento possa ser reprodutível e eficaz. Por outro lado, no trabalho de Agnol⁷⁷ e colaboradores (2009) o resultado da aplicação única de LED ou laser em feridas na pele de ratos induzidos à diabetes, com o objetivo de mensurar sua cicatrização, demonstrou resultado significativo em dois de sete tempos experimentais avaliados, quando comparado ao grupo sem aplicação de laser. No mesmo trabalho não houve também, diferença entre a aplicação de laser ou LED na cicatrização das feridas.

Não havia dados a respeito do comportamento da base em gel sozinha em defeitos ósseos, por isso foi testada sem FS. Os resultados obtidos sugerem que a base em gel se mantém inerte na cavidade, sem reação à bioestimulação. Contudo, há uma tendência da base em gel em retardar o processo de reparo ósseo, visto que há maior formação óssea nos defeitos tratados somente com coágulo. Assim, a base em gel dos DDS podem também ter influenciado no reparo ósseo, independente do FS ou do tempo de fotobioestimulação. Nos resultados o coágulo sempre teve maior formação óssea do que a base em gel sozinha. Na aplicação do LED após 24/48 horas o coágulo apresentou semelhante formação óssea no interior do defeito em relação a todos os outros DDS do grupo teste até os 10 dias. Quando o LED foi aplicado após 72/96 horas houve uma maior formação óssea no lipossoma e na nanoemulsão aos 10 dias, contudo aos 20 dias houve um aumento de formação óssea considerável no coágulo, enquanto que o lipossoma e a nanoemulsão mantiveram-se estáveis. O comportamento da base em gel sozinha foi semelhante ao de todo grupo teste (lipossoma, nanoemulsão, BSA e a base em gel sozinha) ao receber o LED após 24/48 horas, o que sinaliza que talvez a fotobioestimulação possa ter sido insuficiente para ativar o FS deste grupo.

A fotobioestimulação após 72/96 horas pode ter iniciado a ativação do FS do lipossoma, nanoemulsão e BSA, porém não havendo continuidade na aplicação da luz o material pode ter ficado inerte no interior do defeito, tendo resultado semelhante a base em gel sozinha aos 20 dias. Ou seja, os DDS talvez não tenham sido ativados totalmente e seu comportamento no longo prazo não contribuiu para a aceleração do processo de reparo do defeito ósseo. Em um trabalho²⁹ utilizando FS em base gel ativados por laser na pele de ratos, os autores relatam que o grupo tratado somente com a base em gel obteve resultado semelhante aos do grupo controle em cicatrização. O protocolo de fotobiomodulação teve início 1 dia após a realização do defeito tecidual e manteve-se diariamente por 7 dias

utilizando um comprimento de onda de 685 nm, dosagem de 2,5 J/cm² e 35 mW de potência e 10 min de exposição. Os autores também concluíram que múltiplas doses da fotobioestimulação com variações nos intervalos de tempo entre as doses pode aumentar os resultados obtidos. O trabalho de Silva²⁹ e colaboradores (2004) poderia suportar a teoria de que a aplicação única de fonte de luz, seja ela visível, infravermelho ou a associação de ambas não é suficiente para a ativação completa do FS contido nos DDS testados, uma vez que o comportamento da base em gel foi semelhante ao grupo teste ativado por LED 24/48 horas em todos os tempos experimentais, como também semelhante ao grupo teste ativado por LED 72/96 horas aos 20 dias, mantendo-se inerte na cavidade.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo indicam:

- 1) O reparo de defeitos ósseos em calvária resultou em maior formação óssea quando utilizado osso autógeno, comparado a todos os materiais testados e em todos os tempos experimentais;
- 2) Baseado nos dados histológico e histomorfométrico, a utilização dos DDS atrasou o reparo ósseo em todos os tempos experimentais quando irradiados por LED 24/48 horas, quando comparado com os controles (coágulo e osso autógeno);
- 3) O lipossoma e a nanoemulsão com aplicação do LED 72/96 horas resultaram em maior formação óssea que o coágulo, mas esse processo não se sustentou em períodos subseqüentes;
- 4) O tecido ósseo formado nos defeitos, quando utilizado lipossoma com irradiação LED 72/96 horas, obteve maior proporção de trabéculas compostas por osso lamelar quando comparado ao grupo tratado com coágulo;
- 5) O uso de base em gel sozinha atrapalhou sobremaneira o processo de reparo em todos os tempos experimentais.

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

- 1 - Trelles MA, Mayayo E. Bone fracture consolidates faster with low-power laser. *Lasers Surg Med.* 1987;7:36-45.
- 2- 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.* 1995;16:47-55.
- 3 - 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. *Calcif Tissue Int.* 1996;59:297-300.
- 4 - Dörtbudak O, Haas R, Mallath-Pokorny G. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. *Clin Oral Implants Res.* 2000;11:540-545.
- 5 - Torricelli P, Giavaresi G, Fini M, Guzzardella GA, Morrone G, Carpi A, Giardino R. Laser biostimulation of cartilage: in vitro evaluation. *Biomed Pharmacother.* 2001;55:117-1120.
- 6 - Ueda Y, Shimizu N. Pulse irradiation of low-power laser stimulates bone nodule formation. *J Oral Sci.* 2001;43:55-60.
- 7 - Dörtbudak O, Haas R, Mailath-Pokorny G. Effect of low-power laser irradiation on bony implant sites. *Clin Oral Implants Res.* 2002;13:288-292.
- 8 - Guzzardella GA, Torricelli P, Nicoli Aldini N, Giardino R. Laser technology in orthopedics: preliminary study on low power laser therapy to improve the bone-biomaterial interface. *Int J Artif Organs.* 2003;24:898-902.
- 9 - Khadra M, Kasem N, Haanaes HR, Ellingsen JE, Lyngstadaas SP. Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;97:693-700.
- 10 - Rochkind S, Kogan G, Luger EG, Salame K, Karp E, Graif M, Weiss J. Molecular structure of the bony tissue after experimental trauma to the mandibular region followed by laser therapy. *Photomed Laser Surg.* 2004;22:249-253.

- 11 - Khadra M, Lyngstadaas SP, Haanaes HR, Mustafa K. Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. *Biomaterials*. 2005;26:3503-3509.
- 12 - 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*. 1998;22:347-354.
- 13 - Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg*. 2005;23:161-166.
- 14 - Khadra M, Rønold HJ, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE, Haanaes HR. Low-level laser therapy stimulates bone-implant interaction: an experimental study in rabbits. *Clin Oral Implants Res*. 2004;15:325-332.
- 15 - Lopes CB, Pinheiro AL, Sathaiah S, Duarte J, Cristinamartins M. Infrared laser light reduces loading time of dental implants: a Raman spectroscopic study. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2005;23:27-31.
- 16 - Roberts DJ, Cairnduff F. Photodynamic therapy of primary skin cancer: a review. *Br J Plast Surg*. 1995;48:360-370.
- 17 - Souza CS, Felicio LB, Ferreira J, Kurachi C, Bentley MV, Tedesco AC, Bagnato VS. Long-term follow-up of topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy diode laser single session for non-melanoma skin cancer. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2009;6:207-213.
- 18 - Brasseur N, Ouellet R, La Madeleine C, van Lier JE. Water-soluble aluminium phthalocyanine-polymer conjugates for PDT: photodynamic activities and pharmacokinetics in tumor-bearing mice; *British Journal of Cancer*. 1999;80:1533-1541.

- 19 - Sato T, Schuber F. Liposome Technology. Site-specific liposomes coated with polysaccharides, CRC Press. 1993;179-198.
- 20 - Vemuri S, Rhodes CT. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharm Acta Helv.* 1995;70:95-111.
- 21 - Nunes SM, Sguilla FS, Tedesco AC. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37:273-284. Epub 2004 Jan 30.
- 22 - Brasseur N, Ali H, Langlois R, van Lier JE. Biological activities of phthalocyanines--IX. Photosensitization of V-79 Chinese hamster cells and EMT-6 mouse mammary tumor by selectively sulfonated zinc phthalocyanines. *Photochem Photobiol.* 1988;47:705-711.
- 23 - Isele U, Schieweck K, Kessler R, van Hoogevest P, Capraro HG. Pharmacokinetics and body distribution of liposomal zinc phthalocyanine in tumor-bearing mice: influence of aggregation state, particle size, and composition. *J Pharm Sci.* 1995;84:166-173.
- 24 - Bisby RH, Mead C, Morgan CG. Wavelength-programmed solute release from photosensitive liposomes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;276:169-173.
- 25 - Boehncke WH, Elshorst-Schmidt T, Kaufmann R. Systemic photodynamic therapy is a safe and effective treatment for psoriasis. *Arch Dermatol.* 2000;136:271-272.
- 26 - Hoebeke M. The importance of liposomes as models and tools in the understanding of photosensitization mechanisms. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 1995;28:189-196.
- 27 - Foote CS. Definition of type I and Type II photosensitized oxidation. *Journal of Photochemistry and Photobiology.* 1991;54:659.
- 28 - Smith KC. Laser (and LED) therapy is phototherapy. *Photomedicine and Laser Surgery.* 2005;23:78-80.

- 29 - Silva JC, Lacava ZG, Kuckelhaus S, Silva LP, Neto LF, Sauro EE, Tedesco AC. Evaluation of the use of low level laser and photosensitizer drugs in healing. *Lasers Surg Med.* 2004;34:451-457.
- 30 - Hamblin MR, O'Donnell DA, Murthy N, Contag CH, Hasan T. Rapid control of wound infections by targeted photodynamic therapy monitored by in vivo bioluminescence imaging. *Photochem Photobiol.* 2002;75:51-57.
- 31 - Jayasree RS, Gupta AK, Rathinam K, Mohanan PV, Mohanty M. The influence of photodynamic therapy on the wound healing process in rats. *J Biomater Appl.* 2001;15:176-186.
- 32 - Shibli JA, Martins MC, Ribeiro FS, Garcia VG, Nociti Jr FH, Marcantonio Jr E. Lethal photosensitization and guide bone regeneration in treatment of peri-implantitis: an experimental study in dogs. *Clinical Oral Implants Research.* 2006;17:273-281.
- 33 - Medrado ARAP, Pugliese LS, Reis SRA, Andrade ZA. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. *Lasers in Surgery and Medicine* 2003;32:239-244.
- 34 - Desmet KD, Paz, DA, Corry JJ, Eells JT, Wong-Riley MTT, Henry MM, Buchmann EV, Connelly MP, Dovi JV, Liang HL, Henshel DS, Yeager RL, Millsap DS, Lim J, Gould LJ, Das R, Jett M, Hodgson BD, Margolis D, Whelan HT. Clinical and experimental applications of NIR-LED photobiomodulation. *Photomedicine and Laser Surgery* 2006;24:121-128.
- 35 - Rezende SB, Ribeiro MS, Núñez SC, Garcia VG, Maldonado EP. Effects of a single near-infrared laser treatment on cutaneous wound healing: Biometrical and histological study in rats. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2007;87:145-153.

- 36 - Medrado AP, Soares AP, Santos ET, Reis SRA, Andrade ZA. Influence of laser photobiomodulation upon connective tissue remodeling during wound healing. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2008;92:144-152.
- 37 - Rodrigo SM, Cunha A, Pozza DH, Blaya DS, Moraes JF, Weber JBB, Oliveira MG. Analysis of the systematic effect of red and infrared laser therapy on wound repair. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2009;27:929-935.
- 38 - da Silva JP, da Silva MA, Almeida APF, Lombardi Junior I, Matos AP. Laser therapy in the tissue repair process: A literature review. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2010;28:17-21.
- 39 - Tedesco AC, Lebreton-Decoster C, Simioni AR, Bodineau-Mobarak A, Séguier S, Coulomb B. Évaluation des effets de la thérapie photodynamique (PDT) sur la cicatrisation cutanée en utilisant des tissus reconstruits *in vitro*. *Journal des Plaies et Cicatrisations*. 2007;28:134-136.
- 40 - Roberts WE, Garetto LP & Brezniak N. Contemporary implant dentistry. In: Misch CE, ed. *Bone Physiology and Metabolism*. 1st edition. St. Louis: Mosby-Year Book, Inc. 1993:337.
- 41 - Kremer JM, Esker MW, Pathmamanoharan C, Wiersema PH. Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method. *Biochemistry*. 1977;16:3932-3935.
- 42 - Simioni AR, Pelisson MM, Beltrane Jr M, Tedesco AC. Photophysical and Photobiological Studies of a Silicon Tribenzonaphthoporphyrinato Incorporated into Liposomes for Photodynamic Therapy Use. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2008;8:3208-3215.
- 43 - Fessi H, Marty JP, Puisieux F, Carstensen JT. Square root of time dependence of matrix formulations with low drug content. *J Pharm Sci*. 1982;71:749-752.

- 44 - Primo FL, Rodrigues MM, Simioni AR, Lacava ZG, Morais PC, Tedesco AC. Photosensitizer-loaded magnetic nanoemulsion for use in synergic photodynamic and magnetohyperthermia therapies of neoplastic cells. *J Nanosci Nanotechnol.* 2008;8:5873-5877.
- 45 - Bisby R, Mead C, Morgan C. Active uptake of drugs into photosensitive liposomes and rapid release on UV photolysis, *Photochemistry and Photobiology.* 2000;72:57-61.
- 46 - Boehncke W, Elshorst-Schmidt T, Kaufmann R. Systemic photodynamic therapy is a safe and effective treatment for psoriasis. *Archives of Dermatology.* 2000;136:271-272.
- 47 - Khadra M, Kasem N, Haanæs HR, Ellingsen JE, Lyngstadaas SP. Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97:693-700.
- 48 - Uysal T, Ekizer A, Akcay H, Etoz O, Guray E. Resonance frequency analysis of orthodontic miniscrews subjected to light-emitting diode photobiomodulation therapy. *Eur J Orthod.* 2010 Dec 27. [Epub ahead of print].
- 49 - Wilson BC, Patterson MS. The physics of photodynamic therapy. *Phys Med Biol.* 1986;31:327-360.
- 50 - Simpson CR, Kohl M, Essenpreis M, Cope M. Near-infrared optical properties of ex vivo human skin and subcutaneous tissues measured using the Monte Carlo inversion technique. *Phys Med Biol.* 1998;43:2465-2478.
- 51 - Kalka K, Merk H, Mukhtar H. Photodynamic therapy in dermatology. *J Am Acad Dermatol.* 2000;42:389-413.
- 52 - Karu T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Physics.* 1989;56:691-704.
- 53 - Barolet D. Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology. *Semin Cutan Med Surg.* 2008;27:227-238.

