



Universidade do Sagrado Coração - USC

**Alex Giuliano Bosco
Lucas Vaz Gallego Lima**

**Análise Histológica e Radiográfica da
Regeneração Óssea Estimulada por Irradiação
com Laser de Baixa Potência em Defeitos Criados
em Calvária de Ratos**

**Bauru
2007**



Universidade do Sagrado Coração - USC

**Alex Giuliano Bosco
Lucas Vaz Gallego Lima**

**Análise Histológica da Regeneração Óssea Estimulada
por Irradiação com Laser de Baixa Potência em
Defeitos Criados em Calvária de Ratos**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao centro de Ciências
Exatas e Naturais como parte dos
requisitos para obtenção do título
de bacharel em odontologia, sob
orientação da Prof^a. Ms. Márcia
Ferreira Vasconcelos Malmström.

**Bauru
2007**

B7427a

Lima, Lucas Vaz Gallego

Análise histológica da regeneração óssea estimulada por irradiação com laser de baixa potência em defeitos criados em calvária de ratos / Alex Giuliano Bosco, Lucas Vaz Gallego Lima – 2007.

61f.

Orientadora: Profa. Ms. Márcia Ferreira Vasconcellos Malmstrom

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Odontologia) - Universidade do Sagrado Coração – Bauru - São Paulo.

1. Laserterapia 2. Regeneração óssea 3. Defeitos ósseos
I. Lima, Lucas Vaz Gallego II. Malmstrom, Márcia Ferreira Vasconcellos III. Título

**Alex Giuliano Bosco
Lucas Vaz Gallego Lima**

**Análise Histológica e Radiográfica da Regeneração Óssea Estimulada
por Irradiação com Laser de Baixa Potência em Defeitos Criados em
Calvária de Ratos**

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao centro de Ciências Exatas e
Naturais como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em
odontologia, sob orientação da Prof^a. Ms. Márcia Ferreira Vasconcelos
Malmström.**

Banca examinadora:

Data e Local

Dedico este trabalho

...à minha **mãe** e ao meu **pai**

Que jamais mediram esforços, para me proporcionar todo amor, segurança e confiança de que necessitei para enfrentar os obstáculos que a vida me proporciona.

...A Deus,

Pela benção, proteção e orientação, colocando em meu caminho as pessoas certas quando mais necessitei, para que eu pudesse superar todos os obstáculos e atingir este objetivo.

À minha orientadora Professora Mestre **Márcia Ferreira Vasconcelos Malmström**, a minha gratidão pela oportunidade oferecida, bem como pela tolerância e dedicação na realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador nesse trabalho Prof. Ms. **Gustavo Campos Belmonte** que me incentivou em todos os momentos, me dando o exemplo de como age um verdadeiro mestre.

Ao prof. Dr. **Luiz Casati Álvares** que me proporcionou a realização de parte deste meu trabalho

Aos meus amigos colaboradores neste trabalho **Roberta Heiffig Handem** e **Marcelo Azenha** que me ajudaram em todo desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu amigo **Sérgio Henrique Pereira Moura**, responsável pelo biotério da Universidade do Sagrado Coração, pelo apoio e eficiência o trato com os animais durante a realização deste trabalho.

Às funcionárias **Maira Cistina Rondina** e **Terezinha Edna Morbi**, Técnicas de Laboratório da Universidade do Sagrado Coração, pela disposição com que colaboraram na elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Sérgio Augusto Catanzaro Guimarães**, mestre nato, que me orientou na leitura final das peças histológicas, proporcionando uma correta leitura dos resultados finais de trabalho.

Ao funcionário **Wilson Aparecido Orcini**, técnico do laboratório da Universidade do Sagrado Coração, pelo acompanhamento na descrição das lâminas histológicas no fim deste trabalho.

Aos meus irmãos **Bruno, Hugo e Bruna** que estiveram ao meu lado acompanhando e me dando forças quando mais necessitei.

A todos que indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho...
Meu sincero agradecimento.

Meta,
A gente busca.
Caminho,
A gente acha.
Desafio,
A gente enfrenta.
Desejo,
A gente mata.
Vida,
A gente inventa.
E
Sonho,
A gente realiza.

Sumário

Resumo.....	01
Abstract.....	02
Lista de Figuras.....	03
Proposição.....	12
1.Introdução.....	04
2. Desenvolvimento.....	08
2.1 Revisão de literatura.....	08
2.1.1- Defeitos.....	08
2.1.2- Laser.....	10
3. Materiais e métodos.....	13
3.1- Preparo das Peças.....	18
3.2 - Fixação das Peças.....	19
3.3 – Descalcificação e Diafanização.....	19
3.4 - Inclusão e Corte.....	20
3.5 - Processo de Coloração.....	20
3.6 - Análise Histológica.....	21
4. Resultados.....	22
5. Discussão.....	30
6. Conclusões.....	34
Referências bibliográficas.....	35

Resumo

Na Odontologia moderna, o uso de Laseres tem crescido muito, funcionando como uma opção conveniente aos demais equipamentos e técnicas já consagrados no tratamento das afecções da cavidade bucal. O presente estudo avaliou através da microscopia de luz transmitida, a regeneração de defeitos ósseos de dimensão crítica criados em calvária de ratos e tratados apenas com a técnica da Laserterapia. Um total de 24 animais foi dividido em dois grupos, compondo assim, os grupos experimental e controle. Todos os animais foram submetidos a procedimento cirúrgico no qual foi criado um defeito ósseo de 5mm de diâmetro na calvária e todos os defeitos foram preenchidos apenas por coágulo sanguíneo. Os animais do grupo experimental foram submetidos ao protocolo de estimulação da regeneração óssea através da aplicação de laser de baixa intensidade no local do defeito. Aos animais do grupo controle nenhuma medida foi instituída, justamente para que se possibilitasse a análise comparativa. Depois de completados os períodos de avaliação aos 15, 30 e 60 dias pós-operatório, os animais foram sacrificados e suas peças foram removidas para realização de tomada radiográfica e posteriormente foram submetidas aos processos de fixação, descalcificação, inclusão e corte para preparo das lâminas histológicas para análise dos resultados. Os resultados revelaram maior velocidade de proliferação e diferenciação celular nos defeitos ósseos do grupo experimental, bem como, maior quantidade trabéculas ósseas neoformadas. A técnica da Laserterapia favorece o processo cicatricial de defeitos ósseos e não oferece riscos ao processo regenerativo, desde que respeitado o seu protocolo de aplicação.

Palavras-chave: Laserterapia; Regeneração Óssea; Defeitos Ósseos.

Abstract

In the modern dentistry, the use of lasers has deeply grown, functioning as a convenient option to many equipment and consecrated techniques in the treatment of the affections of the mouth cavity. The present study evaluated through the microscopy of transmitted light, the regeneration of bone defects of critical dimension created in calvarial of rats and treated only with the technique of Laser therapy. A total of 24 animals was divided in two groups, composing, thus, the groups experimental and control. All the animals had been submitted to surgical procedure in which a bone defect of 5mm of diameter in the calvarial was created and all the defects had been filled only by coagulum sanguineous. The experimental group animals had been submitted to stimulation protocol of bone regeneration through the application of laser of low intensity in the the defect area. To the animals of the group control no measure was instituted, so that the comparative analysis was possible. After completed the periods of evaluation that were of 15, 30 and 60 days, the animals had been sacrificed and its parts removed and submitted to the processes fixation, decalcification, inclusion and cut for preparation of the histology's blades for analysis of the results. The results had shown to a greater speed in the proliferation and cellular differentiation on the experimental group as well a greater number of boned trabecular. The technology of the laser therapy showed to be efficient in the cicatrisation of bone defects and the regenerative process since that its protocol of application is followed.

Key-Word: Laser therapy; bone regeneration; bone defects

Lista de figuras

FIGURA 1: Desenho esquemático dos defeitos tratados no grupo controle. Pág. 15
FIGURA 2: Ilustrações da técnica cirúrgica (A - F). Pág. 16
FIGURA 3: Desenho esquemático da aplicação do laser o defeito cirúrgico. Pág. 18
FIGURA 4: Radiografia realizada em mamógrafo. Pág. 20
FIGURA 5: Fotomicrografia da região do defeito ósseo controle. 15 dias. Pág. 29
FIGURA 6: Fotomicrografia da região do defeito ósseo experimental. 15 dias. Pág. 30
FIGURA 7: Fotomicrografia da região do defeito ósseo controle. 30 dias. Pág. 31
FIGURA 8 Fotomicrografia da região próxima à margem do defeito ósseo experimental. 30 dias. Pág. 32
FIGURA 9: : Fotomicrografia da região do defeito ósseo controle. 60 dias. Pág. 33
FIGURA 10: Fotomicrografia da região do defeito ósseo experimental. 60 dias. Pág.34
FIGURA 11: Radiografia da região do defeito ósseo. Peça inicial. Pág. 35
FIGURA 12: Radiografia da região do defeito ósseo controle.15 dias Pág. 36.
FIGURA 13: Radiografia da região do defeito ósseo experimental. 15 dias. Pág. 37.
FIGURA 14: Radiografia da região do defeito ósseo controle. 30 dias Pág. 38.
FIGURA 15: Radiografia da região do defeito ósseo experimental. 30 dias. Pág. 39.
FIGURA 16: Radiografia da região do defeito ósseo controle. 60 dias Pág. 40.
FIGURA 17: Radiografia da região do defeito ósseo experimental. 60 dias. Pág. 41.

Proposição

A Laserterapia é reconhecidamente uma técnica bastante efetiva na Biomodulação celular, embora seu mecanismo de ação não seja completamente compreendido.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar microscopicamente, através de microscopia de luz transmitida, e radiograficamente a eficácia da laserterapia em defeitos de dimensão crítica criados em calvária de ratos.

Este comportamento foi avaliado em diferentes períodos, comparando os defeitos tratados e não tratados pela técnica da laserterapia.

1. Introdução

O emprego de lasers de baixa intensidade tem demonstrado resultados positivos nos processos biológicos e bioquímicos de reparo tecidual (OZAWA, 1998). A reconstrução de defeitos, com grande perda de tecido ósseo, representa um desafio para as cirurgias reconstrutivas.

Schimtz & Hollinger, 1986 e Kawamura & Urist, 1988 criaram o conceito de defeito crítico em cirurgia óssea no qual estabeleceram que, o defeito ósseo resultante de uma cirurgia de qualquer natureza quando ultrapassava uma determinada dimensão, que é própria para os diversos tipos ósseos e diversas espécies animais, não é passível de cicatrização por regeneração, mas, apenas por proliferação de tecido fibroso. Estes defeitos são constantemente encontrados em regiões acometidas previamente por tumores, cistos, infecções, traumas ou pós-cirúrgicos. Inúmeras estratégias visando estimular a cicatrização óssea têm sido estudadas e testadas, incluindo enxertos autógenos e alógenos de osso cortical, a utilização de fatores de crescimento (PDGF e PGFI), regeneração tecidual guiada, materiais derivados da matriz do esmalte e outros (BUSER, 1990; GESTRELIUS, 1997; LYNGSTADAAS, 2001).

