

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

PAULO EDUARDO KREISNER

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA, TOMOGRÁFICA E FÍSICA DO EFEITO DA LLLT
NA DISTRAÇÃO OSTEOGÊNICA EM MANDÍBULAS DE COELHOS**

PORTO ALEGRE
2009

PAULO EDUARDO KREISNER

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA, TOMOGRÁFICA E FÍSICA DO EFEITO DA LLLT
NA DISTRAÇÃO OSTEOGÊNICA EM MANDÍBULAS DE COELHOS**

Tese apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para a obtenção do título de Doutor em Odontologia, na área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Profa. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira / Odontologia

Coorientador: Prof. Dr. Roberto Hübler / Física

PORTO ALEGRE
2009

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*À **Natasche Ballei**, por estar ao meu lado, pelo companheirismo, compreensão, amor, por acreditar em mim e me apoiar durante o curso de pós-graduação, me dando força e inspiração ao longo desta caminhada.*

*Aos meus **pais, Edmundo Kreisner e Rejane Maltz Kreisner**, e ao **irmão, Marcelo Kreisner**, pelo amor, carinho, confiança, incentivo, amizade, apoio e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS, pela minha completa e inestimável formação como Cirurgião-Dentista e como Cirurgião Bucomaxilofacial

Ao Programa Pró-Bolsas da PUCRS por ter viabilizado, financeiramente, a realização do Doutorado.

Aos professores do curso de pós-graduação em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da PUCRS, pelo esforço e empenho em transmitir seus conhecimentos e experiências técnicas, científicas e pessoais.

À Prof^ª Dr.^a Marília Gerhardt Oliveira, pela orientação desta pesquisa, mas, principalmente por ter me acompanhado, apoiado e incentivado durante toda a trajetória da minha formação profissional, sendo um exemplo a ser seguido.

Ao Prof. Dr. Roberto Hübler, pela coorientação desta pesquisa, amizade e convivência, sem o que não seria viável a elaboração e execução.

Aos funcionários do GEPSI-LMN Eduardo Blando e André Luís Marin Vargas por estarem sempre disponíveis, colaboradores e receptivos, tornando o ambiente de trabalho saudável.

Ao Prof. Dr. Manoel Sant’Ana Filho por também estar presente durante toda a minha formação profissional e ser imprescindível para a análise histológica desta pesquisa.

Ao físico Rafael Menezes Nunes por sua disponibilidade, além de possibilitar as realizações das tomografias.

Ao colega e amigo Léonilson Gaião, uma das excelentes amizades que o Curso me proporcionou, realizando a pesquisa em conjunto e sem o qual não seria possível a realização da mesma.

*Às colegas e amigas **Dr^{as} Cristina Braga Xavier e Leticia Kirst Post** pelo acolhimento e por possibilitar a realização do experimento em Pelotas.*

*Ao **Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber** pela amizade e por ter lido, corrigido minuciosamente e contribuído de forma fundamental durante a pré-defesa.*

*À **Prof^a. Maria Rita Quintella** pela minuciosa correção da linguagem e à **Bibliotecária Anamaria Ferreira** pela cuidadosa formatação da tese.*

*Aos **colegas de pós-graduação André Takahashi, Hedelson Odenir Iecher Borges, Léonilson Gaião, Roger Lanes Silveira, Taiane Coutinho de Oliveira e Vinicius Nery Viegas** pelo convívio e alegria, que proporcionaram momentos agradáveis e amizades que perdurarão durante toda a vida.*

*Ao amigo e colega **Alexey Gaspar Martins Ferreira**, um de meus melhores amigos, e agora compadre, que sempre me apóia e incentiva como pessoa e como profissional.*

*Ao amigo e colega **Angelo Menuci Neto** por sempre se lembrar de mim, abrindo oportunidades pessoais e profissionais, sendo um exemplo como pessoa e como profissional.*

*Ao amigo e colega **Roberto de Carvalho e Silva Massulo** pela amizade, por me abrir as portas de seu consultório e por ter contribuído na minha iniciação docente.*

*Aos amigos e colegas **Carlos Alberto Medeiros Martins, Frederico Saueressig, Paulo Cauy Petry e Vinicius Nery Viegas** pela amizade e companheirismo.*

*Ao **corpo de funcionários da FO-PUCRS**, por estarem sempre empenhados em fazer o melhor de si pela Faculdade e para o aluno, em especial os funcionários da **Secretaria de Pós-Graduação**.*

“Desocupado leitor, não preciso de prestar aqui um juramento para que creias que com toda a minha vontade quisera que esse livro, como filho do entendimento, fosse o mais formoso, o mais galhardo e discreto que se pudesse imaginar: porém, não esteve em minhas mãos contravir à ordem da natureza, na qual cada coisa gera outra que lhe seja semelhante; que podia portanto o meu engenho, estéril e mal cultivado, produzir neste mundo, senão a história de um filho magro, seco e enrugado, caprichoso e cheio de pensamentos vários, e nunca imaginados de outra alguma pessoa? [...]

Acontece muitas vezes ter um pai um filho feio e extremamente desengraçado, mas o amor paternal lhe põe uma venda nos olhos para que não veja as próprias deficiências; antes as julga como discricões e lindezas, e está sempre a contá-las a seus amigos, como agudezas e donaires. Porém eu, que, ainda que pareço pai, não sou contudo senão padraço de Don Quixote, não quero deixar-me ir com a corrente do uso, nem pedir-te, quase com lágrimas nos olhos, como aí fazem muitos, que tu, leitor caríssimo, me perdoes ou desculpes as faltas que encontrares e descobrires nesse livro; e porque não és seu parente nem seu amigo, e tens a tua alma no teu corpo, e a tua liberdade de julgar muito à larga e a teu gosto, e estás em tua casa, onde és senhor dela como el-rei das suas alcavalas, e sabes o que comumente se diz ‘que debaixo de meu manto ao rei mato’. Isso tudo te isenta de todo o respeito e obrigação e podes do mesmo modo dizer dessa história tudo quanto te lembrar sem teres medo de que te caluniem pelo mal, nem te premiem pelo bem que dela disseres.”

Miguel de Cervantes

RESUMO

Esta pesquisa teve como objetivo avaliar, por métodos histológicos, tomográficos e físicos, o efeito do laser de baixa potência (LLLT – 830 nm) no osso neoformado em mandíbulas de coelhos submetidas à fratura, sem ou com distração osteogênica (DO). Foram utilizados 10 coelhos para as análises histológicas (quatro para o grupo controle e seis para o experimental) além de cinco coelhos para as análises tomográficas e físicas (um não-fraturado, não-distraído e sem irradiação laser; um fraturado, não-distraído e sem irradiação laser; um fraturado, não-distraído e com irradiação laser; um fraturado, distraído e sem irradiação laser; um fraturado, distraído e com irradiação laser). Para os coelhos que sofreram alongamento ósseo por DO foi adotado o seguinte protocolo: latência – três dias, ativação – sete dias 0,7mm/d, e consolidação – 10 dias. Para os animais irradiados, utilizou-se o laser infravermelho (GaAl)As ($\lambda=830$ nm, 40 mW) com o seguinte protocolo: dose pontual de 10 J/cm², diretamente sobre o sítio ósseo submetido à fratura e/ou DO, no período de consolidação óssea, respeitando-se intervalos de 48 horas. O percentual do osso neoformado foi maior no grupo com laser (57,89%) do que no controle (46,75%), $p=0,006$, conforme observado na análise histológica. A análise tomográfica revelou aumento da densidade, medida em Unidades Hounsfield (HU), dos ossos fraturados que foram irradiados com laser. Com relação às propriedades físicas, pareceu não haver grandes diferenças entre os grupos que sofreram fratura. Nos ossos submetidos à DO, o laser não promoveu alteração da nanodureza, mas modificou os valores do módulo de elasticidade, na amostra estudada.

Palavras-Chave: Osteogênese por Distração. Lasers. Microscopia. Tomografia. Testes de Dureza.*

*Bireme: Descritores em Ciências da Saúde. <http://decs.bvs.br/>

ABSTRACT

The purpose of this research was to evaluate the bone repair in defects created by fracture with or without distraction osteogenesis in rabbit lower jaws stimulated with low level laser therapy (LLLT – 830 nm) by histology, computerized tomography and mechanical properties. 10 rabbits underwent surgery in order to have histologic analysis (four control and six experimental) and five rabbits to tomographic and mechanical analysis (one not broken, not distracted and not irradiated; one broken, not distracted and not irradiated; one broken, not distracted but irradiated; one broken, distracted and not irradiated; one broken, distracted and irradiated). In order to achieve the distracted bone, the following protocol was used: latency period– three days, activation period – seven days 0,7 mm/d, consolidation period – 10 days. The animals were irradiated with infrared laser (GaAl)As ($\lambda=830$ nm, 40 mW) with 10 J/cm² dose per spot applied directly to the distraction osteogenesis site during the consolidation stage at 48 h intervals. Histologically, the area of the new bone was higher on irradiated group (57,89%) than the control (46,75%), $p=0,006$. The tomographic analysis shows higher bone density, measured by Hounsfield Units (HU) on the broken bone irradiated with laser and better uniform repair. The mechanical properties were the same in the broken bone. On the distracted bone, the hardness was similar in both groups, but the laser modified the elastic modulus in these rabbits.

Key-words: Distraction Osteogenesis. Lasers. Microscopy. Tomography. Hardness Tests*

*Mesh: Medical Subject Headings. <http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Representação esquemática de uma matriz formada por quadros.....	28
Figura 2	Representação esquemática dos elementos denominados <i>voxels</i>	29
Figura 3	Cada <i>voxel</i> recebe um número de acordo com o grau de atenuação de RX.....	29
Figura 4	Escala de cinza com variação de densidade	30
Figura 5	Os vários tipos de tecidos aparecem diferenciados entre si na TC.....	30
Figura 6	O penetrador está preparado para penetrar a amostra.....	34
Figura 7	Um penetrador de Vickers e a indentação correspondente.....	35
Figura 8	Aplicação dos Ciclos de carga e descarga durante o IHT.....	36
Figura 9	Coelhos alojados em gaiolas individuais no biotério da FEPPS.....	42
Figura 10	Animal com tricotomia e anti-sepsia realizadas.....	45
Figura 11	Exposição do corpo mandibular direito.....	46
Figura 12	Corticotomia vestibular.....	46
Figura 13	Distrator osteogênico instalado.....	47
Figura 14	Sutura com fio mononáilon 4-0.....	47
Figura 15	Cortes realizados para a análise microscópica.....	50
Figura 16	Exemplo de mensuração do osso neoformado.....	51
Figura 17	Área submetida a lixamento e polimento.....	52
Figura 18	Amostra incluída em resina acrílica após lixamento e polimento.....	53
Figura 19	Equipamento utilizado para testes de nanoindentação.....	54
Figura 20	Mandíbula de coelho incluída em resina.....	55
Figura 21	Divisão da região de interesse em 14 regiões.....	55
Figura 22	Microscopia óptica HE 50x.....	58
Figura 23	Microscopia óptica HE 100x.....	60
Figura 24	Coelho A – Mandíbula incluída em resina e TC correspondente.....	61
Figura 25	Coelho B – Mandíbula incluída em resina e TC correspondente.....	62
Figura 26	Coelho C – Mandíbula incluída em resina e TC correspondente.....	63
Figura 27	Coelho D – Mandíbula incluída em resina e TC correspondente.....	64
Figura 28	Coelho E – Mandíbula incluída em resina e TC correspondente.....	65
Figura 29	Coelho B – Mandíbula incluída em resina e TC correspondente.....	73
Figura 30	Coelho C – Mandíbula incluída em resina e TC correspondente.....	75
Figura 31	Coelho D – Mandíbula incluída em resina e TC correspondente.....	77
Figura 32	Coelho E – Mandíbula incluída em resina e TC correspondente.....	79

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Divisão dos grupos submetidos à análise histológica.....	42
Quadro 2	Amostras / unidades experimentais submetidas à análise tomográfica e física...	43
Quadro 3	Resumo das variações de densidade (HU) encontradas na amostra.....	66
Quadro 4	Resumo das propriedades físicas encontradas na amostra.....	72
Quadro 5	Resumo das propriedades tomográficas e físicas encontradas na amostra.....	81

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Variação de densidade (HU) do coelho A, não-fraturado, não- distraído nem irradiado com laser.....	62
Gráfico 2	Variação de densidade (HU) do coelho B, fraturado, não-distraído nem irradiado com laser.....	63
Gráfico 3	Variação de densidade (HU) do coelho C, fraturado, não-distraído e irradiado com laser.....	64
Gráfico 4	Variação de densidade (HU) do coelho D, fraturado, distraído, mas não-irradiado com laser.....	65
Gráfico 5	Variação de densidade (HU) do coelho E, fraturado, distraído e irradiado com laser.....	66
Gráfico 6	Propriedades físicas do coelho A, não-fraturado, não-distraído nem irradiado com laser.....	67
Gráfico 7	Propriedades físicas do coelho B, fraturado, não-distraído nem irradiado com laser.....	68
Gráfico 8	Propriedades físicas do coelho C, fraturado, não-distraído e irradiado com laser.....	69
Gráfico 9	Propriedades físicas do coelho D, fraturado, distraído, mas não irradiado com laser.....	70
Gráfico 10	Propriedades físicas do coelho E, fraturado, distraído e irradiado com laser.....	71
Gráfico 11	Propriedades tomográficas e físicas do coelho B, fraturado, não-distraído nem irradiado com laser.....	74
Gráfico 12	Propriedades tomográficas e físicas do coelho C, fraturado, não-distraído, mas irradiado com laser.....	76
Gráfico 13	Propriedades tomográficas e físicas do coelho D, fraturado, distraído, mas não irradiado com laser.....	78
Gráfico 14	Propriedades tomográficas e físicas do coelho E, fraturado, distraído e irradiado com laser.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Distribuição do número de unidades experimentais obtidas por animal.....	59
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

A_n	- Área neoformada
A_t	- Área total
CCI	- Coeficiente de Correlação Intraclasse
cm	- Centímetro
CEP	- Comitê de Ética em Pesquisa
CDI	- Centro de Diagnóstico por Imagem
COBEA	- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DICOM	- <i>Digital Imaging and Communications in Medicine</i>
DO	- Distração Ostoegênica
E	- Módulo de elasticidade
FEPPS	- Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
GEPSI-LMN	- Grupo de Estudos das Propriedades de Superfícies e Interfaces – Laboratório de Materiais e Nanociências
GPA	- <i>Gigapascal</i>
H	- Dureza
HE	-Hematoxicilina-Eosina
HU	- <i>Hounsfield Unit</i>
IHT	- <i>Instrumented Hardness Test</i>
ISO	- <i>International Organization for Standarization</i>
J	- <i>Joule</i>
Kg	- Quilo
LLLT	- <i>Low Level Laser Therapy</i>
mg	- Miligramas
mm	- Milímetro
MPa	- <i>Megapascal</i>
mW	- Miliwatt
nm	- Nanômetro
P	- Carga
PUCRS	- Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
RS	- Estado do Rio Grande do Sul

TC - Tomografia Computadorizada
UE - Unidade experimental
UFPel - Universidade Federal de Pelotas
(GaAl)As - Arseneto de Gálio-Alumínio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 PROPOSIÇÃO.....	18
3 REVISTA DE LITERATURA	19
3.1 DISTRAÇÃO OSTEOGÊNICA.....	19
3.2 AÇÃO DO LASER NA DISTRAÇÃO OSTEOGÊNICA.....	21
3.3 CONSIDERAÇÕES HISTOLÓGICAS.....	24
3.4 AVALIAÇÃO POR IMAGEM	26
3.5 TESTES INSTRUMENTADOS DE DUREZA – NANODUREZA (IHT)	32
4 METODOLOGIA	41
4.1 PROBLEMA.....	41
4.2 AMOSTRA E DIVISÃO DE GRUPOS	41
4.3 ETAPAS TÉCNICAS DA PESQUISA	43
4.3.1 Elaboração do distrator osteogênico.....	43
4.3.2 Sequência cirúrgica	44
4.3.3 Período pós-operatório.....	48
<i>4.3.3.1 Distração osteogênica (20 dias)</i>	<i>48</i>
4.3.4 Irradiação com o laser 830 nm	49
4.3.5 Morte dos animais	49
4.4 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E COLETA DE DADOS.....	50
4.4.1 Análise histológica	50
4.4.2 Análises tomográfica e física.....	51
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
5 RESULTADOS	57
5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA	57
5.1.1 Análise descritiva	57
5.1.2 Análise da porcentagem de formação óssea	59
5.2 ANÁLISE TOMOGRÁFICA.....	61
5.3 ANÁLISE FÍSICA	67
5.4 ANÁLISE DOS RESULTADOS EM CONJUNTO	72
6 DISCUSSÃO	82
7 CONCLUSÕES	89

REFERÊNCIAS.....	90
ANEXOS	99
ANEXO A – Aprovação da Pesquisa pelo CEP/PUCRS	99
ANEXO B – Aprovação da Pesquisa pela Comissão de Ética em Experimentação da Universidade Federal de Pelotas/RS.....	100
ANEXO C – Calibração do Laser pelo Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Física - PUCRS	101
APÊNDICE	104
APÊNDICE A – Publicação da Equipe: <i>Lasers Med Sci</i> , 2009.....	104

1 INTRODUÇÃO

O tratamento das deformidades faciais frequentemente envolve cirurgias múltiplas e de alto custo, sendo que, muitas vezes, os resultados obtidos não são satisfatórios¹.

As reconstruções ósseas têm sido cercadas de dificuldades como a alta morbidade para a obtenção de enxertos em quantidade suficiente, muitas vezes com resultados pouco satisfatórios na área da Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial².

A distração osteogênica (DO) apresenta-se como uma alternativa promissora e cada vez mais sedimentada em reconstruções ósseas faciais, podendo ser empregada nos casos de deformidades congênitas, traumas ou após cirurgias oncológicas. A DO é baseada no emprego de aparelhos distratores, visando possibilitar o crescimento ósseo em um sítio deformado^{3,4}.

A estabilidade em longo prazo dos resultados obtidos pela DO ainda não está bem-documentada, havendo relatos de instabilidade e recidivas⁴⁻⁷. Diante disso, determinados autores buscam acelerar o processo de maturação óssea e melhorar as propriedades físicas do sítio ósseo alongado⁸⁻¹².

O uso do laser terapêutico demonstrou algum grau de benefício no processo de reparação em tecidos moles e ósseos¹³⁻¹⁵. A DO envolve atividades metabólicas que podem ser passíveis de biomodulação pelo uso de laser, podendo reduzir o tempo global do tratamento.

Uma das maneiras de avaliar qualitativa e quantitativamente a neoformação óssea é a tomografia computadorizada. Este exame permite avaliar a densidade e a geometria óssea, proporcionando informações mais detalhadas sobre a qualidade e a quantidade de osso neoformado em decorrência de sua grande acurácia, mínimo erro e relação direta com os achados histológicos. Por esta razão, a literatura ortopédica descreve-a como o método mais objetivo para avaliar o osso da área submetida à distração. Apesar disto, poucas pesquisas clínicas ou experimentais sobre imagem têm sido publicadas objetivando quantificar o processo de regeneração óssea no esqueleto craniofacial¹⁶⁻¹⁹.

As diversas aplicações da DO, aliada ao seu uso crescente em Odontologia, tornam necessário conhecer, de forma precisa, as características e as limitações das propriedades mecânicas do osso alongado por meio desta técnica. Experimentos laboratoriais, denominados testes instrumentados de dureza (IHT), permitem alcançar tal precisão, pela simulação de situações mecânicas a que tecidos são submetidos, a fim de determinar suas propriedades físicas²⁰.

A dureza é uma das propriedades mecânicas mais importantes de um material, estando inerentemente relacionada à resistência que ele apresenta. Sua mensuração é importante por ser um indicativo para a avaliação de materiais quanto à sua *performance* frente à aplicação de uma tensão. Sua importância está relacionada a grandes aplicações de carga a que os materiais, no caso o osso distraído, são submetidos, auxiliando na escolha daqueles que resistam a condições bastante adversas. O módulo de elasticidade, conhecido como módulo de Young, também pode ser aferido durante os IHT. Em termos práticos, o módulo de elasticidade pode ser interpretado como a rigidez ou a resistência à deformação elástica. Portanto, quanto maior for o módulo de elasticidade de um material, mais rígido ele será, isto é, menor é a deformação elástica que resulta da aplicação de uma dada tensão. Além do mais, o módulo de elasticidade pode ser a quantidade de deformação que pode ser causada a um material sem deformá-lo permanentemente, isto é, sem causar deformação plástica. Junto com as medidas de dureza, o módulo de elasticidade é essencial para interpretar o comportamento dos materiais^{20,21}.

Diversas pesquisas utilizaram o modelo animal para elucidar e aprofundar o processo de distração osteogênica. Dentro deste contexto, inúmeros autores empregaram coelhos para estudar o processo de alongamento ósseo^{9,11,12,22-26}. Referido processo parece ser o ideal para estudo da cicatrização e da regeneração tecidual²⁷.

2 PROPOSIÇÃO

Avaliar, histologicamente, a ação do laser infravermelho (GaAl)As ($\lambda=830$ nm, 40 mW) no processo de neoformação óssea em mandíbulas distraídas de coelhos.

Avaliar, por meio de tomografias computadorizadas, a ação do laser infravermelho (GaAl)As ($\lambda=830$ nm, 40 mW) no processo de neoformação óssea em mandíbulas de coelhos fraturadas, sem e com distração osteogênica.

Avaliar, por meio de testes instrumentados de dureza (IHT), as propriedades físicas de nanodureza e módulo de elasticidade do osso fraturado, sem e com distração osteogênica, submetido ou não à irradiação com laser infravermelho (GaAl)As ($\lambda=830$ nm, 40 mW), no processo de neoformação óssea em mandíbulas de coelhos.

3 REVISTA DE LITERATURA

3.1 DISTRAÇÃO OSTEOGÊNICA

Codvilla apud Samchukov; Cherkashin e Cope, em 1905, fez o primeiro relato de DO em Bologna, na Itália, ao utilizar a técnica no fêmur de um paciente com discrepância no comprimento das pernas. Tentou obter o crescimento ósseo por intermédio de um dispositivo rudimentar de tração externa. À época, os resultados não foram satisfatórios ou motivadores devido à alta frequência de complicações³.

Em 1927, Abbott apud Samchukov; Cherkashin e Cope foi o primeiro a utilizar a DO para alongamento da tíbia em Missouri, nos Estados Unidos. Já então, fez referência à necessidade de um período de latência de sete a 10 dias. Da mesma forma, sua técnica não obteve grande aceitação clínica em decorrência da grande morbidade e de complicações como infecções, edema local, necrose de pele e calcificação imprevisível nas zonas expandidas³.

Somente em 1973, também nos Estados Unidos em Utah, Snyder et al. empregaram a DO no esqueleto facial. Os autores criaram um defeito de 15 mm na mandíbula de um cão, incluindo mucosa e osso, colocando-o em uma oclusão classe II, e, com um distrator externo e um protocolo de uma ativação diária de 1mm durante 14 dias, foi possível restabelecer a oclusão normal no animal. Os pesquisadores consideraram o procedimento bem-sucedido a partir de avaliações clínicas e radiográficas realizadas ao final do período de maturação óssea de seis semanas²⁸.

Os estudos do médico ortopedista russo Gavriil Ilizarov, publicados internacionalmente em 1989, constituem um verdadeiro marco na evolução, difusão e sedimentação da DO. Por este motivo, o autor é considerado o “Pai da Distração Osteogênica”. Ao todo, são cinco experimentos principais que embasaram a técnica. Nos cinco estudos, sempre utilizando tíbia de cães, Ilizarov avaliou diversas variáveis e observou a sua interferência no processo de neoformação óssea. As conclusões de suas pesquisas foram:

- a) quanto mais rígida a fixação e mais preservadas as estruturas de aportes sanguíneo e celular, com mínima lesão do periósteeo e endósteeo, maior será o potencial osteogênico;
- b) com o ritmo de ativação superior a 1,5 mm/d, formou-se tecido osteóide;
- c) nos casos com lesão da medular óssea, formou-se tecido necrótico;
- d) a decorticalização parcial ou total não interfere na recorticalização do segmento ósseo alongado;
- e) o ritmo de 1mm/d de ativação apresentou-se bem-tolerado, sem que houvesse união precoce;
- f) a osteogênese ocorreu mais rapidamente à medida que a frequência de ativações aumentava^{29,30}.

Atualmente, a DO apresenta-se como uma alternativa promissora e cada vez mais sedimentada, sendo empregada em reconstruções ósseas faciais, em casos de deformidades congênitas, traumas ou após cirurgias oncológicas. A DO é conseguida por meio da implantação cirúrgica de aparelhos distratores, objetivando um crescimento ósseo linear em um sítio deformado (atrófico ou ressecado)^{3,4}.

O princípio da DO é que o tracionamento gradual dos tecidos provoca um estresse que estimula e mantém tanto a regeneração quanto o crescimento ativo das estruturas. A estimulação mecânica gerada pelo processo de alongamento induz a uma cascata de respostas biológicas. A sinalização molecular e celular é amplificada durante o processo de distração osteogênica, persistindo até o término de cicatrização óssea^{27,31}.

A técnica da DO é dividida em estágios, iniciando pelo procedimento cirúrgico, quando o aparelho distrator é instalado e a corticotomia realizada. Um período chamado de latência deve ser observado, momento em que não há afastamento dos cotos ósseos, iniciando o processo reparacional (formação de um calo ósseo imaturo). Segue-se o período de ativação (teoricamente sem limite de tempo), quando os cotos ósseos são afastados gradativamente, pela ativação do aparelho distrator, até a correção da deformidade. Finalmente, tem-se o período de maturação óssea (três a sete semanas), quando o aparelho distrator deixa de ser ativado e passa a funcionar apenas como mecanismo de fixação rígida, a fim de que o calo ósseo imaturo mantenha-se imobilizado para ocorrer mineralização e remodelação ósseas. Tal

período é crucial para o sucesso da técnica. Somente ao final deste período o aparelho distrator pode ser removido^{32,33}.

Apesar da utilização cada vez mais difundida, a DO pode ser de grande desconforto para o paciente, especialmente quando utilizados aparelhos distratores externos, que podem induzir infecções de superfície, parestesias, cicatrizes hipertróficas e dificuldade de convívio social³⁴.

Além dos inconvenientes do distrator externo, a estabilidade em longo prazo dos resultados obtidos pela DO ainda não está bem-documentada, existindo relatos de instabilidade e recidivas⁴⁻⁷. Diante disto, alguns autores buscam acelerar o processo de maturação óssea e melhorar as propriedades físicas do sítio ósseo alongado⁸⁻¹².

Diversas pesquisas utilizaram o modelo animal para elucidar e aprofundar o processo de distração osteogênica. Os primeiros modelos foram os cães^{28,35-37}, incluindo também os cinco estudos clássicos de Gavriil Ilizarov^{29,30}. Após, foram empregados coelhos^{9,11-12,22-24}, macacos³⁸ e ovelhas^{2,10,32,39,40}.

3.2 AÇÃO DO LASER NA DISTRAÇÃO OSTEOGÊNICA

Conforme já mencionado, diversos pesquisadores buscam acelerar o processo de maturação óssea e melhorar as propriedades físicas do sítio ósseo alongado por DO⁸⁻¹².

Em estudos anteriores foi demonstrada e comprovada a utilização e os efeitos do laser de baixa potência (LLLT) no reparo ósseo. Foi demonstrado que a irradiação poderia induzir atividade osteoblástica e conseqüente reparo ósseo no local da lesão. Esta capacidade de alterar a atividade celular denomina-se biomodulação, a qual pode ser obtida por meio da utilização de um aparelho de laser operado em baixas potências (1 a 500 mW), chamado de laser de baixa intensidade ou laser terapêutico (LLLT)^{41,42}.

O tipo de irradiação mais utilizado atualmente encontra-se nos espectro de luz visível ou infravermelho. As primeiras pesquisas enfocaram a utilização da luz visível, em especial

com o laser de He-Ne, oferecendo resultados positivos ao aumentar a microcirculação, a síntese de colágeno, bem como a proliferação de células epiteliais e fibroblastos, além ativar o sistema linfático. Por intermédio de tal biomodulação, esse tipo de terapia, com luz visível, é empregada visando à obtenção de efeitos analgésicos, antiinflamatórios e regenerativos atuando, em especial, em tecidos moles^{43,44}.

Mais recentemente, tem sido demonstrado que o laser acelera a regeneração de feridas, tanto de tecidos moles quanto de duros, estimulando fibroblastos, tecidos especializados e endotélio vascular, entre outros. Portanto, o laser tem a capacidade de biomodular e acelerar o processo de reparo, ativando a proliferação celular e a vascularização de tecidos lesados. Esta biomodulação parece estar associada ao potencial do laser em aumentar a respiração mitocondrial e a síntese de adenosina trifosfato (ATP)⁴⁵⁻⁴⁹.

Atualmente, as diversas pesquisas visando à biomodulação do tecido ósseo têm utilizado o laser de espectro infravermelho. De forma geral, sua utilização proporciona aos pacientes um pós-operatório mais confortável, além de promover benefícios no que diz respeito à cicatrização^{50,51}.

A DO também envolve atividades metabólicas potencialmente passíveis de biomodulação pelo uso de laser, que poderia, igualmente, reduzir o tempo global de tratamento e proporcionar maior conforto aos pacientes. No entanto, são escassas as informações que relacionam a utilização do laser ao processo de DO.

Em pesquisa realizada em mandíbulas de ovelhas, foi avaliada a ação do laser diodo de 830 nm no processo de alongamento ósseo. Ao utilizar laser de Arseneto de Gálio-Alumínio (GaAl)As, foi observado aumento significativo da quantidade de trabéculas ósseas no grupo irradiado, além deste apresentar maior resistência mecânica à tração².

Foi realizada outra pesquisa semelhante, com o propósito de avaliar se a irradiação com laser de baixa potência poderia acelerar a regeneração óssea e reduzir o tempo da fase de consolidação em mandíbulas distraídas de coelhos, com o uso do laser (GaAl)As. Mediante os resultados obtidos, os pesquisadores concluíram que o laser acelera o processo de regeneração óssea durante a fase de consolidação, permitindo a remoção mais precoce do aparelho e reduzindo a morbidade²⁵.

Outro grupo de pesquisadores procurou avaliar se o laser aplicado diretamente em defeitos ósseos criados em mandíbulas de ratos aceleraria o processo de formação óssea. Para tanto, usaram o laser de (GaAl)As (780 nm, 35 mW, 1,4J) diretamente sobre o tecido ósseo, durante o preparo do defeito, antes da realização da sutura. Os animais foram mortos em 15, 45 e 60 dias. Os resultados histológicos mostraram formação óssea em ambos os grupos. No entanto, o grupo irradiado apresentou resposta tecidual mais avançada em relação ao grupo controle, abreviando o tempo de reação inflamatória inicial e promovendo uma formação óssea mais rápida em 15 e 45 dias. Por outro lado, não houve diferenças significativas entre os grupos após 60 dias. Portanto, o laser apresenta efeito bioestimulatório nas fases iniciais, modulando a resposta inflamatória e antecipando o processo de reparo⁴⁹.

