



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**EFEITOS DA RADIAÇÃO LASER EM BAIXA INTENSIDADE
NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO ÓSSEA EM DEFEITOS
ENXERTADOS COM OSSO BOVINO E MEMBRANA DE
COLÁGENO REABSORVÍVEL: ESTUDO “*IN VIVO*”.**

CLAUDIA C. RIQUELME

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

**Orientador:
Prof. Dr. Edison Puig Maldonado**

**Co-orientadora:
Profa. Dra. Sheila Gouw-Soares**

**São Paulo
2006**

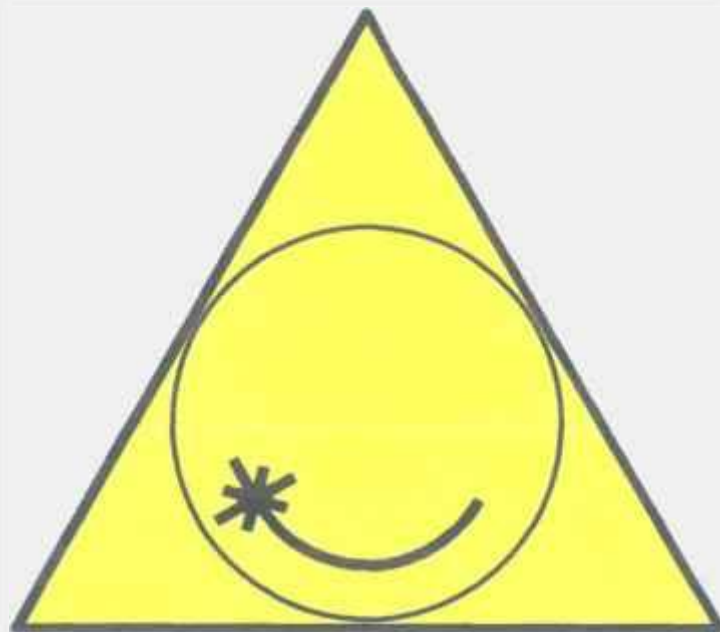


Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MESTRADO PROFISSIONALIZANTE EM LASERS EM
ODONTOLOGIA





INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

**EFEITOS DA RADIAÇÃO LASER EM BAIXA
INTENSIDADE NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO
ÓSSEA EM DEFEITOS ENXERTADOS COM OSSO BOVINO
E MEMBRANA DE COLÁGENO REABSORVÍVEL:
ESTUDO “IN VIVO”.**

Claudia C. Riquelme

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



**Orientador: Prof. Dr.
Edison Puig Maldonado**

**Co-Orientadora: Profa.
Dra. Sheila Gouw-Soares**

São Paulo - 2006



**Faculdade de Odontologia
Universidade de São Paulo**

Aos meus pais Antonio e Ivone, por nunca medirem esforços para ajudar-me a alcançar meus objetivos. Sempre presentes, meus exemplos, minha inspiração.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Edison Puig Maldonado, orientador dessa dissertação, pelo apoio, atenção e ajuda durante todas as etapas do trabalho.

Ao Prof. Dr. Eduardo De Bortoli Groth (i.m.), quem primeiro me incentivou com idéias para o trabalho e na elaboração dos protocolos de irradiação.

À Profa. Dra. Sheila Gouw-Soares, co-orientadora dessa dissertação, por suas sugestões e ajuda.

Ao Prof. Dr. Luiz Antonio Pugliesi Alves de Lima, que disponibilizou seu laboratório, no Departamento de Periodontia da FOUSP, e seus conhecimentos para a realização do processamento histológico dos espécimes, mensurações, análises e interpretação dos resultados.

À Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro, sempre disponível para esclarecer nossas dúvidas.

À Profa. Dra. Denise Maria Zezell, por nos abrir muitas portas para a realização deste experimento.

À Dra. Nanci Nascimento, chefe do biotério do IPEN, que viabilizou a utilização de suas instalações para abrigar os animais e realizar todo o experimento.

Ao amigo cirurgião, Flávio Torezan, que doou todos os animais para este estudo e me ensinou a operá-los, desde o piloto.

Ao meu colega de turma Vladimir Poli, que fotografou as cirurgias.

À Consulmat, empresa que doou o osso bovino utilizado como enxerto neste estudo.

À SIN, empresa que doou os mini-parafusos por nós utilizados.

A Manuel Calisto Lopes da Silva, funcionário do biotério do IPEN, que conteve os animais nos dias das irradiações e deles cuidou com dedicação.

À minha amiga Celey Silveira, que participou ativamente da fase laboratorial do experimento, e me ajudou em todas as outras etapas.

A Luiz Carlos Thomaz Júnior, pelo amor, apoio, compreensão e paciência nos dias difíceis.

À minha secretária Elemar Fialho, por cuidar da parte operacional do experimento, sempre pró-ativa.

À Andréa Malavazi, secretária do Mestrado, por não medir esforços para resolver os imprevistos, sempre prestativa e eficiente.

À minha amiga protesista, Lúcia Morato, por ter me apresentado o laser e me incentivado a fazer o Mestrado.

Ao Prof. Dr. Maurício Machado, por ter me incentivado a fazer o Mestrado Profissionalizante em Laser em Odontologia, nesta Universidade.

A todos os Professores do Mestrado, pelo empenho, competência e amizade.

RESUMO

Este estudo “in vivo” utilizou-se de coelhos para avaliar os efeitos da radiação laser em baixa intensidade, LLLT, no processo de regeneração óssea. Foram realizadas duas perfurações cirúrgicas em cada tíbia dos animais. Posteriormente, essas perfurações foram preenchidas com enxerto ósseo bovino e protegidas com membrana de colágeno reabsorvível. No pós-operatório imediato demos início a LLLT, com laser de diodo de GaAlAs emitindo em 830 nm, com intensidade de $0,1 \text{ W/cm}^2$ e potência de 30 mW. Os parâmetros do laser foram os mesmos para todos os animais, bem como os dias e intervalos das aplicações, realizadas duas vezes por semana. A irradiação foi feita em quatro pontos ao redor de cada perfuração, durante 60 segundos, em contato com a pele e perpendicular a ela. Para cada perfuração, o número total de irradiações foi sorteado, com o intuito de randomizar o estudo, dentre 0, 4, 6 e 8 irradiações. Posteriormente, foram medidas as frações de tecido ósseo na cortical, por processamento e análise histológica.

Do ponto de vista da análise estatística, não houve diferença significativa entre os valores obtidos (médias dos valores de fração de tecido ósseo na cortical) para todos os grupos, o que se considera atribuído ao pequeno número de dados. Entretanto, o grupo com 6 irradiações, ou seja, irradiado por 3 semanas, apresentou o maior valor médio (74%), assim como o menor desvio padrão.

ABSTRACT

In this "in vivo" study, the effect of low-level laser therapy (LLLT) in bone regeneration was evaluated, using rabbits. Two surgical perforations were produced in each animal tibia. Later, they were filled using bovine bone graft protected with absorbable collagen membrane. In the immediate post-surgical, the LLLT using GaAlAs diode laser emitting at 830 nm wavelength, with $0,1 \text{ W/cm}^2$ intensity and power of 30 mW was started. The laser parameters were the same for all animals as well as the applications days and intervals; twice a week. The irradiations were performed at four points around the graft site, 60 seconds, always perpendicular and in contact with the skin. For each site, the total number of irradiation sessions was randomly chosen among zero, four, six and eight. Subsequently, the osseous tissue fractions in the cortical region were measured by histological processing and analysis.

From the statistical view, no difference has occurred among the obtained values (averages of osseous tissue fractions in the cortical region) for all groups, what we believe is due to the small number of data. Nevertheless, the group with six irradiations, i.e., irradiated for three weeks, has the highest average value (74%), as well as the smallest standard deviation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 O tecido ósseo.....	4
3.2 O laser de baixa intensidade.....	7
3.3 LLLT e o processo de cicatrização óssea.....	8
4. METODOLOGIA	11
4.1 O procedimento cirúrgico.....	11
4.2 O protocolo de irradiação.....	14
4.3 A obtenção das peças.....	17
4.4 O processamento histológico.....	18
5. RESULTADOS	21
5.1 Análise estatística.....	21
5.2 Lâmina representativa de cada grupo.....	24
6. DISCUSSÃO	26
7. CONCLUSÕES	31

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 32**LISTA DE ABREVIATURAS**

ATP - Trifosfato de adenosina; éster cuja hidrólise em ésteres semelhantes é acompanhada de liberação de energia.

cm - Centímetro.

cm² - Centímetro quadrado, medida de área.

