



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

**EFEITOS DA RADIAÇÃO DO LASER DE DIÓXIDO DE
CARBONO (Co₂) NO TECIDO ÓSSEO: ANÁLISE EM
MICROSCOPIA ÓTICA E MICROSCOPIA ELETRÔNICA
DE VARREDURA**

RUBENS GUIMARÃES FILHO

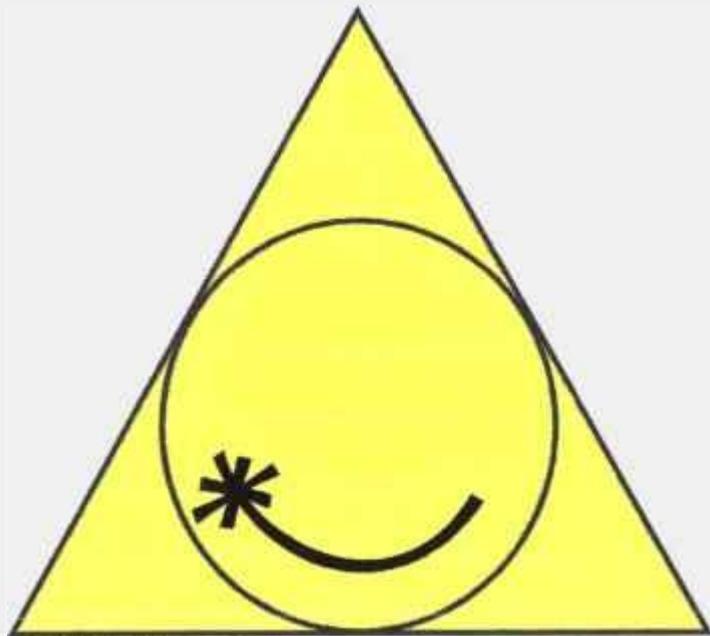
Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre Profissional na área de Lasers
em Odontologia.

Orientador:
Prof. Dr. Nilson Dias Vieira Jr.

Co-Orientador:
Prof. Dr. Walter D. Niccoli Filho

**São Paulo
2001**





**MESTRADO PROFISSIONALIZANTE DE LASER EM
ODONTOLOGIA**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**EFEITOS DA RADIAÇÃO DO LASER DE DIÓXIDO DE CARBONO (CO₂) NO
TECIDO ÓSSEO: ANÁLISE EM MICROSCOPIA ÓPTICA E MICROSCOPIA
ELETRÔNICA DE VARREDURA**

RUBENS GUIMARÃES FILHO



Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do grau de Mestre Profissional em Lasers em
Odontologia

ORIENTADOR: PROF. DR. NILSON DIAS VIEIRA Jr.
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. WALTER D. NICCOLI FILHO

São Paulo

2001

DEDICATÓRIAS

Aos meus pais que me deram o dom da vida e o preparo necessário para que eu pudesse alcançar mais essa conquista, obrigado.

À minha amada esposa, que pacientemente me acompanhou nessa etapa de nossas vidas, sempre me respaldando com seu carinho, paciência e fundamental compreensão.

Divide comigo essa conquista de nossa família.

Ao Prof. Dr. Nilson Dias Vieira Jr., orientador paciente, questionador, que me ensinou o sabor da pesquisa, dando-me sempre total apoio, mesmo quando as coisas ficaram difíceis, minha profunda admiração e respeito.

Ao Prof. Dr. Walter D. Niccoli Filho, mais que um orientador, um amigo, um irmão. Ser humano que me ensinou que somos todos anjos de uma asa só. Minha profunda gratidão por ter me emprestado a sua.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Ricardo Samad pelas constantes explicações físicas sempre de maneira incansável, meu agradecimento.

A Profª Maria Claudia Garcia da Silveira, amiga companheira que no momento difícil que passei sempre me ajudou com seu apoio e estímulo constante para que aqui chegássemos, minha amizade.

Aos Amigos do Mestrado Lívio, Marcus, Alexandre, Zé Tannous e Negrão que durante essa difícil jornada sempre estivemos juntos apoiando-nos mutuamente, minhas saudades.

Ao Prof. Dr. Fernando Wagner Raldi que sempre me apoiou no que se concerne a carreira acadêmica com uma palavra tranqüila e amiga.

A Profª. Dra. Roselene Fernandes da Rocha pelo apoio durante o transcorrer da parte prática da tese, no manuseio dos animais.

Ao Prof. Dr. Eduvaldo S. B. Marques pela compreensão durante minha ausência nos afazeres acadêmicos na Universidade de Taubaté.

Aos técnicos do Biotério-Unesp São José dos Campos Lourival Jacobs e Antonio D. S. B. M. Vasconcellos pelo constante cuidado e apoio no zelar de nossas cobaias, meu agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Luis Eduardo Blumer Rosa pelas conversas sempre elucidativas.

A Prof.^a Dra. Mônica Fernandes Gomes pela atenção dedicada a nós durante o desenvolver de nossa tese.

Ao Amigo Paulo Henrique V. Cursino pelo constante apoio em informática, ajudando-me a diagramar a monografia.

A Secretária Geral Sandra pela simpatia e atenção constante, resolvendo sempre nossos problemas, pessoa sempre presente.

Ao Corpo de Professores e Monitores, obrigado pela dedicação.

As Instituições do IPEN e FOUSP, pelo desenvolvimento do mestrado na área de lasers.

Ao IEAv-SJC pelos constantes contatos esclarecedores no campo da física.

A UNIVERSIDADE de TAUBATÉ pelo apoio e incentivo.

Aos colegas da equipe Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial de Taubaté, Dr. Odalício V. Siqueira, Dr. Luis E. J. Andraus, Dr. Flávio A. Claro e Dr. Luis Cláudio Takayama.

**EFEITOS DA RADIAÇÃO DO LASER DE DIÓXIDO DE CARBONO (CO₂) NO
TECIDO ÓSSEO: ANÁLISE EM MICROSCOPIA ÓPTICA E MICROSCOPIA
ELETRÔNICA DE VARREDURA**

Rubens Guimarães Filho

Resumo

Os efeitos morfológicos da irradiação de tibia de *Rattus novogicus*, *Wistar*, pelo laser de CO₂, foram estudados por técnicas de microscopia óptica e eletrônica de varredura. Aplicações de lasers com 2 e 4 W de potência foram utilizadas *in vivo* e os espécimes foram sacrificados imediatamente após a aplicação e nos períodos de uma, duas, três e quatro semanas subseqüentes. Zonas carbonizadas, presentes nos dois níveis de potência utilizados foram identificadas pela microscopia óptica e mostram redução de tamanho progressiva ao longo do período de observação. Não se observou morbidade em nenhum dos espécimes, o que nos leva a concluir que a carga térmica imposta pela irradiação do laser não impediu a reparação tecidual, durante o período de observação. Em todos os casos uma região de resolidificação extensa foi observada pela microscopia eletrônica de varredura, acompanhada por pequenas fraturas e áreas de ablação. Sendo assim induzimos a separação em um dos ossos de tibia com uma serra sendo os cotos reaproximados e o laser de CO₂ aplicado na interface. Primeiro observou-se que, antes da aplicação do laser, não havia acoplamento mecânico entre eles. Depois da irradiação do laser, os cotos foram mantidos unidos *per si*. Analisando a estrutura morfológica na superfície pela técnica eletrônica de varredura, observou-se pequenas áreas de resolidificação comum do material, demonstrando pequenas soldas, o que foi suficiente para manter os cotos estabilizados.

**EFEITOS DA RADIAÇÃO DO LASER DE DIÓXIDO DE CARBONO (CO₂) NO
TECIDO ÓSSEO: ANÁLISE EM MICROSCOPIA ÓPTICA E MICROSCOPIA
ELETRÔNICA DE VARREDURA**

Rubens Guimarães Filho

ABSTRACT

The morphological effects of CO₂ laser irradiation of tibia bones of *Rattus novegicus*, Wistars, were studied by optical and electron scanning microscopy. Laser powers of 2 and 4 W were used *in vivo* and the specimens were sacrificed in 5 different periods: immediately after the exposure and one, two three and four weeks after that. By the optical microscopy, it was possible to identify carbonized zones, present in the two powers used, which showed a progressive reduction in size, along the observation period. No morbity was observed in all specimens, what led one to conclude that the thermal load imposed by the laser irradiation did not impair the tissue reparation, duration the observation period. Therefore, the osteoprogenitor cells were preserved in these laser applications. In all cases, an extent region of superficial resolidification was observed by electron scanning microscopy, followed by small fractures and zones ablation. One tibia bone was divided by a cutting saw and the pieces were closely joined, and the CO₂ laser was applied in the separation zone. First, it was observed that the two pieces, before the laser application, could not sustain each other. After the laser irradiation, the pieces were kept unified *per si*. Analyzing the morphological structure of the surface by electron scanning microscopy, small areas of common melted material were seen, showing small welded parts, enough to maintain the pieces together.

SUMÁRIO

Dedicatórias.....	I
Agradecimentos.....	V
Resumo.....	VII
Abstract.....	VIII
Sumário.....	IX
Lista de Figuras e Tabelas.....	XII
Lista de Abreviaturas.....	XIV
Capítulo 1 – Introdução.....	16
Capítulo 2 – Fundamentos da Física do Laser.....	18
2.1 – Luz	18
2.2 – Espectro Eletromagnético	20
2.3 – Processos de Interação da Radiação Eletromagnética com o	21
Sistema Atômico	
2.4 – Princípios Físicos de Funcionamento do Laser	22
2.4.1 – Meio Ativo	23
2.4.2 – Bombeamento	23
2.4.3 – Cavidade Ressonante ou Ressonador	24

2.4.4 – Esquema Básico de Funcionamento de um Laser	25
2.4.5 – O feixe Laser	26
2.5 - Lasers e a sua Interação com a Matéria	27
2.5.1 – Mecanismos de Interação (Lei de Lambert-Beer)	27
2.5.2 – Efeitos da Radiação nos Tecidos Biológicos	30
Capítulo 3 – Tecido Ósseo.....	33
3.1 – Estrutura Microscópica	36
3.2 – Histogênese	37
3.2.1 - Ossificação Intramembranosa	37
3.2.2 – Ossificação Endocondral	38
3.3 – Estrutura Óssea Molecular	38
3.4 – Modelamento e Remodelamento Ósseo	39
3.5 – Células	40
3.5.1 – Osteócito	40
3.5.2 – Osteoblastos	40
3.5.3 – Osteoclastos	41
3.5.4 – Matriz	41
3.5.5 – Perióstio e Endóstio	42
Capítulo 4 – Utilizações Clínicas do Laser de CO₂	43
Capítulo 5 – Objetivos.....	47
Capítulo 6 – Materiais e Métodos.....	48
Capítulo 7 – Resultados.....	51
Capítulo 8 – Discussão.....	58

Capítulo 9 – Conclusões.....	62
Proposta para Novos Trabalhos.....	63
Summary.....	64
Referências.....	65
Apêndice 1 – Normas de Segurança.....	68

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1- Propriedades Básicas das Ondas Eletromagnéticas. Campo elétrico da luz em função da distância. λ é o comprimento de onda e A é a sua amplitude.

Figura 2- Gráfico de duas ondas se propagando. As ondas a_1 e a_2 estão em fase, o que leva a uma interferência construtiva, duplicando a amplitude da mesma. As ondas b_1 e b_2 estão em antifase, resultando em uma interferência destrutiva da onda.

Figura 3- Espectro Eletromagnético.

Figura 4- Transições Radioativas entre dois níveis de energia, E_1 e E_2 .

Figura 5- Diagrama de quatro níveis (ideal) atômicos durante o processo de bombeamento.

Figura 6- Esquema do ressonador óptico do laser.

Figura 7- Esquema dos fenômenos que ocorrem quando da interação do feixe laser com o tecido.

Figura 8- Espectro de absorção dos Principais Cromóforos Absorvedores no tecido.

Figura 9 - Mecanismos de Interação Laser-Tecido.

Figura 10 - Hiperplasia de Palato vaporizada com laser de CO_2 (7 W).

Figura 11 - Aparelho Laser de CO_2 modelo *Sharplan 15F*.

Figura 12 – Amostras irradiadas com 2W (seta vermelha) e 4 W (seta azul) foram selecionadas pela microscopia óptica para posterior observação em M.E.V.

Figura 13 – Tecido Ósseo logo após a irradiação com 2 W.(100 x de aumento). A seta vermelha indica a região de resolidificação. A seta azul indica a região de carbonização. As regiões escuras centrais de forma arredondadas demonstram áreas de cavitação devido à ablação.

Figura 14 – Tecido ósseo com 21 dias após a irradiação com 2W. Nota-se uma diminuição da área de carbonização (100 x de aumento).

Figura 15 - Amostra com 14 dias pós-irradiação com 16 x de aumento (vista de topo).

Figura 16 – M.E.V. com 2 W, imediatamente após a irradiação (20 x de aumento). Seta vermelha mostra área de resolidificação.

Figura 17 - M.E.V. com 4 W de potência imediatamente após (12 x de aumento). Seta vermelha mostra área de resolidificação.

Figura 18 - M.E.V. da superfície irradiada com laser de CO₂ (2 W, 500 x de aumento). As setas mostram as trincas promovidas pelo calor.

Figura 19 - M.E.V. da superfície irradiada com laser de CO₂ (4W, 500 x de aumento). As setas mostram as formas de gotas, características de coalescência do tecido ósseo. A seta azul mostra uma gota se sobrepondo à zona de trinca.

Figura 20 - Fotografia mostrando união dos cotos após irradiação com laser de CO₂ (4W de potência).

Figura 21 - M.E.V. da superfície irradiada com laser de CO₂, com potência de 4 W. As setas vermelhas mostram regiões resolidificadas; as duas da direita mostram resolidificação com superposição entre os cotos; a seta amarela mostra uma região resolidificada (contorno indicado pela linha amarela) com fratura na região de separação.

Figura 22 - Fotografia mostrando separação total em osso fresco de galinha.

Figura 23 - Fotografia mostrando união dos cotos após irradiação com 10 W.

Lista de Abreviaturas

A - amplitude

Å - ângstrons

Al - alumínio

ANVS - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Ar – argônio

BMP – Bone Morphogenic Protein

Ca - cálcio

CO₂ - dióxido de Carbono

Cr - cromo

Cu – cobre

CW – emissão contínua

E - energia

E₁ - nível de energia 1

E₂ - nível de energia 2

E₃ - nível de energia 3

E₄ – nível de energia 4

Er:YAG - laser de érbio granada de alumínio e ítrio

eV - elétron-volte

f - frequência

g – grama

He-Ne - Gás de Hélio-Neônio

H-A - hidroxiapatita

Hz – Hertz

I - intensidade

IR - infravermelho

J - Joule (unidade de energia)

Kr – criptônio

km/s - velocidade

M² - (m-quadrado) fator de qualidade do feixe

mg – miligrama

ml – mililitro

mm – milímetro

M.O. – Microscopia Óptica

M.E.V. – Microscopia Eletrônica de Varredura

MPE - Máxima Exposição Permissível

mW – unidade de potência, miliWatt

NA - abertura numérica

Nd: YAG - laser de neodímio granada de alumínio e ítrio

nm – nanômetro

O – oxigênio

Q-switch – modo de travamento do sistema laser

Si - silício

SBC - Sistema Brasileiro de Certificado

UV – ultravioleta

W – Watt – unidade de potência

YAG – Granada de Alumínio e Ítrio

Z - coeficiente de extinção

µm - micrômetro

α - coeficiente de absorção

λ - comprimento de onda

Capítulo 1

Introdução

Desde que o homem teve o seu primeiro contato com o fogo, o trauma térmico tornou-se um perigo em potencial, principalmente para os tecidos superficiais. Contudo, os tecidos mais profundos, como o tecido ósseo, também são afetados pelo calor, seja através de instrumentos rotatórios pérfuro-cortante, como na realização de osteotomias, ou através de qualquer outra fonte geradora de calor que interaja com o tecido (*Pinheiro-1992*). Atualmente a radiação laser tem sido estudada para eventuais aplicações na área de saúde e na dependência de sua indicação, este tipo de radiação pode trazer efeitos deletérios aos tecidos envolvidos, ou mesmo à distância.

