

DENSITOMETRIA ÓPTICA COM VISTAS À ANÁLISE DA FOTOBIMODULAÇÃO ÓSSEA**Danila Xênia de Miranda Matos^{1,2}, Alessandra Pais de Barros Almeida^{1,2}, Alexandre Greca Diamantino², Renata Amadei Nicolau^{1,2}, Marco Antonio de Oliveira^{2,3}**¹Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), Faculdade de Ciências de Saúde, Curso de Odontologia²UNIVAP, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento/ Laboratório de Biomodulação Tecidual³Univap, IP&D, Laboratório de Parasitologia e Biotecnologia

Av. Shishima Hifumi 2911 Urbanova - 12244-000 São José dos Campos – SP Brasil

danilaxenia@ig.com.br, alessbarros@hotmail.com, agdiamantino@gmail.com, rani@univap.br, oliveirama@univap.br

Resumo- A densitometria óptica é utilizada para a mensuração da densidade mineral óssea (DMO). A terapia com LED tem sido reportada pelo efeito biomodulador sobre o tecido ósseo. O presente estudo objetivou a análise densitométrica no processo de reparo ósseo em normalidade e pós-terapia LED. Para tal foram utilizados 30 ratos, submetidos à cirurgia óssea para promoção de um defeito. Estes foram divididos em 6 grupos, com três controles: G-I (14 dias), G-II (21 dias), G-III (28 dias) e outros três irradiados: G-IV (14 dias), G-V (21 dias) e G-VI (28 dias). Para a irradiação foi utilizado um LED (945nm, 48mW). Sete sessões de irradiação foram realizadas, respeitando o intervalo de 48 horas entre as sessões. Aguardado o período de 14, 21 e 28 dias do procedimento cirúrgico, os animais foram sacrificados. Foram realizadas tomadas radiográficas das amostras. As películas foram processadas e a DMO analisada dos diferentes grupos, tanto em áreas híginas quanto em processo de reparo. Os resultados demonstraram que a terapia com LED, com parâmetros empregados, não causou modificação no padrão densitométrico das amostras analisadas, demonstrando-se inócua quanto ao aumento da friabilidade ou maleabilidade do tecido.

Palavras-chave: Densitometria óptica, reparo ósseo, terapia LED**Área do Conhecimento:** IV – Ciências da Saúde**Introdução**

O tecido ósseo é constituinte principal do esqueleto, serve de suporte para os tecidos moles e protege órgãos vitais. Aloja e protege a medula óssea, formadora das células do sangue. Funcionam como depósito de cálcio, fosfato e outros íons, armazenando-os ou liberando-os de maneira controlada, para manter constante a concentração desses importantes íons nos líquidos corporais (JUNQUEIRA-CARNEIRO, 2008). Para a análise de tecido ósseo diferentes ferramentas de investigação podem ser utilizadas como: análise histológica, tomografias computadorizadas, densitometria mineral óssea (DMO), entre outras. A partir de radiografias é possível avaliar a DMO, pois a medida da intensidade de escurecimento de uma película radiográfica pode fornecer dados, quanto ao teor mineral de um tecido.

O olho humano tem capacidade de distinguir uma faixa de 32 tons de cinza, através do processamento digital de uma radiografia odontológica, é possível distinguir 256 tons (GONZALES; WOOD, 2001). Ou seja, com a medição da DMO, são atribuídos, a um determinado tecido, valores que podem variar de 0

a 255, sendo o menor deles correspondente à máxima radiolucidez, e o maior, à máxima radiopacidade. O processamento digital, para análise da DMO, pode ser realizado com auxílio de uma escala de alumínio (penetrômetro) para permitir calibração (FENYO-PEREIRA et al., 1999; WHAITES, 2003). Em estudos realizados por Bodner et al (1993), os autores afirmaram que o uso de radiografias ainda representa o melhor método não cirúrgico para detecção de formação óssea na existência de lesão.