Sobre o reparo ósseo em cavidades produzidas em fêmur de ratos, foi utilizado laser infravermelho (830 nm, 10 J/Cm² e 50 mW) e vermelho (685 nm, 10 J/cm² e 35mW) para biomodular a cicatrização. Os animais receberam irradiação com intervalo de 48 horas, iniciada imediatamente após a realização do defeito. Ambos os grupos irradiados apresentaram graus de formação óssea e regeneração vertical maiores do que o grupo controle, o qual não foi irradiado. Entretanto, não foram encontradas diferenças significativas com relação ao grau de corticalização. Os autores concluíram que a laserterapia foi eficiente na promoção do reparo ósseo⁴².

Uma pesquisa recente investigou o efeito do laser na cicatrização de fraturas produzidas em tíbias de coelhos. O laser utilizado foi o (GaAl)As (780 nm, 4 J/Cm²) aplicado diariamente durante 5 minutos, a partir do quarto dia até o final do pós-operatório em quatro semanas. A formação do calo ósseo e a densidade óssea foram avaliadas por meio de tomografias computadorizadas. Além disso, realizaram-se testes para avaliar as propriedades biomecânicas. Os resultados demonstraram maior densidade óssea no grupo irradiado com laser. A tomografia computadorizada mostrou, ao longo do calo ósseo, uma densidade de 297 Unidades Hounsfield (HU) no grupo controle e de 691 HU no irradiado. Com relação aos testes biomecânicos, não foram verificadas diferenças com relação à força de tensão entre o grupo com e sem laser. Tais resultados sugerem que a utilização do laser pode favorecer a formação do calo em estágios precoces do processo de cicatrização, mas com benefícios duvidosos nas propriedades biomecânicas⁵².

3.3 CONSIDERAÇÕES HISTOLÓGICAS

O objetivo das avaliações histológicas é avaliar a formação óssea, o efeito da latência e a duração do período de fixação⁵³.

A formação óssea na DO lembra muitos aspectos da cicatrização normal de fraturas. Apesar de muitas citocinas, fatores de crescimento, hormônios e componentes de matriz celular serem capazes de regular aspectos específicos da regeneração e do remodelamento ósseo, as proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) constituem-se nos fatores osteoindutivos mais potentes. Tais proteínas são capazes de acelerar a regeneração durante a distração osteogênica⁵⁴.

No passado, a área distraída era considerada como uma ferida que favorecia a interposição de tecido fibroso, muitas vezes levando a uma ausência de união dos segmentos ósseos fraturados. Isso só é verdadeiro nos casos de distrações grandes e rápidas, que podem resultar em união fibrosa, enquanto que ativações de 0,5 a 1mm por dia resultam em formação óssea^{31,33,55}.

Tais diferenças decorrem do fato de que as células na região da distração podem ser derivadas de células osteoprogenitoras do periósteo, do canal medular e dos tecidos ao redor. Sua diferenciação é controlada por condições mecânicas locais e pela vascularização. Portanto, a diferenciação de células osteoprogenitoras é afetada pela velocidade da distração. Dependendo da velocidade, fibroblastos dos tecidos ao redor podem migrar antes das células osteogênicas^{24,31}.

Uma pesquisa documentou a progressão e o padrão de formação óssea em mandíbulas de 24 porcos. Para tanto, os autores promoveram uma área distraída de 12 mm que, de acordo com o grupo, recebeu ativação de 1, 2 e 4 mm por dia. Os animais foram mortos com zero, oito, 16 e 24 dias de fixação. Na maioria dos espécimes mortos a partir de oito dias, já foi verificada a formação de tecido ósseo. A média percentual de formação óssea foi de 12,4% (0-25,9%), 7,5% (0-21,3%) e 3,8% (0-10,5%) para mandíbulas alongadas 1, 2 e 4 mm por dia, respectivamente. Além disso, foi verificada maior quantidade de osso nas margens da osteotomia, diminuindo a quantidade em direção ao centro da ferida. Os especialistas

observaram três zonas distintas: uma de osso original, outra de neoformação óssea e uma terceira interzona central mais fibrosa. Não foi constatada formação de cartilagem. O padrão de formação óssea seguiu um trajeto perpendicular ao traço de fratura, mas paralelo ao alongamento. A ossificação observada foi do tipo intramembranosa⁵³.

Da mesma forma, foram analisadas as características microscópicas do efeito do laser de baixa intensidade no período de ativação e consolidação de mandíbulas de ovelhas submetidas à DO, sendo os animais divididos em três grupos. O primeiro foi o controle, o qual não recebeu irradiação com laser. O segundo recebeu irradiação no período de ativação e o terceiro no de consolidação, o qual totalizou 21 dias. Em todos os grupos foi possível identificar o local de osso maduro lamelar preexistente, com matriz calcificada, canais de Havers e alguns osteócitos. Distanciando-se do osso maduro, observaram-se trabéculas de tecido ósseo menos volumosas dispostas no sentido do alongamento. Na região mais central, havia maior volume de tecido conectivo fibroso, bastante vascularizado e pequenas zonas de calcificação. Os resultados demonstraram que os grupos irradiados com laser (GaAl)As apresentaram maior disposição de trabéculas ósseas mineralizadas em relação ao controle. No grupo que recebeu irradiação no período de ativação foi observada a presença de tecido cartilaginoso. Portanto, o laser atuou de forma mais favorável quando utilizado no período de consolidação, após o alongamento ósseo².

Outros pesquisadores observaram os efeitos do laser de baixa intensidade na DO realizada em mandíbulas de coelhos. Após um período de latência de um dia, os animais receberam ativações diárias de 1 mm/dia durante 10 dias, sendo mortos duas, quatro e seis semanas após o término da ativação. Os resultados histológicos mostraram áreas de formação óssea em todos os grupos. O grupo que recebeu irradiação com laser apresentou grau mais avançado de neoformação óssea, com menor interposição de tecido fibrovascular²⁵.

Também foi avaliado histologicamente o processo de DO em mandíbula de coelhos. Após um período de latência de três dias, deu-se o processo de ativação de 0,9 mm/dia, durante 11 dias. Os animais foram mortos após duas e quatro semanas do período de consolidação. Os autores observaram um aumento da perfusão sanguínea em toda a área distraída, após duas e quatro semanas. Na segunda semana, observaram união óssea da área distraída central, com áreas focais de tecido fibroso. Na quarta semana, verificaram união óssea completa e corticalização parcial²⁷.

Foi realizada uma pesquisa quantitativa para comparar os ritmos contínuos e descontínuos de DO em coelhos. Após um período de latência de três dias, os ossos foram distraídos 0,9 mm/dia durante 11 dias, de três maneiras, de acordo com o grupo. O primeiro recebeu ativações únicas diárias, o segundo, três ativações diárias, enquanto o terceiro recebeu ativação contínua, todos com alongamento de 0,9 mm/dia. Após um período de consolidação de três semanas, os ossos regenerados foram analisados por histomorfometria. De maneira geral, todos os grupos mostraram formação de trabeculado ósseo, entremeados por tecido fibrovascular. O trabeculado ósseo esteve alinhado em direção ao vetor da distração. A maturação óssea não esteve completa após o período de três semanas de maturação. A área central da regeneração mostrou menor quantidade de formação óssea, indicando que a mesma iniciou nos limites/bordas do osso preexistente, diminuindo em direção à área central. Um grande número de osteoblastos foi encontrado, perfilados ao redor do osso novo em formação. Da mesma forma, muitos osteócitos foram visualizados no interior desse osso, mas identificados poucos osteoclastos. Não ocorreu formação de cartilagem. O grupo de ativação contínua apresentou maior volume de regeneração óssea na parte central da regeneração em relação ao modo de ativação descontínua. Além disso, os pesquisadores observaram maior atividade osteoblástica e maior número de vasos sanguíneos. Maior aposição mineral também foi verificada no grupo de ativação contínua. Os autores concluíram que esse modo de ativação acelera a formação óssea⁵⁶.

3.4 AVALIAÇÃO POR IMAGEM

A DO é uma técnica fascinante, estando cada vez mais popularizada e revolucionando o tratamento de diversas malformações congênitas ou adquiridas. No entanto, poucas pesquisas clínicas ou experimentais sobre imagem têm sido publicadas visando quantificar o processo de regeneração óssea no esqueleto craniofacial¹⁹.

Entre os métodos já utilizados para análise de feridas distraídas experimentalmente destacam-se o exame clínico, radiografias bidimensionais^{57,58}, tomografias computadorizadas^{18,59-61}, ultrassonografias⁶²⁻⁶⁴, testes biomecânicos^{63,65} e histologia^{3,53,66,67}.

As radiografias bidimensionais têm valor limitado para documentar o intervalo de cicatrização óssea, demonstrando formação óssea apenas depois de a regeneração estar densamente calcificada. Esta fase ocorre somente após o período de fixação. Além disto, tais imagens fornecem informações insuficientes quanto ao volume ósseo e, portanto, também não podem prever as propriedades biomecânicas⁶⁸.

Por outro lado, as tomografias computadorizadas proporcionam informações mais detalhadas sobre a qualidade e a quantidade de osso nas áreas distraídas. Elas são descritas como um método de análise quantitativa da densidade, após o alongamento. Portanto, permitem mensurar a densidade e as variações de densidade do osso alongado graças à sua grande acurácia, mínimo erro e correlação direta com os achados histológicos¹⁶⁻¹⁹.

Dentre as vantagens da utilização da TC, observa-se que são mais sensíveis aos tipos de tecidos quando comparada às radiografias convencionais, de maneira que diferenças entre tipos de tecidos podem ser mais claramente delineadas e estudadas. Em outras palavras, a radiografia convencional mostra tecidos que tenham diferença de pelo menos 10% em densidade, ao passo que a TC pode detectar diferenças de densidade entre tecidos de 1% ou até menos⁶⁹.

A TC é o processo de produção de seções de imagens de um corpo usando raios X e computadores. O exame consiste de um número de cortes de imagens contínuas por meio de uma área de interesse, permitindo a visualização direta das estruturas internas de tal área. Além disso, é possível a realização de reconstruções tridimensionais de alta qualidade. Isto facilita a visualização, reconstrução e edições de imagem. De maneira similar às técnicas radiográficas convencionais, a interpretação das imagens de TC requer um conhecimento profundo da anatomia da estrutura anatômica que está sendo analisada⁶⁹⁻⁷¹.

Os princípios básicos da TC são semelhantes aos de uma radiografia convencional, na qual se utilizam raios X para a criação de um mapa de atenuação dos tecidos de uma determinada área. Esta atenuação traduz-se em dados matemáticos armazenados e organizados em um computador. A absorção dos raios X é dependente da composição do meio que os mesmos atravessam, de forma que as imagens formadas em uma tomografia dependem basicamente da quantidade e da intensidade do feixe de raios X que atravessa o objeto a ser estudado. Em relação ao objeto, deve ser considerado seu número atômico, sua

densidade física e sua espessura. Estas propriedades determinarão o maior ou menor grau de atenuação dos raios X⁷².

A imagem capturada pelo tomógrafo nada mais é do que uma matriz formada por quadros dispostos em filas e colunas, nas quais cada quadro é um *pixel* (Figura 1). De acordo com o grau de atenuação, esse *pixel* irá receber uma cor específica da escala de cinzas. Assim, a matriz caracteriza-se por uma grade formada por linhas e colunas de *pixels*⁷⁰.

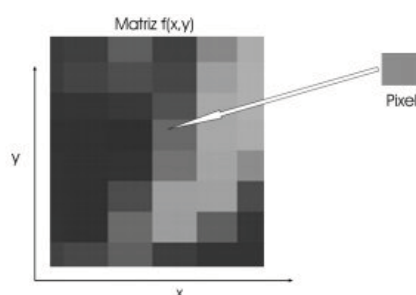


Figura 1: Representação esquemática de uma matriz formada por quadros, onde cada quadro é um *pixel*.

Fonte: www.tecnologiaradiologica.com/digital.htm⁷³, 2009.

Após diversas transmissões de dados de raio X, a anatomia reconstruída na forma de imagem digital é composta por um grande número de blocos diminutos e alongados. Cada um desses blocos representa um volume de tecido. Tais blocos são denominados elemento de volume, conhecidos por *voxels*. Portanto, os *voxels* são elementos de tecidos tridimensionais com altura, largura e profundidade (Figura 2). A profundidade é determinada pela espessura do corte conforme selecionado pelo operador do *scanner*. A espessura, por sua vez, é controlada pelo colimador da fonte e varia de 0,5 a vários milímetros⁶⁹.

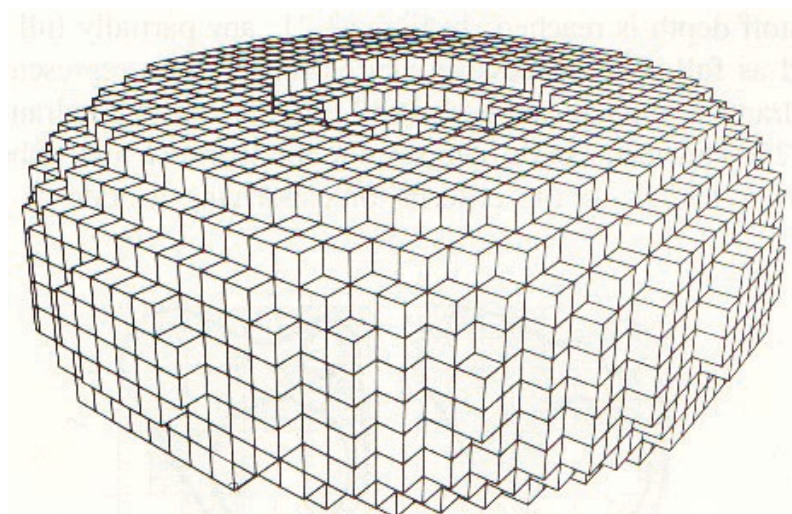


Figura 2: Representação esquemática dos elementos tridimensionais denominados *voxels*, os quais possuem altura, largura e profundidade.

Fonte: <http://caad.arch.ethz.ch/teaching/nds/ws98/computing/cad/imgs/voxel.gif>⁷⁴

Cada *voxel* irá receber um número proporcional ao grau de atenuação de raio X daquela porção de tecido (Figura 3). Na TC, tais dados de absorção diferencial de tecidos por elementos de *voxel* são coletados e processados pela unidade de processamento do computador. Uma vez determinado o grau de atenuação de cada *voxel*, o corte de tecido tridimensional é projetado no computador como uma imagem bidimensional, a qual possui apenas altura e largura. Esta imagem é chamada de matriz de exposição, composta de elementos de imagem chamados de *pixels*. Portanto, cada *voxel* de tecido é representado no monitor como um *pixel*⁶⁹.

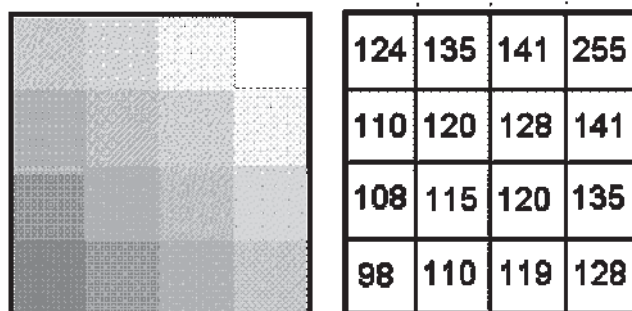


Figura 3: Cada *voxel* recebe um número de acordo com o grau de atenuação de RX.

Fonte: <http://www.inf.ufsc.br/~awangenh/InfoMed/2005/Image60.gif>⁷⁵

Os números obtidos conforme a atenuação de raios X são chamados de unidades Hounsfield (HU). Nelas, os matizes de cinza são relacionados aos números de TC, resultando em uma imagem tomográfica em escala de cinza. Os *scanners* são calibrados de forma que a água seja sempre “0”. O osso cortical apresenta valor de +1.000 até +3.000, enquanto que o ar tem valor de -1.000 (Figura 4). Entre estes extremos encontram-se tecidos e substâncias que apresentam diversos números de TC, de acordo com sua atenuação^{69,70}.

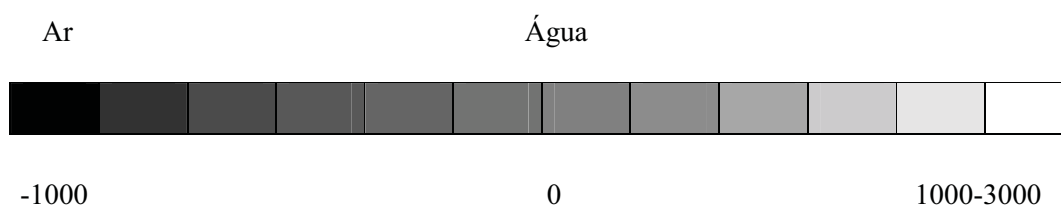


Figura 4: Escala de cinza com variação de densidade, de acordo com o grau de atenuação dos raios X.

Assim, osso, músculo e gordura aparecem, todos, com aspecto diferente entre si em uma imagem de TC devido à sua atenuação e ao número de TC (HU) atribuído a cada um. Tecidos densos aparecem em branco, enquanto o ar mostra-se em preto. Gordura e músculo, cujas densidades situam-se entre as do osso e as do ar, aparecem como matizes variados de cinza, conforme se pode ver na Figura 5⁶⁹.

TIPO DE TECIDO E NÚMERO DE TC		
<i>TIPO DE TECIDO</i>	<i>NÚMEROS DE TC</i>	<i>ASPECTO</i>
Osso cortical		Branco Cinza
Músculo	+1000	Cinza claro
Substância branca	+50 +45 +40	Cinza
Substância cinzenta	+20	Cinza
Sangue*	+15	Cinza
	0 (linha de base) - 100	Cinza escuro a preto
	-200	Cinza escuro a preto
	-1000	*Branco, se usado contraste

Figura 5: Os vários tipos de tecidos aparecem diferenciados entre si na TC, em decorrência do grau de atenuação dos raios X e da consequente diferença de HU.

Fonte: Adaptado de BONTRAGER⁶⁹ (2003)

Pelo fato de a TC oferecer tais propriedades, com as diversas vantagens associadas e já mencionadas, este tipo de exame é amplamente utilizado na Medicina ortopédica. Em Odontologia, a escala Hounsfield é usada em especial na implantodontia, a fim de examinar a densidade óssea para posterior instalação de implantes dentários^{76,77}.

Uma pesquisa foi realizada com o objetivo de avaliar, por meio de TC, a regeneração óssea durante a DO produzida em mandíbulas de cães, em três diferentes períodos de consolidação. Para tanto, os autores utilizaram 12 animais que, após sofrerem alongamento ósseo de 10 mm, foram divididos em três grupos, de acordo com o período de consolidação: quatro, seis ou oito semanas. No referido estudo, não foi utilizada a Unidade Hounsfield para avaliar a densidade óssea, uma vez que tais valores obtidos foram convertidos para um equivalente ósseo mineral de K_2HP0_4 . Os resultados mostraram densidade média pequena da regeneração no grupo de quatro semanas quando comparado ao grupo de seis e oito semanas. Por outro lado, os pesquisadores não verificaram diferença significativa entre as densidades médias entre os grupos de seis e oito semanas. De maneira geral, a densidade do osso regenerado foi maior na periferia do que na área central do osso alongado. Também foi constatado que a densidade óssea da área regenerada nunca chegou aos níveis verificados antes do alongamento ósseo. Com relação ao osso adjacente a regeneração, mas que não foi alongando, foram observados níveis de densidade menores do que os índices pré cirúrgicos⁶¹.

Em 72 pacientes que iriam receber 131 implantes dentários, verificaram-se as variações de densidade através de tomografias computadorizadas. Foram identificados valores variáveis de 278 até 1.227 HU, com uma média de $766,5 \pm 265$ HU. Além disto, ficou constatada diferença significativa entre as médias de densidades ósseas da mandíbula ($856,8 \pm 248$ HU) e da maxila ($594,2 \pm 207$ HU). Os pesquisadores observaram, ainda, valores médios de $944,9 \pm 207$ HU na região anterior de mandíbula, $715,8 \pm 190$ HU na região anterior de maxila, $674,3 \pm 227$ HU na região posterior de mandíbula e $455,1 \pm 122$ HU na região posterior de maxila. Concluíram que a TC demonstra grande utilidade ao avaliar a densidade óssea do osso para possível instalação de implantes dentários⁷⁸.

A densidade óssea dos ossos alveolar e basal da maxila e da mandíbula foi investigada através de 63 tomografias. A densidade óssea na região alveolar da maxila variou de 810 a 940 HU, exceto na região de tuberosidade, onde a variação foi de 443 a 615 HU. A região basal deste osso obteve maior densidade, entre 835 a 1113 HU. Com relação ao osso

mandibular, a densidade óssea alveolar observada foi de 800 a 1.580 HU, enquanto na região basal foi de 1.320 a 1.560 HU. A densidade óssea foi maior na mandíbula do que na maxila, observando-se aumento progressivo da região de incisivos para a região retromolar⁷⁹.

Outra pesquisa determinou a variação de densidade em locais que iriam receber implantes dentários. Para tanto, os autores utilizaram TC de 140 pacientes, examinando 372 regiões que iriam receber tais implantes. A densidade foi mensurada pela utilização da Unidade Hounsfield. Foram encontrados valores que variaram entre 69 e 1.603 HU. Foram encontrados valores médios de 927 ± 237 , 721 ± 291 , 708 ± 277 e 505 ± 274 para a região anterior de mandíbula, posterior de mandíbula, anterior de maxila e posterior de maxila, respectivamente. Os pesquisadores concluíram que a TC é um exame útil para determinar a densidade óssea dos maxilares, previamente à colocação de implantes dentários⁸⁰.

Foram averiguadas as diferenças de densidades ósseas entre as raízes dentárias, visando à posterior instalação de miniimplantes. A densidade óssea foi avaliada através de 28 TC, por intermédio da escala Hounsfield (HU). Na maioria das regiões, densidades ósseas maiores que 850 HU foram encontradas. Tanto na maxila quanto na mandíbula, ocorreu aumento significativo de densidade da crista alveolar em direção ao osso basal na região posterior. Na região anterior os especialistas observaram o contrário. Na mandíbula, a densidade óssea aumentou progressivamente da região anterior para a posterior⁸¹.

3.5 TESTES INSTRUMENTADOS DE DUREZA – NANODUREZA (IHT)

As diversas aplicações da DO, aliadas ao seu uso crescente em Odontologia, tornam necessário conhecer de forma precisa as características e as limitações das propriedades mecânicas do osso distraído. Tais propriedades mecânicas determinarão o comportamento ósseo sob a aplicação de uma carga ou força.

A dureza dos materiais foi avaliada desde a pré-história humana, na verificação da resistência que os mesmos ofereciam quando usado como ferramenta⁸². No entanto, a avaliação científica desta propriedade teve início somente no século XVIII, sendo convencionalizado que a dureza estava ligada à capacidade de um material arranhar o outro⁸³.

Aumentando a necessidade de qualificar e quantificar a dureza dos materiais de forma mais precisa, novas técnicas de medida estão hoje sendo utilizadas²⁰.

Atualmente, por meio de experimentos laboratoriais é possível alcançar esta precisão, quando da simulações de situações a que os tecidos são submetidos, reproduzidas com o máximo de fidelidade possível a fim de determinar suas propriedades físicas. O grande avanço na tecnologia permitiu o desenvolvimento de equipamentos de alta resolução, o que possibilita o controle computadorizado dos testes de dureza, permitindo, ainda, avaliar outras propriedades mecânicas de um material. A demanda por materiais que apresentem propriedades mecânicas contra desgaste, corrosão e deformação é constante, bem como por materiais de alta resistência e durabilidade. O desenvolvimento de técnicas recentes de micro e nanotecnologia tem redirecionado as pesquisas de avaliação das propriedades mecânicas destes materiais^{20,84,85}.

A dureza é uma das propriedades mecânicas mais importantes de um material, estando inerentemente relacionada à resistência que o mesmo apresenta. Sua caracterização é importante por ser um indicativo para a avaliação de materiais quanto a seu comportamento frente à aplicação de uma tensão. Sua importância está relacionada às grandes aplicações de carga a que os materiais, no caso o osso distraído, são submetidos, auxiliando na escolha daqueles que resistam a condições bastante adversas. Os testes de nanodureza são simples, rápidos e não-destrutivos^{20,21}.

Inúmeros fatores estão relacionados à dureza de um material. Portanto, não é possível atribuir tal propriedade a um único fator, mas a um conjunto de fatores, sendo extremamente difícil e complexo definir a razão pela qual um material é mais ou menos duro. Assim, a dureza está relacionada à estrutura cristalina que forma um material, bem como aos defeitos e impurezas associadas a tal estrutura. A simetria e a maneira como as tensões mecânicas se distribuem por meio de uma estrutura cristalina podem determinar a dureza de um material. Da mesma forma, o deslocamento de discordâncias, o empacotamento de um material, seu tamanho de grão, sua estrutura cristalina, a presença de contornos de grão e a temperatura podem atuar como agentes modificadores da dureza desse material. Os testes de dureza têm utilização frequente, pois são simples e baratos, a amostra não necessita de grande preparo prévio e não é destruída, fraturada ou excessivamente deformada. Ademais, outras propriedades mecânicas podem ser estimadas junto com a medida de dureza, tais como

módulo de elasticidade, fluência e tenacidade. A macrodureza é aplicada nos testes de materiais em volume, permitindo avaliar sua dureza frente a um grande esforço. Os testes de nano e microdureza são empregados para avaliação da dureza de superfícies e filmes finos^{20,86}.

A principal forma de mensurar a dureza de um material é o teste de indentação, que consiste basicamente no uso de um penetrador – que costuma ser de diamante –, o qual é forçado contra a superfície de uma amostra em uma direção perpendicular à mesma (Figura 6). O valor da dureza está relacionado com a medida óptica da área indentada na amostra submetida ao teste. De acordo com o valor da carga aplicada, o teste de indentação é considerado de nano e/ou microdureza. Ambos os testes utilizam valores baixos de carga^{20,21,85,87}.

O penetrador consiste de uma extremidade que pode ser constituída de diversos materiais, além de possuir formas geométricas variadas. Atualmente, carbeto e pontas de diamantes têm sido utilizados com formas cônicas, esféricas e piramidais. Uma indentação é a impressão deixada pelo penetrador no material^{83-85,88}.

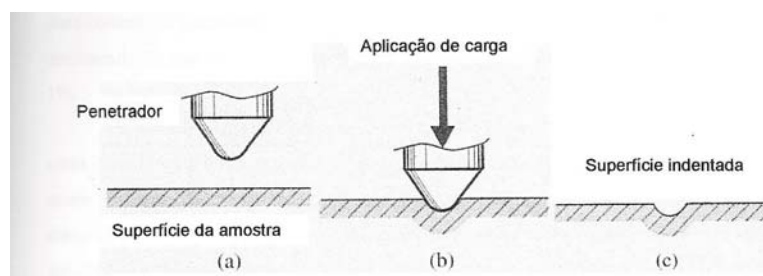


Figura 6: Em (a), o penetrador está preparado para penetrar a amostra; em (b), o penetrador está deformando a amostra por meio da aplicação de uma carga; em (c) a amostra está indentada.

Fonte: Blando²⁰, 2001.

Os testes instrumentados de dureza (IHT) permitem, ainda, determinar o módulo de elasticidade do material em questão. Uma deformação é dita elástica quando a tensão exercida em uma substância é proporcional à deformação causada. O módulo de elasticidade (E) é medido em GPa, ou seja, $1 \text{ GPa} = 10^9 \text{ N/m}^2 = 10^3 \text{ MPa}$. Em termos práticos, o módulo de elasticidade pode ser interpretado como a rigidez ou a resistência à deformação elástica. Portanto, quanto maior for o módulo de elasticidade de um material, mais rígido ele será, isto é, menor é a deformação elástica que resulta da aplicação de uma dada tensão. Além do mais,

o módulo de elasticidade pode ser a quantidade de deformação que pode ser causada a um material sem deformá-lo permanentemente, isto é, sem causar deformação plástica. Junto com as medidas de dureza, o módulo de elasticidade é essencial para interpretar o comportamento dos materiais^{86,89}.

A nanoindentação ou indentação por cargas ultrabaixas é a técnica desenvolvida para aferir as propriedades mecânicas dos materiais em escalas muito pequenas. Portanto, o principal objetivo de medidas de nanoindentação é a determinação da dureza H e do módulo de elasticidade E de filmes finos ou de camadas superficiais de sólidos. Em uma medida de dureza, uma força (carga) P é aplicada a um indentador (uma ponta diamante com uma determinada forma) em contato com a superfície da amostra (Figura 7)⁸⁴⁻⁸⁷.

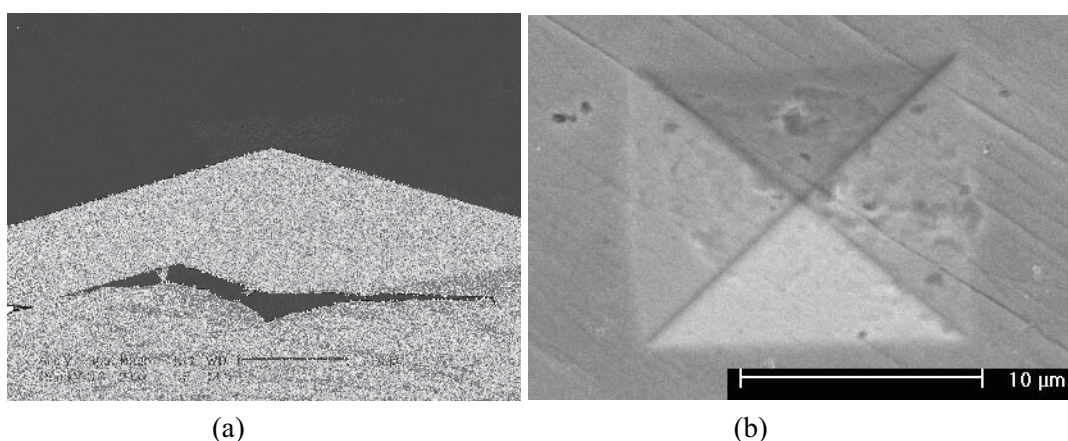


Figura 7: Em (a), um penetrador de Vickers; em (b) a indentação correspondente.