GaAlAs - Arseneto de gálio e alumínio.

h - Hora(s).

IPEN - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.

J - Joule.

J/cm² - Joule por centímetro quadrado, medida de fluência.

Kg - quilograma.

mg/Kg - Miligramas por quilograma.

mm - Milímetro.

mm² - Milímetro quadrado, medida de área.

MMA - Metilmetacrilato.

mW - Microwatt, medida de potência.

n - Unidade estatística (número de dados).

nm – Nanometro.

RNA-m - ácido ribonucléico mensageiro.

ROG – Regeneração óssea guiada.

s/ponto - Segundos por ponto.

W/cm² - Watts por centímetro quadrado, medida de intensidade.

Watt - Watt, vátio, unidade de potência elétrica igual a um joule por segundo.

λ - Comprimento de onda.

μm - Micrometro.

1. INTRODUÇÃO

A perda de tecido ósseo pode ser resultado de processos patológicos, traumáticos, ou fisiológicos. Nas reabilitações orais essa condição retarda a colocação de implantes dentários osteointegrados. Para viabilizar esse tipo de tratamento, faz-se necessária uma cirurgia pré-protética de enxertia óssea, pois os implantes precisam estar ancorados em tecido ósseo de volume ideal, seja por motivos estéticos e/ou funcionais. Existem inúmeras técnicas e materiais para esse propósito. Nesse estudo, o material de eleição foi o osso bovino inorgânico desmineralizado, que possui potencial osteocondutor, ou seja, funciona como estrutura para a aposição do osso circunjacente. Esse material é classificado como xenoenxerto, ou seja, enxerto fabricado a partir da porção inorgânica dos ossos de animais. Sua matriz óssea remanescente assemelha-se mais ao mineral ósseo natural humano que os materiais aloplásticos, que embora também sejam biocompatíveis, são sintéticos. Além disso, foi demonstrado que os enxertos completamente desmineralizados estimulam mais a formação óssea do que os parcialmente desmineralizados (MISCH, 2000).

O uso desse material não é uma ferramenta nova para melhorar a reparação óssea, pois os primeiros estudos datam de 1889. O osso bovino foi usado primeiramente para o aumento do rebordo alveolar e, posteriormente, nas perdas ósseas associadas às lesões periodontais e periapicais, em defeitos ósseos, como agente hemostático e na “regeneração tecidual guiada”, uma técnica muito usada para corrigir defeitos ósseos periodontais. Quando é usado para corrigir defeitos ósseos que não são de origem periodontal a técnica é chamada de “regeneração óssea guiada” (R.O.G.). Esse osso também é utilizado nas cirurgias para elevação do assoalho do seio maxilar, para ganho de altura na região posterior da maxila, que frequentemente sofre pneumatização, inviabilizando a colocação dos implantes.

1. INTRODUÇÃO

A perda de tecido ósseo pode ser resultado de processos patológicos, traumáticos, ou fisiológicos. Nas reabilitações orais essa condição retarda a colocação de implantes dentários osteointegrados. Para viabilizar esse tipo de tratamento, faz-se necessária uma cirurgia pré-protética de enxertia óssea, pois os implantes precisam estar ancorados em tecido ósseo de volume ideal, seja por motivos estéticos e/ou funcionais. Existem inúmeras técnicas e materiais para esse propósito. Nesse estudo, o material de eleição foi o osso bovino inorgânico desmineralizado, que possui potencial osteocondutor, ou seja, funciona como estrutura para a aposição do osso circunjacente. Esse material é classificado como xenoenxerto, ou seja, enxerto fabricado a partir da porção inorgânica dos ossos de animais. Sua matriz óssea remanescente assemelha-se mais ao mineral ósseo natural humano que os materiais aloplásticos, que embora também sejam biocompatíveis, são sintéticos. Além disso, foi demonstrado que os enxertos completamente desmineralizados estimulam mais a formação óssea do que os parcialmente desmineralizados (MISCH, 2000).

O uso desse material não é uma ferramenta nova para melhorar a reparação óssea, pois os primeiros estudos datam de 1889. O osso bovino foi usado primeiramente para o aumento do rebordo alveolar e, posteriormente, nas perdas ósseas associadas às lesões periodontais e periapicais, em defeitos ósseos, como agente hemostático e na “regeneração tecidual guiada”, uma técnica muito usada para corrigir defeitos ósseos periodontais. Quando é usado para corrigir defeitos ósseos que não são de origem periodontal a técnica é chamada de “regeneração óssea guiada” (R.O.G.). Esse osso também é utilizado nas cirurgias para elevação do assoalho do seio maxilar, para ganho de altura na região posterior da maxila, que frequentemente sofre pneumatização, inviabilizando a colocação dos implantes.

Esse tipo de enxerto deve sempre estar protegido por uma barreira mecânica seletiva, para que não haja invasão das células epiteliais antes que o novo osso tenha se formado na região desejada. A barreira utilizada nesse estudo foi a membrana de colágeno reabsorvível.

Atualmente, todos os esforços dos reabilitadores orais estão direcionados na otimização do tempo dos tratamentos, ou seja, a meta é finalizar o tratamento o mais rápido possível, para satisfação do profissional e principalmente, do paciente.

Paralelamente, outros avanços tecnológicos e científicos levaram ao desenvolvimento dos lasers. Os lasers tem sido muito usados em medicina e em odontologia desde o desenvolvimento do laser de rubi por Maiman, em 1960. Existem vários tipos de lasers, que são usados de diversas maneiras, com diferentes aplicações. A terapia com laser em baixa intensidade (LILT), mostrou-se capaz de modular vários processos em diferentes sistemas biológicos. Os efeitos dessa terapia estão sendo estudados nos processos de reparação óssea pós-trauma, nas feridas de pele, no sistema nervoso central e periférico e nos músculos esqueléticos. No caso específico de enxertos, trabalhos sugerem que a LILT pode aumentar a produção de matriz óssea devido ao aumento da vascularização e do efeito antiinflamatório no sítio operado (KHADRA, 2004).

O mecanismo de atuação do laser em baixa intensidade ainda não esta completamente entendido. Ele é fotoquímico por natureza e sua energia provavelmente é absorvida pelos cromóforos intra-celulares e convertida em energia metabólica, envolvendo a cadeia respiratória.

Dessa forma torna-se relevante a realização de estudos que possibilitem a criação de protocolos de aplicação clínica, para que os resultados sejam previsíveis e a utilização do laser, segura.

2. OBJETIVO

Avaliar os efeitos da radiação laser em baixa intensidade na reparação óssea em defeitos criados cirurgicamente nas tibias de coelhos, após regeneração óssea guiada, em 4 sítios diferentes, em cada animal.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O tecido ósseo

O osso é considerado o maior achado na evolução dos tecidos de suporte (SCHENK, 1996). O tecido ósseo é o principal constituinte do esqueleto, serve como suporte estrutural e funciona como depósito de cálcio, fosfato e outros íons, controlando suas concentrações nos líquidos corporais (KESSEL, 1998).

Segundo Ten Cate (2001), o tecido ósseo é formado por células e um material intercelular calcificado, a matriz óssea. As células são: 1. Os osteócitos, que se situam em cavidades ou lacunas no interior da matriz, 2. Os osteoblastos, produtores da parte orgânica da matriz e 3. Os osteoclastos, células gigantes multinucleadas, relacionadas com a reabsorção do tecido ósseo e que participam dos processos de remodelação do osso. A sobrevivência dos osteócitos depende dos canaliculos que fazem comunicação entre as próprias lacunas, entre elas e a superfície interna e externa dos ossos e também com os canais vasculares da própria matriz. Como seria de se esperar, o mecanismo canalicular não é muito eficiente, e não tem possibilidade de manter a vida das células em grandes distâncias. Isto significa que nenhuma célula óssea sobrevive se estiver distante de um capilar mais de uma fração de milímetro. Por isso, é necessário que o osso esteja suprido por uma rede de capilares extremamente desenvolvida.