Maiman em 1960 construiu o primeiro laser de rubi operante, utilizando-se de um cristal que emitia uma luz visível vermelha, mas apresentava limitadas aplicações na área da saúde, devido à sua baixa potência.

Desde então, para a aplicabilidade dos vários lasers na área de saúde, muito tempo tem sido investido em pesquisas e cada vez mais essa “nova” tecnologia vem sendo compreendida e utilizada, fundamentalmente pelo advento de novos comprimentos de onda e novos regimes de operação.

Na área de cirurgia em geral, os lasers vem apresentando excelentes resultados em tecidos moles (derme, mucosa bucal, região neurológica) devido à alta absorção que estes tecidos apresentam por estes comprimentos de onda como o érbio, neodímio, dióxido de carbono, hólmio, hélio-neônio e tantos outros.

No entanto, na área de tecidos duros do organismo ainda há restritas aplicações, como por exemplo, em osteotomias, procedimento este realizado para correções de deformidades faciais, correção de seqüelas de origem traumática, remoção de dentes retidos, remoção de lesões, e tantas outras. Atualmente estes procedimentos são realizados com instrumentos rotatórios ou serras devido aos lasers ainda apresentarem resultados como aumento no tempo de corte, retardo no tempo da cronologia da reparação do tecido e outros que são relacionadas com o tipo e regime de trabalho do laser utilizado.

Nosso trabalho visa entender os aspectos morfológicos do tecido ósseo de tibia de *Rattus novegicus, Wistar* quando dá sua interação com o laser de dióxido de carbono (CO₂) e observar os efeitos resultantes dessa interação com o auxílio da luz da microscopia óptica e da microscopia eletrônica de varredura.

O primeiro laser de dióxido de carbono (CO₂) foi desenvolvido por *Patel* em 1964, nos Laboratórios *Bell* e desde então tem se tornado um instrumento cirúrgico importante para os tecidos moles, pois apresenta alta afinidade de absorção pela água, cromóforo esse presente em abundância nestes tecidos. No caso de tecidos duros o laser de CO₂ apresenta alta absorção pela hidroxiapatita e foi introduzido na ortopedia e traumatologia por apresentar características como a de cortar, coagular e promover a desinfecção do meio, oferecendo assim ao cirurgião um excelente campo de trabalho, mostrando-se um instrumento útil em alguns casos como de osteomielite, por exemplo, (*Ceballos et al, 1997*). Porém apresenta aspectos em relação ao calor gerado no tecido como a carbonização que retardam o processo de reparação e que ainda são alvo de pesquisas na intenção de se estipular a melhor forma de interação desses dois sistemas.

Na atualidade, diversas especialidades da área de saúde vem buscando utilizar esta nova tecnologia, como uma técnica alternativa ou coadjuvante de conduta para seus respectivos tratamentos.

Foi nosso objetivo neste trabalho avaliar a interação do laser de CO₂ no tecido ósseo e observar, através da microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura, os efeitos que esta interação pode promover na tibia de *Rattus novegicus, Wistar*, imediatamente após a aplicação e em intervalos de uma, duas, três e quatro semanas, procurando observar a amplitude do dano térmico, tendo em vista sua aplicabilidade.

Capítulo 2

Fundamentos da Física do Laser

2.1. - Luz

A luz consiste em pequenos pacotes de energia, denominados de fótons ou quanta de energia, que se propagam na forma de onda sem necessitar de um meio para isso, conferindo-lhe assim um caráter dual de onda-partícula. Essa onda eletromagnética é caracterizada por uma determinada frequência, uma velocidade (portanto, um determinado comprimento de onda) e uma amplitude. (vide figura 1)

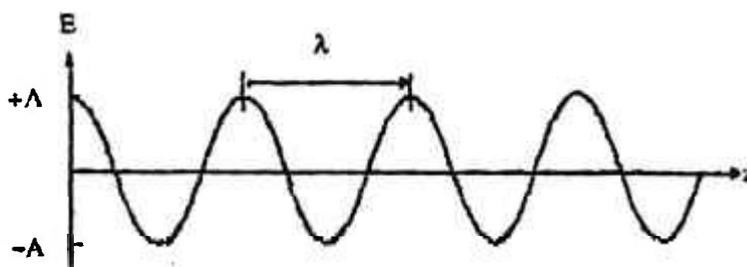


Figura 1. Propriedade Básica da Onda Eletromagnética. Campo elétrico da luz em função da distância. λ é o comprimento de onda e A é a sua amplitude.

O comprimento de onda é dado pela distância entre dois picos consecutivos da onda, ou seja, quando ocorre um ciclo completo. A unidade de medida do comprimento de onda é a unidade de espaço, que pode ser expressa em micrômetros (μm), nanômetros (nm), ou ângstrons (\AA). A unidade de medida usual da energia do fóton é o elétron-volt (eV), comumente utilizada quando nos referimos a pequenas quantidades de energia e que pode ser convertido para Joule (J), quando nos referimos a grande quantidades de energia.

O número de ondas que passam por um determinado ponto, número de oscilações, por segundo é denominado de frequência, sendo expressa em ciclos por segundo ou Hertz (Hz).

A frequência (f) está relacionada às propriedades energéticas das ondas eletromagnéticas. Cada fóton possui uma energia (E) proporcional à frequência da onda eletromagnética.

A velocidade de propagação da luz é constante e no vácuo vale aproximadamente 300.000 km/s.

Ondas de mesmo comprimento de onda estão em fase, sendo que todos os picos e vales caminham da mesma forma no espaço e no tempo. (vide figura 2)

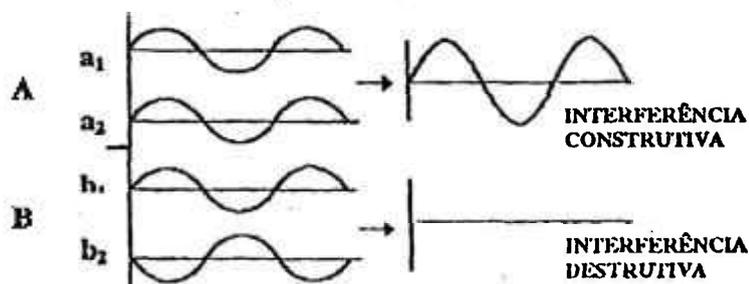


Figura 2. Gráfico de duas ondas se propagando. As ondas a_1 e a_2 estão em fase, o que leva a uma interferência construtiva, duplicando a amplitude da mesma. As ondas b_1 e b_2 estão em antifase, resultando em uma interferência destrutiva da onda.

Sendo assim, essas ondas podem se combinar de forma que a energia resultante se distribua uniformemente no espaço, havendo uma duplicação da amplitude e um aumento do brilho. Esse processo de preservação da fase entre diferentes ondas é denominado de interferência construtiva, o que aumenta muito a sua amplitude.

Este processo de soma de ondas que apresentam mesma fase (coerência) é a característica fundamental dos feixes de um laser, diferenciando-o da luz comum.

2.2. - O Espectro Eletromagnético

O espectro eletromagnético abrange desde de as ondas de comprimento longo, como as ondas de rádio, o infravermelho (IR), o visível e o ultravioleta (UV) até as ondas de menor comprimento, como a radiação ionizante dos raios gama e raios X. (vide figura 3)

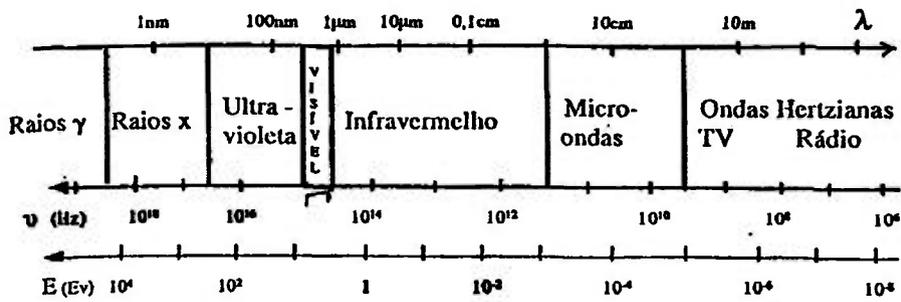


Figura 3. Espectro Eletromagnético.

Essas radiações são essencialmente de mesma natureza, porém diferem somente pela quantidade de energia que transportam e conseqüentemente diferem no tipo de interação com a matéria, como será visto adiante.

A região do visível para o olho humano encontra-se entre os comprimentos de ondas a partir de 400 nm (violeta) até aproximadamente 700 nm (vermelho).

2.3. - Processo de Interação da Radiação Eletromagnética com o Sistema Atômico

A mecânica quântica estabelece que os elétrons em órbita em torno do núcleo podem possuir apenas energias bem definidas, isto é, quantizadas. Em equilíbrio termodinâmico, os átomos ocupam os estados de menor energia. Para temperaturas suficientemente baixas, a ocupação se dá essencialmente no estado de menor energia, denominado estado fundamental. Quando um fóton com energia igual à diferença de energia entre o estado fundamental e algum dos níveis de energia superiores (estado excitado), ele pode ser absorvido. Nesse caso, ocorre uma absorção ressonante e o átomo vai para um estado excitado.

A partir do estado excitado, o sistema pode decair para o estado fundamental de várias maneiras:

- Por emissão de fótons, no processo de decaimento espontâneo;
- Por troca de energia com o ambiente, gerando calor.

Além desses dois processos, o átomo excitado pode ser desexcitado por decaimento estimulado pela presença de um outro fóton ressonante com os níveis eletrônicos de transição. Esse fenômeno é chamado de decaimento estimulado, sendo à base do processo de amplificação dos lasers.

As transições envolvendo a presença de fótons (radioativas) são mostradas na figura 4.

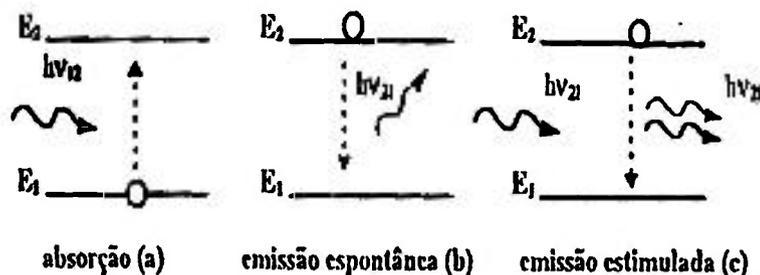


Figura 4. Transições Radioativas entre dois níveis de energia, E_1 e E_2 .

Deve-se destacar que, no caso de absorção e desexcitação térmica, a luz é utilizada para aquecer o material, podendo assim ser utilizada como fonte térmica.

2.4 – Princípios Físicos de Funcionamento do Laser

A partir das postulações do físico dinamarquês *Niels Bohr* em 1913, sobre o átomo de hidrogênio, o físico alemão *Albert Einstein (1879-1955)* em 1917 propôs o conceito da emissão estimulada. Publicou um estudo onde afirmava que os fótons, ao incidirem sobre átomos excitados, poderiam fazê-los produzir uma grande quantidade de luz. Esse foi o princípio do laser (*Einstein 1917*).

Em 1954, na Universidade de Colúmbia, o físico americano *Charles Townes* desenvolveu uma maneira prática de produzir essa energia. Usando um campo elétrico, ele conseguiu estimular o gás amônia a produzir um feixe de microondas, um tipo de luz fora do nosso espectro visível. Estava criado o *Maser*, o predecessor do laser (*Schawlow/Townes 1958*).

Em 1958, *A. Kasler e J. Brosner* idealizaram uma maneira de excitar opticamente um meio, sistema esse conhecido como bombeamento óptico, constituinte essencial para o funcionamento dos lasers.

Em 1958, o mesmo *Charles Townes e Arthur Schawlow*, publicaram um artigo onde demonstraram que era possível utilizar o princípio do *Maser* para produzir luz na faixa visível do espectro eletromagnético, região essa que apresenta fótons mais energéticos.

Dois anos mais tarde, em 1960, o americano *Theodore Maiman* desenvolveu a primeira máquina capaz de emissão laser. Para isso utilizou um cristal de rubi, $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Cr}$, que quando estimulado, era capaz de emitir luz vermelha.

Como curiosidade, vale ressaltar que anteriormente à sua publicação na revista *Nature* seu estudo foi recusado por dois grandes periódicos, que julgaram o dispositivo não funcional.

A palavra laser é um acrônimo de *Ligh Amplification by Stimulated Emissions of Radiation*.

Logo após, em 1961 *Javan* da *Bell Labs*, demonstrou a emissão contínua do laser de *He-Ne* emitindo inicialmente em $1,13\mu\text{m}$ e depois em $632,8\mu\text{m}$.

Em 1964, entra em funcionamento o primeiro laser de CO_2 , desenvolvido por *Patel* do Laboratório *Bell*, que é ainda hoje o tipo de laser mais utilizado em geral e particularmente encontra inúmeras aplicações nas diferentes áreas de saúde.

Para que a maioria dos lasers possa funcionar devem ser satisfeitas três condições fundamentais, isto é, três constituintes são simultaneamente necessários. Um meio ativo ou amplificador, um mecanismo de excitação ou bombeamento e por fim a cavidade ressonante ou ressonador.

2.4.1 - Meio Ativo ou Amplificador

O meio ativo ou amplificador deve possuir uma estrutura apropriada de níveis de energia discretos que se excitam facilmente e possuam a capacidade de armazenar a energia recebida do exterior, possibilitando a inversão de população (maior densidade de população no estado excitado superior que no inferior de uma transição). Esse meio pode ser constituído de íons, átomos ou moléculas e podem ser encontrados na forma sólida, líquida ou gasosa, como o laser por nós utilizado neste trabalho.

2.4.2. - Bombeamento ou Mecanismo de Excitação

No equilíbrio térmico, a população do nível inferior de transição (estado fundamental) é indiscutivelmente a mais elevada e a absorção predomina sobre a emissão estimulada. Para que esta última predomine sobre a absorção é necessário destruir o equilíbrio termodinâmico fazendo com que o nível superior da transição fique mais povoado. Esse processo é denominado de inversão de população, condição fundamental para o funcionamento dos lasers. A noção de inversão de população foi formulada por *Fabrikant 1940*.

