

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

"Avaliação do efeito do plasma rico em plaquetas fotoestimulado pelo laser
de baixa potência no processo de regeneração óssea"

Andréa Lílian Candini

Dissertação de Mestrado apresentada no
Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia
como complementação dos créditos necessários
para obtenção do título de Mestre.

São José dos Campos, SP.
2001

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

"Avaliação do efeito do plasma rico em plaquetas fotobioestimulado pelo laser de baixa potência no processo de regeneração óssea"

Andréa Lílian Candini

Dissertação de Mestrado apresentada no
Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia
como complementação dos créditos necessários
para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Álvaro Brandão
Lopes Martins

São José dos Campos, SP.
2001

539.12.04 Candini, Andréa
C 223 a Avaliação do efeito do plasma rico em plaquetas
Fotoestimulado pelo laser de baixa potência no
processo de regeneração óssea.
São José dos Campos: UniVap, 2001.
90p.;il.;31cm

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de
Pesquisa e Desenvolvimento -Universidade do Vale
Do Paraíba, 2002.

Plasma rico em plaquetas; Laser de baixa potência;
Bioengenharia; dissertação de Mestrado;
Martins, Rodrigo, orientador; t.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processo fotocopiadores ou transmissão eletrônica.

Assinatura do aluno:

Data:

"Avaliação do efeito do plasma rico em plaquetas fotoestimulado pelo laser de baixa potência no processo de regeneração óssea"

Andréa Lílian Candini

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Antônio José Balbin Villaverde (Presidente - UniVap)-----

Prof. Dr. Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins (Orientador)-----

Prof. Dra. Lylian Vieira de Paula (PUC-MG)-----

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco
Diretor do IP&D - UniVap
São José dos Campos, 25 de janeiro de 2002.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins pelo incentivo e apoio, colocando à disposição seu laboratório, tornando possível a realização dos experimentos desse trabalho.

Ao Dr. Néilson Hidekazu Tatsuí que se colocou a disposição me auxiliando e ensinando técnicas necessárias.

Ao José Fernando Mendes Salgado, pelo carinho, companheirismo e apoio.

A Rúbia Gravito Carvalho, pela gentileza se disponibilizando desde o início.

Ao Dr. José Lourenço de Castro pelo incentivo, amizade e ensinamentos.

Ao Prof. Carlos Martins (PUC-MG) por colocar-se a disposição sempre que solicitado.

Ao Rubens Miranda, técnico em Laboratório de Histologia (PUC-MG) pelo auxílio na preparação das lâminas histológicas.

A Melissa Ribeiro, monitora do Laboratório de Documentação em Biologia (PUC-MG).

A Simone Aparecida Bertolotti, pelo auxílio prestado durante a realização da cirurgia nos animais.

Ao João Felipe Sardinha Leonardo, pelo auxílio na fase experimental.

A Maria Inês Monteiro, pela amizade inigualável, sempre me incentivando.

A Ana Paula Durães Candini, pelo auxílio na elaboração das ilustrações.

Aos amigos com os quais convivi em São José dos Campos, que tornaram as dificuldades e os obstáculos menos árduos.

A todos os professores, colegas e funcionários do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da UNIVAP, que em algum momento solicitei apoio e orientação.

Aos animais, para que os estudos pudessem ser realizados.

A Universidade do Vale do Paraíba - UNIVAP, pela confiança me proporcionando o ingresso na carreira científica.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Aos meus pais, que me mostraram que a única forma de conhecer é descobrir, e que descobrir é a única forma de ensinar.

A Nathália, pela presença em todos momentos de minha vida.

A DEUS, que tudo isso me permitiu.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais pela confiança e apoio que vem me dando ao longo desses anos, possibilitando-me alcançar meus objetivos.

À minha querida filha, pelas horas de ausência e compreensão.

NOTA

Esta dissertação apresenta-se dentro das normas explicitadas pelo Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba para obtenção do título de Mestre em Ciências do Curso de Pós-Graduação em Bioengenharia.

Para as referências bibliográficas, foram adaptadas e simplificadas as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas, ABNT-NRB 06023/1989.

"Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque ele se tornará, assim, uma máquina utilizável, mas não uma personalidade.

É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que é belo, do que é moralmente correto. A não ser assim, ele assemelhará, com seus conhecimentos profissionais, mais a um cão ensinado do que uma criatura harmoniosa e desenvolvida. Deve aprender a compreender, portanto, as motivações dos homens, suas quimeras e seu lugar exato em relação aos seus próximos e à comunidade."

EINSTEIN

Resumo

A necessidade da reconstrução esquelética no intuito de se reconstituir ossos perdidos ou danificados representa, muitas vezes, um obstáculo à comunidade médica. Diversos estudos têm focado este tema na tentativa de resolver a questão. No entanto, ainda que muitos procedimentos distintos estejam sendo testados para melhorar a cicatrização óssea com índices variáveis de sucesso, poucos alcançaram estágio de aplicação clínica. A proposta deste estudo foi avaliar o processo de regeneração óssea quando da utilização terapêutica do plasma rico em plaquetas (PRP) isolado e/ou associado à terapia com laser de baixa potência (LBP). Um defeito ósseo, padronizado, foi confeccionado na tíbia esquerda de 16 coelhos. Os animais foram divididos em 4 grupos. O grupo I (controle) - não recebeu tratamento. O grupo II - irradiado com laser de baixa potência, grupo III - PRP e grupo IV - PRP e laser. O laser utilizado foi um diodo de As-Ga-Al (DERMOLASER, 660 nm) e a densidade de energia utilizada foi $20\text{J}/\text{cm}^2$ distribuída no trans ($5\text{ J}/\text{cm}^2$) e pós-operatório imediato ($15\text{ J}/\text{cm}^2$ repartida em três pontos distintos na periferia do defeito ósseo) e nos 1º, 3º, 5º, 7º e 9º dias subsequentes ($20\text{ J}/\text{cm}^2$, distribuídos em quatro pontos de $5\text{ J}/\text{cm}^2$). Os animais foram sacrificados no 10º- dia com uma overdose de anestésico. Análise histológica mostrou formação de trabeculado ósseo mais precoce nos grupos II e III, porém mais evidente no último, quando comparado com controle. No grupo IV houve um retardo no processo de regeneração. Esses resultados sugerem que a utilização de tais terapias isoladamente, fornecem uma otimização no processo regenerador, no entanto estudos futuros se fazem necessários para determinar essa hipótese.

Palavras chaves: Coelhos, regeneração óssea, osso, laser de baixa potência, plasma rico em plaquetas.

Abstract

The necessity of the skeleton reconstruction at the aim of restore missed and injured bone tissues often represents an obstacle to medical community. Studies has showed numerous methods attempting to resolve this matter, but still that many different proceedings are being tested in order to improve the bone restoration. The purpose of the present study was to investigate the improvement of the bone regeneration process, when of the therapeutic use of platelet rich plasm (PRP) isolated and /or associated to the therapy with low potency laser. The standardized bone defect, was performed at the left tibia of 16 rabbits. The animals were separated into 4 groups as following - Group I (control); Group II - irradiated with low power laser; Group III – PRP; Group IV – PRP + laser. The laser employed was a semiconductor diode of As-Ga-Al (DERMOLASER, 660 nm) and the density of energy utilized was 20 J/cm^2 divided as following: 5 J/cm^2 during surgery; 15 J/cm^2 , distributed in 3 differents points at the immediate postoperative and at the 1^o-, 3^o-, 5^o-, 7^o- and 9^o-subsequents days (20 J/cm^2 delivered in 4 different points , 5 J/cm^2 each.). The animals were sacrificed at the tenth day with an letal dose of anaesthetic. Hystological analysis showed formation of bone trabecular more early at the groups II and III, however more evident at the last, when compared with control. At the group IV there was a delay at the beginning of the regeneration process. These results suggest that employee of such therapies isolated provide an acceleration at the regeneration process, however further studies are necessary to clarify this hypothesis.

Key Words : rabbits; bone regeneration , bone , low power laser , platelet rich plasm

Sumário

1. Introdução.....	1
2. Revisão.....	4
2.1. Tecido Ósseo.....	5
2.1.1 Introdução.....	6
2.1.2 Componentes.....	6
2.1.3 Formação óssea.....	7
2.1.4 Mineralização.....	8
2.1.5 Modelação e remodelação óssea.....	8
2.1.6 Regeneração óssea.....	9
2.2. Laser.....	11
2.2.1 Introdução.....	12
2.2.2 Princípios físicos do laser.....	13
2.2.2.1 Emissão estimulada.....	14
2.2.2.2 Cavidade ressonante.....	14
2.2.2.3 Meio ativo.....	14
2.2.3 Parâmetros de irradiação.....	15
2.2.4 Laser de baixa potência.....	16
2.2.5 Efeitos terapêuticos.....	22
2.2.5.1 Efeitos antiinflamatórios.....	22
2.2.5.2 Efeitos analgésicos.....	24
2.2.5.3 Efeitos Sistêmicos.....	24
2.2.6 Laser de baixa potência no tecido ósseo.....	25
2.2.7 Laser Diodo.....	29
2.3 Plasma Rico em Plaquetas.....	31
2.3.1 Introdução.....	32
2.3.2 Fatores de crescimento.....	35
3. Objetivos.....	40
4. Materiais e Métodos.....	42
4.1 Animais.....	43
4.2 Pré-operatório.....	44

4.3 Tempos Cirúrgicos	44
4.4 Sacrifício.....	59
4.5 Técnica histológica	60
5. Resultados	63
5.1 Avaliação histológica	64
6. Discussão.....	72
7. Conclusões.....	78
8. Referências Bibliográficas.....	80

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ATP	-	Adenosina-trifosfato
cm ²	-	Centímetros quadrado
CP	-	Concentrado de plaquetas
DE	-	Densidade de energia
As-Ga-Al	-	Arseniato de gálio e alumínio
As-Ga	-	Arseniato de gálio
GF	-	Fatores de crescimento
He-Ne	-	Hélio-neônio
IM	-	Intramuscular
IR	-	Infravermelho
IGF-I	-	Fator de crescimento similar à insulina
J	-	Joules
LBP	-	Laser de baixa potência
LLLT	-	Terapia laser de baixa intensidade
ml	-	Mililitro
mm	-	Milímetro
mW	-	Miliwatts
nm	-	Nanômetros
PDGF	-	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PRP	-	Plasma rico em plaquetas
RMP	-	Rotações por minuto
TFG -β s	-	Fator de crescimento de transformação-beta
W	-	Watts

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática do laser de diodo	30
Figura 2 - Representação esquemática do papel das plaquetas na regeneração.....	34
Figura 3 - Coelhos acondicionados em gaiolas próprias	45
Figura 4 - Medicação utilizada	46
Figura 5 - Tricotomia da área a ser operada	46
Figura 6 - Animal posicionado na mesa cirúrgica.....	47
Figura 7 - Incisão inicial da pele	47
Figura 8 - Tecidos subcutâneo e muscular divulsionados	48
Figura 9 - Exposição do osso com visualização da fenda metafisária	48
Figura 10 - Mensuração da arruela com paquímetro de precisão.....	49
Figura 11 - Desenho esquemático das medidas tomadas como referência para confecção das lojas cirúrgicas padronizadas.....	49
Figura 12 - Equipamento utilizado - motor	52
Figura 13 - Sutura dos planos internos	52
Figura 14 - Sutura da pele	53
Figura 15 - Aplicação do LBP no trans-operatório	53
Figura 16 - Aplicação do LBP no pós-operatório imediato.....	54
Figura 17 - Realização da punção cardíaca	54
Figura 18 - Disposição dos tubos na centrífuga	55
Figura 19 - Sangue total após centrifugação.....	55

Figura 20 - Desenho esquemático mostrando separação das fases do plasma em tubos distintos	56
Figura 21 - Tubos em banho-maria após adição de gluconato de cálcio	57
Figura 22 - Obtenção do gel plaquetário	57
Figura 23 – Colocação do gel na loja confeccionada	59
Figura 24 - Laser diodo utilizado.....	60
Figura 25 - Desenho esquemático da montagem das lâminas	62
Figura 26 - Caixa de lâminas e peças emblocadas em parafina	62
Figura 27 - Fotomicrografia da loja cirúrgica - Grupo I (cobaia A)	64
Figura 28 - Fotomicrografia da loja cirúrgica - Grupo I (cobaia B).....	64
Figura 29 - Fotomicrografia da loja cirúrgica - Grupo I (cobaia C).....	64
Figura 30 - Fotomicrografia da loja cirúrgica - Grupo II (cobaia A)	65
Figura 31 - Fotomicrografia da loja cirúrgica - Grupo II (cobaia B).....	65
Figura 32 - Fotomicrografia da loja cirúrgica - Grupo II (cobaia C).....	66
Figura 33 - Fotomicrografia da loja cirúrgica - Grupo II (cobaia D)	66
Figura 34 - Fotomicrografia mostrando osteoblastos e seus prolongamentos Grupo II.....	66
Figura 35 - Fotomicrografia da neoformação capilar -Grupo II.....	67
Figura 36 - Fotomicrografia da loja cirúrgica - Grupo III (cobaia A).....	68
Figura 37 - Fotomicrografia da loja cirúrgica - Grupo III (cobaia B)	68
Figura 38 - Fotomicrografia focando osteoblastos ativos-Grupo III	68
Figura 39 - Fotomicrografia do PRP remanescente -Grupo III	69

Figura 40 - Fotomicrografia de tecido conjuntivo na periferia da loja –Grupo III.....	69
Figura 41 - Fotomicrografia da loja cirúrgica - Grupo IV (cobaia A).....	70
Figura 42 - Fotomicrografia da loja cirúrgica - Grupo IV (cobaia B).....	70
Figura 43 - Fotomicrografia da loja cirúrgica - Grupo IV (cobaia C).....	70
Figura 44 - Fotomicrografia da loja cirúrgica - Grupo IV (cobaia D).....	70
Figura 45 - Fotomicrografia evidenciando células inflamatórias-Grupo IV.....	71
Figura 46 - Fotomicrografia mostrando osteoblastos ativos -Grupo IV	71

Lista de Tabelas

Tabela I - Disposição dos grupos testes e controle e momento de avaliação.....43

Tabela II - Protocolo de irradiação com laser As-Ga-Al.....58

1- INTRODUÇÃO:

A capacidade de auto-reparo é o atributo mais importante dos organismos vivos, a qual é alcançada através de adaptações fisiológicas com o intuito de se manter a condição de equilíbrio constante. O que se almeja desta recuperação tecidual não é apenas a reparação, que se traduz numa devolução de tecido sem forma e função e sim uma regeneração do defeito, o que representa a restituição das propriedades mecânicas e funcionais semelhantes à estrutura original. Contudo, essa capacidade de reorganização deve ser bem avaliada, uma vez que é distinta entre os vários tecidos, isto é, enquanto uns retêm alto poder regenerativo durante toda a vida, outros cicatrizam preferencialmente, por um processo de reparo.

Entre os tecidos altamente organizados, o osso, especificamente, se destaca por exibir um potencial inigualável para regeneração, sendo capaz de reparar fraturas e defeitos locais com extrema semelhança estrutural, desde que estejam presentes alguns elementos fundamentais como células osteocompetentes, mediadores biológicos (dentre eles os fatores de crescimento), matriz biológica associada a condições locais de vascularização e suporte.

Entretanto, a necessidade da reconstrução esquelética no intuito de reconstituir ossos reabsorvidos ou danificados por processos inflamatórios, fraturas mutiladoras, lesões tumorais ou simplesmente recuperar tecido ósseo em altura bem como em espessura com finalidade de reabilitar o paciente, representa muitas vezes, um obstáculo a comunidade cirúrgica e ortopédica.

Ao longo dos anos, muitos estudos têm focado numerosos métodos e técnicas na tentativa de resolver tal questão, porém ainda que muitos procedimentos distintos estejam sendo testados para melhorar a cicatrização óssea e a capacidade regeneradora com índices de sucesso, poucos alcançaram o estágio de aplicação clínica rotineira.