Belmonte, 2001 afirma que na reconstrução de tais defeitos é necessária uma condição ideal para estimular a neoformação óssea, a fim de impedir o crescimento de tecido conjuntivo cicatricial para o interior do defeito ósseo o que impede a osteogênese. Para contornar este problema utilizam-se os procedimentos de regeneração óssea guiada (ROG), ou os procedimentos relacionados a enxertos ou implantes. Do ponto de vista da velocidade de regeneração óssea, a melhor opção é o osso autógeno, por ser rico em medula, apresentar propriedades osteoindutoras e osteocondutoras, não haver a possibilidade de rejeição e de ser facilmente incorporado ao leito receptor.

Enneking, 1980 e Brown, 1982 afirmam que enxertos autógenos requerem uma intervenção cirúrgica maior e estão associados a uma maior morbidade na região doadora incluindo a possibilidade de infecção, dor, fragilidade e a formação de hematomas. A aplicação de membranas nas técnicas de ROG é considerada uma modalidade de tratamento de alto custo, mesmas considerações feitas aos fatores de crescimento e derivados a matriz de esmalte (KHADRA, 2004).

Goldman, 1980 e Chapman, 1992 demonstraram que a utilização de osso alógeno ou xenógeno não é indicada por apresentar alto risco de reação imunológica e elevadas taxas de reabsorção.

Além dos materiais alógenos e autógenos existe a opção da substituição óssea por materiais naturais e sintéticos, que apresentam características de inércia, resistência física, durabilidade, elasticidade e fácil obtenção, como os polímeros reabsorvíveis e não reabsorvíveis, cerâmicas inertes, vidros cerâmicos bioativos, fosfato de cálcio e materiais derivados de estruturas naturais (DACULCI, 1997; BELMONTE, 2001).

Todos esses métodos e materiais vêm sendo pesquisados há décadas, sempre com o intuito de favorecer a regeneração de defeitos ósseos, impedindo a proliferação de tecido conjuntivo para o interior do defeito e, ainda, acelerando o processo de neoformação óssea.

Na Odontologia moderna, o uso de Lasers tem crescido consideravelmente, funcionando como uma opção conveniente aos demais equipamentos e técnicas já consagrados no tratamento das afecções da cavidade bucal. Na medicina, os lasers já são empregados há décadas nas mais variadas especialidades como oftalmologia, cirurgias gastro-intestinais, vasculares etc. Na odontologia os lasers surgiram no início da década de 80, inicialmente auxiliando procedimentos cirúrgicos como gengivectomia (Laser de alta potência). Hoje essa tecnologia se desenvolveu e os lasers são utilizados

como auxiliares em diagnóstico de lesões cariosas, cirurgias mucogengivais, cirurgias ósseas e, ainda, como auxiliares nos processos cicatriciais pós-cirúrgicos ou de lesões ulceradas, dentre outras, através do seu comprovado potencial antiinflamatório. Trata-se do Laser de Baixa Potência ou também conhecido como Laser de Baixa Intensidade ou ainda, Laser terapêutico (OSHIRI & CALDERHEAD, 1991), que confere efeitos analgésicos e antiinflamatórios às lesões ou injúrias nas quais ele é aplicado.

O termo laser é um acrônimo com origem na língua inglesa que significa *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, e vem a ser uma fonte de luz que produz um feixe monocromático, não difuso, de tamanho e formas constantes e que apresentam amplitudes idênticas, capaz de estimular a cicatrização tecidual (KANA, 1981; AALMEIDA-LOPEZ, 2004), aumentar a atividade dos fibroblastos e condrócitos (SCHULTZ, 1985; OZAWA, 1998), acelerar a síntese de colágeno (BOZATRA, 1984; THEODORO, 2002), diminuir o tempo regenerativo de lesões de tecidos neurosensoriais (ANDERS, 1993) e diminuir a dor (THEODORO, 2002).

Em um estudo realizado por Tang, 1986 foi demonstrado que a terapia com laser de baixa intensidade aumenta a divisão das células vermelhas do sangue, dos macrófagos, fibroblastos, condrócitos e osteoclastos no tecido ósseo. O Laser de Baixa Intensidade também aumenta a síntese de DNA e RNA representando uma maior atividade celular e um aumento na síntese de proteína (THEODORO, 2002).

Nesse contexto, o conceito de bioestimulação tecidual com a terapia do Laser de Baixa Intensidade vem atraindo especial atenção.

Recentemente, o uso de radiação a laser tem demonstrado ser uma alternativa terapêutica para o tratamento periodontal convencional (SCULEAN, 2004).

Os lasers de baixa intensidade como os de rubi, Hélio-neônio e de Arsênio-Gálio-Alumínio, possuem um efeito fotobiológico que promovem a aceleração dos

eventos do processo de cicatrização tecidual, atuando ao nível celular, através da interação fotoquímica, podendo promover um aumento do metabolismo celular e, conseqüentemente, induzir diferentes efeitos, como analgésico, antiinflamatório e reparador (THEODORO, 2002).

Em virtude da problemática por trás dos procedimentos regenerativos aplicados em defeitos ósseos e diante dos efeitos positivos do laser terapêutico como biomodulador celular, gerou-se uma necessidade de se avaliar, em laboratório, uma condição de tratamento para defeitos ósseos de dimensões críticas utilizando apenas a técnica de laserterapia que hoje em dia tem conquistado com maior acessibilidade o cotidiano do dentista em seu consultório.

Este trabalho tem por objetivo, avaliar através da microscopia de luz transmitida e radiografia realizada em mamógrafo, a regeneração de defeitos ósseos de dimensões críticas criados em calvária de ratos e tratados apenas com a técnica da Laserterapia.

2. Desenvolvimento

2.1 Revisão de literatura

2.1.1 - Defeitos

A reconstrução de defeito com grande perda de tecido ósseo representa um desafio para as cirurgias reconstrutivas. Estes defeitos são constantemente encontrados em regiões acometidas previamente por tumores, cistos, infecções, traumas ou pós-cirúrgicos. Inúmeras estratégias para estimular a cicatrização tecidual óssea têm sido estudadas e testadas, incluindo enxertos autógenos e alógenos de osso cortical, a utilização de fatores de crescimento (PDGF e PGFI), regeneração tecidual guiada, materiais derivados da matriz do esmalte e outros (BUSER, 1990; GESTRELIUS, 1997; LYNGTADAAS, 2001).

Procedimentos visando o reparo e a substituição de tecido ósseo perdido, por eventuais patologias ou traumas, têm sido avaliados de longa data. O tecido ósseo repara-se por processo de regeneração (CATANZARO GUIMARÃES 1982; HOLINGER & WONG 1960; GORANSSON et al. 1992 e BECKER 1995).

Schintz & Hollinger, 1986 e Kawamura & Urist, 1988 criaram o conceito de defeito crítico em cirurgia óssea no qual estabeleceram que, o defeito ósseo resultante de uma cirurgia de qualquer natureza quando ultrapassava uma determinada dimensão, que é própria para os diversos tipos ósseos e diversas espécies animais, não é passível de cicatrização por regeneração, mas, apenas por proliferação de tecido fibroso. Para contornar esse problema são utilizados enxertos e implantes que preenchem a loja cirúrgica e impedem o preenchimento da mesma por tecido conjuntivo fibroso

cicatricial, dando tempo para o lento processo de regeneração óssea, que gradualmente substitui o material implantado, ao que se denomina regeneração por substituição.

Enxertos ósseos são comumente utilizados em cirurgias ortopédicas reconstrutivas, na reparação de defeitos ósseos criados em cirurgias oncológicas, em infecções e traumas com perdas ósseas e em malformações congênitas. O material ósseo implantado impede a penetração de tecido conjuntivo, e serve de arcabouço para a regeneração óssea através da atividade osteoindutiva e osteocondutiva. As opções para enxerto ósseo incluem osso autógeno, osso alógeno, osso xenógeno, e substitutos ósseos (FRIENDLAENDER 1987; GOLBERG & STEVERSON 1987; LANE & SANDHU 1987).

Os caminhos que o processo de reparo pode seguir, de acordo com a localização e amplitude do defeito (AABOE et. Al.1994), são denominados ossificação intramembranosa e endocondral, sendo, esta última, caracterizada pela formação de calo cartilaginoso intermediando a formação de tecido ósseo maduro.

Na reconstrução de defeitos ósseos, torna-se necessário criar condições para o estímulo da neoformação óssea. Contudo, o principal obstáculo para o sucesso do processo de reparo é o crescimento de tecido fibroso para o interior do defeito, impedindo a osteogênese, admite-se que os fibroblastos em proliferação liberam fatores solúveis inibidores da osteogênese (OGISO et. Al. 1991). Alternativamente, é possível que o problema se situe na falha celular de formação da matriz calcificável (SCHIMITZ et. al. 1990), provavelmente causada pela falta de liberação de fatores de crescimento e fatores de diferenciação. Em vista disso, vários métodos, ancorados em princípios diferentes (DAHLIN, 1994) têm sido utilizados para induzir o reparo ósseo em defeitos críticos, tais como o emprego das técnicas de regeneração tecidual guiada e uso de enxertos ou substitutos ósseos, entre as mais conhecidas.

2.1.2 - Laser

A introdução da tecnologia do laser no Brasil foi bastante tardia, se comparada a outros países, principalmente Europa e Estados Unidos. Os primeiros trabalhos são da década de 80 sendo descritos por Duarte, Brugnera, Aun, Wadanabe e, posteriormente por Silveira, Genovese e Pinho na década de 90.

Estudos têm sido desenvolvidos em todos os setores mostrando que essa é e será provavelmente em curto prazo uma das maiores atividades e de fontes de pesquisa dentro da Odontologia, solucionando em grande parte muitos problemas que há bem pouco tempo apresentavam grandes controvérsias (TAUBE 1990; CEKIK 1990; CLOKIE 1991; GERSCHMAN 1994; PINHEIRO 1997 e BRUGNERA 1998).

Segundo Veçoso 1993 e Baxter, 1994, a laserterapia é classificada como de baixa potência, sem potencial destrutivo, de acordo com seu defeito no tecido é indicada para diversas patologias como traumatismos musculares, articulares, nervosos ósseos e cutâneos.

A ação e o efeito do laser de baixa potência no tecido são bem explicados por (VEÇOSO, 1993) segundo o qual a radiação observada pelo tecido provoca efeitos primários ou diretos, os quais incluem efeitos bioquímicos, bioelétricos e bioenergéticos. Posteriormente, ocorre o desencadeamento de efeito indireto, como estímulo a microcirculação e ao trofismo celular e de efeitos terapêuticos, os quais incluem efeito analgésico, antiinflamatório, anti-edematoso e estimulante de trofismo dos tecidos.

Yaakobi et al. 1996, estudaram o efeito do laser hélio-Neônio de baixa intensidade o reparo da região cortical da tíbia, em ratos. Os resultados mostraram que a radiação do laser aumentou em duas vezes o reparo ósseo. Portanto, a regeneração aconteceu mais rapidamente nos ratos irradiados do que em ratos não irradiados.

Ozawa el al., 1998 analisaram o efeito da irradiação de laser de baixa intensidade (830 nm) em cultura de células ósseas de ratos. Os resultados mostraram que o laser, provavelmente, estimulou a formação de osso através de suas funções: 1) estimulação da proliferação celular, principalmente na formação de células da linhagem osteoblástica; 2) estimulação da diferenciação celular, resultado no aumento de células osteoblástica diferenciadas, com conseqüente aumento na formação óssea. O entanto, esses efeitos são observados apenas em células imaturas.

Estudos que utilizaram radiação de laser de baixa potência mostraram efeitos benéficos na osteogênese (LUGER 1998; TRELLES, 1987) com aumento na vascularização e aceleração na razão de formação óssea.