Estudos demonstram resultados favoráveis acerca da terapia de laser de baixa intensidade (TLBI) no estímulo da reparação óssea, sugerindo a capacidade desta em promover aceleração da reparação óssea (SAITO; SHIMAZU, 1997; NICOLAU et al., 2003; STEIN et al., 2005; AIHARA et al., 2006). A fotobimodulação a laser pode melhorar também a reparação óssea ao redor dos implantes osseointegrados (LOPES et al., 2007). A capacidade da fototerapia em modular o metabolismo celular permite a aceleração do processo de reparo do tecido ósseo, uma vez que a irradiação com laser estimula a proliferação e diferenciação de células de linhagem osteoblástica, resultando em um aumento do número de células osteoblásticas

diferenciadas, bem como na formação de tecido ósseo (OZAWA et al., 1998; STEIN et al., 2005).

Segundo autores a terapia LED é responsável por efeitos semelhantes aos obtidos por TLBI (QUEIROZ et al., 2008; CALIFANO et al., 2008; DALL-AGNOL et al., 2009). Vários estudos empregando terapia LED têm sido realizados observando a atividade celular e metabólica de tecido biomodulado, contudo não foram observados estudos sobre a DMO de tecido ósseo. O presente estudo objetivou a análise densitométrica no processo de reparo ósseo em normalidade e pós-terapia LED.

Metodologia

Foram utilizados 30 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos com 300g (3 meses de idade), divididos em 3 grupos (14, 21 e 28 dias após a cirurgia): G-I (14 dias), G-II (21 dias), G-III (28 dias). Os animais foram mantidos em gaiolas e alimentados com ração e água *ad libitum*. Toda pesquisa esteve em conformidade com os critérios aprovados pelo Comitê de Ética da UNIVAP, seguindo os princípios do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. (H013/CEP/2009).

Previamente a realização do procedimento cirúrgico os animais foram pesados e submetidos à administração subcutânea de atropina 1% (Fraga® Farmagráfica S.A.) numa dose de 0,04mL/100g de peso corporal com a finalidade de promover um relaxamento muscular. Após um período de 15 minutos os animais foram anestesiados com uma injeção intramuscular de cloridrato de xilazina 2% (Xylazin®, Syntec do Brasil Ltda.) e cloridrato de cetamina (Cetamin®, Syntec do Brasil Ltda.), ambos numa dose de 0,01mL/100g de peso corporal.

Para a confecção do defeito cirúrgico no fêmur direito, foi realizado a tricotomia na região cirúrgica e assepsia com Povidine® tópico e a área isolada com campos operatórios. Posteriormente, foi realizada a incisão com a lâmina 15, seguida de divisão do tecido muscular e descolamento do periosteio para exposição da superfície da porção media do fêmur direito. O defeito ósseo de 2 mm de diâmetro, monocortical e atingindo a porção medular do osso foi então realizado com auxílio de uma broca carbide nº8 acoplada em um micromotor cirúrgico e irrigação constante e abundante com soro fisiológico. Seqüencialmente, foi realizada a síntese por planos, sendo a musculatura e a fáscia muscular suturados com fio absorvível 5-0 e a pele com fio de Nylon 3-0. Como terapia pós-cirúrgica, todos os animais receberam pentabiótico (Fort Dodge®) de amplo espectro via intramuscular profunda numa única dose de 0,02mL/100g de peso corporal.

Após o procedimento cirúrgico deu-se início à primeira sessão de fototerapia na área lesionada utilizando um aparelho de LED produzido para este estudo pelo Instituto de Ensino e Pesquisa (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), São José dos Campos, São Paulo, Brasil, emitindo na faixa espectral de 945 ±20nm e potência de saída de 48mW. Todos os animais receberam um total de sete sessões de irradiação transcutânea sobre a ferida cirúrgica com intervalo de 48 horas. A primeira aplicação foi realizada imediatamente após o procedimento cirúrgico. A potência de emissão dos equipamentos foi verificada com a utilização do dispositivo Integrated 2-Watt Broadband Power and Energy Meter System - 13 PEM 001/J (Melles Griot Photonics Components Group, EUA).