O laser surgiu como uma nova opção, sendo hoje considerado um método terapêutico alternativo em vários campos da Odontologia e da Medicina. Tem evoluído de maneira extraordinária em decorrência de trabalhos científicos e da divulgação de teorias que vieram consolidar seus principais efeitos terapêuticos, entre eles fotobioestimulação no processo de reparação de tecidos biológicos.

Concomitantemente, avanços em biologia molecular e biotecnologia tem permitido a identificação progressiva de componentes, fatores de crescimento, capazes

de promover diferenciação de células mesenquimais, as quais estimulam procedimentos regenerativos, favorecendo técnicas cirúrgicas onde a previsibilidade em ganho de tecido ósseo aumenta significativamente. A concentração desses fatores de crescimento a partir do plasma rico em plaquetas (PRP) tem se tornado, de forma magnífica, uma ferramenta para aceleração do processo de regeneração óssea.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a conciliação dessas modalidades terapêuticas, tendo em vista que apresentam o mesmo propósito, aceleração da regeneração óssea, com o intuito de se obter resultados finais benéficos, qualitativos e quantitativos em menor tempo e com possível aplicação clínica.

2- REVISÃO:

2.1 TECIDO ÓSSEO:

2.1.1 INTRODUÇÃO:

O osso é um tecido conjuntivo altamente especializado, caracterizado por sua rigidez e resistência a pressão. Tal dureza resulta da interação entre o componente orgânico e o componente mineral da matriz, já que o osso é um grande depósito de substâncias, sobretudo de íons de cálcio e fosfato. (STEVENS e LOWE 2001).

2.1.2 COMPONENTES DO TECIDO ÓSSEO:

É formado por células e um material intercelular calcificado, a matriz óssea. As células componentes deste tecido são: osteócitos, osteoblastos e osteoclastos. A fração orgânica, responsável pela elasticidade corresponde a 25% do tecido, enquanto a fração inorgânica, mineral, formada por cristais de hidroxiapatita a 75%. (ROSS e ROWRELL, 1993).

Tipos celulares:

Osteoblastos: células que sintetizam parte orgânica, colágeno e glicoproteínas da matriz óssea. Apresentam forma poliédrica com núcleo ovóide e sistemas de comunicação intercelular. Destacam-se por apresentar elevada basofilia, quando em alta atividade sintética. Uma vez aprisionados pela matriz óssea, recém sintetizada passam a ser chamados de osteócitos.

Osteócitos: células achatadas, localizadas em lacunas no interior da matriz óssea. São essenciais para manutenção da matriz mineralizada do osso. Se conectam umas as outras através de prolongamentos citoplasmáticos.

Osteoclastos: células gigantes, multinucleadas, ramificadas, derivadas da fusão de monócitos. Participam dos processos de absorção e remodelação do tecido ósseo. Através de ações enzimáticas formam depressões na matriz óssea, conhecidas como lacunas de Howship.

Matriz óssea:

É constituída por duas partes, sendo a inorgânica composta por grande quantidade de íons cálcio e fosfato e pequena quantidade de íons magnésio, potássio, sódio

citratos e bicarbonato. A parte orgânica é formada 95%, por fibras colágenas e por pequena quantidade de substância fundamental amorfa.

Envoltórios:

Os revestimentos das superfícies ósseas interna (endóstio) e externa (perióstio) são constituídos por membranas conjuntivas. São essenciais para manutenção do tecido ósseo. O perióstio é formado por tecido conjuntivo denso em sua parte mais externa e mais celular e vascular na porção interna. Suas células, morfologicamente fibroblastos transformam-se em osteoblastos e tem importante papel no crescimento dos ossos e reparação das feridas.

2.1.3 FORMAÇÃO ÓSSEA:

O osso, pelo seu dinamismo é formado e destruído continuamente sob o controle de fatores hormonais e físicos. Tal atividade constante permite a modelação. Essa renovação é extremamente alta nos primeiros anos de vida, possibilitando o crescimento. No adulto, essa remodelação pode aumentar em função de reparação ou em decorrência de processos patológicos.

A formação do tecido ósseo sempre se inicia por depósito de matriz osteóide, que subseqüentemente, mineraliza-se. Dois pré-requisitos são essenciais para que ocorra formação: vascularização ampla conjugada com um suporte mecânico estável, permitindo uma deposição organizada.

O desenvolvimento do osso é, tradicionalmente, classificado como ossificação endocondral ou indireta, no caso de um modelo de cartilagem servir como precursor. Esse processo é responsável pela formação dos ossos curtos e longos. Já na ossificação intramembranosa ou direta, o osso desenvolve-se diretamente na membrana conjuntiva sem a precedência de molde cartilaginoso. Formam-se a partir desse processo os ossos occipital, parietal, dos maxilares superior e inferior, ossos curtos e crescimento em espessura dos ossos longos (ROSS e ROWRELL, 1993).

Entretanto, devido à rápida remodelação que ocorre durante o desenvolvimento ósseo, o tecido ósseo inicial, depositado tanto por ossificação endocondral como por

intramembranosa, logo serão substituídos. O osso substituto é formado sobre o já existente por crescimento aposicional (ROSS e ROWRELL, 1993).

Histologicamente, o osso pode ser classificado em imaturo ou primário, no qual as fibras colágenas se dispõem irregularmente, sem orientação definida, o que o torna mecanicamente mais fraco. Já no tecido ósseo secundário, também denominado de maduro ou lamelar, as fibras colágenas se organizam em lamelas, paralelas umas as outras, ou se dispõem em camadas concêntricas em torno de canais com vasos formando sistemas de Havers ou Ósteon. Mecanicamente é mais forte.

2.1.4 MINERALIZAÇÃO:

A dureza e a rigidez do osso se devem a presença de sais minerais da matriz do osteóide. Este sal é um complexo cristalino de hidróxidos de cálcio e de fosfato chamado hidroxiapatita.

A mineralização ocorrerá caso a concentração local combinada dos íons cálcio e fosfato seja superior ao limiar, além de requerer alguns fatores para desencadeá-la, como: ligação da osteocalcina a íons cálcio extracelular, ação da enzima fosfatase alcalina e presença de vesículas da matriz, produzidas pelos osteoblastos e que formam o centro de precipitação inicial de hidroxiapatita.

De acordo com STEVENS e LOWE (2001), quando a produção de osteóide for alta, em curto espaço de tempo, nos estados de remodelação intensa, a mineralização irá ocorrer tardiamente.

2.1.5 MODELAÇÃO E REMODELAÇÃO ÓSSEAS:

No decorrer do crescimento, a espessura e a modelação da forma dos ossos fundamentam-se nas atividades de formação e reabsorção por meio dos envoltórios perióstio e endóstio (SCHENK, 1996).

O osso esponjoso, durante e após o período de crescimento pode sofrer modelação em decorrência de uma adaptação estrutural à carga funcional. A

remodelação, caracterizada pela reposição ou substituição tecidual, porém sem alteração da arquitetura óssea, é responsável pela qualidade mecânica do osso. Segundo SCHENK (1996), a remodelação pode ocorrer em decorrência de causas sistêmicas, sendo ativada pelos hormônios de crescimento e da tireóide e paratireóide e inibida pela calcitonina e cortisona. Causas locais como fratura, procedimentos cirúrgicos, também ativam a remodelação.

2.1.6 REGENERAÇÃO:

A reparação de uma ferida, qualquer que seja o agente determinante é a finalidade primária do processo inflamatório. A seqüência das alterações vasculares e celulares que ocorrem, visam em última análise devolver a região às mesmas condições existentes antes da agressão.

A regeneração, um exemplo de desenvolvimento pós-embriônico, consiste na reposição de componentes gastos ou perdidos no organismo por elementos igualmente e altamente organizados.

É considerada fisiológica, quando se caracteriza por reposição contínua de células e elementos teciduais. É reparadora, quando ocorre em função da reposição de tecidos que foram perdidos ou danificados, em decorrência de trauma ou doença.

O tecido ósseo exibe um potencial de regeneração surpreendente, porém esta capacidade apresenta limitações na ausência de suprimento sanguíneo, instabilidade mecânica, presença de defeitos sobexistentes e de tecidos competidores com uma alta atividade de proliferação (SCHENK, 1996).

Na evolução do processo de regeneração óssea, OKAMOTO e RUSSO (1973), enfatizaram quatro fases importantes, sendo a proliferação celular, desenvolvimento, maturação e finalmente mineralização.

Frente a qualquer lesão no tecido ósseo (fraturas, defeitos ósseos, fixação de implantes, interrupção do suprimento sanguíneo) a regeneração óssea local é ativada pela liberação de fatores de crescimento (GF) e indutores.

Vastos estudos têm sido realizados em reparo de defeitos ósseos, objetivando avaliar como se processa a regeneração.

JOHNER (1972) examinou a cicatrização de orifícios criados, com diâmetro de 0,1 e 1,0mm na cortical da tíbia de coelhos. Observou que a formação óssea no interior destes orifícios iniciou-se em 2 dias, sem precedência de reabsorção osteoclástica, revelando dependência de tamanho. Até 0,2 mm de diâmetro, os orifícios foram preenchidos por osso lamelar. Entretanto, em orifícios maiores, verificou uma estrutura de osso embrionário e posteriormente osso lamelar foi depositado nos espaços intertrabeculares neoformados. Após 4 semanas constatou que ambos orifícios, pequenos ou grandes estavam preenchidos por osso compacto. Tal fato indica que o osso não é capaz de atravessar espaços de largura maior que 1mm em salto único.

SCHENK (1996) salientou que o término do preenchimento não significa término da cicatrização. A regeneração óssea parece ser compacta, mas sua estrutura ainda está longe da aparência do osso cortical. A remodelagem ativada pelo tecido local e danos vasculares inicia ao redor do orifício em torno de 3 semanas. A partir daí, progride para o interior do osso neoformado e o substitui por osteônios secundários orientados longitudinalmente. Ao término do segundo mês, os defeitos corticais pequenos são totalmente reconstruídos.

Quanto ao reparo de defeitos ósseos esponjosos pequenos, SCHENK (1996) salientou que estes apresentam um padrão de cicatrização similar. Inicialmente, há formação de osso embrionário, o qual atravessa o defeito e os espaços intertrabeculares adjacentes e posteriormente é reforçado pelo preenchimento concêntrico dos esponjócitos latentes por osso primário com fibras paralelas. Numa segunda fase, a remodelagem restaura a arquitetura trabecular.

2.2 LASER:

2.2.1 INTRODUÇÃO:

A luz, com finalidade terapêutica tem sido utilizada desde o início da civilização pelos egípcios, indianos, gregos e chineses.

EINSTEIN, em 1917, baseado na Teoria Quântica proposta por PLANK (1900) fundamentou a Teoria da Emissão Estimulada (radiação eletromagnética produzida por processo atômico).

Em 1939, FABRIKANT expôs a idéia de amplificar radiação pelo efeito de emissão estimulada. Anos depois, 1952, TOWNES propõe um amplificador para microondas, mais tarde, MASER.

Porém, só em 1960, a emissão estimulada da radiação se tornou uma realidade através dos trabalhos de MAIMAN, com o primeiro emissor de laser a rubi (694,3 nm).

A partir de 1961, grandes descobertas, com êxito, foram realizadas. JAVAN ET AL desenvolveram o laser de hélio-neônio (He-Ne) e JOHSON, o laser de neodímio-ítrio-alumínio-granada (Nd:YAG). PATEL ET AL (1964) apresentaram o laser cirúrgico de dióxido de carbono (CO₂) na faixa do espectro infravermelho e o laser de argônio com duplo espectro de emissão.

MESTER (1966) foi o pioneiro na aplicação do laser de rubi de baixa intensidade de energia, tanto “in vitro” como “in vivo”, em pacientes portadores de úlceras crônicas. SCHAWLOW ET AL (1981) receberam o Prêmio Nobel por estudos em espectroscopia.

Atualmente, os lasers de alta potência apresentam grandes aplicações em decorrência dos efeitos de corte preciso, coagulação e vaporização.

Mais recentemente, vários trabalhos tem sido publicados, avaliando e revelando os efeitos terapêuticos dos lasers de baixa intensidade, (BENEDICENTI e MARTINO (1983); TAKEDA (1988); SILVEIRA E LOPES (1991)).

Com o intuito de utilizar uma das modalidades terapêuticas mais avançadas incansáveis pesquisas têm sido realizadas no sentido de se obter conhecimento da

energia aplicada, dos efeitos que esta produz nos organismos e de um correto protocolo de aplicação.

O termo laser se constitui num acrônimo de “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation” ou “Luz Amplificada por Emissão Estimulada de Radiação”. Como fontes de radiação eletromagnética, os lasers possuem propriedades especiais que as diferem de outras fontes de luz (RIGAU, 1996).

A monocromaticidade, caracterizada pela emissão de fótons, todos com o mesmo comprimento de onda e, portanto com a mesma cor, confere ao laser a natureza de luz pura. O fato dessa emissão estimulada gerar fótons com o mesmo comprimento de onda, movendo-se em fases no tempo e espaço e unidirecionalmente, com mínima divergência angular, caracteriza a luz laser como coerente e colimada, o que lhe permite uma grande concentração de energia por unidade de superfície.

Os lasers são classificados em duas categorias de acordo com a potência de emissão. Assim é definido como laser de alta potência apresentando poder destrutivo ação fototérmica de corte, vaporização, coagulação e laser de baixa potência, sem poder destrutivo, com ações fotoquímicas como analgesia, antiinflamatória e bioestimulatória.

A utilização do laser nas diversas áreas de saúde tem crescido amplamente, nos últimos anos, fato este, que requer um estudo mais aprofundado tanto dos fatores próprios dos lasers como das características e propriedades ópticas de cada tecido, o que por instância irá determinar a extensão da interação e conseqüentemente os efeitos biológicos (PINHEIRO, 1998).

2.2.2 PRINCÍPIOS FÍSICOS DE FUNCIONAMENTO DO LASER:

A luz laser é resultado da emissão estimulada de radiação sendo produzida numa cavidade ressonante a partir de um meio ativo. Possui características de monocromaticidade, colimação e coerência, as quais identificam e diferenciam o laser de outras fontes luminosas.

A monocromaticidade é considerada uma característica importante da luz laser pois, determina quais moléculas absorverão a radiação e portanto, a interação fotobiológica e os efeitos terapêuticos (BAXTER, 1991). O mesmo autor menciona que

a colimação refere-se ao grau de paralelismo do feixe laser, a qual mantém um pequeno tamanho do feixe numa distância relativamente grande. De acordo com KITCHEN e BAZIN (1996), a coerência é a sincronicidade das ondas da luz, podendo ser temporal, quando estas se encontram em fase, ou espacial, quando os fótons estão ajustados em planos espaciais paralelos entre si. BAXTER (1998) salienta, ainda, que a polarização acontece quando ondas de luz estão todas orientadas num só plano, vibrando em seus campos elétricos numa só direção.

2.2.2.1 EMISSÃO ESTIMULADA:

A emissão estimulada da radiação corresponde à liberação de fótons através da transição de um nível de energia alto para um nível de energia baixo (PINHEIRO, 1998). A absorção de radiação eletromagnética é expressa pela relação entre os níveis de energia $E_2 - E_1 = hf$, onde E_2 é o nível energético mais alto, E_1 o mais baixo, f é a frequência e h corresponde a constante de Planck ($6,62 \times 10^{-32}$ J/s).

2.2.2.2 CAVIDADE RESSONANTE:

O raio laser é gerado dentro de uma cavidade, que consiste de uma câmara contendo um meio ativo. Suas dimensões variam de acordo com o meio ativo e potência do aparelho. Em cada uma das extremidades da câmara está posicionado um espelho. Um espelho é totalmente refletor (100%) e o outro parcialmente refletor (98%). A diferença da capacidade de reflexão dos espelhos permite a saída da radiação de dentro da cavidade, formando o laser (OSHIRO, 1991).

2.2.2.3 MEIO ATIVO:

Constituído por materiais que podem produzir a radiação, o meio ativo, pode ser classificado em: sólido (rubí, Nd:YAG, Er:YAG), gasoso (CO_2 , He-Ne), líquido (Dye) e ainda, semi-sólidos, semicondutores e excímeros (GENOVESE, 2000).