3. Material e método

Este trabalho foi submetido à avaliação e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade do Sagrado Coração, Bauru-SP.

Neste estudo, foram utilizados 30 ratos *NORVEGIUS ALBINUS*, machos, adultos, com peso médio de 250g. Os animais foram divididos em 2 grupos, com quinze animais cada, compondo dessa forma os grupos controle e experimental. Durante todo o estudo os animais foram mantidos em boas condições ambientais, de alimentação, temperatura, higiene e iluminação.

A identificação se deu através de uma ficha de biotério (ANEXO I), para a realização dos defeitos ósseos de acordo com o quadro abaixo:

GRUPO	*	Local da Osteotomia	Tratamento associado
EXPERIMENTAL	5	Calvária (sutura interfrontal)	Preenchimento por coágulo + Laserterapia
CONTROLE	5	Calvária (sutura interfrontal)	Somente preenchimento por coágulo

30: Valor representativo do tamanho da amostra

Para o procedimento cirúrgico os animais foram submetidos à injeção intramuscular (IM) de cloridrato de dihidrotiazina^φ, na dosagem de 1.0mL/Kg de peso vivo aplicada na musculatura da face interna da pata posterior direita do animal para

^φ Rompun-Bayer do Brasil

efeito de relaxamento muscular. Após 5 minutos, foi introduzida a solução anestésica também pela via intramuscular (IM) à base cloridrato de ketamina*, na dosagem de 1.0mL/Kg de peso vivo aplicada na face interna da pata posterior esquerda do animal (Belmonte, 2001).

Após a instalação da anestesia geral foi realizada a tricotomia da região de interesse (calvária) seguida pela manobra de anti-sepsia com solução de Polivinilpirolidona (PVPI-tópico). A infiltração de um agente anestésico local⁺ foi realizada previamente ao procedimento de incisão com a finalidade de promover maior hemostasia local. A área a ser operada foi isolada através de campos cirúrgicos de algodão cru estéreis.

Em condições estéreis, uma incisão cutânea e periostal de aproximadamente 3cm de extensão, no sentido longitudinal da calota craniana, foi realizada com bisturi e lâmina nº15. Com o auxílio de uma espátula destaca-periosteio seguiu-se com a divulsão dos tecidos confeccionando um retalho de espessura total ou mucoperiostal, expondo o tecido ósseo.

A osteotomia foi realizada através de broca trefina[#] com diâmetro de 5mm em motor de baixa rotação, no centro da sutura inter-frontal na calvária do animal, sempre sob irrigação abundante com solução fisiológica estéril e gelada, rompendo as corticais ósseas externa e interna, removendo o fragmento ósseo e expondo a duramater, confeccionando um único defeito ósseo, circular e de 5mm de diâmetro (FIGURA1).

* Dopalen Injetável – Vetbrands

⁺ Citanest 3%, Astra Química e Farmacêutica Ltda. Barueri - SP

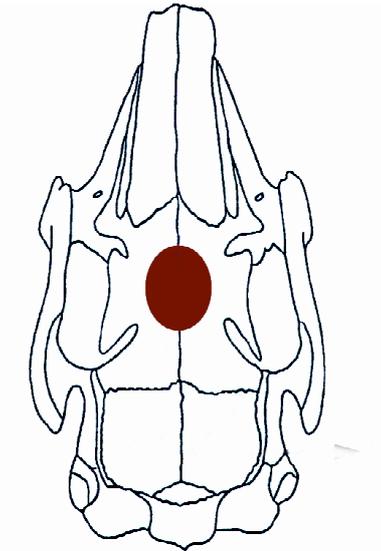


FIGURA 1: Desenho esquemático dos defeitos tratados no grupo controle

Os animais do grupo experimental tiveram os seus defeitos ósseos preenchidos por coágulo sanguíneo e receberam, na seqüência, a irradiação com Laser de Baixa Potência⁺⁺, na dosimetria de 120j/cm², dosagem esta, recomendada pelo fabricante. Os animais do grupo controle tiveram seus defeitos ósseos preenchidos por coágulo sanguíneo, da mesma forma que os animais do grupo experimental, porém não receberam em qualquer momento a irradiação com Laser de Baixa Potência.

Seqüencialmente, iniciaram-se os procedimentos de sutura por planos, primeiramente do periósteo sobre o defeito ósseo e, em seguida, da pele com fio de sutura 4-0^{##}. (FIGURA 2 A-F).

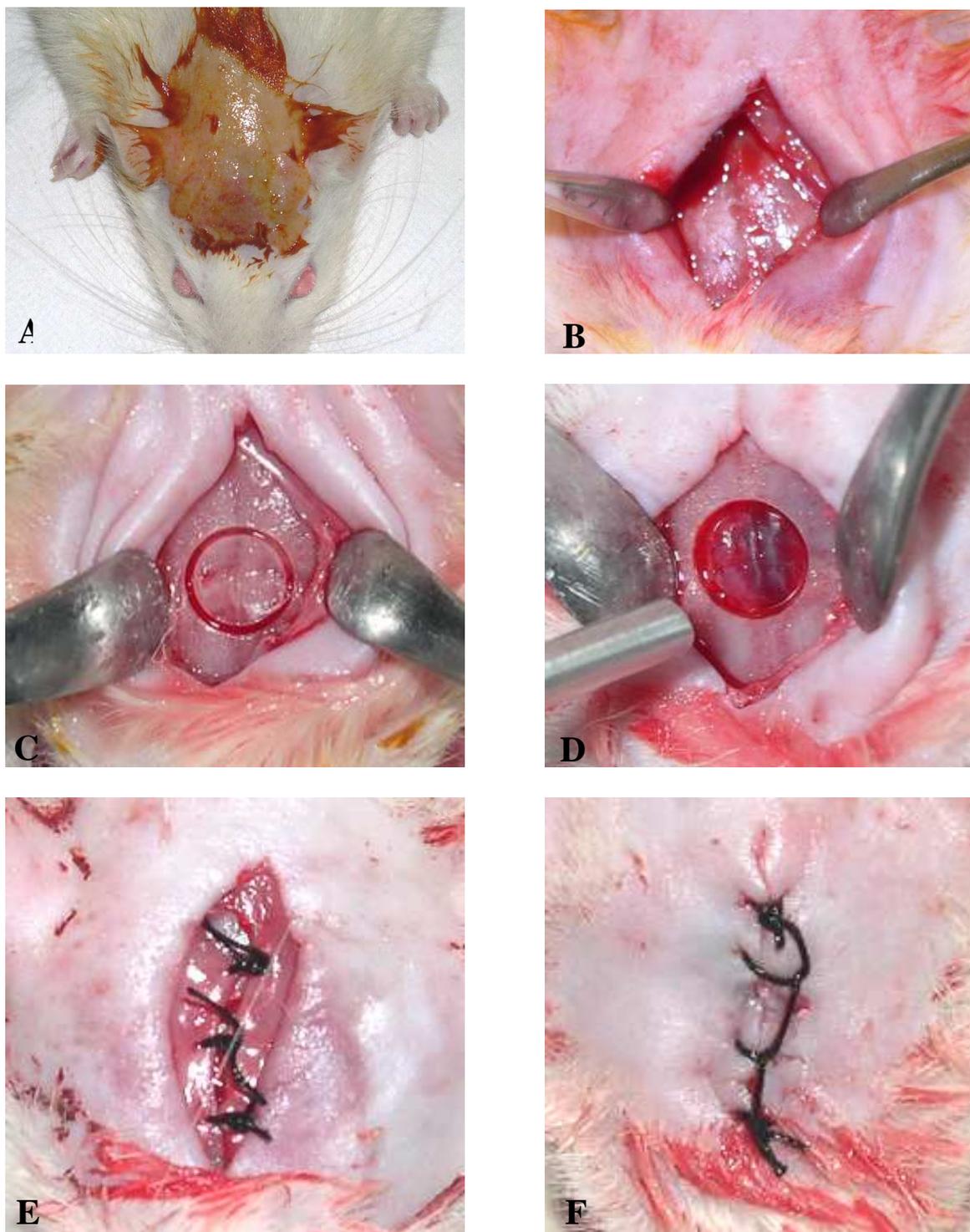


FIGURA 2: A) Antissepsia local prévia com PVPI tópico; B) Exposição da região da calvária onde foi criado o defeito; C) Defeito circular demarcado com broca trefina de 5mm de diâmetro; D) Defeito ósseo criado removendo a cortical externa e interna da calvária e preenchimento por coágulo; E) Sutura por planos, inicialmente da membrana periosteal e F) posteriormente da pele.

O período de análise foi de 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. Em cada período foram sacrificados 5 animais do grupo experimental e 5 animais do grupo controle.

Os animais do grupo experimental receberam mais 1 dose adicional de Laserterapia com fluência de $120\text{j}/\text{cm}^2$ a cada 3 dias, seguindo protocolo de aplicação recomendado pelo fabricante e pela literatura correlata (LIMEIRA-JÚNIOR 2001; ALMEIDA-LOPES 2004).

Para a aplicação do laser os animais tiveram que receber uma sedação completa para que o laser fosse aplicado de forma correta, ou seja, sem que o animal se movesse.

Uma injeção intramuscular (IM) de cloridrato de dihidrotiazina^φ, na dosagem de 0,3mL/Kg de peso vivo aplicada na musculatura da face interna da pata posterior direita do animal, após 5 minutos, foi realizada a anestesia geral, utilizando injeção IM à base cloridrato de ketamina*, na dosagem de 0,3mL/Kg de peso vivo aplicada na face interna da pata posterior esquerda do animal. Como descrito acima, uma dosagem menor das drogas foi administrada para aplicação do Laser de Baixa Potência, visto que esta técnica é de rápida execução e não exige longos períodos de sedação.

A forma de aplicação do laser foi dividida em quatro pontos localizados nas extremidades do defeito ósseo (norte, sul, leste e oeste - FIGURA 3), onde cada ponto era irradiado um de cada vez com fluência de $120\text{j}/\text{cm}^2$, seguindo protocolo de aplicação recomendado pelo fabricante e pela literatura correlata (LIMEIRA-JUNIOR 2001; ALMEIDA-LOPEZ 2004).

Durante todo o período pós-operatório os animais foram alimentados com ração sólida e água.

^φ Rompun-Bayer do Brasil

* Dopalen Injetável – Vetbrands

+ Citanest 3%, Astra Química e Farmacêutica Ltda. Barueri - SP

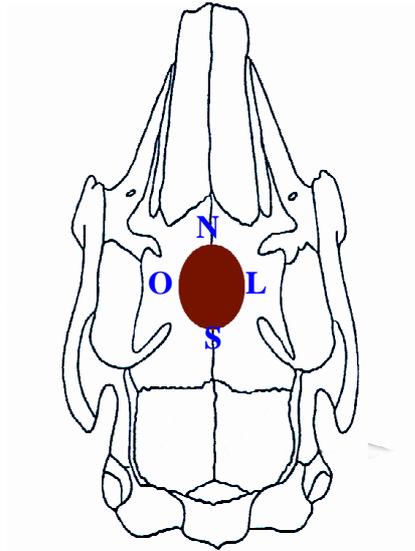


FIGURA3 Desenho esquemático do defeito ósseo no crânio preenchido por coágulo sanguíneo, ilustrando pontos irradiados ao redor do defeito

3.1 - Preparo das Peças:

Após o período de preservação os animais foram sacrificados aos 15, 30 e 60 dias através da super dosagem de anestésico geral* (dose única de 2ml/animal). As áreas operadas foram expostas e examinadas atentamente para o registro de eventuais sinais macroscópicos de inflamação e/ou infecção.