Assim, as avaliações de nano e microdurezas podem ser realizadas pela aplicação de ciclos de carga e descarga com a medida simultânea da carga e profundidade de penetração, que se diferencia do teste de indentação comumente baseado na medida da área de impressão. No ciclo, uma pequena indentação é feita pelo indentador via uma carga seguida de uma descarga. Um ciclo típico de carga e descarga envolve duas curvas: uma curva de carga e uma curva de descarga. A curva de descarga é em geral denominada recuperação elástica do material. Os dados são registrados continuamente durante o ciclo, conforme mostra a Figura 8^{20,86,87}.

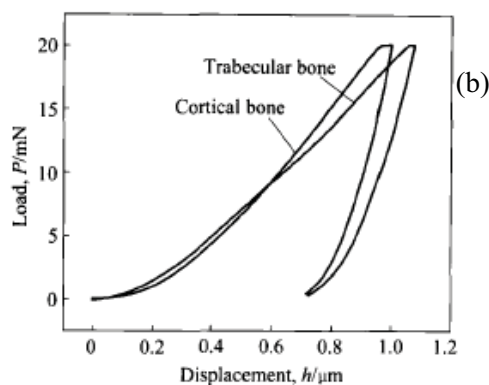
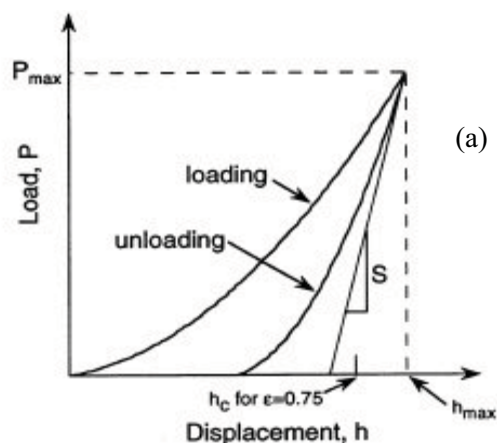


Figura 8: Aplicação dos ciclos de carga e descarga durante o IHT. A Figura 8 (a) mostra um ciclo de carga e descarga típico, enquanto 8 (b) apresenta um ciclo de carga e descarga em um osso cortical e medular bovino. Fonte: Wang et al.⁹⁰ 2006

Como durante a indentação o indentador é dirigido para dentro do material, ocorrem deformações elásticas e plásticas, o que resulta na formação de uma impressão de dureza conforme a forma do indentador. Na remoção do indentador (descarga), somente a porção elástica é restabelecida⁸⁶.

Assim, o módulo de elasticidade, também conhecido como módulo de Young, pode ser aferido durante os IHT. Isto ocorre uma vez que durante o ciclo de descarga a deformação estará diretamente relacionada à recuperação elástica do material⁸⁹.

As grandes vantagens da técnica de nanoindentação ocorrem porque muitas propriedades mecânicas podem ser determinadas pela análise dos dados dos ciclos de carga e descarga isoladamente, evitando marcações da impressão do indentador e medindo as propriedades em pequena escala (nanoescala). Outra vantagem é que as medidas podem ser

realizadas sem a necessidade de remover o filme ou a camada superficial do substrato, o que facilita o preparo da amostra e viabiliza que a mesma não seja destruída^{85,86}.

Quando realizado o teste de indentação para mensuração de nano e microdureza, é altamente recomendável que a amostra apresente um bom polimento^{83,85,91}.

Os Testes Instrumentados de Dureza (Instrumented Hardness Tests - IHT) são os testes de indentação mais utilizados atualmente. O uso de controle computadorizado associado a sensores de deslocamento torna o teste dinâmico capaz de obter resultados instantâneos da dureza do material. A diferença entre o teste IHT e os convencionais de penetração está essencialmente relacionada ao modo de aplicação da força e a forma de calcular a dureza do material analisado. Em um IHT, a medida de dureza ocorre mediante a aplicação de um ciclo de carga-descarga^{20,86}.

Os maiores componentes do tecido ósseo são o colágeno do tipo I e os cristais de hidroxiapatita. A parte mineral, composta pela hidroxiapatita, oferece rigidez e capacidade de suportar cargas. A matriz orgânica, composta de colágeno tipo I, proporciona tanto a resistência quanto a flexibilidade do osso, além de determinar sua organização estrutural. Portanto, as propriedades mecânicas do osso são dependentes das propriedades destes constituintes, desde sua composição até sua organização estrutural. As propriedades mecânicas do osso são determinadas pela composição e pela organização quanto à nanoestrutura (lamelas), microestrutura (ósteon/espaco trabecular) e macroestrutura (compacto e esponjoso). Em DO, as pesquisas sobre propriedades biomecânicas concentram-se em âmbito macro e microestrutural, enquanto que poucas pesquisas nanoestruturais foram realizadas⁹²⁻⁹⁴.

A fim de determinar as propriedades biomecânicas dos componentes microestruturais de duas vértebras e de duas tíbias humanas, foi realizada uma pesquisa que mensurou a dureza e o módulo de elasticidades das trabéculas individuais das vértebras e dos ósteons e lamela intersticial nas tíbias. Com relação ao módulo de elasticidade, foram encontrados valores de $13,5 \pm 2$ GPa para as trabéculas vertebrais e de $22,5 \pm 1,3$ GPa para os ósteons da tíbia. Já para as lamelas intersticiais da tíbia, os valores foram de $25,8 \pm 0,7$ GPa. Com relação à dureza, encontraram-se, na mesma ordem de apresentação, valores de 468 MPa, 614 MPa e 736 MPa, respectivamente⁹⁵.

Um estudo comparou o módulo de elasticidade entre ossos trabeculares e corticais de doadores de ossos femurais humanos. Pela técnica da nanoindentação, os autores encontraram valores médios relativos ao módulo de elasticidade de $18,14 \pm 1,7$ GPa para o osso trabecular e de $20,02 \pm 0,27$ GPa para o cortical. Os especialistas concluíram não haver diferenças estatísticas quanto ao módulo de elasticidade do osso cortical e medular⁹⁶.

Uma pesquisa quantificou as propriedades elásticas do osso no nível lamelar de diáfises e metáfises de fêmur. A técnica de nanoindentação com um sistema de irrigação foi empregada para medir a força e o deslocamento de uma ponta de diamante pressionada 500 nm no tecido ósseo. O módulo de elasticidade foi de $6,9 \pm 4,3$ GPa no tecido trabecular da metáfise femural de uma paciente do gênero feminino e 74 anos de idade, até $25,0 \pm 4,3$ GPa no tecido cortical da diáfise de uma paciente do gênero feminino de 69 anos de idade. As médias de dureza variaram entre 0,234 e 0,760 GPa (234 e 760 MPa)⁹².

O módulo de elasticidade e a dureza do osso lamelar utilizando a nanoindentação foi quantificado em estudo. Ossos corticais e medulares foram obtidos da diáfise e da metáfise do fêmur, do rádio distal e da quinta vértebra lombar de 10 indivíduos do gênero masculino, entre 40 e 85 anos de idade. As amostras foram testadas com uma profundidade máxima de 500 nm. O osso da diáfise apresentou maior módulo de elasticidade e a maior dureza do que a metáfise. O osso trabecular apresentou resultados variáveis ao longo de sua localização. A metáfise femural mostrou maior módulo de elasticidade e dureza do que o rádio distal, que por sua vez apresentou propriedades mecânicas superiores à quinta vértebra lombar. O osso compacto apresentou módulo de elasticidade e dureza com valores superiores ao osso trabecular quando comparados dentro de uma mesma localização⁹⁷.

Igualmente foram investigadas as propriedades mecânicas das suturas craniofaciais de coelhos. Para tanto, os autores empregaram o teste da nanoindentação em três suturas. A sutura maxilomaxilar (pré-maxila) apresentou módulo de elasticidade médio de 1,46 MPa, significativamente maior do que a sutura zigomaticotemporal e nasofrontal, que apresentaram 1,20 MPa e 1,16 MPa respectivamente. As áreas adjacentes às suturas tiveram seus módulos de elasticidade significativamente maiores do que suas suturas correspondentes. A área adjacente à sutura maxilomandibular apresentou 2,07 MPa, enquanto as áreas adjacentes à sutura zigomaticotemporal apresentou 1,56 MPa e à sutura nasofrontal 1,71 MPa. Os

resultados sugerem que as suturas faciais e suas áreas adjacentes apresentam capacidades distintas de deformação mecânica⁹⁸.

Da mesma forma, foram avaliadas as propriedades físicas das suturas craniais pós-natais, as quais apresentam importância por favorecerem o crescimento e permitirem a articulação entre os ossos do crânio. Apesar das propriedades mecânicas serem de importância vital, as mesmas são objeto de pouco estudo. O objetivo da pesquisa foi caracterizar as propriedades nanoestruturais e nanomecânicas da sutura sagital (n=5) e da sutura metópica (n=5) de pacientes com média de 9 meses de idade. A sutura sagital apresentou módulo de elasticidade de $0,7 \pm 0,2$ MPa, significativamente maior do que a sutura metópica, a qual apresentou módulo de elasticidade de $0,5 \pm 0,1$ MPa ($P < 0,01$). Os dados sugeriram que as várias suturas cranianas podem apresentar diferentes características estruturais e mecânicas⁹⁹.

Em vértebras e tíbias bovinas foram mensuradas a dureza e o módulo de elasticidade de acordo com a técnica da nanoindentação. Os pesquisadores realizaram medidas tanto em osso medular quanto em osso cortical, no sentido longitudinal e no transversal. Com relação ao osso cortical no sentido longitudinal, foram feitas as medidas nos ósteons, com valores de módulo de elasticidade médio de $24,7 \pm 2,5$ GPa e dureza média de $0,811 \pm 0,155$ GPa, e nas lamelas intersiticiais, com valores de $30,1 \pm 2,4$ GPa para o módulo de elasticidade e de $0,892 \pm 0,113$ GPa para a dureza. Ainda sobre o osso cortical, mas no sentido transversal, os valores encontrados de módulo de elasticidade médios foram de $19,8 \pm 1,6$ GPa e de dureza, de $0,647 \pm 0,060$ GPa. Em se tratando de osso medular, observaram os autores valores médios de módulo de elasticidade no sentido longitudinal de 20 ± 2 e no sentido transversal de $14,7 \pm 1,9$ GPa. Com relação a esse mesmo osso, com relação à dureza, verificaram valores médios de $0,528 \pm 0,095$ GPa e de $0,410 \pm 0,063$ GPa, respectivamente⁹⁰.

Também em calo ósseo de fêmur de ratos submetidos a fraturas foram determinadas as propriedades físicas, pela nanoindentação. O módulo de indentação variou bastante ao longo do calo ósseo, de 0,61 MPa a 1010 MPa. Essa grande variação ocorreu devido à presença de diversos tecidos na região da cicatrização. O tecido de granulação apresentou valores de 0,61 MPa a 1,27 MPa (média de 0,99 MPa), o tecido cartilaginoso de 1,39 MPa a 4,42 MPa (média de 2,89 MPa), e o osso de 26,92 MPa a 1010 MPa (média de 132,00 MPa)¹⁰⁰.

Os autores relacionaram as propriedades mecânicas do osso com a estabilidade inicial

de implantes dentários. Para esta pesquisa, usaram mandíbulas e maxilas edêntulas de cadáveres humanos frescos. Foi medida a dureza e o módulo de elasticidades de tais ossos pela nanoindentação. Quanto aos valores de dureza, os pesquisadores obtiveram uma média de 0,52 GPa para a maxila e 0,59 GPa para a mandíbula. Com relação ao módulo de elasticidade, os autores observaram valores de 14,9 GPa para a maxila e de 18,3 GPa para a mandíbula¹⁰¹.

Foi realizada pesquisa em ratos submetidos à diminuição da gravidade, a fim de verificar como a mesma afeta as propriedades biomecânicas do osso. Para tanto, utilizaram 12 animais divididos em grupo experimental, com submissão dos espécimes à diminuição de gravidade, e grupo controle, sem diminuição da gravidade. Após 14 dias, puderam ser verificados os valores de dureza e módulo de elasticidade do fêmur, entre outras propriedades. Com relação à dureza, encontraram valores de $0,32 \pm 0,13$ GPa para o grupo experimental e de $0,49 \pm 0,16$ GPa para o controle. Quanto ao módulo de elasticidade, os valores foram de $9,18 \pm 2,68$ GPa para o grupo experimental e $10,66 \pm 3,49$ GPa para o controle⁹⁴.

4 METODOLOGIA

Esta pesquisa foi realizada junto ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), em Porto Alegre, na Linha de Pesquisa Diagnóstico e Terapêuticas Aplicadas, aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da mesma instituição (ANEXO A) e pela Comissão de Ética em Experimentação da Universidade Federal de Pelotas, de Pelotas/RS (ANEXO B).

4.1 PROBLEMA

A LLLT (830 nm) altera a quantidade e a qualidade de osso neoformado no sítio ósseo produzido pela DO?

4.2 AMOSTRA E DIVISÃO DE GRUPOS

Para realizar este experimento foram selecionados 15 coelhos da ordem *Lagomorpha*, gênero *Oryctolagus*, espécie *Oryctolagus cuniculus*, raça Nova Zelândia, variedade branca e machos, com idade adulta reconhecida e peso compreendido entre 3,5 e 4,5Kg, livres de malformações congênitas e feridas.

Dez dos animais selecionados foram admitidos no biotério da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), enquanto os outros cinco, admitidos no Hospital de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, a partir das mesmas matrizes da FEPPS.

Os animais foram pesados, identificados e alojados em gaiolas individuais suspensas (Figura 9), alimentados com dieta sólida¹ e a água fornecida *ad libitum*. As instalações eram climatizadas, mantendo-os sob condições normais de iluminação, umidade e temperatura.

¹ Linha Natural, Purina®

Todas as gaiolas foram devidamente identificadas, durante todo o período do experimento, conforme o grupo a que pertenciam os animais.

Ao final de uma semana de observação, período tido como necessário para a adaptação dos animais às novas condições ambientais, os mesmos foram reavaliados clinicamente, procedendo-se, então, às cirurgias.



Figura 9: Coelhos alojados em gaiolas individuais no biotério da FEPPS.

Os espécimes deste estudo foram divididos em dois grupos de acordo com a análise histológica ou tomográfica/física a que foram submetidos.

O grupo 1, submetido à análise histológica, foi composto por 10 coelhos, todos submetidos ao processo de DO. Desses, seis foram irradiados com laser, enquanto os outros quatro serviram como controle (Quadro 1).

Grupo 1	Análise	DO	Laser	N
A	HE	Sim	Sim	6
B	HE	Sim	Não	4

Quadro 1: Divisão dos grupos submetidos à análise histológica.

Com vistas às análises tomográficas e físicas, foram utilizados cinco coelhos. O coelho A não foi fraturado, nem distraído e não foi irradiado por laser; o coelho B foi fraturado, não foi distraído nem irradiado com laser; o coelho C foi fraturado, não foi distraído e foi irradiado com laser; o coelho D foi fraturado, distraído e não foi irradiado com laser; o coelho E foi fraturado, distraído e irradiado com laser (Quadro 2).

Grupo 2	Análise	Fratura	Distração Osteogênica	Laser	N
A	TC + IHT	Não	Não	Não	1
B	TC + IHT	Sim	Não	Não	1
C	TC + IHT	Sim	Não	Sim	1
D	TC + IHT	Sim	Sim	Não	1
E	TC + IHT	Sim	Sim	Sim	1

Quadro 2: Amostras / unidades experimentais submetidas a análise tomográfica e física

4.3 ETAPAS TÉCNICAS DA PESQUISA

4.3.1 Elaboração do distrator osteogênico

Pelo fato de ser utilizado o modelo animal coelho, impôs-se a necessidade de elaborar um aparelho distrator osteogênico, seguindo os preceitos de bioética relacionada a pesquisas em animais. Apesar da existência de experimentos neste mesmo animal, inclusive no mesmo sítio de alongamento ósseo, optou-se pela confecção própria pela dificuldade de acesso a tais dispositivos, mas sobretudo visando-se obter uma qualidade que pudesse suprir os objetivos da pesquisa.

A partir da obtenção de uma mandíbula de coelho dissecada, realizou-se um protótipo de aparelho distrator baseado naquele utilizado por Yazawa et al.¹⁰² (2003), o qual utilizava oito parafusos de fixação. O aparelho inicialmente confeccionado, com quatro parafusos de fixação, apresentou alguns problemas, principalmente relacionados ao dispositivo de fixação, o qual ficou muito alto. Consequentemente, apenas uma pequena parte do parafuso permanecia dentro do osso, conferindo uma falta de estabilidade que poderia comprometer os resultados, o que levou a equipe de pesquisa a aperfeiçoá-lo e novamente testá-lo. Para o experimento definitivo, foram confeccionados 10 distratores osteogênicos com o apoio da PROMM[®] (Indústria de Materiais Cirúrgicos Ltda).

Os aparelhos distratores foram instalados em todos os espécimes que sofreram fratura. Nos que não sofreram alongamento ósseo, o objetivo da instalação foi proporcionar uma estabilização, ao passo que nos animais distraídos teve a função de promover o alongamento, quando da sua ativação, bem como a posterior estabilização a fim de promover o reparo tecidual.

4.3.2 Sequência cirúrgica

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados nos laboratórios de experimentação, sendo estes ambientes separados. Assim sendo, os animais não ficaram expostos ou sob tensão de ruídos, odores e até mesmo a visão dos procedimentos que foram realizados.

Todas as etapas dos procedimentos anestésicos foram executadas por médicas veterinárias², que acompanharam o pré, o trans e o pós-operatórios dos animais.

A anestesia foi obtida por uma associação de drogas: Solução Cloridrato de Xilazina a 2% (Anacedan[®]) e Cloridrato de Zolazepam com Cloridrato de Tiletamina (Zoletil[®]). O primeiro caracteriza-se como miorelaxante e analgésico; o segundo, um agente anestésico dissociativo capaz de atuar sobre o córtex cerebral, seletivamente, causando analgesia e perda da consciência. A ação complementar destas duas drogas associadas proporciona uma anestesia efetiva para procedimentos cirúrgicos de estímulos moderados.

Na sala de pré-anestesia, por meio de injeções intramusculares, os animais receberam Cloridrato de Xilazina, na dose de 0,1mg/kg de peso, e Cloridrato de Zolazepam com Cloridrato de Tiletamina, na dose de 3mg/kg de peso, ministrados nesta sequência, com um tempo médio de indução anestésica de 4 minutos e, eventualmente, doses complementares intramusculares de manutenção, correspondendo a um terço da dose inicial.

Após a perda da consciência pelos animais, a região submandibular à direita de cada espécime foi tricotomizada com máquina elétrica (Figura 10). Os espécimes foram, então,

² Médicas veterinárias: Dra. Luisa Maria G. de Macedo Braga – FEPPS e Dra. Isabel Pereira – UFPel

levados à sala cirúrgica, posicionados em decúbito lateral direito, fixados à mesa cirúrgica por amarrilhos. A seguir, realizou-se anti-sepsia da pele com Clorexidina 2%. Campos cirúrgicos estéreis isolaram a área operatória.

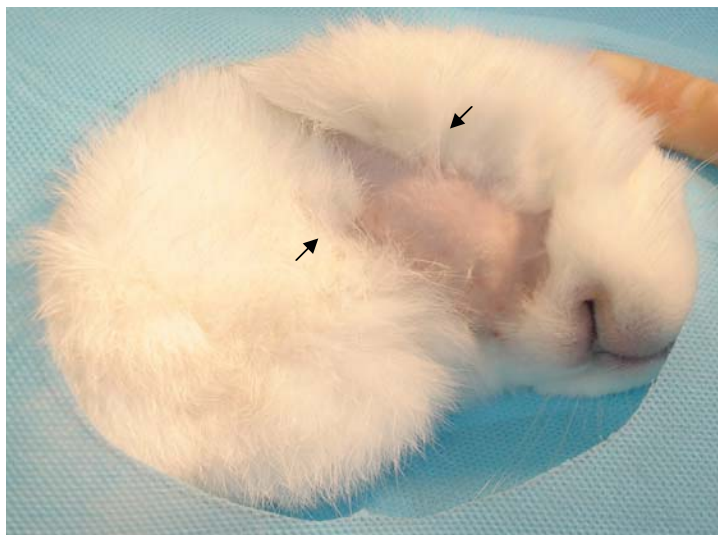


Figura 10: Animal com tricotomia e anti-sepsia realizadas.

Na região a ser incisada, realizou-se infiltração local de Lidocaína a 2% com Epinefrina 1:100.000, no espaço subcutâneo, na dose de 1,8 ml por animal. A administração de Enrofloxacin (Flotril[®]), por via intramuscular, consistiu na antibioticoprofilaxia.

Uma incisão de aproximadamente 3cm, única e linear, foi realizada na pele com cabo de bisturi nº 3 e lâmina de bisturi descartável nº 15, na borda inferior da mandíbula, dando-se início ao acesso até o osso mandibular. A dissecação por planos foi realizada com tesoura de Matzenbaum. O periósteo foi cuidadosamente descolado junto com as inserções musculares, com descolador do tipo Molt, pelas faces lateral e inferior da mandíbula (Figura 11).

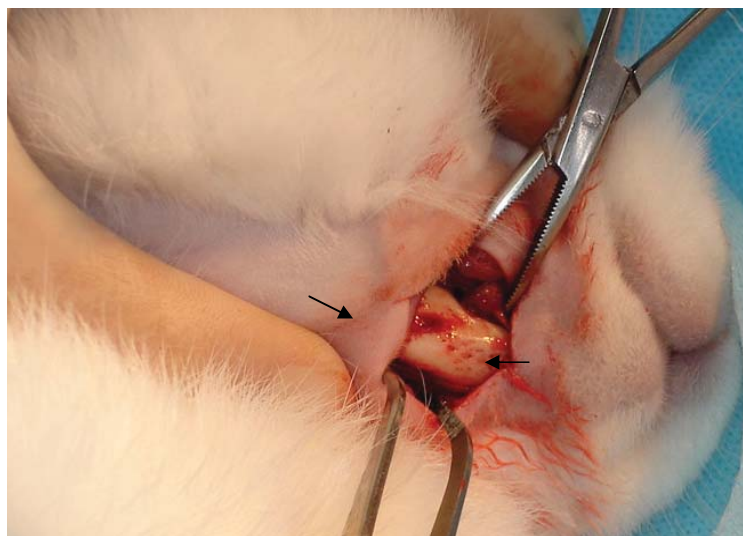


Figura 11: Exposição do corpo mandibular direito.

Após a exposição da região de corpo mandibular, a região do forame mentoniano foi identificada, sendo o nervo e os vasos sanguíneos que por ele emergem cuidadosamente dissecados. Uma corticotomia vestibular foi realizada entre o primeiro pré-molar e o forame mentoniano, utilizando-se broca de aço para micromotor com ponta tronco-cônica 701 (1,0 mm de diâmetro) em baixa rotação e sob irrigação constante, com solução salina de soro fisiológico a 0,9% envolvendo toda a face vestibular mandibular. Durante este procedimento, os tecidos cutâneo e muscular foram tracionados pelos reparos. A cortical lingual e seu perióstio adjacente foram preservados (Figura 12).

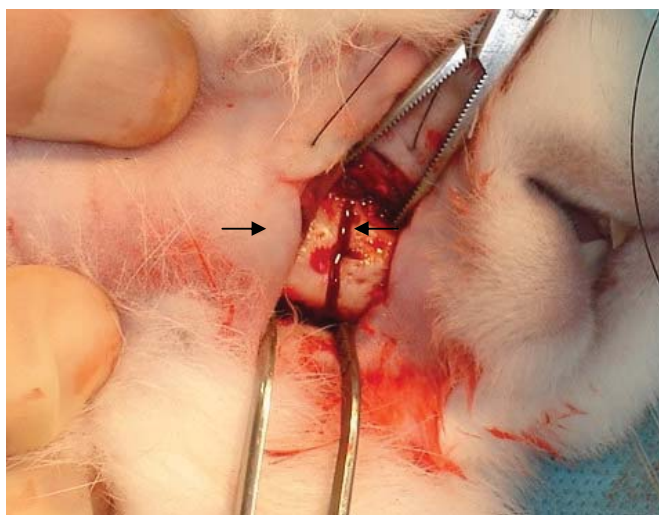


Figura 12: Corticotomia vestibular.

O distrator osteogênico³ foi instalado através da perfuração de dois orifícios em cada lado da osteotomia vestibular e abaixo do forame mentoniano e das raízes dentárias, sendo fixado com parafusos bicorticais de 1,5x5mm. O distrator osteogênico foi adaptado e ativado em duas voltas ou até que se obtivesse uma franca resistência à ativação, quando a fratura da cortical lingual pode ser finalizada com movimentos de alavanca, com cinzéis (Figura 13).

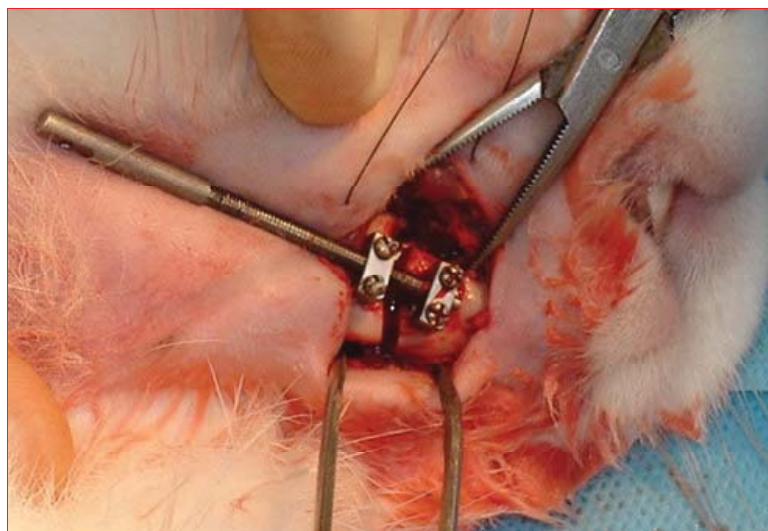


Figura 13. Distrator osteogênico instalado.

Após irrigação abundante para a limpeza do leito operatório, a ferida cirúrgica foi fechada por planos profundo e superficial com fio monofilamentar de náilon nº 4-0, em pontos isolados (Figura 14).



Figura 14: Sutura com fio de nylon monofilamentar 4-0.

³ PROMM® – Indústria de Materiais Cirúrgicos Ltda.

4.3.3 Período pós-operatório

No período pós-operatório, os espécimes permaneceram na FEPPS ou no Biotério da UFPel, nas gaiolas suspensas individuais, sob cuidados dos pesquisadores e orientação da equipe de médicas veterinárias.

Os espécimes receberam, durante os três primeiros dias, doses de 20 gotas de analgésico (Ibuprofeno 50mg/ml), bem como doses antibióticas (Enrofloxacina 50mg/dia) durante todo o período experimental, colocadas no recipiente de água em que bebiam.

A dieta consistiu na mesma ração anteriormente mencionada, umidificada com água e triturada com auxílio de uma colher, a fim de se obter uma consistência pastosa.

Foram feitos controles diários de alimentação e condições de saúde dos animais, sob orientação das médicas veterinárias responsáveis.

4.3.3.1 *Distração osteogênica (20 dias)*

a) Período de latência (três dias)

Nos três primeiros dias pós-operatórios, o distrator osteogênico não foi ativado, apenas inspecionado e higienizado com clorexidina 2%.

b) Período de ativação (sete dias)

A partir do terceiro dia pós-operatório, tiveram início as ativações do aparelho distrator com o ritmo de 0,7 mm de extensão por dia, até que se completassem sete dias de ativação (aproximadamente 4,9 mm de extensão).

c) Período de consolidação (10 dias)

Após os 10 dias de latência e ativação, o distrator osteogênico permaneceu instalado nos animais por mais 10 dias, como fixação rígida, para que a maturação óssea pudesse ser alcançada.

4.3.4 Irradiação com o laser 830 nm

Para a irradiação pelo laser 830 nm, foi utilizada uma unidade de laser Thera Laser^{®4}, devidamente calibrada segundo o teste espectralradiométrico (ANEXO C).

Para o cálculo da dosimetria, aplicou-se a fórmula-padrão:

$$DE = \frac{P(W) \times t(s)}{A(cm^2)}$$

onde (DE) é a densidade de energia a ser calculada ou dosimetria, (P) é a potência, (t) é o tempo de aplicação e (A) representa a área utilizada.

Nos animais que receberam irradiação laser, foi empregada a seguinte dosimetria: dose pontual de 10 J/cm² de laser, com potência de 40 mW, modo de emissão contínua, diretamente sobre o sítio ósseo submetido à DO, no período de consolidação óssea, respeitando-se intervalos de 48 horas, totalizando 50 J/cm² por animal.

4.3.5 Morte dos animais

Quando atingiram o período de consolidação óssea, os espécimes foram mortos em câmara de dióxido de carbono, seguindo preceitos éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA)⁵.

Após a morte, as mandíbulas foram dissecadas, isoladas e separadas na região do corpo, com brocas, a fim de que os blocos ósseos fossem suficientes para que as avaliações laboratoriais pudessem ser realizadas.

⁴ DMC equipamentos (São Carlos, São Paulo, Brasil)

⁵ Disponível em: <<http://www.cobea.org.br>>

4.4 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E COLETA DE DADOS

4.4.1 Análise histológica

Os 10 espécimes para a análise histológica foram armazenados em formalina tamponada 10% e posteriormente preparados no Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da PUCRS.

Nesse Laboratório, as peças receberam uma numeração no Livro de Registro, sem o conhecimento dos pesquisadores sobre a que grupo pertenciam, caracterizando-se este estudo como cego.

As peças foram, então, descalcificadas com ácido cítrico a 5%, submetidas a procedimento de rotina para inclusão em parafina e coloração por HE, obtendo-se, após, cortes de 4 μ m de espessura no sentido lateromedial. Foram selecionados três cortes de cada peça (Figura 15).

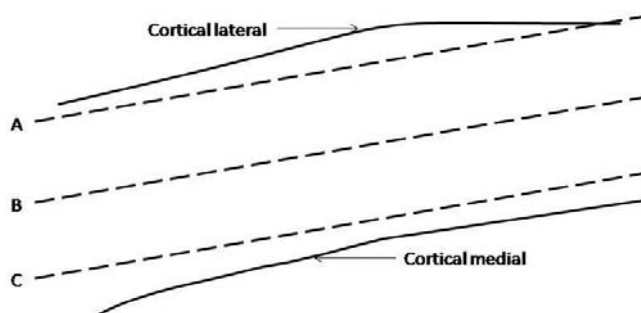


Figura 15: Cortes realizados para a análise microscópica. A. corte lateral; B. corte médio; C. corte medial.