De acordo com KITCHEN e PARTRIDGE (1991), o meio ativo é responsável pela determinação do comprimento de onda, extremamente importante, pois é ele que define a profundidade de penetração no tecido alvo. De acordo com FULLER (1983), diferentes comprimentos de onda apresentam distintos coeficientes de absorção para um mesmo tecido .

A fonte de energia (ou excitatória) fornecida ao meio ativo pode ser um outro laser ou descargas elétricas .

2.2.3. PARÂMETROS DE IRRADIAÇÃO DE UM LASER :

Os parâmetros que descrevem um laser são: tipo, comprimento de onda, potência, forma de emissão, densidade de potência e densidade de energia, os quais devem ser ajustados de acordo com a patologia a ser tratada . (BASFORD, 1989) .

A densidade de potência ou irradiância é a potência óptica de saída do laser em Watts, dividida pela área irradiada em cm^2 . Segundo KARU (1988), é através do controle desta que pode-se gerar fotoativação ou fotoinibição.

$$DP=P/A$$

A densidade de energia ou fluência (J/cm^2) determina a quantidade de energia que o tecido está recebendo. É obtida multiplicando-se a irradiância pelo tempo de exposição em segundos.

$$DE=DP.T$$

2.2.4. LASER DE BAIXA POTÊNCIA:

Vastos estudos vem sendo realizados na busca incessante de procedimentos que possibilitem minimizar a dor, regredir edemas, estimular a reparação e a cicatrização de tecidos, sem entretanto, provocar danos nos tecidos adjacentes.

A terapia com laser de baixa intensidade conhecida pela sigla inglesa LLLT (Low Level Laser Therapy) ou terapia com laser de baixa potência (LBP) vem sendo retratada desde a década de 60, quando MESTER (1966) publicou seu primeiro trabalho utilizando um laser de rubi operando em baixa intensidade de energia, o qual avaliou os efeitos dessa radiação no processo de cicatrização de úlceras crônicas.

Nos últimos dez anos, a introdução de fotodiodos emissores de lasers promoveram um avanço na utilização dessa terapia. Tal modalidade terapêutica, caracterizada pelas interações atômicas da luz laser com os tecidos (BAXTER, 1998) tem sido alvo de pesquisas, cujos resultados têm indicado grande potencial para modular diferentes processos biológicos, dentre eles: estímulo a microcirculação, síntese de colágeno, aceleração do processo de reparação de tecidos, além de apresentar efeitos antiinflamatório, analgésico, antiedematoso e de biomodulação e trofismo tecidual.

Atualmente, a laserterapia se tornou um método terapêutico de grande aplicação em odontologia e medicina, em decorrência da realização e divulgação de inúmeros trabalhos científicos, que vieram consolidar seus efeitos, especialmente fotoquímicos.

Segundo vários autores, a radiação laser promove modificações não só fotoquímicas, mas também, fotoelétricas e fotoenergéticas quando atuando em nível celular.

A absorção dessa energia por biomoléculas celulares específicas produzem estimulação ou inibição de atividades enzimáticas e reações fotoquímicas. Estas ações determinam trocas fotodinâmicas em cadeias complexas e moléculas básicas de processos fisiológicos de conotações terapêuticas.

KARU (1988) verificou que a irradiação de mitocôndrias isoladas induziu mudanças na homeostasia celular, que implicaram em reações em cascata e propuseram

um número de componentes da cadeia respiratória (citocromos, citocromos oxigenase e flavinas desidrogenase) os quais são fotorreceptores ou cromóforos primários e desta maneira capazes de absorver luz para um comprimento de onda apropriado. Estas causam a curto prazo a ativação da cadeia respiratória. Assim, a cadeia de elétrons transportados desta maneira resulta na melhora e no aumento da síntese de ATP. Além disso, a radiação laser afeta os níveis de íons hidrogênio na célula. Essa parceria no aumento de ATP causa ativação de outros íons transportados na membrana tais como: sódio e potássio e altera o fluxo de cálcio entre mitocôndrias e citoplasma. A variação desses parâmetros é um componente necessário no controle da atividade proliferativa da célula.

Em estudos subsequentes, KARU (1989) concluiu que a universalidade dos efeitos do LBP na estimulação do metabolismo celular se deve ao fato dos receptores primários serem componentes da cadeia respiratória. Além disso, são dependentes da dose de luz. Dessa maneira, em baixas doses, a irradiação causa regulação oxi-redução do metabolismo celular, e em altas doses, ocorre danos fotodinâmicos. A intensidade do efeito de bioestimulação depende do estado da célula antes da irradiação, isso explica o porque do efeito bioestimulante nem sempre ser possível. Os efeitos terapêuticos do LBP são explicados pelas mudanças nas atividades fisiológicas de células excitáveis.

De acordo com RIGAU (1996), os lasers e diodos de baixa intensidade emitem na faixa do vermelho (visível) e do infravermelho (600-1000 nm) propiciando boa transmissão na pele e mucosa, já que nessa faixa de comprimento de onda a energia é pouco absorvida.

Geralmente operam utilizando uma densidade de energia (dE) situada entre 0,1-10 J/cm² e uma densidade de potência entre 0.01-100mW/cm². Conforme MESTER ET AL (1985), a densidade de energia não deve ultrapassar 12 J/ cm², o que levaria a um efeito inibidor.

ANNEROTH ET AL (1988) avaliando os efeitos do LBP, na faixa do infravermelho, na cicatrização de feridas em ratos, obtiveram resultados que sugerem que tais efeitos dependem do fato de que a luz penetre nos tecidos e nos fluidos teciduais. A energia pode ser absorvida onde a concentração do fluido é maior e portanto mais facilmente absorvida pelos tecidos inflamados ou edemaciados.

Estudos “in vitro” e “in vivo” em animais de laboratório, bem como em pacientes, apoiam a teoria de que a regeneração tissular e a cicatrização de feridas são favorecidas com LBP.

De acordo com MESTER e JASZSAGI (1973) a alteração nas estruturas da mitocôndria promovem aumento da síntese de colágeno e o incremento do tecido conjuntivo, em razão do crescente poder de captação da glicina e da prolina pelos fibroblastos.

BENEDICENTI (1982a) relatou que os efeitos bioestimulantes do laser atua no fisiologismo celular acelerando a produção de ATP nas mitocôndrias e conseqüentemente o aumento da liberação da energia após a hidrólise das moléculas do ATP, revertendo em ADP para, novamente após a captação do radical PO_4 , retornar a ATP e assim sucessivamente.

Em 1983, o mesmo autor demonstrou que a radiação laser exercendo um estímulo na produção de ATP mitocondrial, resulta no aumento da velocidade de mitoses e conseqüentemente na aceleração da reparação tecidual.

PASSARELA ET AL (1984) relataram que os efeitos fotofísicos e/ou fotoelétricos do laser derivam de trocas nos potenciais de membrana, que se traduzem, intracelularmente, com um aumento na síntese de ATP.

No mesmo ano, MESTER concluiu em seus estudos, que além do LBP acelerar a divisão celular, este promove um significativo aumento dos leucócitos que participam da fagocitose, aumento na síntese de colágeno e regeneração mais precoce de vasos, o que facilita o desenvolvimento do tecido de granulação.

KARU e TIPHLOVA (1987) afirmou que a energia cedida pela radiação laser é absorvida intracelularmente e convertida em energia metabólica, sendo que a curto prazo acelera a síntese de ATP e a longo prazo a transcrição e replicação de DNA.

Significante aumento da quantidade de colágeno, com conseqüente melhoria na resistência à tensão em feridas irradiadas foi verificado por LYONS ET AL (1987), fato, também observado por ABERGEL ET AL (1987) ao realizarem pesquisas em ratos e pele de porco.

Resultados locais do LBP foram avaliados por YEWE ET AL (1989) ao utilizarem laser de He-Ne no processo de cicatrização de anastomoses intestinais. O grupo irradiado apresentou síntese mais elevada de colágeno, ratificando estudos anteriores.

Em 1991, TSUCHIDA ET AL realizaram um estudo em ratos normais e diabéticos utilizando um laser de He-Ne em feridas cirúrgicas. Observaram que tanto nos animais normais como nos diabéticos, a reparação da ferida foi mais acelerada naqueles grupos irradiados comparados aos controles.

Os efeitos da irradiação laser de arseniato de gálio (Ga-As) de 904nm, sobre o comportamento de mastócitos, em um processo de cicatrização de pele, foram avaliados por SILVEIRA e LOPES (1991). Os autores constataram maior desgranulação de mastócitos, áreas com vasodilatação, proliferação fibroblástica e aumento de substância fundamental no local da lesão.

TELFER ET AL (1993) verificaram, segundo pesquisas, que a utilização de LBP na reparação de trauma agudo induzia uma melhoria na microcirculação, o que incluía alívio do espasmo local de vasos, arteríolas e vênulas intensificando o fluxo sanguíneo nos capilares nutricionais, anastomoses, abrindo e ativando a neovascularização.

Também em 1993, ANDERS ET AL observaram melhora na microcirculação, diminuição no infiltrado celular, síntese de procolágeno, ativação na proliferação de fibroblasto e fibroses mais fortes após o tratamento com laser, em ratos com artrite. Salientaram que os nervos injuriados e ossos fraturados podem curar, rapidamente, nos grupos tratados com laser.

BASFORD (1993) relatou que específicos parâmetros ópticos do laser como: comprimento de onda, intensidade e dose podem alterar a proliferação celular, mobilidade e secreção. Salientou que LBP induz fenômenos, os quais na prática clínica podem melhorar a cicatrização no corpo.

Posteriormente, KAMEJA ET AL (1995) avaliaram o processo de cicatrização de feridas tratadas com LBP, com diferentes comprimentos de onda (830, 680 e 632,8 nm). Não foram observadas diferenças macroscópicas entre os grupos tratados, entretanto, significativa diferença com o grupo controle quando comparados.

Histologicamente, grupos irradiados apresentavam maior proliferação de vasos sanguíneos e tecido conjuntivo.

GARCIA ET AL (1995a) realizaram avaliação clínica do efeito do laser de He-Ne (632,8 nm) na bioestimulação em tecido gengival hiperplásico. Concluíram que a laserterapia se constitui em um método efetivo, podendo ser utilizado como auxiliar e/ou escolha para tratamento de alterações periodontais inflamatórias.

Em 1997, HÉRNANDEZ ET AL analisaram os resultados alcançados com a aplicação do laser de He-Ne (632,8nm) e Ga-As (904nm) em 204 pacientes no tratamento de osteomioartrite, afecções dermatológicas e transtornos na cicatrização. Os resultados foram promissores, uma vez que 77% dos pacientes melhoraram, notadamente.

YU ET AL (1997) pesquisaram o efeito da fotoestimulação na cicatrização de feridas em ratos diabéticos. Utilizaram para tal, um laser de argônio de 630nm e potência de saída de 20mW/cm². Verificaram uma melhora na cicatrização, através de análise histológica e clínica nos grupos que foram submetidos à irradiação, sugerindo que o LBP em certa fluência e em determinado comprimento de onda pode estimular a liberação de fatores de crescimento para fibroblastos e proliferação celular, sendo indicado no tratamento de feridas crônicas que ocorrem como complicação em diabetes mellitus.

A utilização do LBP no tratamento de lesões de mucosas induzidas por dentadura foi avaliado por MAREI ET AL (1997). Análises histológicas evidenciaram o efeito do laser na cicatrização. Avaliação densitométrica mostrou um aumento na densidade óptica do osso alveolar abaixo e próximo da zona irradiada comparada com áreas de lesões não tratadas. Os autores sugerem que o efeito da laserterapia em ambos, tecido mole e duro com subsequente tratamento da base da dentadura pode otimizar a terapia convencional.

Em 1997, GÓMEZ-VILLAMANDOS ET AL fizeram um estudo em lesões superficiais de mucosa de equinos. Utilizaram laser de He-Ne (632,8nm) e um diodo (904nm) em aplicações diárias das feridas, durante 15 dias com densidade de energia de 8 J/cm². Os resultados obtidos mostraram que os animais irradiados tiveram a

cicatrização acelerada, sem evidências de infecção, enquanto que no grupo controle, 70% dos animais apresentaram infecção.

CAMBIER e VANDERSTRAETEN (1997) realizaram um estudo “in vitro”, avaliando a ação do laser He-Ne sobre “pseudomonas aeruginosas”. Verificaram que o laser como agente bactericida mostrou ser irrelevante e não estimulou crescimento bacteriano, podendo ser implementado em feridas infectadas. Fato este já observado por LEE ET AL (1993), quando em pesquisa, trataram feridas em ratos infectados por *Stafilococcus aureus*, com laser de diodo, verificando boa evolução nas lesões tratadas em comparação com os controles não tratados.

REDDY ET AL (1998) utilizaram um laser de He-Ne (632,8 nm), diariamente em doses de 10 J/cm^2 , durante 14 dias e observaram a reparação da lesão provocada , experimentalmente, em tendões de Aquiles de coelhos. Por meio de análises bioquímicas, verificaram um aumento de 26% na concentração de colágeno após a irradiação e conseqüente aumento na velocidade de cura quando comparado com o controle.

ANTIPA e VLAICULESCU (1999) realizaram um estudo que visava verificar a eficácia de diferentes lasers diodo em distúrbios reumáticos. Observou que o melhor resultado clínico foi obtido quando se associava infravermelho (IR) e o laser diodo vermelho. Os autores não perceberam diferenças significantes entre os lasers diodo IR pulsado e contínuo.

Os efeitos do laser Ga-As (904 nm) no crescimento e desenvolvimento de membros fetais de rato em um modelo “in vitro” foram avaliados por THAWER e HOUGHTON (1999), por análises computadorizadas e imagens fotográficas. Os autores puderam verificar que após a administração de uma densidade de energia da ordem de $0,23$ a $1,37 \text{ J/cm}^2$ houve significativa inibição de crescimento de novos tecidos.

No mesmo ano, SROKA e SCHAFFER avaliaram o uso do laser em diferentes comprimentos de onda nas mitoses, em células tumorais. A taxa de mitose foi determinada pela contagem simples das células coradas por orceína. Os autores verificaram um máximo na taxa de mitose após irradiação entre 4 a 8 J/cm^2 , enquanto houve uma taxa reduzida de mitose a 20 J/cm^2 .

SIMUNOVIC (1999) investigou em 47 pacientes, a ação do LBP após cirurgias em decorrência de acidentes de trânsito e injúrias esportivas. Utilizou um laser de Ga-Al-As (830 nm), um laser IR e um laser de He-Ne (632,8 nm), combinados com um laser diodo (904 nm) pulsado para varredura. Os resultados obtidos mostraram que a cura foi acelerada em 25% a 35% no grupo tratado com LBP quando comparado com o grupo tratado com a terapia clássica.

2.2.5 EFEITOS TERAPÊUTICOS:

2.2.5.1 EFEITOS ANTIINFLAMATÓRIO E ANTIEDEMATOSO:

GENOVESE (2000) relatou em seu trabalho, que a ação analgésica do laser é observada sobre a dor crônica de diversas etiopatogenias, seguindo uma seqüência desde os receptores periféricos até o estímulo no sistema nervoso. Quanto aos efeitos antiinflamatório e antiedematoso são exercidos mediante a aceleração da microcirculação, o que leva a alterações na pressão hidrostática capilar, com conseqüente reabsorção do edema e eliminação do acúmulo de catabólitos intermediários. Tais fatos foram mencionados, anteriormente por RIGAU (1996) durante seus estudos.

De acordo com MIRÓ (1984), a vasodilatação e o aumento da microcirculação são resultados de um aumento do metabolismo tissular e da normalização da homeostasia. Este mecanismo de vasodilatação capilar é mantido em todos os casos por mais de 20 minutos após a aplicação do laser, mesmo que a região seja resfriada, e mais, este efeito não depende tão somente do efeito físico nos receptores celulares mas, uma ativação também de mediadores químicos do balanço vascular humoral, como liberação de histamina e serotonina.

FUERTE (1986) e LIEVENS (1986) salientaram que o efeito antiinflamatório e antiedematoso do LBP, é realizado por meio do aumento da microcirculação local, determinando alterações na pressão hidrostática nas alças capilares processando, assim, revigoramento da circulação sanguínea e da drenagem linfática, influenciando de maneira

plena na redução dos líquidos intercelulares e catabólicos neles dissolvidos, entre os quais os ácidos pirúvico, láctico e outros produtos da decomposição protéica.