- 54 - Pinheiro AL, Carneiro NS, Vieira AL, Brugnera A Jr, Zanin FA, Barros RA, Silva PS. Effects of low-level laser therapy on malignant cells: in vitro study. *J Clin Laser Med Surg.* 2002;20:23-26.
- 55 - Santos NC, Castanho MARB. Lipossomas: a bala magica acertou ? *Química Nova.* 2002;25:1181-1185.
- 56 - Sortino S, Mazzaglia A, Scolaro LM, Merlo FM, Valveri V, Sciortino MT. Nanoparticles of cationic amphiphilic cyclodextrins entangling anionic porphyrins as carrier-sensitizer system in photodynamic cancer therapy. *Biomaterials.* 2006;27:4256-4265.
- 57 - Kawasaki ES, Player A. Nanotechnology, nanomedicine, and the development of new, effective therapies for cancer. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* 2005;1:101-109.
- 58 - Valzeno D. Photomodification of biological membranes with emphasis on singlet oxygen mechanisms. *Photochemistry and Photobiology.* 1987;46:146-160.
- 59 - Desmet KD, Paz DA, Corry JJ, Eells JT, Wong-Riley MT, Henry MM, Buchmann EV, Connelly MP, Dovi JV, Liang HL, Henshel DS, Yeager RL, Millsap DS, Lim J, Gould LJ, Das R, Jett M, Hodgson BD, Margolis D, Whelan HT. Clinical and experimental applications of NIR-LED photobiomodulation. *Photomed Laser Surg.* 2006;24:121-128.
- 60 - Kawasaki K, Shimizu N. Effects of low-energy laser irradiation on bone remodeling during experimental tooth movement in rats. *Lasers Surg Med.* 2000;26:282-291.
- 61 - Karu TI, Kolyakov SF. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. *Photomed Laser Surg.* 2005;23:355-361.
- 62 - Hawkins D, Abrahamse H. Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblasts. *Photomed Laser Surg.* 2006;24:705-714.

- 63 - Greenbaum R, Bay J, Hargreaves MD, Kain ML, Kelman GR, Nunn JF, Prys-Roberts C, Siebold K. Effects of higher oxides of nitrogen on the anaesthetized dog. *Br J Anaesth.* 1967;39:393-404.
- 64 - Ihsan FR. Low-level laser therapy accelerates collateral circulation and enhances microcirculation. *Photomed Laser Surg.* 2005;23:289-294.
- 65 - Kobu Y. Effects of infrared radiation on intraosseous blood flow and oxygen tension in the rat tibia. *Kobe J Med Sci.* 1999;45:27-39.
- 66 - Pinheiro AL, Gerbi ME. Photoengineering of bone repair processes. *Photomed Laser Surg.* 2006;24:169-178.
- 67 - Shakouri SK, Soleimanpour J, Salekzamani Y, Oskuie MR. Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process. *Lasers Med Sci.* 2010;25:73-77.
- 68 - Garavello-Freitas I, Baranauskas V, Joazeiro PP, Padovani CR, Dal Pai-Silva M, da Cruz-Höfling MA. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. *J Photochem Photobiol B.* 2003;70:81-89.
- 69 - Nissan J, Assif D, Gross MD, Yaffe A, Binderman I. Effect of low intensity laser irradiation on surgically created bony defects in rats. *J Oral Rehabil.* 2006;33:619-924.
- 70 - Fávaro-Pípi E, Feitosa SM, Ribeiro DA, Bossini P, Oliveira P, Parizotto NA, Renno AC. Comparative study of the effects of low-intensity pulsed ultrasound and low-level laser therapy on bone defects in tibias of rats. *Lasers Med Sci.* 2010;25:727-732.
- 71 - Ng GY, Fung DT, Leung MC, Guo X. Comparison of single and multiple applications of GaAlAs laser on rat medial collateral ligament repair. *Lasers Surg Med.* 2004;34:285-289.
- 72 - Shahgaldi BF. Repair of large osteochondral defects: load-bearing and structural properties of osteochondral repair tissue. *The Knee.* 1998;5:111-117.

- 73 - Kamali F, Bayat M, Torkaman G, Ebrahimi E, Salavati M. The therapeutic effect of low-level laser on repair of osteochondral defects in rabbit knee. *J Photochem Photobiol B.* 2007;88:11-15.
- 74 - Bayat M, Kamali F, Dadpay M. Effect of low-level infrared laser therapy on large surgical osteochondral defect in rabbit: a histological study. *Photomed Laser Surg.* 2009;27:25-30.
- 75 - Al-Watban FA, Andres BL. Polychromatic LED in oval full-thickness wound healing in non-diabetic and diabetic rats. *Photomed Laser Surg.* 2006;24:10-16.
- 76 - Li WT, Leu YC, Wu JL. Red-light light-emitting diode irradiation increases the proliferation and osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Photomed Laser Surg.* 2010;28 Suppl 1:S157-S165.
- 77 - Dall Agnol MA, Nicolau RA, de Lima CJ, Munin E. Comparative analysis of coherent light action (laser) versus non-coherent light (light-emitting diode) for tissue repair in diabetic rats. *Lasers Med Sci.* 2009;24:909-916.

FIGURAS

8 FIGURAS



Figura 1. Fotografia mostrando a calvária do coelho. A incisão foi realizada horizontalmente pela sutura mediana.



Figura 2. Fotografia mostrando a exposição da calvária do coelho.



Figura 3. Fotografia mostrando os defeitos realizados com trefina na calvária de coelho.

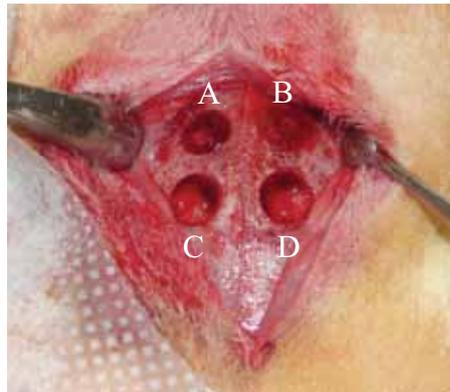


Figura 4. Fotografia mostrando a instalação dos materiais nos defeitos de calvária. Os materiais foram inseridos com uma seringa de insulina até preencherem completamente o defeito. A- Lipossoma, B- PAM, C-Base em gel e D-Nanoemulsão.



Figura 5. Fotografia mostrando os defeitos no grupo controle. A-Osso autógeno e B-Coágulo.



Figura 6. Fotografia mostrando a sutura com poligalactina 910 em planos após instalação dos materiais.



Figura 7. Fotografia mostrando a sutura da pele com fio de nylon 5-0.

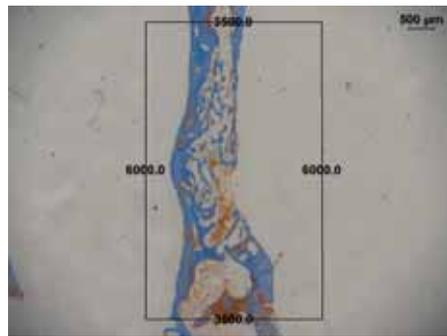


Figura 8. Fotomicrografia histológica mostrando o retângulo padronizado para mensurar a quantidade de tecido ósseo formado no interior do defeito. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

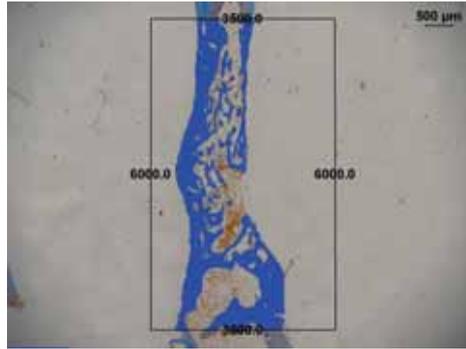


Figura 9. Fotomicrografia histológica mostrando a área de tecido ósseo selecionada em azul para a obtenção das medidas histomorfológicas. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.



Figura 10. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito do grupo de nanoemulsão aos 5 dias utilizando LED 24/48 horas preenchido por tecido conjuntivo (*) com presença de grande quantidade de matriz osteóide (seta). Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

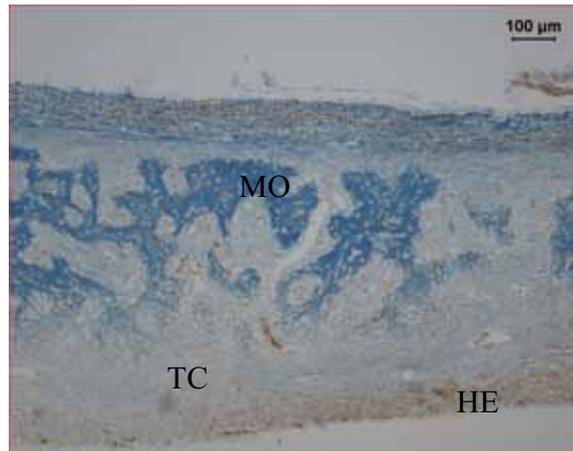


Figura 11. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito do grupo tratado pela nanoemulsão aos 5 dias com aplicação de LED 24/48 horas preenchido por tecido conjuntivo (TC) com presença de grande quantidade de matriz osteóide (MO) e algumas hemácias (HE). Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

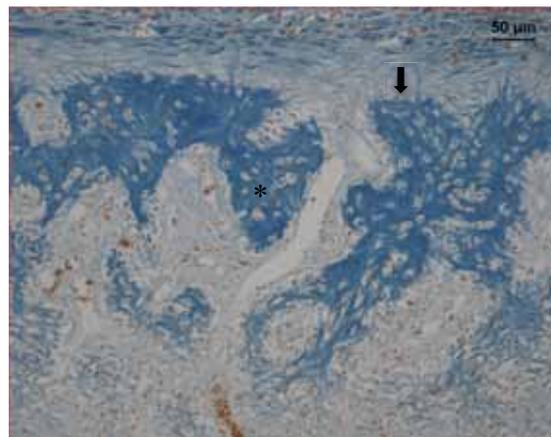


Figura 12. Fotomicrografia histológica mostrando em defeito preenchido por nanoemulsão e irradiado com LED 24/48 horas a porção central do defeito preenchida por matriz osteóide (*) com alta atividade osteoblástica (seta). Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

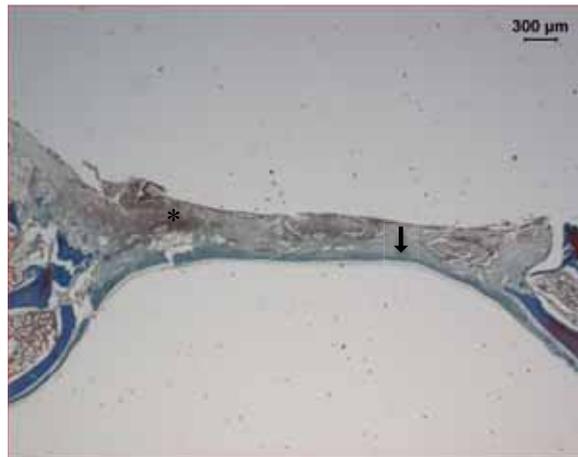


Figura 13. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido por lipossoma aos 5 dias com irradiação de LED 24/48 horas com hemácias (*) em seu interior apresentando também uma base de tecido conjuntivo (seta). Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

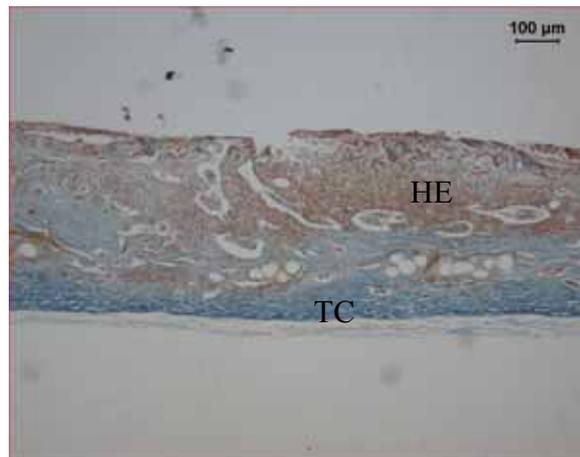


Figura 14. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito tratado por lipossoma aos 5 dias com aplicação de LED 24/48 horas com hemácias (HE) na porção superior do defeito e a formação de uma base de tecido conjuntivo (TC) no centro do defeito. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

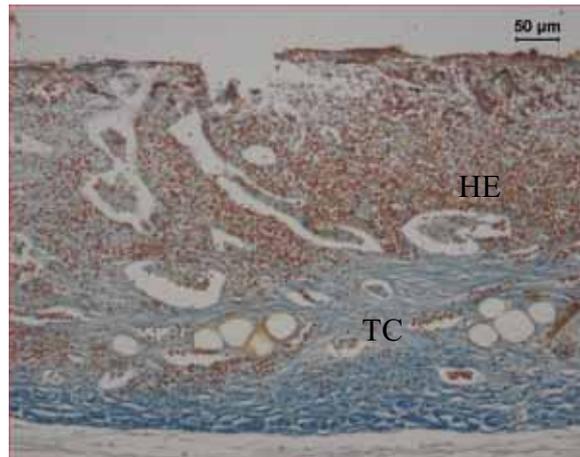


Figura 15. . Fotomicrografia histológica mostrando o defeito tratado por lipossoma aos 5 dias com aplicação de LED 24/48 horas com hemácias (HE) na porção superior do defeito e a formação de uma base de tecido conjuntivo (TC) no centro do defeito. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

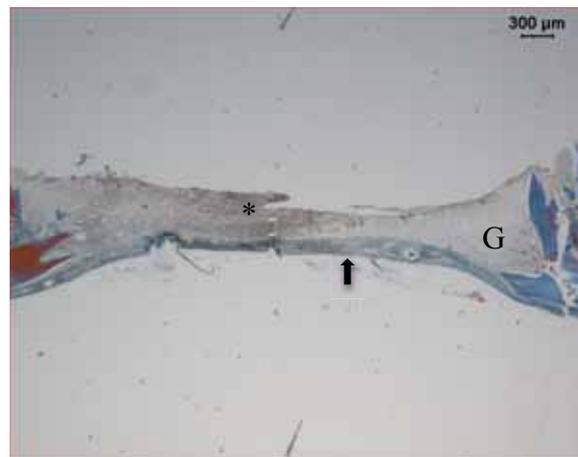


Figura 16. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito tratado pela base em gel aos 5 dias com aplicação de LED 24/48 horas preenchido por tecido conjuntivo (seta) somente na porção inferior, apresentando poucas hemácias (*) em seu interior. A maior parte do defeito está preenchida pela base em gel (G). Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

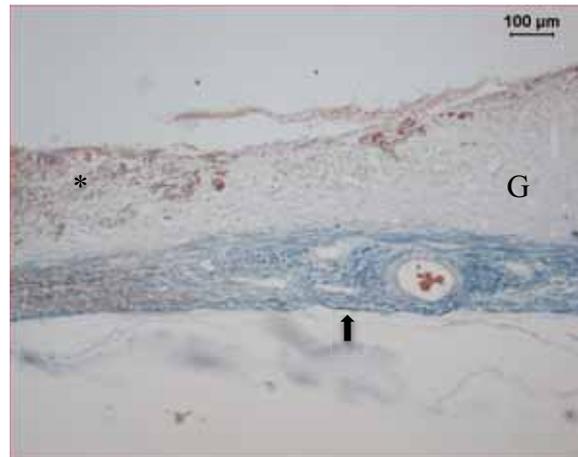


Figura 17. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito tratado pela base em gel aos 5 dias com aplicação de LED 24/48 horas preenchido por tecido conjuntivo (seta) somente na porção inferior, apresentando poucas hemácias (*) em seu interior. A maior parte do defeito está preenchida pela base em gel (G). Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