Três lâminas de cada espécime foram obtidas. Contudo, para a mensuração das áreas de neoformação óssea, cada lâmina foi subdividida em unidades experimentais (UEs), a partir de um aumento aproximado de 100x, no microscópio óptico, com conseqüente captura das imagens por câmera fotográfica digital Sony – 14 *megapixels* acoplada ao microscópio Olympus BX 60.

Áreas do corte com dobraduras ou separações do tecido foram excluídas, o que levou à variação no número de UEs obtidas em cada lâmina.

As imagens das UEs foram organizadas em arquivos com a mesma numeração do Livro de Registro do Laboratório, mantendo-se, portanto, o cegamento dos examinadores.

Para histomorfometria das áreas neoformadas em pixels quadrados, foi empregado o *software* livre ImageTool[®] for Windows 3.0 (The University of Texas Health Science Center in San Antonio, Estados Unidos). A partir da mensuração da área neoformada (A_N) e da área total da UE (A_T), foram calculadas as porcentagens da neoformação óssea ($A_N/A_T * 100$) (Figura 16).

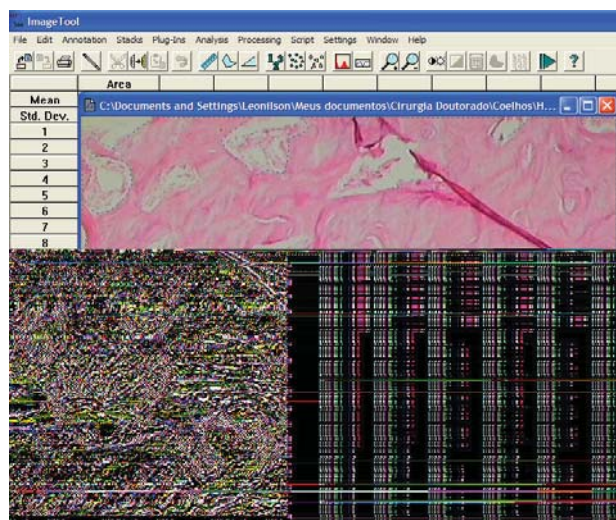


Figura 16: Exemplo de mensuração do osso neoformado.

4.4.2 Análises tomográfica e física

As análises tomográficas foram realizadas no Centro de Diagnóstico por Imagem (CDI) da Faculdade de Medicina da PUCRS, localizado no Hospital São Lucas da PUCRS, em Porto Alegre/RS.

As análises físicas foram realizadas nos laboratórios do Grupo de Estudos das Propriedades de Superfícies e Interfaces – Laboratório de Materiais e Nanociências (GEPSI -

LMN) da Faculdade de Física da PUCRS, localizado no Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Física no Parque Tecnológico da PUCRS (TECNOFUC).

O preparo das amostras foi feito em quatro etapas:

- a) as cinco hemimandíbulas direitas dos coelhos foram dissecadas, removidas e armazenadas em glutaraldeído a 2%;
- b) a área de interesse (Figura 17) foi separada da hemimandíbula por intermédio de seccionamento com disco de carborundum acoplado em mandril para peça de mão em baixa rotação, iniciando na região alveolar até a base da mandíbula;

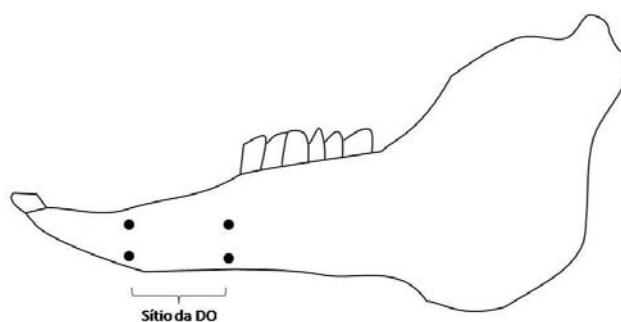


Figura 17: Área submetida a lixamento e polimento.

- c) em seguida, as mesmas foram embutidas em resina acrílica, com a porção anterior da mandíbula virada para cima, deixando suas bordas levemente preenchidas com um excesso de material;
- d) a superfície anterior da mandíbula ficou exposta, sendo lixada e polida com o objetivo de deixar a base do bloco paralela à superfície, ficando esta última lisa, a fim de permitir a realização do IHT. Para o lixamento e o polimento, realizados de forma manual, usou-se uma sequência de lixas da gramatura desde 100 a 4000, fixas em bloco de vidro. O lixamento foi obtido com lixas de grana 100 até grana 600 e lubrificadas com água até que o excesso de resina ficasse no mesmo nível da mandíbula e que a mandíbula exposta ficasse lisa. O polimento, por sua vez, foi realizado com lixas 600 a 4000, lubrificadas com uma mistura de álcool isopropílico e propileno-glicol 1:1. O polimento continuou sendo feito com pasta de diamante e o acabamento com solução coloidal de SiC (Figura 18).



Figura 18: Amostra incluída em resina acrílica após lixamento e polimento.

O objetivo deste preparo foi a obtenção de uma superfície polida no sítio da DO e nas suas adjacências afim de permitir o teste de indentação, de acordo com a norma ISO 14577, relacionada aos testes instrumentados de indentação para dureza e parâmetros de materiais.

Após lixadas e polidas, as unidades experimentais estiveram prontas para serem tomografadas e sofrerem os testes instrumentados de dureza.

Para a aquisição das tomografias, as hemimandíbulas incluídas em resina acrílica, lixadas e polidas, foram reunidas em uma peça única, identificadas, e a aquisição da imagem de todos eles foi feita em uma única tomada tomográfica.

O equipamento utilizado foi o Siemens Somaton Plus 4. As amostras foram posicionadas sobre a mesa de exames e obtidos cortes axiais. As imagens foram armazenadas em formato *Digital Imaging and Communications in Medicine* (DICOM) no servidor de imagens do referido Hospital. O *software* utilizado para reconstrução das imagens foi o OsiriX Imaging Software 3.5.1 (Open SourceTM), capaz de realizar processamento tridimensional. Obtiveram-se, ainda, renderizações tridimensionais a partir dos cortes axiais. Além disso, o *software* permitiu estabelecer limiares de atenuação, produzindo imagens com base em determinados números de TC (unidades Hounsfield).

Foi utilizado um protocolo de aquisição em espiral com os seguintes parâmetros: espessura de corte de 1,0mm, Pitch de 1,0mm, incremento de reconstrução de 1,0mm, reconstrução com filtro para osso, 120 kV e 90 mA e FOV de 15 cm . Foram obtidas matrizes de 512 X 512 *pixels*.

A fim de realizar a análise das imagens e obter a densidade, foi utilizado o *software* Image J, *freeware*, desenvolvido pelo National Institutes of Health. Foi selecionado o corte mais anterior e, na mesma região aproximada onde iria ser realizado o IHT, foi traçada uma linha com o intuito de se obter as Unidades Hounsfield (HU) ao longo do trajeto.

Esses números, obtidos em forma de tabela, foram exportados para o programa Origin 6.0 (Microcal SoftwareTM) a fim de se obter os gráficos das variações de densidade das unidades experimentais, em HU.

Os testes instrumentados de dureza (IHT) foram realizados nas dependências do GEPSI - LMN sob orientação de físicos experientes⁶, sob as normas ISO 14577.

Para tal, foi utilizado o equipamento Fischerscope HV 100, o qual consiste de três unidades distintas: a de controle e avaliação, a de posicionamento e a de processamento. Este sistema possibilita a realização de testes dinâmicos de indentação e testes com aplicação direta de carga, fornecendo medidas de dureza e de módulo de elasticidade (Figura 19).



Figura 19: Equipamento utilizado para os testes de nanoindentação

⁶ Profs. Drs. Roberto Hübler e Eduardo Blando – TECNOPUC.

Para a realização dos testes instrumentados de dureza, marcou-se a região óssea alongada (Figura 20), que foi analisada por meio dos testes físicos.

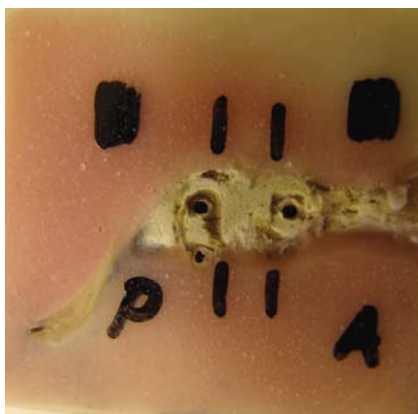


Figura 20: Mandíbula de coelho incluída em resina. Após lixada e polida, foi marcada a região de interesse para os testes físicos.

A região de interesse foi dividida 14 outras regiões no sentido ântero-posterior, com distância de 500 micrômetros entre elas (Figura 21).

Para avaliação da nanodureza e do módulo de elasticidade, realizaram-se 10 medidas em cada uma dessas 14 regiões com uma distância de pelo menos 50 micrômetros entre cada ponto medido, evitando-se, assim, qualquer influência entre as medidas. Cada indentação foi realizada utilizando-se um único ciclo de carga e descarga de 0 até 1 Nilton e de 1 até 0 Nilton, com um penetrador do tipo Vickers.

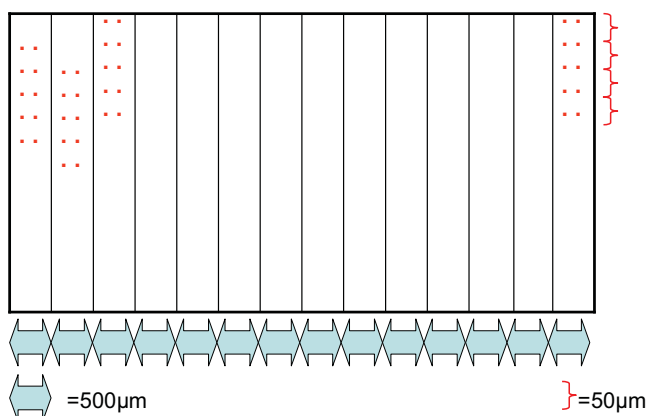


Figura 21: Divisão da região de interesse em 14 regiões com distância de 500 micrômetros entre elas. Em cada região foram realizadas 10 medidas, com distâncias mínimas de 50 micrômetros entre cada uma delas.

Assim, obteve-se uma resposta do comportamento de dureza e de módulo de elasticidade de cada amostra. Os dados foram, então, exportados para o *software* Origin 6.0 (Microcal SoftwareTM) visando à obtenção de gráficos mostrando a variação ao longo da amostra.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na avaliação histológica, foi utilizado o *software* Biostat 4.0 para a obtenção do Coeficiente de Relação Intraclasse (CCI), a fim de avaliar-se a replicabilidade das medidas observadas por dois examinadores, que receberam treinamento de patologista experiente⁷.

A existência de normalidade das medidas histomorfométricas, quanto à variável osso neoformado, foi avaliada pelo teste Kolmogorov-Smirnov. O teste t foi utilizado para comparar o percentual de neoformação óssea entre os grupos. Para tal fim, empregou-se o *software* SPSS^{®8}.

Para as análises tomográficas e físicas, utilizou-se a análise estatística descritiva apresentada na forma de gráficos.

⁷ Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho.

⁸ SPSS – Statistic Packet of Social Science. Produzido por SPSS[®] Inc. Chigado. www.spss.com.

5 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados conforme a ordem de preparo e experimentação da amostra, bem como de obtenção dos resultados das análises realizadas.

5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA

5.1.1 Análise descritiva

Antes da análise comparativa relacionada à porcentagem de formação óssea no sítio alongado, as lâminas coradas por HE foram estudadas a fim de se realizar uma análise descritiva dos processos biológicos que estavam ocorrendo.

Tanto no grupo que não sofreu irradiação com laser quanto no que foi irradiado, observou-se formação óssea no sítio de alongamento.

Na área da DO verificou-se o defeito provocado pela instalação do parafuso responsável pela fixação do aparelho distrator, a qual se caracterizou por um espaço redondo e vazio, com ausência de tecido conjuntivo ou tecido ósseo. Algumas lâminas apresentaram sinais de coágulo e/ou hemorragia, fato esperado em decorrência do trauma cirúrgico para perfuração e instalação dos parafusos (Figura 22).

Ao redor da região correspondente aos orifícios, foi observado osso maduro, resultado previsível visto que a fixação ocorreu no osso preexistente. Tal osso apresentou uma característica mais compacta e organizada com relação à área mais central do alongamento ósseo, com menor sinal de atividade osteoblástica e inferior quantidade de tecido conjuntivo entre as trabéculas ósseas (Figura 22).

Na área alongada verificou-se formação de tecido ósseo com a presença de vasos sanguíneos, osteócitos recém-formados, bem como atividade osteoblástica intensa, demonstrando atividade osteogênica intensa. Este tecido ósseo caracterizou-se por ilhas/trabéculas entremeadas por tecido conjuntivo. As trabéculas ósseas apresentaram-se paralelas

entre si, mas perpendiculares ao traço de fratura, caracterizando o processo fisiológico de reparo com vista a preencher o defeito (Figura 22).

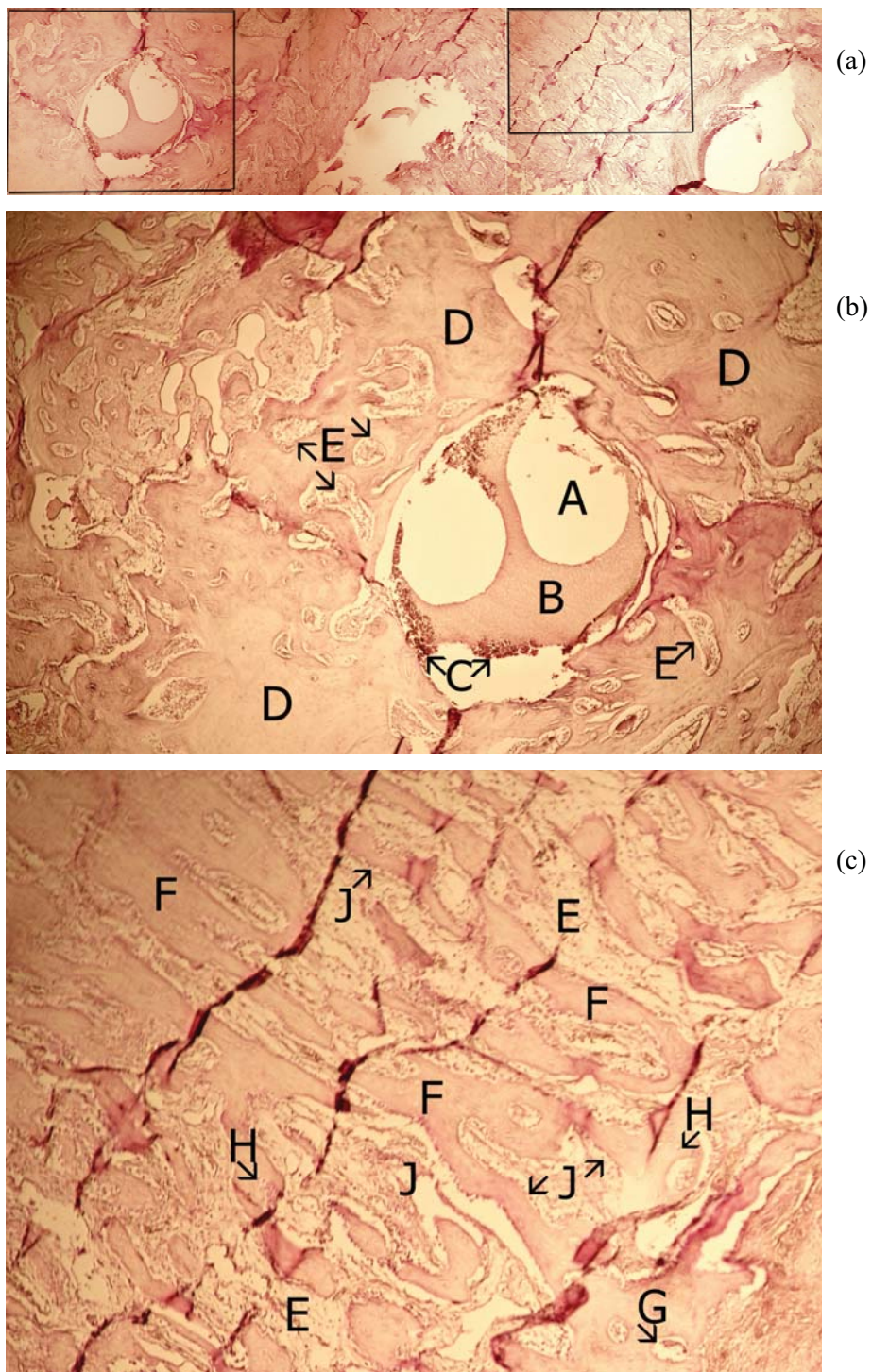


Figura 22: Microscopia óptica (HE-50x). A figura (a) apresenta um mosaico da região distraída; na figura (b) e (c) podem ser identificados: - (A) defeito provocado pela instalação do parafuso; (B) coágulo; (C) hemorragia; (D) osso maduro; (E) tecido conjuntivo; (F) neoformação óssea; (G) vaso sanguíneo; (H) osteócitos novos; (J) osteoblastos perfilados em atividade.

Ao ser verificado o processo de formação óssea ativa na área alongada, passou-se à etapa de avaliação da porcentagem de formação óssea nos grupos estudados.

5.1.2 Análise da porcentagem de formação óssea

Para ser realizada esta análise, procedeu-se à calibração dos dois examinadores, após realizarem treinamento com patologista experiente⁹, a qual obteve Coeficiente de Correlação Intraclasse (CCI) de 0,9939. Segundo Fleiss¹⁰³ (1986), o CCI observado indica “Replicabilidade Excelente”.

As mensurações da UE foram submetidas ao teste de Kolmogorov-Smirnov para verificação da normalidade das medidas histomorfométricas, quanto à variável osso neoformado (Tabela 1), em que se verificou a normalidade na distribuição ($p < 0,05$). Assim, nas análises subsequentes, foram empregados testes paramétricos.

Tabela 1 - Distribuição do número de unidades experimentais obtidas por animal.

Grupos	Animal	UEs
Controle	1	19
	2	33
	3	17
	4	29
Experimental	1	29
	2	21
	3	17
	4	14
	5	18
	6	11

⁹ Prof. Dr. Manoel Sant'Anna Filho.

As médias de osso neoformado foram obtidas a partir das mensurações das unidades experimentais de cada lâmina.

Estas mensurações foram submetidas ao teste paramétrico “t” para amostras independentes, sendo observada maior porcentagem de neoformação óssea no grupo experimental (57,89%) em relação ao grupo controle (46,75%) ($p=0,006$). Tais resultados indicaram a ação positiva do LLLT no grupo experimental (figura 23).

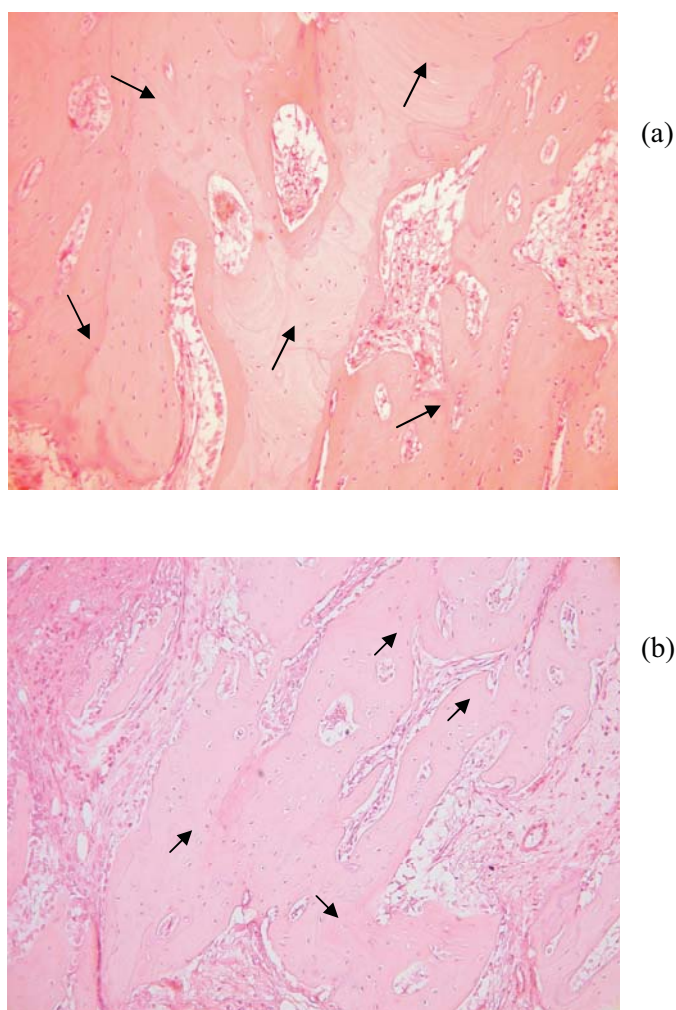


Figura 23: Microscopia óptica (HE – 100x): a Figura (a) apresenta uma UE de coelho irradiado com LLLT (grupo experimental), enquanto que a (b) mostra uma UE de coelho não-irradiado com LLLT (grupo controle). As setas representam as diversas “ilhas” de neoformação óssea.

5.2 ANÁLISE TOMOGRÁFICA

Esta análise foi feita por avaliação da densidade da área alongada, utilizando-se a escala de densidade Hounsfield.

As imagens mostram a tomografia do coelho A, o qual serviu de controle, uma vez que não sofreu fratura nem alongamento ósseo e tampouco foi irradiado com laser. Neste caso, não há linha de fratura, e o tecido ósseo apresenta-se com aspecto normal, sem o furo de parafusos ou linhas de fratura (Figura 24).

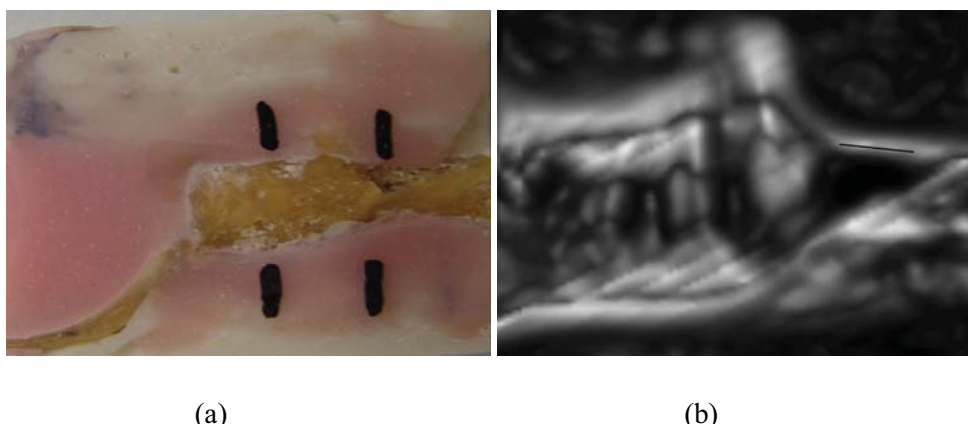


Figura 24: Coelho (a) não-fraturado, não-distraído nem irradiado com laser. Na Figura (a), a mandíbula deste espécime incluída em resina; em (b), a TC correspondente.

Apesar de o osso normal do coelho (cortical madura) não apresentar densidade grande, observou-se pouca variação da mesma, a qual ficou próxima de 1300 HU (Gráfico 1)

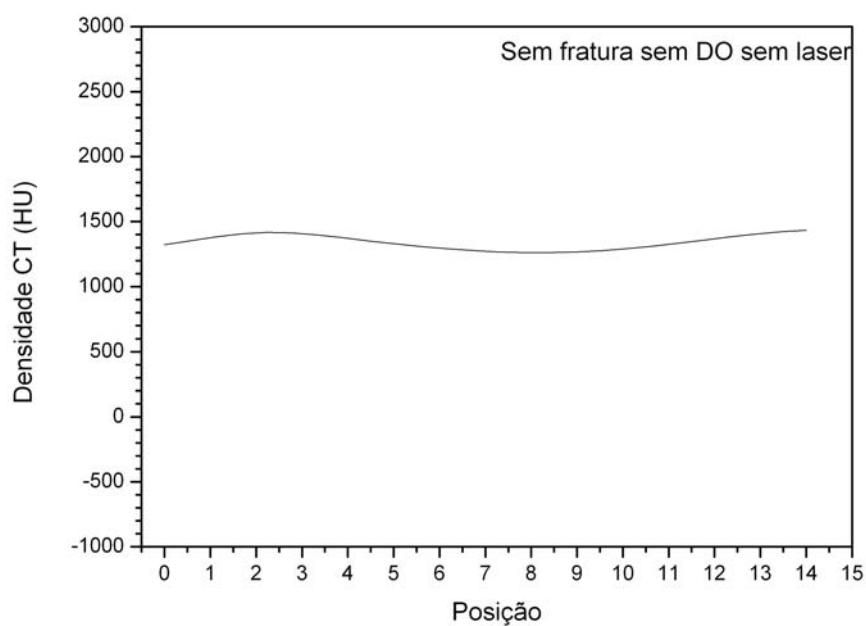
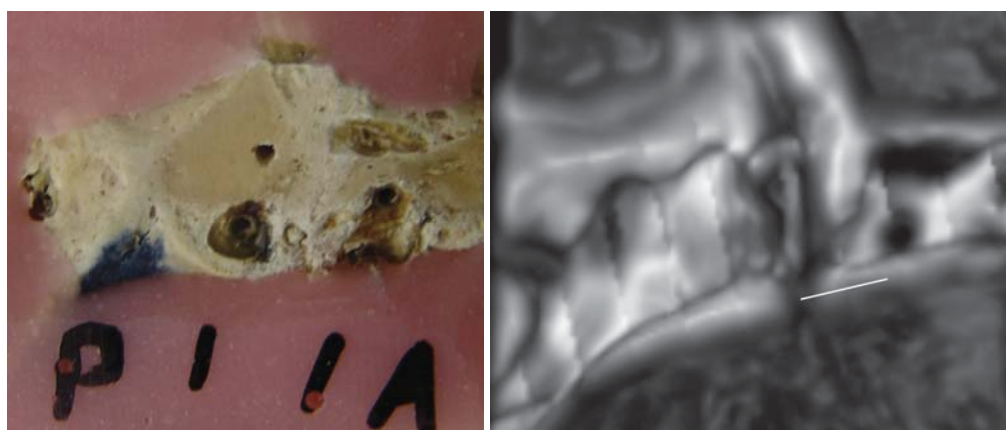


Gráfico 1: Variação de densidade (HU) do coelho A, não-fraturado, não-distraído nem irradiado com laser.

Quanto ao coelho (b), o qual sofreu fratura, mas não foi alongado nem irradiado com laser, observou-se uma área mais central correspondente à fratura, com uma densidade menor em relação às demais áreas ósseas (Figuras 25).



(a)

(b)

Figura 25: Coelho (b), fraturado, não-distraído nem irradiado com laser. Na figura (a), a mandíbula deste espécime incluída em resina; em (b), a TC correspondente.

Avaliando-se a densidade pela escala Housfield verificou-se uma densidade menor do que o osso que não sofreu fratura nem alongamento ósseo. A variação da densidade foi de aproximadamente 0 até 1000 HU, conforme Gráfico 2.

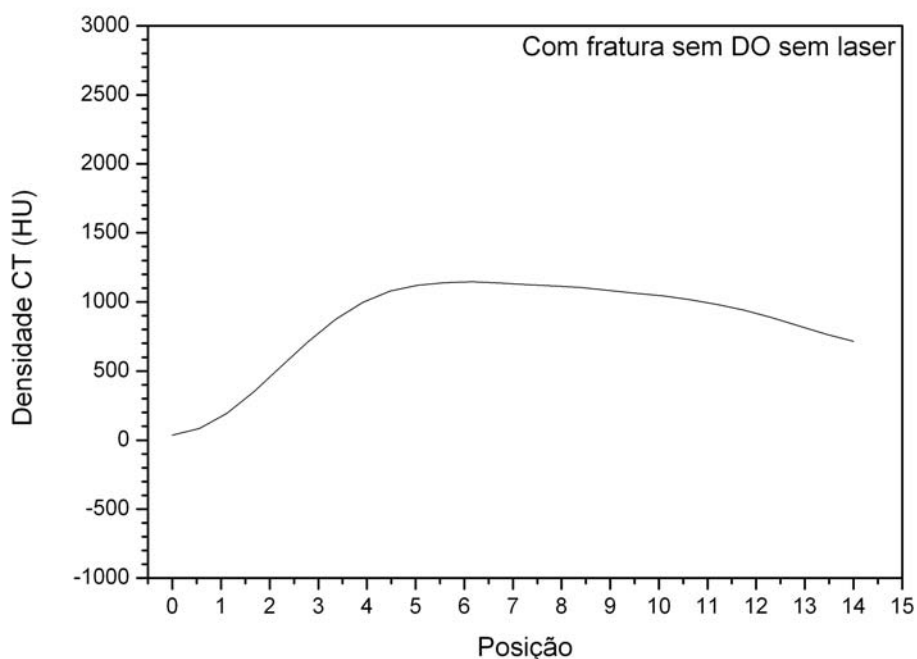


Gráfico 2: Variação de densidade (HU) do coelho B, fraturado, não-distraído nem irradiado com laser.

A tomografia do coelho C, que sofreu fratura, mas não foi alongado, embora tenha recebido irradiação com laser, apresentou uma imagem semelhante ao animal anterior, com uma área central de menor densidade do que as demais, correspondente à região da fratura (Figura 26).

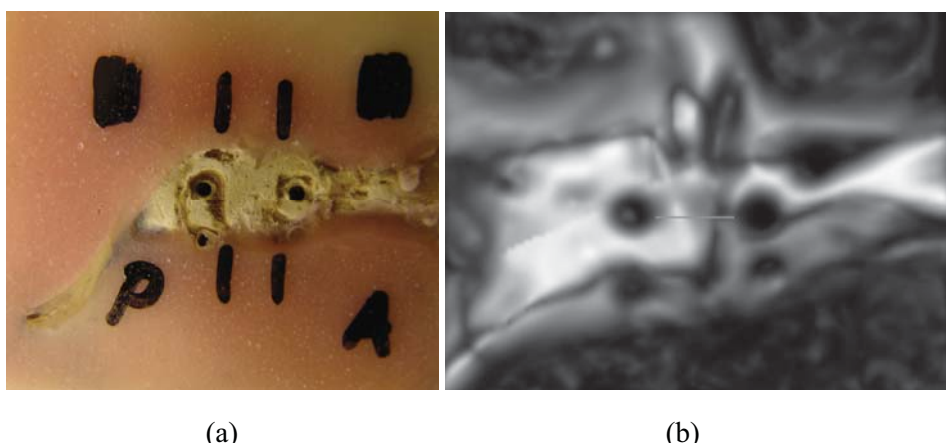


Figura 26: Coelho C, fraturado, não-distraído e irradiado com laser. Na figura (a), a mandíbula deste espécime incluída em resina; em (b), a TC correspondente.

