

UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

LEONARDO MARQUES

**ESTUDO COMPARATIVO DE DOIS PROTOCOLOS DE
LASERTERAPIA PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA**

**BAURU
2010**

LEONARDO MARQUES

**ESTUDO COMPARATIVO DE DOIS PROTOCOLOS DE
LASERTERAPIA PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA**

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Centro de Ciências Biológicas e Profissões da
Saúde como parte dos requisitos para obtenção do
título de Cirurgião-Dentista sob a orientação da
Prof. Dra. Angela Mitie Otta Kinoshita.**

**BAURU
2010**

Marques, Leonardo

Estudo comparativo entre dois protocolos de Laserterapia para a Regeneração Óssea. / Leonardo Marques – 2010.

58 f.

**Orientadora: Angela Kinoshita
Trabalho de Conclusão de Curso (Odontologia)
Universidade Sagrado Coração – Bauru – SP.**

1. Regeneração Óssea. 2. Laserterapia. 3. Dosimetria Laser. I. Kinoshita, Angela. II. Título

LEONARDO MARQUES

**ESTUDO COMPARATIVO DE DOIS PROTOCOLOS DE LASERTERAPIA
PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências Biológicas e Profissões da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título de Cirurgião-Dentista sob a orientação da Prof. Dra. Angela Mitie Otta Kinoshita.

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Patrícia Pinto Saraiva
Universidade Sagrado Coração

Prof. Dra. Maria Cecília Veronezi Daher
Universidade Sagrado Coração

Prof. Angela Otta Mitie Kinoshita
Universidade Sagrado Coração

Bauru, 02 de Dezembro de 2010.

Dedico este trabalho à **Maria Aparecida Simionato Marques**, minha mãe e protetora, que nunca mediu esforços no que se diz respeito a minha formação pessoal e profissional, pelo amor, pelo exemplo e pela incansável dedicação frente às dificuldades.

E ainda, a todos que participaram desta realização.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela força e determinação que me foi concedida por esse ano de estudo e pesquisa.

Meu agradecimento especial a minha orientadora e amiga **Prof. Dra. Angela Otta Mitie Kinoshita**, exemplo de profissional, e dona de um caráter admirável. Agradeço a todas as oportunidades de estar ao seu lado, pelos ensinamentos, pelo otimismo e honestidade com que sempre conduziu nossas realizações. Minha orientadora por duas vezes em projetos de Iniciação Científica. Muitas conquistas a quem deixo o meu eterno e sincero obrigado.

Meu imenso agradecimento a professora **Prof. Dra. Leda Aparecida Francischone**, minha co-orientadora que nos ajudou a conduzir este projeto.

Ao grande amigo e **Prof. Ms Leandro Holgado**, pelo auxílio na fase experimental deste trabalho, pelo empenho, atenção e paciência dedicada à pesquisa. Obrigado pelos valiosos ensinamentos.

A amiga **Janayna Grando Machado**, pelo auxílio, pela amizade, pelo companheirismo e pela verdadeira parceria nesses anos de graduação e que com certeza o fará para o resto dos anos de nossas vidas.

Aos amigos **Nathan Herrera de Lima, Gabriela Cristina Oliveira, Lilian Souza Kretter de Camargo, Flávia Faria e Flávia Amadeu e Diego Pons** pelo auxílio na fase experimental.

Aos funcionários do Biotério, **Sergio e Mateus**, e a **Prof. Dra. Dulce Helena Constantino**, pelo cuidado com os animais e pela colaboração neste projeto.

Às funcionárias do Laboratório de Histologia da USC, **Maira, Fabiane e Lígia**, pela fundamental importância no processamento das lâminas.

Ao amigo e funcionário do Laboratório de Análises Clínicas e Fotomicroscopia, **Wilson Orcini**, na realização da Morfometria.

A todos meus amigos, funcionários e professores do Curso de Odontologia, com o qual convivo diariamente e que são exemplos de perseverança e boa vontade. Agradeço a todos que direta e indiretamente participaram desta pesquisa.

Em especial, agradeço à Universidade do Sagrado Coração, pelo ensino de qualidade e também ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico pelo auxílio pecuniário através do programa de bolsas de Iniciação Científica – PIBIC/CNPq.

“A possibilidade de realizarmos um sonho é o que torna a vida interessante”.

Paulo Coelho

RESUMO

A Laserterapia de Baixa intensidade tem sido utilizada com sucesso em vários procedimentos médicos e odontológicos, em grande parte destes, devido à sua ação antiinflamatória e pela sua capacidade de acelerar a cicatrização. A otimização da regeneração óssea é um assunto de grande interesse, pois está intimamente relacionada a vários tratamentos como em cirurgias ortopédicas, movimentação ortodôntica, e ósseo-integração de implantes dentários. Este trabalho consiste do estudo comparativo entre dois protocolos de laserterapia para regeneração óssea. No primeiro foi utilizado o método convencional, com aplicações durante todo o período experimental e, no segundo, proposto neste trabalho, foram utilizadas três aplicações, uma diretamente no local do defeito ósseo durante o procedimento cirúrgico, seguido de duas outras aplicações após a cirurgia, visando estabelecer um método mais prático sob o ponto de vista clínico. Este protocolo foi embasado na dosimetria laser adotado em experimentos *in vitro*, onde se aplica o laser diretamente nas células. Foram utilizados 45 ratos Wistar, divididos randomicamente em 3 grupos de 15 animais, nos quais defeitos ósseos de tamanho crítico (8mm de diâmetro) foram confeccionados cirurgicamente na calvária. Posteriormente, dois grupos (A e B) foram tratados por laserterapia de baixa intensidade, e o terceiro grupo (C), grupo controle, mantido sem tratamento. Foi utilizado o laser semiconductor Thera Lase® com emissão no infra-vermelho ($\lambda=830\text{nm}$). O primeiro protocolo consistiu de aplicações transcutâneas pontuais, com fluência de $16\text{J}/\text{cm}^2$, realizadas a cada 48 horas, iniciando-se 24 horas após a cirurgia, estendendo-se por 15 dias e foi aplicado ao grupo A. No segundo protocolo, realizam-se três aplicações: a primeira durante a cirurgia, diretamente no defeito, com fluência de $3,75\text{J}/\text{cm}^2$, seguido de duas aplicações transcutâneas 48 e 120 horas após a cirurgia e foi aplicado ao grupo B. Os animais do grupo controle (C) não foram submetidos a tratamento, no entanto, manuseados da mesma forma que os grupos tratados. Após o período de 7, 15 e 45 dias, 5 animais de cada grupo foram eutanasiados, e a peças contendo o defeito ósseo coletadas para análises microscópica: histológica descritiva e histomorfometria, e espectroscopia de absorção atômica (AAS), através da medida da concentração de cálcio. Os resultados dos tratamentos foram avaliados através da medida da área relativa ao tecido ósseo neoformado, através da histomorfometria. Os resultados da histomorfometria de tecido ósseo neoformado 15 dias após a cirurgia mostram maior fração deste tecido no grupo B em comparação ao grupo controle ($P<0.05$) de acordo com teste *t*-Student. Como esses valores obtidos 45 dias após a cirurgia não diferem entre os grupos, este resultado sugere que a laserterapia utilizando o protocolo proposto neste trabalho acelera o processo de cicatrização óssea.

Palavras-chave: Regeneração Óssea. Laserterapia. Dosimetria laser

ABSTRACT

Low intensity laser therapy has been used successfully in several medical and dental procedures, mainly due to its anti-inflammatory action and ability to speed up the healing. Enhancement of bone regeneration is a subject of great interest because it is closely related to several treatments such as orthopedic surgeries, orthodontic movement, and osseointegration of dental implants. This work is a comparative study between two protocols of laser-therapy for bone regeneration. The first the conventional method, with applications throughout the experimental period was used. The second, proposed in this work consist of three applications were used, the first directly on the site of a bone defect during the surgical procedure, followed by two other applications after surgery, to establish a more practical method for clinical uses. This protocol was based on laser dosimetry adopted in *in vitro* experiments, where the laser was applied directly into the cells. In this study, 45 Wistar rats were randomly divided into 3 groups of 15 animals, in which bone defects of critical size (8mm diameter) were prepared surgically in the skull. Subsequently, two groups (A and B) were treated by low intensity laser therapy, and the third group (C), control group, kept untreated. The semiconductor laser with emission in the infrared Thera Lase® ($\lambda = 830\text{nm}$) was used. The first protocol applied to the group A consisted of transcutaneous point applications, with fluency of $16\text{J}/\text{cm}^2$, performed every 48 hours starting 24 hours after surgery, extending until 15 days. In the second protocol, applied to the group B, three applications were carried out, the first during the surgery, directly into the defect, with a fluence of $3.75\text{ J}/\text{cm}^2$, followed by two transcutaneous applications, 48 and 120 hours after surgery. The control group (C) were not treated, however, handled the same way as the treated groups. After a period of 7, 15 and 45 days, five animals from each group were euthanized, and specimens containing the bone defect collected for microscopic analysis, histological description and histomorphometry, and atomic absorption spectroscopy (AAS). The analysis of results was assessed by the measurement of the newly formed bone through histomorphometry. The *t*-Student test was performed and showed that the result related to 15-days samples from group B is higher than to the control group ($P < 0.05$). As the newly formed bone fraction is the same in the samples of 45-days period in all groups, this result suggest that the laser therapy using the protocol proposed in this work speed up the process of bone healing.