Em 1991, SILVEIRA E LOPES relataram que a irradiação com LBP determina desgranulação de mastócitos numa intensidade maior do que em condições normais e fisiológicas, o que favorece a ocorrência de alterações circulatórias locais, especialmente a vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular.

Avaliando o processo de regeneração, GARCIA ET AL (1995b) observaram que o LBP promove vasodilatação local e angiogênese, deixando o tecido bem vascularizado, o que determina maior aporte de oxigênio e daí aceleração da reparação.

KUBOTA e KOBAYASHI (1999) utilizaram um laser diodo Ga-Al-As (810 nm) sobre um retalho de padrão axial realizado em ratos, para avaliar os efeitos da radiação no sangue periférico na manutenção do retalho. Observaram que os retalhos irradiados tiveram uma melhor perfusão vascular que os de controle, o que permitiu sobrevida destes.

Estudos de SCHIND e MARTIN (1999b), em pacientes diabéticos e radiolesados portadores de úlceras crônicas utilizando um laser de He-Ne (632,8 nm, 10 mW) demonstraram um aumento da neovascularização dérmica e cicatrização da lesão após 7 irradiações.

GENOVESE (2000) relata que a radiação laser tem uma ação indireta sobre o esfíncter pré-capilar, por meio de mediadores químicos, paralisando-o e produzindo sua abertura constante, estimulando a microcirculação. O autor menciona que o LBP controla a produção de substâncias liberadas nos fenômenos de dor e inflamação, como as prostaglandinas, histamina, serotonina, bradicinina e leucotrienos. Em relação as prostaglandinas, o laser inibe e bloqueia a ação da enzima ciclooxigenase sobre o ácido araquidônico.

A ação antiedematosa do LBP foi, inicialmente, avaliada por TRELLES e MAYAYO (1987) em estudos clínicos, nos quais os autores observaram que o laser acelerou a redução de edemas em decorrência do escoamento mais rápido dos exsudatos, o que se explica por meio de dois fenômenos: estímulo a microcirculação, permitindo melhores condições de drenagem do plasma que forma o edema e ação fibrinolítica, que propicia resolução do isolamento realizado pela coagulação do plasma.

2.2.5.2 EFEITOS ANALGÉSICOS:

Quanto aos efeitos analgésicos proporcionados pelo LBP, BENEDICENTI (1982b) demonstrou que após a radiação havia um aumento de β -endorfina, considerada fator analgésico fisiológico, em nível do líquido cefalorraquidiano.

CRUANTES (1984) destacou que o efeito analgésico do laser se dá por meio da liberação de produtos químicos morfínomiméticos como endorfinas e encefalinas.

Segundo LOMBARD ET AL (1990), os efeitos analgésicos do laser são mais prováveis em decorrência da liberação de serotonina e acetilcolina.

BAXTER ET AL (1991) relataram que os efeitos da laserterapia nas condições de dor estão entre as melhores modalidades para alívio, se comparada com outras eletromodalidades .

GENOVESE (2000) salienta que a terapia laser pode acarretar diminuição da intensidade de dor, não só pela inibição da enzima ciclooxigenase, mas também pelo fato de atuar como um fator equilibrador do potencial da membrana em repouso, dificultando a transmissão do estímulo nervoso.

2.2.5.3 EFEITOS SISTÊMICOS:

Os efeitos sistêmicos do LBP foram descritos, primeiramente, por MESTER e JASZSAGI (1973) e mais tarde por TRELLES e MESTER (1983). Os autores atribuíram o fato do laser provocar efeitos nos tecidos distantes do local de irradiação, a fatores humorais. Mediante esta ação, preconizaram que no tratamento não seria necessário irradiar toda a área lesada para obter um efeito sistêmico.

Posteriormente, ZARAGOZA ET AL (1985) publicaram um estudo sobre o efeito do laser de He-Ne no tratamento de fístulas osteomielíticas múltiplas em ratos fêmeas, onde obtiveram a cura de todas elas, irradiando apenas uma única pata do animal.

ROCHKIND ET AL (1989) compararam a evolução de feridas por queimadura em animais. Observaram que tanto a ferida irradiada como a não irradiada, no mesmo animal, curavam ao mesmo tempo e muito antes que nos animais controles não irradiados.

Os efeitos sistêmicos do LBP na circulação, em pacientes portadores de diabetes e microangiopatias foram investigados por SCHIND e MARTIN (1999a). O mesmo demonstrou um acréscimo significativo da circulação na pele, em decorrência do aumento da temperatura, detectada por um termógrafo infravermelho, o que sugeriu que a irradiação laser induziu efeitos sistêmicos.

2.2.6. LASER BAIXA POTÊNCIA EM TECIDO ÓSSEO:

O reparo tecidual é um dos fenômenos mais interessantes que ocorrem nos organismos vivos. A capacidade de reparar tecidos lesados é uma resposta da própria vida e portanto, deve ser considerada como um dos mecanismos primários de sobrevivência.

A regeneração óssea tem sido alvo de vários estudos ao longo dos anos, porém com o advento do laser, surge uma nova opção terapêutica.

Durante o processo de cicatrização de feridas cirúrgicas, a formação de tecido de granulação é um dos quesitos essenciais. (CONWAY, 1952). De acordo com MESTER e JASZSAGI (1973), o desenvolvimento de um maior aporte sanguíneo é um dos fatores mais benéficos e decisivos atribuídos a laserterapia, na aceleração da reparação tecidual.

TRELLES e MAYAYO (1987) observaram que a irradiação de 2 a 4 J/cm² com laser de He-Ne, por um período de 1 a 3 semanas causava um efeito estimulador no processo de reparação de fraturas ósseas, determinado pela mensuração da largura trabecular. Avaliação histológica, mostrou um aumento de fibroblastos nos calos ósseos irradiados.

Pesquisa realizada por TAKEDA (1988), em osso alveolar, avaliou os efeitos da energia laser do tipo Ga-As, com densidade de energia de 20J/cm² e densidade de potência de 0,025 W/cm², em aplicação única, durante 5 minutos. Observou que a

proliferação dos fibroblastos foi mais pronunciada e a formação de tecido osteóide foi mais precoce nos irradiados.

LABBE (1990) concluiu em seus estudos, que a fotoestimulação por laser provocou um incremento na síntese do ácido ascórbico e na hidroxiprolina em culturas de fibroblastos, o que poderia, com certeza, gerar uma melhora na qualidade da reparação óssea.

Incremento vascular e rápido aparecimento de células pré-osteogênicas foi descrito por DE TEJADA ET AL (1990), ao avaliarem o efeito de 6 mW de irradiação em fratura de fêmur de rato.

Trabalhos realizados por NICCOLI FILHO (1991) com laser de He-Ne em reparação alveolar, demonstrou a formação mais precoce do tecido de granulação e início de neoformação óssea, com remodelação das cristas alveolares.

No mesmo ano, YAMADA verificou que o laser de baixa potência promove um efeito positivo na proliferação e na diferenciação de células osteoblásticas “in vitro”.

Em 1992, OLIVEIRA realizou um estudo histológico, após irradiação com laser Ga-As (904 nm), no reparo alveolar de feridas de extração dentária infectada. Constatou que a radiação laser acelerou a cronologia do reparo alveolar quando comparado com grupo controle sem laser.

Efeitos da radiação infravermelha, em defeitos circulares criados no osso parietal de ratos Wislander, foram avaliados por GORDJESTANI e DERMAUT (1994). Análises após 28 dias, com Technetium 99m metileno-difosfanato, não evidenciaram nenhuma diferença metabólica do osso entre os grupos.

GARCIA ET AL (1995b) trabalharam em alvéolos dentais infectados após exodontia. Verificaram, por meio de análises histológicas, que a ação da radiação laser do tipo Ga-As (904 nm) acelerou o processo de reparação dos alvéolos, sendo mais evidente nos tempos iniciais (6 a 15 dias) e no grupo que a aplicação foi de quatro minutos.

BARUSHKA ET AL, em 1995, verificaram que a irradiação com laser de He-Ne em perfurações provocadas em tíbia de rato, promovia um aumento da população de osteoblastos, resultados obtidos pela alteração da quantidade de fosfatase alcalina.

Estudos subsequentes foram realizados por GLINKOWSKY e ROWINSKI (1995) utilizando um laser de baixa potência em fraturas de tíbia de rato. Concluíram, por meio de densitometria laser, que a densidade óptica era maior nos grupos irradiados.

Na periodontia, o surgimento do laser e suas aplicações trouxeram novas perspectivas terapêuticas. HERNÁNDEZ ET AL (1997) realizaram um ensaio clínico com 60 pacientes portadores de doença periodontal, com perda óssea horizontal. Observaram, radiograficamente, que defeitos ósseos tratados com laser He-Ne ($3\text{J}/\text{cm}^2$) obtiveram 20% de ganho ósseo quando comparado com grupo que recebeu tratamento tradicional.

SAITO e SHIMIZU (1997) utilizando um laser diodo de Ga-Al-As, com potência de 100 mW, avaliaram a eficiência deste, na regeneração óssea durante expansão mediana da sutura palatina, em ratos. Seus achados sugeriram que a irradiação pode acelerar a regeneração da sutura palatina durante rápida expansão, porém este efeito depende da frequência e da dose de radiação.

Ainda em 1997, ANDREU ET AL, empregaram a terapia laser na regeneração óssea periapical. Participaram do estudo 40 pacientes que apresentavam processos periapicais crônicos. Tratamentos endodônticos e laserterapia foram realizados. A técnica aplicada foi pontual na área lesionada e em pontos de acupuntura, com depósitos energéticos de $15\text{ J}/\text{cm}^2$ e $7\text{ J}/\text{cm}^2$, respectivamente. Resultados obtidos mostraram aceleração nos processos de reparação óssea periapical ao utilizar a laserterapia, pois em 67,5% dos pacientes a mesma ocorreu em período menor que 6 meses.

Investigando os efeitos do laser de Ga-Al-As (830 nm, 500 mW) em vários estágios de culturas de células de calvária de rato (1-16 dias), OZAWA ET AL (1998) avaliaram proliferação celular, formação do nódulo ósseo, atividade da fosfatase alcalina e a expressão do gen osteocalcin. Concluíram que a radiação laser agiu em dois pontos principais: estimulação da proliferação e diferenciação celular.

LUGER ET AL, no mesmo ano, constataram um aumento na resistência à tensão de tíbias de ratos, fraturadas, depois de serem irradiadas com laser de He-Ne (632,8 nm, 35 mW). O laser foi aplicado durante 30 minutos sobre a área da fratura, diariamente, durante 14 dias. Observaram que o LBP propiciou uma aceleração na regeneração e cura das feridas ósseas.

Estudo realizado por LIZARELLI e LAMANO (1999) avaliou o efeito da radiação laser de Ga-Al-As (790 nm) na cronologia do reparo alveolar de ratos, que tiveram seus incisivos centrais extraídos. Verificaram que a quantidade de osso era maior nos grupos que foram irradiados.

DORTBUDAK e HASS (2000) analisaram os efeitos da radiação de um soft laser diodo pulsado (690 nm) por 60 segundos, com tempos de 3,5,7 dias, em culturas de células da medula óssea (osteoblastos derivados de células mesenquimais). Constataram um aumento significativo de osso depositado nas culturas irradiadas quando comparadas com as não irradiadas, sugerindo um efeito de bioestimulação nos osteoblastos “in vitro”, levando a crer que poderia ser usado nos processos regenerativos, terapia de fraturas e osseointegração de implantes.

A influência da radiação laser He-Ne na osteogênese, após fraturas cirúrgicas, foi demonstrada em pesquisas realizadas em ratos Wistar, por FREITAS e BARANAUSKAS (2000). O tratamento laser iniciou 24 horas após a cirurgia. Os animais foram divididos, aleatoriamente, em 3 grupos com diferentes doses de radiação e aplicações diárias. Análises com microscopia óptica e eletrônica, revelaram que os tratamentos com doses de 31,5 e 94,7 J/cm² resultaram na formação óssea com trabeculado mais denso, o qual indicou maior síntese de colágeno.

Em seus estudos, KAWASAKI e SHIMIZU (2000) induziram movimentos ortodônticos em molares de ratos (10 g de força ortodôntica) e simultaneamente utilizaram um laser diodo As-Ga-Al, incidindo ao redor dos dentes movimentados. Verificaram um aumento da formação óssea e taxa de proliferação celular no lado de tensão e aumento do número de osteoclastos no lado de pressão, no grupo irradiado. Concluíram que a laserterapia acelerou movimento dos dentes acompanhado do processo de remodelação do osso alveolar.

Dada a complexidade do assunto, o uso de tão sofisticada técnica merece novos experimentos, no intuito de melhor conhecer essa energia, seus efeitos no organismo e modo de aplicação. Ignorar essas prerrogativas anteriores seria restringir a ação de uma das modalidades terapêuticas mais avançadas.

2.2.7. LASERS DE DIODO:

O laser de As-Ga (arseniato de gálio) é obtido mediante estimulação de um diodo semiconductor formado por cristais de arseniato de gálio. A região ativa do diodo lembra um sanduíche (PINHEIRO, 1998). Uma camada de material condutor de carga elétrica positiva (cristal de As-Ga do tipo P) é separada de uma camada de material condutor de cargas negativas (cristal de As-Ga do tipo N) por uma camada não condutora.

Uma corrente elétrica contínua aplicada a esse diodo proporcionará a combinação dos elétrons em excesso de um lado aos vazios existentes no outro. Essa energia resultante é amplificada pelas extremidades polidas do diodo e escapa do mesmo na forma de radiação laser (GENOVESE, 2000).

A adição de alumínio (Al) na mistura permite a produção de lasers visíveis na faixa do vermelho (620 a 830 nm).

Quando comparado ao laser de He-Ne, que se destaca em lesões superficiais, o laser de As-Ga-Al oferece aplicação terapêutica em lesões mais profundas, uma vez que a energia da radiação laser na região do espectro eletromagnético com comprimento de onda entre 620 - 680 nm é pouco absorvido por líquidos aquosos e hemoglobina permitindo, assim, maior penetração (2-3 cm) (Fig.1).

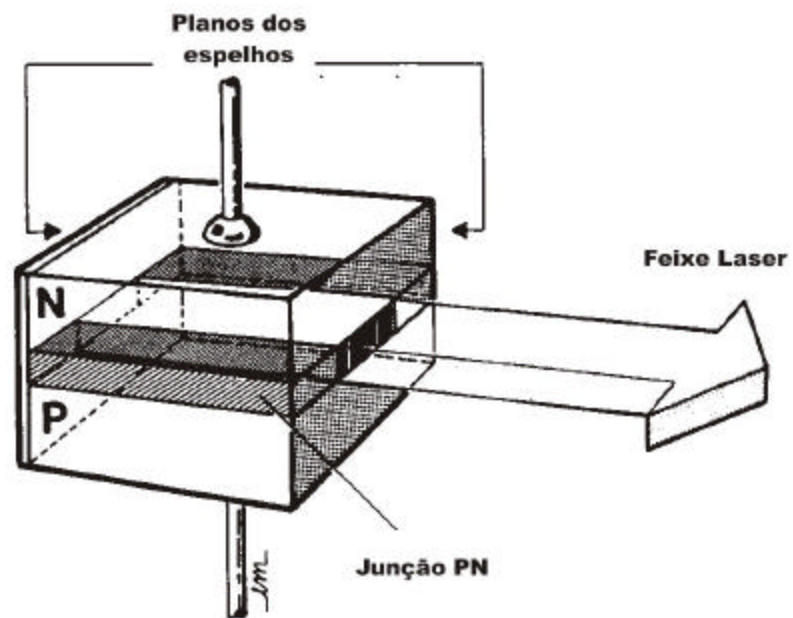


Figura 1 - Representação esquemática do laser de diodo

2.3 PLASMA RICO EM PLAQUETAS:

2.3.1. INTRODUÇÃO:

Graças aos últimos avanços em biologia molecular e biotecnologia tornou possível a identificação de componentes capazes de promover diferenciação de células mesenquimais estimulando e regulando o processo de cicatrização. A concentração desses elementos possibilita ampliar e mesmo acelerar o processo de regeneração fisiológica (GREEN ET AL 1997).