O Gráfico 3, sobre variação da densidade segundo a escala Hounsfield, mostrou variação de densidade de 250 até 1250 HU. Tais valores foram maiores do que o coelho B, o qual foi fraturado mas não irradiado com laser.

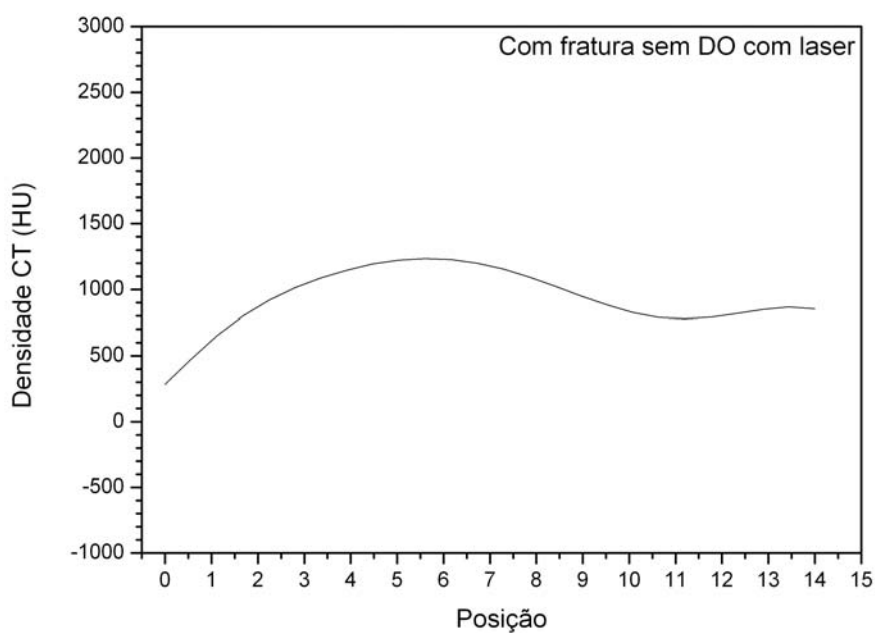


Gráfico 3: Variação de densidade (HU) do coelho C, fraturado, não-distraído e irradiado com laser.

O coelho D, que sofreu fratura e distração osteogênica, mas não recebeu irradiação com laser, apresentou uma área mais ampla de menor densidade correspondente ao alongamento ósseo (Figura 27).

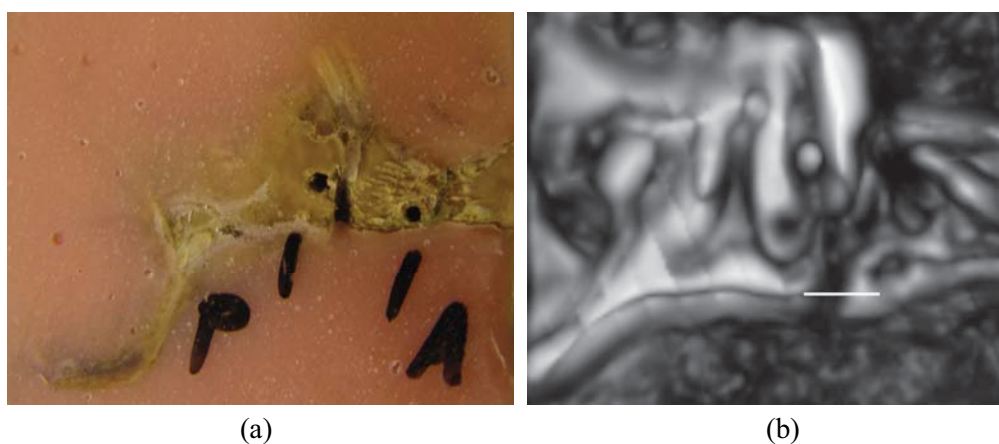


Figura 27: Coelho D, fraturado, distraído, mas não irradiado com laser. Na Figura (a), a mandíbula deste espécime incluída em resina; em (b), a TC correspondente.

Quanto à variação de densidade pela escala Hounsfield observou-se variação de densidade, entre aproximadamente 0 e 1000 HU (Gráfico 4).

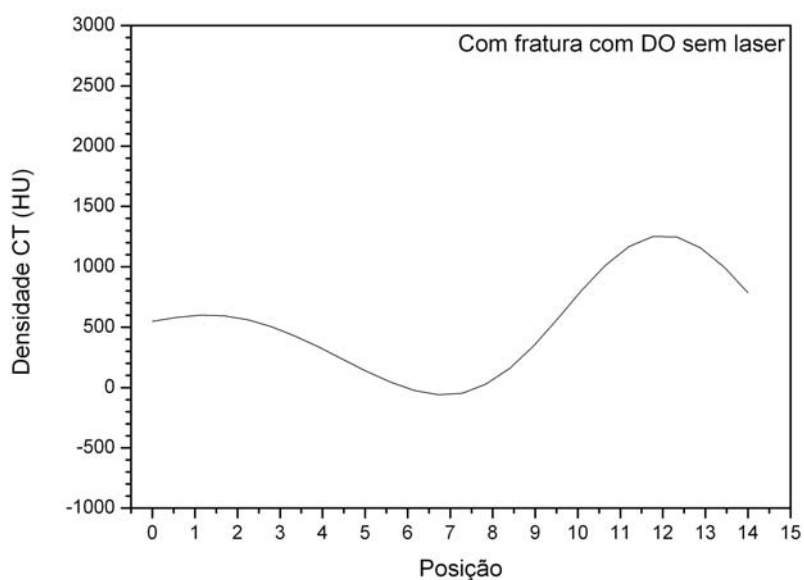
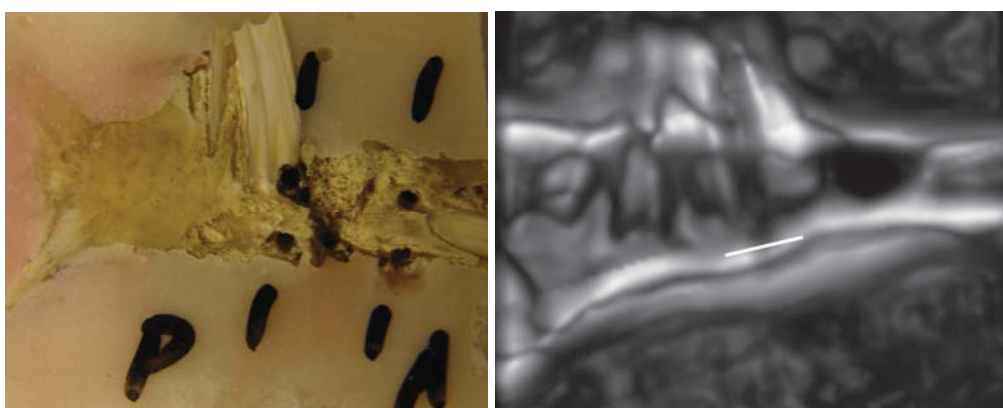


Gráfico 4: Variação de densidade (HU) do coelho D, fraturado, distraído, mas não-irradiado com laser.

Semelhante à amostra anterior, o coelho E, que sofreu fratura, distração osteogênica e irradiação com laser, apresentou uma área central de menor densidade correspondente ao alongamento ósseo (Figura 28).



(a)

(b)

Figura 28: Coelho E, fraturado, distraído e irradiado com laser. Na figura (a), a mandíbula deste espécime incluída em resina; em (b), a TC correspondente.

A análise da densidade pela escala Hounsfield mostrou variação de aproximadamente 0 a 1000 HU, com valores semelhantes ao coelho que também sofreu distração osteogênica, embora não tenha sido irradiado com laser (Gráfico 5).

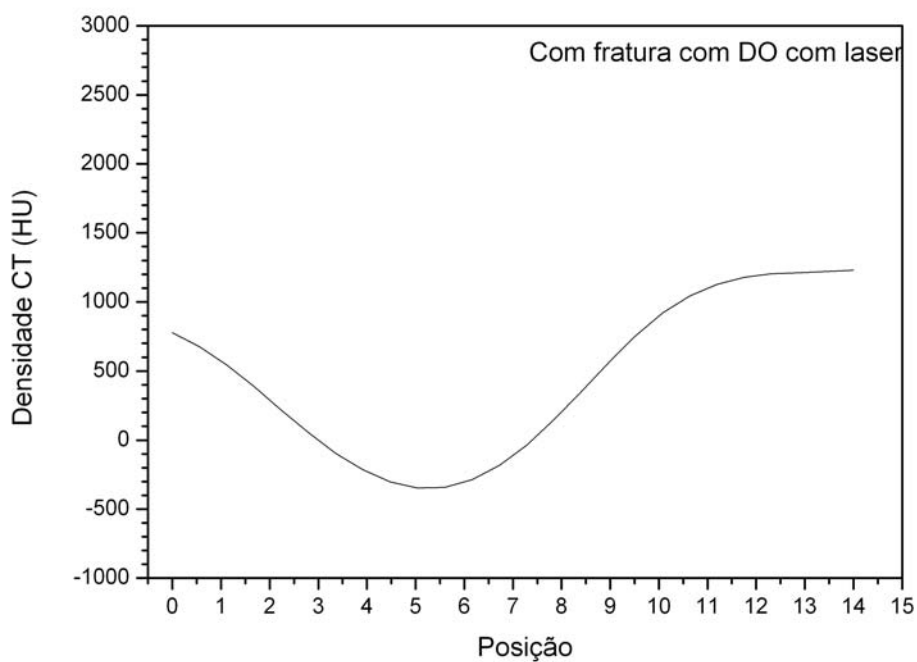


Gráfico 5: Variação de densidade (HU) do coelho E, fraturado, distraído e irradiado com laser.

O Quadro 3 resume os valores de densidade encontrados na amostra.

COELHOS	Fratura	Distração Osteogênica	Laser	Valores de Densidade
A	Não	Não	Não	1300
B	Sim	Não	Não	0 - 1000
C	Sim	Não	Sim	250 - 1250
D	Sim	Sim	Não	0 - 1000
E	Sim	Sim	Sim	0 - 1000

Quadro 3: Resumo das variações de densidade (HU) encontradas na amostra

5.3 ANÁLISE FÍSICA

Para esta análise foram utilizados os mesmos espécimes da análise tomográfica apresentada anteriormente.

Os resultados foram ilustrados por meio de gráficos que apresentam as medidas de dureza, em Megapascal (MPa), e de módulo de elasticidade, em Gigapascal (GPa).

Ao se avaliar a dureza do coelho A, que não sofreu distração osteogênica nem irradiação com laser, foi observada variação, ao longo da região avaliada, de 50 a 600 MPa, enquanto que o módulo de elasticidade variou de 3 a 16 GPa (Gráfico 6).

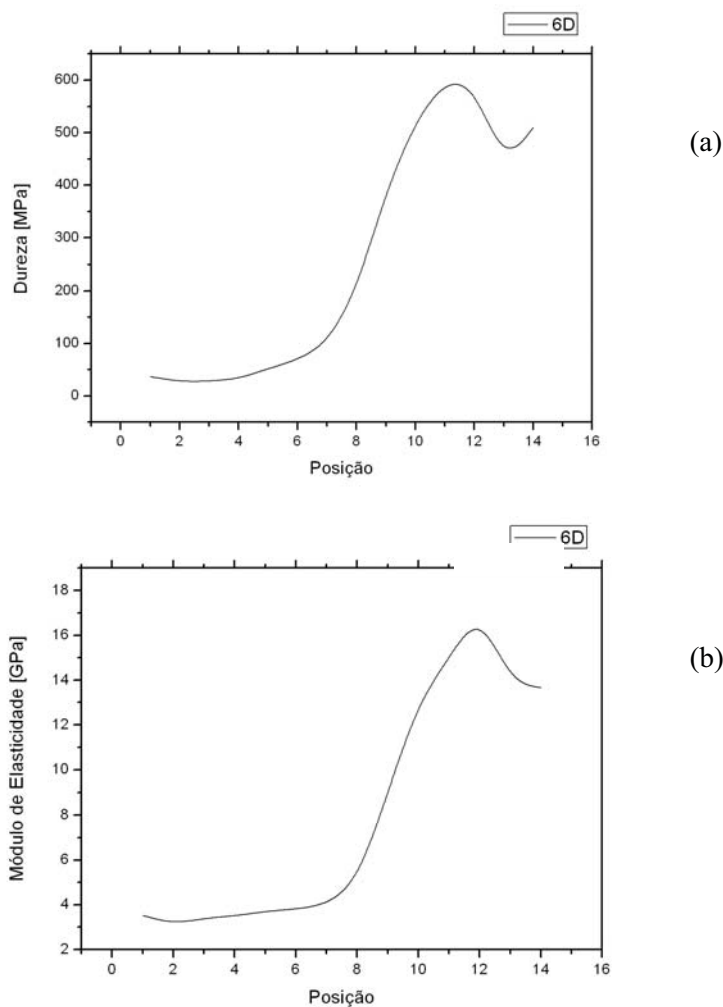


Gráfico 6: Propriedades físicas do coelho A, não-fraturado, não-distraído nem irradiado com laser. Em 6(a), a variação de nanodureza; em 6(b), a variação do módulo de elasticidade.

Quanto ao coelho B, o qual sofreu fratura, mas não foi alongado nem irradiado com laser, observaram-se valores de dureza semelhantes ao coelho anterior, variando de 50 a 600 MPa. Contudo, quanto à variável módulo de elasticidade, foram verificados valores superiores, de 3 a 20 GPa (Gráfico 7).

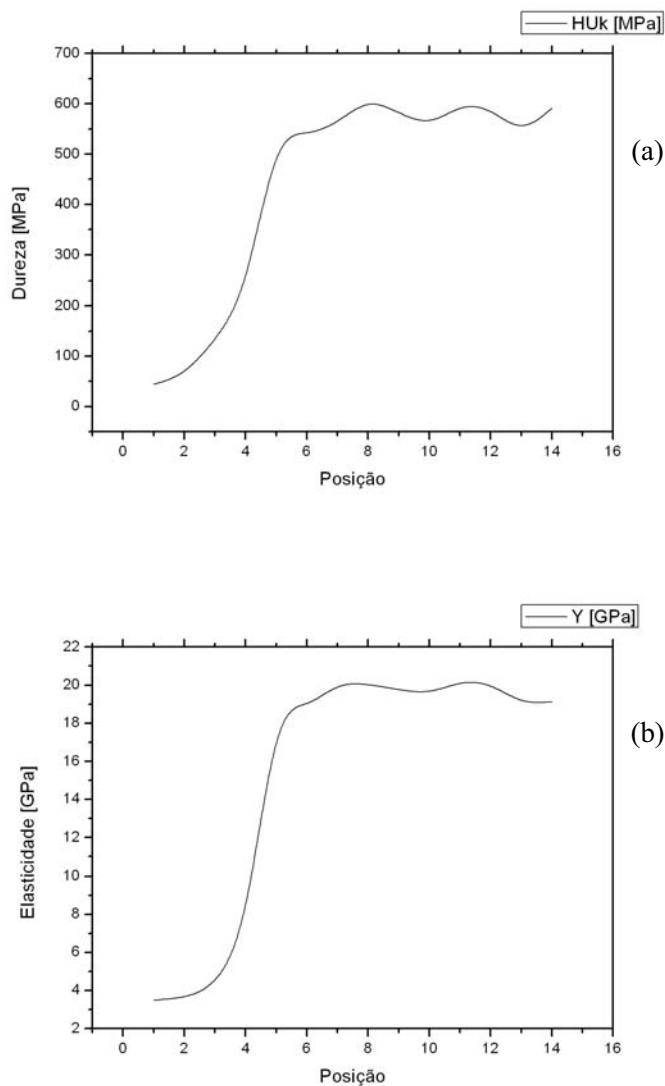


Gráfico 7: Propriedades físicas do coelho B, fraturado, não-distraído nem irradiado com laser. Em 7(a), a variação de nanodureza; em 7(b), a variação do módulo de elasticidade.

Quando avaliadas as propriedades físicas do coelho C, que sofreu fratura e irradiação com laser, mas não foi alongado, os valores de dureza verificados variaram entre 50 a 550 MPa, enquanto o módulo de elasticidade variou entre 3 a 16 GPa (Gráfico 8).

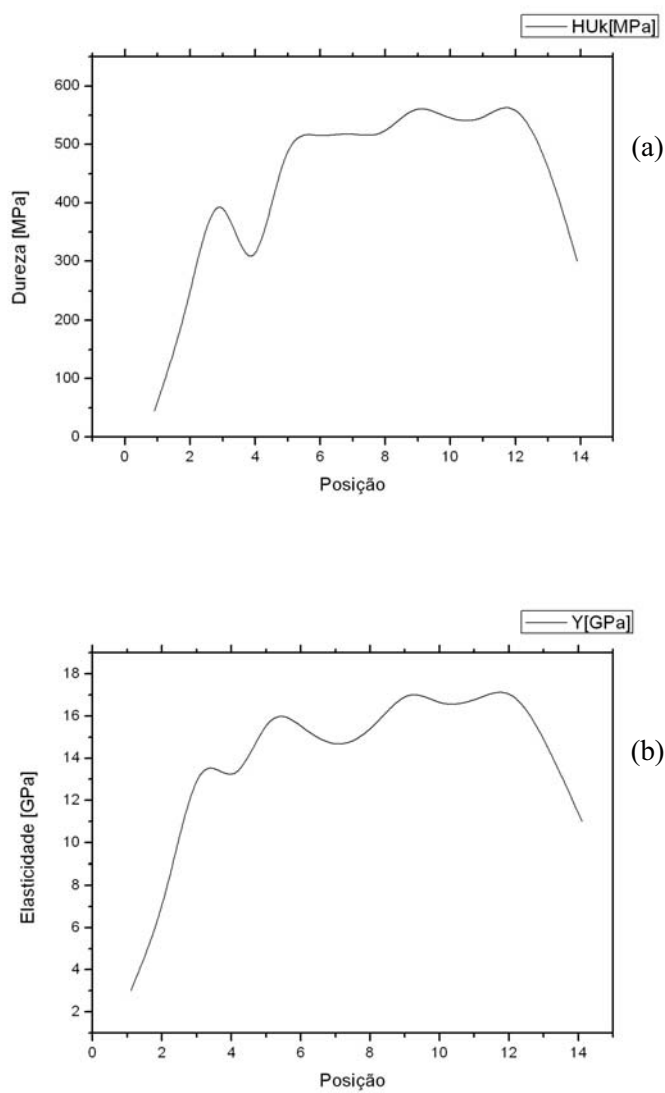


Gráfico 8: Propriedades físicas do coelho C, fraturado, não-distraído e irradiado com laser. Em 8(a), a variação de nanodureza; em 8(b), a variação do módulo de elasticidade.

Com relação ao coelho D, que sofreu fratura e alongamento ósseo, mas não foi irradiado com laser, verificaram-se medidas de dureza entre 0 e 500 MPa e de módulo de elasticidade entre 0 e 6 GPa (Gráfico 9).

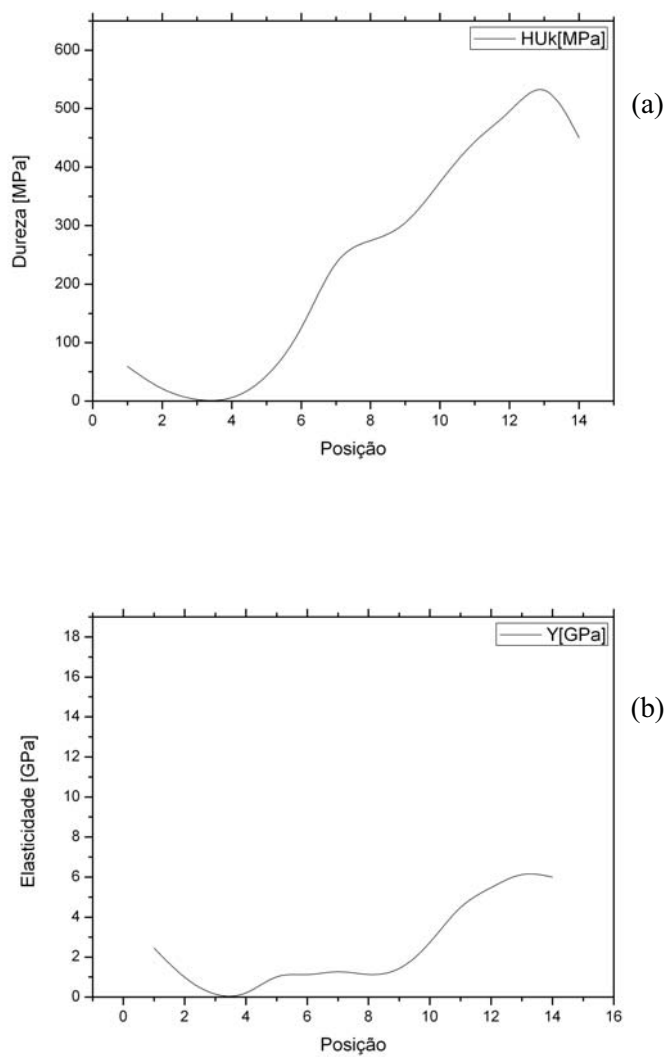


Gráfico 9: Propriedades físicas do coelho D, fraturado, distraído, mas não irradiado com laser. Em 9(a), a variação de nanodureza; em 9(b), a variação do módulo de elasticidade.

O coelho E, que sofreu fratura, distração osteogênica e irradiação com laser, apresentou valores de dureza entre 0 e 500 MPa e de módulo de elasticidade entre 0 e 14 GPa (Gráfico 10).

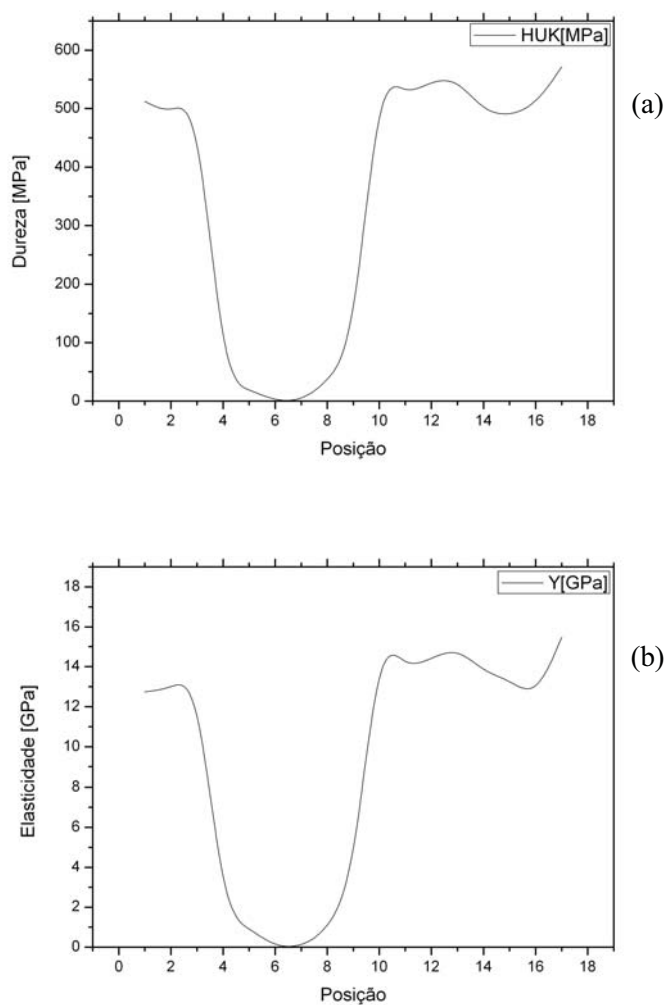


Gráfico 10: Propriedades físicas do coelho E, fraturado, distraído e irradiado com laser. Em 10(a), a variação de nanodureza; em 10(b), a variação do módulo de elasticidade.

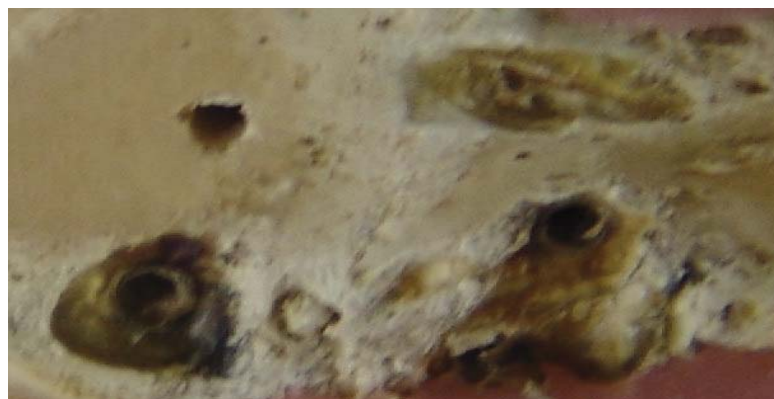
O Quadro 4 resume os valores das propriedades físicas encontradas na amostra

COELHOS	Fratura	Distração Osteogênica	Laser	Propriedades Físicas	
				Dureza (MPa)	Elasticidade (GPa)
A	Não	Não	Não	50-600	3-16
B	Sim	Não	Não	50-600	3-20
C	Sim	Não	Sim	50-550	3-16
D	Sim	Sim	Não	0-500	0-6
E	Sim	Sim	Sim	0-500	0-14

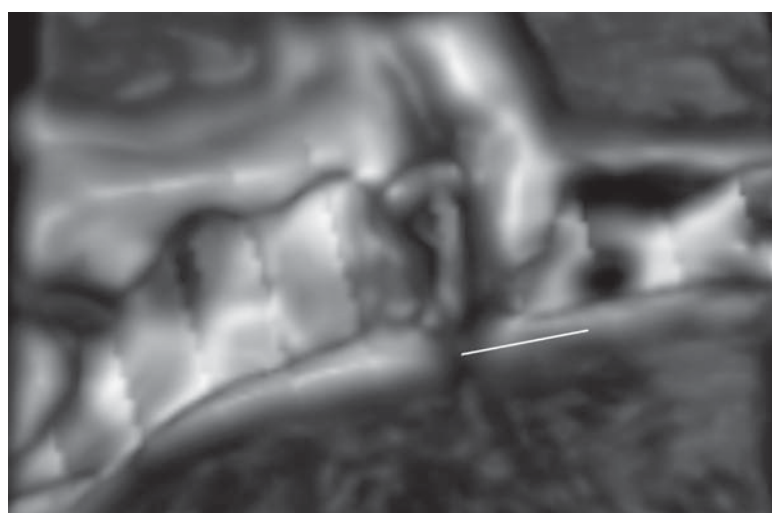
Quadro 4: Resumo das propriedades físicas encontradas na amostra.

5.4 ANÁLISE DOS RESULTADOS EM CONJUNTO

A seguir, foi apresentado um desenho esquemático mostrando um mosaico do osso embutido em resina acrílica (Figura 29a) e a tomografia (Figura 29b) e os gráficos relativos às análises tomográficas (Gráfico 11a) e físicas (gráficos 11b e 11c) do coelho B, que sofreu fratura, mas não foi distraído nem irradiado com laser.



(a)



(b)

Figura 29: Coelho B, fraturado, não-distraído nem irradiado com laser. Na figura (a), a mandíbula deste coelho incluída em resina; em (b), a TC correspondente.

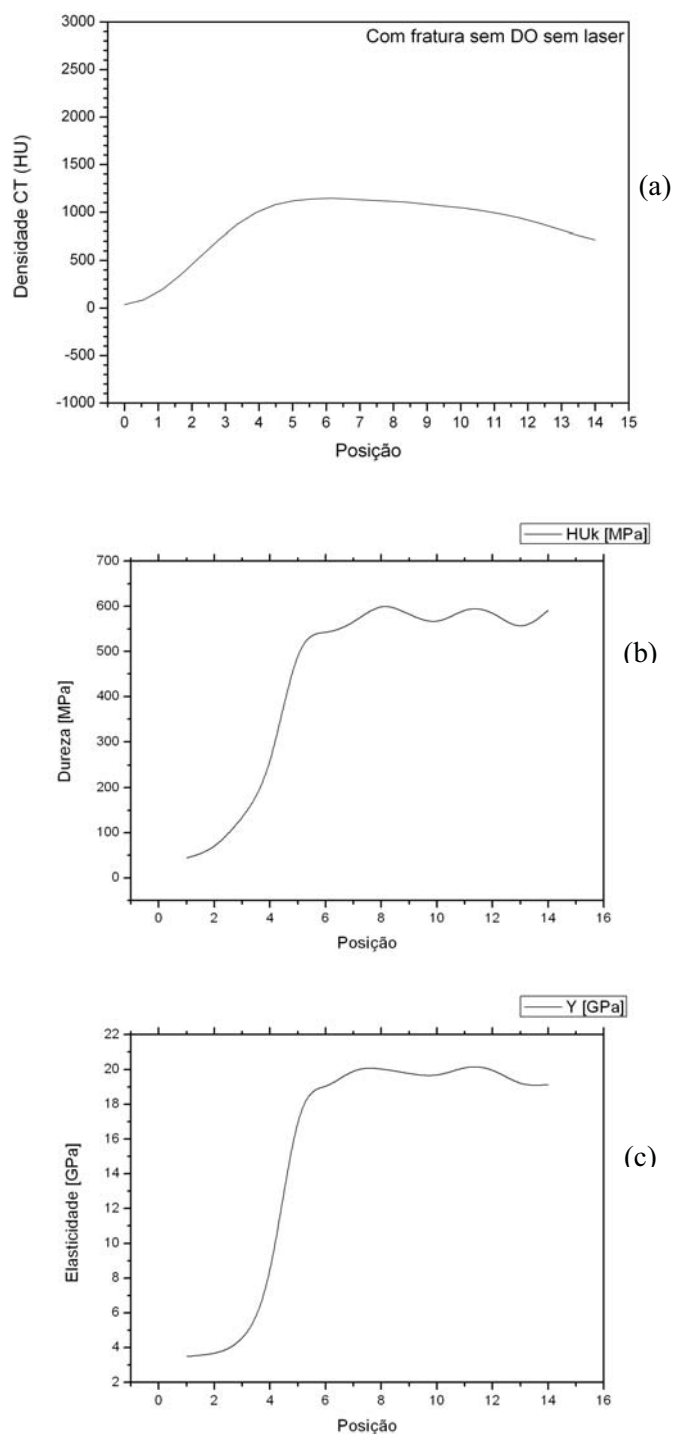
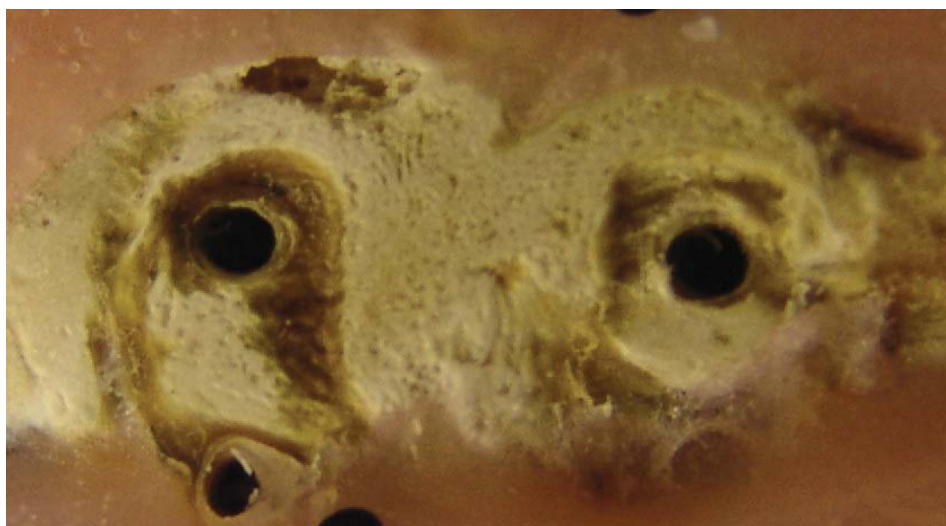
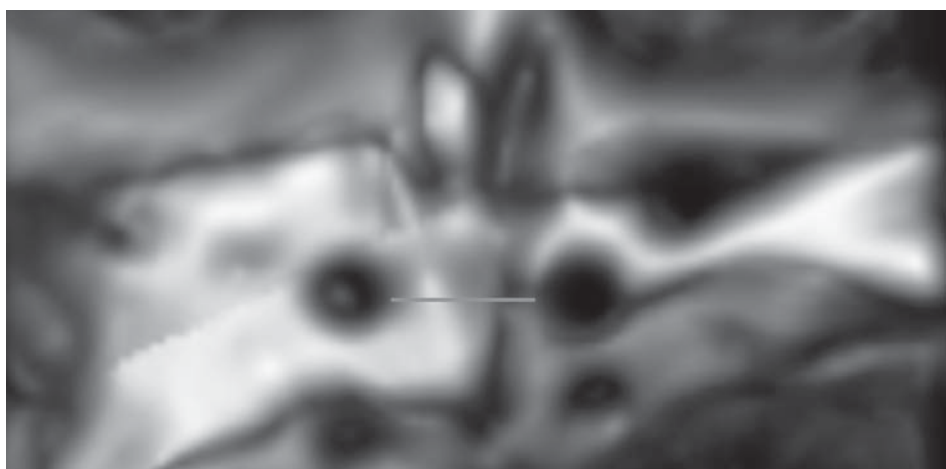


Gráfico 11: Propriedades tomográficas e físicas do coelho B, fraturado, não-distraído nem irradiado com laser. Em 11(a), a variação de densidade; em 11(b), as medidas de nanodureza; em 11(c), as medidas do módulo de elasticidade.