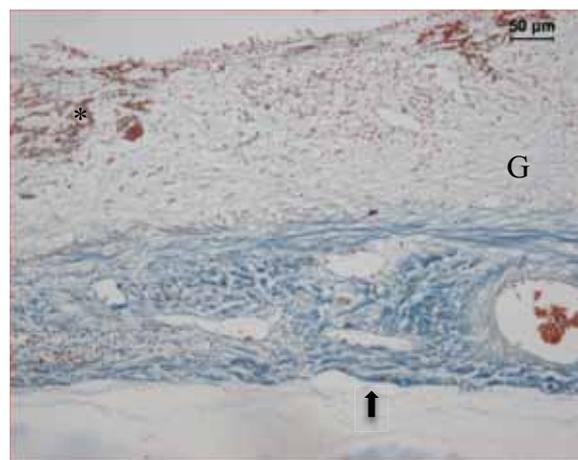


Figura 18. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito tratado pela base em gel aos 5 dias com aplicação de LED 24/48 horas preenchido por tecido conjuntivo (seta) somente na porção inferior, apresentando poucas hemácias (*) em seu interior. A maior parte do defeito está preenchida pela base em gel (G). Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

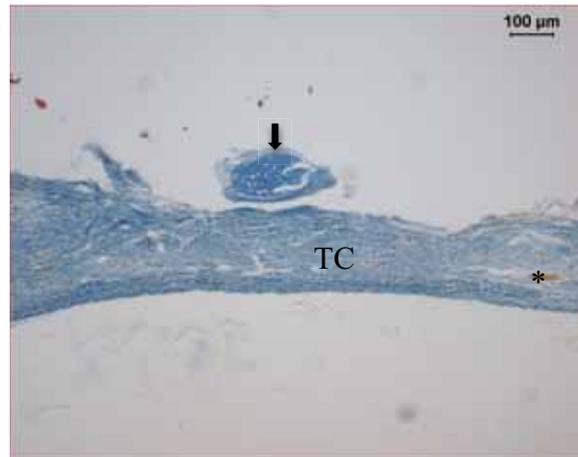


Figura 19. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito tratado com BSA aos 5 dias com aplicação de LED 24/48 horas. Defeito preenchido por tecido conjuntivo frouxo (TC) com poucas hemácias (*) aparentes e a formação de matriz osteóide (seta) isoladamente no centro do defeito. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

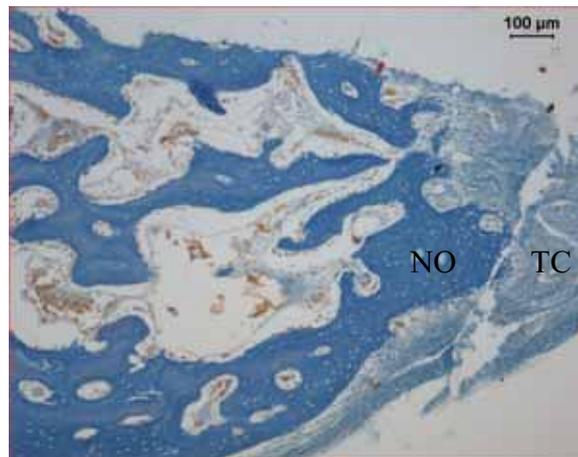


Figura 20. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito tratado com BSA aos 5 dias e aplicação de LED 24/48 horas. A partir da porção lateral do defeito ocorre a neoformação óssea (NO), juntamente com o tecido conjuntivo (TC) que preenche o defeito. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

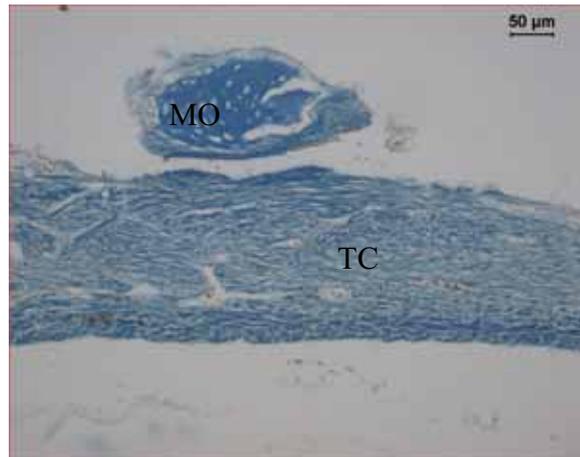


Figura 21. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito tratado com BSA aos 5 dias com aplicações de LED 24/48 horas. O centro do defeito parece com tecido conjuntivo (TC) e na porção superior a formação de matriz osteóide (MO). Coloração tricrômio de Mallory.

A barra indica o aumento.

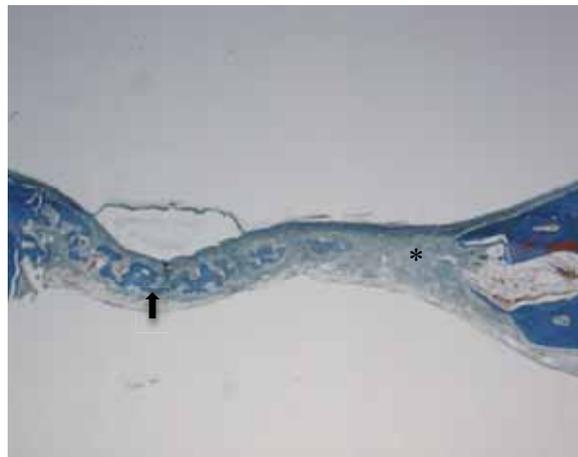


Figura 22. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido pela nanoemulsão aos 10 dias com aplicação de LED 24/48 horas. O defeito encontra-se preenchido por tecido conjuntivo (*) e algumas regiões de osso neoformado (seta) originados principalmente da lateral do defeito. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

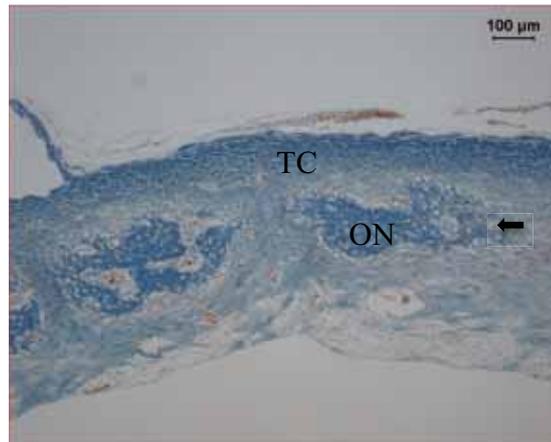


Figura 23. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito tratado com nanoemulsão aos 10 dias com aplicação de LED 24/48 horas. O centro do defeito está preenchido por tecido conjuntivo (TC) com formação de matriz osteóide (seta) dando origem ao tecido ósso neoformado (ON). Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

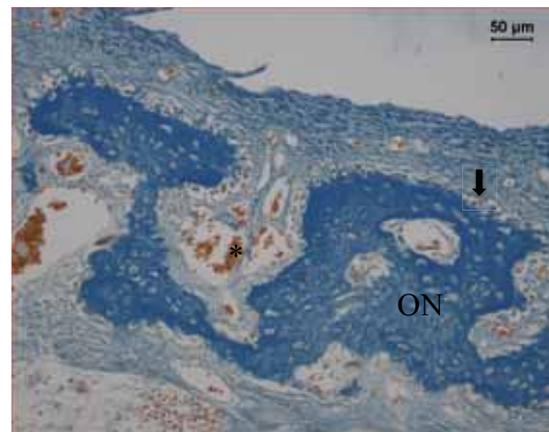


Figura 24. Fotomicrografia histológica mostrando aos 10 dias de tratamento com nanoemulsão e aplicação de LED 24/48 o tecido conjuntivo preenchido também por grande parte de osso imaturo (ON) cercado por osteoblastos (seta) principalmente na porção superior. No centro do defeito ainda encontram-se algumas hemácias (*).

Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

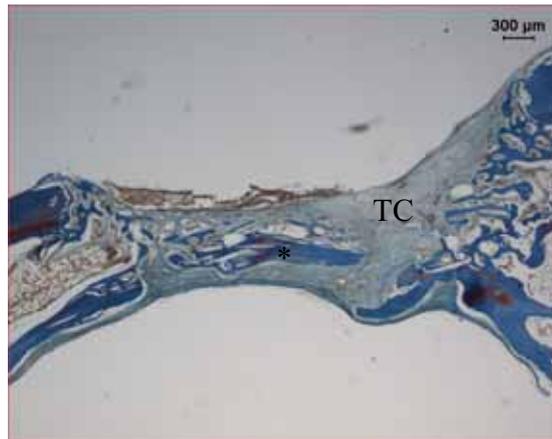


Figura 25. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido por lipossoma aos 10 dias com aplicação de LED 24/48 horas. O defeito está preenchido por tecido conjuntivo (TC) com presença de osso imaturo (*) proveniente das laterais do defeito. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

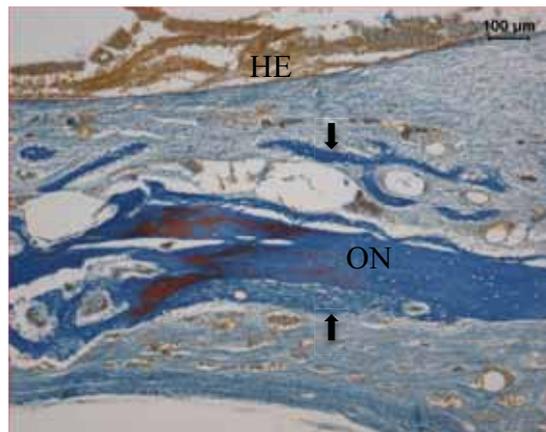


Figura 26. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido por lipossoma aos 10 dias com aplicação de LED 24/48 horas. A formação de osso neoformado (ON) ocorre no centro do defeito, circundado por tecido osteóide (seta) e a presença de várias hemácias (HE) na porção superior. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

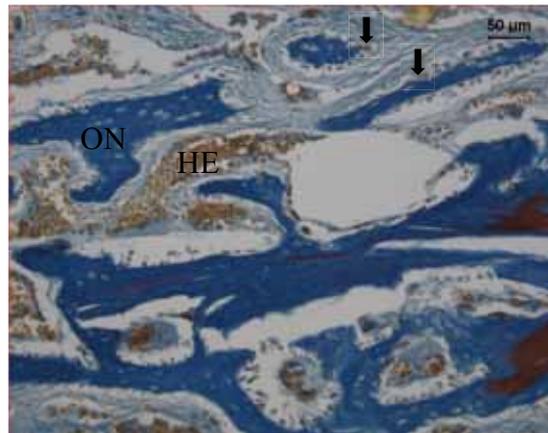


Figura 27. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido por lipossoma aos 10 dias com aplicação de LED 24/48 horas. Formação de tecido ósseo neoformado (ON) com a presença de uma linha de osteoblastos (seta) contornando este tecido. Visualiza-se também a presença de hemácias (HE) no interior do defeito. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

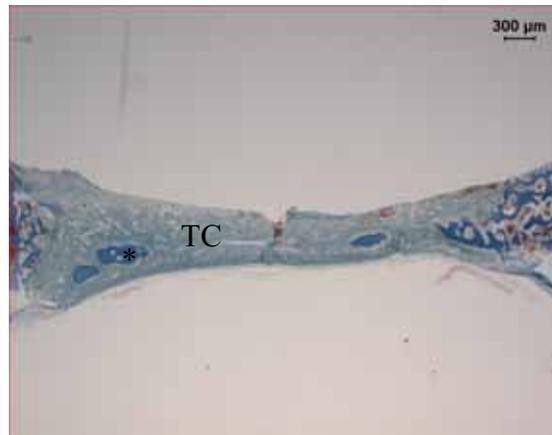


Figura 28. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido pela base em gel aos 10 dias com irradiação de LED 24/48 horas. O defeito aparece preenchido por tecido conjuntivo (TC) e com poucos focos de matriz osteóide (*) em seu interior. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

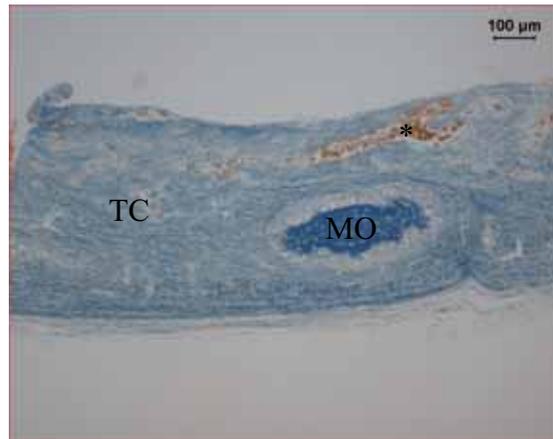


Figura 29. Fotomicrografia histológica mostrando defeito preenchido pela base em gel aos 10 dias com irradiação de LED 24/48 horas. O defeito aparece preenchido por tecido conjuntivo (TC) e com matriz osteóide (MO) em seu interior, juntamente com hemácias (*). Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

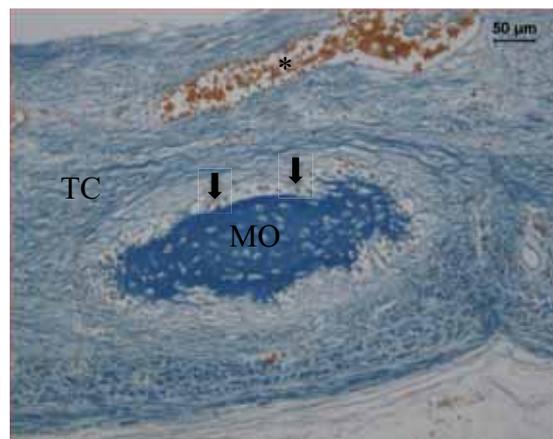


Figura 30. Fotomicrografia histológica mostrando defeito preenchido pela base em gel aos 10 dias com irradiação de LED 24/48 horas. O defeito aparece preenchido por tecido conjuntivo (TC) e com matriz osteóide (MO) em seu interior circundada por uma linha de osteoblastos (seta), juntamente com hemácias (*). Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

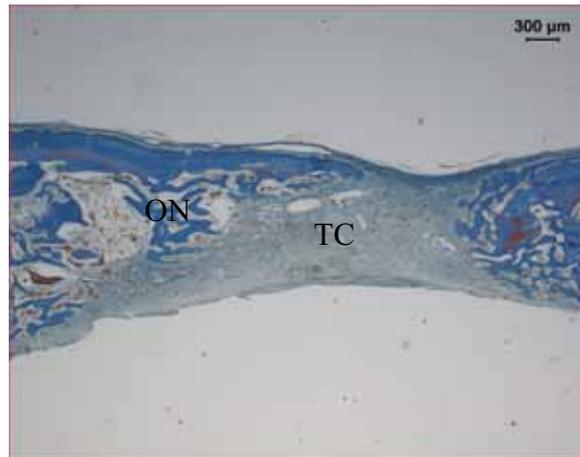


Figura 31. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido por tecido conjuntivo (TC) e presença de pouca quantidade de osso imaturo (ON) proveniente das laterais do defeito no leito preenchido por BSA aos 10 dias com irradiação LED 24/48 horas.

Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

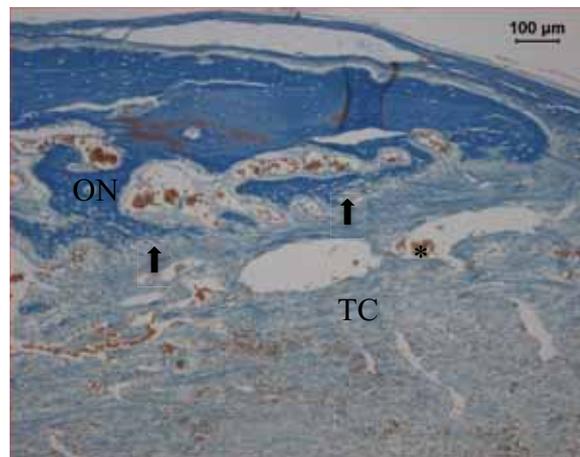


Figura 32. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido por BSA aos 10 dias com irradiação LED 24/48 horas. Presença de tecido ósseo neoformado (ON) na porção superior do defeito, logo abaixo a formação de matriz osteóide (seta). O tecido conjuntivo (TC) está presente na porção inferior do defeito com várias hemácias (*) em seu interior.

Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

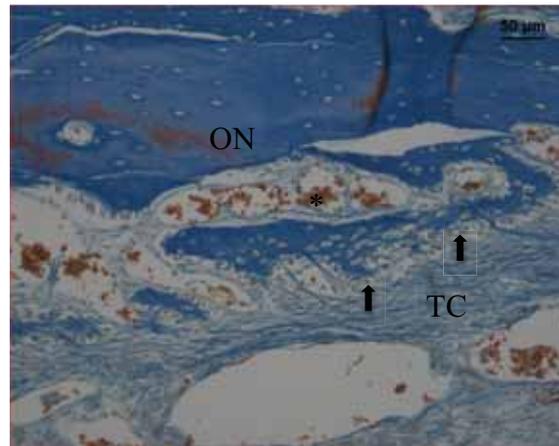


Figura 33. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido por BSA aos 10 dias com irradiação LED 24/48 horas. Presença de tecido ósseo neoformado (ON) na porção superior do defeito, logo abaixo a formação de matriz osteóide (seta). O tecido conjuntivo (TC) está presente na porção inferior do defeito com várias hemácias (*) em seu interior.

Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.



Figura 34. Fotomicrografia histológica mostrando o tecido conjuntivo (*) no interior do defeito com formações de tecido ósseo neoformado (seta) a partir das extremidades do defeito. Defeito preenchido por nanoemulsão aos 20 dias com irradiação LED 24/48 horas. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

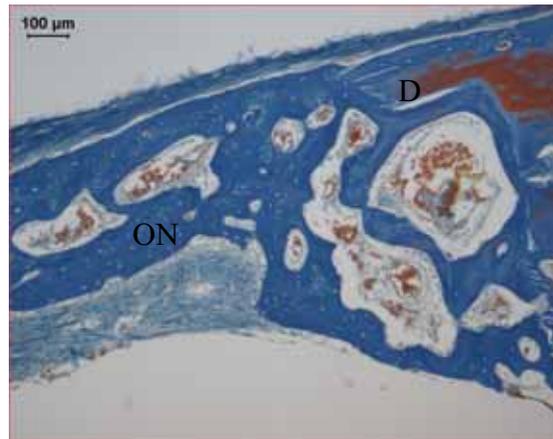


Figura 35. Fotomicrografia histológica mostrando defeito tratado com nanoemulsão aos 20 dias com irradiação LED 24/48 horas. Na porção lateral do defeito (D) a formação óssea (ON) ocorre em direção ao centro do defeito. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

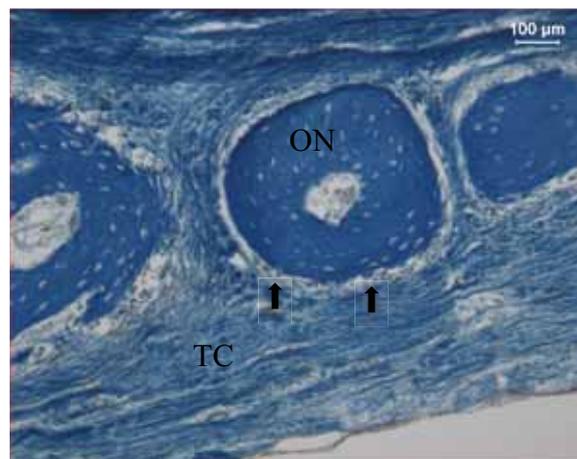


Figura 36. Fotomicrografia histológica mostrando o tecido conjuntivo (TC) no interior do defeito com formações de tecido ósseo neoformado (ON) a partir das extremidades do defeito. Este tecido ósseo está circundado por uma linha ativa de osteoblastos (seta). Defeito preenchido por nanoemulsão aos 20 dias com irradiação LED 24/48 horas. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

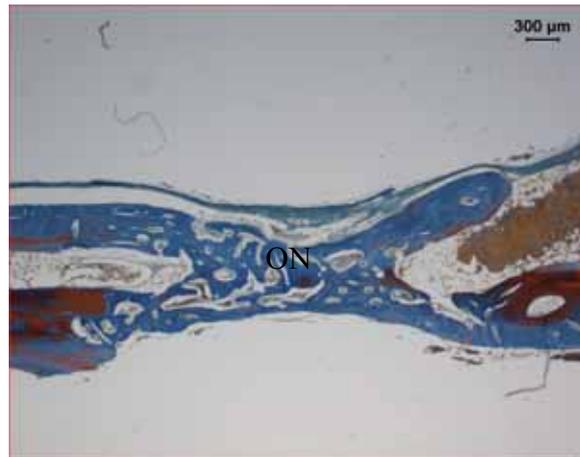


Figura 37. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito tratado por lipossoma aos 20 dias com irradiação LED 24/48 horas. O defeito está preenchido por osso neoformado (ON) em sua porção central. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

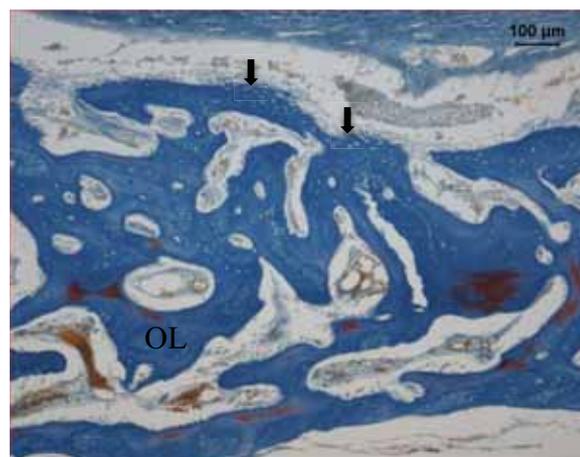


Figura 38. Fotomicrografia histológica mostrando que a base do defeito é formada por trabéculas ósseas espessas (OL), enquanto que a porção superior é formada por tecido osteóide a partir de uma linha de osteoblastos (seta). Defeito preenchido por lipossoma aos 20 dias com irradiação LED 24/48 horas. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

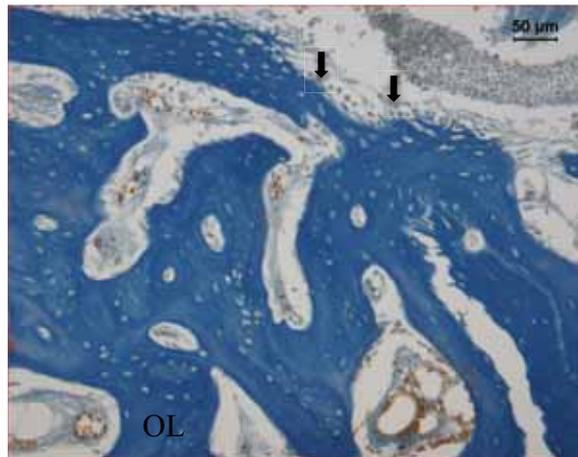


Figura 39. Fotomicrografia histológica mostrando as trabéculas ósseas lamelares (OL) na porção mais inferior, com a porção superior composta de uma linha de osteoblastos (seta) depositando matriz osteóide. Defeito preenchido por lipossoma aos 20 dias com irradiação LED 24/48 horas. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

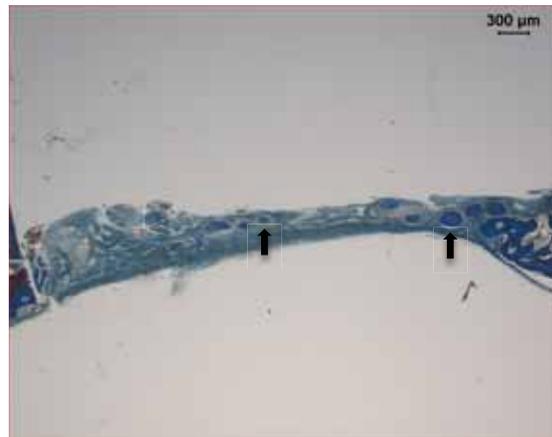


Figura 40. Fotomicrografia histológica mostrando o preenchimento do defeito com algumas trabéculas ósseas neoformadas (seta) nas laterais. Defeito tratado com BSA aos 20 dias e irradiado com LED 24/48 horas. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

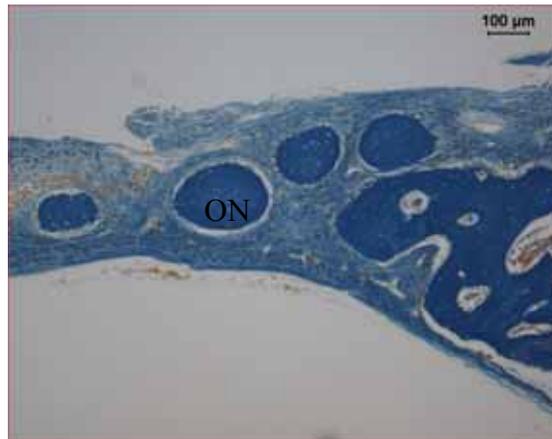


Figura 41. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito tratado com BSA aos 20 dias com irradiação LED 24/48 horas. O reparo ósseo proveniente da porção lateral do defeito propicia a formação de ilhas de osso imaturo (ON). Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

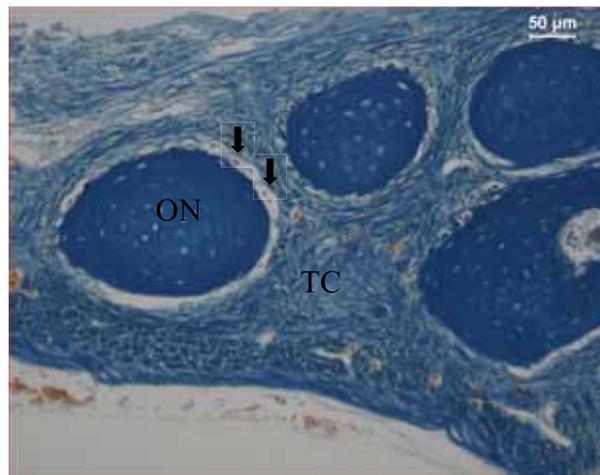


Figura 42. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido pela BSA aos 20 dias com irradiação LED 24/48 horas. Presença de tecido conjuntivo (TC) com ilhas de tecido ósseo neoformado (ON) circundadas por linhas de osteoblastos (seta). Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

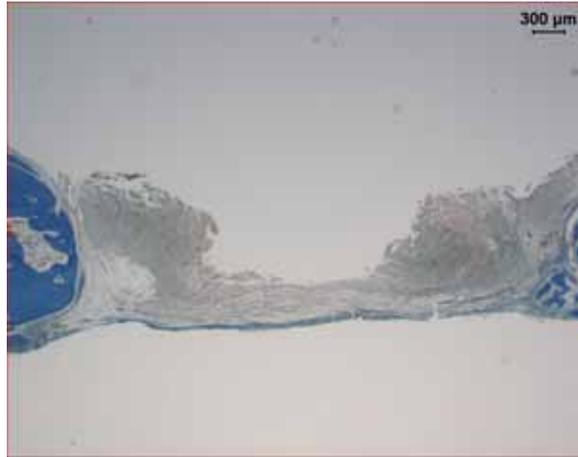


Figura 43. Fotomicrografia histológica da base em gel aos 20 dias com aplicação de LED 24/48 horas. A formação de tecido ósseo está comprometida, visto que o defeito está vazio, somente tecido de granulação em seu interior. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

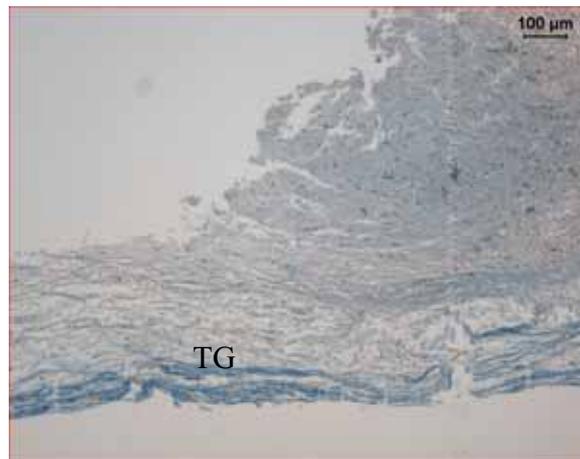


Figura 44. Fotomicrografia histológica da base em gel aos 20 dias com irradiação LED de 24/48 horas. Presença de tecido de granulação (TG) porém sem sinais de matriz osteóide. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

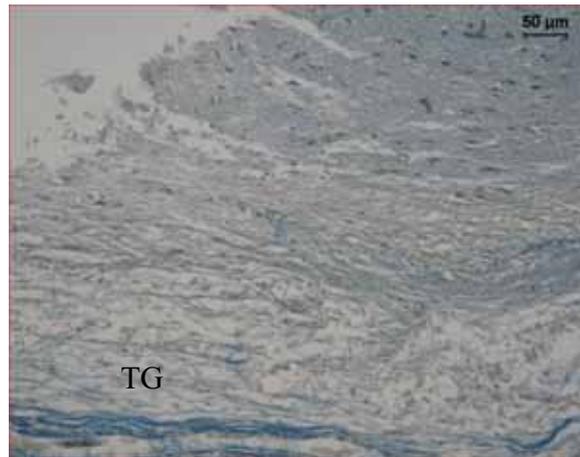


Figura 45. Fotomicrografia histológica da base em gel aos 20 dias ativada por LED 24/48 horas. A base do defeito ainda está revestida com tecido de granulação (TG). Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.