Keywords: Bone Regeneration. Laser-therapy. Laser dosimetry

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Medicamentos que serão utilizados para os procedimentos de anestesia: Cloridrato de Cetamina e Xilasina - Cetamin® e Xilazin®, respectivamente.....	24
Figura 2: Tricotomia da região da calota craniana.....	24
Figura 3: Incisão linear da pele, utilizando lâmina de bisturi nº 15.....	25
Figura 4: Descolamento muco-periostéo.....	25
Figura 5: Modelo esquemático da região do defeito ósseo.....	26
Figura 6: Calvária exposta, observar a sutura coronal na linha média.....	26
Figura 7: Defeito crítico sendo confeccionado com broca Trefina de 8 mm.....	27
Figura 8: Defeito ósseo confeccionado.....	27
Figura 9: Equipamento Thera Lase® (DMC Equipamentos Ltda, São Carlos, Brasil).....	28
Figura 10: Fotomicroscópio <i>Nikon Eclipse 80i</i> , acoplado a um analisador de imagens (Image Pró-Plus® 5.1).....	30
Figura 11: Exemplo ilustrativo do processo de mensuração do tecido ósseo neoformado através do software Image Pró-Plus. As Áreas em verde correspondem ao tecido conjuntivo, enquanto que as áreas em vermelho o tecido ósseo neoformado e células em diferenciação na cor amarela.....	31
Figura 12: Fotomicrografia da região do defeito ósseo e tecidos adjacentes Grupo C -Controle (7 dias) , demonstrando a presença de tecido conjuntivo (seta amarela)e áreas de neoformação óssea (seta preta). Coloração tricômico de masson, aumento 2X.....	34
Figura 13: Fotomicrografia da região do defeito ósseo e tecidos adjacentes Grupo A –(Protocolo 1)- 7 dias , demonstrando a presença de tecido conjuntivo e áreas de neoformação óssea. Coloração tricômico de masson, aumento 2X.....	35

Figura 14: Fotomicrografia da região do defeito ósseo e tecidos adjacentes Grupo B (Protocolo 2) -7 dias , demonstrando a presença de tecido conjuntivo (seta amarela) e áreas de neoformação óssea (seta preta). Coloração tricômico de masson, aumento 2X.....	36
Figura 15: Fotomicrografia da região do defeito ósseo e tecidos adjacentes - Grupo C -Controle (15 dias) . Coloração tricômico de masson, aumento 2X.....	36
Figura 16: Fotomicrografia da região do defeito ósseo e tecidos adjacentes Grupo A (Protocolo 1)-15 dias . Coloração tricômico de masson, aumento 2X.....	37
Figura 17: Fotomicrografia da região do defeito ósseo e tecidos adjacentes Grupo B – (Protocolo 2) - 15 dias , demonstrando a presença de tecido conjuntivo (seta amarela) e áreas de neoformação óssea (seta preta). Coloração tricômico de masson, aumento 2X.....	37
Figura 18: Fotomicrografia da região do defeito ósseo e tecidos adjacentes Grupo C -Controle (45 dias) . Coloração tricômico de masson, aumento 2X.....	38
Figura 19: Fotomicrografia da região do defeito ósseo e tecidos adjacentes Grupo A (Protocolo 1) - 45 dias . Coloração tricômico de masson, aumento 2X.....	39
Figura 20: Fotomicrografia da região do defeito ósseo e tecidos adjacentes Grupo B (Protocolo 2) - 45 dias , demonstrando a presença de tecido conjuntivo e trabéculas curtas de tecido ósseo primário. Coloração tricômico de masson, aumento 2X.....	40
Figura 21: Histomorfometria de Tecido ósseo neoformado e tecido conjuntivo relativo ao grupo A (Protocolo 1), de acordo com o período de observação. Não há diferença estatisticamente significativa ($P>0.05$) de acordo com teste <i>t</i> -Student entre os resultados em relação aos períodos de 15 e 45 dias para ambos tecidos.....	41
Figura 22: Histomorfometria de Tecido ósseo neoformado e tecido conjuntivo relativo ao grupo B (Protocolo 2), de acordo com o período de observação. Não há diferença estatisticamente	

significativa ($P>0.05$) de acordo com teste t -Student entre os resultados em relação aos períodos de 15 e 45 dias para ambos tecidos.....42

Figura 23: Histomorfometria de Tecido ósseo neoformado e tecido conjuntivo relativo ao grupo C (controle), de acordo com o período de observação. Há diferença estatisticamente significativa (*) e (**)($P<0.05$) de acordo com teste t -Student entre os resultados em relação aos períodos de 15 e 45 dias para ambos tecidos.....43

Figura 24: Fração de Tecido Ósseo Neoformado (%) de acordo com os tratamentos e período de observação. Os valores relativos ao período de 15 dias dos grupo B e C são estatisticamente diferentes (*) de acordo com teste t -Student($P<0.05$). No período de 45 dias os resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas de acordo com teste ANOVA e Tukey ($P>0.05$).....45

Figura 25: Fração de Tecido Conjuntivo (%) de acordo com os tratamentos e períodos de observação. Os valores relativo ao período de 15 dias dos grupos B e C são estatisticamente diferentes (*)de acordo com teste t -Student($P<0.05$). No período de 45 dias os resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas de acordo com teste ANOVA e Tukey ($P>0.05$).....46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fração (%) em área do Tecido ósseo neoformado obtido por Histomorfometria, de acordo com o período de observação e tratamento.....	44
Tabela 2: Fração (%) em área do Tecido conjuntivo obtido por Histomorfometria, de acordo com o período de observação e tratamento.....	44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO/REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2 JUSTIFICATIVA.....	19
3 OBJETIVO.....	22
3.1 Geral.....	22
3.2 Específicos.....	22
4 METODOLOGIA.....	23
4.1 Procedimentos cirúrgicos.....	24
4.2 Laserterapia.....	29
4.3 Análise Microscópica.....	30
4.4 Espectroscopia de Absorção Atômica.....	32
4.5 Análise dos Resultados.....	33
5 RESULTADOS.....	35
5.1 Descrição microscópica.....	35
5.2 Histomofometria.....	42
5.3 Espectroscopia de Absorção Atômica.....	48
6 DISCUSSÃO.....	50
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
REREFENCIAS.....	55
ANEXO 1– Parecer de Aprovação do Comitê de Ética.....	57
ANEXO 2– Menção Honrosa.....	58

Introdução

1 INTRODUÇÃO/REVISÃO DE LITERATURA

A regeneração óssea é um dos processos de reparo mais importantes do corpo porque o osso, assim como o fígado, é um dos poucos órgãos aptos a sofrer regeneração espontânea em vez de apenas restaurar uma estrutura. Os ossos regeneram-se de duas formas distintas: por formação de calo ósseo de origem tanto periostal como endocondral e por regeneração intramembranosa. As mudanças associadas à regeneração óssea podem ser descritas como uma série de estágios ou fases, que ocorrem em seqüência, visando o processo de reparo ósseo. O processo de ossificação endocondral ocorre do centro da matriz óssea para as extremidades, e, na intramembranosa, ocorre de forma inversa, das extremidades para o centro. O crânio, por exemplo, se ossifica a partir das extremidades, onde as trabéculas se formam no interior de uma membrana do tecido conjuntivo. Neste processo, as trabéculas são constituídas por osso primário, que se forma a partir do mesênquima embrionário, sem um modelo cartilaginoso, sendo necessário que o suprimento sanguíneo e a base sólida para deposição óssea sejam mantidos de forma adequada. (LINDE et al., 1993).

A otimização da regeneração óssea é um assunto de grande interesse, pois está intimamente relacionada a vários tratamentos como as cirurgias ortopédicas, movimentação ortodôntica, e ósseo-integração de implantes dentários. Uma das formas que vem sendo utilizada com sucesso neste âmbito é a laserterapia de baixa intensidade. O efeito produzido pelo uso do laser terapêutico se caracteriza pelo princípio da biomodulação, isto é, a utilização da própria matéria-prima produzida por nosso organismo para produzir alterações a nível tecidual, que, por sua vez, contribui para a recuperação de diversas condições patológicas (GUPTA, 2001). A absorção da radiação laser pelos citocromos das mitocôndrias desencadeia uma cascata de eventos que resultam em uma maior produção de ATP e assim, fornece melhores condições para a

multiplicação celular (KARU, 1989), estimulando o processo de renovação tecidual (TIPHLOVA, 1989). Adicionalmente, os efeitos antiálgico, antiinflamatório, antiedematoso e normalizador circulatório produzidos pela laserterapia de baixa intensidade são freqüentemente citados na literatura (GUPTA, 2001).

Um estudo do efeito da laserterapia na regeneração óssea foi realizado por Marino (2003), através da experimentação animal, onde se verificou uma aceleração no processo de cicatrização de defeitos criados na tíbia de ratos. Os autores relacionaram os resultados satisfatórios ao possível aumento na vascularização, à reabsorção mais rápida de exudatos e ao aumento da atividade fagocitária dos macrófagos, como fatores que possam ter contribuído para uma regeneração óssea mais ativa.