O osso não cresce por mecanismo intersticial, mas somente pela adição de novo osso às superfícies pré-existentes. As células que cobrem e revestem a superfície óssea e servem como células fonte para o osso são denominadas células osteogênicas. Para que ocorra a osteogênese, ou seja, a formação de tecido ósseo, as células osteogênicas devem diferenciar-se em osteoblastos, que vão secretar a substância intercelular orgânica do osso. Os corpos celulares dos osteoblastos possuem muitos prolongamentos delgados que vão estabelecer contato com

prolongamentos semelhantes das células vizinhas. Quando os osteoblastos produzem substâncias intra-celulares orgânicas, cercam seu corpo e prolongamentos com essas substâncias, ficando situados em pequenos espaços, denominados lacunas ou osteoplastos, e passam a ser denominados de osteócitos. Os prolongamentos celulares ficam situados em delgados canais, os canalículos. Dessa maneira, uma nova camada de osso é adicionada à superfície, sem que o número de células que recobrem essa superfície seja reduzido.

Macroscopicamente, a estrutura mineralizada do osso é revestida por envoltórios de periósteo e de endósteo. Os canais vasculares no interior do osso compacto são continuação dos envoltórios de periósteo ou endósteo (envoltório endocortical ou harvesiano). Esses envoltórios são responsáveis pelo potencial osteogênico e pela vascularização do osso. As células osteoprogenitoras geralmente estão localizadas nas vizinhanças dos vasos sanguíneos perto de uma superfície óssea (SCHENK, 1994).

Visualmente o osso se apresenta de duas maneiras: **osso cortical** e osso esponjoso, também chamado de **osso medular**. O osso cortical é compacto, no entanto, microscopicamente apresenta condutos. Já o osso medular, é disposto na forma de trabéculas ósseas, assemelhando-se a uma treliça. O osso esponjoso pode ser transformado em osso cortical, por meio da secreção contínua de camadas de matriz óssea pelos osteoblastos sobre sua superfície. Tanto o osso cortical quanto o esponjoso sofrem remodelação em resposta às tensões ou cargas aplicadas, ao grau de atividade ou inatividade, e às influências hormonais (KESSEL, 1998, TEN CATE, 2001; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Quimicamente, o osso consiste em aproximadamente 65% de mineral (principalmente hidroxiapatita), 25% de matriz orgânica e 10% de água. O colágeno representa cerca de 90% da

porção orgânica (peso seco); os 10% restantes consistem de proteoglicanos de pequeno peso molecular e proteínas não colágenas (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Qualquer lesão óssea (fraturas, defeitos, fixação de implantes, interrupção do suprimento sanguíneo) ativa a regeneração óssea local pela liberação de hormônios de crescimento. Porém, a formação óssea depende de dois requisitos: amplo suprimento vascular e suporte mecânico. A união de todos esses fatores irá ativar os osteoblastos na produção de tecido ósseo (HOLLINGER et al., 1999).

Sistemicamente, a remodelagem óssea é ativada pelos hormônios de crescimento e pela tireóide e paratireóide; e inibida pela calcitonina e cortisona. Localmente, a remodelagem óssea é ativada por qualquer traumatismo no osso, isto é, fraturas, procedimentos cirúrgicos ou fixação de implantes. Uma interrupção temporária do suprimento sanguíneo com desvitalização associada e necrose do tecido ósseo resulta em ativação substancial da remodelagem, mesmo na ausência de qualquer lesão mecânica concomitante. Isto estimula a revascularização e substituição das zonas necróticas por tecido vital.

De acordo com Schenk et al. (1994), apesar do tecido ósseo exibir um potencial de regeneração surpreendente e restaurar perfeitamente sua estrutura original e suas propriedades mecânicas, essa capacidade tem seus limites e também pode falhar, se certas condições não forem atingidas. Os fatores que impedem ou previnem o reparo ósseo são, entre outros: falhas na vascularização, instabilidade mecânica, defeitos sobreestendidos e tecidos competidores com uma alta atividade de proliferação. Dai a indicação das membranas na regeneração óssea guiada (R.O.G).

3.2 O laser de baixa intensidade

Os lasers em baixa intensidade tem sido largamente utilizados em medicina e odontologia. Os mecanismos envolvidos nos efeitos observados com esse tipo de laser preconizam a LILT (Low Intensity Laser Therapy – terapia com lasers em baixa intensidade), atualmente LLLT (Low Level Laser Therapy). Esses lasers são usados para propósitos terapêuticos desde a década de 1960, por suas características de baixa intensidade de energia e comprimento de ondas capazes de penetrar nos tecidos. O laser operando em baixa intensidade foi considerado por MESTER, em 1969, um “bioestimulador”, pois notou-se seus efeitos de estimular e acelerar os processos de cicatrização de feridas na pele. Porém, a partir de estudos clínicos e laboratoriais, ficou evidente que essa terapia não somente acelerava determinados processos, mas também retardava outros, e que essa era uma função “biomoduladora” do laser. Considerou-se que a energia dos fótons de uma radiação laser absorvida por uma célula é transformada em energia bioquímica e utilizada em sua cadeia respiratória (MESTER, 1969). Em 1988, KARU descreveu um mecanismo de ação diferente para os lasers emitindo radiação na região do visível e do infravermelho próximo. A luz laser visível pode induzir reações fotoquímicas, ou seja, uma direta ativação da indução de enzimas intracelulares, e essa luz teria principal atuação sobre os lisossomos e as mitocôndrias das células. As membranas das células, por sua vez, teriam maior interação com a luz infravermelha e as alterações nessas membranas, corresponderiam a efeitos fotofísicos e fotoelétricos, aumentando a síntese de ATP mitocondrial, favorecendo uma série de reações que interferem no metabolismo celular, conduzindo à fotorresposta ou bioestimulação. SMITH acrescenta ao modelo de KARU, a sugestão que a radiação infravermelha inicie a cascata de eventos metabólicos, através dos efeitos fotofísicos sobre as membranas, provavelmente nos

canais de cálcio, conduzindo à mesma resposta final (ZEZELL, MALDONADO e RIBEIRO, 2004).

Os lasers em baixa intensidade, ao contrário daqueles em alta intensidade, são compactos, de baixo custo e de grande eficiência elétrica e óptica. Muitos trabalhos estão sendo feitos para estudar os efeitos da LLLT: aceleração na cicatrização de feridas, melhor regeneração e remodelação ósseas, atenuação dos processos inflamatórios, aceleração na osteointegração dos implantes etc.

Os lasers em baixa intensidade mais utilizados em odontologia são os de Hélio-neônio, argônio e o arseneto de gálio-alumínio. Este último é um tipo de semicondutor de dupla heterojunção, que torna possível sua emissão de forma contínua em temperatura ambiente. O bombeamento desses lasers pode ser realizado de várias maneiras, porém a forma mais usual é a utilização do semicondutor na forma de diodo, com excitação produzida por uma corrente elétrica. Ele apresenta potência pico de alguns Watts, e comprimentos de onda na faixa do infravermelho, por volta de 830 nm. Esse laser apresenta uma grande profundidade de penetração nos tecidos, pois a água e a hemoglobina apresentam um baixo coeficiente de absorção para esse tipo de radiação.

3.3 LLLT e o processo de cicatrização óssea

É sabido que o potencial osteogênico das células mesenquimais depende de muitos fatores genéticos e também de fatores indutores locais e sistêmicos. A LLLT pode atuar como um fator indutor. No entanto, trabalhos sugerem que a LLLT pode aumentar a produção de matriz óssea devido ao aumento da vascularização e do efeito antiinflamatório. Esses aspectos podem resultar tanto no aumento da liberação dos mediadores quanto na microvascularização, o que vai acelerar a cicatrização óssea (KHADRA, 2004).

Vários trabalhos reconhecem que a LLLT tem efeito positivo no osso. Esses estudos refletem a idéia que as células mesenquimais não diferenciadas podem ser biomoduladas positivamente em osteoblastos, que se transformarão mais rapidamente em osteócitos (TRELLES, 1987). Existem muitos estudos prévios nos quais a LLLT foi usada em fraturas nos defeitos ósseos, em extrações dentárias e após a colocação de implantes dentários (SILVA JUNIOR, 2002).

A atividade da fosfatase alcalina é considerada um indicador na diferenciação dos osteoblastos. As células progenitoras novas não expressam atividade de fosfatase alcalina, mas se diferenciam através de um número definido de divisões celulares para finalmente expressar um fenótipo de osteoblasto maduro, que é uma célula pós-mitótica expressando esse indicador que é capaz de formar osso.