Figura 46. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido por tecido conjuntivo com hemácias (*) na porção superior e a formação de matriz osteóide (seta) principalmente na porção lateral do defeito. Defeito preenchido por nanoemulsão aos 5 dias com aplicação de LED 72/96 horas. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

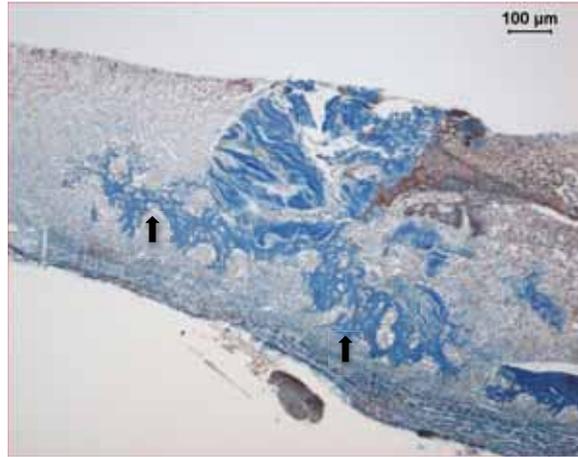


Figura 47. Fotomicrografia histológica mostrando a formação de matriz osteóide (seta) a partir da porção lateral do defeito utilizando nanoemulsão aos 5 dias com aplicação de LED 72/96 horas. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

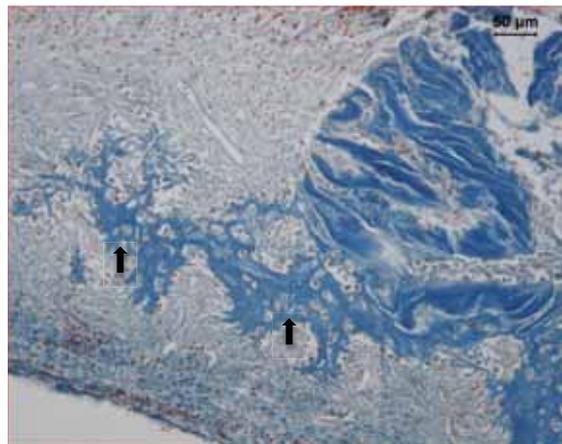


Figura 48. Fotomicrografia histológica mostrando a formação de matriz osteóide (seta) a partir da porção lateral do defeito utilizando nanoemulsão aos 5 dias com aplicação de LED 72/96 horas. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.



Figura 49. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido por tecido conjuntivo com várias hemácias (*) na porção superior e a formação de matriz osteóide (seta). Defeito tratado por lipossoma aos 5 dias com aplicação de LED 72/96 horas. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

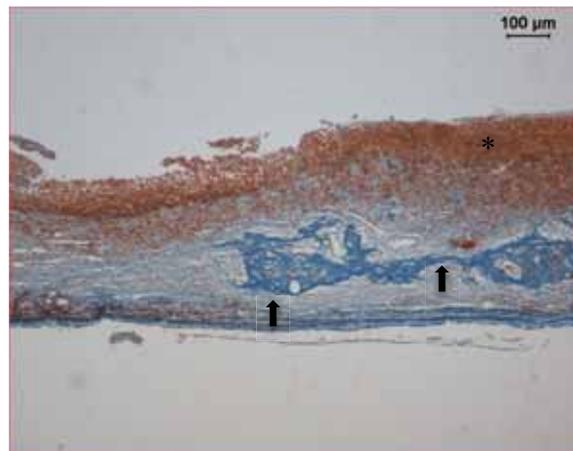


Figura 50. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito tratado com lipossoma aos 5 dias e aplicação de LED 72/96 horas. Presença de osso neoformado (seta) no centro do defeito com várias hemácias (*) na porção superior. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

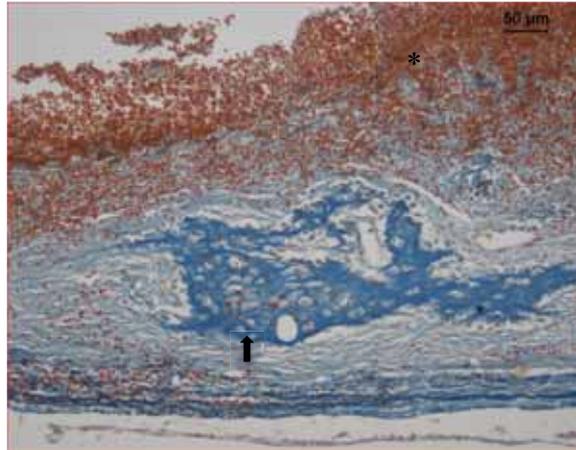


Figura 51. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito tratado com lipossoma aos 5 dias e aplicação de LED 72/96 horas. Presença de osso neoformado (seta) no centro do defeito com várias hemácias (*) na porção superior. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

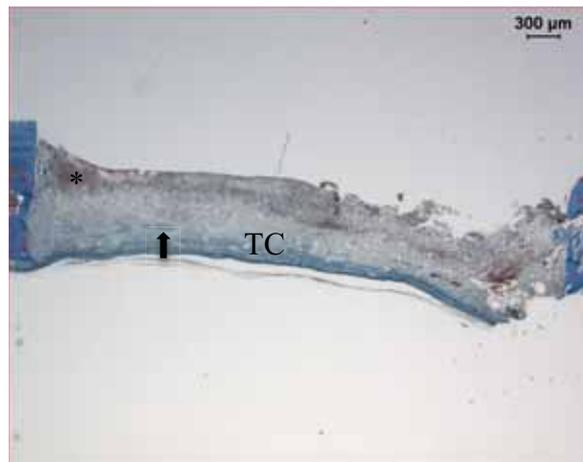


Figura 52. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido por tecido conjuntivo (TC) com várias hemácias (*) na porção superior e poucos focos da formação de matriz osteóide (seta). Defeito tratado por BSA aos 5 dias e irradiação LED 72/96 horas.

Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

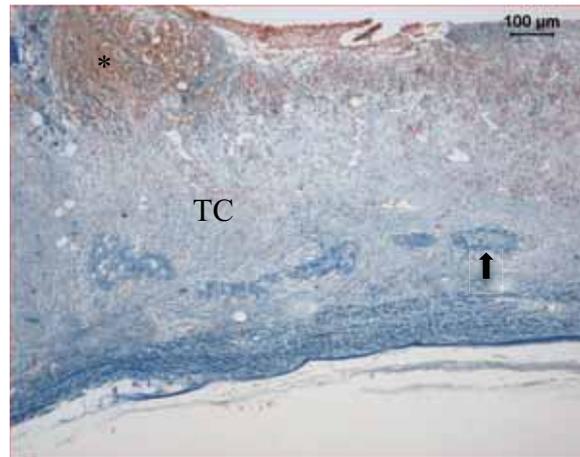


Figura 53. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido por tecido conjuntivo (TC) com várias hemácias (*) na porção superior e poucos focos da formação de matriz osteóide (seta). Defeito tratado por BSA aos 5 dias e irradiação LED 72/96 horas. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

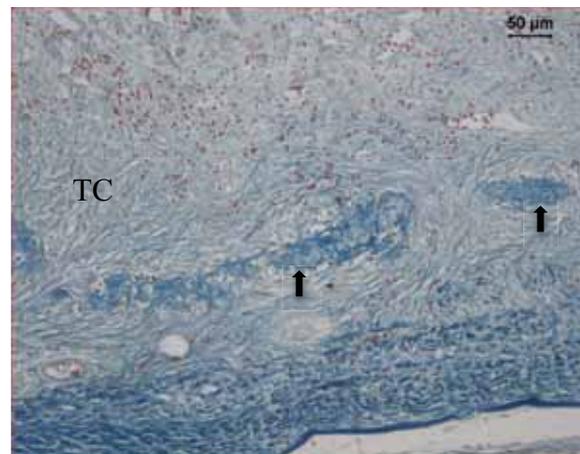


Figura 54. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido por tecido conjuntivo (TC) e poucos focos da formação de matriz osteóide (seta). Defeito tratado por BSA aos 5 dias e irradiação LED 72/96 horas. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

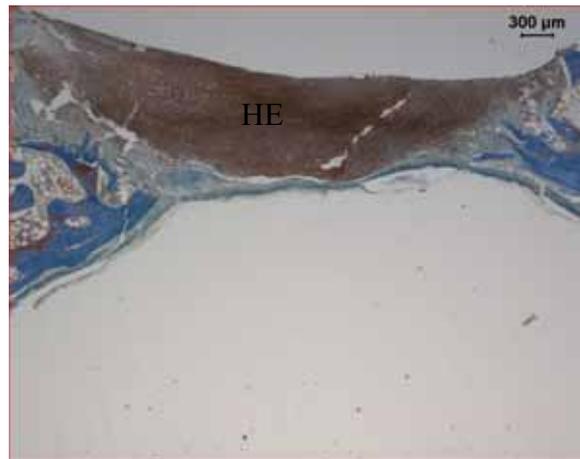


Figura 55. Fotomicrografia histológica mostrando a base de gel em 5 dias com aplicação de LED 72/96 horas. Defeito preenchido por material denso com grande concentrado de hemácias (HE) em sua formação. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.



Figura 56. Fotomicrografia histológica mostrando a base de gel em 5 dias com aplicação de LED 72/96 horas. Presença de hemácias (HE) no interior do defeito. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.



Figura 57. Fotomicrografia histológica mostrando a base de gel em 5 dias com aplicação de LED 72/96 horas. Presença de hemácias (HE) no interior do defeito. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

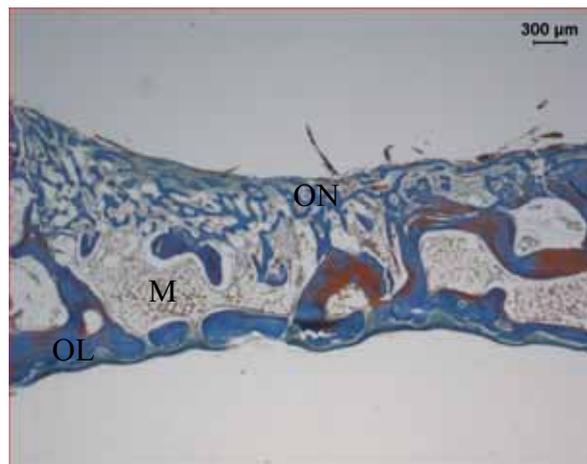


Figura 58. Fotomicrografia histológica mostrando a base do defeito formada por uma linha de trabéculas ósseas espessas (OL), acima uma porção medular (M) com com trabéculas recém formadas por osso imaturo (ON). Defeito tratado com nanoemulsão aos 10 dias com irradiação LED 72/96 horas. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

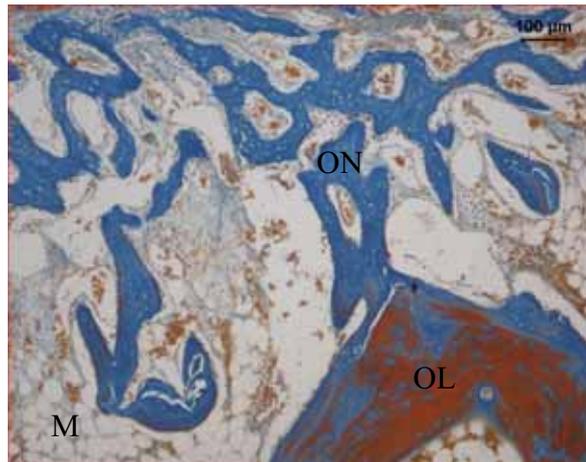


Figura 59. Fotomicrografia histológica mostrando a base do defeito formada por trabéculas ósseas espessas (OL), acima uma porção medular (M) com com trabéculas recém formadas por osso imaturo (ON). Defeito tratado com nanoemulsão aos 10 dias com irradiação LED 72/96 horas. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

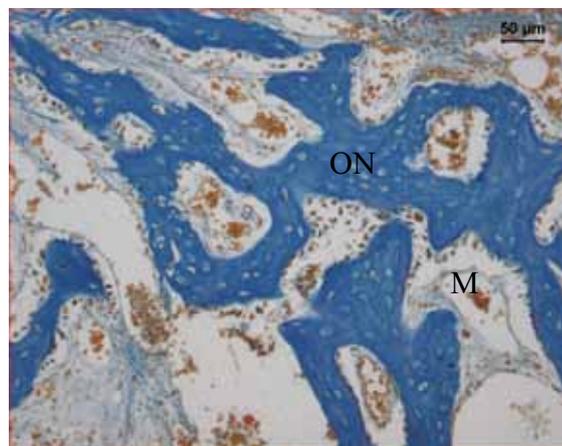


Figura 60. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito tratado com nanoemulsão aos 10 dias com irradiação LED 72/96 horas. Presença de osso neoformado (ON) circundado pela porção medular (M). Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

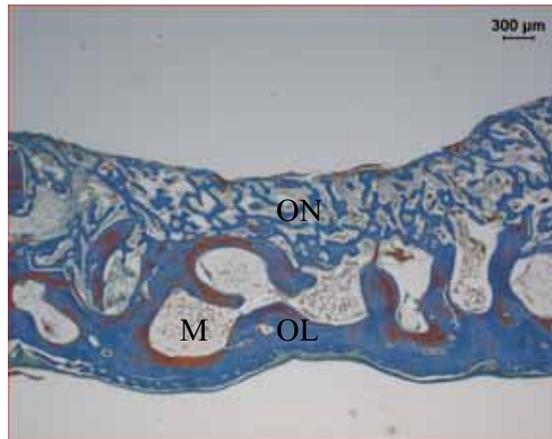


Figura 61. Fotomicrografia histológica mostrando a base do defeito formada por uma linha de trabéculas ósseas espessas (OL), na parte superior uma porção medular (M) com trabéculas recém formadas por osso imaturo (ON). Defeito preenchido por lipossoma aos 10 dias com irradiação LED 72/96 horas. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

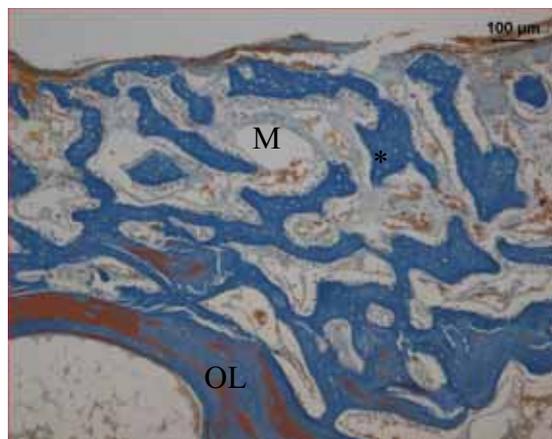


Figura 62. Fotomicrografia histológica mostrando a base do defeito formada por trabéculas ósseas espessas (OL), na parte superior uma porção medular (M) com trabéculas recém formadas por osso imaturo (*). Defeito preenchido por lipossoma aos 10 dias com irradiação LED 72/96 horas. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

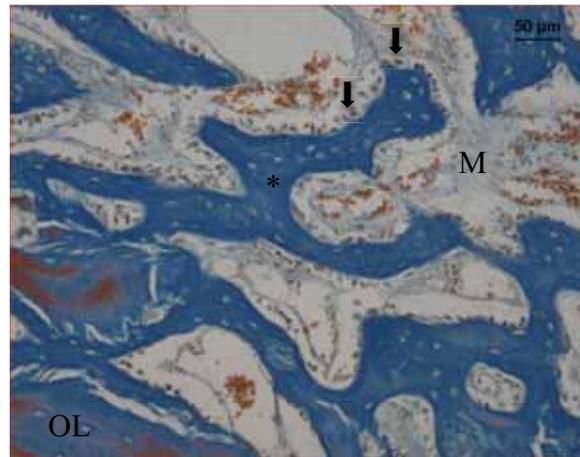


Figura 63. Fotomicrografia histológica mostrando a formação de trabéculas ósseas espessas (OL), na parte superior uma porção medular (M) com trabéculas recém formadas por osso imaturo (*) circundadas por uma linha de osteoblastos ativos (seta). Defeito preenchido por lipossoma aos 10 dias com irradiação LED 72/96 horas. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