As peças foram removidas através de osteotomia com discos de carborundum em baixa rotação.

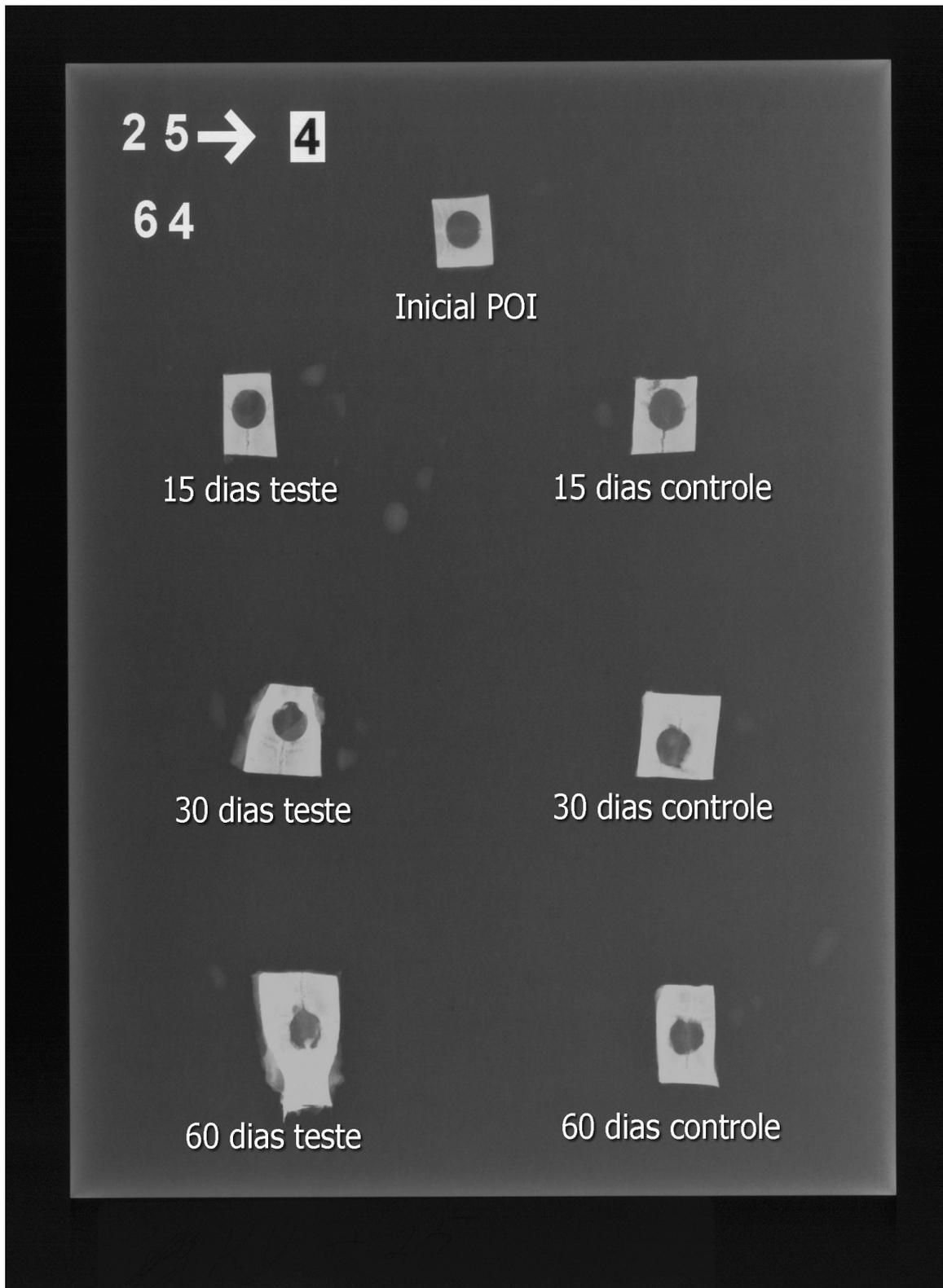
3.2- Realização Radiográfica

Foram eleitas, aleatoriamente, uma peça de cada grupo, tanto experimental quanto controle, dos períodos de 15, 30 e 60 dias, assim como a peça inicial pós-operatória.

As peças foram imersas em solução de Formol – 10% e enviadas para o Hospital Beneficência Portuguesa de Bauru, onde foi realizada a tomada radiográfica.

Para realização da radiografia, utilizou-se o aparelho mamógrafo (descrever marca e modelo).

As peças inicial, grupo controle e grupo experimental 15, 30 e 60 dias, foram posicionadas no mesmo filme e em seguida foram expostas aos raios X com distância foco-filme de 64 cm, potência de 25 KV e 4 MA (FUFURA 4).



4: Radiografia realizada em mamógrafo, com as peças: inicial, 15, 30 e 60 dias controle e experimental.

3.2.1- Digitalização Radiográfica

Para que fosse possível uma adequada descrição dos resultados radiográficos, a radiografia foi digitalizada em resolução de 300dpi para uma melhor nitidez e facilidade de visualização das imagens.

Utilizando-se do programa Microsoft Adobe Photoshop 7.0 a imagem pôde ser avaliada na tela do monitor e ampliada para que se tivesse uma melhor visualização das áreas de interesse.

Com as imagens das peças radiográficas expostas lado a lado na tela do computador, foi possível realizar uma circunferência padrão construída com a ferramenta Marca de seleção no formato circular contornando as margens do defeito da peça inicial que possuía exatos 5 mm de diâmetro.

Nas configurações do programa Microsoft Adobe Photoshop 7.0 os 5mm de diâmetro foram demarcados com a circunferência obtida pela ferramenta com uma medida de área de 72 x 72 pixels que possuíam equivalência à medida do defeito ósseo das peças, criando assim uma circunferência padrão que serviu para comparação de todos os defeitos, tanto do grupo controle, quanto do grupo experimental.

3.2 - Fixação das Peças:

Após da realização da tomada radiográfica, as peças foram submetidas ao processo de descalcificação pelo método de MORSE. Terminado o período de descalcificação, os espécimes foram lavados em água corrente por doze horas.

3.3 - Descalcificação e Diafanização:

O processo de descalcificação consiste na remoção do cálcio tecidual, sem alterações nas estruturas celulares.

Todas as peças foram submetidas ao processo de descalcificação pelo método de MORSE, que consiste na mistura de duas soluções: solução A (citrato de sódio – 200g/ água destilada – 1000ml) e solução B (ácido fórmico – 500ml/ água destilada – 500ml), em iguais proporções. A descalcificação dos espécimes se completou em aproximadamente quatro semanas, sendo as soluções trocadas a cada 48 horas.

Após a descalcificação, as peças foram preparadas para a inclusão. Primeiramente foi feita a desidratação, que consiste na retirada do conteúdo aquoso do interior das células. Esse processo foi conseguido através da imersão das peças em soluções de álcoois 70%, 80%, 95% e 100% e, em seguida, foi realizada a diafanização com xilol, que tem por finalidade preencher os espaços anteriormente ocupados por água e permitir a penetração da parafina em todos os interstícios do tecido.

3.4 - Inclusão e Corte:

A partir desse momento, as peças foram incluídas em parafina (60° C).

Uma vez preparados os blocos de parafina, os mesmos foram submetidos a cortes em micrótomo (Leica RM - Germany), na espessura de cinco micrômetros, e estendidos em banho-maria a 45°C. Posteriormente os cortes foram colocados nas lamínulas e, estas, foram colocadas em estufa para secagem.

3.5 - Processo de Coloração: Técnica da Coloração com Tricrômico de Masson:

Este procedimento de coloração consiste na limpeza das lâminas através da imersão das mesmas em xilol (I) por quinze minutos e, ainda, em xilol (II) por quinze minutos. Prossegue-se por passagens sucessivas em álcool 100%, álcool 95% e álcool 70%, intercalando cada banho por lavagem em água corrente por cinco minutos. Após cada imersão, removem-se os excessos das substâncias envolvidas apenas escorrendo-as.

Em seguida, as lâminas são fixadas em líquido de *Bowin* por aproximadamente uma hora, a 56° C.

Ao final desse período, faz-se a lavagem em água corrente, por aproximadamente uma hora (até sair a cor do fixador), lavagem em água destilada por cinco minutos, imersão em Hematoxilina por cinco minutos e nova lavagem em água corrente e água destilada por cinco minutos.

Após a passagem nessas soluções, é feita a coloração por cinco minutos na solução “A” (solução aquosa de fucsina ácida a 1%), seguida da imersão por dez minutos na solução “B” (ácido fosfomobilídico – 5g, adicionado de ácido fosfotúngstico – 5g e água destilada – 200ml) para lavagem e, ainda, imersão por dez minutos em solução “C” (azul de anilina – 1g adicionado de 100ml de ácido acético a 1%) e lavagem em água acética (ácido acético – 1ml/ água destilada – 100ml) por três minutos e água destilada por cinco minutos.

Segue-se com imersões rápidas em álcool 95% (duas vezes), álcool 100% (duas vezes), xilol I e II (quinze minutos em cada solução) e, finalmente, imersão em solução de xilol III até a montagem das lamínulas, usando *PermOUNT*.

3.6 - Análise Histológica:

A análise histológica à microscopia óptica foi realizada empregando um fotomicroscópio (NIKON ELIPSE 80i), e um programa computadorizado para averiguação das peças histológicas (PRÓ-PLUS 5.1).

Esta análise foi realizada comparativamente entre o grupo controle e experimental.

4. Resultados:

As áreas portadoras dos defeitos cirúrgicos foram avaliadas clinicamente todas as semanas com a finalidade de se observar focos de infecção. Em todos os casos utilizados no experimento, não foram detectados sinais de infecção nas áreas dos defeitos ou próximo a elas.

O grupo controle, igualmente ao experimental, foi avaliado em períodos de quinze, trinta e sessenta dias após as cirurgias dos defeitos ósseos.

Os achados histológicos o tecido conjuntivo na área do defeito cirúrgico foi sempre observada nos períodos controle e experimental, porém, os últimos exibiram maior quantidade de tecido conjuntivo osteogênico e trabéculas ósseas imaturas, principalmente nos períodos avançados, enquanto nos achados radiográficos pode-se avaliar uma formação de manchas radiopacas nas bordas do defeito sendo que no grupo experimental essa velocidade de formação foi maior. Todas as avaliações radiográficas tomaram como orientação a circunferência de 72 x 72, padronizada, criada a partir do defeito criado na peça inicial. A neoformação óssea ocorre sempre a partir da parede do defeito ósseo.

Período de 15 dias (Histológico):

Os defeitos ósseos não irradiados desenvolveram um padrão típico de processo de reparo observados em defeitos com dimensão crítica. A região apresentou-se totalmente preenchida por tecido de granulação, com áreas hemorrágicas e pequenos

focos de tecido conjuntivo osteogênico, estes, localizados mais próximos às paredes do defeito ósseo (FIGURA 5).

Nesta fase, os defeitos ósseos irradiados, exibiram tecido conjuntivo osteogênico em quase toda a sua extensão, bem como trabéculas ósseas imaturas nas extremidades do defeito e na região supra-dural (FIGURA 6).