Tal condição é obtida através do fornecimento de energia para o meio ativo por intermédio de uma fonte externa de energia, isto é o bombeamento. Esse mecanismo pode ocorrer por meio de um outro laser, uma lâmpada, ou por uma descarga elétrica (vide figura 5).

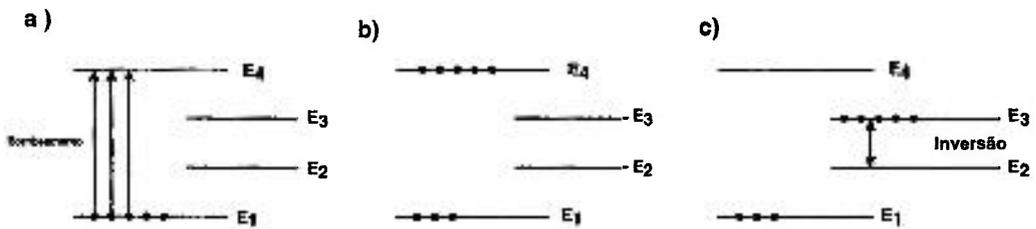


Figura 5. Diagrama de 4 níveis (ideal) atômicos durante o processo de bombeamento.

- a) População no nível fundamental (E_1), é excitada para E_4 ;
- b) E_4 é populado;
- c) A população de E_4 decai para E_3 , produzindo uma inversão de população de E_3 em relação a E_2 .

2.4.3. - Cavidade Ressonante ou Ressonador

É uma cavidade constituída por dois espelhos, sendo um altamente refletor e o segundo parcialmente refletor, paralelos, alinhados frente a frente. O feixe laser será parcialmente transmitido pelo espelho frontal.

Os espelhos refletem as ondas eletromagnéticas em múltiplas passagens de ida e volta no meio ativo, amplificando assim o campo eletromagnético na cavidade. O tipo de ressonador mais simples foi idealizado por *Fabry-Perot* (vide figura 6).

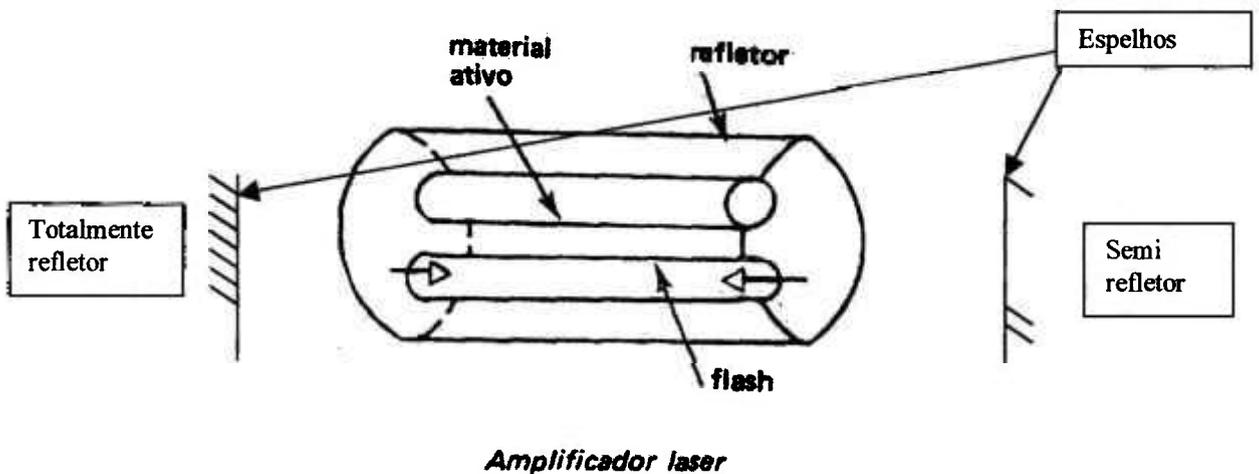


Figura 6. Esquema do ressonador óptico do laser

2.4.4. – Esquema Básico de Funcionamento de um Laser

Os lasers de modo geral podem operar em dois regimes: o contínuo e o pulsado.

Na operação contínua (CW) a emissão se dá na forma de um feixe de potência constante, que não varia com o tempo. Na operação pulsada, a emissão é intermitente com pulsos de energia emitidos em intervalos regulares de tempo. Estes modos de operação dos lasers são, portanto a forma como o meio ativo é alimentado pela fonte de excitação.

No caso do modo contínuo, a única variável controlada pelo operador é o nível de potência, que pode ir de um Watt até a um máximo que é característico de cada equipamento.

No caso da emissão pulsada, o operador pode variar a energia, a largura temporal de cada pulso e a taxa de repetição. Assim, varia-se não só a potência média do laser, como também a potência pico.

Além do tipo de bombeamento, mecanismos especiais colocados intracavidade alteram a forma temporal com que o elemento ativo é depopulado. Nesses casos, concentrações especialmente altas de energia óptica no espaço e no tempo podem ser obtidas. Com esses mecanismos, como no caso do chaveamento Q (Q-switch) e do travamento de modos (mode-locking), pulsos ultracurtos e de alta potência podem ser obtidos apresentando duração de 10^{-8} a 10^{-13} s e em geral, potência de pico de até 10^{10} W (H. Maillet 1987).

O laser de dióxido de carbono CO_2 , é um laser molecular, com transições entre níveis moleculares rotacionais, vibracionais ou eletrônicos. Seu meio ativo é uma mistura de gás carbônico, nitrogênio e hélio. Seu método de bombeamento é a descarga elétrica e como os outros tipos de laser, ele converte a energia luminosa em calor, ocorrendo a destruição das células por aquecimento da água e das proteínas intracelulares.

Primeiramente a descarga excita estados vibracionais do nitrogênio o qual por colisão, bombeia as moléculas de CO_2 para um nível eletrônico-vibracional excitado. O gás hélio é um auxiliar importante que mantém a energia média dos elétrons alta na região de descarga e também, refrigera os níveis laser inferiores da molécula de CO_2 . Seu decaimento ocorre em milissegundos.

Como a molécula de CO₂ pode não somente vibrar, mas também rodar, o espectro do laser é constituído de várias linhas de emissão, variando entre 9 µm e 11 µm. Nós trabalhamos com a emissão de 10.6 µm. Dentre os lasers, o laser de CO₂ é um dos lasers mais eficientes, com eficiência acima de 10 por cento e a sua potência está relacionada ao volume de gás do meio ativo. Normalmente pode-se obter extração de potência de 70 W por litro de gás.

Quando da sua interação com os tecidos, podem ocorrer efeitos térmicos, como a ablação, a fotoablação, a fotodisrupção e os efeitos fotodinâmicos.

Para direcionar a radiação, um laser de *He-Ne* é alinhado co-axialmente com potência aproximada de 2 mW, é serve como guia, quando o modelo for de braço articulado, aumentando assim a precisão da aplicação, já que a área central do local deve ser cortada, enquanto que a área periférica será coagulada, o que confere a característica gaussiana do feixe. A radiação pode ser liberada no modo contínua, contínua interrompida ou pulsada.

Os atuais lasers de CO₂ são capazes de gerar potências de saída de menos de um W a 100 W de potência, sendo que a radiação é liberada através de um sistema óptico com distâncias focais de 20 a 200 mm. Pelo ajuste da potência de saída e do tempo de exposição o laser pode cortar, vaporizar, coagular ou promover a ablação do tecido biológico (H. Maillet 1987).

2.4.5. - O feixe Laser

O feixe laser que é emitido da cavidade ressonante possui características próprias como a monocromaticidade, coerência espacial e temporal, colimação, direcionalidade e brilhância, o que confere ao laser a condição de ser focado em pequenas áreas e ao mesmo tempo desenvolver altíssimas potências (H. Maillet 1987).

O fator de qualidade do feixe é medido pelo fator M^2 , ou seja, quanto maior o fator M^2 pior a qualidade de foco. Como descrito na seção 2.1, a coerência permite a obtenção de altas densidades de energia.

O feixe laser emitido pode ser entregue via *hollow fiber*, via braço articulado ou via fibra óptica.

Estes sistemas de entrega promovem diferenças de potência entre o feixe na saída do aparelho e o feixe que é emitido na ponta do sistema de entrega. Isso se explica em função do índice de refração do material constituinte do núcleo do sistema de entrega e perdas por injeção e reflexão.

Estes são os maiores problemas com as fibras, podendo as perdas serem em alguns casos minimizadas através de métodos específicos de construção.

A abertura numérica (NA) é representativa da capacidade da fibra de transmitir energia luminosa. Quanto maior for o NA, maior será o rendimento do acoplamento a uma fonte de luz, o que também é outro fator de diferença entre a energia produzida no aparelho e a energia entregue na ponta do sistema de entrega (*Young 1997*).

Em nosso trabalho utilizamos um sistema de entrega via *hollow fiber*, sendo esse revestido com prata em seu interior de forma a refletir a luz sem absorvê-la. Nosso laser por emitir em 10.600 nm apresenta alta absorção pela água e pelo material das fibras comuns (SiO_2) o que não nos permitiria utilizá-lo acoplado uma fibra óptica.

2.5. - Lasers e a sua Interação com a Matéria Orgânica

2.5.1. - Mecanismos de Interação da Luz com o Tecido Biológico (Lei de Beer)

Quando há incidência de um feixe laser em um tecido biológico, 4 fenômenos podem ocorrer. Parte da luz pode ser refletida, parte da luz pode ser transmitida sem atenuação, parte pode ser absorvida pelos componentes ópticos do tecido (cromóforos) e parte pode espalhada no tecido (vide figura 7).

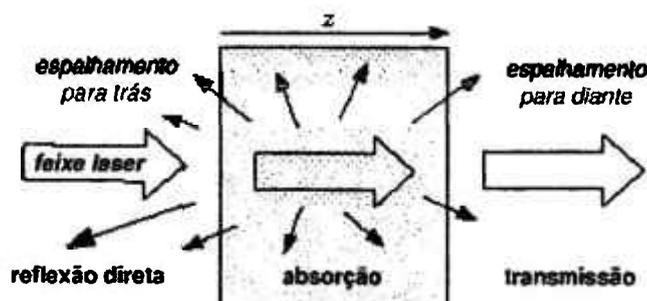


Figura 7. Esquema dos fenômenos que ocorrem quando da interação do feixe laser com o tecido.

A absorção e o espalhamento são os fenômenos de interesse quando utilizamos essa tecnologia na área de saúde, pois não haverá reação sem absorção, ao mesmo tempo que quando não corretamente empregada, pode levar à iatrogenias.

Muitos dos princípios básicos que determinam as interações laser com os tecidos biológicos são relativamente simples. Além das propriedades da radiação laser, como seu comprimento de onda, características temporais de emissão contínua ou pulsada, intensidade ou densidade de energia do feixe laser; as propriedades ópticas do tecido biológico alvo têm um papel muito importante na distribuição da luz laser no tecido. Estas propriedades determinaram a natureza e a extensão da resposta do tecido à incidência da radiação laser.

Os sistemas biológicos são complexos e compostos de uma grande variedade de elementos celulares e fluidos teciduais, cada qual com diferentes características de absorção, dentre eles: água, melanina, hemoglobina, H-A e as proteínas. Todos estes componentes podem absorver a luz em diferentes comprimentos de onda, transformando a energia luminosa em calor. Portanto, a utilização de lasers para uma dada aplicação deve ser discutida em termos de considerações de fluxo de calor, em geral.

Para minimizarmos esse fluxo de calor devemos atentar á escolha do laser, o seu regime de operação, o tecido alvo a ser trabalhado. Quão mais ressonante for todo esse processo, menor será o dano ocasionado pelo calor.

O melhor método de remoção de calor é a ablação explosiva, onde a molécula de água é rapidamente aquecida por volta de 250° C, em um tempo curtíssimo (10^{-12} a 10^{-15} de segundo) e explode levando consigo o tecido ao redor junto com a pluma de ablação, além do calor evitando assim que o mesmo propague.

As características ópticas dos tecidos são importantes para determinarmos os parâmetros de utilização dos lasers. Cada tecido apresenta um coeficiente óptico de absorção, denominado de α . A intensidade da luz transmitida ao longo de um meio absorvedor é descrita pela lei de *Lambert-Beer*, que apresenta uma dependência exponencial com o comprimento:

$$I_{(z)} = I_0 e^{(-\alpha \cdot z)} \quad (\text{exp. 1})$$

A profundidade de transmissão também chamada de profundidade de penetração óptica, ou comprimento de absorção é definido pelo inverso do coeficiente α e corresponde ao comprimento no qual 63% da luz é absorvida (vide exp. 1).

$$Z_{\text{óptico}} = 1 / \alpha \quad (\text{exp.2})$$

O comprimento de extinção é definido como o comprimento no qual 90% da luz é absorvida, e corresponde a aproximadamente 2,3 comprimentos de absorção.

A Figura 8 apresenta o espectro de absorção dos principais cromóforos do tecido biológico (comunicação privada, *E. P. Maldonado*).

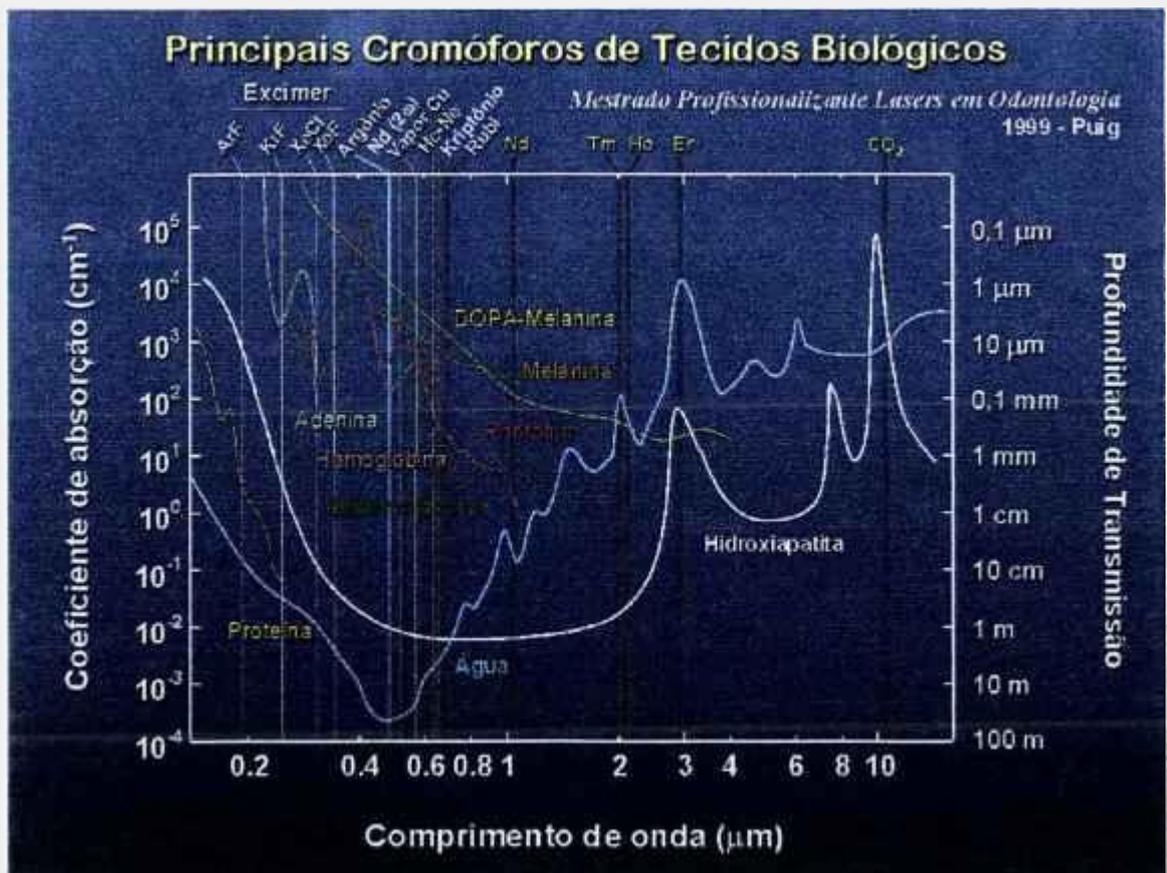


Figura 8. Espectro de absorção dos Principais Cromóforos Absorvedores no tecido.