Aguardado o período de 14, 21 e 28 dias do procedimento cirúrgico, os animais foram sacrificados de acordo com princípios éticos adequados (COBEA). Para tanto, foram previamente anestesiados para então receberem aplicação via intracárdica de anestésico tiopental sódico, na dose de 0,05mL/100g de peso corpóreo. Após 5 minutos foi realizada a aplicação do cloreto de potássio 19,1%, via intracárdica com dose única de 0,4mL/100g de peso corpóreo. O fêmur dos animais foram removidos e submetidos à análise densitométrica. Para tal as amostras, dos diferentes grupos, foram posicionadas em películas de filme ocular (Kodak Insight, IO-41) com presença de um penetrômetro, conforme figuras 1 e 2. Os grupos foram identificados com marcadores de chumbo sobre a película.

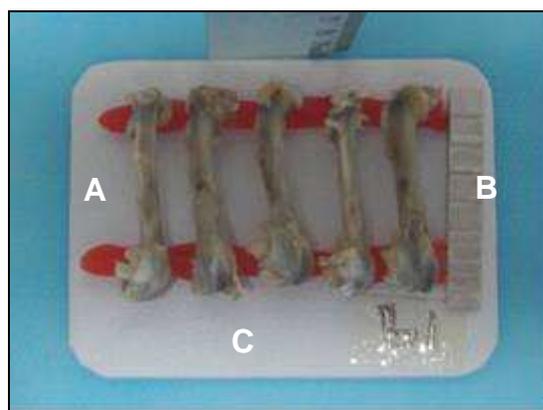


Figura 1. Amostras posicionadas para tomada radiográfica. A - Amostras ósseas posicionadas para tomada radiográfica padronizada. B - Penetrômetro. C - Película radiográfica.

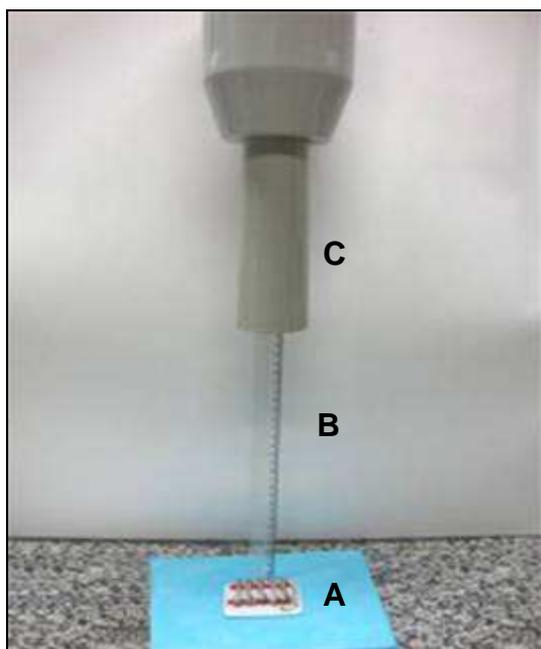


Figura 2. Esquema de tomada radiográfica para análise da DMO. A - Película radiográfica com amostras (por grupo). B - Distância do cone de RX à amostra (30 cm). C - Posição perpendicular do cone de RX (Gnatus, 70 kVp).