Período 15 dias (Radiográfico):

Tanto os defeitos do grupo controle quanto do grupo teste não apresentaram ganho de estrutura radiopaca para o interior do defeito. No entanto observou-se que a peça do grupo controle (FIGURA 12) uma perda regular de área radiopaca em toda a circunferência do defeito. Se comparada ao grupo experimental do mesmo período (FIGURA 13) existe uma considerável diferença, pois a peça do grupo experimental (FIGURA 13) não sofreu perda de porção radiopaca nas bordas do defeito.

Período 30 dias (Histológico):

Nos defeitos não irradiados, nota-se coágulo sangüíneo ainda em fase inicial de diferenciação. Presença de tecido de granulação e tecido conjuntivo osteogênico no interior do defeito. Trabéculas ósseas imaturas em pequena quantidade nas extremidades do defeito (FIGURA 7).

A FIGURA 8 mostra um defeito ósseo irradiado preenchido de borda à borda por tecido conjuntivo osteogênico – na porção superior – e trabéculas ósseas neoformadas – na porção inferior.

Período 30 dias (Radiográfico):

No defeito não irradiado (FIGURA 14) observa-se uma perda heterogênea com aspecto de bordas roídas no contorno do defeito, ampliando a circunferência do mesmo.

No defeito onde foi realizada a terapia com laser (FIGURA 15) já é observada uma discreta invaginação de manchas radiopacas para o interior do defeito sem perda de diâmetro como o que ocorreu com a peça do grupo controle.

Período de 60 dias (Histológico):

Nesta fase, os defeitos ósseos não irradiados, apresentaram-se totalmente preenchidos por tecido conjuntivo osteogênico com formação de trabéculas imaturas apenas nas extremidades (FIGURA 9).

Finalmente, a FIGURA 10 mostra um defeito ósseo irradiado com focos de formação óssea lamelar nas extremidades, além, de grande quantidade de tecido conjuntivo osteogênico e trabéculas ósseas imaturas no interior com ausência de formação de calo condrogênico. Observar coágulo sanguíneo no centro do defeito, já em estágio avançado de diferenciação em tecido conjuntivo osteogênico.

Período 60 dias (Radiográfico):

Nesta fase a peça não irradiada (FIGURA 16) apresenta um pequeno ganho na área radiopaca nas paredes circundantes ao defeito, podem ainda possuir áreas que não

preenchem a circunferência padrão criada, utilizada para a comparação entre os defeitos.

Diante da peça irradiada podemos observar com clareza, significantes áreas de manchas radiopacas que cresceram em direção ao centro do defeito se comparado ao grupo controle do mesmo período, além de todas as bordas apresentarem-se crescidas em direção a luz do defeito se comparadas à circunferência padrão (FIGURA 17).

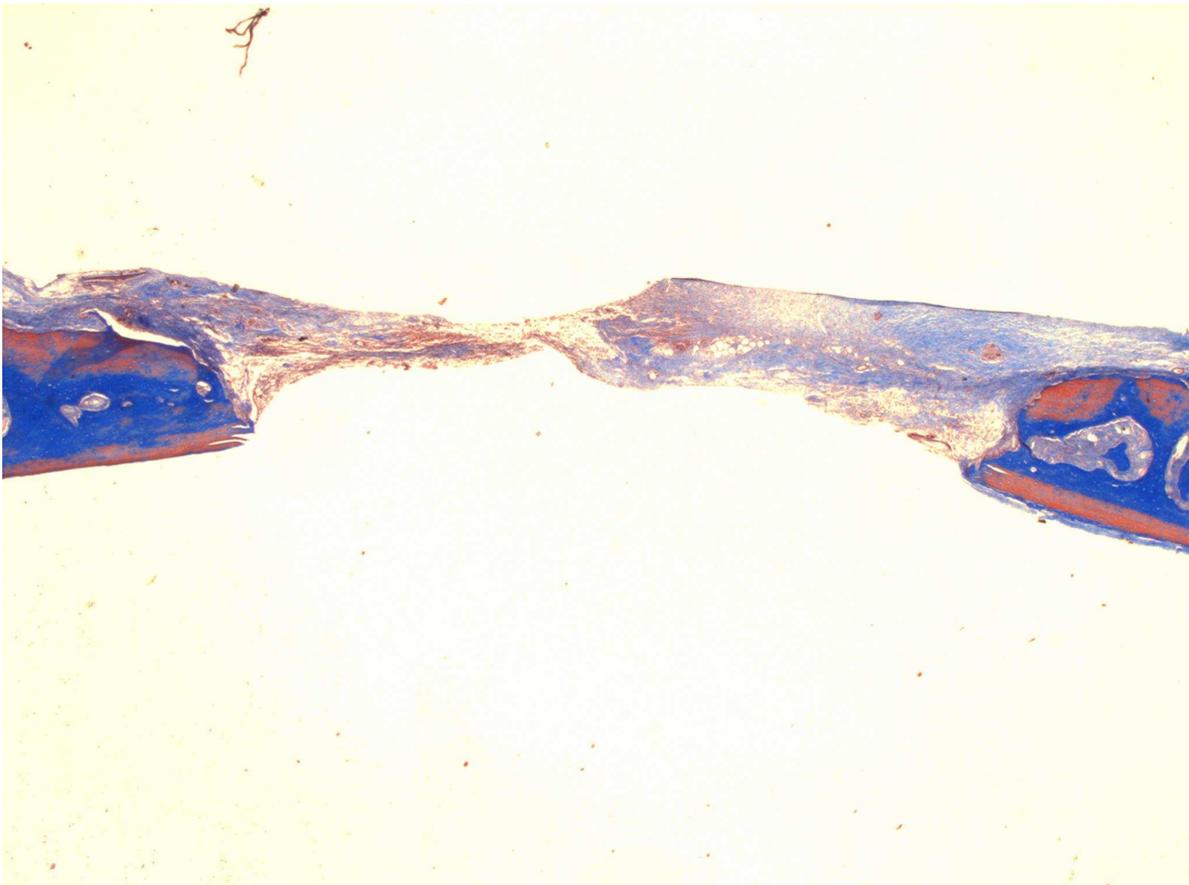


FIGURA 5: Fotomicrografia da região do defeito ósseo controle. 15 dias.

- A) Notar a presença de tecido conjuntivo em toda a extensão do defeito.
- B) Na região superior esquerda observar a presença de tecido conjuntivo osteogênico oriundo da membrana periosteal. O mesmo ocorre na região superior direita, porém de maneira discreta. (Tricrômico de Masson – aumento linear original 10x).

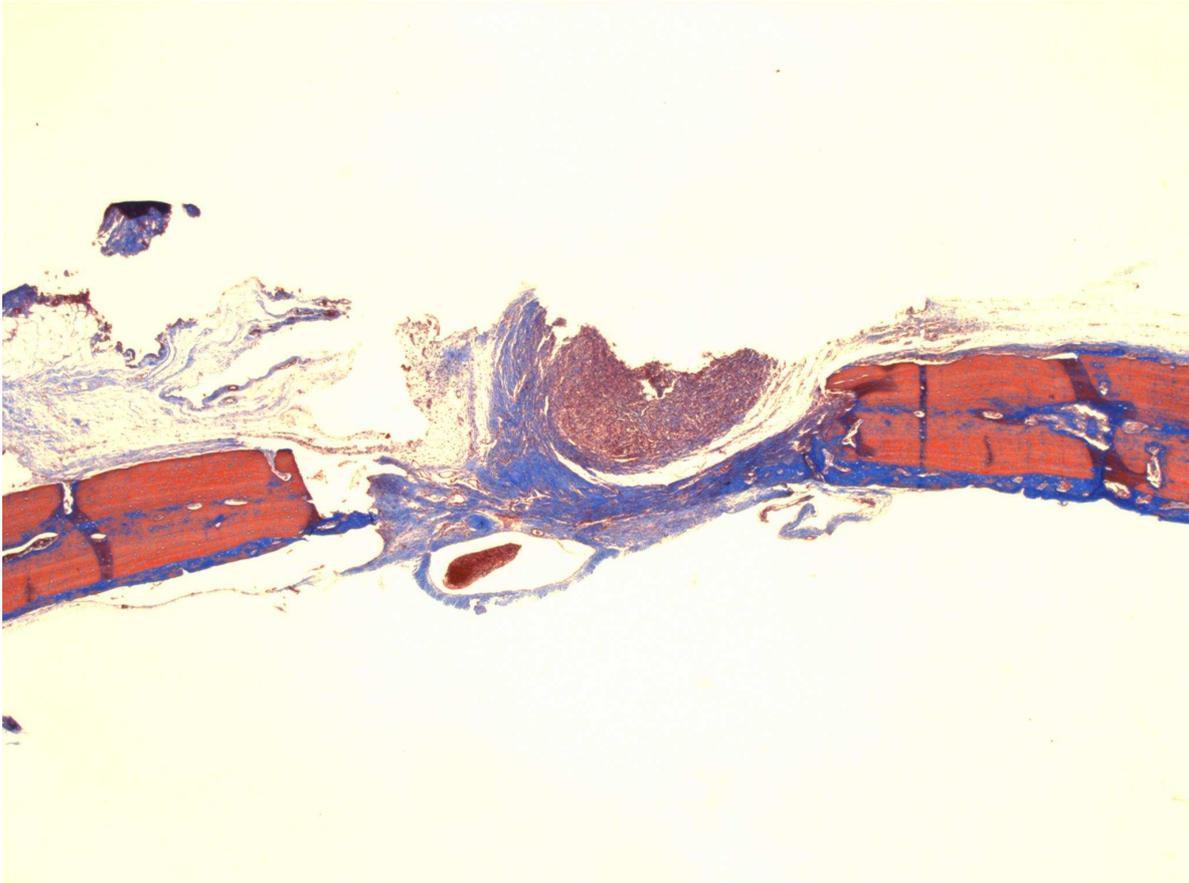


FIGURA 6: Fotomicrografia da região do defeito ósseo experimental. 15 dias.

- A) Notar a presença de tecido conjuntivo osteogênico no interior do defeito.
- B) Na região supra-dural observar a presença de trabéculas ósseas imaturas.
- C) No centro do defeito, observar de coágulo sangüíneo já em processo de diferenciação, dando lugar ao tecido conjuntivo osteogênico. (Tricrômico de Masson – aumento linear original 10x).