2.5.2. - Efeitos da Radiação nos Tecidos Biológicos

A natureza da resposta de um tecido para a irradiação laser é dependente não apenas da absorção específica do comprimento de onda como também das características de densidade, intensidade, taxa de repetição e tempo de exposição do feixe laser e também da propagação da luz laser até o alvo.

Os sistemas biológicos são complexos e compostos de uma grande variedade de elementos celulares e fluidos teciduais, cada qual com diferentes características de absorção.

Majoritariamente, o corpo humano é constituído de água, tornando-a assim um cromóforo essencial para as aplicações biomédicas. Além da água, outros constituintes como a melanina, a hemoglobina, as proteínas e no caso dos tecidos duros a hidroxiapatita, são responsáveis por absorverem determinados comprimentos de onda e promoverem os efeitos desejados no tecido (vide figura 9).

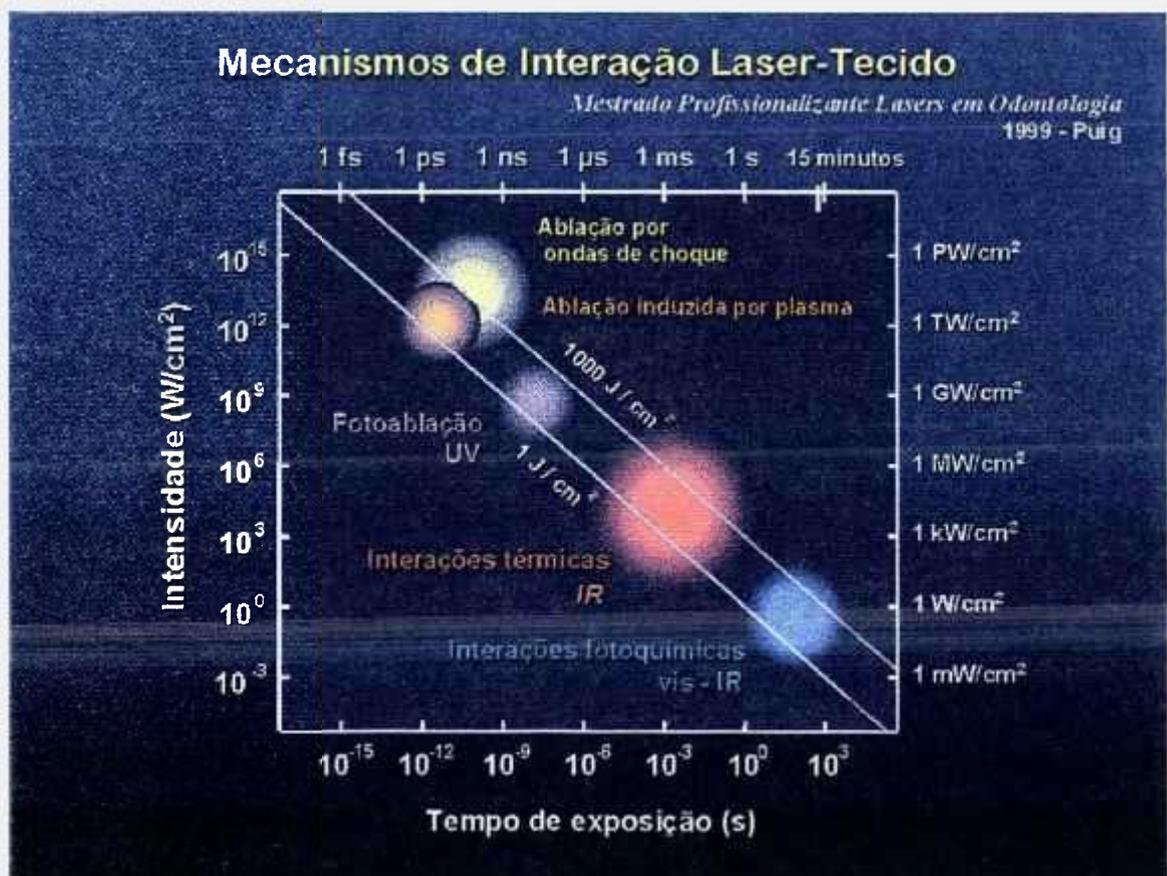


Figura 9. Mecanismos de Interação Laser-Tecido.

As interações que podem ocorrer quando a radiação laser é absorvida pelos tecidos biológicos são: efeitos não térmicos, efeitos fotomecânicos, efeitos fotoquímicos, efeitos fotoelétricos, efeitos quânticos e os efeitos térmicos como a coagulação, vaporização, ablação, corte ou carbonização tecidual.

A maior parte das aplicações biomédicas utiliza fótons menos energéticos situados na região de infravermelho e infravermelho próximo, os quais podem levar os átomos ou as moléculas a vibrarem mais intensamente levando assim, a um aumento de temperatura. Sendo assim, a energia deve ser depositada no tecido de forma que o mesmo tenha seu tempo de relaxação térmica respeitado, considerando-se uma dada aplicação, para que evitemos um acúmulo de temperatura, minimizando dessa forma o dano a distância.

A ação térmica é modulada pela condutividade térmica do tecido, pela vascularização local e pela profundidade com que o feixe laser atinge o tecido.

O feixe laser pode ser focalizado sobre a superfície tissular em áreas entre vários mm^2 a alguns μm^2 levando a um aquecimento dos tecidos dependente da densidade superficial de energia ($\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$) e promover coagulação, vaporização, corte ou ablação do tecido alvo.

Quando o tecido atinge temperaturas abaixo de 60°C , em geral o efeito que se manifesta é a hipertermia, que para pequenos tempos de exposição não produzem efeitos irreversíveis, ocorrendo sim mudanças enzimáticas e o desenvolvimento do edema. Acima de 65°C ocorre a desnaturação protéica acompanhada por coagulação de elementos do sangue, com exposição de poucos segundos de duração. Acima de 100°C ocorre superaquecimento produzindo rápida vaporização do fluido do tecido resultando na ablação e encolhimento ou contratura da área adjacente.

Para tecidos duros, o processo de remoção de tecido se inicia ao se atingir a temperatura de superfície de limiar de ablação para cada comprimento de onda específico (300°C para $2,94 \mu\text{m}$, 800°C para $2,79 \mu\text{m}$ e 1000°C para $9,6 \mu\text{m}$), sem refrigeração, sendo a temperatura de vaporização destes tecidos de cerca de 1100°C (H-A).

Para baixas intensidades a célula absorve a energia de forma seletiva, passando para o estado excitado. O retorno ao estado fundamental pode se dar por degradação térmica ou emissão de radiação de fluorescência, ou ainda por transferência de energia, causando reações químicas (efeitos não térmicos).

Para comprimentos de ondas menores que 400nm , os efeitos no tecido são predominantemente fotoquímicos, de forma que a energia dos fótons é suficiente para produzir mudanças químicas diretamente, podendo ser quebradas ligações químicas de

átomos ou moléculas. Nesta região temos alta absorção nas proteínas. Para comprimentos acima de 750nm, os efeitos são basicamente térmicos (*H. Maillet 1987*).

Capítulo 3

Tecido Ósseo

Todas as formas de matéria viva necessitam de muitos elementos inorgânicos para seus processos vitais normais. Nas células vivas têm-se encontrado quase todos os elementos da tabela periódica, embora nem todos sejam necessariamente essenciais.

Os elementos minerais no organismo podem ser classificados como: elementos principais (cálcio, magnésio, sódio, potássio) e os elementos de traço (iodo, cobre, zinco).

O metabolismo mineral difere em um ponto do metabolismo das proteínas, lipídeos e carboidratos, pois não são produzidos no organismo e sua ingestão se dá através dos alimentos.

Os minerais guardam entre si uma relação recíproca e um equilíbrio na fisiologia humana e não podem ser considerados como elementos isolados.

O cálcio constitui 2% do corpo humano adulto, sendo que 99% desse cálcio encontra-se no tecido ósseo e dentes. O cálcio participa da coagulação sanguínea, da contração neuromuscular e é um cofator enzimático da permeabilidade capilar.

Segundo a *Food and Nutrition Board do National Research Council*, são necessárias 0,8g na infância, 1,2g na adolescência e 800mg diárias na fase adulta, de consumo de cálcio.

A presença de vitamina D e o pH ácido intestinal melhoram as condições de absorção de cálcio pelo organismo, ao passo que excessos de gorduras, ácidos oxálico e ácidos fítico dificultam a absorção do mesmo.

No sangue o cálcio apresenta-se sob duas formas, sendo uma parte em torno de 40% a 50%, associado a proteínas e uma segunda parte, cerca de 50% a 60%, encontra-se na forma iônica Ca^{++} . O cálcio do sangue é levado aos líquidos extracelulares e daí para as células onde vai desempenhar o seu papel metabólico. Nos ossos e dentes participa do processo de mineralização.

A regulação da calcemia é feita pelo paratormônio e pela calcitonina, hormônios secretados pela paratireóide e tireóide, respectivamente.

O paratormônio é um hormônio hipercalcemiante, pois age aumentando a absorção intestinal de cálcio, a absorção renal e a mobilização do cálcio ósseo.

Já a calcitonina tem um efeito hipocalcificante, pois age diminuindo a deposição do cálcio nos ossos e dentes, aumentando a excreção renal (*Ferreira, et al 1989*).

O tecido ósseo, como outros tecidos conjuntivos, consiste de células, fibras, e substância fundamental, mas difere dos outros no que diz respeito aos seus componentes extracelulares que são calcificados, tornando-o, um tecido duro, ideal para suporte e proteção do organismo humano. Como tecido especializado em suportar pressões sucede a cartilagem, tanto na ontogênese como na filogênese. São importantes para inserções musculares e tendinosas formando com ambas o conjunto responsável pelo movimento.

O seu conteúdo medular apresenta elementos formadores do sangue e é o principal reservatório de cálcio do organismo, sendo responsável pelo seu metabolismo.

Apresenta notável combinação de propriedades físicas, como alta tensão e resistência à compressão e alguma elasticidade ao mesmo tempo em que é um material leve.

Por essas características o tecido ósseo encontra-se em constante remodelação, sendo que cerca de 0,7% do esqueleto é remodelado por dia levando em um período de 142 dias em média a formação de um novo esqueleto (*Garg, et al 1998*).

Sendo assim, concluímos que o tecido ósseo exerce inúmeras funções e responde prontamente aos estímulos do meio, ocorrendo atrofia quando do pouco uso, ou a hipertrofia com pequeno aumento da massa óssea, quando solicitado por determinado tempo. Além disso, participa do metabolismo endócrino (Ca^{++}), nutricional e metabólico.

Em sua análise macroscópica, o tecido ósseo se apresenta bem diferenciado em duas partes distintas: na periferia (osso compacto ou cortical) e no interior (osso medular ou esponjoso).

O osso esponjoso constitui-se em um arcabouço onde encontraremos a medula em suas lacunas. Já o osso compacto aparece como uma massa contínua sólida, em que espaços podem ser vistos somente em escala microscópica.

A união entre essas duas modalidades de osso é bem delimitada e fina sendo que a intercomunicação entre os espaços do trabeculado desse osso esponjoso no adulto está diretamente ligada à cavidade medular.

Envolvendo o osso medular temos o osso cortical envolvido por um tecido conjuntivo conhecido como periósteo, o qual possui um alto potencial osteogênico e é composto por duas camadas, sendo a fibrosa mais externa que promove a sensibilidade a pressão por causa da sua configuração de fibras colágenas principalmente densas e fibroblastos. Essa camada é rica em fibras nervosas e suprimento sanguíneo. A camada celular interna está em contato direto com o osso e contém osteoblastos funcionais e é freqüentemente relacionada como a camada de trocas. Nas articulações o periósteo não está presente, além daquelas áreas onde tendões e ligamentos estão inseridos.

As cavidades e os espaços medulares são cobertos pelo endósteo, que consiste de uma única camada de osteoblastos formando uma membrana delicada e muito fina. O endósteo é arquitetonicamente similar a camada de trocas celulares do periósteo pela presença de células ósseas osteoprogenitoras, osteoblastos e osteoclastos.

Quando o periósteo não está presente, o tecido conjuntivo que está em contato com a superfície do osso, não apresenta potencial osteogênico e não contribui para regeneração.

A cavidade medular da diáfise e as cavidades dos ossos esponjosos são revestidas pelo endósteo, que se constitui de uma fina camada celular que também possui propriedades osteogênicas.

As células do tecido ósseo são: os osteócitos, que se situam em cavidades ou lacunas no interior da matriz; os osteoblastos, produtores da parte orgânica da matriz e os osteoclastos que são células gigantes multinucleadas, relacionadas com a reabsorção do tecido ósseo e que participam dos processos de remodelação.

Como não existe difusão de substâncias através da matriz calcificada do osso, a nutrição dos osteócitos depende dos canalículos que existem na matriz. Esses canalículos permitem a comunicação dos osteócitos com seus vizinhos, com as superfícies externa e interna do osso e com os canais vasculares da matriz.

3.1. Estrutura Microscópica

Quando analisamos o tecido ósseo em escala microscópica, definimos quatro tipos de ossos: primário ou imaturo, composto, lamelar ou secundário, maduro e alveolar.

O osso primário exerce um papel durante a cicatrização. Sua principal propriedade é a sua habilidade em se formar rapidamente (em uma média de 30 a 60 microns/dia). Entretanto, devido ao osso primário ser formado rapidamente, ele se desenvolve de modo desorganizado sem arquitetura lamelar ou sistema harvesiano. Como resultado, o osso primário tem baixa resistência biomecânica e freqüentemente é citado na literatura como osso embrionário, termo esse que algumas vezes é enganoso, pois todos os adultos têm capacidade de formar esse tipo de osso. Durante a cicatrização óssea, ele é referido como osso fase I. Com o tempo, esse osso fase I é substituído por um osso mais maduro, fase II, ou lamelar.