Tais componentes, os fatores de crescimento (GF), são proteínas solúveis produzidas por uma grande variedade de células e seus nomes derivam da fonte de onde se originam. Destes, pelo menos três são derivados dos grânulos α -plaquetários: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de transformação-beta (TGF- β s) e o fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-I) .

Esses polipeptídeos são considerados mediadores biológicos naturais, sendo responsáveis por regular diversos eventos celulares essenciais, como: mitogênese, quimiotaxia, citodiferenciação e síntese de matriz (GIANNOBILE, 1996).

De acordo com MARX (1999), os fatores de crescimento exercem vários efeitos sobre os processos de reparação e regeneração, daí considerados iniciadores universais de quase todos os processos cicatriciais. A sinalização aos GF se encontra mediada por receptores de membrana específicos na superfície das células sobre as quais atuam promovendo uma proliferação ou inibição em diferentes situações, o que garante uma especificidade de ação frente a cada situação (LENHARO e COSSO, 2001).

Pesquisas contínuas têm sido realizadas com o intuito de demonstrar o potencial significativo da influência dos fatores de crescimento na regeneração tecidual, condrogênese e osteogênese.

Recentemente, com intento de adquirir um material bioativo, capaz de promover a ativação e liberação dos fatores de crescimento, induzindo a diferenciação osteoblástica e permitindo a regeneração óssea no sítio lesado, relatos científicos chamam a atenção para o plasma rico em plaquetas (PRP).

Utilizado como simples estratégia para concentrar plaquetas ou enriquecer coágulo natural (95% células vermelhas, 4% plaquetas e 1% de células brancas), o PRP

(4% células vermelhas, 95% plaquetas e 1% de células brancas) fundamenta-se na modulação e aceleração dos processos cicatriciais por meio dos fatores de crescimento contidos nas plaquetas (DINATO ET AL, 2001).

O PRP é uma fonte autógena, exógena e acessivelmente barata de fatores de crescimento, preparado a partir de uma pequena quantidade de sangue total, retirado do próprio paciente, no período pré-operatório e obtido por separação e concentração de plaquetas por gradiente de concentração.

Outros termos como concentrado de plaquetas (CP), plasma enriquecido com plaquetas, plasma rico em fatores de crescimento, ou ainda gel de plaquetas, também são encontrados na literatura (ANITUA, 1999; LYNCH, 1989; MARX, 1999; WHITMAN, 1997).

O PRP apresenta na sua constituição básica três componentes: plasma, leucócitos e plaquetas.

No plasma estão contidos os mais diversos fatores de coagulação (fibrinogênio, protrombina, etc) (GOLDBERG, 1997).

MARX e GARG (1999) relataram que a presença de células brancas no PRP, lhe confere uma resistência natural aos processos infecciosos e/ou alérgicos. Contudo são as plaquetas o componente mais importante, devido capacidade de liberar os fatores de crescimento (WHITMAN, 1997).

As plaquetas são pequenos fragmentos citoplasmáticos presentes no sangue circulante. Derivam de megacariócitos. Apesar de seu tamanho reduzido, cerca de 3µm, atuam na coagulação do sangue, retração e dissolução do coágulo e nos processos de cicatrização (Fig.2). Esses elementos são as primeiras células de resposta à traumas e sofrem desgranulação nos sítios de injúria, liberando dentre outros, fatores de crescimento, os quais como já citado anteriormente, desempenham papel relevante em muitos processos biológicos.

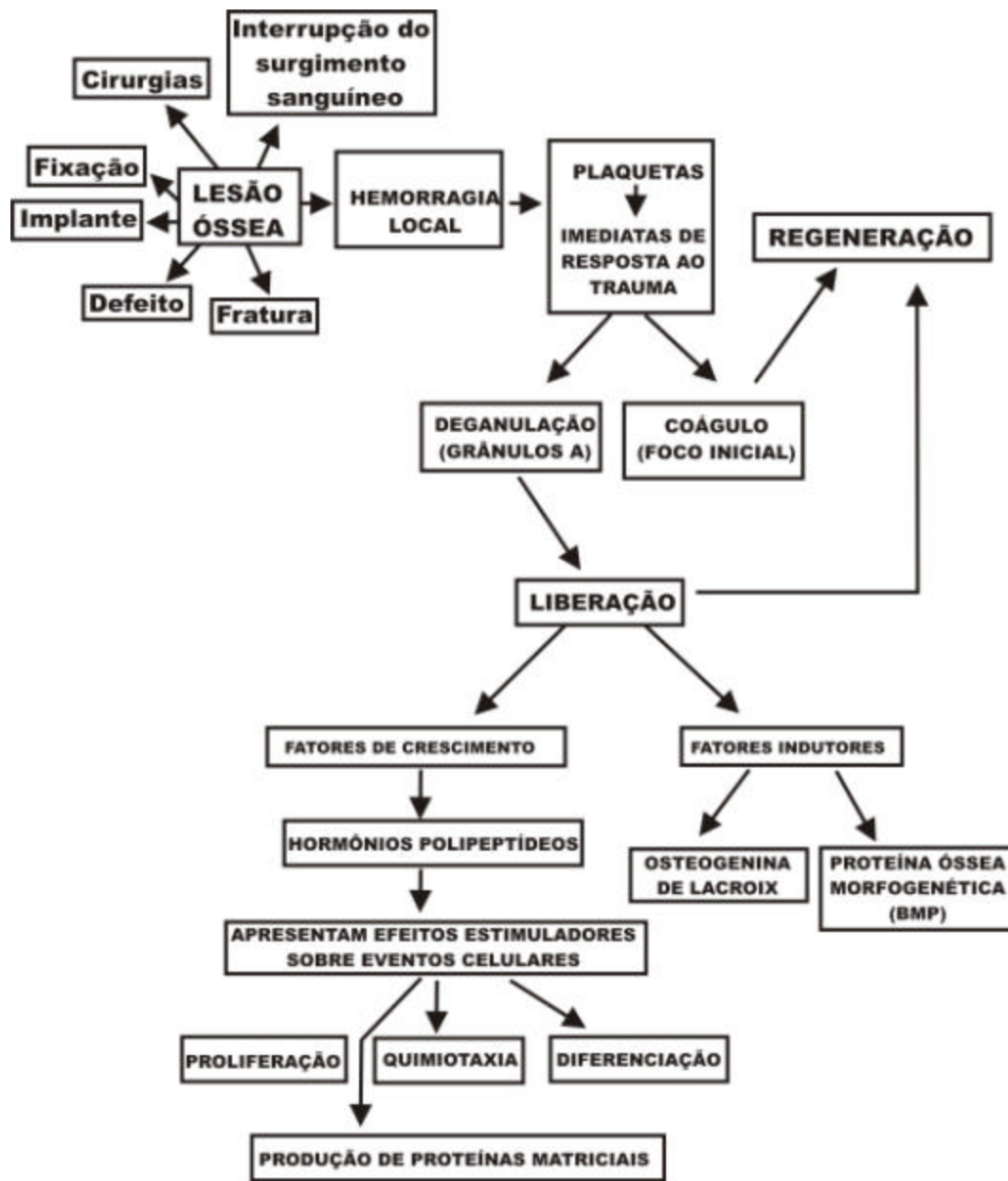


Figura 2- Representação esquemática do papel das plaquetas no processo de regeneração óssea.

A aplicação do plasma rico em plaquetas (PRP) no local da injúria, amplia a influência do PDGF e do TGF- β , pelo menos nos estágios iniciais do processo de regeneração óssea. Apesar dessa atividade extinguir-se dentro de sete a dez dias, o reforço inicial que o PRP oferece ao processo é benéfico, uma vez que propicia, mais rapidamente, a cascata de eventos regenerativos (GARG,1999a).

2.3.2. FATORES DE CRESCIMENTO PRESENTES NO PRP:

O fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) é uma glicoproteína presente nos grânulos α -plaquetários, sendo, também, encontrados em macrófagos e células endoteliais (ANITUA, 1999). São liberados quando ocorre o agregamento plaquetário e início do processo da cascata da coagulação.

Principal fator de crescimento liberado pelos grânulos plaquetários, o PDGF é o primeiro a estar presente na lesão. No sítio da ferida, atinge as células alvo, aderindo-se aos receptores da membrana e estabelecendo ligações de proteína tirosina-quinase. Apresenta como atividades específicas a mitogênese, angiogênese, ativação de macrófagos, além de promover migração perivascular de células e modular seus efeitos nos outros fatores e crescimento (MATSUDA, 1992; WANG, 1994).

Segundo MARX (1999), dispõe-se em pequenas quantidades, algo em torno de 6×10^{-17} g de PDGF por plaqueta.

Os fatores de crescimento de transformação (TGF) mais comuns no PRP são: fator de crescimento de transformação beta 1 (TGF- β 1) e fator de crescimento de transformação beta 2 (TGF- β 2). Constituem uma super família de mediadores locais e suas principais atividades são quimiotaxia e mitogênese dos precursores de osteoblastos, além de estimular a deposição de matriz colágeno para cicatrização de feridas e de osso (GARG, 1999b). Segundo ANITUA (1999), quando atuam sobre os osteoclastos, inibem reabsorção óssea. Dentre as células ativadas estão os fibroblastos, células endoteliais, células osteoprogenitoras, células condroprogenitoras e células derivadas do mesênquima.

O fator de crescimento similar a insulina (IGF -I) é mitogênico para as células de linhagem osteoblástica e estimulador da osteogênese a partir dos osteoblastos diferenciados.

De acordo com GIANNOBILE (1999), quando combinados com outros fatores de crescimento, aumentam a osteogênese em processos cicatriciais.

A partir da década de 80, pesquisas se superpõem na busca da confirmação experimental de que a utilização terapêutica isolada e/ou associada dos fatores de crescimento derivados das plaquetas (PDGF, TGF- β s, IGF-s) é biologicamente segura.

HOWES ET AL (1988) realizaram enxertos de matriz de osso desmineralizado em ratos, verificando a formação local de cartilagem e osso sob a influência de fatores de crescimento adicionados no enxerto. Constataram que suplementos de fator de crescimento derivado de plaqueta aumentou tanto a produção de mRNAp, colágeno II como a atividade da fosfatase alcalina e a quantidade de cálcio no osso.

GRAVES ET AL (1989) demonstraram que o PDGF é um potente mitógeno para células originadas do mesênquima e que atuam como ambos fatores reguladores autócrino e parócrino.

Os efeitos da combinação de PDGF e IGF em defeitos ósseos periodontais naturais ocorridos em cães foram avaliados por LYNCH ET AL (1989). Os pesquisadores verificaram que nas áreas de controle tratadas sem fatores de crescimento não ocorreu nenhuma formação óssea, ao passo que ocorreu regeneração nos sítios tratados com fatores de crescimento.

A primeira evidência de estimulação da formação óssea “in vivo” por TGF- β foi reportada por MASAKI (1989), verificando que a ação deste foi local e dose dependente (doses inferiores não produziram o mesmo efeito).

Em 1992, RUTHEFORD e NIETRASH obtiveram resultados benéficos após aplicação de uma combinação de PDGF e IGF em lesões periodontais induzidas em macacos pelo fato de se mostrarem potentes reguladores, diferenciadores e sintetizadores de matriz extracelular durante reparação de ferida .

Segundo ROBINSON (1993), a inclusão de fatores de crescimento em sítios de injúria podem modificar o processo de cicatrização, acelerando-o.

SLATER ET AL (1993) testaram se concentrado de plaquetas humanas, como suplemento para meio de cultura, suportaria a atividade proliferativa e funcional de osteoblasto. Resultados obtidos nos estudos indicaram que meio suplementar de plaquetas estimulou proliferação e manutenção de diferentes funções nos osteoblastos humanos.

Estudos realizados por HOWELL ET AL (1995) avaliaram os efeitos do PDGF e IGF em defeitos periodontais infra-ósseos e em furcas grau II em seres humanos.

Observaram formação significativa nos sítios de furca tratados com fatores de crescimento.

Analisando os fatores de crescimento implicados na regulação da formação de tecido de granulação durante a cicatrização de feridas, RIGAU (1996) concluiu que “in vitro” os fatores de crescimento apresentam efeitos de estimulação sobre a proliferação celular e síntese de DNA e “in vivo” esses polipeptídeos desempenham papel relevante em muitos processos biológicos, incluindo embriogênese e cicatrização de feridas.

VIKJAER ET AL (1997) avaliaram o efeito da recombinação de fator de crescimento derivado de plaqueta de humanos na cicatrização de defeitos de calvária de coelhos. Após 8 semanas, observaram formação precoce de osso .

MICHAEL e JOYCE (1998) demonstraram a importância dos fatores de crescimento PDGF e TGF- β no processo de reparação óssea. Observaram que esta começa, imediatamente, após a lesão quando os fatores de crescimento são liberados no local da injúria pelas plaquetas, agindo como reguladores centrais de todo o processo de reparo.

TRIPPEL (1998) evidenciou que o fator de crescimento similar a insulina (IGF) tem papel na cicatrização de fratura, uma vez que promove proliferação celular e síntese de matriz pelos condrócitos e osteoblastos, além de mediar muitas das ações dos hormônios de crescimento .

No mesmo ano, MARX e CARLSON avaliaram, radiograficamente, enxertos que receberam quantidades adicionais de fatores de crescimento por adição de PRP. Evidenciaram uma taxa de maturação radiográfica de 1.62 para 2.16 vezes maior que o enxerto sem PRP. Análise histomorfométrica mostrou um aumento da densidade óssea em enxerto que recebeu PRP (74.0 % +/- 11%), quando comparado com enxerto sem PRP (55.1% +/- 8%).

ANITUA (1999) utilizando uma técnica ambulatorial para obtenção de PRP, tratou 20 pacientes submetidos à extração em futuros sítios para colocação de implantes. Concluiu que a aplicação do PRP promove regeneração óssea e dos tecidos moles mais rapidamente, sendo ausentes os efeitos negativos, risco de infecção ou de

transmissão de doenças, por ser um material autógeno. Fato mencionado por RAPP (1999) após avaliar o uso de PRP em conjunto com enxerto ósseo em cirurgias.

MERAW ET AL (2000) investigaram os efeitos da combinação de um cimento de fatores de crescimento (GFC) na regeneração óssea guiada ao redor de implantes dentais. Avaliação com microscopia digital computadorizada das amostras obtidas, após 3 meses de experimento, indicou efeito significativo dos fatores de crescimento no aumento do contato osso-implante e quantidade de osso por superfície de área comparada com outras modalidades ($P < 0.0009$).

A distribuição e modificação de fator de crescimento de transformação-beta ($TGF-\beta$) no tecido periodontal de ratos foi avaliado por WANG ET AL (2000) com intuito de verificar a influência deste no movimento ortodôntico. Observaram que o $TGF-\beta$ desempenha um papel importante na remodelação do tecido periodontal durante o movimento ortodôntico, além deste, potencialmente promover formação óssea.

OBARRIO e ARAUZ (2000) utilizaram gel plaquetário em combinação com enxerto ósseo para tratamento de defeitos ósseos periodontais. Verificaram clinicamente, uma redução significativa das profundidades dos defeitos. Radiograficamente, observaram uma soma precoce de osso neoformado.

STEFANI ET AL (2000) avaliaram por análise histomorfométrica, o processo de cicatrização de ferida óssea ao redor de implantes colocados em alvéolos dentais extraídos, com ou sem a aplicação simultânea de PRP. Com finalidade de marcar o osso regenerado, uma solução de calceína a 2% foi administrada via IM em 0, 7, 15, 30, 45, 60 e 75 dias após inserção do implante. Observaram, dentro dos limites do estudo, que a combinação de PDGF/IGF-I participou, ativamente, da fase inicial da reparação óssea.