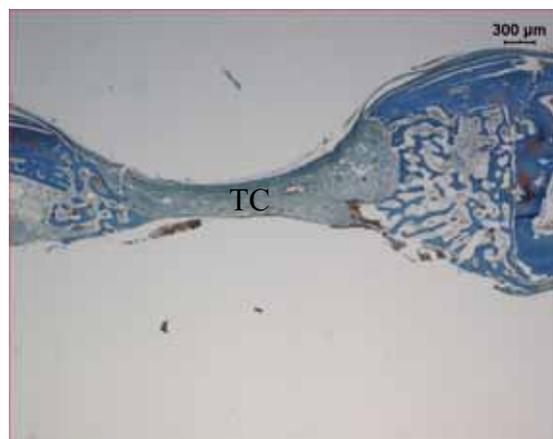


Figura 64. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido por tecido conjuntivo frouxo (TC). Defeito tratado com BSA aos 10 dias e irradiação LED 72/96 horas. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

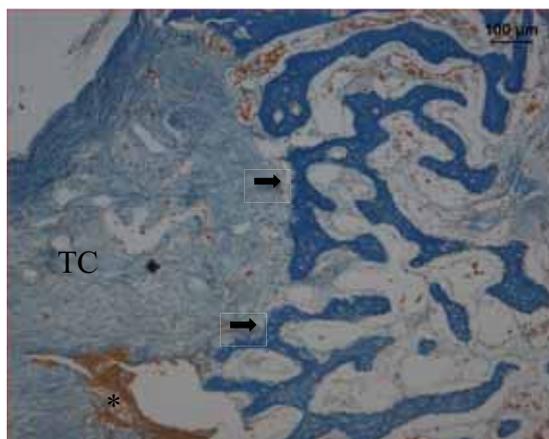


Figura 65. Fotomicrografia histológica mostrando a parte lateral do defeito onde se têm início o processo de reparo ósseo com tecido conjuntivo (TC) e uma linha de osteoblastos ativos (seta). Abaixo, a presença de hemácias (*). Defeito preenchido por BSA aos 10 dias com irradiação LED 72/96 horas. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

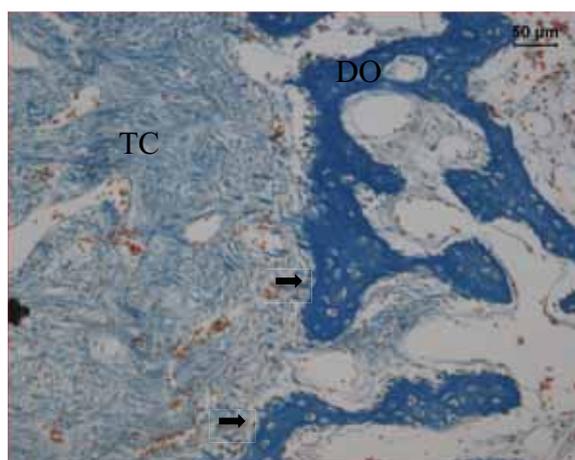


Figura 66. Fotomicrografia histológica mostrando a parte lateral do defeito (DO) onde se têm início o processo de reparo ósseo com tecido conjuntivo (TC) e uma linha de osteoblastos ativos (seta). Defeito preenchido por BSA aos 10 dias com irradiação LED 72/96 horas.

Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

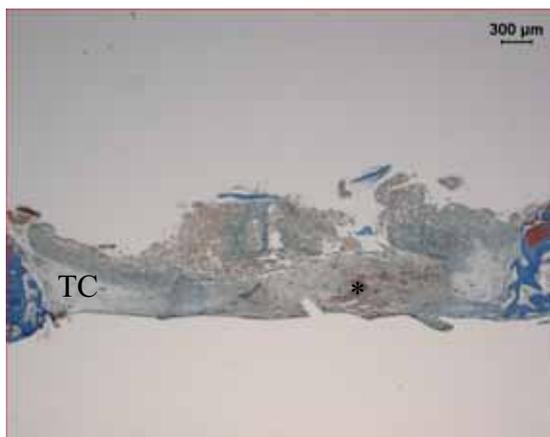


Figura 67. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido por tecido conjuntivo frouxo (TC) com poucas hemácias (*) em seu interior. Tratamento de base em gel aos 10 dias com irradiação LED 72/96 horas. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

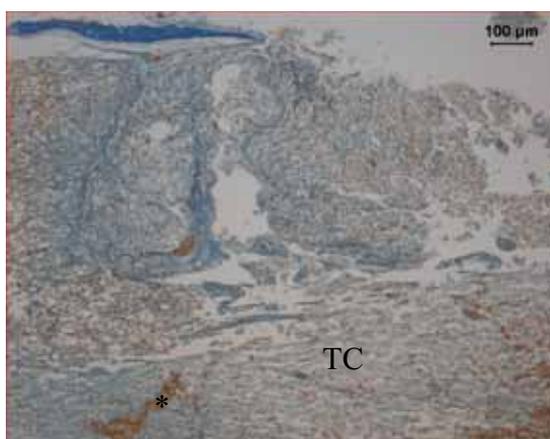


Figura 68. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido por tecido conjuntivo frouxo (TC) com poucas hemácias (*) em seu interior. Tratamento de base em gel aos 10 dias com irradiação LED 72/96 horas. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

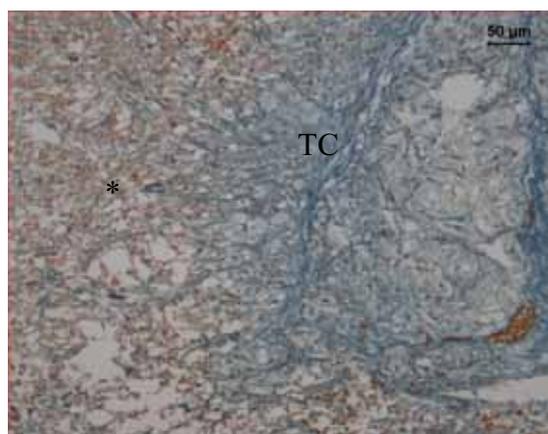


Figura 69. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido por tecido conjuntivo frouxo (TC) com poucas hemácias (*) em seu interior. Tratamento de base em gel aos 10 dias com irradiação LED 72/96 horas. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

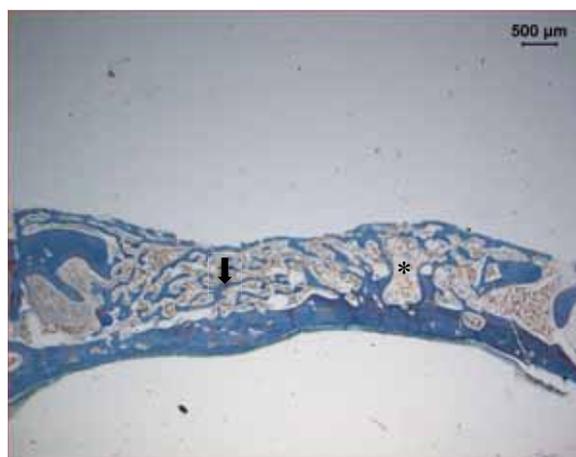


Figura 70. Fotomicrografia histológica mostrando o preenchimento do defeito por trabéculas ósseas neoformadas (seta) ainda envoltas a uma grande porção medular (*) no grupo tratado por nanoemulsão aos 20 dias com irradiação LED 72/96 horas. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

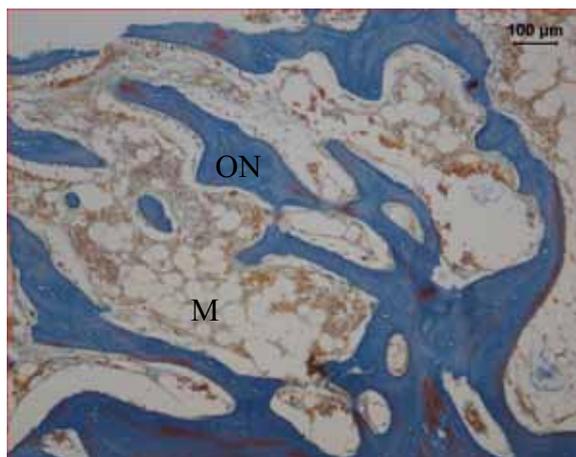


Figura 71. Fotomicrografia histológica mostrando defeito preenchido por nanoemulsão aos 20 dias com irradiação LED 72/96 horas. Presença de trabéculas ósseas neoformadas (ON) no interior do defeito circundadas pela porção óssea medular (M). Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

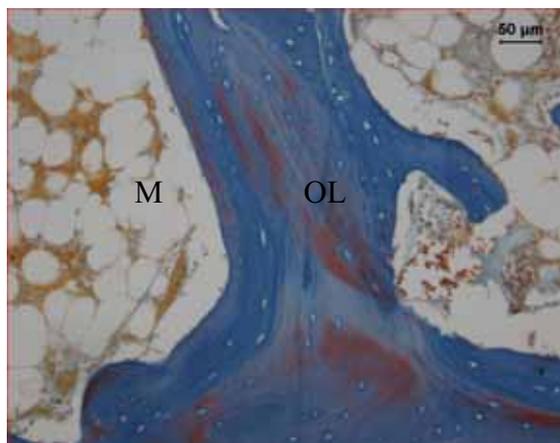


Figura 72. Fotomicrografia histológica mostrando uma trabécula óssea lamelar (OL) circundada por porção medular (M) do osso em um defeito tratado com nanoemulsão aos 20 dias com irradiação LED 72/96 horas. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

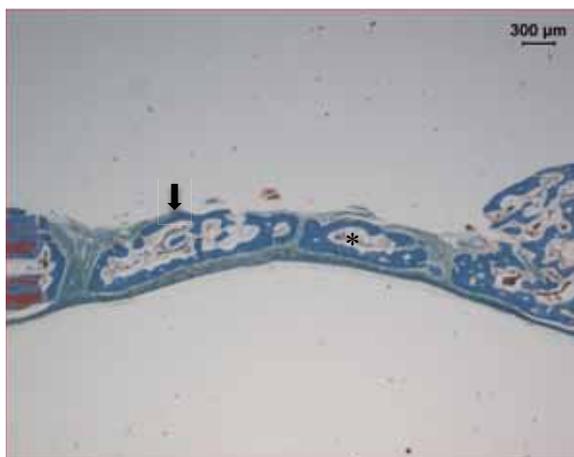


Figura 73. Fotomicrografia histológica mostrando o preenchimento do defeito por trabéculas ósseas neoformadas (seta) ainda envoltas a uma grande porção medular (*) no grupo preenchido por lipossoma aos 20 dias com irradiação LED 72/96 horas. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

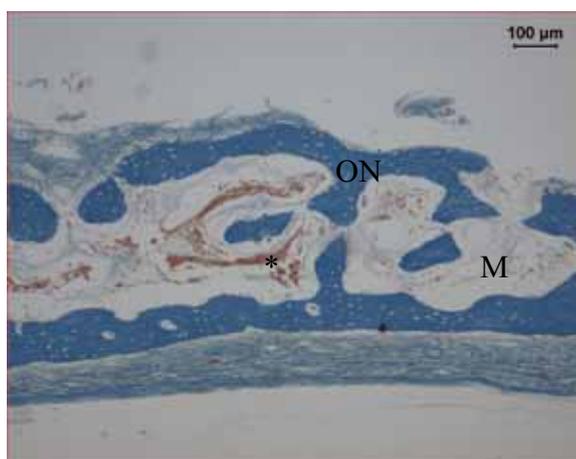


Figura 74. Fotomicrografia histológica do defeito preenchido por lipossoma aos 20 dias com irradiação LED 72/96 horas. Tecido ósseo neoformado (ON) no interior do defeito, com grande porção medular (M) e hemácias (*). Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

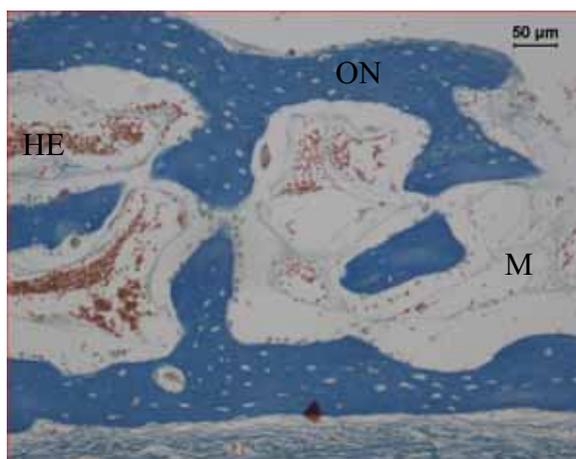


Figura 75. Fotomicrografia histológica do defeito preenchido por lipossoma aos 20 dias com irradiação LED 72/96 horas. Tecido ósseo neoformado (ON) no interior do defeito, com grande porção medular (M) e hemácias (HE). Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

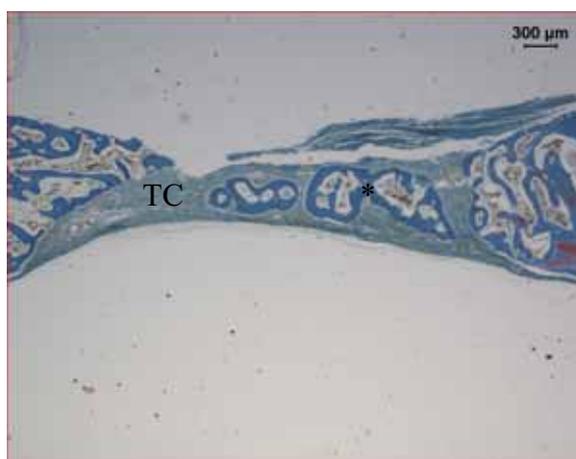


Figura 76. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido por BSA aos 20 dias com aplicação de LED 72/96 horas. O defeito está preenchido por tecido conjuntivo (TC) e com algumas porções de osso imaturo (*). Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

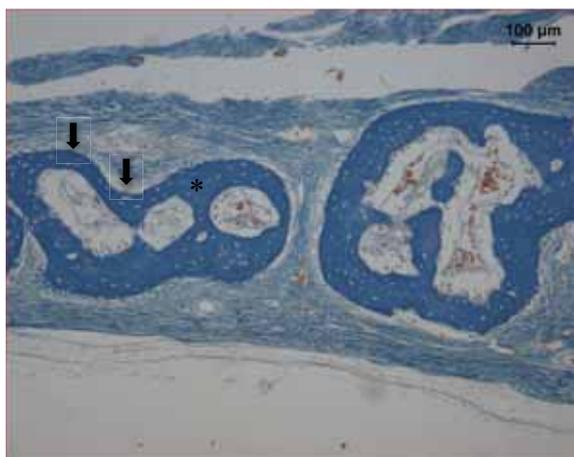


Figura 77. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido por BSA aos 20 dias com irradiação de LED 72/96 horas. A presença de tecido ósseo imaturo (*) envolto por uma linha de osteoblastos (seta). Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