Verificou-se que a LLLT pode aumentar a produção de colágeno, que é um importante componente da matriz extra-celular do osso. O aumento da quantidade de fibras colágenas representa a intensificação da neo-formação óssea depois da mineralização da matriz (PINHEIRO, 2003). Esse aspecto foi claramente observado no trabalho que associou enxerto ósseo, membrana e LLLT, quando no trigésimo dia, observou-se, além da grande quantidade de fibras colágenas, presença de trabeculado ósseo denso. Outros trabalhos também observaram aumento dos níveis de RNAm de colágeno tipo I. Como esse tipo de colágeno é a maior parte da proteína do osso, a observação que o laser estimula os níveis de colágeno é, no mínimo, um suporte indireto do efeito estimulatório da irradiação laser na formação do osso.

Porém, o mecanismo exato pelo qual a LILT atua no osso, ainda é incerto. Mas já existem algumas suposições: alteração na regulação genética e/ou modulação da atividade enzimática envolvendo o metabolismo do colágeno (DORTBUDAK, 2000).

O processo natural de cicatrização óssea inclui fases consecutivas e difere de acordo com o tipo e intensidade do trauma e também da extensão do dano ao osso.

A regeneração óssea não depende somente da dose total de energia de laser irradiado mas também do período e da maneira que essa irradiação foi feita. Aplicações nas fases iniciais levaram a resultados melhores (SAITO, 1997). Irradiações múltiplas são mais efetivas que uma única dose para acelerar a formação óssea ou o crescimento de fibroblastos. Estudos recentes sugerem que os parâmetros de densidade de energia e a intensidade são biologicamente independentes um do outro, e é isso que vai determinar o sucesso ou fracasso do tratamento (SAITO, 1997).

4. METODOLOGIA

4.1 O procedimento cirúrgico

O estudo foi realizado em 10 coelhos da raça “Nova Zelândia”, machos, pesando entre 3,8 Kg e 4,0Kg e idade variando entre 10 e 12 meses, com aprovação do Comitê de Ética, sob Parecer- Projeto N° 10/CEPA-IPEN/SP. Os animais foram mantidos no biotério do IPEN nos 10 dias que precederam a cirurgia e por mais 40 dias depois do procedimento. Os coelhos foram alimentados com ração, alfafa e água, em abundância. Todos ficaram confinados em gaiolas com bandeja removível forrada com maravalha (serragem) estéril, para uma boa absorção de urina e fezes, que era trocada a cada 24 horas.

Em cada animal foram criados 4 defeitos cirúrgicos com fresas de titânio, preenchidas com osso bovino particulado e protegidas com membrana de colágeno reabsorvível.

No pré-operatório imediato, cada animal foi pesado para que fosse aplicada dose ideal de anestésico e medicação pós-operatória. Previamente à anestesia, foi injetado por via subcutânea Atropina 0,50mg, numa dose de 0,08 mg/Kg, para prevenir bradicardia. A solução anestésica preparada por médico veterinário foi de Ketamina 2,5mg/Kg e Acepran 0,1 mg/Kg. Essa solução foi injetada, por via intra muscular, numa dose de 1ml/Kg, para atingir sedação profunda. Para testar a sensibilidade do animal, antes de iniciarmos o procedimento, o centro da pata dianteira foi apertado com força. O animal foi submetido à tricotomia das patas traseiras, na região da tibia, e posteriormente à anti-sepsia local com escovas embebidas em solução de iodo-povidine, sendo então a região isolada através de campo cirúrgico estéril. Aplicamos anestesia infiltrativa local, sem vaso constritor, nas articulações dos joelhos, para que não houvesse risco de dor e o animal reagisse. Uma incisão com bisturi frio, de aproximadamente 5 cm, foi feita sobre a tibia, na pele, fascias, tecido muscular e periósteo, deixando o tecido ósseo exposto. Foram feitas 2

perfurações em cada tíbia, com fresas de aço inoxidável, refrigeradas com solução salina, preparando a loja óssea de maneira gradual. As perfurações tinham 8 mm de profundidade e 2 mm de diâmetro (16 mm²).



Figura 1: Tibia com 2 perfurações (superior e inferior) e 2 mini-parafusos de titânio para identificação.

Lateralmente a cada um desses sítios, foi instalado um mini-parafuso de titânio (SIN[®]) para servir de identificação do local da enxertia (Figura 1). Em todos os animais, as 4 perfurações foram preenchidas com enxerto liofilizado de osso bovino desmineralizado e recobertas com membranas de colágeno reabsorvível (R.O.G.) (Consulmat[®]) (Figuras 2 e 3).



Figura 2: Osso bovino e membrana de colágeno reabsorvível.



Figura 3: Perfurações preenchidas com osso bovino e protegidas com membrana de colágeno.



Figura 4: Sutura do plano muscular



Figura 5: Sutura da pele.

A ferida cirúrgica foi fechada por planos, com fio de sutura Nylon 3-0 e lavada com soro fisiológico (Figuras 4 e 5). Os animais foram medicados com Ampicilina 25 mg/Kg, por via intra-muscular, em dose única, para prevenir infecção no pós-operatório.

4.2 O protocolo de irradiação

Imediatamente após o procedimento cirúrgico, iniciamos a terapia com laser de baixa intensidade, de arseneto de gálio e alumínio (GaAlAs), com comprimento de onda (λ) de 830 nm (Kondortech[®]), no modo contínuo e irradiação com a ponta de entrega óptica em contato com a pele, perpendicular ao plano da pele, seguindo as seguintes definições:

Área (A) = 0,3 cm²; Potência (P) = 30 mW; Intensidade (I) = 0,1 W/cm²

Fluência (D) = 6 J/cm²; tempo (t) = 60 s/ponto (Figuras 6 e 7).

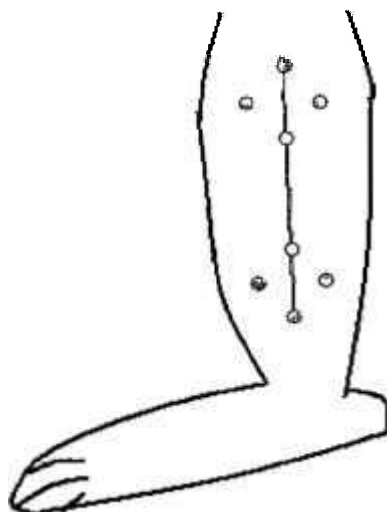


Figura 6: O laser utilizado.



Figura 7: Ponta de entrega óptica do equipamento laser.

Local da irradiação: 4 pontos ao redor de cada perfuração, conforme ilustração abaixo.



Quatro sítios em cada animal:

- Controle (nenhuma irradiação)
- 4 irradiações
- 6 irradiações
- 8 irradiações

Foi realizado um sorteio das posições de irradiação em cada animal, de forma a prevenir qualquer possível influência da posição do sítio nos resultados. Essas combinações randomizadas foram utilizadas em 5 pares de animais de acordo com a Tabela 1, a seguir:

	coelhos A e A'		coelhos B e B'		coelhos C e C'		coelhos D e D'		coelhos E e E'	
PS	0	8	6	4	0	6	8	0	4	8
PI	4	6	0	8	8	4	6	4	6	0
	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E

Tabela 1: Distribuição dos coelhos e respectivas posições das irradiações (PS: perfuração superior; PI: perfuração inferior; D: pata direita; E: pata esquerda).

Todos os coelhos tiveram suas gaiolas e suas orelhas identificadas com sua letra e com um desenho especificando a combinação correspondente, para que não houvesse erros no momento da irradiação com o laser.

Os coelhos A e A' não foram irradiados na perfuração superior direita, receberam 4 irradiações na perfuração inferior direita, 8 irradiações na perfuração superior esquerda e 6 irradiações na perfuração inferior esquerda.

Os coelhos B e B' foram irradiados 6 vezes na perfuração superior direita e nenhuma vez na perfuração inferior direita. A tibia esquerda recebeu 4 irradiações na perfuração superior e 8 na inferior. O coelho B' morreu antes da segunda irradiação.

Os coelhos C e C' não receberam nenhuma irradiação na perfuração superior direita e 8 irradiações na perfuração inferior direita. A perfuração superior esquerda foi irradiada 6 vezes e a inferior, 4 vezes. O coelho C' morreu após a quinta irradiação.