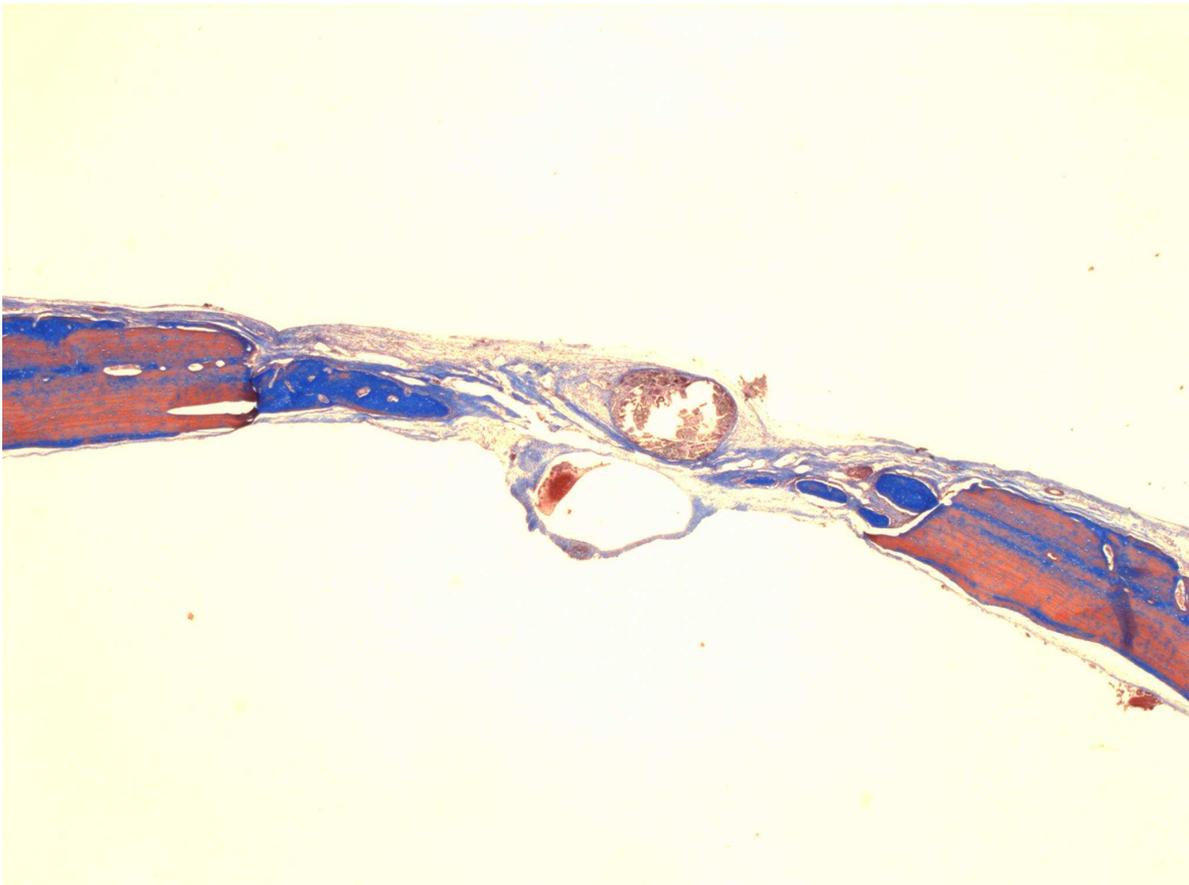


FIGURA 7: Fotomicrografia da região do defeito ósseo controle. 30 dias.

- A) Presença de trabéculas de osso imaturo na margem esquerda do defeito e, em menor quantidade, na margem direita.
 - B) Notar a presença de tecido conjuntivo osteogênico no interior do defeito.
 - C) Coágulo sangüíneo no centro do defeito em fase inicial de diferenciação.
- (Tricrômico de Masson – aumento linear original 10x).

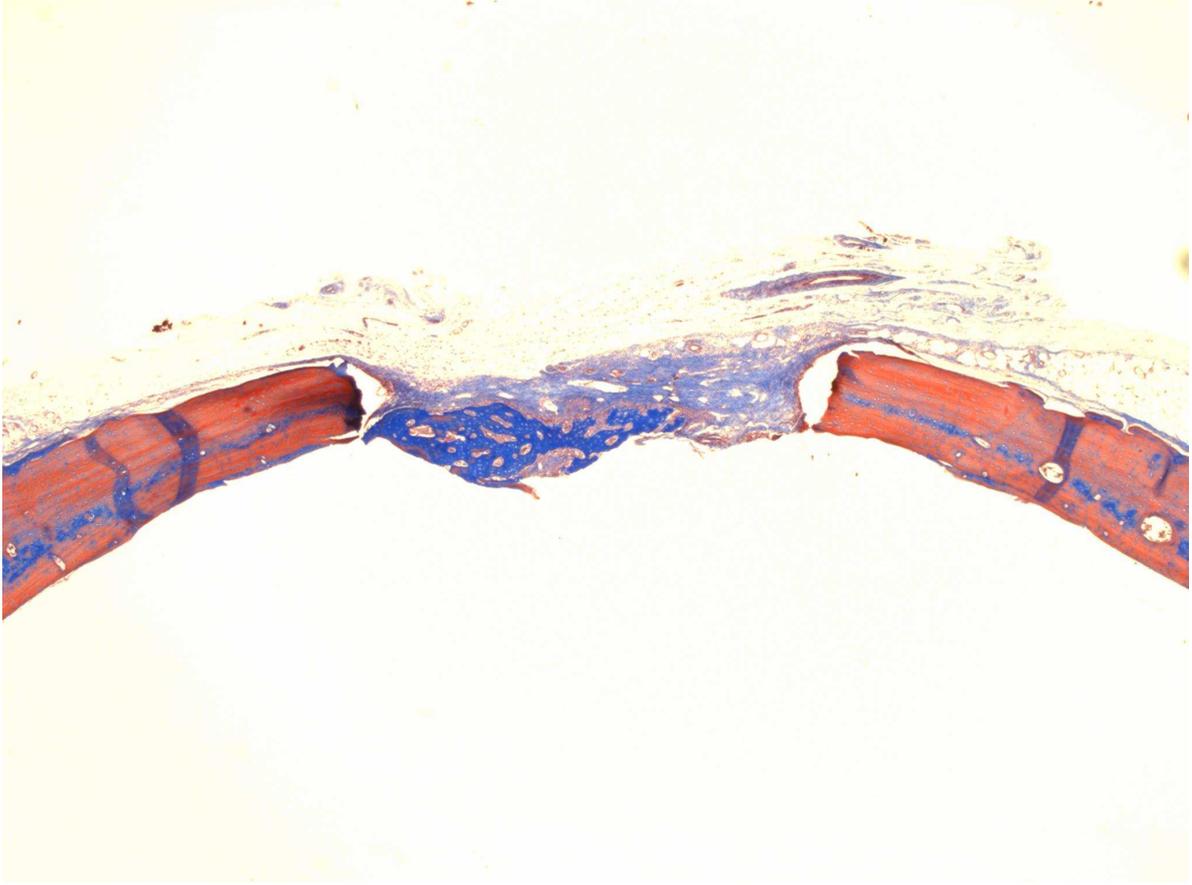


FIGURA 8: Fotomicrografia da região próxima à margem do defeito ósseo experimental. 30 dias.

- A) Notar a presença de tecido conjuntivo osteogênico em toda a extensão do defeito.
- B) Na porção inferior, abaixo do tecido conjuntivo osteogênico, notar a presença de trabéculas ósseas imaturas. (Tricrômico de Masson – aumento linear original 10x).

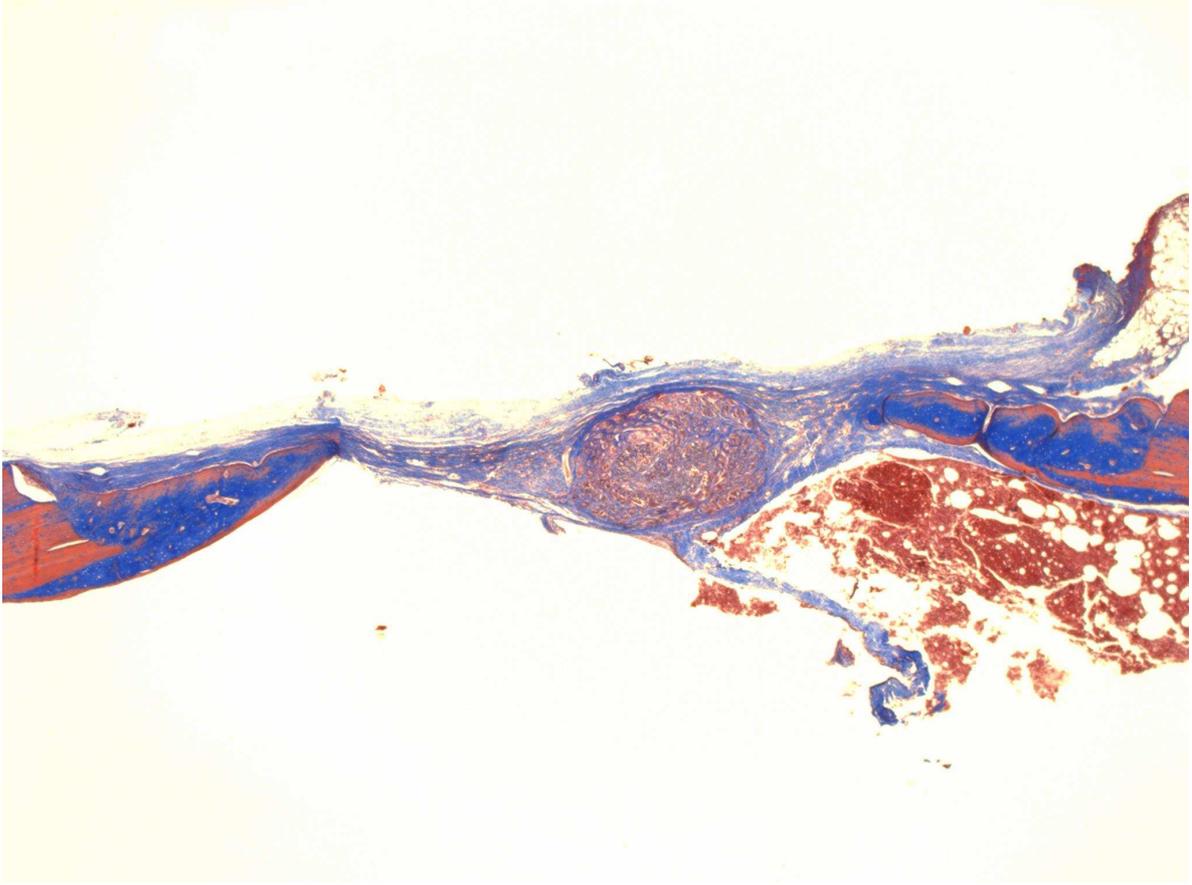


FIGURA 9: Fotomicrografia da região do defeito ósseo controle. 60 dias.

- A) Notar nas extremidades do defeito a presença de trabéculas ósseas imaturas.
- B) Ainda nas extremidades do defeito observar a presença, em pequena quantidade, de tecido ósseo lamelar.
- C) No centro do defeito, notar a presença de tecido conjuntivo osteogênico e coágulo sangüíneo em fase inicial de diferenciação. (Tricrômico de Masson – aumento linear original 10x).