O osso composto é o termo usado para descrever um estado de transição entre o osso fase I e o osso fase II, que é um osso primário envolvido por um osso lamelar.

O osso lamelar é o osso formado, maduro extremamente forte. Tem uma formação lenta, na média de 0,6 a 1,0 microns/dia e é bem organizado na sua estrutura colágena, e posteriormente, na sua estrutura mineralizada. O osso lamelar consiste de camadas múltiplas paralelas ou concêntricas. Por fim o osso alveolar é o mais encontrado ao redor dos ligamentos e articulações. Consiste de intercomunicações estriadas com ligamentos.

3.2. Histogênese

O tecido ósseo pode ser formado via ossificação intramembranosa ou endocondral. Logo após o início da ossificação, começa também a haver reabsorção, portanto, durante o crescimento dos ossos pode se ver lado a lado, áreas de tecido ósseo primário, de reabsorção e de tecido ósseo secundário.

3.2.1. Ossificação Intramembranosa

Sua origem ocorre no interior das membranas de natureza conjuntiva. É o processo de formação dos ossos frontal, parietal e de partes do occipital, temporal e dos maxilares superior e inferior. Contribui também para o crescimento dos ossos curtos e para o crescimento em espessura dos ossos longos.

O local onde a ossificação se inicia chama-se centro de ossificação primária. O processo tem início pela diferenciação de células indiferenciadas semelhantes a fibroblastos jovens que se transformam em grupos de osteoblastos. Estes sintetizam o tecido osteóide que logo se calcifica, englobando alguns osteoblastos que se transformam em osteócitos. Como surgem vários desses grupos quase que simultaneamente, ocorre à confluência das traves ósseas formadas, dando ao osso um aspecto esponjoso.

Entre as traves formam-se cavidades que são penetradas desde cedo por vasos sanguíneos. Com estes vasos penetram também células mesenquimatosas indiferenciadas que irão dar origem à medula óssea. Por mitose e diferenciação as células do tecido conjuntivo formam novos osteoblastos, que se colocam sobre as traves ósseas, continuando o processo de ossificação.

Nos ossos chatos do crânio, principalmente após o nascimento, verifica-se um predomínio acentuado de formação sobre a reabsorção tanto na superfície externa como interna e assim formam-se as duas tábuas de osso compacto, enquanto o centro permanece esponjoso (díploe).

3.2.2. Ossificação Endocondral

Tem sua origem sobre uma peça de cartilagem hialina, de forma semelhante à do osso que se vai formar, porém de tamanho menor. É responsável pela ossificação de ossos curtos e longos.

Durante o processo de ossificação duas fases se apresentam: primeiramente a cartilagem hialina sofre modificações, havendo hipertrofia dos condrócitos, que acabam morrendo e deixando as cavidades separadas por finos tabiques de matriz cartilaginosa, que se calcifica ao morrerem os condrócitos. Em segundo lugar as cavidades da cartilagem são invadidas por capilares sanguíneos e células mesenquimatosas indiferenciadas vindas do conjuntivo adjacente. Essas células vão-se diferenciar em osteoblastos que depositarão matrizes ósseas sobre os restos de cartilagem calcificada.

3.3. Estrutura Óssea Molecular

A nível molecular o osso é um material composto, por uma matriz colágena de ligação cruzada que tem uma organização múltipla tridimensional das fibras da matriz. A orientação das fibras colágenas determina o padrão de mineralização. Deste modo o osso adapta-se no seu ambiente biomecânico e projeta máxima força na direção que está sendo forçado, sendo este é o papel primário das fibras colágenas.

A substância óssea intercelular tem um aspecto homogêneo de uma estrutura organizada. A porção orgânica ocupa 35% da matriz e é principalmente formada por fibras osteocolagenosas as quais são similares às fibras colágenas do tecido conjuntivo. Essas fibras são agrupadas juntas por uma substância, tipo cimento, consistindo principalmente de glicaminoglicanos (proteína polissacarídea).

Sessenta e cinco por cento do peso ósseo corresponde a seu componente inorgânico, localizado apenas no cimento interfibrinoso. Os minerais são encontrados predominantemente na forma de cristais de fosfato de cálcio com uma estrutura de apatita a qual corresponde a hidroxiapatita. Estes minerais formam depósitos de partículas densas ao longo das fibras osteocolágenas. As lacunas e ductos são cobertos por uma camada fina de cimento orgânico especial que difere do restante por sua substância intercelular, isto devido falta de fibras.

A matriz de protefna óssea calcificada consiste de 35% de componentes orgânicos (colágeno) e 5% de outras proteínas e peptídeos.

Estas outras proteínas e peptídeos, tal como a BMP (bone morfogenic protein), regula como o osso é disposto em camadas e como o mesmo é mantido. A matriz óssea tem um aspecto característico de camadas seqüências que variam na espessura de 300 a 700 microns. Essas camadas são o resultado de um depósito rítmico e uniforme da matriz. As fibras de cada camada são paralelas, com uma orientação em espiral que muda entre as camadas de modo que as fibras de uma camada corram perpendiculares às fibras da camada adjacente. Essa disposição alternada na direção das fibras explica a divisão existente entre elas.

3.4. Modelamento e Remodelamento Ósseo

O modelamento ósseo é definido como qualquer mudança na forma ou tamanho do osso. Pode ser um processo anabólico com aposição de osso sobre a superfície, ou pode ser um processo catabólico com reabsorção da superfície. Por causa desses dois processos poderem ser levados separadamente sobre as diferentes superfícies, o modelamento ósseo é um fenômeno de superfície específica que ocorre durante o crescimento, como parte do processo de cicatrização (por exemplo, durante a estabilização de um implante endósseo) e na resposta à carga óssea.

O modelamento é um processo único no qual a formação não tem que ser precedida pela reabsorção. A ativação das células para reabsorção ou formação óssea pode ocorrer no mesmo osso em diferentes superfícies. Como exemplo temos a movimentação ortodôntica.

O modelamento ósseo pode ser controlado por fatores biomecânicos, como no caso do movimento dentário por ortodontia ou por fatores de crescimento tal como no caso da cicatrização óssea por enxerto e subsequêntemente osseointegração.

Até certos valores de pressão há uma resposta funcional normal no qual um osso forte é produzido sendo este efetivo quando submetido a cargas. Quando uma pressão superior é aplicada o organismo na tentativa de responder à necessidade, promove a produção de um osso primário, sendo limitada sua capacidade de suportar carga.

3.5. CÉLULAS

3.5.1. Osteócitos

São células que estão presentes no interior da matriz óssea, ocupando suas lacunas das quais partem os canaliculos. Os osteócitos são células achatadas com forma de amêndoa e prolongamentos citoplasmáticos que, em ossos jovens, ocupam toda a extensão dos canaliculos. Gradativamente os osteócitos retraem seus prolongamentos deixando as partes terminais ocupadas por substância fundamental amorfa.

Os osteócitos são essenciais para a manutenção da matriz mineralizada do osso e sua morte é seguida por reabsorção da matriz. Estudos de histoquímica demonstraram que os osteócitos e os osteoblastos contêm fosfato de cálcio unido à proteína ou glicoproteína. As células do osso são portanto, capazes de concentrar cálcio no seu citoplasma. O mecanismo pelo qual essa célula mantém o tecido ósseo ainda é objeto de investigações. *(Junqueira e Carneiro 1983)*

3.5.2. Osteoblastos

São as células que sintetizam a parte orgânica (colágeno e proteoglicanas) da matriz óssea. Dispõe-se sempre nas superfícies ósseas, lado a lado num arranjo que lembra um epitélio simples. Quando em intensa atividade sintética são cubóides com citoplasma muito basófilo, porém, em estado pouco ativo, tornam-se achatados com a basofilia citoplasmática diminuída. Possuem prolongamentos citoplasmáticos que se prendem aos dos osteoblastos vizinhos. Esses prolongamentos se tornam mais evidentes quando um osteoblasto é envolvido pela matriz, pois são responsáveis pela formação dos canaliculos que se irradiam em lacunas. Um vez aprisionado pela matriz recém-sintetizada, o osteoblasto passa a ser chamado de osteócito. A matriz se deposita ao redor do corpo da célula e de seus prolongamentos, formando assim as lacunas e os canaliculos, respectivamente.

Os osteoblastos em fase de síntese mostram as características ultra-estruturais das células produtoras de proteínas, com o retículo endoplasmático granular e aparelho de Golgi desenvolvidos. São células polarizadas cuja secreção é eliminada pela extremidade em contato com o osso. O núcleo que é grande e claro no osteoblasto ativo, situa-se na extremidade da célula afastada da matriz. A matriz óssea adjacente aos osteoblastos ativos e que ainda não está calcificada recebe o nome de osteóide ou pré-óssea. Nos osteoblastos ativos têm-se observado grânulos citoplasmáticos, prováveis precursores das glicosaminoglicanas neutras da matriz (*Junqueira e Carneiro 1983*).

3.5.3. Osteoclastos

São células gigantes, móveis, contendo 5 núcleos ou mais que aparecem nas superfícies ósseas quando ocorre reabsorção do tecido. Nos cortes histológicos as áreas de reabsorção podem ser identificadas pela presença dos mesmos. Frequentemente os osteoclastos situam-se em depressões da matriz, nas lacunas de *Howship*. Têm citoplasma granuloso algumas vezes com vacúolos e fracamente basófilo nos osteoclastos jovens e acidófilo nos maduros. Os osteoclastos contêm numerosos lisossomas dando, portanto, reação histoquímica positiva para fosfatase ácida.

O papel exato dos osteoclastos na reabsorção óssea não está totalmente esclarecido. Todavia, há evidências de que eles secretam uma colagenase que ataca a parte orgânica da matriz óssea. Além disso, os osteoclastos englobam e solubilizam os cristais contendo cálcio, que se destacam da matriz durante a reabsorção desta (*Junqueira e Carneiro 1983*).

3.5.4. Matriz

A parte inorgânica representa cerca de 50% do peso da matriz óssea. Os íons mais encontrados são o fosfato e o cálcio. Há também bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato em pequenas quantidades.

Nas micrografias eletrônicas, os cristais de hidroxiapatita aparecem sob a forma de agulhas ou tablóides alongados. Estes cristais se arranjam ao longo das fibrilas colágenas e são envolvidos por substância fundamental amorfa.

A associação de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) com fibras colágenas são os responsáveis pela dureza e resistência característica do tecido ósseo (*Junqueira e Carneiro 1983*).

3.5.5. Periosteio e Endosteio

As superfícies interna e externa dos ossos são recobertas por membranas conjuntivas, que formam o endosteio e o periosteio, respectivamente.

O revestimento das superfícies ósseas é essencial para a manutenção do tecido, pois áreas de reabsorção aparecem nos locais que perderam o revestimento conjuntivo ou a camada de osteoblastos.

O periosteio é formado por tecido conjuntivo denso, muito fibroso em sua parte externa e mais celular e vascular na porção interna junto ao tecido ósseo, mantendo relação de continuidade entre algumas fibras do periosteio e fibras colágenas do tecido ósseo, sendo conhecidas como fibras de *Sharpey*, as quais mantêm unido firmemente o periosteio ao tecido ósseo.

As principais funções do periosteio e do endosteio são nutrir o tecido ósseo, pois dos seus vasos partem ramos que penetram nos ossos pelos canais de *Volkman* e servem de fonte de osteoblastos para o crescimento e reparação dos ossos. (*Junqueira e Carneiro 1983*)

Capítulo 4

Aplicações Clínicas do Laser de CO₂ em Tecidos Ósseos

Em 1966, portanto, logo após o funcionamento do primeiro laser, *Yahr e Strully* adequaram o laser de CO₂ (*Patel 1964*) e apresentaram o modelo cirúrgico do mesmo, citando suas propriedades hemostáticas e de corte (*Lehnert et al, 1996*).

Em 1968, foi adaptado um sistema de braços articulados e espelhos por *Polanyi*, da *American Optical Company*, para aplicações cirúrgicas. Nesse mesmo período *Nath* acoplou com perfeição uma fonte laser a uma “*hollow fiber*”, o que proporcionou ao laser maior aplicabilidade. Nesse mesmo ano *Jako* removeu pólipos da corda vocal com laser CO₂.

Kaplan em 1972 iniciou o uso do laser de CO₂ em cirurgias e em 1974 *Bellina* adaptou o braço articulado no laser de CO₂, para utilizá-lo em ginecologia.

Em 1977, *Ascher* realizou com sucesso um procedimento de neurocirurgia, assistida por laser de CO₂.

A área de saúde foi a primeira a reconhecer os danos do calor friccional, quando de sua utilização em cirurgias ortopédicas. Mais tarde, os estudos de *Hall, Mester e Mihashi*, todos em 1971, aumentaram as aplicações do laser de CO₂ em tecidos moles, segundo (*Pinheiro1992*).

De acordo com *Fisher et al. (1984)*, o uso do laser de CO₂ no tratamento de pacientes nas especialidades da oftalmologia, ginecologia, otorinolaringologia e dermatologia tem sido bem documentado, sendo que na ginecologia e dermatologia o laser tem sido aplicado como um meio de erradicar a displasia cervical e a neoplasia intra-epitelial, condições da mucosa que estão histologicamente relacionadas às alterações que ocorrem na cavidade oral.

A cirurgia a laser tem vantagens quando comparada a outras técnicas, como precisão na destruição tecidual, mínimo dano aos tecidos adjacentes, efeito hemostático, propriedade de selar vasos com até 0.5 mm de diâmetro, redução de dor e edema pós-operatórios, esterilização do campo cirúrgico e possibilidade de controle microscópio e endoscópio (*Fisher et al. 1984*).

O uso do laser com alta intensidade para promover o corte do tecido ósseo resultará em necrose térmica do osso adjacente e segundo *Clauser e Panzoni (1981)* a energia necessária para penetração no osso possui relação linear com a espessura do tecido.

Mediante a presença de irrigação e regimes pulsados de trabalho *Sherk et al. (1995)* sugerem que o defeito ósseo produzido pelo laser de CO₂ depende da potência utilizada, sendo que baixas potências produzem maiores defeitos. *Clayman et al. (1978)* observaram três zonas de dano térmico, a saber:

- zona central: espaço vazio resultante da vaporização do tecido;
- zona de sub-vaporização: esbranquiçada, correspondente à metade da zona de vaporização, a qual é delimitada pela terceira zona;
- zona de carbonização: áreas enegrecidas e delgadas.

Estes autores descreveram ainda uma quarta zona correspondente a uma área esbranquiçada, aproximadamente do tamanho da de sub-vaporização, atribuída à vaso-constricção e *Sherk et al. (1995)*, observaram que esta zona é preenchida por um tecido de granulação bem vascularizado, o qual também preenche o defeito ósseo decorrente da vaporização tecidual e posteriormente mostra características osteóides.

Small et al. (1979) utilizando o laser de CO₂ pulsado, verificaram que ocorre um retardo na cicatrização da zona central do defeito, sujeita a maior aquecimento pelo laser, além de que neste modo de operação do laser há a produção de uma área de menor dano térmico, pois a energia total entregue ao tecido é menor, produzindo incisões mais superficiais e uma menor deposição de carbono na superfície em relação ao modo contínuo.