Conforme os experimentos de Ninomiya et al (2007) a irradiação laser promove a atividade de um maior número de osteoblastos e faz decrescer o número de osteoclastos, sugerindo que a laserterapia ativa a regeneração óssea devido ao decréscimo do número e atividade dos osteoclastos. Estes resultados foram reforçados por Kim et al, 2007 e Fujita et al, 2008 que estudaram os efeitos da irradiação laser nos processos de osteoclastogênese na movimentação dentária induzida, relatando o estímulo ao aumento da velocidade de movimentação. O efeito da associação de drogas antinflamatórias e laserterapia de baixa intensidade no reparo ósseo foi estudado por Ribeiro & Matsumoto (2008) através de experimentação em modelo animal. Os autores demonstraram que esta terapia otimiza o processo de reparo ósseo, em ratos tratados com drogas antinflamatórias. Grande parte dos trabalhos de laserterapia relatados na literatura associados à regeneração óssea executados em modelo animal consiste de várias sessões de aplicação, por um longo período, o que pode dificultar o seu uso na prática clínica. Exemplificando, Ribeiro e Matsumoto (2008) e Matsumoto et al (2008) realizaram aplicações pontuais transcutâneas a cada 48 horas por todo o período experimental, que variou de 7 a 21

dias, utilizando laser infravermelho ($\lambda=735\text{nm}$ e fluência de $16\text{J}/\text{cm}^2$) . Kim et al (2007) e Fujita et al (2008) realizaram aplicações diárias por 7 dias. Utilizaram fluências de $9,6\text{J}/\text{cm}^2$ e $\lambda=808\text{nm}$ (infravermelho) e $54\text{J}/\text{cm}^2$ e $\lambda=810\text{nm}$ (infravermelho), respectivamente.

Fukuhara et al (2006) realizaram um extenso estudo utilizando cultura de osteoblastos da calvária de ratos e determinaram que a fluência de $3,75\text{J}/\text{cm}^2$ é a fluência “ótima” pois promoveu a maior formação de nódulos ósseos, em comparação às fluências inferiores ($1,25\text{ J}/\text{cm}^2$) e superiores ($6,25\text{ J}/\text{cm}^2$). Adicionalmente, a laserterapia é eficiente quando utilizada nos estágios iniciais, ou seja, sua eficácia é maior na fase de proliferação celular, em relação às fases de maturação da matriz óssea e de mineralização (FUKUHARA, et al, 2006).

Com isso, embasados nos resultados de Fukuhara et al (2006), propomos o estudo do efeito de um protocolo alternativo, de dosimetria de $3,75\text{J}/\text{cm}^2$ para aplicação diretamente no defeito ósseo, durante o procedimento cirúrgico, seguido de duas aplicações transcutâneas com fluências de $16\text{J}/\text{cm}^2$, utilizado por Matsumoto et al (2008). Desta forma, visamos estabelecer um método mais prático sob o ponto de vista de aplicações clínicas da laserterapia em regeneração óssea. Com isso, este estudo teve como foco principal a necessidade de se comparar o efeito deste novo protocolo em relação aos protocolos que têm sido adotados para esta mesma finalidade e, para este fim, adotamos o procedimento adotado por Matsumoto et al (2008) como referência. Para tanto foi utilizado o modelo de craniotomia em ratos, que foram submetidos aos tratamentos e a avaliação dos protocolos será realizada mediante as análises do volume ósseo neoformado, através da histomorfometria, e pela medida da concentração de cálcio, que será feita pela espectroscopia de absorção atômica.

Justificativa

2 JUSTIFICATIVA

A laserterapia de baixa intensidade é reconhecidamente um método capaz de otimizar a regeneração óssea. No entanto, os experimentos *in vivo* envolvem protocolos contendo várias sessões de aplicações do laser, o que pode dificultar o procedimento na prática clínica. Com isso, baseados na literatura propomos um protocolo alternativo, com um número menor de aplicações. Neste protocolo utilizaremos resultados da dosimetria laser de experimentos *in vitro*, onde se aplica o laser diretamente nas células, a fluência ideal, e no período onde no qual a eficácia do tratamento é maior, de acordo com dados da literatura.

Com isso, se faz necessário um estudo comparativo entre os dois protocolos. Adicionalmente o efeito geral da laserterapia realizados pelos dois protocolos foi avaliado através da comparação dos resultados com o grupo controle, o qual não foi submetido a nenhum tratamento.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é comparar os efeitos da laserterapia para regeneração óssea obtidos por dois protocolos diferentes. Adicionalmente, os efeitos dos dois tratamentos foi avaliado em relação ao grupo controle.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar quantitativamente a neoformação óssea em defeitos críticos em calvária de ratos estimulados por radiação laser de baixa intensidade utilizando dois protocolos diferentes, ao longo de 3 períodos.
- Avaliar o efeito da aplicação de laser durante o procedimento cirúrgico, frente ao uso somente de aplicações subcutâneas, realizadas durante o mesmo período experimental, de 7 dias, pela comparação dos resultados obtidos neste período dos grupos A e B
- Avaliar o efeito de sessões de laserterapia em períodos posteriores a 7 dias, através da comparação dos resultados dos grupos A e B obtidos nos períodos de 15 e 30 dias
- Comparar a mineralização óssea na região de neoformação, 45 dias após o experimento, através da medida da concentração de cálcio obtidos após os tratamentos e também em relação ao grupo controle.

Metodología

4 METODOLOGIA

Foram utilizados neste estudo, 45 ratos albinos *Wistar*, pesando em média 200g (8 semanas) oriundos do biotério da Universidade do Sagrado Coração, mantidos em gaiolas de polietileno, alimentados com água e ração, num ambiente de temperatura e luz controladas. Os ratos foram aleatoriamente distribuídos em 3 grupos experimentais:

GRUPO A – Protocolo 1 de laserterapia

GRUPO B – Protocolo 2 de laserterapia

GRUPO C – Controle

A análise de neoformação óssea está sendo realizada nos períodos de 7, 15, e 45 dias. Após estes períodos de preservação, os animais foram eutanasiados e a área contendo o defeito será coletada para realização de análise microscópica. Uma porção das peças referentes ao período de 45 dias foi removida e destinada para determinação da concentração de cálcio por espectroscopia de absorção atômica (AAS).

4.1 Procedimentos Cirúrgicos

As cirurgias ocorreram no Biotério da Universidade do Sagrado Coração – USC. Para realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram submetidos à medicação pré-anestésica com Atropina numa dose de 0,1ml por animal, intraperitonal e, em seguida, anestesia geral através da injeção de cloridrato de Cetamina e Xilasina, associados numa relação de 1:1, com dose de 0,1 ml/100g de peso corpóreo. Inicialmente serão realizados os procedimentos de

tricotomia na região da calota craniana seguida de assepsia com PVPI (polivinilpiridona) tópico, conforme as figuras 1 e 2.



Figura 1: Medicamentos que serão utilizados para os procedimentos de anestesia: Cloridrato de Cetamina e Xilazina - Cetamin® e Xilazin®, respectivamente.



Figura 2: Tricotomia da região da calota craniana

A área a ser operada foi isolada com campos cirúrgicos estéreis. Foi realizada uma incisão mucoperiostal linear, de aproximadamente 1,5cm no plano sagital mediano do osso parietal com lâmina de bisturi número quinze. Em seguida, dissecação cuidadosa com destaca-periósteo para expor a superfície óssea e seqüencialmente a divulsão muscular plano a plano do retalho com espátula, conforme ilustrados nas figuras 3, 4, 5 e 6.



Figura 3: Incisão linear da pele, utilizando lâmina de bisturi nº 15



Figura 4: Descolamento muco-periostéo

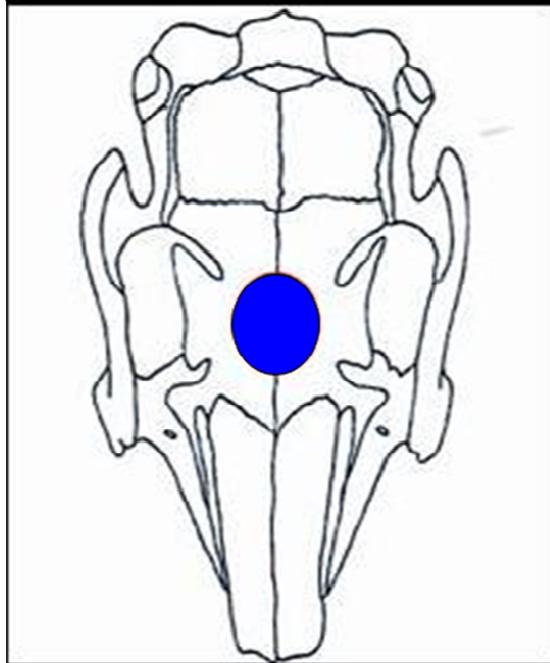


Figura 5: Modelo esquemático da região do defeito ósseo



Figura 6: Calvária exposta, observar a sutura coronal na linha média

O defeito ósseo foi criado no centro da calvária do rato, com uma broca trefina de 8mm de diâmetro, usando um motor de baixa rotação, sob irrigação constante e abundante de solução

fisiológica. Foi removido todo osso cortical e esponjoso, expondo a membrana meníngea, conforme ilustrado nas figuras 6, 7, e 8.