Com intento de determinar os benefícios da aplicação do PRP na superfície da ferida, em cirurgia cosmética, WELSH (2000) realizou um estudo clínico. Observou que o tempo de cicatrização total foi reduzido e muitos pacientes foram capazes de retornar ao trabalho em menor tempo, além de diminuir o requerimento de drenos e curativos elásticos, concluindo, assim, que o PRP adiciona o benefício de entregar grande concentração de plaquetas e produtos importantes para cicatrização de feridas

MARX e GARG (2000) afirmaram que a bioquímica dos tecidos receptores e dos enxertos são compatíveis, mas a adição de PRP estimula uma consolidação e

mineralização do enxerto na metade do tempo com 15 a 30% de ganho na densidade óssea.

Em seus trabalhos, SHIMNELE ET AL (1998) sugerem que PRP é uma excelente “ferramenta” para aumentar e acelerar a taxa de formação óssea, uma vez que é uma fonte autóloga de fatores e crescimento, de fácil obtenção no tempo cirúrgico, o que a torna extremamente efetiva e segura.

KASSOLIS ET AL (2000) sugerem, a partir de seus achados clínicos e histológicos, que o aumento de crista alveolar e levantamento de seio utilizando um aloenxerto associado com PRP pode funcionar como uma modalidade terapêutica alternativa, viável para posterior colocação de implantes.

LENHARO e COSSO (2001) concluíram que a regeneração de áreas tratadas com PRP parece responder muito melhor em comparação com áreas de controle, em decorrência do alto grau de células diferenciadas.

É um fato real que o plasma rico em plaquetas (PRP) abre um novo campo para a engenharia de farmacologia de ferida, oferecendo empolgante prospecto de avanço revolucionário no meio cirúrgico.

3-OBJETIVOS:

O presente trabalho teve como objetivo avaliar, histologicamente a potencialização do processo de regeneração óssea primária, quando da utilização terapêutica do plasma rico em plaquetas (PRP) isolado e/ou associada à terapia com laser de diodo (As-Ga-Al, 650 nm). Determinando:

- Método mais seguro e efetivo na otimização do processo de regeneração óssea primária.
- Conhecimento de técnicas que possibilitem reabilitar mais precocemente o paciente.

4 -MATERIAIS E MÉTODOS:

4.1.ANIMAIS:

Foram utilizados 16 coelhos da raça Norfolk, com peso corpóreo entre 1500 e 2500 gramas. Os animais foram fornecidos pelo biotério do Centro de Estudos da Natureza da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP). Foram acondicionados em gaiolas próprias e ambientados durante um período de sete dias no Laboratório de Farmacologia do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP & D), sob condições de iluminação natural, climatização do ambiente, ração apropriada (Purina ®), granulada (200g/dia) e água à vontade (Fig.3).

Os animais foram divididos, aleatoriamente, em quatro grupos de quatro animais cada, como mostra a tabela:

GRUPOS	TEMPO DE AVALIAÇÃO (dias)
GRUPO I	10
GRUPO II	10
GRUPO III	10
GRUPO IV	10

Tabela I - Disposição dos grupos testes e controle e momento de avaliação.

GRUPO I -(Controle)

Animais foram submetidos à cirurgia (confeção da loja cirúrgica padronizada), porém não receberam nenhum tipo de tratamento.

GRUPO II -Loja e Laser

Animais foram submetidos à cirurgia e laserterapia.

GRUPO III -Loja e PRP

Animais foram submetidos à cirurgia e colocação de PRP na loja.

GRUPO IV -Loja, PRP e laserterapia de baixa potência

Animais foram submetidos à cirurgia, colocação de PRP na loja e laserterapia com laser diodo de As-Ga -Al.(650 nm).

Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia do IP&D.

4.2 PRÉ-OPERATÓRIO:

Os animais foram submetidos à dieta zero, doze horas antes da intervenção cirúrgica e foram devidamente pesados.

Com intuito de diminuir o stress, os animais receberam uma medicação pré-anestésica, Acepran 1%(UNIVET-uso veterinário), via intramuscular (IM), na dose de 0,08 ml por animal, quinze minutos antes da aplicação do anestésico. Posteriormente, os animais foram anestesiados com anestésico geral Zoletil 50®(VIRBAC-uso veterinário), via IM na dose de 0,5 ml/kg (Fig. 4).

Após a anestesia, os animais foram submetidos à tricotomia da região a ser operada (região méso-anterior da tibia esquerda) (Fig.5). Realizou-se a seguir a delimitação da área a ser operada com lápis dermatográfico.

O animal foi posicionado na mesa cirúrgica, previamente coberta com pano de campo estéril, em decúbito lateral (Fig.6). Com álcool iodado promoveu-se assepsia da área, a qual foi, posteriormente, isolada com compressa cirúrgica estéril.

4.3 TEMPOS CIRÚRGICOS:

Utilizando-se de um bisturi cirúrgico descartável (lâmina n ° 15), realizou-se uma incisão, de maneira contínua, no sentido longitudinal, aproximadamente 10 cm, na porção méso-anterior da tibia esquerda (Fig.7). Os tecidos subcutâneo e muscular

foram divulsionados com auxílio de uma tesoura romba, permitindo, assim, acesso à região metafisária da tíbia, porém sem rompimento de fibras musculares (Fig.8).

O periósteo exposto foi incisionado e afastado com auxílio do destaca-perioste. Os vários planos teciduais foram afastados e estabilizados com fios de sutura (4.0 nylon preto-monofilamento poliamida, TechSyntlukens) e afastadores cirúrgicos de tecidos.

Realizada a exposição de tecido ósseo (Fig.9), foi procedida a marcação, previamente estipulada do local a ser confeccionada a loja cirúrgica (3 mm da fenda metafisária) da tíbia. Para tal marcação, três arruelas similares foram, previamente, mensuradas com um paquímetro de precisão (Fig.10). Foram realizadas as leituras do diâmetro do orifício interno das arruelas (3mm) e da distância entre as paredes interna e externa (3mm) (Fig.11).



Figura 3: - Coelhos acondicionados em gaiolas especiais



Figura 4: Medicação utilizada.



Figura 5: Tricotomia da área a ser operada.



Figura 6: Animal posicionado na mesa cirúrgica.

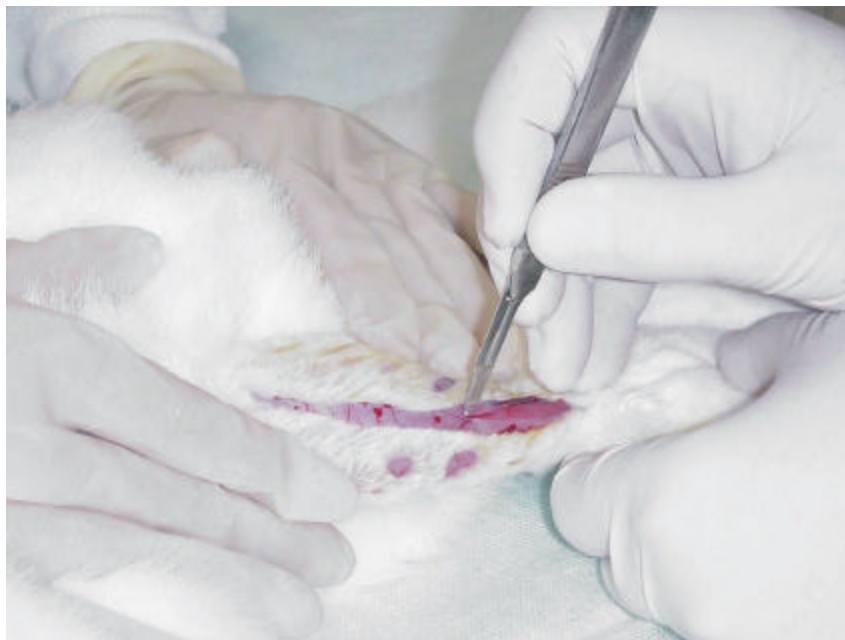


Figura 7: Incisão inicial da pele.



Figura 8: Divulsão dos tecidos subcutâneo e muscular.

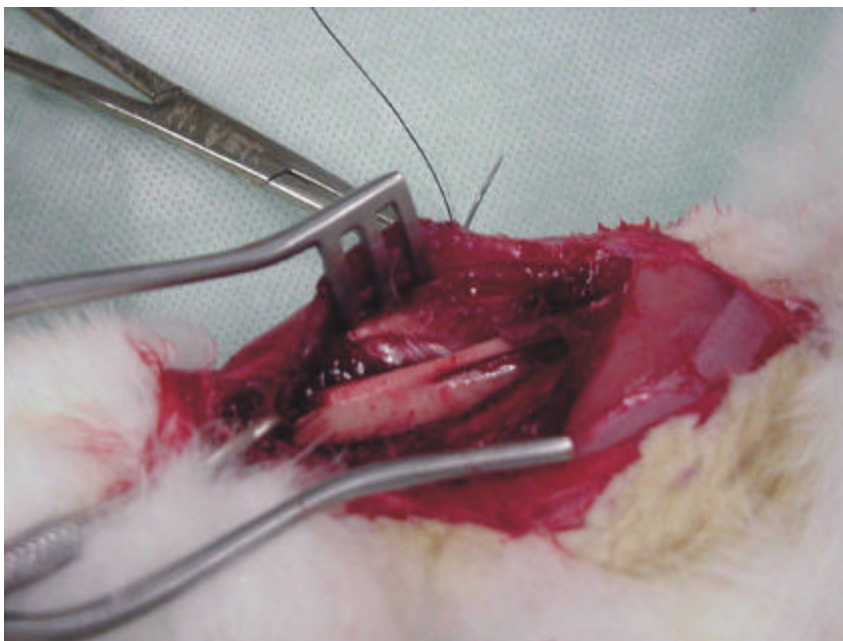


Figura 9: Exposição do tecido ósseo com visualização da fenda metafisária.

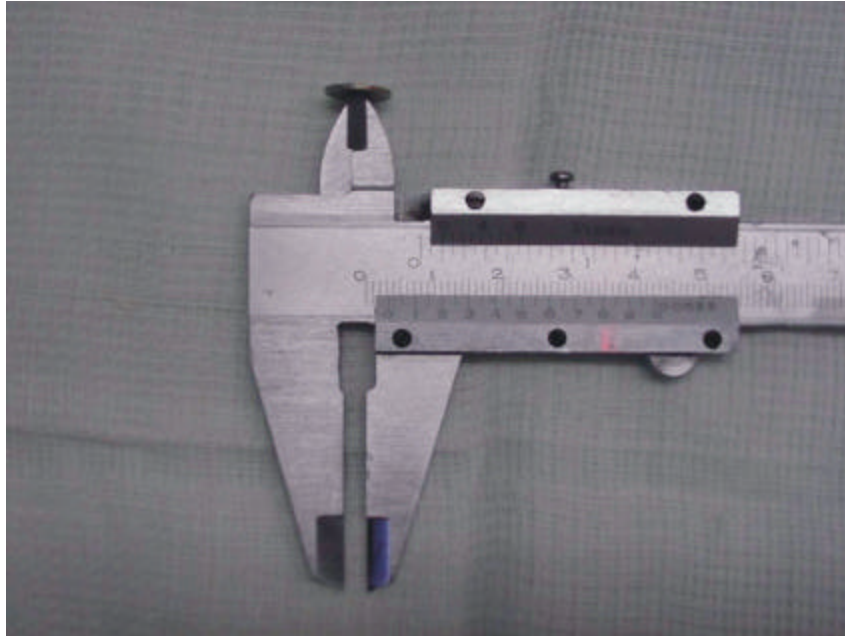
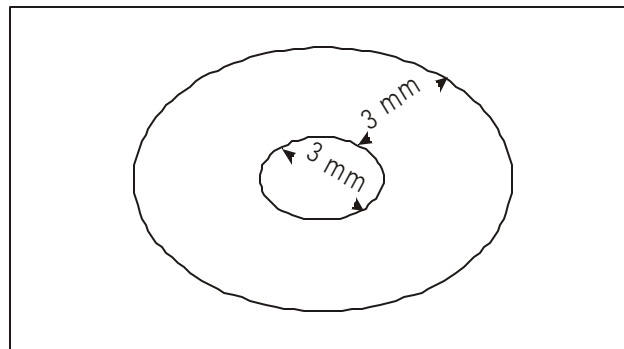


Figura 10: Mensuração da arruela com paquímetro de precisão.



Escala 1 : 6

Figura 11: Desenho esquemático das medidas tomadas como referência para confecção das lojas cirúrgicas padronizadas

Com os tecidos afastados, a arruela foi posicionada na extremidade distal da fenda metafisária, de maneira que a distância desta ao orifício fosse de 3mm, e que este estivesse situado na porção central da tibia no sentido méso-lateral.

Com um porta-agulha, a arruela foi estabilizada. O orifício central da arruela (3mm de diâmetro) foi utilizado como medida padrão para confecção da loja.

Inicialmente, uma broca guia, nº 1, marca Dentoflex foi adaptada a um contra-ângulo redutor de velocidade 16/1, marca NSK e este acoplado a um micromotor da marca DRILLER 100, com o propósito de direcionar a perfuração (Fig.12). Esta foi realizada posteriormente, utilizando uma seqüência de brocas esféricas de baixa rotação, nºs 2, 4 e 6, marca MAILLEFER. Uma broca cônica multilaminada, nº 6 foi utilizada para acabamento e alisamento das bordas da loja cirúrgica. A referência da profundidade da loja foi a resistência oferecida pela cortical oposta.

Durante todo o ato cirúrgico, abundante irrigação com solução de Ringer (cloreto de sódio com lactato de sódio) EQUIPLEX foi utilizado a fim de que danos térmicos não fossem causados ao tecido ósseo.

No momento da perfuração foi oferecido um apoio ao osso, com intuito de que as forças incididas sobre a área operada não provocassem uma fratura.

No grupo I (controle) após a confecção da loja, procedeu-se a reposição dos tecidos nos devidos planos, sendo que os internos foram suturados com ponto simples com vicryl trançado 3.0, absorvível, estéril da marca ETHICON e a derme e a epiderme suturados com nylon preto 4.0, estéril, não absorvível, da marca TECHSYNT (LUKENS), técnica em “u” ou “colchoeiro” para que as bordas ficassem bem próximos, evitando problemas de ruptura no pós-operatório (Fig.13 e14).

No grupo II, os animais foram submetidos à confecção da loja cirúrgica e laserterapia no trans e pós-cirúrgico (Fig.15 e 16).

No grupo III e IV, além dos procedimentos descritos, anteriormente, os animais foram submetidos à uma punção cardíaca com finalidade de obter o sangue total necessário para a preparação do plasma rico em plaquetas (PRP), antes da reposição dos tecidos e suturas.

Uma vez confeccionada a loja cirúrgica, esta foi protegida com gaze embebida em solução de Ringer e procedeu-se a punção cardíaca.

Inicialmente, por meio de palpação foi localizada a junção costo-condral e o dedo indicador levemente deslocado até a região entre 3º e 4º vértebras. Neste local foi

realizada a punção cardíaca, em nível de ventrículo e 9 ml de sangue foram aspirados com uma seringa de 12ml, descartável, contendo 0,5ml de citrato de sódio 10%, previamente preparado (Fig.17). A seguir, a seringa foi levemente agitada e o sangue total com o citrato dividido em dois tubos secos, estéreis de 5ml (BD Vacuntainer), sendo colocado 4,5ml em cada tubo, para cada animal.

Os tubos foram posicionados em uma centrífuga, com 8 cm de raio, marca FANEM (modelo Baby), dispostos de maneira que ficassem opostos e equidistantes do centro (Fig.18). O sangue total foi centrifugado durante seis minutos a uma velocidade de 1400 RPM. Após a centrifugação, o sangue total no tubo apresenta as seguintes fases distintas perceptíveis pela cor: fase vermelha no fundo (células vermelhas do sangue) e uma camada mais superficial amarelada (camurçada), o plasma, a partir do qual foi obtido o PRP (Fig.19).

Esta fase amarelada (plasma), foi dividida em quatro subfases. Utilizando-se uma pipeta automática, regulável, marca EPPENDORF, de 500 mcl, as duas subfases mais superficiais (plasma pobre em plaquetas e plasma intermediário) dos dois tubos centrifugados foram pipetadas e descartadas em um tubo seco estéril, 5,0ml (BD VACUNTAINER).