Lehnert et al. (1996) relatou que quando uma pequena quantidade de energia é absorvida e interage com o tecido, a reação térmica resulta em coagulação a uma temperatura aproximada de 60° C, podendo ser usada para promover hemostasia e reduzir a sensação dolorosa. Se a quantidade de energia é maior, alcançando temperaturas acima de 100° C, ocorrerá a vaporização do tecido, sendo que não há trauma mecânico e mínima dor pós-operatória é observada, devido a possível cauterização das terminações nervosas livres.

Em Odontologia na especialidade de periodontia pode ser usado para remover ou cortar tecidos gengivais hiperplásicos e corrigir defeitos ósseos. Em cirurgia oral e maxilo-facial os lasers têm sido usados para o tratamento de patologias benignas e malignas de tecidos moles, evitando a disseminação das células aos tecidos mais profundos, altamente vascularizados tais como à língua, onde procedimentos têm sido simplificados pela excelente hemostasia. Desordens ulcerativas virais recorrentes podem ser erradicadas devido à vaporização das partículas virais. O uso do laser de CO₂ é preferível em certos distúrbios do sono caracterizados por apnéia devido à obstrução das vias aéreas superiores, quando comparado aos métodos convencionais. Em cirurgias da articulação temporomandibular, este tipo de laser tem promovido resultados significativos devido a hemostasia, por ser está uma região muito vascularizada, promovendo um retorno mais antecipado do fluido sinovial, da sensação e da propriocepção. A recorrência da forma erosiva do líquen plano tem sido menor com a excisão utilizando o laser de CO₂ e há outros estudos que sugerem sua utilização em cirurgia ortopédica para o tratamento de osteomielite e em biópsias para o diagnóstico de neoplasmas malignos (*Lehnert et al, 1996*).

Apesar de suas inúmeras indicações, os lasers apresentam também algumas desvantagens, tais como perda de um guia táctil, pois são utilizados mais comumente sem o contato com o tecido alvo, havendo perda de sensação e propriocepção pelo operador e a ressonância que o processo deve ter além disso a necessidade de mais de um aparelho elevando o custo do tratamento.

Já foi observado um atraso na cicatrização após osteotomias a laser de CO₂, no modo contínuo (CW), com potências menores que 100 Watts, sendo esta a maior desvantagem de osteotomias a laser e está provavelmente relacionado à extensa necrose paraincisional que ocorre, já que a resposta do tecido à radiação está primariamente relacionada ao calor gerado durante a exposição ao laser e a intensidade e a severidade de reação é em função dos parâmetros da radiação laser, bem como das propriedades físicas e ópticas do tecido.

A resposta fototérmica do tecido depende da temperatura, do conteúdo aquoso e da condição e composição tecidual. O fenômeno da difusão térmica dentro dos tecidos durante a irradiação a laser, pode resultar em dano colateral suficiente para reproduzir áreas adjacentes de osso inviável, podendo levar a reabsorção do osso mediada por células ou a manifestações de seqüestro ósseo e as chances de reações teciduais adversas aumentarem com a elevação da densidade de energia e da absorção pelo tecido alvo e adjacente a ele.

De acordo com *Verschueren et al. (1975)* as causas da necrose são duas:

- Necrose na primeira camada, cerca de 50 μm de espessura, é devida à absorção direta da energia infravermelha da radiação laser, contendo espaços vazios pela formação de vapor e as células nesta área parecem ser desvitalizadas;
- Além desta primeira camada de necrose permanece uma zona de dano térmico devido à condução de calor, pois enquanto a vaporização tecidual com o laser ocorre, o efeito termostático de aquecimento mantém a temperatura da margem da cratera em aproximadamente 100° C.

Capítulo 5

Objetivos

O objetivo do nosso trabalho é analisar através da microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura, os efeitos da radiação laser de CO₂ no tecido ósseo de tíbia de *Rattus novegicus*, Wistar, in vivo, utilizando duas potências, 2 e 4 W.

Acompanhar os efeitos físicos ocorridos no tecido ósseo e a sua reparação tecidual através da microscopia óptica em intervalos de uma, duas, três e quatro semanas.

A opção de se trabalhar com duas potências diferentes foi elaborada para podermos ter maiores parâmetros de análise e averiguar se com o aumento da potência, haveria diferença em relação aos efeitos produzidos no tecido por nós pesquisados.

Capítulo 6

Materiais e Métodos

Após ter sido aprovado este protocolo pelo comitê de Ética em Pesquisa Local (processo 011/98) utilizamos 11 *Rattus norvegicus albinus*, *Wistar*, fêmeas, adultos, com peso médio de 280 gramas.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 2 grupos. Na primeira fase do estudo, separados em gaiolas, com quatro ratos em cada, alimentados com ração granulada e água “*ad libitum*” e mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – Unesp.

Os animais de ambos os grupos foram submetidos à anestesia intraperitoneal com uma solução de *Rompun / Francotar* na proporção de 2:1 respectivamente, na dose de 0.1 ml / 100 g, de peso. Depois de realizada a tricotomia na região da tíbia direita, de forma manual, uma incisão foi realizada com bisturi *bard packer* nº3 e lâmina 15, com aproximadamente 3 cm de extensão. O tecido foi então divulsionado em planos até ampla exposição do tecido ósseo.

Utilizando um aparelho laser de CO₂ da *SHARPLAN 15F* – Israel - (FAPESP), com potência de 1 a 15 W, escolhemos as potências de 2 e 4 W e os animais dos grupos I e II foram irradiados em modo contínuo utilizando um spot de 0.6 mm e com um comprimento de onda de 10.600 nm, sem irrigação no sentido do longo eixo da tíbia com distância focal de um centímetro. O tempo aproximado de todas as aplicações foi de um segundo e o sistema de entrega utilizado foi via *hollow fiber*.

Todas as pessoas que estavam presentes ao experimento usavam óculos de proteção e máscara, sendo todo o processo realizado sob aspiração constante (vide figura 11).



Figura 11. Aparelho Laser de CO₂ com potência de 1 a 15 W, modelo Sharplan 15F, utilizado no trabalho.

Após a irradiação, um animal de cada grupo foi respectivamente sacrificado por trauma induzido no crânio, forma essa escolhida por trazer menor angustia ao animal. A peça irradiada foi então separada e acondicionada em vidros vedados com soro fisiológico a 0.9%, sendo os demais suturados com mononylon 5-0 estéril, e devolvidos às suas gaiolas.

As peças dos animais imediatamente sacrificados foram primeiramente encaminhadas à microscopia óptica e observados com aumento de 50 e 100 vezes. Em seguida foram desidratadas em seqüências de álcool sendo 20 minutos para concentrações de 25%, 50% e 75%, 30 minutos para concentração de 90% e uma hora para concentração de 100%.

Após o término da desidratação as amostras foram encaminhadas à metalização e posterior avaliação em microscopia eletrônica de varredura, com aumentos de 20 e 500 vezes. Esse processo ocorreu em 72 horas.

As demais cobaias foram sacrificadas em intervalos regulares de sete em sete dias até o período de 28 dias.

O processo de sacrifício das cobaias e obtenção do espécime foi repetido e as amostras foram encaminhadas à microscopia óptica com intuito de se observar à redução da área carbonizada.

Todas as amostras apresentavam tamanho aproximado de 15mm (vide figura12).

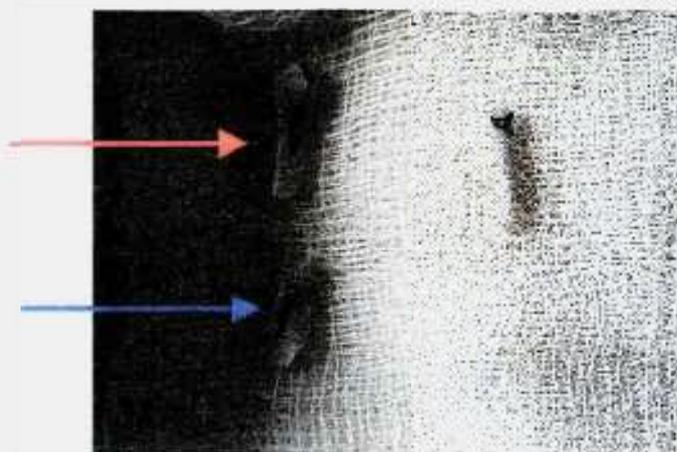


Figura 12. Amostras irradiadas com 2 W (seta vermelha) e 4 W (seta azul) foram selecionadas pela microscopia óptica para posterior observação em M.E.V.

Ao serem analisadas em M.O. observamos áreas esbranquiçadas sugerindo resolidificação que foram confirmadas pela M.E.V. com seus respectivos aumentos (vide figuras 13, 16, 17, 18, 19). .

Sendo assim, repetimos o procedimento anestésico, de obtenção da amostra e dessa vez induzimos uma secção total na tíbia, separando totalmente os fragmentos. Em seguida reaproximamos os fragmentos e vaporizamos com 4 W de potência e observamos que os fragmentos se sustentavam *per si* (vide figura 20).

Testamos a mesma metodologia com ossos frescos de galinha, por apresentarem um peso específico maior, e irradiamos com 10 W por aproximadamente 3 segundos em toda seu perímetro. Visualmente o efeito mecânico se confirmou (vide figuras 22, 23).

Capítulo 7

Resultados

Os resultados das aplicações do laser de CO₂, com 2 e 4 W de potência foram analisados em microscopia óptica e demonstraram três áreas bem definidas, desde a primeira observação, sendo elas: ablação, resolidificação e carbonização. Com o passar dos períodos de 7 dias de observação de nosso trabalho, ocorreu uma progressiva diminuição na área de carbonização, sobre a superfície cortical do tecido ósseo, indicando que a reparação estava ocorrendo, sem sinais de morbidade (vide figuras 13 e 14).

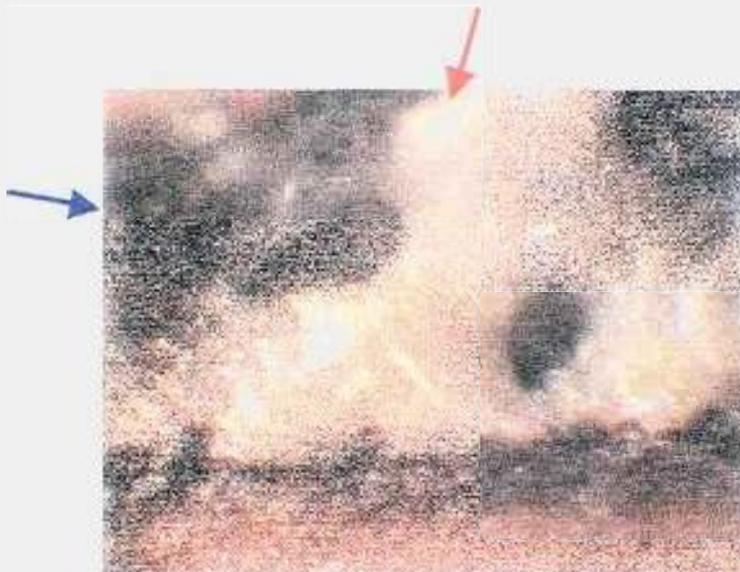


Figura 13. Tecido Ósseo logo após a irradiação com 2 W.(100 x de aumento). A seta vermelha indica a região de resolidificação. A seta azul indica a região de carbonização. As regiões escuras centrais de forma arredondadas demonstram áreas de cavitação devido à ablação.



Figura 14. Tecido ósseo com 21 dias após a irradiação com 2W. Nota-se uma diminuição da área de carbonização (100x de aumento).

Quando dá observação de topo, com o espécime em vista longitudinal, observamos que com 4 W de potência logo abaixo do soalho do tecido irradiado, (setas amarelas) uma região morfológica bastante alterada estendendo-se até o osso medular (setas amarelas). Em menores potências o dano térmico foi sempre menor (vide figura 15).

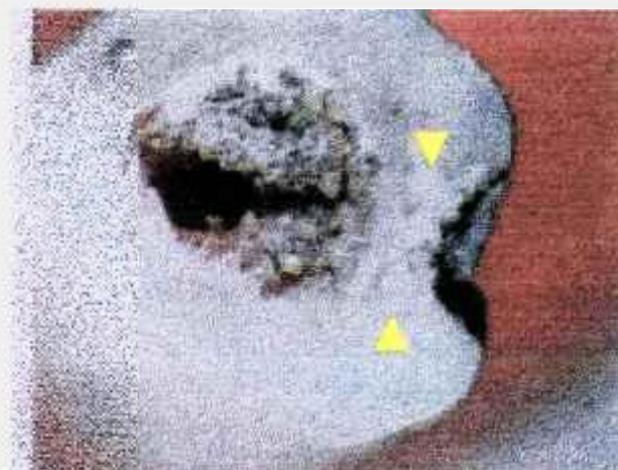


Figura 15. Amostra com 14 dias pós-irradiação com 16x de aumento

As amostras imediatamente depois de irradiadas, também foram levadas à análise em microscopia eletrônica de varredura, onde pudemos corroborar os resultados da microscopia óptica, ficando evidente as três áreas já anteriormente citadas à medida que caminhamos para maiores aumentos (vide figura 16).

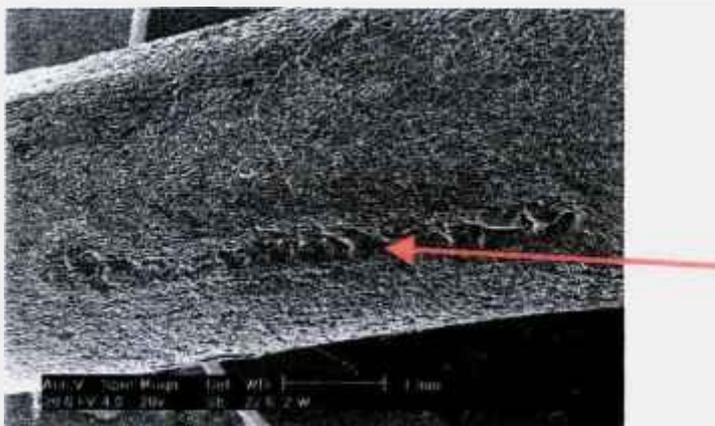


Figura 16. M.E.V. com 2 W, imediatamente após a irradiação (20 x de aumento). Seta vermelha mostra área de resolidificação.



Figura 17. M.E.V. com 4 W de potência imediatamente após (12 x de aumento). Seta vermelha mostra área de resolidificação.