As figuras 30 mostram um mosaico do osso embutido em resina acrílica e a tomografia e os gráficos relativos às análises tomográficas (Gráfico 12A) e físicas (gráficos 12B e 12C) do coelho C, que sofreu fratura, não foi distraído, mas irradiado com laser.



(a)



(b)

Figura 30: Coelho C, fraturado, não-distraído, mas irradiado com laser. Na figura (a), a mandíbula deste coelho incluída em resina; em (b), a TC correspondente.

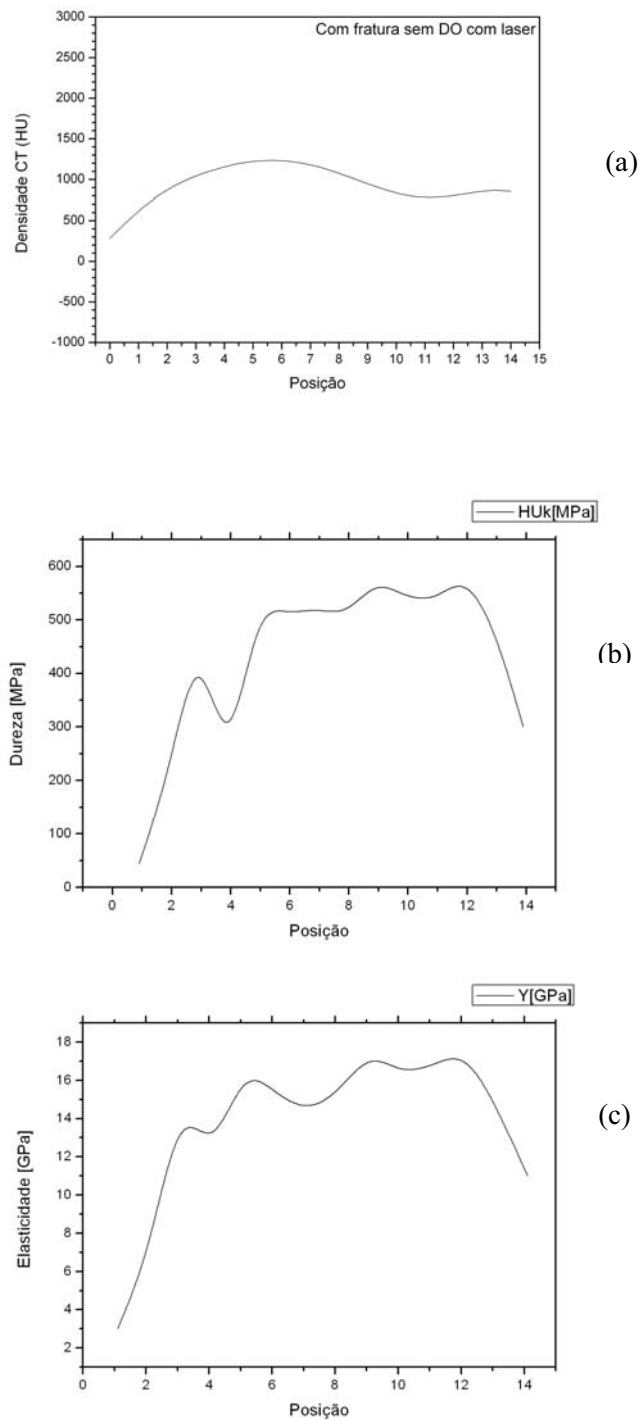


Gráfico 12: Propriedades tomográficas e físicas do coelho C, fraturado, não-distraído, mas irradiado com laser. Em 12(a), a variação de densidade; em 12(b), as medidas de nanodureza; em 12(c), as medidas do módulo de elasticidade.

A seguir, foi apresentado um desenho esquemático mostrando um mosaico das imagens de HE ao longo de toda a área distraída (Figura 31a), do osso embutido em resina acrílica (Figura 31b) e da tomografia (Figura 31c), além dos gráficos relativos às análises tomográficas (Gráfico 13a) e físicas (gráficos 13b e 13c) do coelho D, que sofreu fratura, foi distraído, mas não foi irradiado com laser. Ressalta-se que a imagem HE não é do mesmo coelho do bloco embutido em resina, da tomografia e das análises.

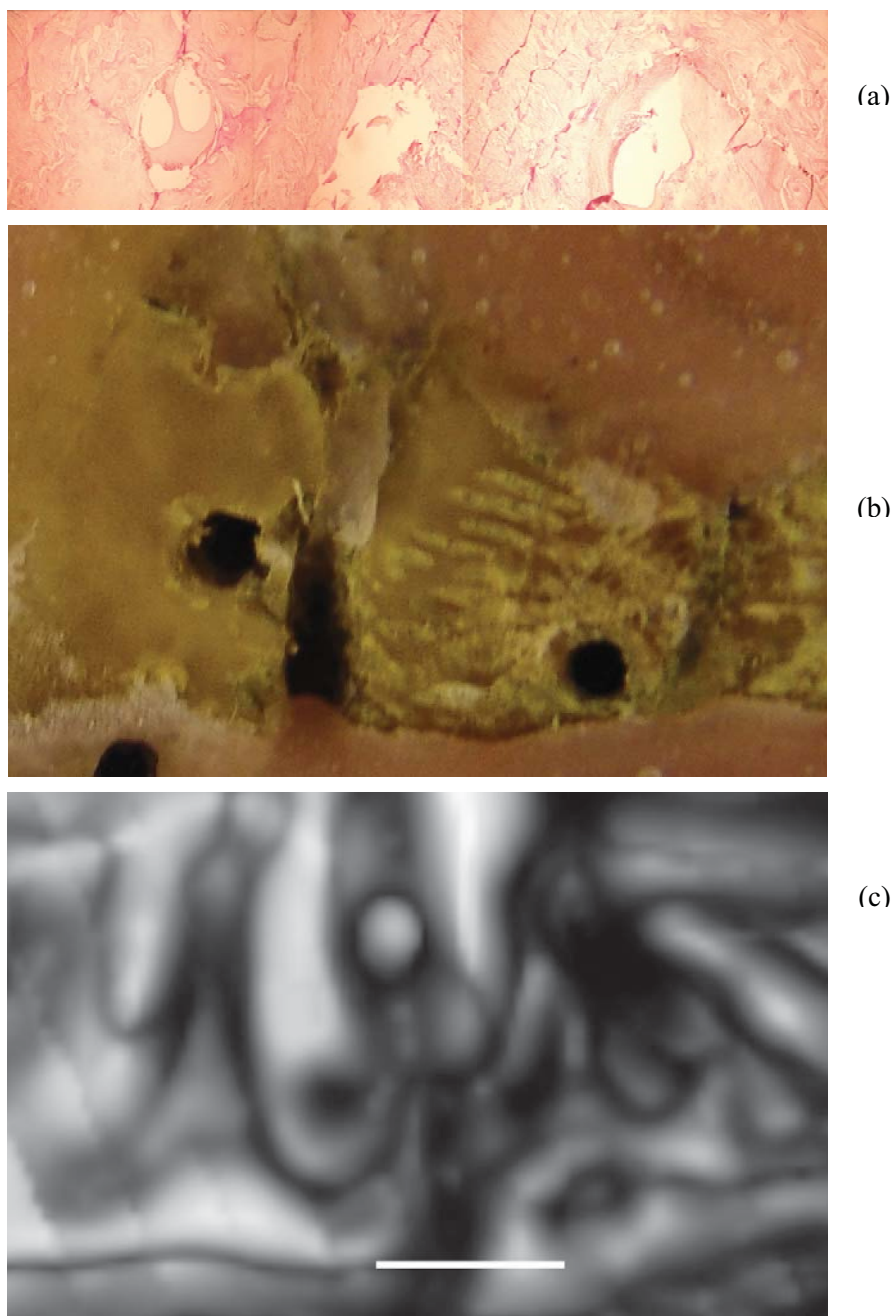


Figura 31: Coelho D, fraturado, distraído, mas não-irradiado com laser. Na Figura (a), uma representação do HE; na (b), a mandíbula incluída em resina; em (c), a TC correspondente.

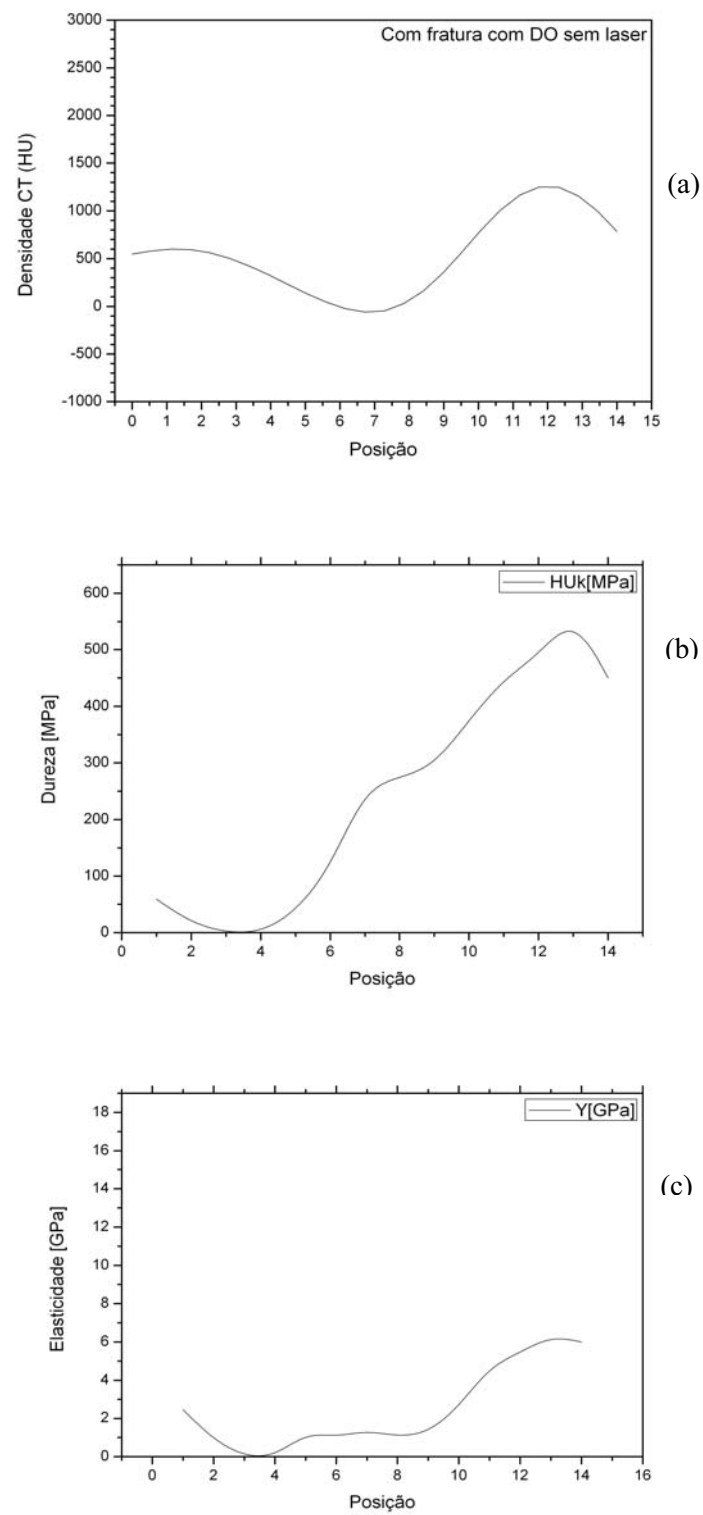
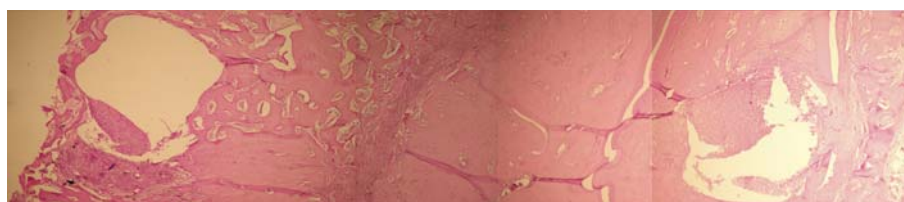
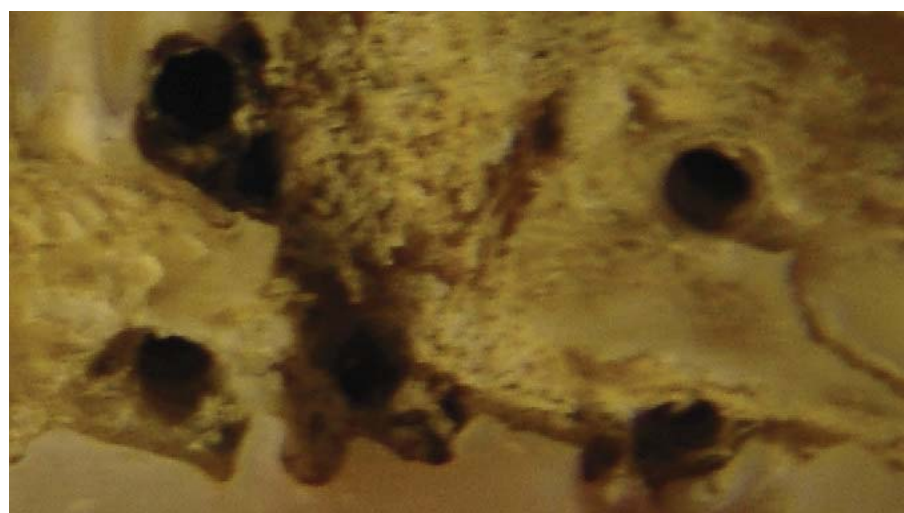


Gráfico 13: Propriedades tomográficas e físicas do coelho D, fraturado, distraído, mas não irradiado com laser. Em 13(a), a variação de densidade; em 13(b), as medidas de nanodureza; em 13(c), as medidas do módulo de elasticidade.

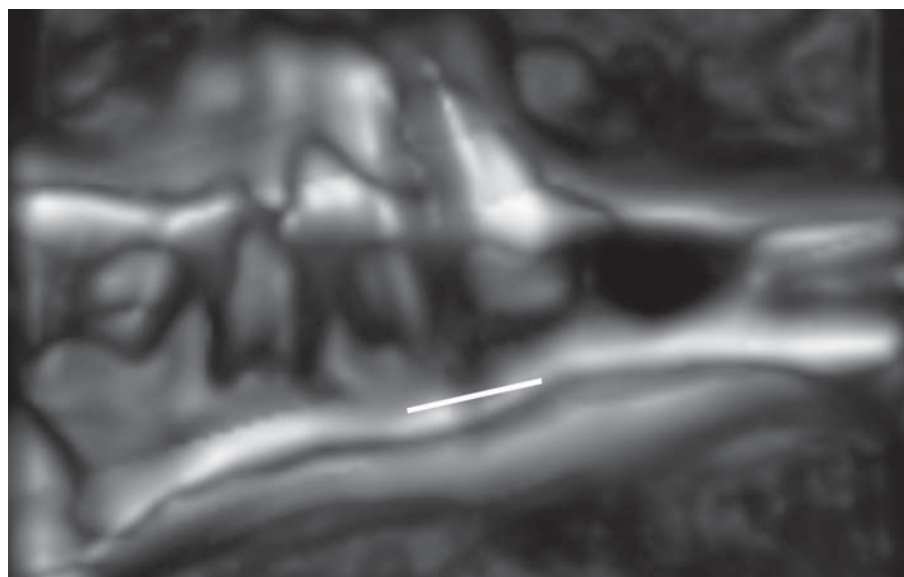
Finalmente, foi apresentado um desenho esquemático mostrando um mosaico das imagens de HE ao longo de toda a área distraída (Figura 32a), do osso embutido em resina acrílica (Figura 32b) e da tomografia (Figura 32c), além dos gráficos relativos às análises tomográficas (Gráfico 14a) e físicas (gráficos 14b e 14c) do coelho E, que sofreu fratura, distração e irradiação com laser. Ressalta-se que a imagem HE também não é do mesmo coelho do bloco embutido em resina, da tomografia e das análises.



(a)



(b)



(c)

Figura 32: Coelho E, fraturado, distraído e irradiado com laser. Na Figura (a), uma representação do HE; na (b), a mandíbula incluída em resina; em (c), a TC correspondente.

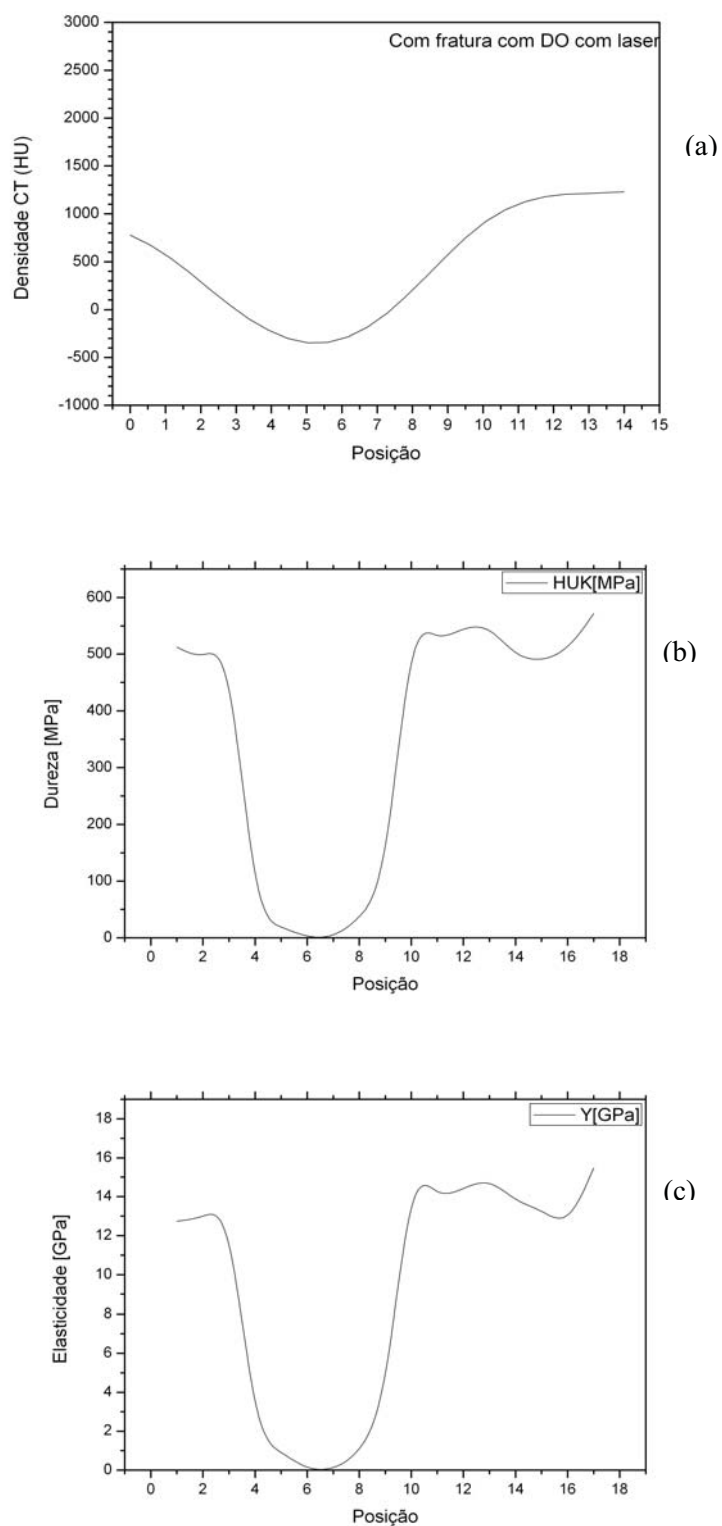


Gráfico 14: Propriedades tomográficas e físicas do coelho E, fraturado, distraído e irradiado com laser. Em 14(a), a variação de densidade; em 14(b), as medidas de nanodureza; em 14(c), as medidas do módulo de elasticidade.

O Quadro 5 apresenta os resultados relativos às propriedades tomográficas e físicas de maneira resumida.

COELHOS	Fratura	Distração Osteogênica	Laser	Propriedades Tomográficas	Propriedades Físicas	
				Escala Hounsfield	Dureza (MPa)	Elasticidade (GPa)
A	Não	Não	Não	1300	50-600	3-16
B	Sim	Não	Não	0 - 1000	50-600	3-20
C	Sim	Não	Sim	250 - 1250	50-550	3-16
D	Sim	Sim	Não	0 - 1000	0-500	0-6
E	Sim	Sim	Sim	0 - 1000	0-500	0-14

Quadro 5: Resumo das propriedades tomográficas e físicas encontradas na amostra.

6 DISCUSSÃO

O modelo animal adotado para esta pesquisa foi o coelho, submetido a DO de mandíbula. Este modelo já foi amplamente utilizado em estudos sobre alongamento e regeneração de tecido ósseo^{9,11,12,22-26}.

Resultados clínicos e histológicos obtidos em outras investigações indicam o coelho como o modelo animal ideal para DO mandibular, pois combina, com sucesso, critérios de controle intraanimal, análise temporal, custo efetivo e bom controle biológico, que podem nortear futuros estudos¹⁰⁴.

Além disso, a utilização de animais de pequeno porte permite praticidade e rapidez na realização de análises histológicas e por imagem radiológica, com menor custo⁵³.

Para avaliar o processo de neoformação óssea, diversos pesquisadores utilizaram a análise histológica^{2,25-27,53,56}. Apesar de estarem bem descritos e consagrados os eventos que ocorrem durante o processo de alongamento ósseo por DO, inclusive quando da irradiação com laser^{2,25,26}, julgou-se importante a realização desta pesquisa, a fim de comprovar a ocorrência de neoformação óssea, suas características e a diferença percentual de osso neoformado, com e sem irradiação com laser.

Verificou-se, por análise descritiva, que realmente ocorreu neoformação óssea, com padrões definidos. Foram observadas, basicamente, duas regiões distintas: uma, de osso preexistente, ao redor dos parafusos e outra, de neoformação óssea caracterizada por ilhas entremeadas por tecido conjuntivo fibrovascular. Tais ilhas apresentaram orientação perpendicular ao traço de fratura, mas horizontal ao vetor de alongamento ósseo. Este padrão seguiu o mesmo encontrado na literatura^{2,25,26,53}.

Na presente pesquisa, apesar da quantidade de osso neoformado diminuir em direção à zona central da DO, não foi encontrada uma zona específica de tecido fibroso, conforme descrito por outros autores consultados^{2,53}. No entanto, os resultados obtidos são coincidentes com um estudo que encontrou formação de trabeculado ósseo em todos os grupos estudados, entremeados por tecido fibrovascular, onde o trabeculado ósseo esteve alinhado em direção ao

vetor da distração e a área central da regeneração mostrou menor quantidade de formação óssea, indicando que esta iniciou nos limites/bordas do osso preexistente, diminuindo em direção à área central⁵⁶.

Em alguns espécimes da presente pesquisa observou-se, também, pequena formação de cartilagem. Quando essa ocorreu, estava localizada em direção à região alveolar, próxima aos dentes. A possível explicação para tal fato seria um trauma cirúrgico provocado pela perfuração para instalação de parafusos do aparelho distrator, que, em alguns casos, ficou junto às raízes dentárias, com possível infecção de origem intrabucal associada. Já outras pesquisas não observaram esta formação de cartilagem^{53,56} ou foi constatada formação de tecido cartilaginoso apenas no grupo que recebeu irradiação com laser, no período de ativação².

Por meio da análise por HE, foi observada formação óssea, tanto no grupo controle quanto no experimental. Este tipo de evento está diretamente relacionado à quantidade e ao tempo de ativação. Foi utilizado um protocolo de ativação do aparelho de 0,7 mm/dia, pois, segundo a literatura, ativações de 0,5 a 1mm/dia resultam em formação óssea, enquanto que distrações maiores e mais rápidas resultam em união fibrosa, fato este não observado nesta investigação^{31,33,55,56}.

Com relação ao período de consolidação, optou-se por 10 dias, caracterizado como mais curto em relação a outras pesquisas^{25,27,56} que utilizaram períodos de fixação de duas a seis semanas. Esta opção se deu, principalmente, visando avaliar os estágios iniciais de formação óssea, a partir de um mesmo modelo experimental animal não-humano coelho. Esta metodologia é sustentada por resultados relatados de pesquisa em que se observou neoformação óssea em cinco coelhos (de um total de seis) com período de consolidação de somente oito dias⁵³. Além disso, o período de consolidação utilizado nesta pesquisa foi apenas um pouco inferior ao de outra, na qual se verificou que, na segunda semana, se pode observar união óssea na área central distraída, mas com áreas focais de tecido fibroso. Acredita-se que, para a finalidade deste estudo, o tempo de consolidação pode ser considerado ideal, embora somente na quarta semana se estime haver união óssea completa e corticalização parcial no osso neoformado por DO, em modelo experimental animal não humano coelho²⁷.

Na análise histológica, empregou-se o percentual de neoformação óssea, que é o teste padrão em estudos que avaliam tecidos ou substitutos ósseos. Quanto à utilização do laser em DO, já foi empregado anteriormente^{2,25,26}.

A intenção da utilização de tecnologia laser foi averiguar se a mesma biomodula positivamente, estimulando o processo de maturação da ferida, na medida em que a DO pode ocasionar grande desconforto ao paciente, especialmente quando utilizados aparelhos distratores externos, que podem induzir infecções de superfície, parestesias, cicatrizes hipertróficas e dificuldade de convívio social, além de casos de instabilidade e recidivas após o processo de distração osteogênica^{4-7,34}. Portanto, acredita-se ser importante desenvolver estratégias terapêuticas que abreviem o tempo para a estável consolidação do processo em estudo.

Optou-se pela utilização do comprimento de onda infravermelho, quando do emprego da LLLT, com o objetivo de acelerar a regeneração tecidual, pois as pesquisas já realizadas demonstram ser com este comprimento de onda que se obtém os melhores resultados no que se refere à biomodulação positiva em tecido ósseo^{42,49-52}.

A partir dos resultados obtidos no estudo realizado pela mesma equipe de pesquisa, publicado por Cerqueira et al. (2007), optou-se por irradiar com laser (LLLT – 830 nm) na fase de consolidação, considerando-se importante que o processo de ativação, imediatamente anterior, na dinâmica da DO, envolve atividade metabólica bem maior, passível de biomodulação positiva para estimulação da neoformação óssea. Ademais, os resultados daquele estudo também demonstraram formação de cartilagem quando o tecido foi irradiado no período de ativação².

Conforme o esperado, observou-se biomodulação positiva da ação do LLLT, proporcionando maior porcentagem de neoformação óssea em relação ao grupo controle. Os resultados são semelhantes aos apresentados na literatura, visto que pesquisadores encontraram maior neoformação óssea no grupo irradiado^{2,25,26}.

Utilizando-se uma amostra com espécimes submetidos à DO e também naqueles espécimes em que não foi realizada DO, mas apenas fratura do osso mandibular de coelhos, foram realizadas análises tomográficas e físicas, fato ainda não encontrado na literatura

pertinente ao assunto. Apesar das duas fases do experimento não terem ocorrido no mesmo biotério e no mesmo período, as cirurgias foram realizadas em animais obtidos a partir de mesmas matrizes, com características similares. Adiciona-se a isso o fato de seguir-se o mesmo protocolo terapêutico e ser realizado pelos mesmos operadores.

Inúmeros pesquisadores utilizaram tomografias para avaliar o processo de formação óssea ocorrida após DO. No entanto, poucos empregaram medidas de densidade. Apesar do custo da TC ser mais elevado do que exames radiográficos bidimensionais convencionais, optou-se por utilizar a tomografia em decorrência das vantagens sustentadas pela literatura¹⁶⁻¹⁹. Pesquisadores experientes afirmam que as tomografias computadorizadas proporcionam informações mais detalhadas sobre a qualidade e a quantidade de osso, nas áreas neoformadas, permitindo mensurar a densidade e as suas variações no osso alongado por DO, graças à sua grande precisão, mínimo erro e relação direta com os achados histológicos.