Figura 7: Defeito crítico sendo confeccionado com broca Trefina de 8 mm

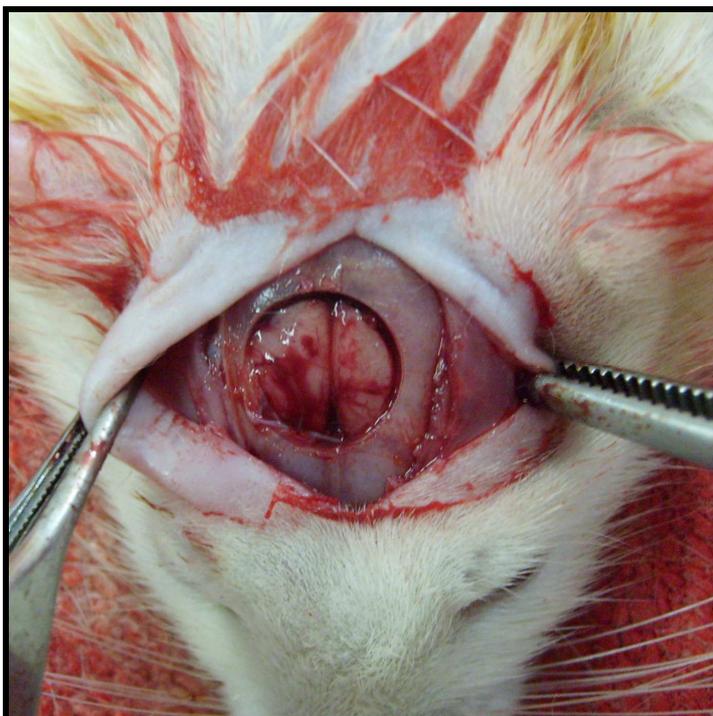


Figura 8: Defeito ósseo confeccionado.

Os procedimentos de laserterapia foram realizados segundo a metodologia descrita a seguir, finalizando com a manobra de síntese, onde realizou-se a sutura do tecido, com fio de sutura seda 4.0.

4.2 Laserterapia

Foi utilizado o equipamento laser semiconductor Thera Lase[®] (DMC Equipamentos Ltda, São Carlos, Brasil) ajustado para o comprimento de onda $\lambda=830\text{nm}$ (infravermelho), potência 20mW, no modo contínuo. Neste equipamento, tempo de aplicação é ajustado automaticamente de acordo com a dosimetria e a potência. A figura a seguir, ilustra o equipamento utilizado nesse estudo.

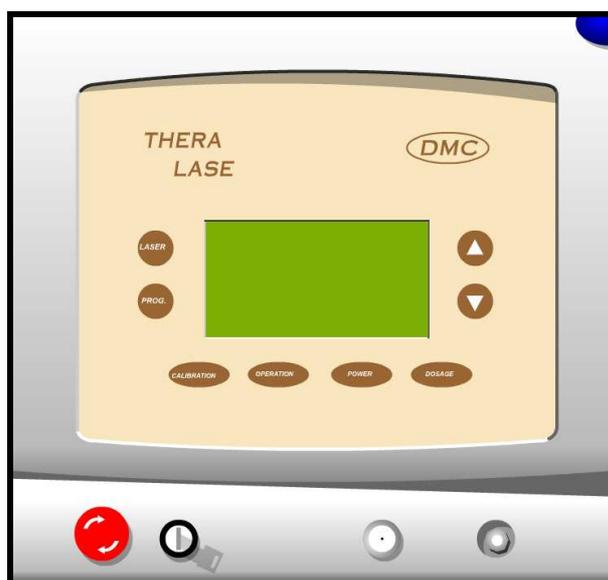


Figura 9: Equipamento Thera Lase[®] (DMC Equipamentos Ltda, São Carlos, Brasil)

O Protocolo 1 consistiu de 4 aplicações transcutâneas pontuais, equidistantes entre si ao redor do defeito, aplicados a uma distância aproximada de 1mm da borda do mesmo, com

fluência de $16\text{J}/\text{cm}^2$. As aplicações ocorrem a cada 48 horas, iniciando-se 24 horas após a cirurgia, estendendo-se por 15 dias. Este protocolo foi adotado ao grupo A.

O Protocolo 2 consistiu de três aplicações: a primeira durante a cirurgia, diretamente no defeito em quatro pontos como descrito no protocolo 1, com fluência de $3,75\text{J}/\text{cm}^2$, seguida de duas aplicações transcutâneas 48 e 120 horas após a cirurgia, com fluência de $16\text{J}/\text{cm}^2$, em quatro pontos, e foi aplicado ao grupo B.

Os animais do grupo controle (C) não foram submetidos a tratamento, no entanto, foram manuseados da mesma forma que os grupos tratados.

Após os períodos de preservação de 7, 15 e 45 dias, 5 animais de cada grupo foram eutanasiados com superdosagem de anestésico geral (Ketamin®) e as peças contendo o defeito ósseo coletadas e fixadas em formol 10% por 92 horas. As peças referentes ao período de 45 dias foram cortadas ao meio, usando um Micrótomo de tecido duro pertencente ao Departamento de Física e Matemática da USP-Ribeirão Preto. Uma das metades de cada peça foi destinada a preparação microscópica, e a outra, estão sendo preparadas para a realização dos experimentos de espectroscopia de absorção atômica.

4.3 Análise Microscópica

Após fixação das peças em formol a 10% por 92 horas, foi realizada a descalcificação pelo método Morse (solução aquosa de ácido fórmico/citrato de sódio) e inclusão em parafina, com o qual os cortes microscópicos foram obtidos no sentido longitudinal com seis micrômetros de espessura e corados pelos métodos da hematoxilina/eosina e Tricrômico Masson.

As lâminas foram observadas no fotomicroscópio *Nikon Eclipse 80i*, acoplado a um analisador de imagens (Image Pró-Plus® 5.1). Todas as imagens foram salvas para posterior

análise cuidadosa de todas as estruturas e tecidos presentes, observando-se principalmente a neoformação óssea. A fração de tecido ósseo maduro será determinada na região do defeito, através do software Image Pró-Plus® 5.1.

As figuras 10 e 11 ilustram o equipamento que será utilizado na sequências pra captura de imagens, transferência ao software Image Pró-Plus® 5.1., para a realização de morfometria e quantificação de osso neoformado.



Figura 10: Fotomicroscópio *Nikon Eclipse 80i*, acoplado a um analisador de imagens (Image Pró-Plus® 5.1).

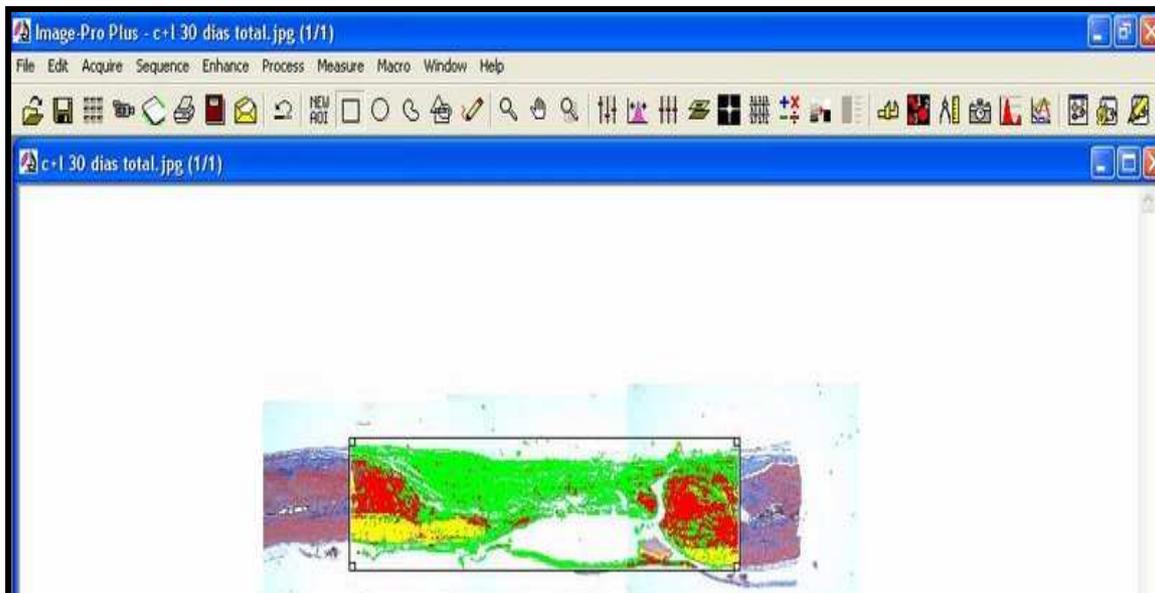


Figura 11: Exemplo ilustrativo do processo de mensuração do tecido ósseo neoformado através do software Image Pró-Plus. As Áreas em verde correspondem ao tecido conjuntivo, enquanto que as áreas em vermelho o tecido ósseo neoformado e células em diferenciação na cor amarela.

4.4 Espectroscopia de Absorção Atômica (AAS)

Uma fração do tecido neoformado na região do defeito ósseo foi extraída das peças do período de 45 dias de cada grupo bem como do tecido hospedeiro. Após a determinação da massa através de balança analítica, estas amostras foram dissolvidas em ácido nítrico e esta solução foi posteriormente diluída para leitura no Espectrômetro Shimadzu modelo AA680, pertencente ao Departamento de Química – USP-RP para a determinação da concentração de Cálcio presente nas amostras.

4.5 Forma de Análise dos Resultados

A análise macroscópica foi realizada pela descrição geral das peças coletadas após a cirurgia, estabelecendo-se uma comparação entre os tratamentos e o grupo controle. As características mais relevantes foram registradas através de fotografias obtidas com lente de aproximação.

Na análise microscópica, inicialmente as lâminas foram descritas em toda extensão do defeito, salientando os aspectos relacionados ao processo regenerativo. A análise quantitativa (histomorfometria) foi realizada pela mensuração da fração de tecido ósseo maduro na região do defeito, e também pela quantidade de tecido conjuntivo presente no local do defeito ósseo através do software Image Pró-plus® 5.1. Os resultados de cada grupo e período foram representados pelo valor médio e desvio padrão. Estes resultados foram avaliados estatisticamente pelo teste estatístico *t*-Student, considerando que as médias foram estatisticamente significativas quando $P < 0.05$.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Descrição microscópica

A descrição minuciosa das lâminas procedeu-se por profissional especializado que avaliou as particularidades de cada espécime, de acordo com os períodos estudados.