Com aumento de 500 vezes observamos também uma quarta área com trincas produzidas pelo aquecimento tanto com 2 como com 4 Watts. Já com 4 Watts pudemos observar mais nitidamente regiões com superfície nitidamente mais suaves, características de resolidificação conjunta, (forma de gotas) sugerindo a coalescência do tecido quando do seu resfriamento. (Figuras 18 e 19)

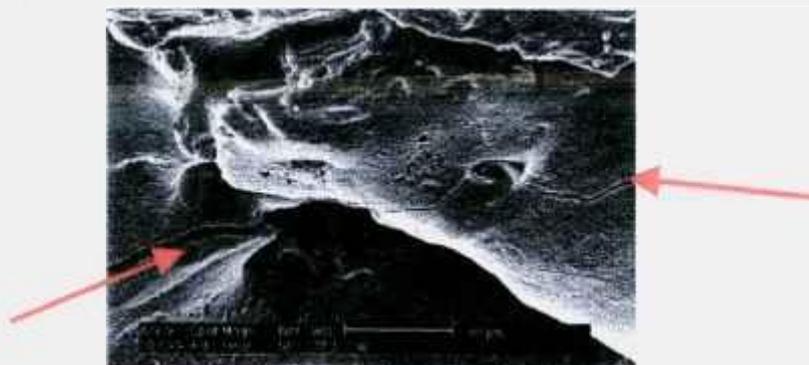


Figura 18. M.E.V. da superfície irradiada com laser de CO₂ (2 W , 500 x de aumento). As setas mostram as trincas promovidas pelo calor.

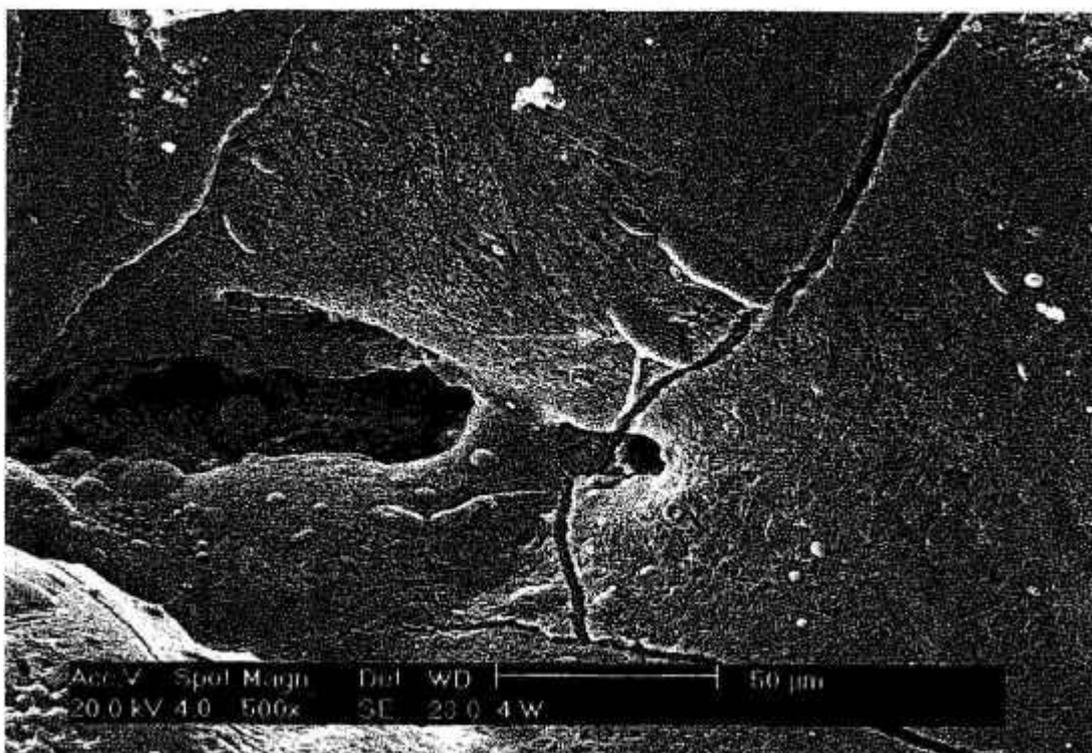


Figura 19. M.E.V. da superfície irradiada com laser de CO₂ (4W, 500 x de aumento). As setas mostram as formas de gotas, características de coalescência do tecido ósseo. A seta azul mostra uma gota se sobrepondo à zona de trinca.

A figura 20 demonstra os resultados da aplicação do laser de CO₂ em um tecido ósseo previamente dividido com serra, sendo reaproximado os cotos e irradiados com 4 W de potência. Os cotos se mantiveram *per si*.



Figura 20. Fotografia mostrando união dos cotos após irradiação com laser de CO₂ (4W de potência).

A figura 21 mostra a M.E.V. do tecido irradiado onde se observa pequenas áreas superficiais de resolidificação e união entre os cotos.

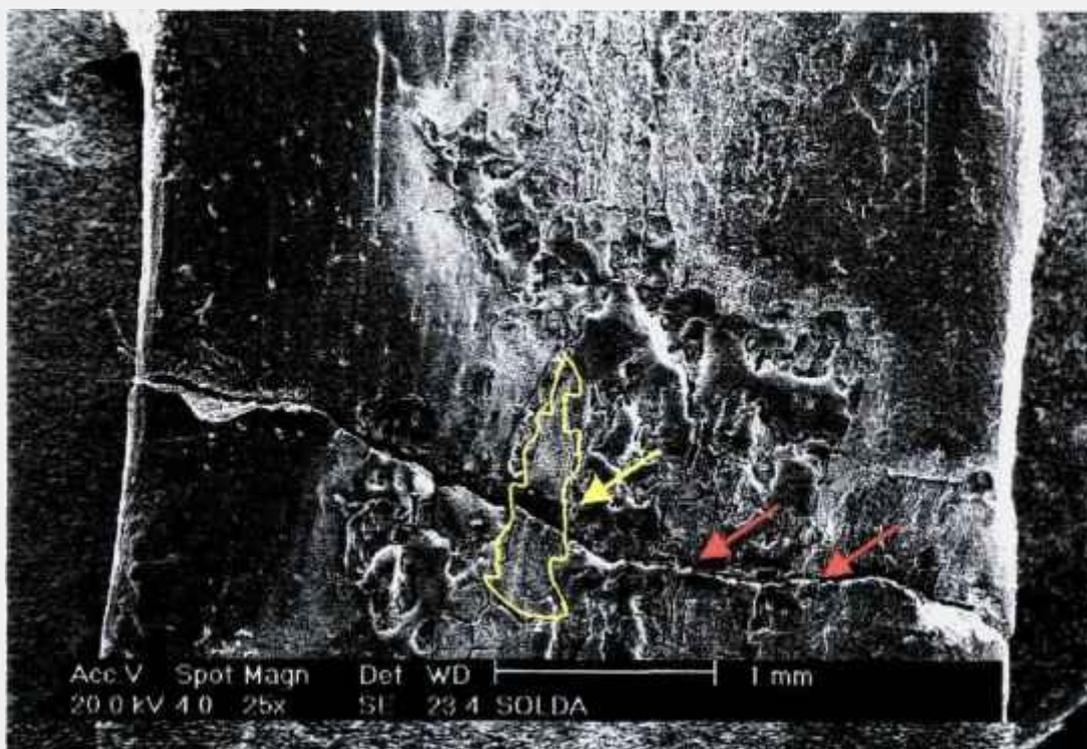


Figura 21. M.E.V. da superfície irradiada com laser de CO₂, com potência de 4 W. As setas vermelhas mostram regiões resolidificadas; as duas da direita mostram resolidificação com superposição entre os cotos; a seta amarela mostra uma região resolidificada (contorno indicado pela linha amarela) com fratura na região de separação.

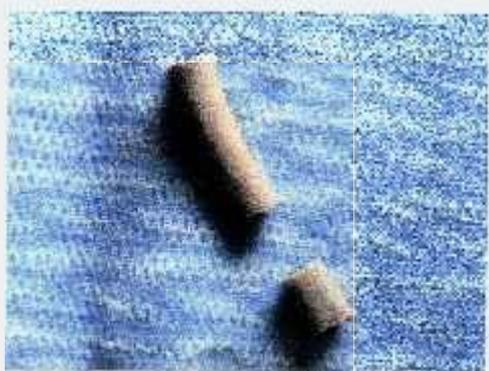


Figura 22. Fotografia mostrando separação total em osso fresco de galinha.



Figura 23. Fotografia mostrando união dos cotos após irradiação com 10 W.

Capítulo 8

Discussão

Na microscopia óptica imediatamente após a irradiação do tecido ósseo com laser de CO₂, observamos três zonas bem definidas, sendo elas:

- uma área de defeito ósseo, sugerindo que o tecido foi ablacionado;
- uma área esbranquiçada adjacente à área anterior, sugerindo resolidificação;
- uma área enegrecida (carbonizada) localizada nas adjacências da área resolidificada e nas margens do defeito ocorrido no tecido ósseo.

Esses efeitos são comuns às aplicações de 2 e 4 W.

O aparecimento de regiões carbonizadas se dá pela alta temperatura ocorrida na superfície do tecido ósseo, devido à sua absorção do laser de CO₂ (vide figura 8).

O tecido ósseo é rico em H-A e apresenta um baixo teor de água, sendo que estes dois cromóforos são bons absorvedores do comprimento de onda por nós utilizados. Para este comprimento de onda o coeficiente de absorção é de 10^5 cm^{-1} , o que nos dá uma profundidade de penetração óptica de aproximadamente $1 \mu\text{m}$ (vide exp. 2). Isto significa que nesta profundidade, 63% da energia do laser é absorvida, ficando concentrada na superfície. Devido a este fato, a grande elevação de temperatura produz a ablação (vide figura 13) e dissociação das moléculas orgânicas, formando complexos de carbono com aparência enegrecida (carbonização), conforme visto na figura 13. Portanto, há uma necrose evidenciada claramente pela camada carbonizada.

A região de alta temperatura, porém, se propaga de forma gradual para o interior do tecido, produzindo a evaporação dos compostos orgânicos mais voláteis, o que leva a formação de vapor com conseqüente aparecimento de espaços vazios e células remanescentes desvitalizadas. Estas observações estão de acordo com os resultados de *Verscheren et al*, em 1975 e também com os resultados de *Clayman et al* em 1978.

Apesar de haver claramente necrose superficial evidenciada pela carbonização, não houve necrose definitiva e nem óbito em nenhum dos espécimes durante o período em que a pesquisa se realizou.

O que notamos foi que no prazo máximo de observação (28 dias), a região de necrose havia sido reduzida em relação aos resultados obtidos imediatamente após a irradiação (vide figuras 13 e 14).

Á utilização do laser de CO₂ em casos clínicos de osteomielite crônica (*Ceballos et al, 1997*) demonstrou ser um excelente coadjuvante, apresentando 56% de sucesso em seres humanos, com uma única aplicação, viabilizando-o no tratamento destas patologias. Além disso, os autores concluíram que o fator temperatura era um agente antibiótico potente, promovendo assim a desinfecção do campo, o que justificaria a ausência de sinais flogísticos de infecção em nossas amostras. O laser também diminui o trauma induzido pela ausência de contato como o que acontece com qualquer outro instrumento utilizado nesses casos, reduzindo assim o risco de fraturas. O autor ainda cita áreas de resolidificação, as quais obliteram a superfície do tecido ósseo, diminuindo assim o risco de recidiva das lesões, achado este que se assemelha ao nosso (vide figuras 16 e 17).

O tecido ósseo difere dos demais tecidos não só na sua estrutura físico-química como também na sua extraordinária capacidade de remodelação e de regeneração durante todo o período pós-fetal. Esta habilidade inata do tecido ósseo de se remodelar e de se regenerar ao longo da vida tem sido atribuída tanto a proliferação das células osteoprogenitoras, como também da indução da proliferação e diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas (*Cormack 1991*). Essa característica confere ao tecido ósseo a capacidade de se reparar, mesmo sofrendo danos térmicos provenientes da exposição a altas temperaturas, provocadas pela interação do laser de CO₂. Qual desses sistemas celulares responde pelas atividades de regeneração e remodelação óssea induzida, permanece ainda um assunto controvertido (*Gomes, F.M., 2000*).

O processo de cicatrização das feridas ósseas produzidas pelo laser de CO₂ no tecido ósseo ocorre mais lentamente quando comparado às feridas ósseas produzidas por brocas ou serras, devido à presença da área de carbonização e possível dano à distância, produzido pelo calor propagado no tecido ósseo medular. Porém é sabido que no período de 4 semanas, ambos se encontram em condições de igualdade, apresentando a formação de um tecido osteóide (*Clayman et al, 1978/ Friesen et al, 1999*).

Comparando os efeitos dos lasers de CO₂, Nd: YAG, Er: YAG, com e sem refrigeração, nas superfícies radiculares de elementos dentais recém-extraídos, *Israel et al* em 1997 concluíram que para o laser de CO₂, a alteração morfológica está diretamente relacionada à potência utilizada e a ausência de refrigeração. Foram observadas áreas de cavitação, áreas de fusão e resolidificação mineral e uma camada superficial carbonizada. Esse trabalho é citado pelo fato do tecido radicular ser um tecido abundante em H-A e pobre em água, assemelhando-se nesse aspecto ao tecido ósseo.

Isso nos levou a pensar que se houve resolidificação é porque houve anteriormente um processo de fusão em função do calor gerado na superfície óssea. Não sendo observado dano térmico definitivo em nenhum dos espécimes, mesmo trabalhando-se sem refrigeração, esse mecanismo poderia fundir as superfícies ósseas fraturadas de forma a apresentar certa estabilidade. As áreas de resolidificação observadas por nós também foram observadas por outros autores (*Pinheiro em 1992/ Israel et al, 1997*).

Porém, quando da observação da superfície subjacente à área de ablação do tecido, observamos, tanto com 2 e 4 W de potência sem refrigeração, uma maior uniformidade na área de resolidificação (vide figuras 16, 17, 18 e 19).

Observamos também que a potência de 4 W demonstrou uma superfície resolidificada mais uniforme quando comparada à de 2 W.

Utilizando o laser de CO₂ com 4 W em dois cotos ósseos confrontados e analisados com o M.E.V.(vide figura 20), observamos regiões de resolidificação já vistas nas figuras 18 e 19. Percebemos que em algumas pequenas regiões (vide figura 20) havia união dos cotos, apresentando uma certa estabilidade. De fato, estes espécimes submetidos ao laser de CO₂ não apresentavam nem reentrâncias e nem saliências que justificassem um acoplamento mecânico *per si*, pois suas superfícies foram preparadas com serra e separadas totalmente. Após a irradiação pelo laser até o espécime ser levado à M.E.V., a peça se autosustentou íntegra, o que só pode ser explicado pela região unida pelo laser, como de fato observamos na análise superficial em M.E.V.

Uma foto deste espécime consolidado é mostrada na figura 21, onde se observa os cotos já unidos.

Como complemento a esta sucessão de experimentos, mostramos um processo semelhante realizado com ossos frescos de galinhas, separado por serra, confrontados e irradiados com laser de CO₂ e potência de 10 W, onde se vê claramente que há consolidação, pois o espécime apresenta capacidade de sustentação de uma das partes (vide figuras 22 e 23).

Esses resultados não foram antes descritos na literatura, sendo esse um passo inicial na busca de mais uma alternativa de se estabilizar fraturas e enxertos ósseos.

Com a utilização de dois cotos reaproximados, pudemos verificar pequenas áreas de resolidificação comum aos dois, o que produziu uma união parcial superficial, entre eles, com características mecânicas suficientes para autosustentação, promovendo uma certa estabilidade na união. Este fato não foi reportado na literatura e abre uma nova possibilidade de uso do laser c.w. de CO₂ em cirurgias de tecido duro, pois a consolidação óssea parcial de fraturas, aliada ao efeito conhecido da desinfecção do campo, pode ter usos clínicos bem indicados, como em regiões onde a ação muscular é ausente.