O tempo de irradiação durante a tomada foi de 1 segundo. Todas as películas foram processadas simultaneamente em colgadura múltipla. O processamento em câmara escura a uma temperatura ambiente de aproximadamente 21°C. As películas foram levadas à solução reveladora Kodak contendo na composição água (60 – 65%); sulfito de potássio (5 – 10%); dietilenoglicol (5 – 10%); sulfito de sódio (5 – 10%); hidroquinona (6%); carbonato de potássio (1 – 5%), por 40 segundos, passadas para a lavagem intermediária em água por 20 segundos e fixadas em solução fixadora Kodak contendo na composição e no rótulo atual: bissulfito de sódio (7631-90-5); sulfito de amônio (10196-04-0); tiossulfato de amônio (7783-18-8); ácido acético (64-19-7); ácido bórico (10043-35-3); sulfato de alumínio (10043-01-3), por 10 minutos. A lavagem final foi realizada por 5 minutos em água corrente.

As radiografias foram digitalizada com auxílio de câmera digital Fuji (5 megapixel) e as imagens foram transferidas para um computador, onde foram analisadas por um programa computacional Image J. Estas imagens foram transformadas em tons de cinza para melhor visualização e compreensão das mesmas.

Foram analisadas áreas onde havia tecido ósseo íntegro e sobre o defeito ósseo, medindo-se uma área de osso íntegro e área da lesão, após a calibração do sistema com auxílio do

penetrômetro. A sequência dos passos para análise da DMO foram:

1º) Transformação de imagem colorida em 8 bits.

2º) Calibração do sistema a partir das cinco diferentes espessuras do penetrômetro (espessura de alumínio vs radiopacidade).

3º) Medida da densidade óptica na área de tecido ósseo normal e local de perfuração (por amostra), tanto dos grupos controle e quanto irradiados.

Os dados foram submetidos à análise estatística com auxílio do programa GraphPad Prism. Empregou-se a Análise de Variância (ANOVA), com pós-teste de Tukey, considerando valores significativos quando $p < 0,05$.

Resultados

Observou-se a ausência de diferença significativa entre a DMO do grupo controle VS LED no diferentes tempos experimentais na região de tecido ósseo rígido (figura 3) e de tecido perfurado (figura 4).

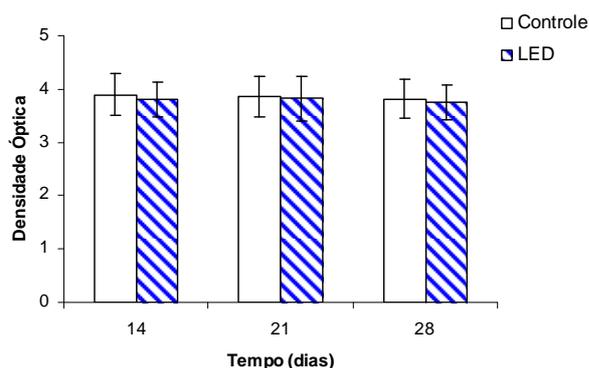


Figura 3. Densidade óptica na região de tecido ósseo rígido em diferentes tempos experimentais. Dados expressos em média \pm desvio padrão.

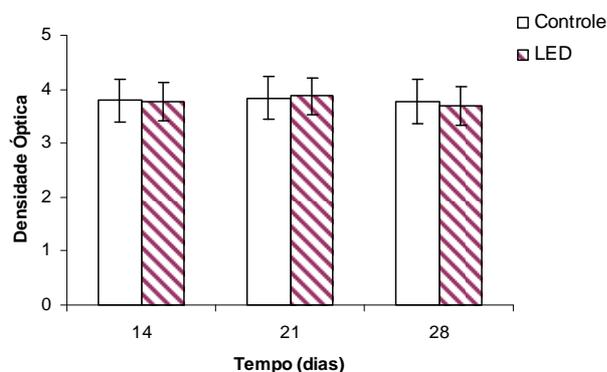


Figura 4. Densidade óptica na região de tecido ósseo perfurado em diferentes tempos experimentais. Dados expressos em média \pm desvio padrão.