Nos coelhos D e D', a perfuração superior direita foi irradiada 8 vezes e a inferior, 6. A perfuração na tibia superior esquerda não foi irradiada e a inferior recebeu 4 irradiações.

Por fim, nos coelhos E e E', a perfuração superior direita foi irradiada 4 vezes e a inferior, 6. Do lado esquerdo, a perfuração superior recebeu 8 irradiações e a perfuração inferior não foi irradiada.

Para facilitar as irradiações e evitar erros no momento dos procedimentos, as patas direitas nas etiquetas identificadoras foram desenhadas em azul, e as patas esquerdas, em amarelo. Em todos os dias das aplicações, seguimos uma ordem das gaiolas, começávamos sempre pelo mesmo animal, e irradiávamos primeiro as patas direitas e depois as esquerdas. Além disso, as irradiações foram todas feitas pela mesma pessoa, bem como a contenção dos animais.

O protocolo utilizado foi criado baseado em estudos prévios publicados na literatura. As irradiações foram feitas às segundas e quintas -feiras. Os dias das aplicações simulam uma condição mais viável da utilização do laser nos consultório, otimizando o número de retornos dos pacientes que vierem a se submeter a essa terapia.

Em todas as irradiações seguintes, que os animais não estavam sob o efeito da anestesia, foram contidos e irradiados, um a um.

4.3 A obtenção das peças

Dois coelhos morreram no decorrer do estudo (B'e C'). Quarenta dias após a cirurgia, 8 animais foram sacrificados: anestesiados da mesma forma que na cirurgia, por sedação profunda, e depois levados à câmara de gás. As incisões foram feitas para acessar as tíbias e o osso foi cortado, entre os parafusos, com discos de carborundum, para obtenção das peças (Figura 8). O coelho D' teve infecção na pata direita e não foi utilizado na análise, portanto, 7 animais foram estudados.

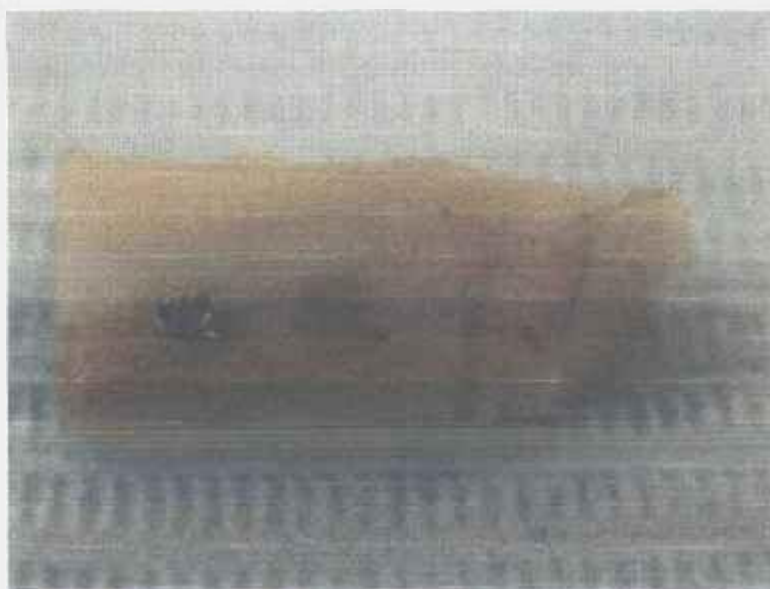


Figura 8: Região de interesse obtida da tíbia.

4.4 O processamento histológico

O protocolo utilizado neste estudo foi uma reprodução do protocolo publicado por Schenck (1984). As peças foram aparadas com um disco de carborundum e peça reta, para remoção de setores sem interesse. Então, as peças foram incluídas em solução resinosa de Metil Metacrilato (MMA).

O MMA penetra facilmente no tecido ósseo e resulta num polímero muito duro, com encadeamento linear, propriedade que possibilita a produção de ótimas secções não descalcificadas de tecido ósseo com excelente detalhamento, permitindo uma boa análise histomorfométrica das lâminas.

Concluída a polimerização, os vidros foram quebrados e os blocos de resina com as tíbias incluídas foram aparados de forma que se adaptassem à pinça do micrótomo. No micrótomo, foram cortados com disco de diamante numa espessura de 500 μm (Figura 9).

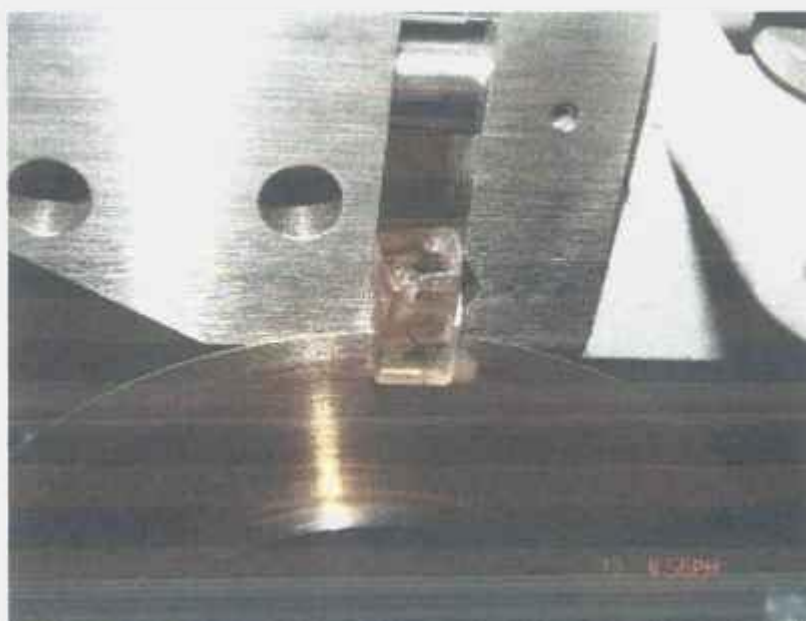


Figura 9: Disco de diamante do micrótomo, cortando a peça em lâminas.

O primeiro corte, na periferia da área de interesse, foi chamado de “base line”. A partir dele, foram realizados, aproximadamente, mais dois cortes na área de interesse, em cada um dos blocos. Cada um desses cortes foi identificado com um número e examinado no microscópio óptico, para escolha do melhor lado a ser posicionado na lâmina de acetato. Os cortes foram colados em placas de acetato com cola de secagem rápida (tipo “super bonder”). O corte posicionado na placa de acetato foi desgastado por meio de lixas de diversas granulações até que a lâmina atingisse 100 μm . Essas medições foram feitas com um paquímetro digital.

No passo seguinte, as lâminas foram coradas com azul de toluidina permitindo assim a distinção das estruturas de interesse: osso neoformado (azul escuro), tecido conjuntivo (azul claro) e partículas de enxerto ósseo (púrpura).