No Grupo C (Controle) aos 7 dias (figura 12), os defeitos apresentaram-se preenchidos por tecido conjuntivo em estágio de organização, altamente vascularizado. Observou-se também discreto infiltrado inflamatório com exceção de um espécime que apresentou intenso infiltrado inflamatório na região central do defeito com presença de células gigantes multinucleadas. Alguns espécimes apresentaram discretas áreas de osteogênese com formação de tecido ósseo primário.

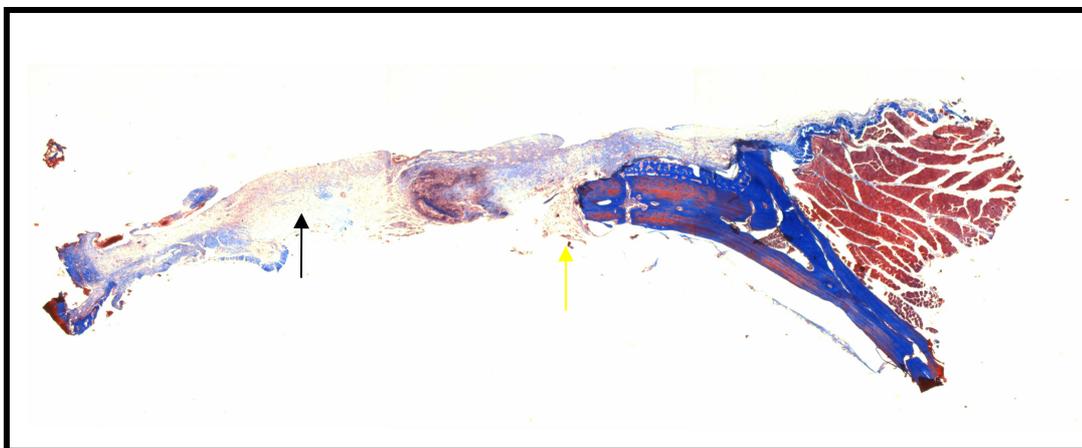


Figura 12: Fotomicrografia da região do defeito ósseo e tecidos adjacentes **Grupo C - Controle (7 dias)**, demonstrando a presença de tecido conjuntivo (seta amarela) e áreas de neoformação óssea (seta preta). Coloração tricômico de masson, aumento 2X.

O grupo A, que foi submetido à laserterapia Protocolo 1, aos 7 dias apresentou tecido conjuntivo fibroso em organização ricamente vascularizado. Observaram-se áreas de infiltrado

inflamatório mononuclear de baixa intensidade. Discreta presença de tecido ósseo primário a partir das bordas do defeito cirúrgico foi notada (figura 13).

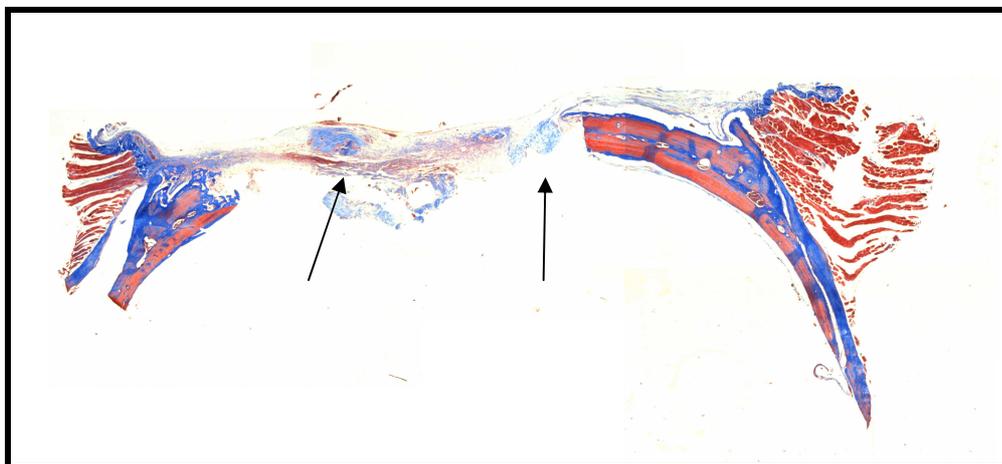


Figura 13: Fotomicrografia da região do defeito ósseo e tecidos adjacentes Grupo A – (Protocolo 1)- 7 dias, demonstrando a presença de tecido conjuntivo e áreas de neoformação óssea. Coloração tricômico de masson, aumento 2X.

O grupo B referente ao tratamento com laserterapia Protocolo 2, aos 7 dias apresentou padrão semelhante aos outros grupos no mesmo período, demonstrando que a aplicação do laser diretamente no local do defeito na dosimetria programada não levou à necrose tecidual ou outros efeitos indesejados. Destaca-se as áreas de osteogênese permeando as bordas do defeito. Também pode-se observar infiltrado inflamatório com presença de células gigantes multinucleadas (figura 14).

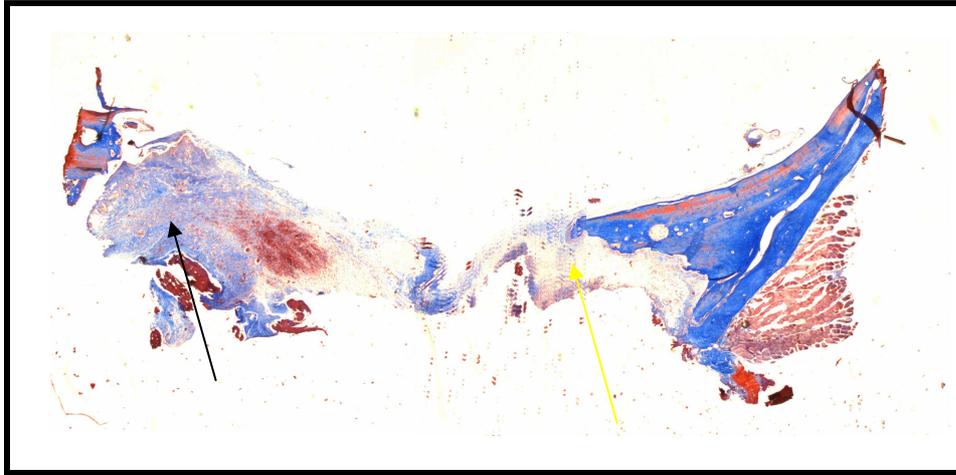


Figura 14: Fotomicrografia da região do defeito ósseo e tecidos adjacentes **Grupo B (Protocolo 2) -7 dias**, demonstrando a presença de tecido conjuntivo (seta amarela) e áreas de neoformação óssea (seta preta). Coloração tricômico de masson, aumento 2X.

No Grupo C (controle), aos 15 dias, observou-se a área do defeito preenchida por tecido conjuntivo fibroso em organização, intenso infiltrado inflamatório em alguns espécimes. Os defeitos cirúrgicos apresentaram áreas discretas de osteogênese predominantemente das bordas, conforme a figura 15.

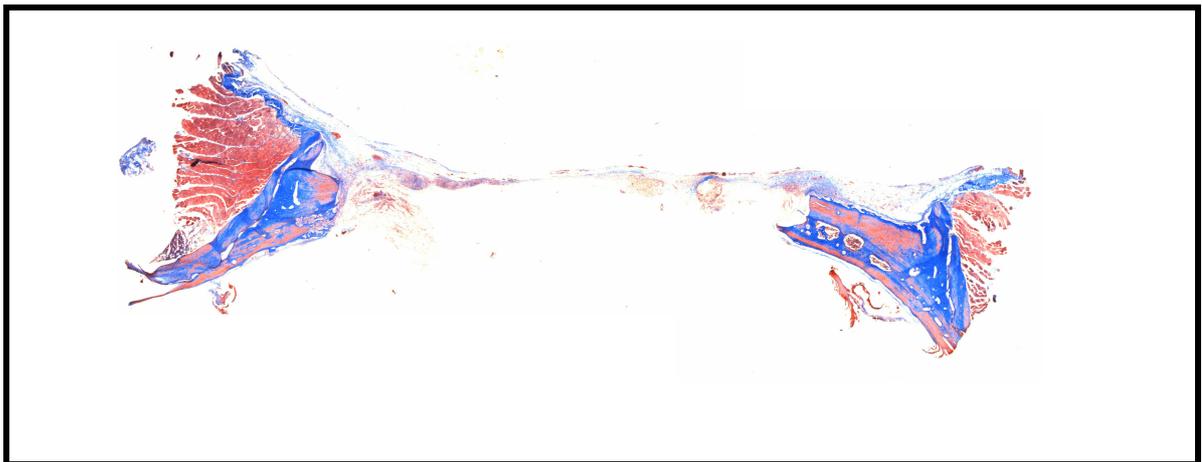


Figura 15: Fotomicrografia da região do defeito ósseo e tecidos adjacentes - **Grupo C - Controle (15 dias)**. Coloração tricômico de masson, aumento 2X.

Nas amostras relativas ao Grupo A (Protocolo 1) aos 15 dias, observou-se um padrão semelhante encontrado no grupo controle. Conjuntivo fibroso em organização permeando infiltrado inflamatório mononuclear. Áreas de formação de osso primário encontrados nas bordas do defeito cirúrgico (figura 16).