Discussão

Visando a análise de tecido ósseo tratado com LED após lesão, o presente estudo objetivou a análise densitométrica no processo de reparo ósseo em normalidade e pós-terapia LED. A densitometria óptica radiográfica é utilizada para a mensuração da DMO, por meio de imagens radiográficas, permitindo avaliar o processo de mineralização óssea com boa precisão e sensibilidade, reprodutibilidade, fácil aplicabilidade e baixo custo (STERMAN, 2001). A grande dificuldade nas análises densitométricas em radiologia é a de reprodutibilidade das densidades ópticas de uma mesma estrutura em sucessivas tomadas radiográficas. Decorre, então, a grande importância da padronização de todos os parâmetros utilizados nas tomadas radiográficas, para que as medidas densitométricas possam ser comparadas sem nenhum fator de correção (DUTRA et al., 2007, CARVALHO et al., 1976). A análise da densitometria em radiografias de rotina realizadas com auxílio de uma escala padrão de alumínio possibilita a aferição do estado de cicatrização alveolar (MURAMOTO et al., 2005). Relataram também que a formação de osteóide e de mineralização são expressas radiograficamente pelo aumento na radiopacidade, resultante de maior densidade óptica da imagem óssea. No presente estudo não foram observadas diferenças entre os grupos (controle e LED) na DMO em tecido hígido nos diferentes tempos experimentais. Este resultado aponta para homogeneidade da densidade óssea nos diferentes animais, principalmente devido ao controle de variáveis como nutrição, idade, condições controladas do ambiente, processamento radiográfico. Variações nestes valores poderiam implicar falhas de interpretação referentes às áreas de reparo. Observou-se que não houve influência significativa da terapia LED sobre a DMO nos grupos tratados. Este dado sugere que não houve modificações quanto ao padrão mineral do tecido tratado em relação ao controle. Estudos demonstram que a reabsorção óssea pode ser estimulada pela fototerapia, em razão do aumento na formação de células osteoclásticas (AIHARA et al., 2006; NICOLAU et al., 2003), o que contra indicaria sua aplicação em indivíduos osteoporóticos. A magnitude do efeito biomodulador da fototerapia está diretamente relacionada com o estado fisiológico da célula antes da radiação. Por esta razão, os efeitos biomoduladores nem sempre são observados em organismos em homeostasia (KARU et al., 2008; WEBER et al., 2006).

Conclusão

Conclui-se que o LED não modificou a DMO, contudo não se pode atribuir à terapia com LED efeitos negativos no que se refere a possibilidade de aumento de friabilidade ou maleabilidade pós-terapia. Outras formas de análise devem ser realizadas para observação da atividade celular e/ou metabólica do tecido.

Referências

- AIHARA, N.; YAMAGUCHI, M.; KASAI, K. Low-energy irradiation stimulates formation osteoclast like cells via RANK expression in vitro. **Lasers in Medical Science**, v. 21, p. 24-33, 2006.
- CALIFANO, A.R. ; KELENCZ, C. A. ; NICOLAU, R. A. ; MUNOZ, I. S. S. ; ZÂNGARO, R A ; LOBO, P.D.C. . Luz LED (640 20 nm) sobre a atividade, força e tempo de fadiga do músculo masseter - Estudo clínico. **Terapia Manual** , v. 6, p. 163-166, 2008.
- CARVALHO, A. Fator de Correção em Densitometria Radiográfica. **Rev. Fac. Farm. Odont. Araraquara**. v. 10, p. 115-24, 1976
- CASALECHI, H.L. ; NICOLAU, R. A. ; CASALECHI, V. L. ; SILVEIRA-JÚNIOR, L ; PAULA, A.M.B. ; PACHECO, M T T . The Effects of Low Level LED on the Repair Process of Achilles Tendon Therapy on Rats. **Lasers in Medical Science**, v. 24, p. 659-665, 2009.
- DALL-AGNOL, M. A. ; NICOLAU, R. A. ; LIMA, J. C. ; MUNIN, Egberto . Comparative analysis of coherent light action (laser) versus non-coherent light (LED) for tissues repair in diabetic rats. **Lasers in Medical Science**, v. 24, p. 909-916, 2009
- DUTRA, G.; WIENANDTS, P.; COSTA, N.; ARAUJO, F. Avaliação da densidade óptica da superfície oclusal através de radiografias digitalizadas e sua relação com a presença de lesões de cárie em molares decíduos. **Revista Odonto Ciência** – Fac. Odonto/PUCRS, v. 22, n. 57, jul./set. 2007
- FENYO-PEREIRA M; COSTA, C; PANELLA J. Avaliação fotodensitométrica dos filmes radiográficos periapicais Ektaspeed e Ektaspeed Plus e sua aplicação diagnóstica. **Rev. Inst. Ciênc. da Saúde**. v.17, n. 2, p. 103-9, jul/dez. 1999