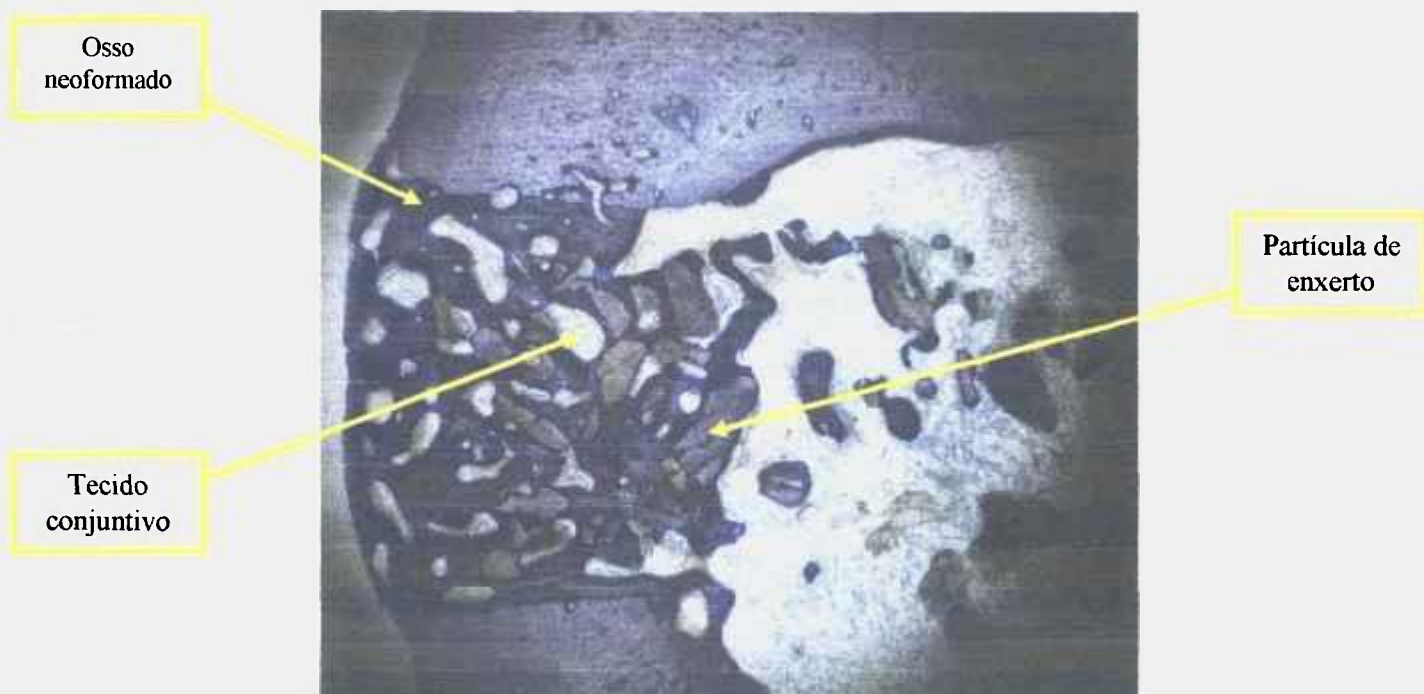


Figura 10: Região cortical e medular com presença de partículas de enxerto, osso neoformado e tecido conjuntivo, em lâmina corada com azul de toluidina.

A seguir, as lâminas foram fotografadas em microscópio óptico, com objetiva de 2,5 e aumento de 800 vezes (Figura 10). Cada lâmina recebeu um número, de maneira aleatória, para que sua análise não fosse tendenciosa. Utilizando o programa Axion Vision 3.0 (Zeiss), traçamos um retângulo na região de cortical na área que foi feita a perfuração e reproduzimos o retângulo com a mesma área para a região de medular. Feito isso, delimitamos a porção de tecido ósseo (osso particulado e tecido ósseo neoformado) ou de tecido conjuntivo, manualmente, em ambos retângulos (Figura 11). Com a área de cortical e medular em mãos, subtraímos a área delimitada e obtivemos a área restante, na cortical e na medular, em cada uma das lâminas. No total foram obtidas 56 lâminas, somando-se todos os grupos (0, 4, 6 e 8 irradiações). Porém, por motivos técnicos, o número de lâminas não foi igual para todos os grupos. Esses valores foram dispostos numa tabela e submetidos à análise estatística.

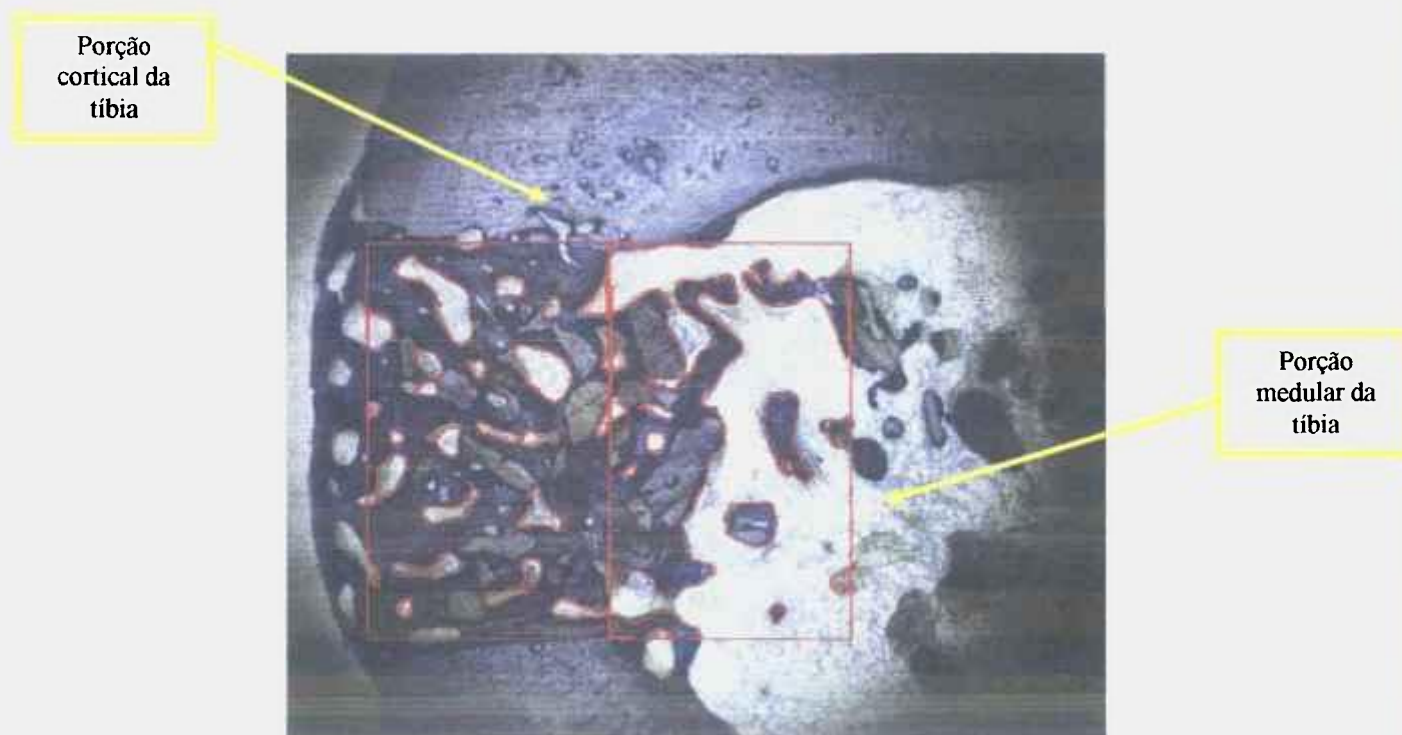


Figura 11: Retângulo esquerdo: área de interesse na cortical, com porções de tecido conjuntivo delimitadas. Retângulo direito: Área de interesse na medular e partículas de tecido ósseo delimitadas.

5. RESULTADOS

5.1 Análise estatística

Dez coelhos foram utilizados neste experimento. Dois coelhos morreram no decorrer do estudo (B' e C') e um (D') teve infecção na pata direita e não foi utilizado na análise. Portanto, 7 animais foram estudados.

A unidade estatística (n) utilizada nesta análise foi o animal (coelho).

Como parâmetro de avaliação, escolheu-se a fração (percentual) de tecido ósseo (T.O.), na porção cortical das amostras (Tabela 2).

Lâminas	Fração T.O. Cortical	Lâminas	Fração T.O. Cortical
A 0	0,762	A 4	0,483
A' 0	0,679	A' 4	Nenhuma
B 0	0,900	B 4	0,529
C 0	0,462	C 4	0,325
D 0	0,682	D 4	0,851
E 0	0,475	E 4	0,750
E' 0	0,022	E' 4	0,532
n=7		n=6	

A 6	0,710	A 8	Nenhuma
A' 6	0,840	A' 8	0,522
B 6	0,674	B 8	0,714
C 6	0,639	C 8	0,700
D 6	0,846	D 8	0,686
E 6	0,775	E 8	0,556
E' 6	0,672	E' 8	0,466
n=7		n=6	

Tabela 2: Frações de tecido ósseo cortical nos diferentes grupos.

Como o número de lâminas não foi igual para todos os animais e grupos, foi utilizada a média dos valores das frações de áreas encontradas em cada animal e grupo com mais de uma lâmina e, em seguida, calculados a média e o desvio padrão das frações obtidas para cada grupo.