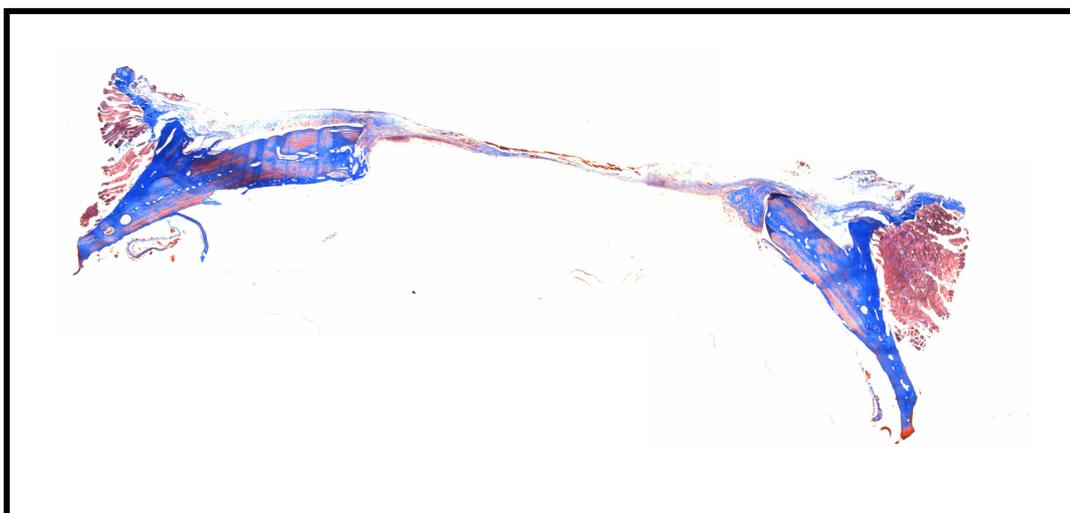


Figura 16: Fotomicrografia da região do defeito ósseo e tecidos adjacentes **Grupo A (Protocolo 1)-15 dias**. Coloração tricômico de masson, aumento 2X.

Na amostras do Grupo B (Protocolo 2), aos 15 dias, observou-se que os defeitos apresentam-se preenchidos por tecido conjuntivo fibroso, com discreto infiltrado inflamatório. Áreas osteogênicas discretas puderam ser observadas junto à parede do defeito cirúrgico (figura 17).

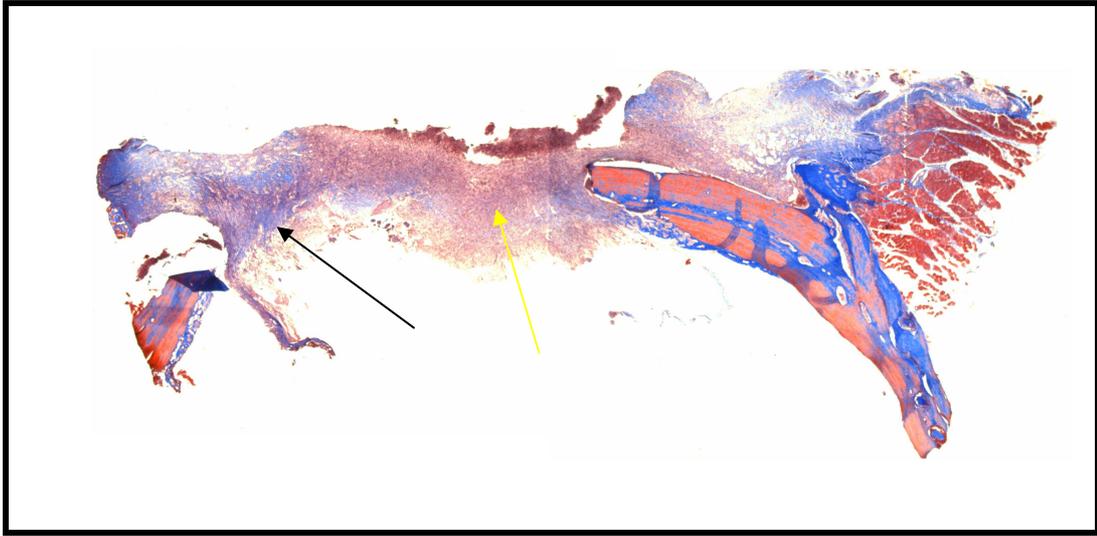


Figura 17: Fotomicrografia da região do defeito ósseo e tecidos adjacentes **Grupo B – (Protocolo 2) - 15 dias**, demonstrando a presença de tecido conjuntivo (seta amarela) e áreas de neoformação óssea (seta preta). Coloração tricômico de masson, aumento 2X.

Os defeitos do grupo C (Controle), aos 45 dias, apresentam-se preenchidos por uma delgada camada de tecido conjuntivo fibroso em organização. Observou-se também a presença de infiltrado inflamatório discreto e difuso. Observou-se também discreta presença de células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho. Nota-se atividade osteogênica nas bordas do defeito ósseo, e também a presença de curtas trabéculas ósseas primárias, localizadas próximas a parede do defeito (figura 18).

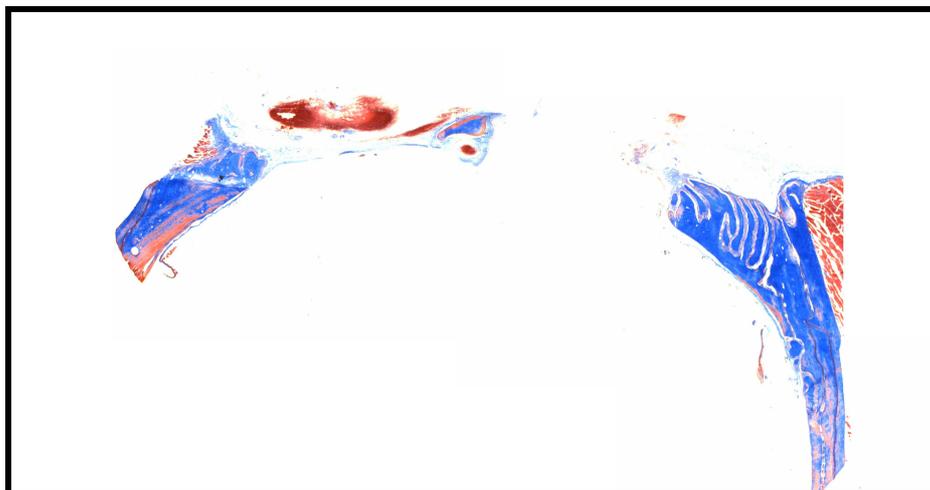


Figura 18: Fotomicrografia da região do defeito ósseo e tecidos adjacentes **Grupo C - Controle (45 dias)**. Coloração tricômico de masson, aumento 2X.

No Grupo A (Protocolo 1), aos 45 dias, observou-se a presença de tecido conjuntivo fibroso organizado de caráter osteogênico, alguns espécimes mostraram presença de infiltrado inflamatório com presença de células gigantes (fio-de-sutura). Pode-se observar a presença trabéculas curtas de tecido ósseo primário, permeadas por células osteoblásticas na porção central do defeito, bem como nas regiões mais periféricas (bordas). O tecido ósseo neoformado encontra-se em estágio de amadurecimento, caracterizado por linhas basofílicas de reversão (figura 19).

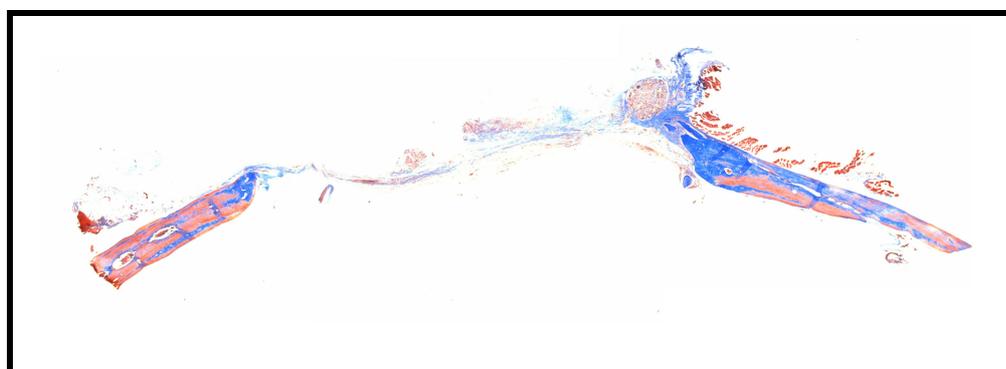


Figura 19: Fotomicrografia da região do defeito ósseo e tecidos adjacentes **Grupo A (Protocolo 1) - 45 dias**. Coloração tricômico de masson, aumento 2X.

Observou-se no grupo B (Protocolo 2), aos 45 dias, a presença de tecido conjuntivo organizado e fibroso preenchendo a intimidade do defeito cirúrgico. Discretas áreas apresentando infiltrado inflamatório. Esse grupo se caracterizou pela formação óssea discreta nas bordas do defeito. Foi observado em um espécime trabéculas curtas de tecido ósseo primário (figura 20).