- FREITAS, A.; ROSA J. E.; SOUZA I. F. **Radiologia Odontológica** 6 ed. São Paulo: Artes Médicas, 2004
- GONZALES, R.C.; WOOD, R.E. Digital image processing. 2 ed. **Pretice-Hall**. 2001 783p.
- JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, J, **Histologia Básica**, 11 Ed., Editora Guanabara/Koogan, p. 135, 2008
- KARU, T., PYATIBRAT L.V., SERGEI M., SERGEI A., VLADILEN L. Elementary processes in cells after light absorption do not depend on the degree of polarization: implications for the mechanisms of laser phototherapy. **Photomed Laser Surg**, v. 26, n. 2, p. 77-82, 2008.
- LOPES, C. B.; PINHEIRO, A. L. B.; SATHAIAH, S.; SILVA, N. S.; SALGADO M. A. C. Infrared Laser Photobiomodulation (830nm) on Bone Tissue Around Dental implants: A Raman Spectroscopy and Scanning Eletronic Microscopy Study in Rabbits. **Photomed. Laser Surg.**, v. 25, n. 2, p. 96-101, 2007
- MURAMOTO, C.; STERMAN, F.FONSECA PINTO, A Estabelecimento de valores de densidade mineral óssea (DMO) das regiões metafisária e diafisária do rádio em cães da raça Poodle por meio da Densitometria Óptica Radiográfica. **Braz J vet Res anim Sci**, São Paulo, v.42, n.2, p.89-97, 2005
- NICOLAU, R. A.; JORGETTI, V.; RIGAU, J.; PACHECO, M. T. T.; REIS, L. M; ZÂNGARO, R. A. Effect of low-power GaAlAs laser (660 nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. **Lasers in Medical Science**, v. 18, p. 89-94, 2003
- OZAWA, Y.; SHIMIZU, N.; KARIYA G. Low-power laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in calvarial cells. **Bone**, v. 22, p. 347-354, 1998
- QUEIROZ, L.S. ; WOLLMANN, D. E. R. ; NICOLAU, R. A. ; PACHECO, M T T . Effect of LED irradiation on microcirculation of auricular mouse. **Revista da Associação Paulista de Cirurgões Dentistas**, v. 62, p. 138-142, 2008
- SAITO S.; SHIMIZU N. Estimulatory effects of low-power laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat. **J. Orthod. Dentofac. Orthop.** v.111, n.5, p.32-525, 1997
- STEIN, A.; BENAYAHU, D.; MALTZ, L.; ORON, U. Low-Level Laser Irradiation Promotes Proliferation and Differentiation of Human Osteoblasts *in Vitro*. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 23, p. 161-166, 2005
- WEBER, J. B. B.; PINHEIRO, A. L. B.; OLIVEIRA, M. G.; OLIVEIRA, F. A. M.; RAMALHOR, L. M. P., Laser therapy improves healing of bone defects submitted to autologus bone graft. **Photomed Laser Surg.** v.24, n.1, p.38-44, 2006
- WHAITES, E. **Princípios de radiologia odontológica** 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2003, 444p.