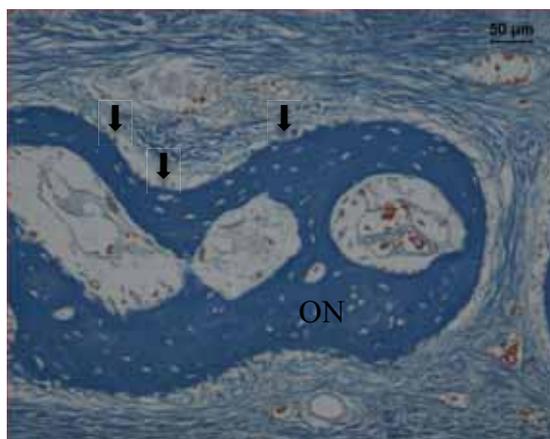


Figura 78. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito preenchido por BSA aos 20 dias com irradiação de LED 72/96 horas. A presença de tecido ósseo (ON) imaturo envolto por uma linha de osteoblastos (seta). Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

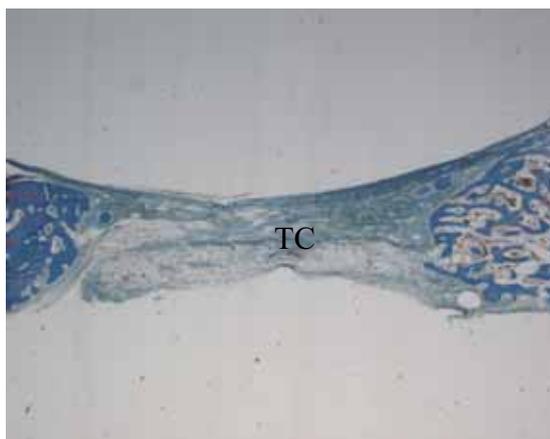


Figura 79. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito tratado pela base em gel aos 20 dias com aplicação de LED 72/96. Apresenta tecido conjuntivo (TC) no seu interior, sem nenhum indício de formação de matriz osteóide. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

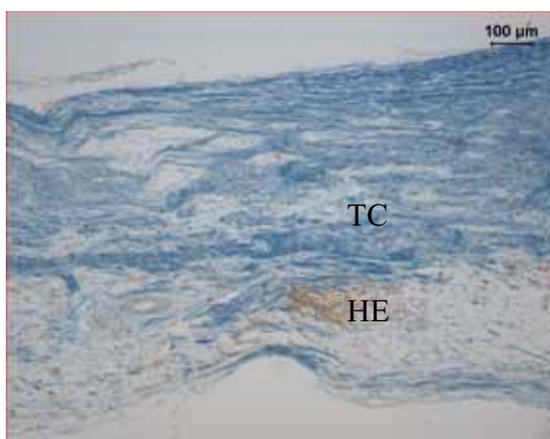


Figura 80. Fotomicrografia histológica mostrando o tecido conjuntivo (TC) frouxo com algumas hemácias (HE) no grupo tratado pela base em gel aos 20 dias com irradiação LED 72/96 horas. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento

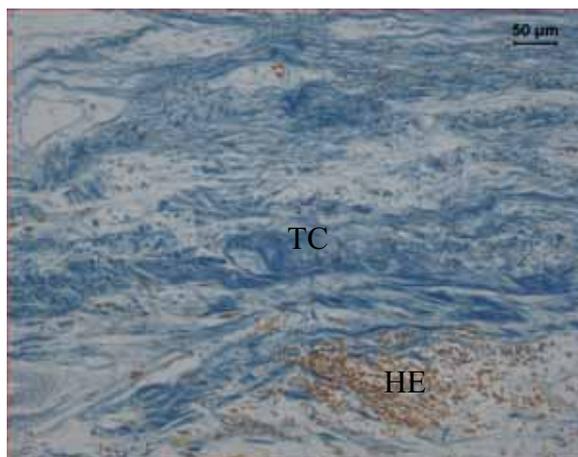


Figura 81. Fotomicrografia histológica mostrando o tecido conjuntivo (TC) frouxo com algumas hemácias (HE) no grupo tratado pela base em gel aos 20 dias com irradiação LED 72/96 horas. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

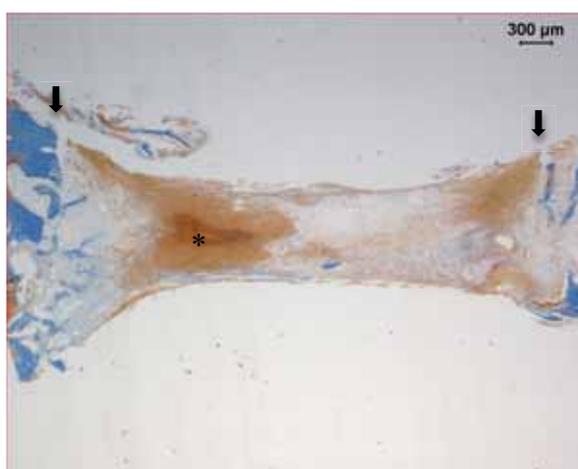


Figura 82. Fotomicrografia histológica da área do defeito ósseo após 5 dias de reparo ósseo no grupo controle com coágulo. Nota-se os limites do defeito (setas) e o seu preenchimento com hemácias (*). Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

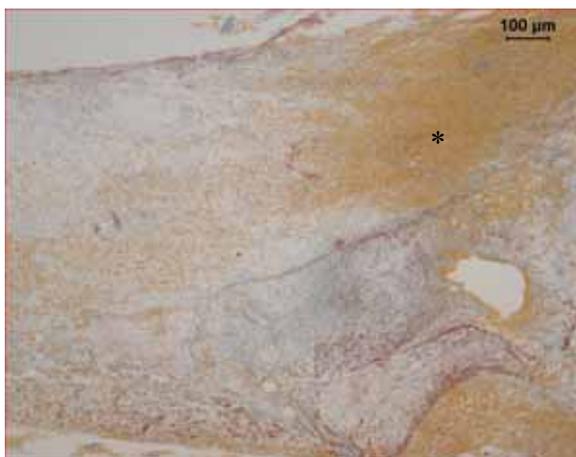


Figura 83. Fotomicrografia histológica mostrando o coágulo aos 5 dias. Nesta fase do reparo ósseo o coágulo, rico em hemácias (*) está sendo gradativamente substituído por tecido de granulação. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

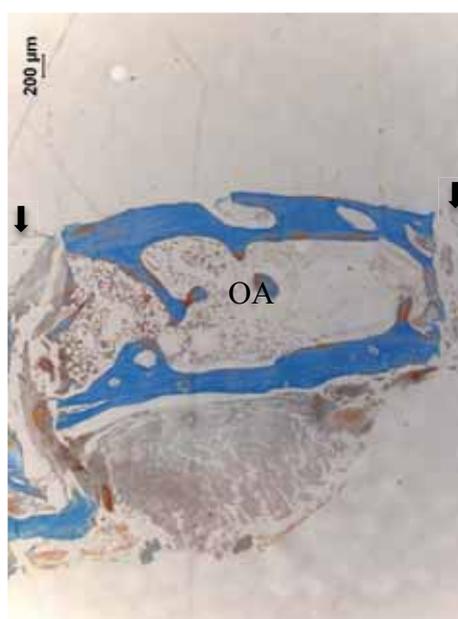


Figura 84. Fotomicrografia histológica do osso autógeno aos 5 dias mostrando as paredes do defeito (seta) e o preenchimento completo da cavidade com osso autógeno (OA). Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

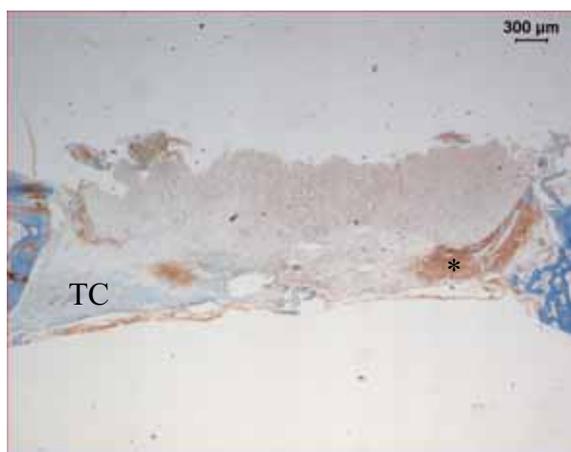


Figura 85. Fotomicrografia histológica mostrando o defeito ósseo aos 10 dias preenchido somente com coágulo. O centro do defeito está povoado por tecido conjuntivo (TC) neoformado oriundo da rede de fibrina formada anteriormente. Ainda há presença de hemácias (*) nas laterais do tecido. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

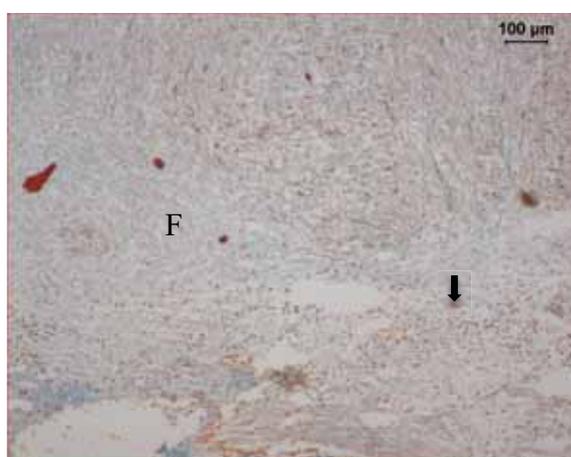


Figura 86. Fotomicrografia histológica do grupo controle preenchido com coágulo aos 10 dias. A partir das laterais do defeito o tecido conjuntivo neoformado é invaginado para o centro do alvéolo, preenchido ainda pela rede de fibrina (F) e com hemácias (seta). Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

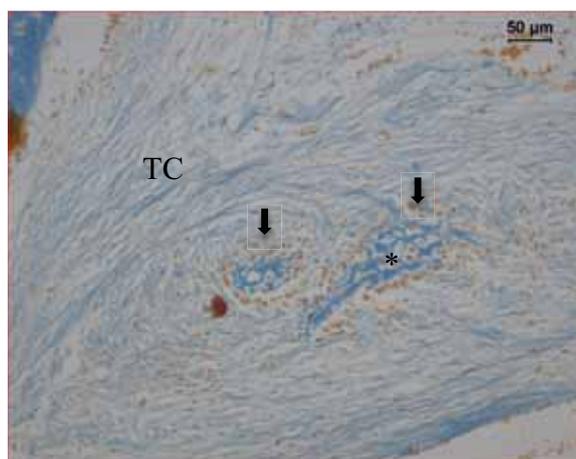


Figura 87. Fotomicrografia histológica do grupo controle utilizando coágulo aos 10 dias. Na porção lateral do defeito, onde há uma maior porção de tecido conjuntivo (TC) neoformado há formação de um tecido osteóide (*) cercado por hemácias (seta). Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

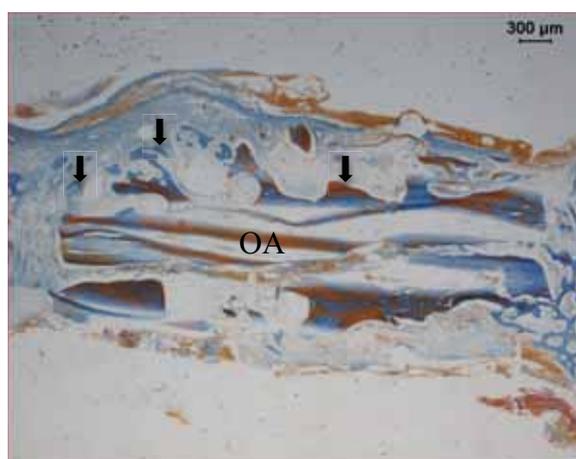


Figura 88. Fotomicrografia histológica mostrando osso autógeno (OA) aos 10 dias com grande padrão de absorção (seta) na porção superior do osso. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

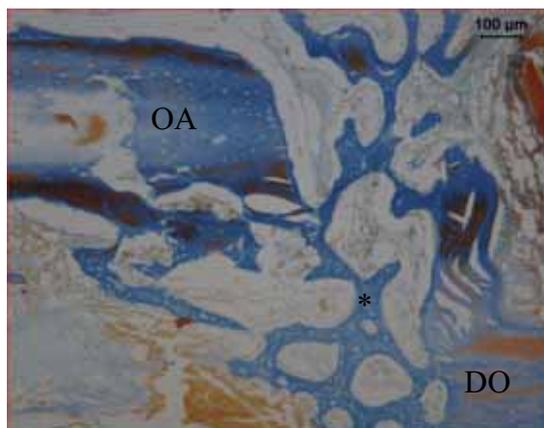


Figura 89. Fotomicrografia histológica de osso autógeno aos 10 dias. Há formação de tecido ósseo imaturo (*) a partir dos limites laterais do defeito, fazendo a ligação entre a parede do defeito (DO) e o osso (OA) instalado em seu interior. Coloração tricrômio de Mallory.

A barra indica o aumento.

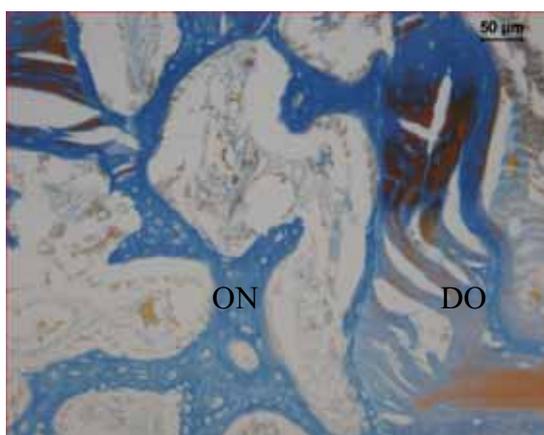


Figura 90. Fotomicrografia histológica de osso autógeno aos 10 dias. A formação de osso imaturo (ON) na junção entre o defeito ósseo (DO) e o osso autógeno. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

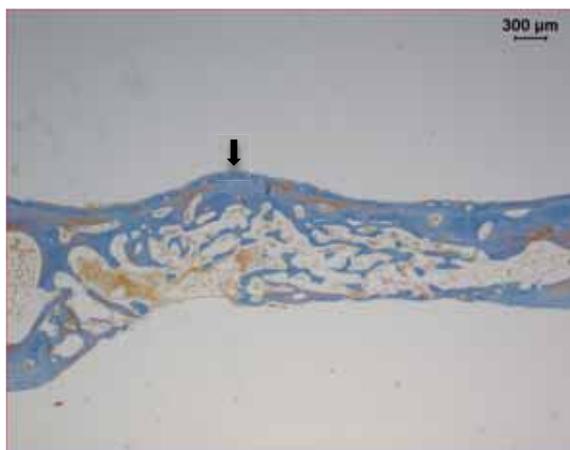


Figura 91. Fotomicrografia histológica mostrando o grupo controle com coágulo aos 20 dias.

A formação do calo ósseo (seta) ocorre na porção central do defeito. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

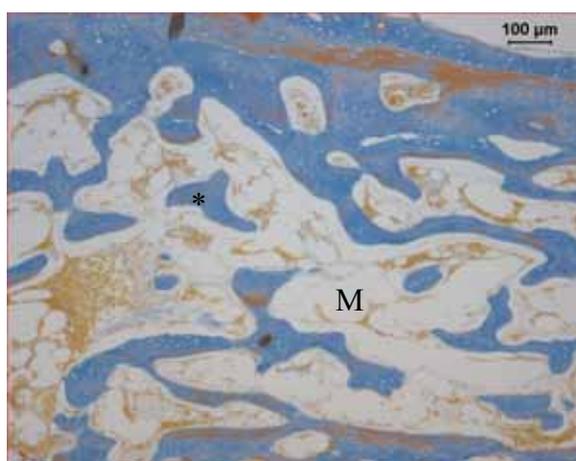


Figura 92. Fotomicrografia histológica do grupo controle usando coágulo aos 20 dias.