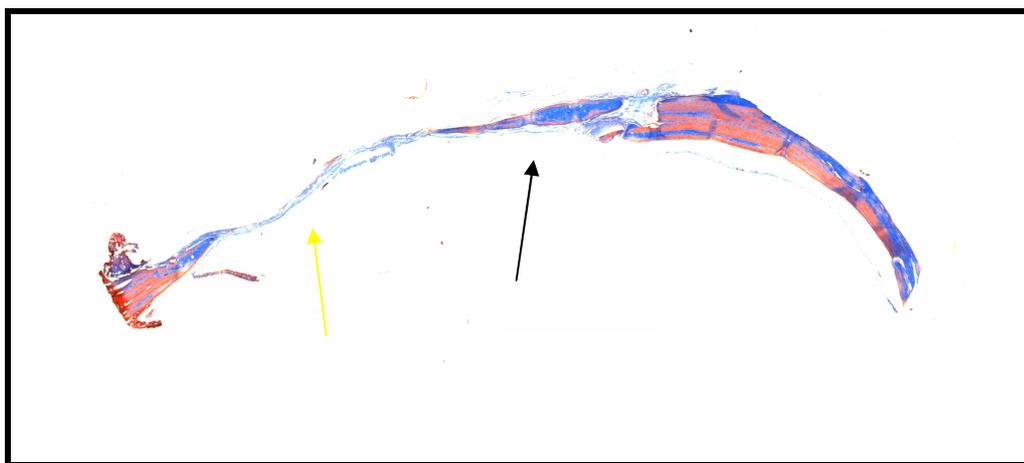


Figura 20: Fotomicrografia da região do defeito ósseo e tecidos adjacentes **Grupo B (Protocolo 2) - 45 dias**, demonstrando a presença de tecido conjuntivo e trabéculas curtas de tecido ósseo primário. Coloração tricômico de masson, aumento 2X.

5.2 Histomorfometria

As figuras 21, 22 e 23 mostram através de gráficos os resultados da histomorfometria de Tecido ósseo Neoformado e tecido conjuntivo relativos aos Grupos A (Protocolo 1), B (protocolo 2) e C (controle) de acordo com os períodos de observação. Os resultados expressam a média e o desvio padrão relativos aos 5 animais de cada grupo e cada período. Em relação ao período de 7 dias, não se pode quantificar estas estruturas com precisão.

As tabela 1 e 2 resumizam os resultados da histomorfometria do tecido ósseo neoformado e do tecido conjuntivo, respectivamente, de acordo com o período e tratamento. Os dados representam a média e o desvio padrão relativo às 5 amostras por grupo e por período. As figuras 24 e 25 mostram a comparação entre os tratamentos de acordo com os períodos de observação através da evolução da fração de tecido ósseo neoformado e tecido conjuntivo.

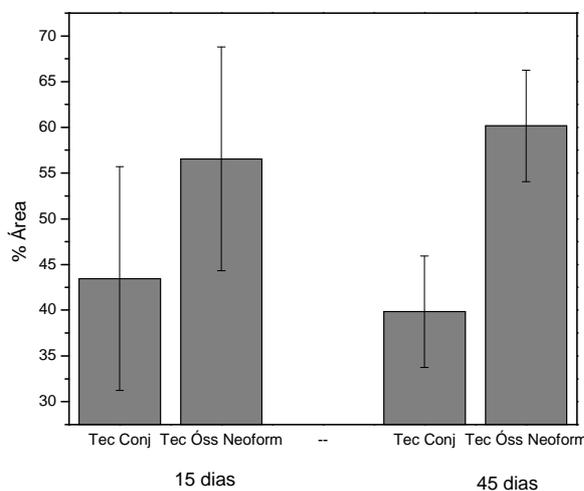


Figura 21: Histomorfometria de Tecido ósseo neoformado e tecido conjuntivo relativo ao grupo A (Protocolo 1), de acordo com o período de observação. Não há diferença estatisticamente significativa ($P>0.05$) de acordo com teste *t*-Student entre os resultados em relação aos períodos de 15 e 45 dias para ambos tecidos.

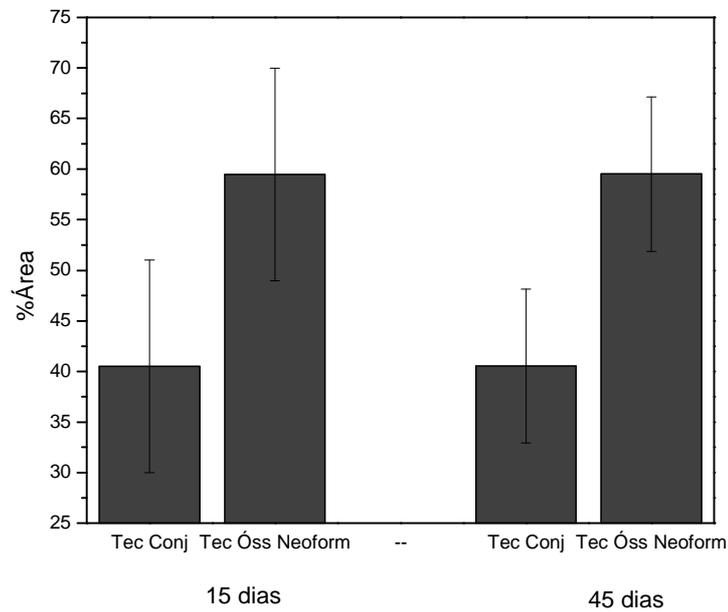


Figura 22: Histomorfometria de Tecido ósseo neoformado e tecido conjuntivo relativo ao grupo B (Protocolo 2), de acordo com o período de observação. Não há diferença estatisticamente significativa ($P>0.05$) de acordo com teste *t*-Student entre os resultados em relação aos períodos de 15 e 45 dias para ambos tecidos.

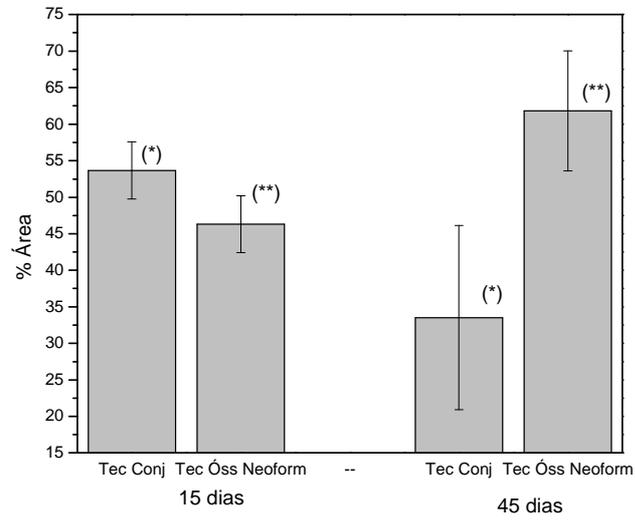


Figura 23: Histomorfometria de Tecido ósseo neoformado e tecido conjuntivo relativo ao grupo C (controle), de acordo com o período de observação. Há diferença estatisticamente significativa (*) e (**)($P < 0.05$) de acordo com teste t -Student entre os resultados em relação aos períodos de 15 e 45 dias para ambos tecidos.

Tabela 1: Fração (%) em área do Tecido ósseo neoformado obtido por Histomorfometria, de acordo com o período de observação e tratamento.

Período	Grupo A	Grupo B	Grupo C
15 dias	56 ± 10	59 ± 10	46 ± 4
45 dias	60 ± 6	59 ± 7	62 ± 8

Tabela 2: Fração (%) em área do Tecido conjuntivo obtido por Histomorfometria, de acordo com o período de observação e tratamento

Período	Grupo A	Grupo B	Grupo C
15 dias	43±10	40±10	54±4
45 dias	40±6	40±8	33±10

Ainda, procedeu-se o Teste estatístico *t*-Student, ANOVA e Tukey comparando todos os grupos estudados nos períodos de 15 e 45 dias, que apresentou os seguintes resultados:

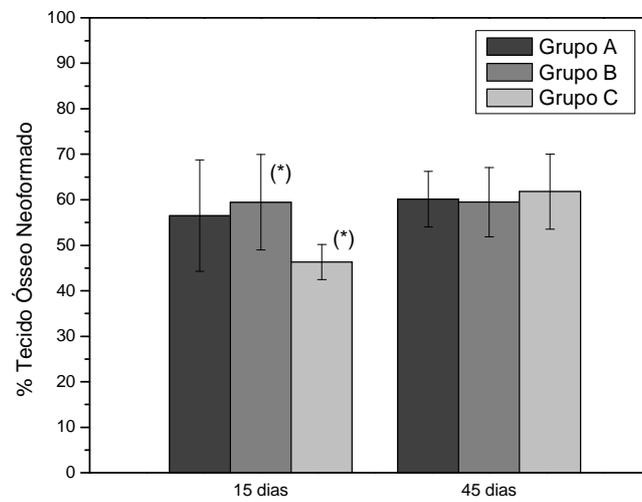


Figura 24: Fração de Tecido Ósseo Neoformado (%) de acordo com os tratamentos e período de observação. Os valores relativos ao período de 15 dias dos grupo B e C são estatisticamente diferentes (*) de acordo com teste *t*-Student ($P < 0.05$). No período de 45 dias os resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas de acordo com teste ANOVA e Tukey ($P > 0.05$)

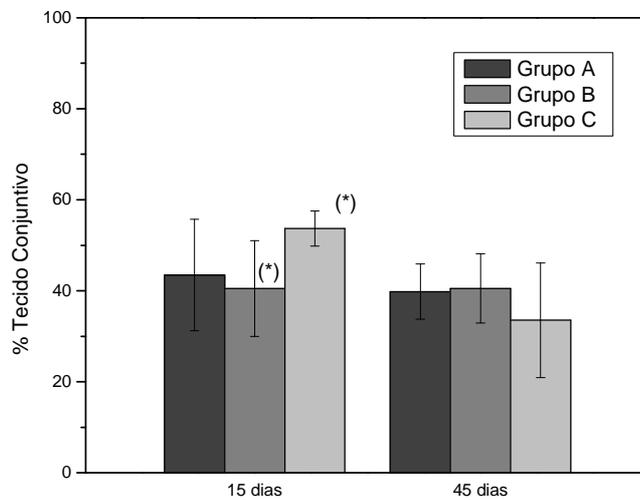


Figura 25: Fração de Tecido Conjuntivo (%) de acordo com os tratamentos e períodos de observação. Os valores relativo ao período de 15 dias dos grupos B e C são estatisticamente diferentes (*) de acordo com teste *t*-Student ($P < 0.05$). No período de 45 dias os resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas de acordo com teste ANOVA e Tukey ($P > 0.05$)

5.3 Espectroscopia de Absorção Atômica (AAS)

Não foi possível a retirada precisa somente do tecido relativo ao defeito ósseo, devido à imprecisão na determinação desta interface. Os valores típicos da concentração de Cálcio na calvária de ratos, de acordo com a metodologia encontrada foi de 13 a 18%.