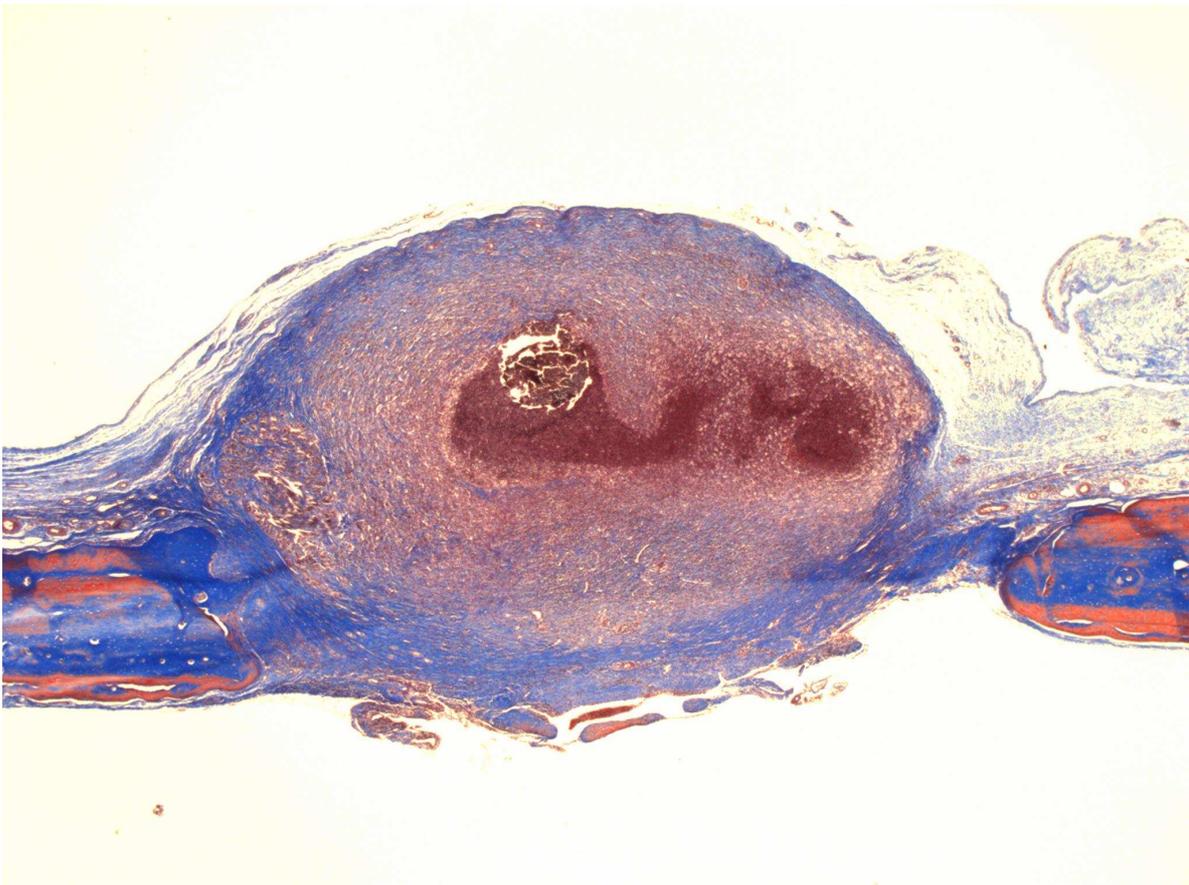


FIGURA 10: Fotomicrografia da região do defeito ósseo experimental. 60 dias.

- A) Grande quantidade de trabéculas ósseas imaturas nas extremidades do defeito.
- B) Na porção central do defeito, notar a presença de coágulo sanguíneo em fase avançada de diferenciação, mostrando tecido conjuntivo osteogênico em grande quantidade nas porções periféricas do coágulo.
- C) Ossificação intramembranosa característica, ausência total de condrócitos.
- D) Presença de osso lamelar nas extremidades do defeito. (Tricrômico de Masson – aumento linear original 10x).

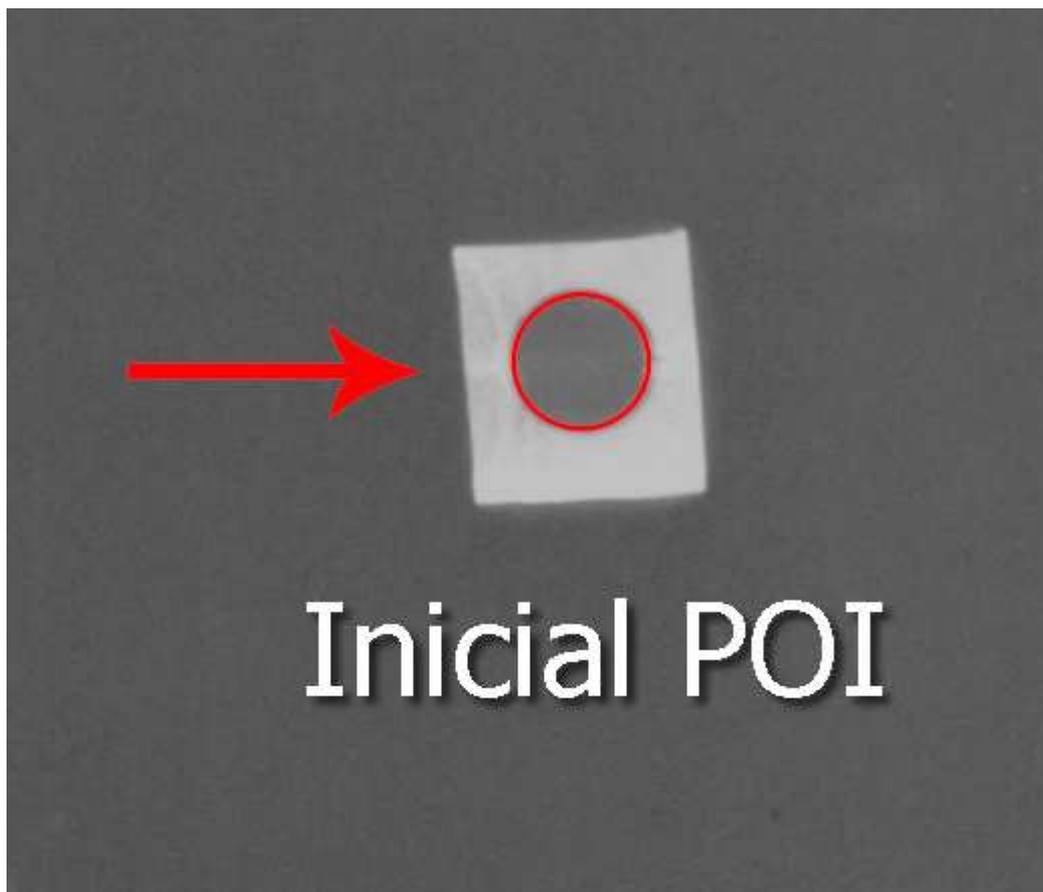


FIGURA 11: Peça inicial demonstrando o defeito de 5mm com as bordas bem definidas.

Circunferência criada para comparar os defeitos entre os grupos.



FIGURA 12: Radiografia de 15 dias controle demonstrando defeito com as bordas irregulares apresentando um aumento na luz do defeito caracterizando uma reabsorção periférica.



FIGURA 13: Defeito com as bordas regulares sem aumento na luz do defeito.



FIGURA 14: Padrão irregular de formação óssea com áreas de reabsorção



FIGURA 15: Padrão de formação óssea regular sem áreas de reabsorção.



FIGURA 16: Padrão de formação óssea periférica com algumas áreas de reabsorção persistentes.



FIGURA 17: Radiografia mostra grande área radiopaca que se mostra avançando em direção ao centro do defeito diminuindo consideravelmente a sua luz.

5. Discussão

A reconstrução de defeitos com grande perda óssea, representa um desafio para as cirurgias reconstrutivas. Assim, defeitos com substancial perda óssea podem ocorrer na face em consequência de traumas, infecções, anomalias congênitas e ressecção tumoral. Na reconstrução desses defeitos, torna-se necessário criar condições para o estímulo da neoformação óssea, uma vez que o tecido ósseo repara-se por regeneração (CATANZARO GUIMARÃES, 1982; GÖRANSSON ET AL., 1992; BECKER, 1995; HOLLINGER & WONG, 1996). Contudo, o principal obstáculo para o sucesso do processo de reparo, ou seja, para o estímulo da neoformação óssea, é o rápido crescimento do tecido conjuntivo cicatricial que preenche o defeito ósseo cirúrgico e impede drasticamente a osteogênese. Com a falha da regeneração óssea, desenvolve-se a reparação fibrosa, ou pseudoartrose, ou ainda, a não-união.

Como a reparação fibrosa é destituída de valor biológico no processo de reparo ósseo, vários métodos, ancorados em princípios diferentes (DAHLIN 1994), têm sido utilizados para contornar este problema de grande repercussão cirúrgica, quando se trata de processo de reparo ósseo em defeitos críticos.

Um desses métodos consiste na regeneração tecidual guiada. O princípio da regeneração tecidual guiada baseia-se no fato de que diferentes tipos de células, que circundam o leito ósseo cirúrgico, proliferam em direção à área do defeito com velocidades diferentes. A velocidade de proliferação celular determina a qualidade do processo de reparo no defeito. Assim, fibroblastos que proliferam mais rapidamente que as células osteoprogenitoras, preenchem o defeito e induzem reparação fibrosa condenando o processo de reparo ósseo. A utilização da membrana tem a finalidade de inibir a proliferação dos fibroblastos para o interior do defeito, permitindo um tempo

adicional para as células osteoprogenitoras repovoar a área do defeito produzindo, com eficiência, neoformação óssea (BUSER 1994; GOMES 1998; SCHLEGEL 2000).

Outros métodos utilizam enxertos ou substitutos ósseos sintéticos como materiais de implante, preenchendo por completo a área do defeito ósseo e, desta forma, impedindo a proliferação de fibroblastos no interior do mesmo.

No presente trabalho não foram utilizados quaisquer materiais de implante, com propriedades osteoindutoras e/ou osteocondutoras, no preenchimento dos defeitos ósseos, tampouco, membranas foram utilizadas com a finalidade de impedir o crescimento de tecido conjuntivo cicatricial para o interior do defeito. Todos os defeitos ósseos criados foram preenchidos apenas por coágulo sanguíneo e encobertos pelo perióstio através da técnica de sutura por planos.

Em defeitos ósseos, o processo regenerativo é complexo e se processa em fases distintas. Inicialmente, formam-se coágulo sanguíneo, reação inflamatória e formação de tecido de granulação mesenquimal em substituição ao coágulo; subseqüentemente, o processo regenerativo pode evoluir por dois caminhos diferentes, respectivamente denominados direto e indireto. O caminho direto forma calo osteogênico constituído, em seqüência, por osso imaturo não-lamelar, formado em substituição ao tecido de granulação mesenquimal, e osso osteonal lamelar maduro formado em conseqüência da remodelação do osso não-lamelar imaturo. O caminho indireto forma calo osteogênico através de uma cascata de transformações teciduais que envolve, primeiro, a formação de tecido cartilaginoso em substituição ao tecido de granulação mesenquimal e, segundo, pela formação de tecido ósseo imaturo não-lamelar em substituição à cartilagem que, em seqüência, sofre remodelação para tecido ósseo lamelar ou osteonal. O resultado de ambos os processos é a regeneração de novo osso cuja estrutura é indistinguível do osso maduro preexistente. (BELMONTE, 2001).

Mais recentemente, a utilização de Laseres Terapêuticos vem se ampliando nas áreas médica e odontológica, sobretudo, como auxiliar em processos cicatriciais devido as suas propriedades analgésicas, antiinflamatórias e anti-edematosas, funcionando, ainda, como biomodulador celular (VEÇOSO, 1993).

O principal objetivo deste trabalho é o estudo da reparação tecidual óssea em defeitos preenchidos apenas por coágulo sanguíneo e irradiados com laser de baixa intensidade, seguindo protocolo descrito na literatura correlata (LIMEIRA-JÚNIOR 2001; ALMEIDA-LOPES 2004).