Variável	Grupo	N	média	Desvio padrão	p (ANOVA)
Fração de tecido ósseo cortical	0	7	57%	0,29	0,33
	4	6	58%	0,19	
	6	7	74%	0,08	
	8	6	61%	0,11	
Fração de tecido ósseo medular	0	7	13%	0,09	0,54
	4	6	25%	0,13	
	6	7	24%	0,16	
	8	6	23%	0,23	

Tabela 3: Estatística descritiva dos valores obtidos para as frações de tecido ósseo, tanto cortical como medular, nos diferentes grupos.

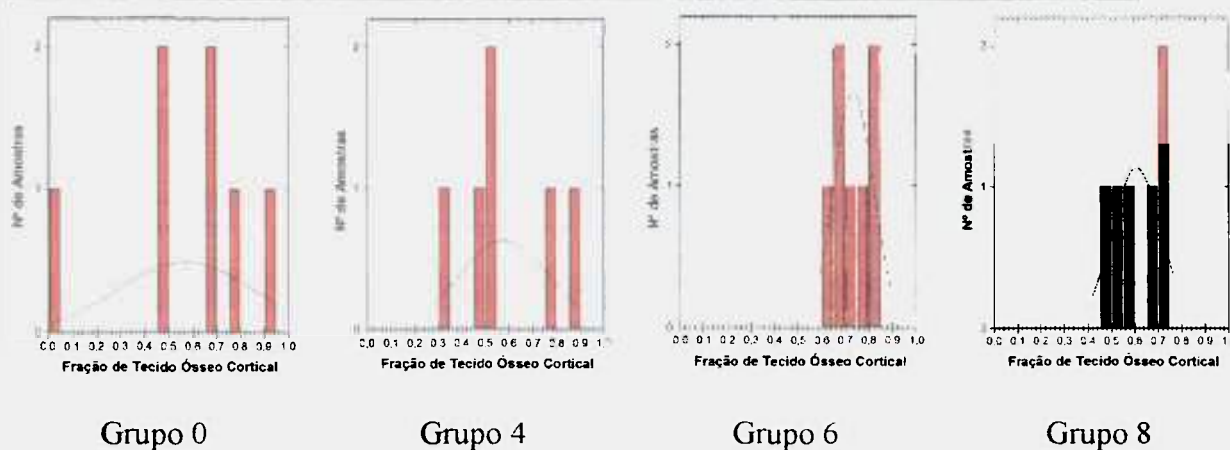


Figura 12: Frações de tecido ósseo cortical nos diferentes grupos

No resultado da análise dos valores médios, não houve diferença estatística significativa entre os grupos com relação aos valores médios obtidos do percentual de tecido ósseo na porção cortical.

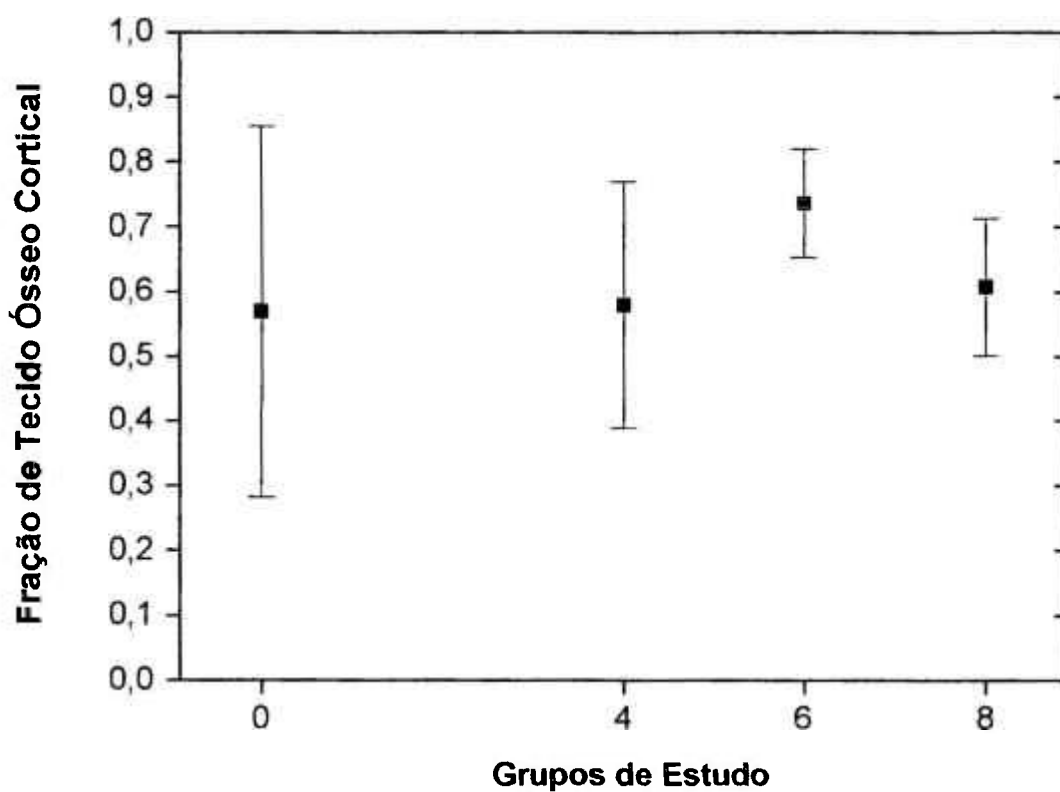


Figura 13: Médias e desvios-padrão das frações de tecido ósseo cortical nos diferentes grupos.

5.2 Lâmina representativa de cada grupo



Lâmina do grupo 0: perfuração não irradiada.



Lâmina do grupo 4: perfuração irradiada 4 vezes
(2 semanas).



Lâmina do grupo 6: perfuração irradiada 6 vezes
(3 semanas).



Lâmina do grupo 8: perfuração irradiada 8 vezes
(4 semanas).

6. DISCUSSÃO

A proposta do nosso trabalho foi avaliar os efeitos da LLLT na reparação óssea em defeitos criados cirurgicamente nas tíbias de coelhos, após regeneração óssea guiada, em 4 sítios diferentes, no mesmo animal.

A escolha de nossos parâmetros de intensidade ($I = 0,1 \text{ W/cm}^2$) e de densidade de energia ou fluência ($DE = 6 \text{ J/cm}^2$) para a irradiação do laser em baixa intensidade, utilizados neste trabalho, foi elaborada baseada em publicações na literatura que estudaram os efeitos dessa terapia no tecido ósseo (Pinheiro et al. 2003; Guzzardella et al. 2003; Kadra et al. 2004; Dörtbudak et al. 2000; Silva Júnior et al. 2002; Barushka et al. 1995; Yaakobi et al. 1996; David et al. 1996; Ozawa et al. 1998; Braekt 1991; Gordjestani et al. 1994; Trelles e Mayayo, 1987). A área aqui considerada, $0,3 \text{ cm}^2$, é a da ponta de entrega óptica do equipamento laser utilizado para este estudo, pois a aplicação foi feita em contato.

A potência (P) foi ajustada em 30 mW para atingirmos a intensidade (I) de $0,1 \text{ w/cm}^2$ e o tempo de irradiação (t) de 60 segundos por ponto foi calculado para alcançarmos a densidade de energia escolhida ($DE = 6 \text{ J/cm}^2$).

A escolha da forma de irradiação, 4 pontos ao redor de cada perfuração, em contato e perpendicular à pele, foi baseada no modelo de Pinheiro et al. (2003) e na capacidade do laser em criar uma condição ambiental mais favorável no processo de osteogênese, favorecida pelo aumento da vascularização e ação anti-inflamatória promovida por essa terapia, já que um dos requisitos para que haja formação óssea é um amplo suprimento vascular. A irradiação ao redor do sítio enxertado teve como principal objetivo, portanto, aumentar o aporte sanguíneo na região.

Não foi possível observar diferença estatística significativa, para o parâmetro escolhido na fração de tecido ósseo cortical entre os 4 grupos: controle, 4, 6 e 8 irradiações. Porém, ao analisarmos a tabela 3, observamos que os maiores valores médios de percentual de tecido ósseo, na porção cortical da tibia, ocorreram no grupo que foi irradiado 6 vezes: 74%. O que representou 17 % a mais que o grupo controle, que apresentou 57% de área de tecido ósseo na cortical. Além disso, observamos que o desvio padrão desse grupo 6 foi menor que nos outros (Figuras 12 e 13). Isto pode sugerir que 6 irradiações com os parâmetros utilizados neste trabalho sejam a melhor opção para a estimulação da regeneração óssea, que pareceu reproduzir um padrão mais homogêneo de reparação.