Capítulo 9

Conclusões

De acordo com a metodologia utilizada e os resultados obtidos, julgamos poder concluir que:

1. Nas potências utilizadas (2 e 4 W) observamos as quatro áreas afetadas pela exposição ao laser: cavitação decorrente de ablação, resolidificação superficial nas camadas superficiais, trincas decorrentes de diferentes temperaturas quando da aplicação do laser e carbonização.
2. Observamos que a região carbonizada foi regenerada ao longo dos períodos de observação (até 28 dias) com ausência de morbidade, mostrando que o dano térmico causado não foi suficiente para evitar a reparação tecidual. Portanto, as células osteoprogenitoras adjacentes à área irradiada pelo laser foram preservadas de forma a possibilitar a reparação tecidual;
3. Observamos áreas de resolidificação superficiais em quase toda a área irradiada pelo laser, tanto com 2 como com 4 W. Uma fração importante da energia do laser é utilizada para fundir a superfície óssea e esta por sua vez se resolidifica em regiões extensas, claramente observadas nas análises ópticas e por M.E.V.
4. Observamos a presença de trincas superficiais, decorrentes dos gradientes térmicos ocorridos na irradiação do laser, que devem ser evitadas se procuramos uso em união de partes. Estas trincas se devem a procedimentos que merecem estudos mais aprofundados para minimiza-las.

Proposta para futuros trabalhos:

No sentido de viabilizar o uso do laser em consolidação óssea, propomos para trabalhos futuros:

- Analisar a profundidade e a extensão com que o tecido ósseo se resolidificada;
- Padronizar tempo de aplicação, correlacionando o volume da região resolidificada comum à densidade de energia aplicada;
- Realizar testes de tração para se averiguar o grau de resistência mecânica atingida;
- Determinar o intervalo de potências e tempos (densidades de energia) para esta aplicação.

Summary

The morphological effects of CO₂ laser irradiation of tibia bones of *rattus novogicus*, wistars, were studied by optical and electron scanning microscopy. Laser powers of 2 and 4 W were used *in vivo* and the specimens were sacrificed in 5 different periods: immediately after the exposure and one, two three and four weeks after that. By the optical microscopy, it was possible to identify carbonized zones, present in the two powers used, which showed a progressive reduction in size, along the observation period. No morbity was observed in all specimens, what led one to conclude that the thermal load imposed by the laser irradiation did not impair the tissue reparation, duration the observation period. In all cases, an extent region of superficial resolidification was observed by electron scanning microscopy, followed by small fractures and zones ablation. One tibia bone was divided by a cutting saw, the pieces were closely joined, and the CO₂ laser was applied in the separation zone. First, it was observed that the two pieces, before the laser application, could not sustain each other. After the laser irradiation, the pieces were kept unified *per si*. Analyzing the morphological structure of the surface by electron scanning microscopy, small areas of common melted material were seen, showing small welded parts, enough to maintain the pieces together.

REFERÊNCIAS

- 1 ALLEN, M.G.W.; ADRIAN, C.J.C. **Effects of carbon Dioxide Laser Radiation on Bone: Na Initial Report.** Military Medicine, v 146, p.120-123, 1981.
- 2 BAILIN, P.L.; WHEELAND, R.G. **Carbon Dioxide(CO₂) Laser Perforation of Exposed Cranial Bone to Stimulate Granulation Tissue,** Plastic and Reconstructive Surgery, p. 898-902, 1984.
- 3 CEBALLOS, A M.D. PHD., BALMASEDA, R. M.D., PUENTE, R. M.D. AND PEDROSO, M. M.D. **CO₂ Laser Surgery in Osteomyelitis.** Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery, V, 15, p 221-223. , 1997.
- 4 CECCHINI, S.C.M. **Estudo das Aplicações do laser de HÓLMIO: YLF em Esmalte e Dentina, Visando a Realização de Cirurgia de Acesso Endodôntico e Preparo Cavitário.** Dissertação de Mestrado na Área de Ciências de Tecnologia Nuclear, IPEN/USP, 1995.
- 5 CLAUSER, C. **Comparison of depth and Profile of Osteotomies Performed by Rapid Superpulsed and continuous-wave CO₂ laser beams at high poweroutput.** J Oral Maxillofac Surg, V. 44, p. 425-430, 1986.
- 6 CLAYMAN, L.; FULLER, T.; BECKMAN, H. **Healing of continuous-wave and rapid superpulsed, carbon dioxide laser, laser induce bone defects.** J Oral Surg, V. 36, p. 932-937, 1978.
- 7 COLVARD, M.D.; PICK, R. M. **Future directions of lasers in dental medicine.** Current Science, p.144-150, 1993.
- 8 DUARTE, A C.; NAKAE K.; ARAUJO, S. N.; LASCALA, T. N. **Estudo dos efeitos biológicos do raio laser de CO₂ sobre tecidos gengivais de ratos.** Revista Paulista de Odontologia, V. 5, p. 50-55, 1984.
- 9 EINSTEIN, A .**ON THE QUANTUM THEORY OF RADIATION.** B.L. van der Waerden, Sources of Quantum Mechanics, Amsterdam, North-Holland Publishing Co, New York: Dover 1967.
- 10 FABRIKANT, V. A. Moscou: Universidade de Moscou, 1940, Tese (Doutorado em Física) – Universidade de Moscou, 1940, apud GARAVAGLIA, M. **El Láser.** La Plata: Programa regional de Desarrollo Científico y Tecnológico de la OEA, 1976, 118p. (Série de Física, n.12).
- 11 FISHER, S. E.; FRAME, J. W. **The Effects of the Carbon Dioxide Surgical Laser on Oral Tissues,** Br. J. Oral Maxillofac, V. 22, p. 414-425, 1984.

- 12 FRIESEN, L.N. ET. AL. **Laser Irradiation of Bone: II Healing Response Following Treatment by CO₂ and Nd:YAG Lasers**, J. Periodontol, V. 70, p. 75-83, 1999.
- 13 GARG, A. K. **Estrutura Óssea, metabolismo e fisiologia: Seu impacto na implantodontia**, BC I, V. 5, p. 69-79, 1998.
- 14 ISRAEL, M.; COBB, C. W.; ROSSMANN, J. A.; SPENCER, P. **The Effects of CO₂, Nd:YAG and Er:yag lasers with and without surface coolant on tooth root surfaces – An in vitro study**. Universit Missouri, Schdent, Dept Periodont, Kansas City, Mo 64108
- 15 JUNQUEIRA e CARNEIRO, **Histologia Básica, quarta edição**. Editora Guanabara Koogan, 1983.
- 16 JUNQUEIRA e CARNEIRO. **Biologia Celular e Molecular, terceira edição**, Editora Guanabara Koogan, 1983.
- 17 KRAUSE, L.S.; COBB, C.M.; RAPLEY, J.W.; KILLOR, W.J.; SPENCER, P. **Laser Irradiation of Bone. I. An In Vitro study Concerning the Effects of the CO₂ laser on Oral Mucosa and Subjacent Bone**. J. Periodontol, V. 68 , p. 872-880, 1997.
- 18 LENHNERT, M. W. **Lasers in Medicine and Dentistry**. Northwest Dentistry, p. 17-22, 1996.
- 19 LI, Z. Z.; REINISCH, L.; MERWE, W.P.V. **Bone Ablation with Er:YAG and CO₂ Laser: Study of Thermal and Acoustic Effects**. Lasers in Surgery and Medicine, V. 12, p.79-85, 1992.
- 20 MAIMAN, T. H. **Stimulated Optical Radiation in Ruby**. Nature, V. 187, p.493-494, 1960.
- 21 NAKAMURA, Y.; HOSSAIN, M. WATANABE, H.; TOKONABE, H.; MATSUMOTO, N. MATSUMOTO, K. **A Study on the Morfological Changes of the Rat Mandibular Bone with TEA CO₂ Laser**, Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery, V. 17, p.211-215, 1999.
- 22 NICCOLI-FILHO, W., FURLANI, J.C.; SCHWAB, C.; RALDI, F. V. EDUARDO, C.P. **Intrapulpar temperature during continous CO₂ laser in human molars: in vitro study**. J. Laser Applic, v.9, p. 291-94, 1997.
- 23 PANZONI, E., CLAUSER, C. **II laser CO₂ come strumento per osteotomie**. Rev Ital Stomatol, v. 1, p. 793-799, 1981.
- 24 PINHEIRO, A. L. B., **Uso do Laser de CO₂ em Ortopedia**. Rev. Bras. Méd. V.49, p. 238-244, 1992.
- 25 PINHEIRO A. L. B. **Tratamento de tumores de células gigantes do osso com laser de dióxido de carbono: uma real possibilidade?** Rev. Bras. Méd. V 49, p.84-88, 1992.

- 26 RAYAN,G.M.; STANFIELD,T.; CAHILL,S.; KOSANKE,S.D.; KOPTA,J.A. **Effects of Rapid Pulsed CO₂ Laser Beam on Cortical Bone In Vivo.** Lasers in Surgery and Medicine, p. 616-620, 1992.
- 27 ROMANOS, G.; SIAR,C.H.; NG,K.TOH,C.G. **A Preliminar Study of Healing of Superpulsed Carbon Dioxide Laser Incisions in the Hard Palate of Monkeys.** Lasers in Surgery and Medicine, V. 24, p.368-374, 1999.
- 28 SCHAWLOW, A. L.; TOWNES, C. H. **Infrared and Optical Masers.** Phys. Rev. V. 112, p. 33-42, 1958.
- 29 SHERK, H. H.; LANE, G.; RHODES, A.;BLACK, J. **Carbon Dioxide laser removal of polymethylmethacrylate.** Clin Orthop, V. 310, p. 67-71, 1995.
- 30 SMALL, I.A. ; OSBORN, T. P.; FULLER, T.; HUSSAIN , M.; KOBERNICK, S. **Observations of carbon Dioxide laser and bone bur in the osteotomy of the rabbit tibia.** J Oral Surg, v. 37, p. 159-66, 1979.
- 31 SMITH, C. F.;JOHANSEN, W. E.;VANGNESS,C.T.; SUTTER, L.V. and MARSHALL, G.J. **The Carbon Dioxide Laser. A Potenetial Tool for Orthopedic Surgery.** Clinical Orthopedics and Related Research, V. 242, p.43-50, 1989.
- 32 SPENCER, P.; COBB,C.M.; WIELICZKA,D.M.; GLAROS.A.G.; MORRIS, P. J. **Change in Temperature of Subjacent Bone During Soft Tissue Laser Ablation.** J. Periodontal, V. 69, p. 1278-1282, 1998.
- 33 VANGSNESS, C. T.; SMITH, C.F.; MARSHALL, G. J.; SWEENEY.J.R.,;PA and JOHANSEN,E. **The Biological Effects of carbon Dioxide Laser Surgery on Rabbit Articular Cartilage.** Clinical Orthopaedics and Related Research, V. 310 p.48-51, 1995.
- 34 VERSCHUEREN, R. C.; KOUDSTAAL, J.; OLDHOFF, J. **The carbon dioxide laser some possibilities in surgery.** Acta Chir. Belg, v. 74, p. 197-204, 1975.
- 35 YOUNG M. **Óptica e Lasers**, Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
- 36 WATANABE, F.; TAWADA, Y.; KOMATSU, S.; HATA, Y. **Heat Distribution in Bone During Preparation of Implant Sites: Heat Análisis by Real-Time Thermography.** The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants, V. 7, p. 212-219, 1992.
- 37 WILLIAMS, T. M., COBB, C. M., RAPLEY, J. W., KILLOY, W. J. **Histologic Evaluation of Alveolar Bone Following CO₂ Laser Removal of Connective Tissue from periodontal Defects.** The International Journal of Periodontics and Restorative Dentrity V. 15, p. 497-503, 1995.

Apêndice 1

Normas de Segurança

O órgão responsável pela regulamentação e fiscalização dos aparelhos lasers é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, (ANVS) criada em 26 de janeiro de 1999.

Com esse fim, a mesma publica em 31 de agosto de 1999 a resolução 444, que determina o registro compulsório de equipamentos eletromédicos de médio e alto risco, conforme definidos e classificados na portaria 2.043, de 12 de dezembro de 1994, do Ministério da Saúde. Assim a comercialização (fabricação e importação) de equipamentos eletromédicos a laser de médio e alto risco fica sujeita ao registro na ANVS.

A solicitação do registro a ANVS (pelo fabricante ou importados) deve conter, além de outros itens, uma cópia do Certificado de Conformidade, emitido por organismo de certificação credenciado no âmbito do Sistema Brasileiro de Certificação (SBC).

A Resolução 444 adota a Norma Técnica Brasileira NBR IEC 60601.1 e a série NBR IEC 60601.2 para estabelecer os requisitos de Segurança e Qualidade, ou seja, os aparelhos eletromédicos a laser comercializados no Brasil devem estar em conformidade com as Normas Técnicas NBR IEC 60601.1, NBR IEC 601.2.22 e colaterais, sendo que a Norma Técnica NBR IEC 61.2.22 é estruturada fundamentalmente na Norma Técnica Internacional IEC 60825-1:1993.

Os aparelhos lasers de acordo com a potência gerada são classificados em 5 grupos, sendo eles classe 1, classe 2, classe 3^a, classe 3b e classe 4.

Os aparelhos classe 1 são lasers menos potentes e considerados sem perigo a menos que modificações tenham sido realizadas no equipamento. A potência gerada nunca atinge a MPE (*Maximum Permissible Exposition*) para os olhos.

Os aparelhos classe 2 são os lasers de baixa potência e somente considerados um perigo se alguém intencionalmente olhar diretamente para o feixe. Em casos acidentais e de rápida exposição o próprio reflexo pupilar protege os olhos. Geram no máximo 1mW CW.

Os aparelhos classe 3a são os lasers de média potência e somente constituem um perigo ocular se a luz laser for coletada e focalizada pelo olho. Geram no máximo 5mW CW.

Os aparelhos classe 3b são os lasers de média potência e somente constituem um perigo ao olho se visto diretamente.

Os aparelhos classe 4 são os lasers de alta potência e que podem causar dano ocular tanto quando dá exposição direta como também quando dá reflexão difusa ou especular. Essa classe de laser também pode causar dano á pele e provocar fogo.

Sendo assim, medidas de segurança devem ser adotadas para se minimizar ou até mesmo evitar que acidentes ocorram, pois na área Odontológica nós trabalhamos tanto com lasers de baixa potência como com lasers de alta potência, dentre elas:

- protetores oculares respectivos para o comprimento de onda gerado pelo laser;
- evitar a utilização de materiais reflexivos, para se evitar danos a distância;
- evitar de se trabalhar com materiais inflamáveis;
- uso de bomba de sucção de alta potência para evitar a inalação de sub-produtos provenientes da vaporização tecidual;
- utilização de mascaras;
- utilização de placas de segurança externa ao ambiente de trabalho com o laser;
- ambiente apropriado;
- utilização de *interlocks* nas portas de acesso ao ambiente de trabalho com laser.