Posteriormente, a subfase rica em plaquetas foi pipetada e acondicionada em um tubo seco, estéril (BD VACUNTAINER) e a seguir a subfase leucoplaquetária foi pipetada e acondicionada em outro tubo (Fig.20). O tubo 1 foi descartado, o tubo 2 reservado para complemento caso necessário e o tubo 3 foi utilizado para obtenção do PRP, por apresentar alta concentração de plaquetas.

Com uma pipeta automática, regulável, marca GILSON foram adicionadas ao tubo 3 e 6 gotas de gluconato de cálcio 10%, a fim de reverter a ação do citrato. Em seqüência levado à banho maria, por aproximadamente 5 a 10 minutos, a fim de acelerar a formação do gel plaquetário (Fig .21).



Figura 12: Equipamento utilizado – motor.



Figura 13: Sutura dos planos internos.



Figura 14: Sutura de pele.

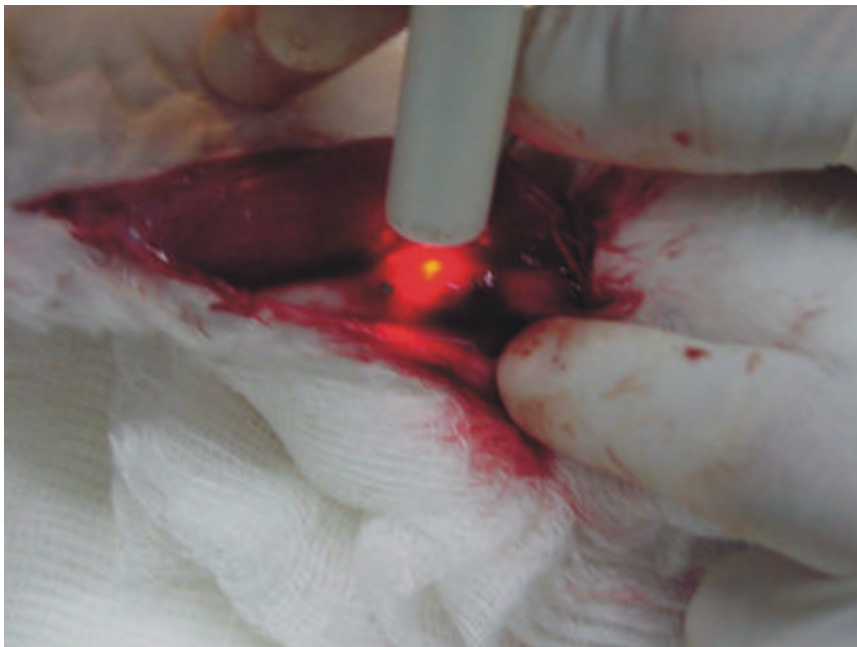


Figura 15: Aplicação do LBP no trans-operatório.



Figura 16: Aplicação do LBP no pós-operatório imediato.



Figura 17: Realização da punção cardíaca.



Figura 18: Disposição dos tubos na centrífuga.

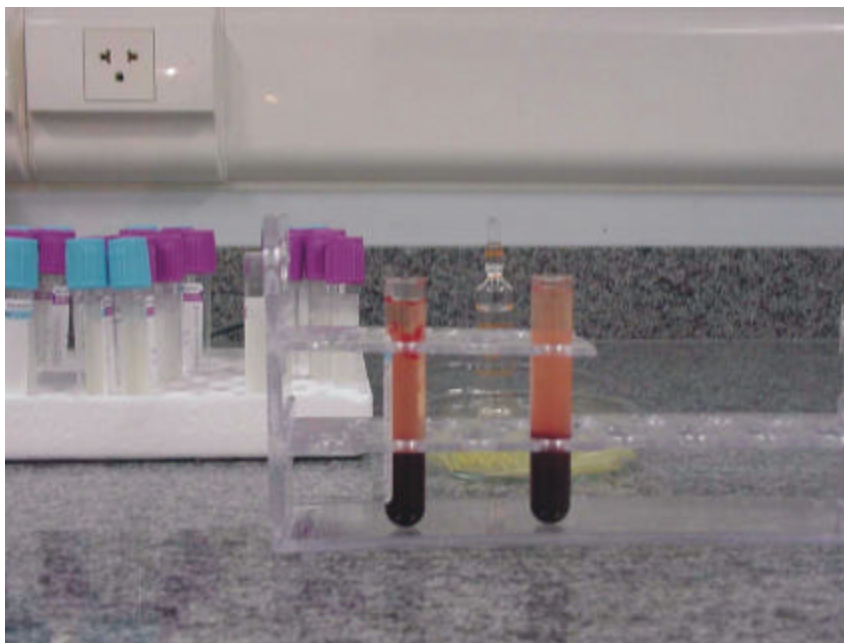


Figura 19: Sangue total após centrifugação.

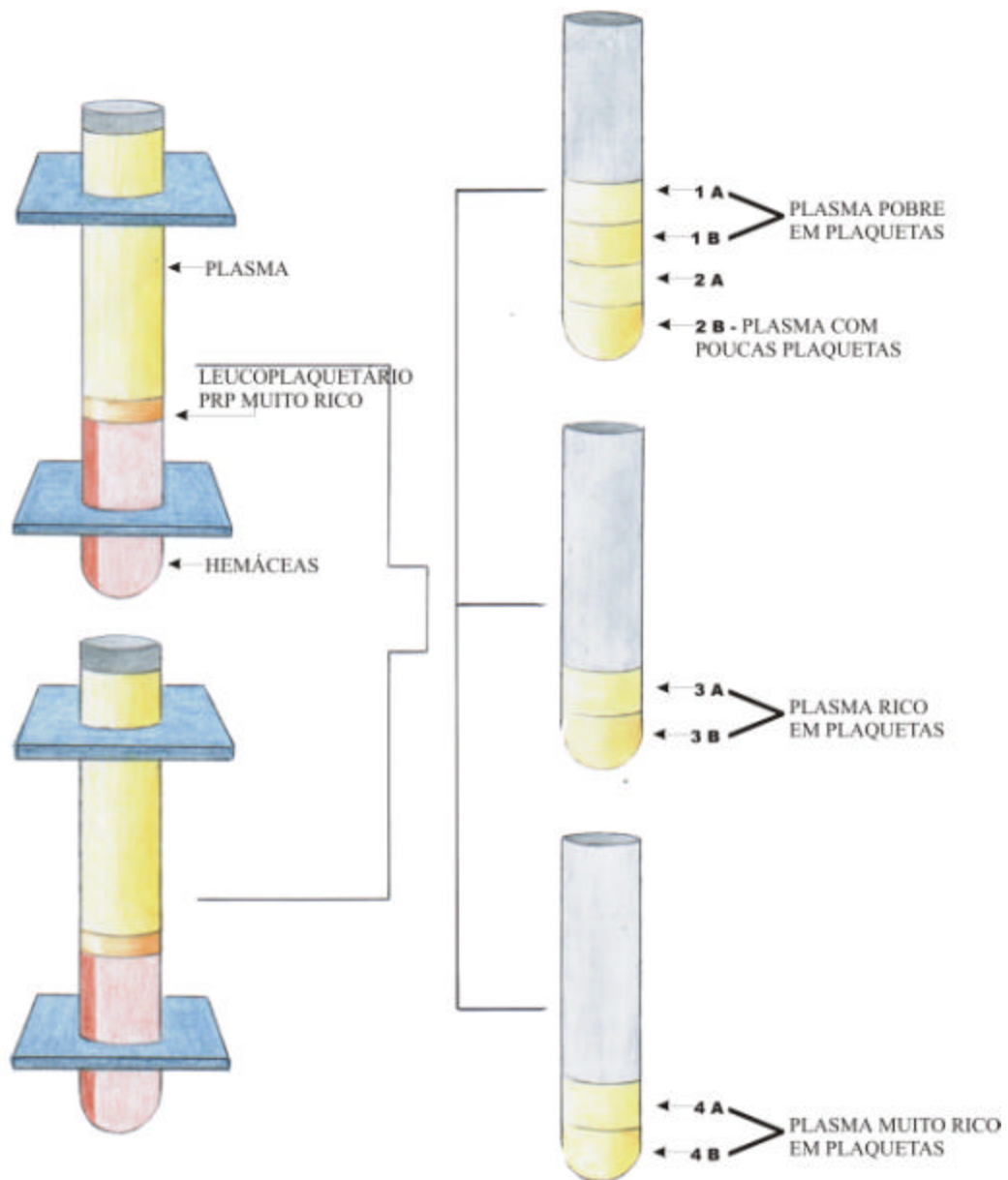


Figura 20: Desenho esquemático mostrando separação das fases do plasma em tubos distintos.



Figura 21 – Tubos em banho-maria (37°) após adição de gluconato de cálcio 10%.

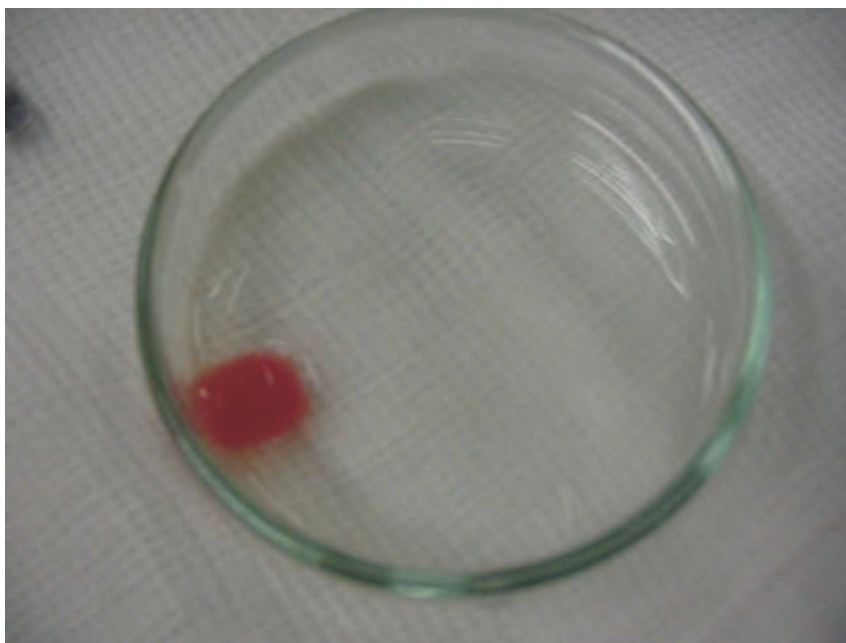


Figura 22 – Obtenção do gel plaquetário.

Uma vez obtido, o PRP foi, então, conduzido e acondicionado no interior da loja cirúrgica com auxílio de uma cureta e a seguir realizadas a reposição dos tecidos nos devidos locais e suturas (Fig. 22 e 23).

Nos grupos II e IV, os animais foram submetidos à laserterapia no trans e pós-cirúrgico.

O equipamento utilizado foi um laser de baixa potência, do tipo diodo semiconductor As-Ga-Al (650 nm) (fig. 24). O protocolo utilizado foi o seguinte conforme mostra a tabela:

PARÂMETRO DE IRRADIAÇÃO	VALORES
Densidade de energia	5 J/cm ²
Potência	5,0 x 10 ⁻³ W
Comprimento de onda	660 - 680 nm
Área do feixe	0,08 cm ²
Distância do local	1 cm
Tempo	1.20 minutos
Sistema	Pontual

Tabela II: Protocolo de irradiação com laser de As-Ga-Al (DERMOLASER).

No trans-operatório foram depositados 5 J/cm² sobre a loja cirúrgica e após a sutura foram depositados mais 15 J/cm², sendo que estes foram distribuídos em três pontos distintos, ao redor da área operada, 5 J/cm² em cada. Posteriormente, o laser foi aplicado após as primeiras 24 horas e a seguir no 3º, 5º, 7º e 9º dias após a cirurgia, seguindo o seguinte protocolo: aplicação pontual, depositando uma dosimetria

energética de $20\text{J}/\text{cm}^2$ em quatro pontos equidistantes entre si ($5\text{J}/\text{cm}^2$ cada, em um período de 1.20 minutos), na região operada, previamente demarcada com lápis dermatográfico.



Figura 23- Colocação do gel na cavidade

4.4 SACRIFÍCIO:

O sacrifício dos animais foi realizado no 10º dia após o ato cirúrgico, com uma overdose de anestésico pentobarbital (HYPNOL 100 mg-CRISTALIA), administrada na veia marginal da orelha. Em seqüência, as peças anatômicas foram obtidas e acondicionados em frascos de vidro, contendo solução fixadora (formalina a 10%).



Figura 24 –Laser de diodo utilizado.

4.5 TÉCNICA HISTOLÓGICA:

Após o sacrifício, as peças anatômicas (tíbia esquerda) foram obtidas e dissecadas, cuidadosamente. Os ossos foram, então, acondicionados em recipientes de vidro, previamente rotulados, de acordo com o grupo pertencente, contendo uma solução fixadora (formol 10%) impedindo assim, a degradação das mesmas. Em seguida, utilizou-se um descalcificador, EDTA (Etilenodiaminotetracetato de tetrasódio), na forma de solução aquosa a 10 % neutralizado com Hidróxido de Sódio para dar pH 7,0. O tempo de descalcificação foi de 27 dias.

Posteriormente, as peças foram lavadas em água corrente para retirar o excesso de descalcificador. A seguir foram, progressivamente, desidratadas pela passagem sucessiva em soluções alcoólicas (álcool 70° ao absoluto III-III (3 vezes), uma hora em cada) até que a água intrínseca do tecido e a água do fixador fossem removidas e que as amostras ficassem completamente permeadas pelo álcool absoluto .

Procedeu-se, então, a diafanização em xilol I-II-III, 30 minutos, em cada. Em seqüência, as peças foram imersas em parafina derretida (62 °) III-III, 30 minutos em

cada, o que permitiu a impregnação ou infiltração destas. As peças emblocadas foram, posteriormente, cortadas com o auxílio de um micrótomo de parafina (rotativo).

Foram realizados cortes longitudinais, semi-seriados, com intervalo de 10 cortes, possibilitando a avaliação em profundidade. A parafina funcionando como um suporte físico, possibilitou a obtenção de cortes finos (7 micrômetros de espessura sem deformação da estrutura e da arquitetura celular. Os cortes foram desparafinados utilizando para tal xilol, durante 10 minutos e em seguida foram reidratados através da passagem por uma série gradativa de soluções alcoólicas (álcool absoluto, álcool 95°, álcool 80°, álcool 70°), durante 2 minutos em cada. Em seguida, lavados durante 10 minutos e posteriormente corados com Hematoxilina e Eosina .

Os cortes foram corados com hematoxilina por 2 minutos, lavados durante 10 minutos, corados com eosina durante 1 minuto e novamente lavados com água destilada. Os cortes corados foram desidratados com álcool (álcool 70°, 80°, 95°, absoluto I-II-III) durante 2 minutos em cada, diafanizados com xilol I-II-III, 5 minutos em cada e montados, usando-se um meio de montagem não aquoso (Entellan ou Bálsamo do Canadá). Os cortes semi-seriados foram montados em lâminas (Fig.25).

Foi realizado um estudo histológico dos cortes longitudinais dos específicos grupos, avaliando a evolução do processo de regeneração óssea, no 10^o dia. Para avaliação das lâminas foi utilizada a microscopia óptica (Microscópio Óptico, marca Olympus), a qual possibilitou a análise comparativa dos detalhes estruturais em três aumentos, (4/0.10, 10/0.25, 40/0.65) (Fig.26). Fotografias das lâminas foram realizadas utilizando uma Câmera Pentax MZ-M acoplada a um Microscópio Lambda LMR-2, nos aumentos (4 x 2,5, 10 x 2,5, 40 x 2,5).



Figura 25- desenho esquemático da montagem das lâminas para análise histológica.



Figura 26- Caixa de lâminas e peças emblocadas em parafina.