No que se refere aos testes instrumentados de dureza (IHT), os mesmos possibilitam a identificação das propriedades mecânicas do osso alongado por DO, por intermédio de medidas de nanodureza e módulo de elasticidade. Este tipo de teste tem sido bastante utilizado para avaliação de ossos e suturas em humanos e animais^{90,92,94-99,101}. No entanto, não existem informações sobre as propriedades físicas do osso distraído, embora já tenham sido mensuradas as propriedades físicas, pela nanoindentação, do calo ósseo de ratos submetidos a fraturas de fêmur¹⁰⁰.

Quanto ao coelho A, este não sofreu fratura nem processo de alongamento por DO. Ao serem avaliadas as propriedades tomográficas, foram verificadas pequenas variações de densidade, de acordo com a escala Hounsfield, estando no valor aproximado de 1.300 HU. Tais resultados estão de acordo com os valores já descritos para tecido ósseo na literatura^{69,70}. Segundo pesquisadores, o osso apresenta valores que variam de +1.000 até +3.000 HU. Além disto, estes resultados corroboram com os de outras pesquisas, que registraram valores de $944,9 \pm 207$ HU na região anterior de mandíbula⁷⁸, 1.320 a 1.560 HU na região basal de mandíbula⁷⁹ e densidades ósseas maiores que 850 na maioria das regiões interdentárias de maxila e mandíbula⁸¹.

Ao se avaliarem as propriedades físicas relacionadas à nanodureza, os valores encontrados no grupo controle desta pesquisa demonstraram ser um pouco menores do que

em ossos humanos, segundo a literatura, uma vez que se constatou variação entre 50 – 600 MPa, enquanto que, para ossos de humanos, foram observados valores de nanodureza um pouco maiores, variando entre 468 até 736 MPa⁹⁵ e entre 234 e 760 MPa⁹² e, especificamente, para ossos da face de humanos foram observados valores médios de 520 MPa para maxila e 590 MPa para mandíbula¹⁰¹.

Em relação ao módulo de elasticidade, observaram-se valores entre 3 e 16 GPa para tecido ósseo do modelo experimental animal não humano coelho pesquisado. Em ossos humanos do corpo foram encontrados valores de 13,5 – 25,8 GPa⁹⁵ e de 18,14 – 20,02 GPa⁹⁶. Em se tratando de ossos da face, foram verificados valores de 14,9 GPa para maxila e 18,3 GPa para mandíbula¹⁰¹. Os resultados obtidos nesta pesquisa indicam que as mandíbulas dos coelhos apresentam valores de módulo de elasticidade inferiores aos de ossos humanos.

Os coelhos B e C do grupo 2 sofreram fratura, embora não tenham sido alongados por DO. O primeiro não recebeu irradiação com laser, enquanto o segundo foi irradiado. As análises das tomografias revelaram variações de densidade de 0 até 1.000 HU para o coelho B e de 250 até 1.250 HU para o coelho C.

O coelho B apresentou densidades ósseas menores do que os valores do osso hígido, conforme os valores de densidade mencionados na literatura^{69,70} e comprovado pelas pesquisas^{78,79,81}. Tais valores são semelhantes aos do calo ósseo de fraturas produzidas em tíbias de coelhos, mas não irradiadas com laser, em que os pesquisadores constataram densidade de 297 HU⁵². Apesar de os valores obtidos serem inferiores aos do osso hígido, ocorreu união dos segmentos ósseos por neoformação, comprovado clinicamente e sustentado pelos achados histológicos prévios.

Em relação ao coelho C, este apresentou picos de valores de densidade óssea semelhantes ao coelho A e apontados na literatura para osso hígido^{69,70,78,79,81}. Tais valores seguem aqueles observados em pesquisa sobre calo ósseo de fraturas produzidas em tíbias de coelhos irradiadas com laser, cujo valor médio foi de 691 HU⁵². Semelhante ao coelho B, houve união dos segmentos ósseos comprovada clinicamente e sustentada pelos achados histológicos prévios, na área da neoformação óssea.

Este aumento da densidade em relação ao grupo que sofreu fratura, mas não foi irradiado com laser, é atribuído justamente à biomodulação positiva induzida pela utilização desta tecnologia. Este efeito é confirmado por inúmeras pesquisas^{2,25,26,42,49,52} que demonstraram que o laser oferece vantagens em termos de cicatrização de feridas ou fraturas ósseas. Sua utilização no coelho C produziu um calo ósseo exuberante, comprovado clinicamente, que traduziu no aumento da densidade observado no estudo da TC.

As propriedades físicas destes grupos identificaram valores de nanodureza e módulo de elasticidade semelhantes ao grupo controle, o qual não sofreu fratura nem alongamento ósseo por DO. Tais valores já foram discutidos anteriormente. A ausência de variação entre estes grupos experimentais e o controle possivelmente deve-se ao fato de que, embora tenha sido realizada uma fratura, esta foi adequadamente reduzida e estabilizada, sem sofrer alongamento ósseo, possibilitando uma adequada cicatrização. Soma-se a isso o fato de que os testes de nanodureza (IHT) terem sido realizados entre os orifícios do parafuso, de forma que também foram feitas medidas no osso hígido preexistente e não necessariamente apenas na região da linha de fratura. A formação do calo ósseo também contribuiu para esta semelhança de resultados.

Os resultados tomográficos e físicos estão em consonância com aqueles encontrados por um grupo de pesquisadores que observou que, em relação aos testes biomecânicos, não foram verificadas diferenças no que diz respeito à força de tensão entre os grupos com e sem laser que sofreram fraturas. Tais resultados sugerem que a utilização do laser pode favorecer a formação do calo ósseo em estágios precoces do processo de cicatrização, mas com benefícios duvidosos nas propriedades biomecânicas⁵².

Já os coelhos D e E do grupo 2 sofreram fratura e alongamento ósseo por DO. O primeiro não recebeu irradiação com laser, enquanto o segundo foi irradiado. As análises das tomografias revelaram variações de densidade de 0 até 1.000 HU para ambos os grupos. Acredita-se que tais grupos foram os que tiveram o processo de cicatrização mais dificultado devido ao processo específico para obter o alongamento ósseo, pois cada ativação traduzia-se em uma desorganização tecidual e em um trauma adicional local que, de alguma forma, poderia dificultar e/ou retardar o reparo tecidual. Essa seria a principal causa referida na literatura de instabilidades e recidivas^{4,5-7} dependentes do tempo de consolidação proposto pela equipe de pesquisadores.

Esta menor densidade óssea, quando comparada ao coelho não fraturado, é semelhante à pesquisa que constatou que a densidade óssea da área regenerada nunca chegou aos níveis verificados antes do alongamento ósseo, após um período de quatro, seis e oito semanas de consolidação⁶¹.

Quanto às propriedades mecânicas, tanto o coelho D quanto o E apresentaram valores de nanodureza e módulo de elasticidade um pouco inferiores aos demais grupos. Para estes grupos, os valores de nanodureza foram entre 0 até 550 MPa. O coelho não-irradiado (D) apresentou módulo de elasticidade entre 0 e 6 GPa, enquanto que o irradiado (E) mostrou módulo de elasticidade entre 0-14 GPa. Apesar de se apresentarem inferiores aos demais coelhos, os valores de nanodureza encontraram-se próximos a eles. O módulo de elasticidade do coelho D mostrou estar bem inferior aos demais, ao passo que no E, apesar de mais baixo, os valores encontraram-se mais próximos aos coelhos A, B e C. Isto indica que o osso alongado por DO e irradiado com laser apresenta propriedades mecânicas de um processo de cicatrização mais adiantado que o osso alongado por DO que não foi irradiado.

Ressalta-se que a avaliação tomográfica não identificou diferença de densidade entre os ossos distraídos, com e sem laser, enquanto que os testes físicos identificaram variação do módulo de elasticidade entre esses mesmos animais. Portanto, o IHT pode ser um teste mais sensível, identificando diferenças que as tomografias não aferem.

Os resultados obtidos com amostragem pequena, como foi o caso da presente pesquisa, devem ser interpretados com cautela. Por exemplo, quando se faz referência a valores de propriedades mecânicas das análises físicas com valor 0 (zero), pode-se entender que a medida foi obtida sobre uma área não-trabeculada (espaço ósseo não-mineralizado). Apesar disto, sendo este um trabalho pioneiro e preliminar, balisador de pesquisas seqüenciais, os achados histológicos, tomográficos e físicos obtidos e relacionados parecem convergir quanto ao efeito bioestimulatório no que diz respeito ao processo de reparo tecidual quando da utilização da LLLT.

7 CONCLUSÕES

- A partir de análise histológica, pode-se afirmar que a utilização do laser infravermelho (GaAl)As ($\lambda=830$ nm, 40 mW) aumenta o percentual de neoformação óssea, no grupo irradiado.
- A utilização do laser infravermelho (GaAl)As ($\lambda=830$ nm, 40 mW) aumenta a densidade do osso neoformado, no animal fraturado.
- A utilização do laser infravermelho (GaAl)As ($\lambda=830$ nm, 40 mW) não aumenta a densidade óssea do animal fraturado e distraído.
- Os resultados aferidos por IHT não demonstram benefícios relacionados às propriedades mecânicas de nanodureza e módulo de elasticidade do osso fraturado, utilizando-se o laser infravermelho (GaAl)As ($\lambda=830$ nm, 40 mW).
- Em relação à propriedade mecânica de nanodureza do osso fraturado e distraído, a utilização do laser infravermelho (GaAl)As ($\lambda=830$ nm, 40 mW) não apresenta benefícios relacionados, conforme resultados aferidos por IHT.
- Em relação à propriedade mecânica de módulo de elasticidade do osso fraturado e distraído, resultados aferidos por IHT demonstram benefícios relacionados à utilização do laser infravermelho (GaAl)As ($\lambda=830$ nm, 40 mW).

REFERÊNCIAS

1. Petzold R, Zeilhofer HF, Kalender WA. Rapid prototyping technology in medicine-basics and applications. **Comput Med Imaging Graph.** 1999 Sep-Oct;23(5):277-84.
2. Cerqueira A et al. Bone tissue microscopic findings related to the use of diode Laser (830 nm) in ovine mandibule submitted to distraction osteogenesis. **Acta Cir Bras.** 2007 Mar-Apr;22(2):92-7.
3. Samchukov ML, Cherkashin AM, Cope JB. Distraction osteogenesis: history and biologic basis of new bone formation In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE. (Org.). **Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics.** Illinois: Quintessence, 1999. p. 131-146.
4. Mofid MM et al. Craniofacial distraction osteogenesis: a review of 3278 cases. **Plast Reconstr Surg.** 2001 Oct;108(5):1103-14; discussion 1115-7.
5. McCarthy JG et al. Lengthening the human mandible by gradual distraction. **Plastic Reconstr Surg.** 1992 Jan;89(1):1-8; discussion 9-10.
6. Douglas LR, Douglas JB, Smith PJ. Intraoral mandibular distraction osteogenesis in a patient with severe micrognathia secondary to TMJ ankylosis using a tooth and bone-anchored device (PIT Device): a case report. **J Oral Maxillofac Surg.** 2000 Dec;58(12):1429-33.
7. Marquez IM, Fish LC, Stella JP. Two-years follow-up of distraction osteogenesis: its effect on mandibular ramus height in hemifacial microsomia. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.** 2000 Feb;117(2):130-9.
8. Saito S, Shimizu N. Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.** 1997 May;111(5):525-32.
9. Stewart KJ et al. A quantitative analysis of the effect of insulin-like growth factor-1 infusion during mandibular distraction osteogenesis in rabbits. **Br J Plast Surg.** 1999 Jul;52(5):343-50.
10. Farhadieh RD et al. Effect of distraction rate on biomechanical, mineralization, and histologic properties of an ovine mandible model. **Plast Reconstr Surg.** 2000 Mar;105(3):889-95.

11. Hagiwara T, Bell WH. Effect of electrical stimulation on mandibular distraction osteogenesis. **J Craniomaxillofac Surg**. 2000 Feb;28(1):12-9.
12. Shimazaki A et al. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates bone maturation in distraction osteogenesis in rabbits. **J Bone Joint Surg (Br)**. 2000 Sep;82(7):1077-82.
13. Mester E et al. Effect of laser rays on wound healing. **Am J Surg**. 1971 Oct;122(4):532-5.
14. Luger EJ et al. Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. **Lasers Surg Med**. 1998;22(2):97-102.
15. Kawasaki K, Shimizu N. Effects of low-energy laser irradiation on bone remodeling during experimental tooth movement in rats. **Lasers Surg Med**. 2000;26(3):282-91.
16. Aronson J et al. Preliminary studies of mineralization during distraction osteogenesis. **Clin Orthop Relat Res**. 1990 Jan;(250):43-9.
17. Lindh C et al. Trabecular bone volume and bone mineral density in the mandible. **Dentomaxillofac Radiol**. 1997 Mar;26(2):101-6.
18. Zimmermann CE et al. Assessment of bone formation in a porcine mandibular distraction wound by computed tomography. **Int J Oral Maxillofac Surg**. 2004 Sep;33(6):569-74.
19. Swennen GRJ et al. Assessment of the distraction regenerate using three-dimensional quantitative computer tomography. **Int J Oral Maxillofac Surg**. 2005 Jan;34(1):64-73.
20. Blando E. **Estudo de técnicas de indentação para avaliação de materiais na região de nano e microdureza**. [Dissertação]. Porto Alegre (RS): Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2001.
21. Newey D, Pollock HM, Wilkins MA. The ultra-microhardness of ion-implanted iron and steel at sub-micron depths and its correlation with wear-resistance. **J Mater Sci**. 1983 12: 157-66.
22. Komuro Y et al. The histologic analysis of distraction osteogenesis of the mandible in rabbits. **Plast Reconstr Surg**. 1994 Jul;94(1):152-9.

23. Meyer U et al. The effect of magnitude and frequency of interfragmentary strain on the tissue response to distraction osteogenesis. **J Oral Maxillofac Surg.** 1999 Nov;57(11):1331-9; discussion 1340-1.
24. Al ruhaimi KA. Comparison of different distraction rates in the mandible: an experimental investigation. **Int J Oral Maxillofac Surg.** 2001A Jun;30(3):220-7.
25. Miloro M, Miller JJ, Stoner JA. Low-Level laser effect on mandibular distraction osteogenesis. **J Oral Maxillofac Surg.** 2007 Feb;65(2):168-76.
26. Hübler R et al. Effects of low-level laser therapy on bone formed after distraction osteogenesis. **Lasers Med Sci.** 2009 Jun 23. [Epub ahead of print]
27. Zheng LW, Ma L, Cheung LK. Changes in blood perfusion and bone healing induced by nicotine during distraction osteogenesis. **Bone.** 2008 Aug;43(2):355-61. Epub 2008 Apr 16
28. Snyder CC et al. Mandibular lengthening by gradual distraction: preliminary report. **Plast Reconstr Surg.** 1973 May;51(5):506-8.
29. Ilizarov GA. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: Part 1. The influence of stability of fixation and soft tissues preservation. **Clin Orthop Relat Res.** 1989A Jan;(238):249-81.
30. Ilizarov GA. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: Part 2. The influence or rate and frequency of distraction. **Clin Orthop Relat Res.** 1989B Feb;(239):263-85.
31. Elshahat A et al. Role of guided bone regeneration principle in preventing fibrous healing in distraction osteogenesis at high speed: experimental study in rabbit mandibles. **J Craniofac Surg.** 2004 Nov;15(6):916-21.
32. Tavakoli K et al. The role of latency in mandibular osteodistraction. **J Craniomaxillofac Surg.** 1998 Aug;26(4):209-19.
33. Boccaccio A, Pappalettere C, Kelly DJ. The influence of expansion rates on mandibular distraction osteogenesis: a computational analysis. **Ann Biomed Eng.** 2007 Nov;35(11):1940-60. Epub 2007 Sep 4

34. Dinner PA et al. Submerged intraoral device for mandibular lengthening. **J Craniomaxillofac. Surg.** 1997 Jun;25(3):116-23.
35. Michieli S, Miotti B. Lengthening of mandibular body by gradual surgical-orthodontic distraction. **J Oral Surg.** 1977 Mar;35(3):187-92.
36. Fischer E et al. Histopathologic and biomechanical changes in the muscles affected by distraction osteogenesis of the mandible. **Plast Reconstr Surg.** 1993 31(2):170-2.
37. Oda T et al. Segmental mandibular reconstruction by distraction osteogenesis under skin flaps. **Int J Oral Maxillofac Surg.** 1998 Feb;27(1):9-13.
38. Bell WH et al. Distractrion osteogenesis to widen the mandible. **Br J Oral Maxillofac Surg.** 1997 Feb;35(1):11-9.
39. Reichel H et al. Biomechanical and densiometric bone properties after callus distraction in sheep. **Clin Orthop Relat Res.** 1998 (357):237-46.
40. McTavish J et al. Does the sheep mandible relapse following lengthening by distraction osteogenesis? **J Craniomaxillofac Surg.** 2000 Oct;28(5):251-7.
41. Barushka O, Yaakobi T, Oron U. Effect of low-energy laser irradiation on the process of bone repair in the rat tibia. **Bone.** 1995 Jan;16(1):47-55.
42. Blaya DS et al. Histologic study of the effect of laser therapy on bone repair. **J Contemp Dent Pract.** 2008 Sep 1;9(6):41-8.
43. Al-Watban FAH, Zhang Z. Dosimetry-related wound healing response in the rat model following helium neon laser LLLT. **Laser Ther.** 1994 6(2):119-24.
44. Pinheiro ALB et al. Biomodulatory effects of LLLT on bone regeneration. **Laser Ther.** 2001 13:73-9.
45. Stadler I et al. 830-nm irradiation increases the wound tensile strength in a diabetic murine model. **Lasers Surg Med.** 2001;28(3):220-6.

46. Garavello-Freitas I et al. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. **J Photochem Photobiol B**. 2003 May-Jun;70(2):81-9.
47. Khadra M et al. Low-level laser therapy stimulates bone-implant interaction: an experimental study in rabbits. **Clin Oral Implants Res**. 2004 Jun;15(3):325-32.
48. 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**. 2007 Jan;40(1):140-8. Epub 2006 Sep 15
49. Pretel H, Lazarelli RF, Ramalho LT. Effect of low-level laser therapy on bone repair: histological study in rats. **Lasers Surg Med**. 2007 Dec;39(10):788-96.
50. Nicola RA et al. Effect of low-power GaAlAs laser (660nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. **Lasers Med Sci**. 2003 18(2):89-94.
51. Weber JB et al. Laser therapy improves healing of bone defects submitted to autologous bone graft. **Photomed Laser Surg**. 2006 Feb;24(1):38-44.
52. Shakouri SK et al. Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process. **Lasers Med Sci**. 2009 Apr 28. [Epub ahead of print]
53. Zimmermann CE et al. Histology of the porcine mandibular distraction wound. **Int J Oral Maxillofac Surg**. 2005 Jun;34(4):411-9.
54. Li G et al. Bone consolidation is enhanced by rhBMP-2 in a rabbit model of distraction osteogenesis. **J Orthop Res**. 2002 Jul;20(4):779-88.
55. Heiple KG, Herndon CH. The pathologic physiology of non-union. **Clin Orthop**. 1966 43:11.
56. Djasim UM et al. Histomorphometric comparison between continuous and discontinuous distraction osteogenesis. **J Craniomaxillofac Surg** 2009 May 18. [Epub ahead of print]
57. Aronson J et al. The effect of aging on distractions osteogenesis in the rat. **J Orthop Res**. 2001 May;19(3):421-27.

58. Cope JB, Samchukov ML. Mineralization dynamics of regenerate bone during mandibular osteodistraction. **Int J Oral Maxillofac Surg.** 2001 Jun;30(3):234-42.
59. Van Roermund PM et al. The use of computed tomography to quantitate bone formation after distraction epiphysiolysis in the rabbit. **Skeletal Radiol.** 1987;16(1):52-6.
60. Harp JH, Aronson J, Hollis M. Non-invasive determination of bone stiffness for distraction osteogenesis by quantitative computed tomography scans. **Clin Orthop.** 1994 301: 42-8.
61. Smith SW, Sachdeva RC, Cope JB. Evaluation of the consolidation period during osteodistraction using computed tomography. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.** 1999 Sep;116(3):254-63.
62. Daniel BL et al. The use of ultrasound mean acoustic attenuation to quantify bone formation during distraction osteogenesis performed by the Ilizarov method. Preliminary results in five dogs. **Invest Radiol.** 1994 Oct;29(10):933-9.
63. Hamdy RC et al. Correlation between ultrasound imaging and mechanical and physical properties of lengthened bone: an experimental study in a canine model. **J Pediatr Orthop.** 1995 Mar-Apr;15(2):206-11.
64. Thurmüller P. Use of ultrasound to assess healing of a mandibular distraction wound. **J Oral Maxillofac Surg.** 2002 Sep;60(9):1038-44.
65. Windhagen H et al. Quantitative assessment of in vivo bone regeneration consolidation in distraction osteogenesis. **J Orthop Res.** 2000 Nov;18(6):912-9.
66. Rachmiel A et al. Midface membranous bone lengthening: a one-year histological and morphological follow-up of distraction osteogenesis. **Calcif Tissue Int.** 1998 Apr;62(4):370-6.
67. Welch RD et al. Hystomorphometry of distraction osteogenesis in a caprine tibial lengthening model. **J Bone Miner Res.** 1998 Jan;13(1):1-9.
68. Young JW et al. Radiologic assessment of bones after Ilizarov procedures. **Radiology.** 1990 Oct;177(1):89-93.

69. Bontrager KL. **Tratado de técnica radiológica e base anatômica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2003. 814 p.
70. Quessada GAT et al. Entendendo a tomografia computadorizada (TC). **Revista Odonto Ciência**. 2001 16(34):275-82.
71. Aguinaga HF et al. Tomografía axial computarizada y resonancia magnética para la elaboración de un atlas de anatomía segmentaria a partir de criosecciones axiales del perro. **Rev Col Cienc Péc**. 2006 19(4):451-9.
72. Freitas A, Rosa JE, Souza IF. **Radiologia odontológica**. 3. ed. São Paulo: Artes Médicas, 1998. 610 p.
73. O que é radiologia digital? Disponível em: <www.tecnologiaradiologica.com/digital.htm> Acesso em: 20 jul. 2009.
74. Disponível em:
<<http://caad.arch.ethz.ch/teaching/nds/ws98/computing/cad/imgs/voxel.gif>>. Acesso em: 20 jul. 2009.
75. Disponível em: <<http://www.inf.ufsc.br/~awangenh/InfoMed/2005/Image60.gif>>. Acesso em: 20 jul. 2009
- 76 Norton MR, Gamble C. Bone classification: an objective scale of bone density using the computerized tomography scan. **Clin Oral Implants Res**. 2001 Feb;12(1):79-84.
77. Shahlai M et al. Bone density assessments of dental implant sites: 1. Quantitative computed tomography. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 2003 Mar-Apr;18(2):224-31.
78. Turkyilmaz I, Tözüm TF, Tumer C. Bone density assessments of oral implant sites using computerized tomography. **J Oral Rehabil**. 2007 Apr;34(4):267-72.
79. Park HS et al. Density of the alveolar and basal bones of the maxilla and the mandible. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**. 2008 Jan;133(1):30-7.
80. Turkyilmaz I et al. Determination of bone quality of 372 implant recipient sites using hounsfield unit from computerized tomography: a clinical study. **Clin Implant Dent Relat Res**. 2008 Dec;10(4):238-44. Epub 2008 Apr 1.

81. Chun YS, Lim WH. Bone density at interradicular sites: implications for orthodontic mini-implant placement. **Orthod Craniofac Res.** 2009 Feb;12(1):25-32.
82. Ronan CA. **História ilustrada da ciência – Vários volumes**, Brasil: Círculo do Livro, 1987.
83. Callister WD. **Materials science and engineering: an introduction**. 4. ed. New York (NY): John Wiley & Sons, 1997. 852 p.
84. Cheng YT, Cheng CM. what is indentation hardness? **Surface and Coatings Technology.** 2000 Nov;(133-134):417-24.
85. Jiang WG, Su JJ, Feng XQ. Effect of surface roughness on nanoindentation test of thin films. **Engineering Fracture Mechanics** 2008 Nov;75(17):4965–72.
86. Pharr GM. Measurement of mechanical properties by ultra-low load indentation. **Mater Sci Eng.** 1998 A253:151–9.
87. Chang NK et al. Size effect of indenter on determining modulus of nanowires using nanoindentation technique. **Thin Solid Films.** 2009 (517):3695–97.
88. Shackelford JF. **Introduction to material science for engineers**. 4. ed. USA: Prentice Hall, 1996. 670 p.
89. Chicot D et al. Elastic properties determination from indentation tests. **Surface and Coatings Technology.** 1996 81(2-3):269-74.
90. Wang XJ et al. Elastic modulus and hardness of cortical and trabecular bovine bone measured by nanoindentation. **Trans Nonferrous Met Soc China.** 2006 16:744-48.
91. Oliver WC, Pharr GM. An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. **Journal of Materials Research Society.** 1992 7(6):1564-83.
92. Zysset PK et al. Elastic modulus and hardness of cortical and trabecular bone lamellae measured by nanoindentation in the human femur. **J Biomech.** 1999 Oct;32(10):1005-12.

93. Fan ZF et al. Nanoindentation as a means for distinguishing clinical type of osteogenesis imperfecta. **Compos Part B**. 2007 38(3):411–5.
94. Sun LW et al. Evaluation of the mechanical properties of rat bone under simulated microgravity using nanoindentation. **Acta Biomaterialia**. Article in press.
Please cite this article in press as: Sun L-w et al., Evaluation of the mechanical properties of rat bone under simulated microgravity using nanoindentation, Acta Biomater (2009), doi:10.1016/j.actbio.2009.04.042
95. Rho JY, Tsui TY, Pharr GM. Elastic properties of human cortical and trabecular lamellar bone measured by nanoindentation. **Biomaterials**. 1997 Oct;18(20):1325-30.
96. Turner CH et al. The elastic properties of trabecular and cortical bone tissues are similar: results from two microscopic measurement techniques. **J Biomech**. 1999 Apr;32(4):437-41.
97. Hoffler CE et al. Heterogeneity of bone lamellar-level elastic moduli. **Bone** 2000 Jun;26(6):603-9.
98. Radhakrishnan P, Mao JJ. Nanomechanical properties of facial sutures and sutural mineralization front. **J Dent Res**. 2004 Jun;83(6):470-5.
99. Grau N et al. Nanostructural and nanomechanical properties of synostosed postnatal human cranial sutures. **J Craniofac Surg**. 2006 Jan;17(1):91-8; discussion 98-9.
100. Leong PL, Morgan EF. Measurement of fracture callus material properties via nanoindentation. **Acta Biomater**. 2008 Sep;4(5):1569-75. Epub 2008 Mar 19.
101. Seong WJ, et al. Correlations between physical properties of jawbone and dental implant initial stability. **J Prosthet Dent**. 2009 May;101(5):306-18.
102. Yazawa M et al. Expression of bone morphogenetic proteins during mandibular distraction osteogenesis in rabbits. **J Oral Maxillofac Surg**. 2003 May;61(5):587-92.
103. Fleiss, JL. The design and analysis of clinical experiments. New York: John Wiley, 1986
104. Al-Sebaei MO, Gagari E, Papageorge M. Mandibular distraction osteogenesis: a rabbit model using a novel experimental design. **J Oral Maxillofac Surg**. 2005 May;63(5):664-72.

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação da Pesquisa pelo CEP/PUCRS



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP - PUCRS



Ofício 1393/06-CEP

Porto Alegre, 01 de dezembro de 2006.

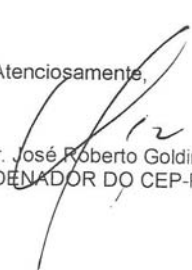
Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS
apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 05/02791, intitulado:
**“Avaliação dos efeitos de lasers terapêuticos na distração osteogênica pela
detecção da expressão de proteínas osteogênicas”.**

Sua investigação está autorizada a partir da
presente data.

Relatórios parciais e final da pesquisa devem ser
enviados a este CEP.

Atenciosamente,


Prof. Dr. José Roberto Goldim
COORDENADOR DO CEP-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)
Profa Dra Marília Gerhardt de Oliveira
N/Universidade

ANEXO B – Aprovação da Pesquisa pela Comissão de Ética em Experimentação da
Universidade Federal de Pelotas/RS



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
BIOTÉRIO CENTRAL**

COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO

Protocolo CEEA n°

Parecer n° 03/07

Pesquisador: Profª. Drª. Marília Gerhardt de Oliveira

Título: Avaliação dos efeitos de lasers terapêuticos na distração osteogênica pela detecção da expressão de proteínas osteogênicas.

Entrada: 10 de maio de 2007

Reunião: 27/07/2007

Situação do Projeto:

Considerações e Parecer: Após analisado o Projeto em tela e baseado no parecer da PUC/RS, que apreciou e aprovou, sob protocolo de pesquisa, registro n° 05/02791.


Referendamos o parecer supra citado.

Relator: Prof. Milton Oliveira Amado.


Campus Universitário – Capão do Leão Instituto de Biologia Prédio n° 20 Biotério Central Fone Fax:
32757341 E-mail: milton.amado@ufpel.edu.br CEP n° 96.010-900 Pelotas RS ceea@ufpel.br

ANEXO C – Calibração do Laser pelo Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Física - PUCRS

1/3



LABORATÓRIO DE IRRADIAÇÃO E RADIOMETRIA
GRUPO DE FÍSICA DAS RADIAÇÕES – GFR
NÚCLEO DE PESQUISA EM INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO COM A MATÉRIA
CENTRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM FÍSICA - PUCRS


Relatório Espectrorradiométrico
Nº 0006IEI/05 - GFR

Data 13/09/05

MEDIDA DE IRRADIÂNCIA ESPECTRAL E IRRADIÂNCIA

1. REQUERENTE

Razão Social/Nome: Faculdade de Odontologia da PUCRS – Marília Gerhardt de Oliveira
Endereço: Av. Ipiranga, 6681 – Prédio 6
Cep: 90619-900
Cidade: Porto Alegre – RS
Telefone: 3320-3538

2. DESCRIÇÃO DOS ITENS ENSAIADOS ^[1]

A tabela 2.1 identifica as duas fontes lasers ensaiadas do seguinte equipamento:

- **Marca:** DMC.
- **Modelo:** Thera Laser.
- **Tensão:** 127 V.
- **Número de série:** TLSR0391.