No único trabalho na literatura, que associa LLLT com regeneração óssea guiada em defeitos produzidos cirurgicamente, foram encontradas evidências de reparo ósseo mais avançado nos espécimes irradiados (Pinheiro et al. 2003). Porém não é possível estabelecer uma comparação entre esses dois estudos, por vários motivos: nosso modelo animal foram coelhos (10), irradiados 2 vezes por semana com $DE=6J/cm^2$ e $I=0,1 W/cm^2$, sacrificados todos no mesmo período (40 dias após a cirurgia), e a nossa análise das lâminas quantificou tecido ósseo na porção cortical e medular dos defeitos que mediram 8 mm de profundidade por 2 mm de diâmetro ($A= 16 mm^2$), posteriormente submetida a análise estatística. Enquanto no estudo de Pinheiro et al. (2003), os animais utilizados foram ratos (42), os parâmetros do laser e das irradiações foram diferentes ($DE=4J/cm^2$, $I= 0,05 W/cm^2$, irradiados a cada 48 h, animais sacrificados 15, 21 e 30 dias após a cirurgia), os defeitos foram produzidos em fêmures e mediam $3 mm^2$ e além disso, sua análise foi apenas descritiva, por microscopia de luz, ou seja, os resultados não foram submetidos à análise estatística.

Em outro estudo também de Pinheiro et al. do mesmo ano (2003), de metodologia semelhante, porém, com número menor de animais (24) e defeitos enxertados não recobertos com membranas, os autores também encontraram evidências de reparo ósseo mais avançado nos espécimes também irradiados com laser de comprimento de onda de 830 nm.

Embora os resultados de estudos em animais não devam ser extrapolados para humanos, optamos por irradiar os animais de nosso experimento 2 vezes por semana, uma condição que simula, de forma mais viável, o retorno dos pacientes ao consultório para submeterem-se à LLLT, diferentemente dos retornos a cada 48 h, que são praticamente inviáveis nas grandes cidades.

A avaliação da reparação óssea em nosso estudo “in vivo”, foi feita por método histomorfométrico, através da mensuração das áreas de interesse, ou seja, a análise foi quantitativa. Em estudos prévios que demonstraram aceleração da neoformação óssea em culturas de células “in vitro” irradiadas, os autores optaram por esse modelo, pois acharam que esses experimentos são, em sua maioria, mais favoráveis às análises quantitativas que os “in vivo” (Yamada, 1991; Ozawa et al., 1998). Porém, é importante ressaltar as limitações dos estudos “in vitro”; eles sempre reproduzem uma condição “ideal” para o crescimento celular. As culturas celulares são homogêneas, todas no mesmo meio, sob as mesmas condições, sem a interferência das diferentes camadas teciduais e de fatores imunológicos. Além disso, é possível irradiá-las exatamente da mesma maneira, durante todo o experimento. Quando trabalhamos com animais, esses fatores não são tão previsíveis, visto que existe a resposta do indivíduo à terapia e é pouco provável que todas as irradiações sejam feitas exatamente no mesmo local, por melhor que venha a ser a contenção do animal. Por outro lado, mesmo que a metodologia dos trabalhos “in vitro” não seja totalmente reprodutível aos modelos “in vivo”, geralmente são o primeiro passo para o desenvolvimento das pesquisas “in vivo”. Os modelos “in vitro” podem esclarecer a seqüência de

eventos e parâmetros que interferem na reparação tecidual, mesmo que os dados não possam ser extrapolados para estudos “in vivo”, por causa da numerosa população de células e dos fatores bioquímicos envolvidos (Guzzardella et al., 2002).

A ausência de diferença estatística significativa em nosso trabalho pode ser devido ao tamanho da amostra. Como nos estudos *in vivo* o número de animais utilizados é limitado, por motivos éticos e práticos, a realização de um próximo estudo com o mesmo número de animais, porém com menor número de grupos, pode interferir positivamente nos resultados estatísticos (Gordjestani et al. 1994). Silva Júnior et al. (2002), que também quantificaram osso neoformado em defeitos de 1 cm² criados em fêmures de 40 ratos por medição de área, porém, sem uso de enxerto, encontraram diferenças estatísticas significativas entre os grupos irradiados e o controle. Apesar de seus parâmetros serem diferentes dos nossos, o maior número de animais certamente interferiu nos resultados estatísticos. Suas medições foram feitas de maneira computadorizada, ou seja, o computador selecionava as áreas de interesse baseado nas cores escolhidas. Além disso, os autores selecionaram as lâminas de melhor qualidade. Esses dois aspectos podem ter favorecido a tendenciosidade dos resultados, pois o procedimento automático pode não conseguir identificar diferenças tênues de coloração e apenas as melhores lâminas entraram no estudo. No nosso trabalho, a delimitação da área de interesse (área de tecido ósseo) foi feita manualmente, para se evitar erros e, além disso, nenhuma lâmina foi excluída das análises.

Inúmeros trabalhos na literatura mostram os efeitos positivos da LLLT nos processos de reparação óssea (Yaakobi et al. 1996; Freitas et al 2000), seja na consolidação das fraturas (Trelles e Mayayo 1987; Lunger et al. 1998), nas expansões rápidas da sutura palatina (Saito, 1997), na cicatrização de alvéolos pós-exodontias (Takeda, 1988), na aceleração da osteointegração de implantes dentários (Blay 2001; Guzzardella et al. 2003; Kadra et al. 2004),

seja nos estudos “in vitro” (Yamada 1991; Ozawa et al. 1988). Porém, os resultados são controversos (Coomble et al. 2001; David et al. 1996; Braekt et al. 1991). Isso se deve ao fato dos trabalhos utilizarem diferentes protocolos, diferentes associações de comprimentos de onda, modelos de emissão e doses, em diferentes animais ou modelos celulares (Silva Júnior et al. 2002).

O laser utilizado neste estudo, com comprimento de onda de 830 nm, possui a capacidade de penetrar profundamente nos tecidos biológicos, pois a água e a hemoglobina têm baixo coeficiente de absorção para esse comprimento de onda.

No nosso estudo, o fato dos melhores resultados (74%) ocorrerem no grupo de 6 irradiações, ou seja, no grupo irradiado por 3 semanas, indicam um reforço à hipótese de que a LLLT atua melhor nas fases iniciais do processo de reparação (Silva Júnior et al. 2002; Nicolau et al. 2003; Saito e Shimizu, 1997).

7. CONCLUSÕES

Estatisticamente não houve diferença entre os resultados obtidos. Acreditamos que esse resultado não demonstra de maneira definitiva que o protocolo utilizado não tem a ação terapêutica desejada, mas pode ser devido ao tamanho de nossa amostra.

Entretanto, o grupo com seis irradiações, ou seja, com sessões de irradiação conduzidas ao longo de três semanas, apresentou o maior valor médio (74%), o que representou 17% a mais que o grupo controle (57%), assim como o menor desvio padrão. Isso está de acordo com a hipótese de que a LLLT atua melhor nas fases iniciais do processo de reparação.

Assim, os parâmetros do grupo seis são uma boa opção para a continuidade dos estudos.

Um outro estudo dando continuidade a este trabalho, e ainda na mesma linha, seria também averiguar o eventual potencial “regulador” dessa terapia no caso descrito, pois a dispersão dos resultados (representada pelo desvio –padrão) decresceu para os grupos quatro, seis e oito.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARUSKA, O.; YAAKOBI, T.; ORON, U. Effect of low-energy laser (He-Ne) irradiation on the process of bone repair in the rat tibia. *Bone*, v.16(1), p. 47-55, 1995.

BERQUÓ, E.S.; SOUZA, J.M.P.; GOTLIEB, S.L.D. *Bioestatística*. São Paulo, EPU, p.350, 1981.

BLAY, A. Efeitos da irradiação laser em baixa intensidade no mecanismo de ossintegração de implantes: estudo “*in vivo*”. *Tese (Mestrado)*. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

BRAEKT IN DE M.M.H. VAN ALPHEN, F.A.M.; KUIJPERS-JAGTMANI, A. M.; MALTHA, J.C. The effect of low-level laser treatment on maxillary arch dimensions after palatal surgery on beagle dogs. *J Dent Res*, v.70 (11), p. 1467-1470, 1991.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)