Nossos resultados mostraram, já nos períodos iniciais histológicos do grupo experimental, maior velocidade na diferenciação celular, exibindo formação de tecido conjuntivo osteogênico e focos de formação óssea não-lamelar (FIGURA 6) e radiograficamente o defeito se mostrou com todas as bordas regulares e correspondendo a circunferência padrão criada para comparação do interior dos defeitos (FIGURA 13), enquanto que, os defeitos do grupo controle histológicos, no mesmo período, apresentaram pequena quantidade de tecido conjuntivo osteogênico e nenhum sinal de formação óssea (FIGURA 5) e radiograficamente com suas bordas sem continuidade e com aumento do seu diâmetro o que sugere uma pequena reabsorção óssea em toda a circunferência do defeito (FIGURA 12). YAAKOBI et al. (1996), encontraram resultados histológicos semelhantes avaliando o reparo ósseo da região cortical da tíbia de ratos irradiada com laser de baixa potência. Os autores relataram uma velocidade no reparo do defeito ósseo duas vezes maiores nos animais irradiados.

Essa aceleração do processo cicatricial no grupo experimental também foi observada nos períodos de 30 e 60 dias da avaliação histológica. A (FIGURA 7) ilustra um defeito ósseo do grupo controle no período de 30 dias com coágulo sanguíneo ainda

em fase inicial de diferenciação e pequenas quantidades de trabéculas ósseas imaturas localizadas mais próximas as extremidades do defeito, enquanto que, no grupo experimental no mesmo período (FIGURA 8), observa-se o preenchimento, quase por completo, do defeito por tecido conjuntivo osteogênico e expressiva quantidade de tecido ósseo neoformado. Radiograficamente podemos também concluir esta aceleração do processo cicatricial o grupo experimental de 30 dias em relação ao grupo controle do mesmo período, pois o grupo experimental além de mantida a circunferência interna do defeito sem áreas de reabsorção apresentou áreas radiopacas em direção ao centro do defeito (FIGURA 13), enquanto que no grupo controle o defeito se apresentou com margens indefinidas sem manchas radiopacas invadindo a luz do defeito (FIGURA 14). Da mesma forma, no grupo controle 60 dias histológico (FIGURA 9) observa-se a presença de tecido conjuntivo osteogênico, trabéculas ósseas imaturas e tecido ósseo lamelar em quantidades menores que no grupo experimental (FIGURA 9). Radiograficamente o grupo de 60 dias é o que apresenta maiores diferenças entre o grupo experimental e controle, observando no grupo experimental uma quantidade muito maior de áreas radiopacas (FIGURA 17), que vão das bordas ao centro do defeito, se comparado ao mesmo período do grupo controle onde essa quantidade de áreas radiopacas não é tão grande (FIGURA 16).

Tais achados justificam-se pelas reconhecidas propriedades dos lasers de baixa potência como estímulo da vascularização local, da proliferação e diferenciação celular (TRELLES MA, 1987; LUGER, 1998; OZAWA et al. 1998). Os lasers de baixa potência aumentam a produção de ATP que irá proporcionar o aumento na divisão celular, estímulo à microcirculação, aumento do nível de nutrientes e formação de vasos a partir de vasos pré-existentes (VEÇOSO, 1993).

6. Conclusão

Baseados nos achados deste trabalho, conclui-se que a irradiação de defeitos ósseos de dimensões críticas com lasers de baixa potência favorece sua regeneração em menores períodos que defeitos não irradiados. O tratamento de defeitos ósseos pela técnica da Laserterapia parece não oferecer riscos ao processo regenerativo desde que respeitado o seu protocolo de aplicação.

Referências Bibliográficas

AABOE, M. et al. "Unicortical Critical Size Defect of Rabbit Tibia is Larger than 8mm". *J.Craniofac Surg*, v. 5, n. 3, p. 201 – 203, 1994.

ALMEIDA-LOPES, L. *Laserterapia na Odontologia*. Bio Odonto Publicações Científicas, V.1, nº1, 2004.

ANDERS, JJ et al. *Low power laser irradiation alters the rate of regeneration of the rat facial nerve*. *Laser Surg Med*;V13, n.82, p.72, 1993.

BAXTER GD. *Therapeutic lasers: theory and practice*. New York: Churchill Livingstone; 1994.

BECKER RO. *The Body Electric*. New York: William Morrow and Co, Inc; 1985.

BELMONTE GC. *Avaliação histológica qualitativa da reação tecidual ao implante de polímero de mamona analisado pela microscopia de luz transmitida e microscopia eletrônica de varredura*. Dissertação(Mestrado), Universidade do Sagrado Coração, Bauru-SP, 110p., 2001.

BOSATRA M et al. *In vitro fibroblast and dermis fibroblast activation by laser irradiation at low energy*. *Dermatological* V.168, n.62, p. 157, 1984.

BROWN, KLB; CRUESS RL. *Bone and cartilage transplantation surgery*. *J Bone Jt Surg Am*: V.64, n.9, p.270, 1982.

BRUGNERA Jr, A.; PINHEIRO< A. L. B. *Lasers na odontologia moderna*. São Paulo, Pancast Ed., 1998.

BUSER,D et al. *Regeneration and enlargement of jaw bone using guided tissue regeneration*. Clin Oral Impl Res;V.1, n.22, p.32, 1990.

CHAPMAN,PG;VILLAS,RN. *The bacteriology of Bone Allografts*. J Bone Jt Surg; V.74, n.398, p.9, 1992.

CATANZARO GUIMARÃES, S.A. “Patologia básica da Cavidade Bucal ” Guanabara Koogan, Rio de janeiro, 1982.

CEKIK, A et al. *Efikasnosf meoglasera lijecenju oralnih simptoma*. Acta Stomatol. Croat. V. 24. n. 4, p. 281-8, 1990

CLOKIE, C.; BENTLEY, K.C.; HEAD, T.W. *The effects of the helium-neon laser on post surgical discomfort: a pilot study*. J. Can. Dent. Assoc. v.57, n.7, p.584-6, jul.1991.

DACULSI, G et al. “*Adaptive Crystal Formation in Normal and Pathological Calcifications in Synthetic Calcium Phosphate and Related Biomaterials*”. International Review of Cytology, v. 172, p. 129 – 181, 1997.

DAHLIN, C. “*Scientific Background of Guided Bone Regeneration*”. IN: BUSER, R.; DAHLIN, C and SCHENK, R. ed. *Guided Bone Regeneration in Implant Dentistry*. Quintessence, 1994.

ENNEKING WF et al. *Autogenous cortical bone grafts in the reconstruction of segmental skeletal defects*. J Bone Jt Surg A; V62-A, p.58-1039. 1980.

FRIEDLAENDER, G.E. “*Current Concepts Review: Bone Grafts*”. J. Bone Joint Surg , 69A , p. 786 – 790, 1987.

GESTRELIUS S. et al. *In vitro studies on periodontal ligament cells and enamel matrix derivative*. J Clin Periodontol; V.24, p. 92-685, 1997.

GOLDBERG, V. M.; STEVENSON, S. “*Natural History of Autografts and Allografts*”. Clin Orthop , n. 225, p. 7 – 16, 1987.

GOLDMAN, H.M.; COHEN, D.W. *Periodontia*. 6^aed, Guanabara Koogan, 1980.

GÖRANSSON, H. et al. “*Histology and Histomorphometry of Bone Regeneration After Experimental Injuries*”. Ann Chirur Gynaecol, v. 81, n.1, p. 58 – 65, 1992.

GERSCHMAN, J. A. et al. *Low-level laser therapy for dental tooth hypersensibility*. Aust. Dent. J. v. 39, n. 6, p. 353-7, dec. 1994.

HOLLINGER, J.; WONG, J. “*The Integrated Processes of Hard Tissue Regeneration With Special Emphasis on Fracture Healing*”. Oral Surg, v. 82, n. 6, p. 594 – 606, Dec. 1996.

KANA, J.S. et al. *Effect of low-power density laser radiation on healing of open skin wounds in rats*. Arch Surg, V.116 n.6, p.293, 1981.

KAWAMURA, M.; URIST, M. R. “*Induction of Callus Formation by Implants of Bone Morphogenetic Protein and Associated Bone Matrix Noncollagenous Proteins*”. Clin Orthop , Nov., (236): p. 240 – 248, 1988.

KHADRA, M.et al.. *Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod V.97, n. b, p.693-700, 2004.

LANE, J. M.; SANDHU, H. S. “*Current Approaches to Experimental Bone Grafting*”. Orthop Clin North Am , n. 18, p. 213 – 225, 1987.

LIMEIRA-JÚNIOR, F.A. *Avaliação do reparo ósseo com o uso de osso orgânico e membrana reabsorvível após irradiação com Laser Diodo 830nm*. (Dissertação de Mestrado). Salvador: Universidade Federal da Bahia; 2001.

LUGER EJ, Rochkind S, Wollman Y, Kogan G, Dekel S. *Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats*. Laser Surg Med; V22, n.2, p.97-102 1998.

LYNGSTADAAS, S.P et al. *Autocrine growth factors in human periodontal ligament cells cultured on enamel matrix derivative*. J Clin Periodontol; V.28, p.181-8, 2001.

OGISO, B. et al. “*Fibroblasts Inhibit Mineralized Bone Nodule Formation by Rat Bone Marrow Stromal Cells in vitro*”. J Cell Physiol , n. 146, p. 442, 1991.

OSHIRO, T. CALDERHEAD,, R.G. *The development of low reactive-level laser therapy (LLLT) and its present status.* J. Clin Laser Med Surg.; V.9, n.(4), p.267-75 1991.

OZAWA, Y. et al. *Low-Energy Laser Irradiation Stimulates Bone Nodule Formation at Early Stages of Cell Culture in Rat Calvarial Cells.* Bone V22, n.(4), p.347-54, 1998.

PINHEIRO, A. L. et al. *Low level laser therapy is na important in the menegement of disordies of the maxilofacial region.* J. Clin. Laser Med. Surg. V. 4, n. 15, p. 181-3, jun. 1997.

SCHIMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. *“The Critical Size Defects as an Experimental Model for Craniomandibulofacial Nounions”.* Clin Orthop , Apr., (205): p. 299 – 308, 1986.

SCHULTZ, R.J. et al. *Effects of varying intensities of laser energy on articular cartilage.* Lasers Surg Med V.5, p.557-88, 1985.

SCULEAN, A. et al. *Healing of intrabony defects following surgical treatment with or without an Er:YAG laser. A pilot study.* J Clin Periodontol 2004;

TAUBE, S.; PIIRONEN, J.; YLIPAAVALONIEMI,P. *Heliumneon laser theray in the prevention of postoperative swelling and pain after wiston tooth extraction.* Proc. Finn. Dent. Soc., v. 86, n. 1, p. 27-7, 1990.

TANG, X.M.; CHAI, B.P. *Effect of CO2 laser irradiation on experimental fracture healing: a transmission electron microscopic study*. *Laser Surg Méd* V.6, p.346-52, 1986.

THEODORO, L.H. et al. *Lasers em implantodontia*. *BCI* V.9 p.74-8, 2002.

TRELLES MA, Mayayo E. *Bone fracture consolidates faster with low-power laser*. *Laser Surg Med* V.7, p.36-45, 1987.

VEÇOSO MC. *Laser em fisioterapia*. São Paulo: Lovise; 1993.

YAAKOBI T, Maltz L, Oron U. *Promotion of bone repair in the cortical bone of the tibia in rats by low energy laser (He-Ne) irradiation*. *Calcif Tissue Int* V.59, p.297-300, 1996.