Trabeculas ósseas neoformadas (*) no centro do defeito, envoltas pela porção medular do osso (M). Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

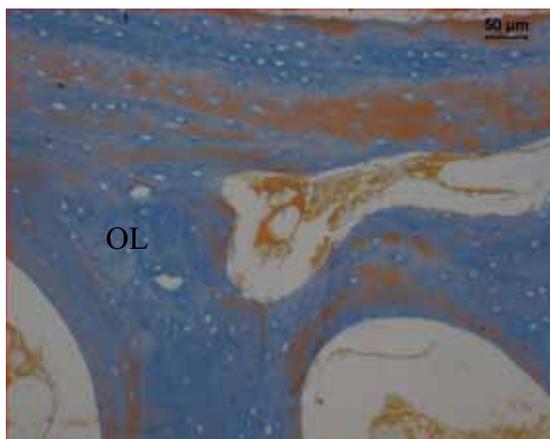


Figura 93. Fotomicrografia histológica do grupo controle usando coágulo aos 20 dias, mostrando as corticais espessas formadas por osso lamelar (OL) no interior do defeito.

Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

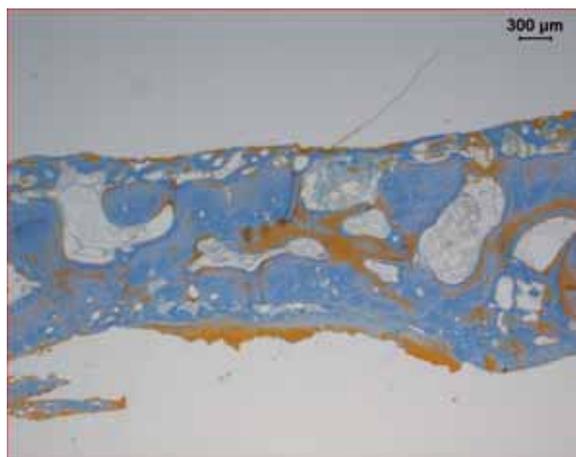


Figura 94. Fotomicrografia histológica de osso autógeno aos 20 dias mostrando a completa adaptação do osso no defeito. Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

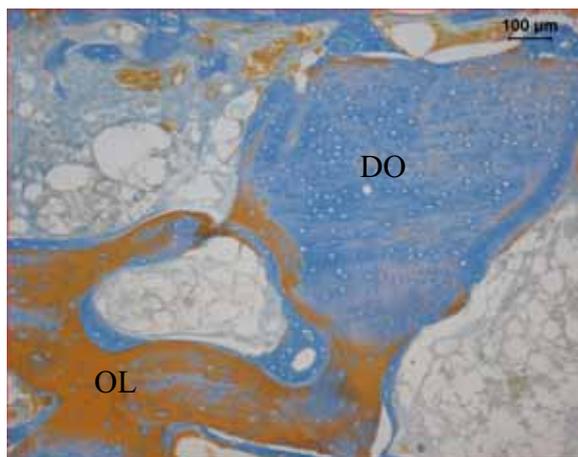


Figura 95. Fotomicrografia histológica de osso autógeno aos 20 dias mostrando a formação de osso lamelar (OL) no limite do defeito ósseo (DO). Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

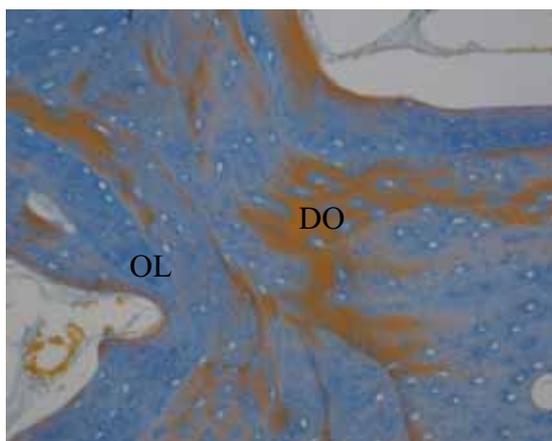


Figura 96. Fotomicrografia histológica de osso autógeno aos 20 dias mostrando a formação de osso lamelar (OL) no limite do defeito ósseo (DO). Coloração tricrômio de Mallory. A barra indica o aumento.

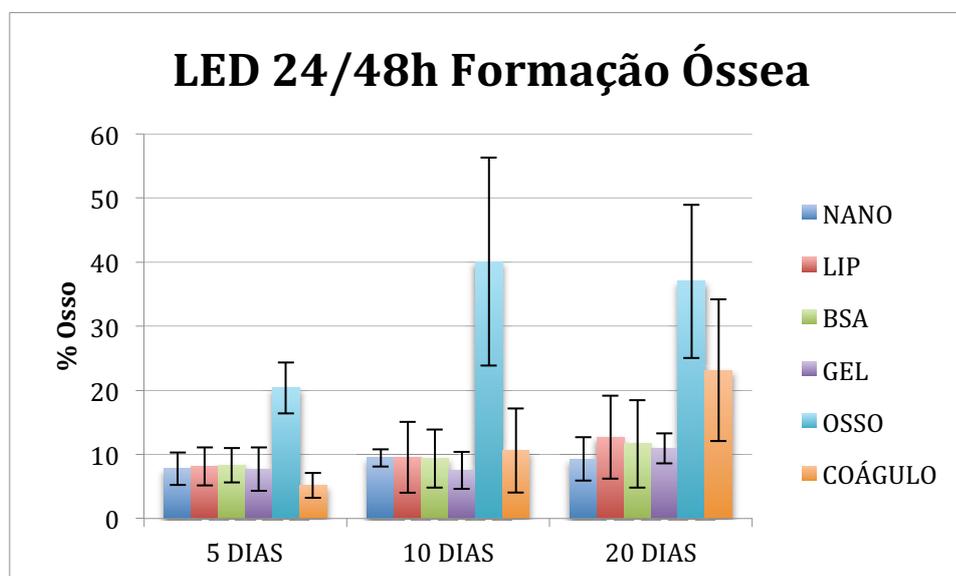


Gráfico 1. Gráfico mostrando o resultado da histomorfometria do grupo utilizando LED após 24/48 horas.

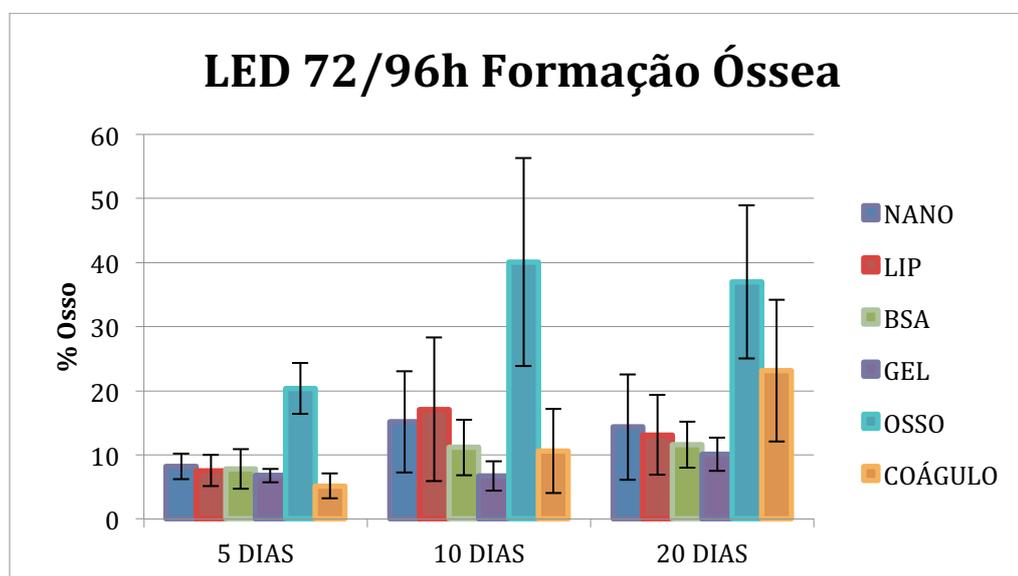


Gráfico 2. Gráfico mostrando o resultado da histomorfometria do grupo utilizando LED após 72/96 horas.

TABELA

	LED 24/48				LED 72/96				CONTROLE	
	NANO	LIP	BSA	GEL	NANO	LIP	BSA	GEL	COÁGULO	OSSO
5 DIAS	AB	AB	AB	AB	AB	AB	AB	AB	AB	C*
10 DIAS	AB	AB	AB	A*	AB	B*	AB	A*	AB	D*
20 DIAS	AB	AB	AB	AB	AB	AB	AB	AB	C*	D*

Tabela 1. Tabela demonstrando as diferenças estatísticas dos resultados da histomorfometria.

*Letras diferentes representam diferença estatística.

ANEXOS

Anexo A – Certificado do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 08.1.86.53.2), intitulado: "Avaliação Histológica, Histomorfométrica e Imunoistoquímica do Efeito de Fármacos Fotossensíveis Ativados por Laser no Reparo Ósseo e Osseointegração de Implantes. Estudo em coelhos e cães", de autoria de **Paulo Esteves Pinto Faria** e de **Luiz Antonio Salata**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus de Ribeirão Preto – USP* foi aprovado em reunião da CEUA de 07.05.2008.

Ribeirão Preto, 8 de maio de 2008



Presidente da CEUA
Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos



Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro

Anexo B – Normas da revista selecionada para publicação do artigo


Submit manuscripts via JOMI's online submission service:

www.manuscriptmanager.com/jomi

Manuscripts should be uploaded as a PC Word (doc) file with tables and figures preferably embedded at the end of the document.

No paper version is required.

Acceptable material. Original articles are considered for publication on the condition they have not been published or submitted for publication elsewhere (except at the discretion of the editors). Articles concerned with reports of basic or clinical research, clinical applications of implant research and technology, proceedings of pertinent symposia or conferences, quality review papers, and matters of education related to the implant field are invited.

Number of authors. Authors listed in the byline should be limited to four. Secondary contributors can be acknowledged at the end of the article. (Special circumstances will be considered by the editorial chairman.)

Review/editing of manuscripts. Manuscripts will be reviewed by the editorial chairman and will be subjected to blind review by the appropriate section editor and editorial staff consultants with expertise in the field that the article encompasses. The publisher reserves the right to edit accepted manuscripts to fit the space available and to ensure conciseness, clarity, and stylistic consistency, subject to the author's final approval.

Adherence to guidelines. Manuscripts that are not prepared in accordance with these guidelines will be returned to the author before review.

MANUSCRIPT PREPARATION

• The journal will follow as much as possible the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver Group) in regard to preparation of manuscripts and authorship (Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Ann Intern Med* 1997;126:36-47). See <http://www.icmje.org>

• **Manuscripts** should be double-spaced with at least a one-inch margin all around. Number all pages. Do not include author names as headers or footers on each page.

• **Title page.** Page 1 should include the title of the article and the name, degrees, title, professional affiliation, and full address of all authors. Phone, fax, and e-mail address must also be provided for the corresponding author, who will be assumed to be the first-listed author unless otherwise noted. If the paper was presented before an organized group, the name of the organization, location, and date should be included.

• **Abstract/key words.** Page 2 of the manuscript should include the article title, a maximum 300-word abstract, and a list of key words not to exceed 6. Abstracts for basic and clinical research articles must be structured with the following sections: (1) Purpose, (2) Materials and Methods, (3) Results, and (4) Conclusions. Abstracts for all other types of articles (ie, literature reviews, clinical reports, technologies, and case reports) should not exceed 250 words and need not be structured.

• **Introduction.** Summarize the rationale and purpose of the study, giving only pertinent references. Clearly state the working hypothesis.

• **Materials and Methods.** Present materials and methods in sufficient detail to allow confirmation of the observations. Published methods should be referenced and discussed only briefly, unless modifications have been made. Indicate the statistical methods used, if applicable.

• **Results.** Present results in a logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all the data in the tables or illustrations; emphasize only important observations.

• **Discussion.** Emphasize the new and important aspects of the study and the conclusions that follow from them. Do not repeat in detail data or other material given in the Introduction or Results section. Relate observations to other relevant studies and point out the implications of the findings and their limitations.

• **Conclusions.** Link the conclusions with the goals of the study but avoid unqualified statements and conclusions not adequately supported by the data. In particular, authors should avoid making statements on economic benefits and costs unless their manuscript includes the appropriate economic data and analyses. Avoid claiming priority and alluding to work that has not been completed. State new hypotheses when warranted, but clearly label them as such.

• **Acknowledgments.** Acknowledge persons who have made substantive contributions to the study. Specify grant or other financial support, citing the name of the supporting organization and grant number.

• **Abbreviations.** The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement.

• **Trade names.** Generic terms are to be used whenever possible, but trade names and manufacturer name, city, state, and country should be included parenthetically at first mention.

• **Numbers.** Per SI convention, authors are requested to use decimal points rather than commas for fractional numbers.

REFERENCES

• **All references must be cited** in the text, numbered in order of appearance.

• **The reference list** should appear at the end of the article in numeric sequence.

• **Do not include unpublished data** or personal communications in the reference list. Cite such references parenthetically in the text and include a date.

• **Avoid using abstracts** as references.

• **Provide complete information** for each reference, including names of all authors (up to six). If the reference is to part of a book, also include title of the chapter and names of the book's editor(s).

Journal reference style:

1. Johansson C, Albrektsson T. Integration of screw implants in the rabbit: A 1-year follow-up of removal torque of titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1987;2:69-75.

Book reference style:

1. Skalak R. Aspects of biomechanical considerations. In: Brånemark P-I, Zarb GA, Albrektsson T (eds). *Tissue-Integrated Prostheses: Osseointegration in Clinical Dentistry*. Chicago: Quintessence, 1985:117-128.

ILLUSTRATIONS AND TABLES

- All illustrations and tables should be numbered and cited in the text in order of appearance.
- Illustrations and tables should be embedded in a PC Word document.
- All illustrations and tables should be grouped at the end of the text.
- Original slides or high-resolution images must be sent to the Publisher's office upon acceptance of the article.
- *Note that article acceptance is pending receipt of acceptable original art.*

MANDATORY SUBMISSION FORM

The Mandatory Submission Form (accessible at www.quintpub.com) must be signed by all authors and faxed to the JOMI Manuscript Editor (630-736-3634)

PERMISSIONS AND WAIVERS

- Permission of author and publisher must be obtained for the direct use of material (text, photos, drawings) under copyright that does not belong to the author.
- Waivers must be obtained for photographs showing persons. When such waivers are not supplied, faces will be masked to prevent identification.
- Permissions and waivers should be faxed along with the Mandatory Submission Form to the JOMI Manuscript Editor (630-736-3634).

REPRINTS

If reprints are desired, they may be ordered from the publisher. Authors receive a discount of 40% on quantities of 100 or 200 reprints.