2.1 Tabela de Identificação:

Código	Tipo	Potência	Obs.
0006IEI/05 – 01	Fonte Laser Vis	35 mW	---
0006IEI/05 – 02	Fonte Laser IR	100 mW	---

[1] Informações fornecidas pelo requerente.

3. INSTRUMENTO DE MEDIDA

- Espectrorradiômetro: Detecção espectral entre 250-1100 nm em intervalos de 1 nm, com largura de banda não excedendo a 2,5 nm.
- Certificado de Calibração nº 506074717 de 07/06/05.

4. MÉTODO DE MEDIDA

Método realizado de acordo com o Procedimento Técnico Interno de Medida de Irradiância Espectral Difusa.

- Distância fonte - detector: (2,5 ± 0,1) cm.
- Intervalos de medida: 400 - 800 nm e 750 - 1100 nm.

Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 96A / 104
CEP 90619-900 - Porto Alegre - RS - Brasil
Home-page: www.pucrs.br/gfr E-mail: gfr@pucrs.br

gfr

Fone: (51) 3320-3682
Fax: (51) 3320-3616
CNFJ 88630413/0002-81



Relatório Espectrorradiométrico N° 0006IEI/05 - GFR

Continuação

Data 13/09/05

5. RESULTADO DAS MEDIDAS ^[2]

Tabela com Valores da Irradiância Difusa e Espectros das fontes identificadas pelo código da Tabela 2.1.

5.1 Tabela de Irradiância Difusa e Comprimento de Onda:

Código	Comprimento de Onda	Irradiância Difusa
0006IEI/05 – 01	683 nm	2,87 Wm ⁻²
0006IEI/05 – 02	829 nm	13,22 Wm ⁻²

5.2 Anexo I: Espectros da Irradiância Espectral Difusa x Comprimento de Onda, para as fontes de radiação identificada pelo código da Tabela 2.1.

[2] Observações:

- Incerteza das medidas: 251-400 nm : ± 4.0 %; 400-900nm: ± 3.3 %; 900-1000: ± 5.1%; 1000-1100: ± 8.0%.
- Para as medidas de irradiância de barreiras (filtros, óculos, tecidos, entre outros) será acrescida ao código da fonte empregada a seguinte identificação: letra A para a primeira barreira, letra B para segunda e assim, sucessivamente.
- Esse relatório espectrorradiométrico é válido exclusivamente para as amostras identificadas na Tabela 2.1, não sendo extensivo a quaisquer lotes, mesmo que similares.
- O relatório espectrorradiométrico não deve ser reproduzido sem prévia autorização.

Esclarecimento:

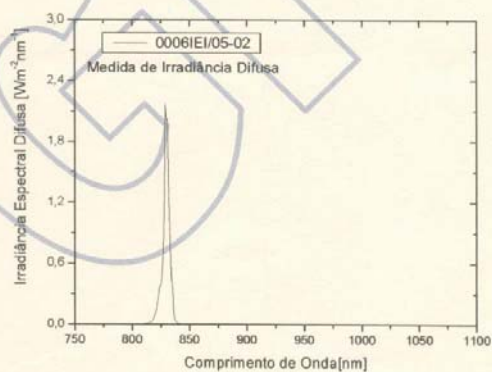
O presente Relatório Espectrorradiométrico n° 0006IEI/05 – GFR está inserido na rede de convênio-cooperação desse Laboratório com o solicitante desse serviço. Como consequência toda divulgação dessas medidas deverá ser acompanhada com a descrição: "Resultados concedidos pelo Grupo de Física das Radiações (GFR-PUCRS)".

Porto Alegre, 13 de setembro de 2005.

Dra. M. R. Rizzatti
Coordenadora do GFR-PUCRS



ANEXO I (3/3)



APÊNDICE

APÊNDICE A – Publicação da Equipe: *Lasers Med Sci*, 2009

Lasers Med Sci
DOI 10.1007/s10103-009-0691-2

ORIGINAL ARTICLE

Effects of low-level laser therapy on bone formed after distraction osteogenesis

Roberto Hübler · Eduardo Blando · Léonilson Gaião · Paulo Eduardo Kreisner · Leticia Kirst Post · Cristina Braga Xavier · Marília Gerhardt de Oliveira

Received: 6 January 2009 / Accepted: 22 May 2009
© Springer-Verlag London Limited 2009

Abstract This study evaluated the effect of low-level laser therapy (LLLT) on the chemical composition, crystallinity and crystalline structure of bone at the site of distraction osteogenesis. Five rabbits were subjected to distraction osteogenesis (latency = 3 days; rate and frequency = 0.7 mm/day for 7 days; consolidation = 10 days), and three were given LLLT with arsenide–gallium–aluminum (AsGaAl; 830 nm, 40 mW): 10 J/cm² dose per spot, applied directly to the distraction osteogenesis site during the consolidation stage at 48 h intervals. Samples were harvested at the end of the consolidation stage. X-ray fluorescence and X-ray diffraction were used to analyze chemical composition, crystallinity and crystalline structure of bone at the distraction osteogenesis site. The analysis of chemical composition and calcium (Ca) and phosphorus (P) ratios revealed greater mineralization in the LLLT group. Diffractograms showed that the crystalline structure of the samples was similar to that of hydroxyapatites. Crystallinity percentages were greater in rabbits that were given LLLT. Crystallinity (41.14% to 54.57%) and the chemical composition of the bone at the distraction osteogenesis site were

similar to the that of the control group (42.37% to 49.29%). The results showed that LLLT had a positive effect on the biomodulation of newly formed bone.

Keywords Osteogenesis · Distraction · Lasers · X-ray diffraction

Introduction

In the past two decades distraction osteogenesis has become an effective therapeutic alternative to the use of bone grafts in the treatment of several congenital or acquired dentofacial deformities. Distraction osteogenesis consists of the use of distraction devices implanted in adjacent and independent bone sites to promote their separation and the consequent osteogenesis between them. After the time necessary for separation and defect repair, the distraction device is held in place but is no longer activated. It should be removed only after the interposed osteoid tissue has mineralized. Because of the time required for bone maturation and for removal of the distractor, distraction osteogenesis may generate discomfort, which has led some authors to study solutions to accelerate new bone formation [1–7].

Distraction osteogenesis involves metabolic activities that can be modulated by physical and chemical agents. Therefore, the use of low-level laser therapy (LLLT) may reduce total treatment time and provide more comfort to patients. The use of LLLT has been proven to be beneficial to soft tissue and bone repair [8–13].

Bone may be evaluated by several types of tests that differ in their accuracy and complexity. These tests should determine the quantitative and qualitative differences in bone tissue between study groups. The analysis of how operator-independent the test is may also be relevant,

R. Hübler · E. Blando
School of Physics,
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS),
Av. Ipiranga, 6681, Prédio 10, sala 222, Caixa Postal 1429,
90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil

L. Gaião · P. E. Kreisner · M. G. de Oliveira (✉)
School of Dentistry,
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS),
Porto Alegre, RS, Brazil
e-mail: mogethardt@yahoo.com.br

L. K. Post · C. B. Xavier
School of Dentistry, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL),
Pelotas, RS, Brazil

Published online: 23 June 2009

 Springer

because of the influence that operators may have on their object of study.

Histological analysis after hematoxylin–eosin (HE) staining is widely used to evaluate bone changes. Other stains are also used with the same purpose, and their performance and analysis are similar. Although relatively easy to perform, they have the disadvantage of being operator-dependent, which requires us to use a greater number of animals or specimens to obtain a statistical sample with a good level of significance.

X-ray fluorescence (XRF) and X-ray diffraction (XRD) are physical analyses requiring high-technology equipment that can be used for the study of bone and to generate data about its mineral characteristics, such as type of crystals (crystalline structure), the perfection of those crystals (crystallinity), and their mineral content (amount of calcium, phosphorus, and other elements). In these tests, which are operator-independent, the so-called counting statistics indicate that the measurement of each point has the accuracy of 1 to 100 parts per million (ppm), which rules out some biases associated with data collection [14].

These mineral characteristics of bone at the distraction osteogenesis site have not been documented in the literature. As distraction osteogenesis promotes bone formation from the initial stages to maturity, the mineral characteristics of bone may change. Therefore, physical analyses may be useful in the identification of possible changes and in the development of innovative and accurate procedures for the analysis of changes in bone metabolism. This study evaluated the action of LLLT on the crystalline structure, chemical composition and crystallinity of bone at the distraction osteogenesis site.

Materials and methods

All experimental procedures were approved by the Ethics Research Committee of Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Brazil. Five adult male New Zealand rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) were used, but the data from one was excluded from analysis because of early union of fracture fragments. Rabbit 1 was subjected to distraction osteogenesis and LLLT; rabbit 2, distraction osteogenesis, but no LLLT; rabbit 3, no distraction osteogenesis, but LLLT; and rabbit 4, neither distraction osteogenesis nor LLLT.

The animals that underwent distraction osteogenesis (rabbits 1 and 2) were anesthetized with 2% xylazine hydrochloride 1 mg/kg (Anacedan®) and zolazepam hydrochloride plus tiletamine hydrochloride at 3 mg/kg (Zoletil®). The right submandibular area was shaved and cleaned with 4% chlorhexidine. Sterile fields were used to isolate the operation area. Antibiotic prophylaxis consisted of 50 mg enrofloxacin administered 1 h before the procedure and for the next 3 days.

After 0.9 ml lidocaine and 2% epinephrine had been infiltrated, a 3 cm incision was made on the skin of the lower border of the right hemi-mandible. Careful subperiosteal dissection was performed and the mandible was exposed. A corticotomy was performed using drills and osteotomes, and the lower alveolar nerve was preserved. The distractor (PROMM®, Porto Alegre, Brazil) was fixed to the mandible with four 1.5 mm × 5 mm screws at a plane perpendicular to the corticotomy. The wound was irrigated with saline solution and sutured in layers. Distraction osteogenesis followed a latency stage of 3 days, one daily 0.7 mm distractor activation for 7 days, and a consolidation time of 10 days.

Rabbits 1 and 3 were given LLLT at 10 J/cm² per spot every 48 h during consolidation, at a total dose of 50 J/cm². LLLT was applied with 830 nm and 40 mW gallium-aluminum-arsenide diodes. At the end of the consolidation stage, the animals were killed in a carbon dioxide chamber, according to the recommendations of the Brazilian Council for Animal Experimentation.

Physical examinations were conducted at the Laboratory of Materials and Nanosciences [Laboratório de Materiais e Nanociências (LMN)] of the School of Physics, Center of Research and Development in Physics, Technological Center, PUCRS.

X-ray fluorescence spectroscopy

Samples were prepared for XRF in three stages:

- (a) The four rabbit hemi-mandibles were dissected, removed and stored in 2% glutaraldehyde
- (b) Immediately after that, the specimens were embedded in acrylic resin for sanding and polishing
- (c) For manual polishing, sequential grits (180 to 4,000) of sandpaper were used; the sandpaper was fixed to a glass block and was used under irrigation with running water

The purpose of this preparation was to obtain a polished surface at the distraction osteogenesis site and adjacent areas for the direct incidence of X-rays in the spectrometer.

The acrylic resin blocks containing the distraction osteogenesis site were placed directly in the spectrometer (XRF-1800, sequential X-ray spectrometer, Shimadzu) for the analysis of calcium (Ca) and phosphorus (P). The samples were measured using rhodium K α (Rh, X-ray source) at 40 kV and 95 mA. To measure the Ca and P, we used lithium fluoride (LiF) and germanium (Ge) diffraction crystals, which specifically detect the fluorescence of each of these elements (Ca and P). Procedures were performed in vacuum at a pressure of 25 Pa, scanning speed of 8°/min, in steps of 0.1°, and 0.75 s per step.

Measurements were made at different points along the distraction osteogenesis vector using a millimeter grid

(template) and along the axis of distraction in the mandibles, starting at the point most proximal to the border of the produced fracture (P1) and extending to the most medial point in the newly formed bone at the osteogenesis distraction site (P3–P5). The purpose of multiple measurements was to evaluate the fluctuation of Ca and P content at the distraction osteogenesis site. Several stages of bone maturity were expected, because of the characteristic gradual stretching of the distraction osteogenesis technique. Only three to five points were measured at the distraction osteogenesis site because small bone irregularities (medullary spaces), found even after polishing, severely distorted the results. Therefore, when differences between results were too large, the point where the measurement was made was examined under the microscope, and, if it was located in a topographically irregular area, those values were immediately discarded.

The values obtained for Ca and P at each point were used to calculate Ca-to-P ratios, which were analyzed statistically and organized in tables.

X-ray diffraction spectroscopy

After XRF data had been obtained, the specimens were cut transversally in a microtome, and the anterior and middle portions of the distraction osteogenesis site were separated. A slice of newly formed bone containing cortical and medullary portions was ground to a powder with a ceramic mortar and pestle. For XRD analysis, the material (powder) should be pressed in specific equipment devices. However, because of the very small amount of material obtained, it was necessary to produce glass plate wells that measured 6 mm in diameter and 1 mm deep. As glass plates do not have X-ray diffraction peaks, the material obtained from each specimen was placed in the well and pressed satisfactorily there.

Each glass plate containing powder was analyzed by the X-ray diffractometer (XRD Maxima 7000, Shimadzu). Samples were measured using copper (Cu) α ($\lambda=1.5406 \text{ \AA}$) at 40 kV, and 30 mA. Bragg–Brentano geometry (θ – 2θ) was used for measurements, at 30–45° scanning, 2°/min speed, 0.02° steps, and 6 s per step. Angle scanning covered only the region between 30° and 45° because this is the only region where hydroxyapatite (HA) diffraction peaks are found. Total measurement time for each sample was 4,500 s, which generated excellent statistical data.

A diffractogram was obtained for each sample; peaks, ratio of signal amplitude, and noise were identified and compared with those of known hydroxyapatites. Similarities were sought using the equipment software.

The Shimadzu software uses Lorenz adjustment for the measurement of sample crystallinity. Crystallinity is calculated according to the American Society for Testing and

Materials (ASTM) D5357 and D5758 norms, which are used for XRD calculations of the crystallinity of zeolites, a large group of minerals with a porous structure.

At an initial stage of the process of new bone formation, after the reabsorption of tissues, the organism has to supply the region with:

- (a) the necessary amounts of minerals to form inorganic tissue (Ca-to-P ratio)
- (b) cell organization, to differentiate tissues (mineral deposition)
- (c) specialization of tissues, to support expected loads (crystallinity)

The more advanced the process of bone maturation, the greater the degree of bone organization, and, therefore, the greater its crystallinity. Therefore, based on these assumptions, crystallinity indicates the degree of bone maturity.

Results

X-ray fluorescence spectroscopy

The presence of calcium and phosphorus in the samples was determined according to their characteristic X-ray emission peaks (k_{α} and k_{β}) detected by the spectrometer. Figure 1a shows newly formed bone in distraction osteogenesis sites, and Fig. 1b shows areas of newly formed bone in pixels squared to the total area of distraction osteogenesis obtained in the HE analyses. Figure 2 shows Ca-to-P ratios according to X-ray fluorescence measurements for each rabbit (Table 1).

Figure 2 clearly shows that the Ca-to-P ratios were almost constant in the rabbits that had not been subjected to distraction osteogenesis (rabbits 3 and 4) and are within the usual statistical variation at a Ca-to-P ratio of 0.82, as found in bone biology studies in the literature. In the mandibles of rabbits that underwent distraction osteogenesis, however, the action of LLLT is clear. Rabbit 2, which was not given LLLT, showed great fluctuation of the composition of bone matrix and evidence of a still immature phase of osteogenesis. With the use of LLLT (rabbit 1), there was greater homogeneity, and the mineral composition of newly formed bone after distraction osteogenesis was variable and changed from the area of greatest bone maturation (P1) to the area of most recently formed bone (P3), even inverting the Ca-to-P ratio.

X-ray diffraction spectroscopy

The diffractograms of all bone samples showed a similar diffraction pattern, as shown in Fig. 3. The (002), (211), (112) and (300) hydroxyapatite diffraction peaks were

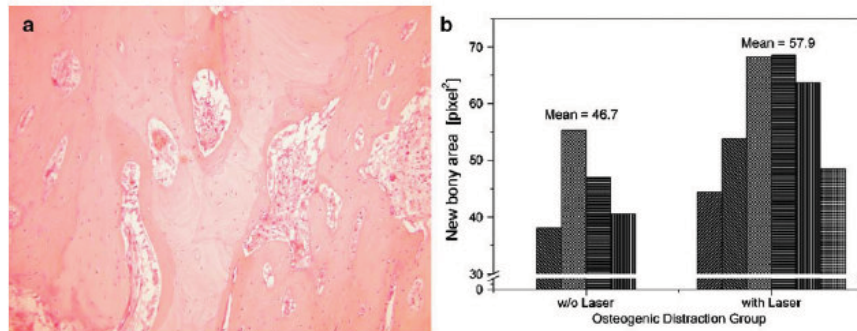


Fig. 1 a Histological analysis of newly formed bone in distraction osteogenesis site of a rabbit that was given LLLT (study group). HE, $\times 100$. b Area of newly formed bone in pixels squared to total area obtained after distraction osteogenesis according to HE analyses (w/o without)

detected at the 2θ angles of 25.9° , 31.8° , 32.1° and 32.9° . Those peaks were found in all samples and quantified the bone crystallinity, as described in the Methods section. Figure 4 shows the crystallinity values for all samples.

Discussion

Few studies in the literature have investigated distraction osteogenesis by XRD and XRF to evaluate the quality of newly formed bone. The results of X-ray fluorescence spectroscopy in this study suggested a trend towards greater mineralization in the groups that were given LLLT. The Ca-to-P ratios of all samples were lower than expected for known pure hydroxyapatite, but they were similar to those expected for bone [15], which demonstrated, therefore, that newly formed bone was detected according to its mineral and organic portions.

The comparison of Ca-to-P ratios in rabbits 1 and 3, both in the LLLT group, suggested that LLLT affected the initial

stages of osteogenesis, which is consistent with findings reported in the literature [16, 17].

Ca and P are the basic components of hydroxyapatite and are found in bone in the form of small crystals that may contain impurities, such as carbonates and magnesium. Such imperfections make bone hydroxyapatite more soluble and promote the ion exchanges that are necessary for homeostasis. The mineral portion of bone contains 96% of the calcium and 85% of the phosphorus found in the human body. The ratios between these elements determine the mechanical properties of bone and are evidence of its organization and maturity [18, 19].

The presence of (002), (211), (112) and (300) diffraction peaks (Fig. 3) in all diffractograms showed that the samples analyzed were hydroxyapatite. Noise is common in bone measurement and may be assigned to the small amount of material available for analysis, which precludes the preparation of a powder with minimally homogeneous granulation. The use of larger animals, such as sheep or pigs, may be a solution for such limitation. This problem may be overcome

Fig. 2 Ca-to-P ratios calculated by X-ray fluorescence measurements for each rabbit, as shown in Table 1

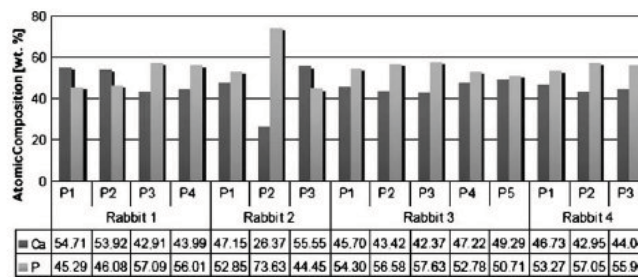


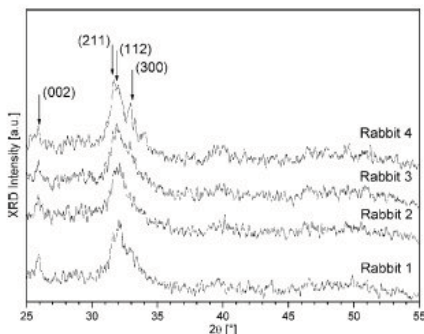
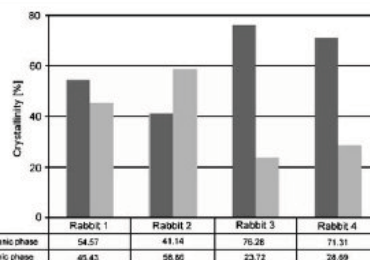
Table 1 Mean Ca-to-P ratios according to rabbit ($n=4$) (SD standard deviation)

Rabbit no.	Mean	SD	Minimum	Maximum
Rabbit 1	0.98	0.24	0.75	1.21
Rabbit 2	0.83	0.44	0.36	1.25
Rabbit 3	0.84	0.09	0.74	0.97
Rabbit 4	0.81	0.06	0.75	0.88

by using mathematical calculations for adjustments, such as the Lorentz calculations, similar to those used for crystallinity. The shape of an XRD peak indicates the crystallinity at a specific diffraction plane: the narrower the peak, the more crystalline the sample.

The crystallinity percentages accurately indicated a biomodulatory effect of LLLT. The comparison of bone with the increase in the crystallinity percentage in rabbits with and without distraction osteogenesis showed that bone crystals were superior in size, order and perfection. The results showed that the percentage of crystallinity of the samples from the rabbits that had been subjected to distraction osteogenesis and had received LLLT was close to that of rabbits that had not undergone distraction osteogenesis, which points to faster bone regeneration with the use of LLLT.

Physical analyses, as previously described, were easily performed and did not require any special sample preparation, such as that required for acid attack for demineralization, precise sectioning for slice preparation, or readings that may be operator dependent. Therefore, the use of crystallinity to measure the level of bone maturity is a rapid and accurate measurement that provides a quantitative value of the variable of interest.

**Fig. 3** X-ray diffractograms for all samples studied (a.u. arbitrary units)**Fig. 4** Crystallinity of newly formed, distracted, portion of bone of all samples

Similar crystallinity values were found for rabbits 3 and 4, which had not been subjected to distraction osteogenesis. This finding suggested that the action of LLLT on normal, mature, bone is not significant. The bone of the rabbit that had undergone distraction osteogenesis and had received LLLT was expected to progress faster to crystallinity, as in the rabbit that had not undergone distraction osteogenesis at later bone consolidation times.

Miller et al. [20] found an inverse association between the number of phosphate ions (PO_4^{3-}) and crystallinity. The XRF finding that P content (presence of PO_4^{3-}) was lower in irradiated rabbits may indicate a more mature bone, which is in agreement with the superior crystallinity found in these animals and the irradiated group analyzed by means of percentage of new bone formation. No other studies using XRD analysis of bone samples were found in the literature.

Other studies used XRD to describe the following materials: Zyman et al. [21], ceramic calcium phosphate implants; Hayakawa et al. [22], hydroxyapatite on the surface of titanium implants coated with calcium phosphate; Lobato et al. [23], α - and β -tricalcium phosphate implants; Zhou et al. [24], titanium implant surfaces. However, those studies used the XRD technique only to describe characteristics of commercial materials, differently from what our study focused on: the use of an accurate test for quantitative and qualitative analyses of bone without the influence of operator subjectivity on the results.

Increased crystallinity of the samples in this study, as well as the histological analysis after HE staining, indicated a better quality of newly formed bone. These findings suggest that more mature bone may also have greater mineral organization, which is described by the XRD crystallinity results. The agreement between results of histological analysis after HE staining and crystallinity suggest the possibility of the use of XRD to measure bone quality.

Diversified analysis techniques for the same animal samples were used to maximize the results of studies using animals, and they were in agreement with the current influence of ethics concerns on research committees. Our use of animals that were subjected to distraction osteogenesis without LLLT as control groups was justified by the systemic effect assigned to the independent variable used in this study. Miloro et al. [25] did not take this effect into consideration when comparing the effect of LLLT applied to one side of the animals that underwent bilateral mandibular distraction osteogenesis. The other side was used as a control, but that would limit the inference of the results, even if positive effects of LLLT were found.

Physical analysis does not pose the risk of examiner influence on results, but their interpretation demands knowledge and experience in the use of specific techniques.

The evaluation of fluorescence spectra brings accurate information about the proportion of Ca-to-P in bone and indicates whether the environment is adequate for the formation of quality bone. The evaluation of X-ray diffractograms indicates whether the phases formed are the ones that correspond to hydroxyapatite, and crystallinity shows the maturation stage of newly formed bone.

The results of this study showed that LLLT had a positive effect on the percentage of newly formed bone, on the chemical composition according to the Ca-to-P ratios, and on the crystallinity and crystalline structure according to the detection of hydroxyapatite phases in the distraction osteogenesis sites.

Acknowledgments We thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil, for financial support for this study. We also thank Dr. Adriana Etges from Universidade Federal de Pelotas, Brazil.

References

- Shimazaki A, Inui K, Azuma Y, Nishimura N, Yamano Y (2000) Low-intensity pulsed ultrasound accelerates bone maturation in distraction osteogenesis in rabbits. *J Bone Joint Surg Br* 82:1077–1082. doi:10.1302/0301-620X.82B7.9948
- Hagiwara T, Bell WH (2000) Effect of electrical stimulation on mandibular distraction osteogenesis. *J Craniomaxillofac Surg* 28:12–19. doi:10.1054/jcms.1999.0104
- al Ruhaimi KA (2001) Effect of calcium sulphate on the rate of osteogenesis in distract bone. *Int J Oral Maxillofac Surg* 30:228–233. doi:10.1054/ijom.2001.0048
- Hamdy RC, Amako M, Beckman L, et al (2003) Effects of osteogenic protein-1 on distraction osteogenesis in rabbits. *Bone* 33:248–255. doi:10.1016/S8756-3282(03)00154-6
- El-Hakimi IE, Azim AM, El-Hassan MF, Maree SM (2004) Preliminary investigation into the effects of electrical stimulation on mandibular distraction osteogenesis in goats. *Int J Oral Maxillofac Surg* 33:42–47. doi:10.1054/ijom.2003.0445
- Swennen GR, Schutyser F, Mueller MC, Kramer FJ, Eulzer C, Schliephake H (2005) Effect of platelet-rich-plasma on cranial distraction osteogenesis in sheep: preliminary clinical and radiographic results. *Int J Oral Maxillofac Surg* 34:294–304. doi:10.1016/j.ijom.2004.09.001
- Pampu AA, Dolanmaz D, Tüz HH, Avırdük MC, Kışınçı RS (2008) Histomorphometric evaluation of the effects of zoladronic acid on mandibular distraction osteogenesis in rabbits. *J Oral Maxillofac Surg* 66:905–910. doi:10.1016/j.joms.2007.12.004
- Kawasaki K, Shimizu N (2000) Effects of low-energy Laser irradiation on bone remodeling during experimental tooth movement in rats. *Lasers Surg Med* 26:282–291. doi:10.1002/(SICI)1096-9101(2000)26:3<282::AID-LSM6>3.0.CO;2-X
- Silva Júnior AN, Pinheiro AL, Oliveira MG, Weismann R, Ramalho LM, Nicolau RA (2002) Computerized morphometric assessment of the effect of low-level laser therapy on bone repair: an experimental animal study. *J Clin Laser Med Surg* 20:83–87. doi:10.1089/104454702753768061
- Weber JB, Pinheiro AL, de Oliveira MG, Oliveira FA, Ramalho LM (2006) Laser therapy improves healing of bone defects submitted to autologous bone graft. *Photomed Laser Surg* 24:38–44. doi:10.1089/pho.2006.24.38
- Cerqueira A, Silveira RL, Oliveira MG, Sant'ana Filho M, Heitz C (2007) Bone tissue microscopic findings related to the use of diode laser (830 nm) in ovine mandible submitted to distraction osteogenesis. *Acta Cir Bras* 22:92–97. doi:10.1590/S0102-86502007000200003
- Blaya DS, Guimarães MB, Pozza DH, Weber JB, de Oliveira MG (2008) Histologic study of the effect of laser therapy on bone repair. *J Contemp Dent Pract* 9:41–48
- Seifi M, Maghzi A, Gutknecht N, Mir M, Asna-Ashari M (2009) The effect of 904 nm low level laser on condylar growth in rats. *Lasers Med Sci*. Epub ahead of print
- Brundie CR, Evans CA, Wilson S (1992) Encyclopedia of materials characterization. Butterworth-Heinemann, Boston Greenwich
- Krawczyk A, Kuroplka P, Kuryczko J, Wall A, Dragan S, Kulej M (2007) Experimental studies on the effect of osteotomy technique on the bone regeneration in distraction osteogenesis. *Bone* 40:781–791. doi:10.1016/j.bone.2006.10.002
- Saito S, Shimizu N (1997) Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 111:525–532. doi:10.1016/S0889-5406(97)70152-5
- Seifi M, Shafiei HA, Daneshdoost S, Mir M (2007) Effects of two types of low-level laser wave lengths (850 and 630 nm) on the orthodontic tooth movements in rabbits. *Lasers Med Sci* 22:261–264. doi:10.1007/s10103-007-0447-9
- Bohic S, Heymann D, Použat JA, Gauthier O, Dacuki G (1998) Transmission FT-IR microspectroscopy of mineral phases in calcified tissues. *Comptes Rendus Acad Sci Ser III* 321:865–876. doi:10.1016/S0764-4469(99)80027-4
- Shea JE, Miller SC (2005) Skeletal function and structure: implications for tissue-targeted therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 57:945–957. doi:10.1016/j.addr.2004.12.017
- Miller LM, Vairavamurthy V, Chance MR, et al (2001) In situ analysis of mineral content and crystallinity in bone using infrared micro-spectroscopy of the ν_4 PO_4^{3-} vibration. *Biochim Biophys Acta* 1527:11–19
- Zyman Z, Ivanov I, Glushko V, Dedikh N, Malyschkina S (1998) Inorganic phase composition of remineralisation in porous CaP ceramics. *Biomaterials* 19:1269–1273. doi:10.1016/S0142-9612(98)00024-6
- Hayakawa T, Yoshinari M, Kiba H, Yamamoto H, Nemoto K, Jansen JA (2002) Trabecular bone response to surface

- roughened and calcium phosphate (Ca-P) coated titanium implants. *Biomaterials* 23:1025–1031. doi:10.1016/S0142-9612(01)00214-9
23. Lobato JV, Sooraj Hussain N, Botelho CM, Mauricio AC, Afonso A, Ali N, Santos JD (2006) Assessment of Bonelike® graft with a resorbable matrix using an animal model. *Thin Solid Films* 515:362–367. doi:10.1016/j.tsf.2005.12.153
24. Zhou Y, Jiang T, Qian M, Zhang X, Wang J, Shi B (2008) Roles of bone scintigraphy and resonance frequency analysis in evaluating osseointegration of endosseous implant. *Biomaterials* 29:461–474. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.10.021
25. Miloro M, Miller JJ, Stoner JA (2007) Low-level laser effect on mandibular distraction osteogenesis. *J Oral Maxillofac Surg* 65:168–176. doi:10.1016/j.joms.2006.10.002