Discussão

6 DISCUSSÃO

A otimização da regeneração óssea tem seu destaque em diversas publicações científicas e atualmente nos deparamos com a necessidade de pesquisas com o intuito de minimizar as sessões clínicas de aplicação terapêutica dos lasers de baixa intensidade. Marino em 2003 realizou um estudo do efeito da laserterapia na regeneração óssea, onde o mesmo verificou uma aceleração no processo de cicatrização de defeitos criados na tíbia de ratos, ou seja utilizou o modelo animal com a finalidade de estudar a regeneração óssea induzida pela laserterapia. Os autores relacionaram os resultados satisfatórios ao possível aumento na vascularização, à reabsorção mais rápida de exudatos e ao aumento da atividade fagocitária dos macrófagos, como fatores que possam ter contribuído para uma regeneração óssea mais ativa.

Neste trabalho pode-se verificar que a histomorfometria é uma potencial ferramenta para análise quantitativa dos processos relacionados à cicatrização óssea, uma vez que o aumento de tecido ósseo neoformado e a redução de tecido conjuntivo foram observados nos resultados do grupo controle, com diferenças estatisticamente significativas entre os períodos.

Fukuhara e colaboradores em 2006, afirmam que a laserterapia é eficiente quando utilizada nos estágios iniciais, ou seja, sua eficácia é maior na fase de proliferação celular, em relação às fases de maturação da matriz óssea e de mineralização. Na análise comparativa, a histomorfometria de tecido ósseo neoformado dos grupos tratados com laser (A e B) não mostram diferenças entre os períodos de 15 e 45 dias, para ambos grupos, indicando que o laser atua nos primeiros estágios do processo de reparo. Este fato pode ser comprovado na comparação entre o grupo B, no qual foi utilizado o protocolo proposto neste trabalho, com o grupo controle (C), no período de 15 dias, uma vez que a fração de tecido ósseo neoformado é maior no grupo tratado, com diferenças estatisticamente significantes. O mesmo podemos afirmar para os

resultados do tecido conjuntivo, o grupo B no período de 15 dias apresentou menor resultado em relação ao grupo C (controle) com diferenças estatisticamente significativas.

A Espectroscopia de Absorção Atômica (AAS) possibilita a determinar da concentração de cálcio em tecidos do modelo animal adotado neste trabalho. Porém, devido à imprecisão na localização da interface osso hospedeiro/defeito, e por se tratar de uma técnica muito sensível, não foi possível a realização da análise comparativa neste trabalho. Futuramente, este modelo pode ser otimizado, utilizando-se um marcador para delimitar a área cirúrgica (através de materiais de preenchimento como guta percha) e assim poder utilizar a AAS com grande precisão.

As dosagens utilizadas no protocolo proposto nesse estudo foram embasadas nos resultados de Fukuhara et al (2006), onde se propomos um protocolo alternativo, de dosimetria de $3,75\text{J}/\text{cm}^2$ para aplicação diretamente no defeito ósseo, durante o procedimento cirúrgico, seguido de duas aplicações transcutâneas com fluências de $16\text{J}/\text{cm}^2$, utilizado por Matsumoto et al (2008). Os resultados quantitativos deste trabalho corroboram com os dados da literatura já citados (Marino 2003; Fukuhara, et al. 2006) mostrando que a laserterapia realizada pelo protocolo proposto atua nos primeiros estágios do processo de regeneração ósseo. Sendo assim, este protocolo representa uma alternativa com maior viabilidade clínica, levando-se em consideração a redução do número de aplicações, implicando na redução de visitas clínicas e conseqüentemente a redução de custos.

Considerações Finais

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Laserterapia de Baixa intensidade é sem dúvida uma técnica de grande valia no que tange respeito da capacidade de acelerar a regeneração óssea. O protocolo apresentado neste trabalho demonstra que a laserterapia atua nos primeiros estágios do processo de regeneração óssea, constituindo uma alternativa com maior viabilidade clínica.

Referências

REFERÊNCIAS

GUPTA, A.K. et al. the influence of photodynamic therapy on the wound healing process in rats. **J. Biomet. Appl.**; 15:176-186, 2001.

FUJITA, S. et al; Low-energy laser stimulates tooth movement velocity via expression of RANK and RANKL. **Orthod Craniofac Res.**; 11:143–155, 2008.

FUKUHARA, E. et al; Optimal Low-Energy Laser Irradiation Causes Temporal G2/M Arrest on Rat Calvarial Osteoblasts. **Calcif Tissue Int**; 79:443-450, 2006.

KARU, T I. Fotobiology of low laser therapy, In: Letokov VS et a/, editors.Laser Science Technology, an International Handbook; **Harwood Academic**, v.8, London, 1989.

KIM, Y.D. et al; Effect of low level laser treatment during toothmovement-immunohistochemical study of RANKL,RANK, OPG: an experimental study in rats. **Laser Phys**; n 8; p616–623, 2007.

LINDE, A. et al. Osteopromotion: a soft-tissue exclusion principle using a membrane for bone healing and bone neogenesis. **J Periodontol.**, United States, v.64, suppl 11, p. 116-1128, nov. 1993.

MARINO, J.A.M. **Efeito do laser terapêutico de baixa potência sobre o processo de reparação óssea em tibia de rato.** 107p. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

NINOMIYA, T. et al. Increase of bone volume by a nanosecond pulsed laser irradiation is caused by a decreased osteoclast number and an activated osteoblasts. **Bone**; v.40, p.140-148; 2007.

MATSUMOTO, M.A; RIBEIRO D.A.; Low-level laser therapy improves bone repair in rats treated with anti-inflammatory drugs. **Journal of Oral Rehabilitation**, V. 35; p. 925–933, 2008

RIBEIRO, D. A.; MATSUMOTO, M.A.; FERRINO, R.V.; MONTELEONE, G.F.; Low-level laser therapy modulates cyclo-oxygenase-2 expression during bone repair in rats. **Lasers Med Sci.** 2008.

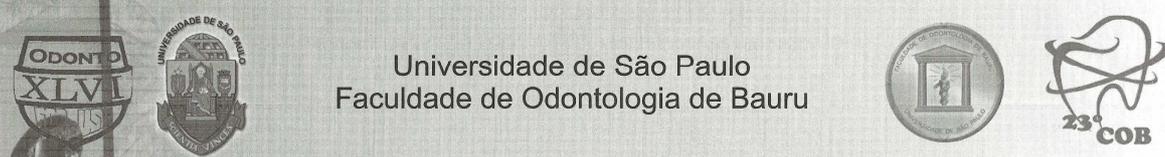
TIPHLOVA, O.A.; KARU, T. I. Role of primary effects: action of HeNe laser radiation on bacteriophage T4 – escherichia coli interation, **Radiobiologiya**, 25, p. 112-115. (in Russian). 1989.

Anexos

ANEXO 1 – Parecer de Aprovação do Comitê de Ética

	
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Protocolo n.º 100/09	
Título do Projeto: ESTUDO COMPARATIVO DE DOIS PROTOCOLOS DE LASERTERAPIA PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA	
Pesquisador (a) Responsável: ANGELA MITIE OTTA KINOSHITA	
Comitê de Ética: O CEP analisou, baseado em parecer competente, o presente projeto e o considerou aprovado.	
Data: 25/06/2009	
Assinatura do Presidente: 	
<i>Prof. Dr. Marcos da Cunha Lopes Virmond</i>	

ANEXO 2 – Menção Honrosa



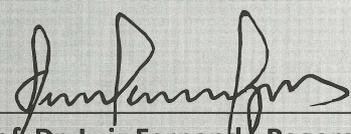
Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

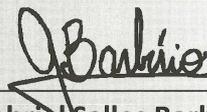
Menção Honrosa

A Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo através da Comissão Organizadora do 23º Congresso Odontológico de Bauru “Profª. Drª. Maria Fidela de Lima Navarro” atribui Menção Honrosa ao(à) aluno(a):

Leonardo Marques

Pelo trabalho “Estudo comparativo entre dois protocolos de Laserterapia para a Regeneração Óssea” na categoria Oral, área de Cirurgia, com os seguintes autores: Marques L*, Amadeu F, Holgado L, Francischone L, Kinoshita A.


Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro
Coordenador Científico do 23º COB


Gabriel Salles Barbério
Presidente do 23º COB