5- RESULTADOS:

5.1 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA:

A análise histológica do processo de regeneração óssea, por volta do 10º- dia pós-cirúrgico apresentou os seguintes resultados: No Grupo I (controle), em menor aumento (4 x 2,5) , pode-se observar loja cirúrgica circundada por tecido ósseo maduro. Na periferia da loja, tecido conjuntivo altamente imaturo, alterna-se com algumas espículas ósseas neoformadas. No centro da loja, grande quantidade de infiltrado inflamatório. Hemólise central do coágulo é, progressivamente, substituída por tecido de capilares neoformados (Figs. 27, 28 e 29).

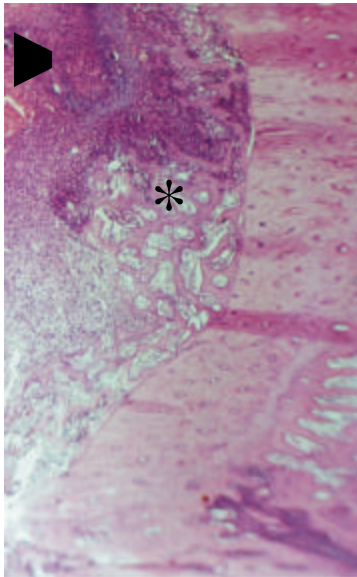


Figura 27-Cobaia A

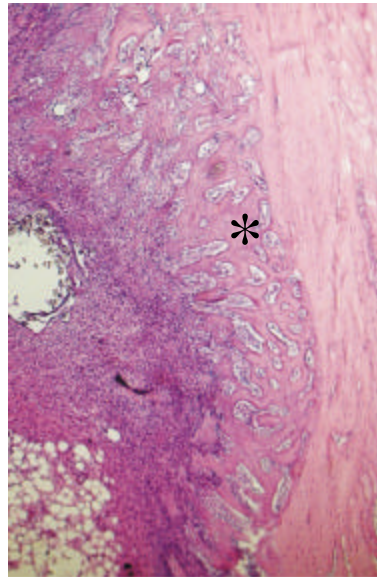


Figura 28-Cobaia B

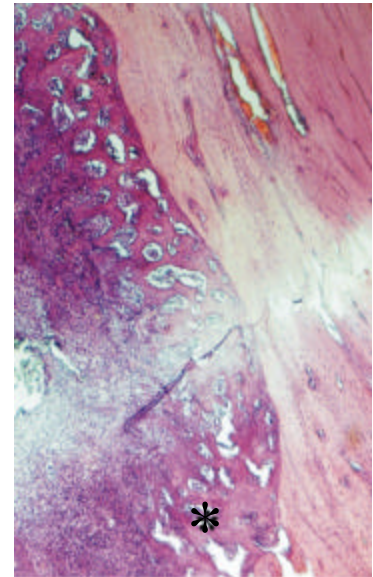


Figura 29-Cobaia C

Figuras 27, 28 e 29 -Grupo I (Controle). Fotomicrografias das lojas cirúrgicas, evidenciando espículas ósseas imaturas, na periferia (*), tecido conjuntivo neoformado e hemólise do coágulo na região central (▶). (4 x 2,5) .

Tecido osteóide se deposita entre camada de osteoblastos ativos e trabéculas ósseas imaturas, na periferia da loja. Vasos sanguíneos neoformados podem ser vistos entre estas.

No Grupo II (loja e laser), pode-se verificar grande quantidade de trabéculas neoformadas dispostas da periferia para a região central. A organização celular no

centro da loja é bem avançada e caracterizada pela existência de um tecido de granulação e infiltrado inflamatório (Figs. 30, 31, 32 e 33).

Osteoblastos ativos se mostram cubóides e basófilos revestindo todas as superfícies das trabéculas neoformadas com osteóide. Prolongamentos citoplasmáticos dos osteoblastos e células mais alongadas, próximas destes (células osteoprogenitoras), podem ser vistos (Fig.34).

Neoformação capilar é observada entre as espículas imaturas e tecido de granulação (Fig. 35).

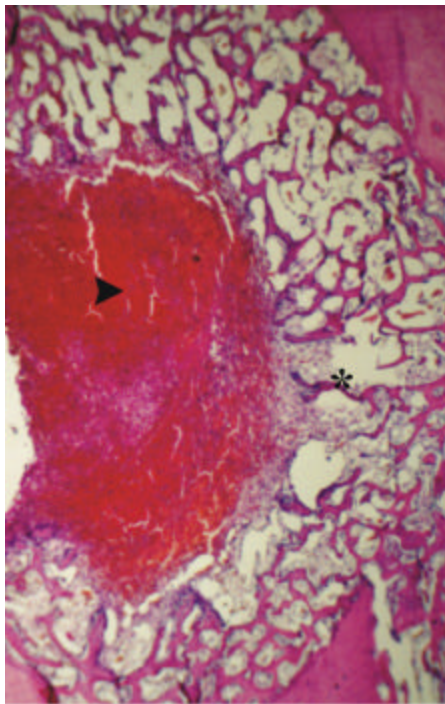


Figura 30 - Cobaia A, Grupo II

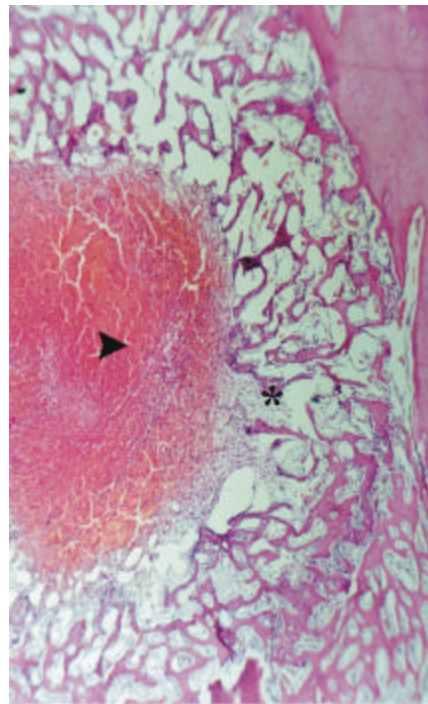


Figura 31 - Cobaia B, Grupo II

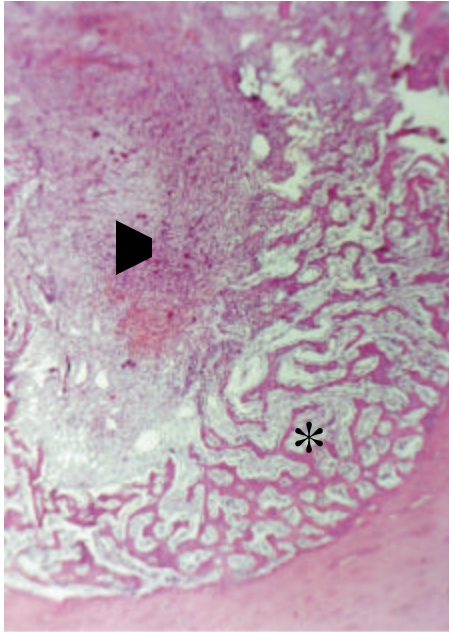


Figura 32 -Cobaia C, Grupo II

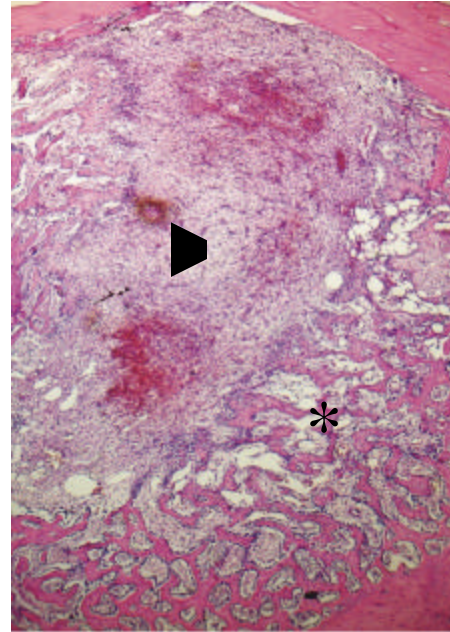


Figura 33 -Cobaia D, Grupo II

Figuras 30, 31, 32 e 33 - Grupo II (Loja e Laser). Fotomicrografias mostrando espessura da camada trabecular imatura, na periferia das lojas cirúrgicas (*) e região central com tecido de granulação e infiltrado inflamatório (▶).

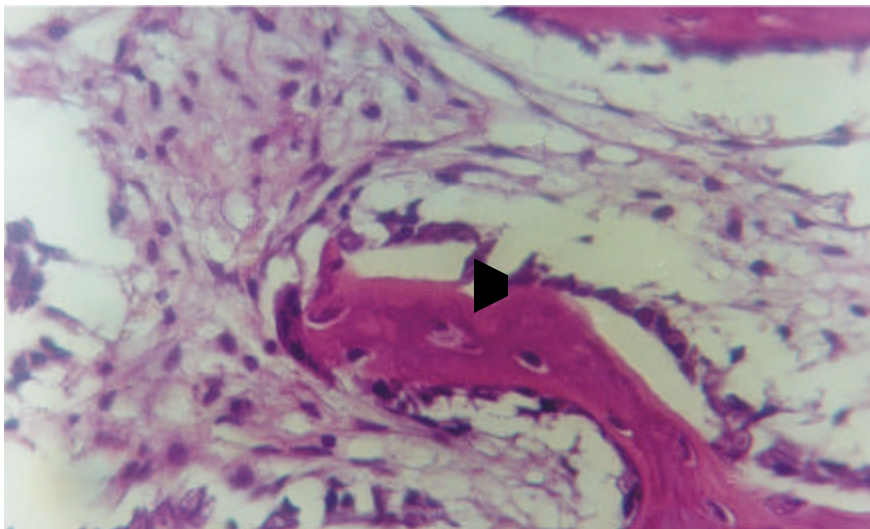


Figura 34- Grupo II (Loja e laser). Fotomicrografia evidenciando região trabecular, focando osteoblastos, seus prolongamentos citoplasmáticos (▶) e células osteoprogenitoras (alongadas) (40 x 2,5).

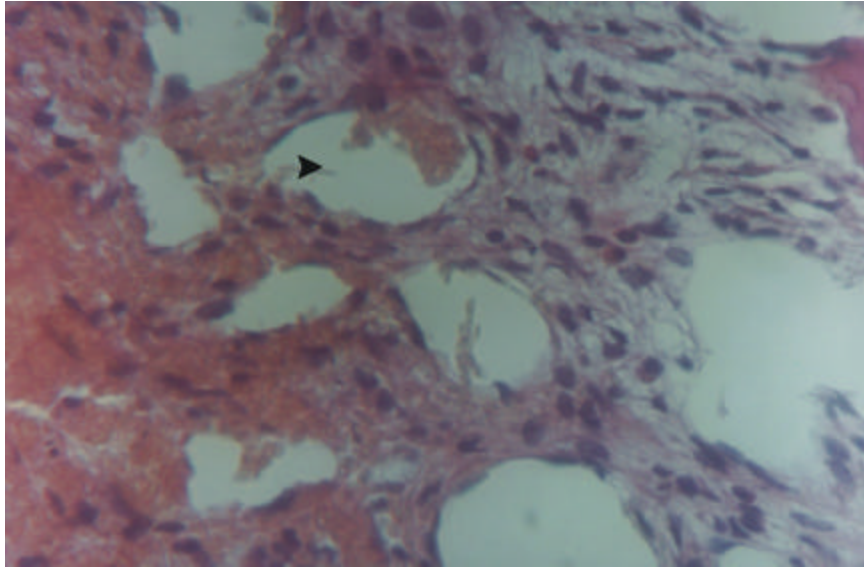


Figura 35-Grupo II (Loja e Laser). Fotomicrografia mostrando neoformação capilar (►) (40 x 2,5).

No Grupo III (PRP) uma espessa camada de trabéculas imaturas pode ser vista disposta da periferia para o centro, quando comparada com Grupo I. Tecido de granulação, infiltrado inflamatório e remanescente de gel plaquetário se concentram na região mais central da loja (Fig.36 e 37).

Trabéculas imaturas aprisionam osteócitos. Osteoblastos ativos revestem jovens trabéculas. Grande quantidade de vasos neoformados são vistos entre estas (Fig.38).

Resquício de gel plaquetário pode ser visto em maior aumento, no centro da loja (Fig.39).

Em alguns pontos da periferia da loja, tecido conjuntivo bem vascularizado ainda está presente (Fig.40).

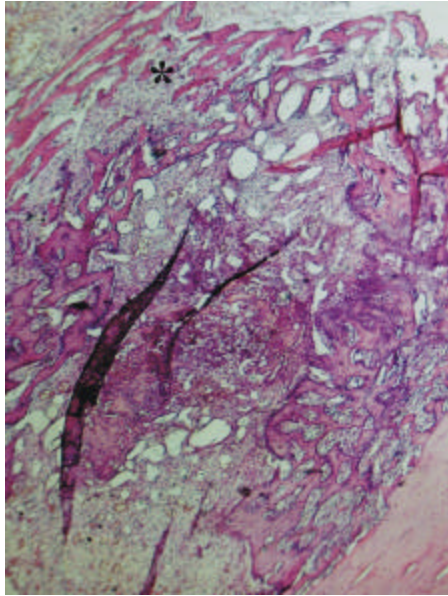


Figura 36 -Cobaia A

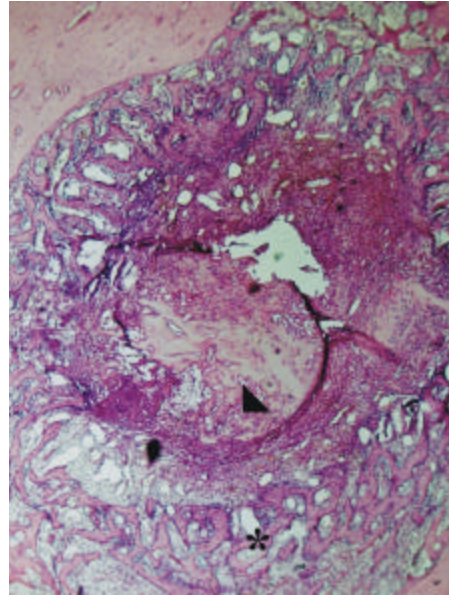


Figura 37 -Cobaia B

Figura 36 e 37 -Grupo III (PRP). Fotomicrografias das lojas mostrando camada espessa de trabéculas neoformadas (*), na periferia e remanescente de gel plaquetário ao centro, destas. (▶) (4 x 2,5).

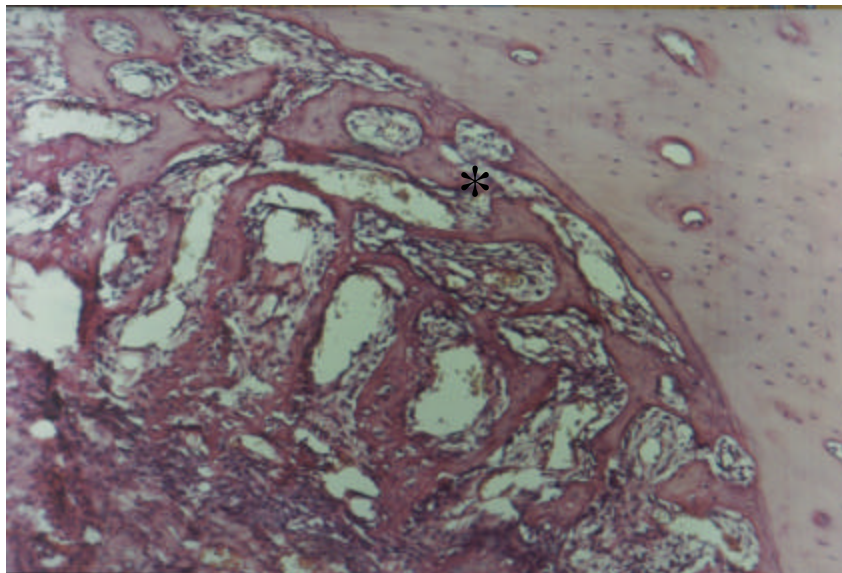


Figura 38 – Grupo III (PRP). Fotomicrografia da região trabecular, na periferia da loja exibindo osteoblastos ativos, osteócitos e vasos neoformados (*) (10 x 2,5).

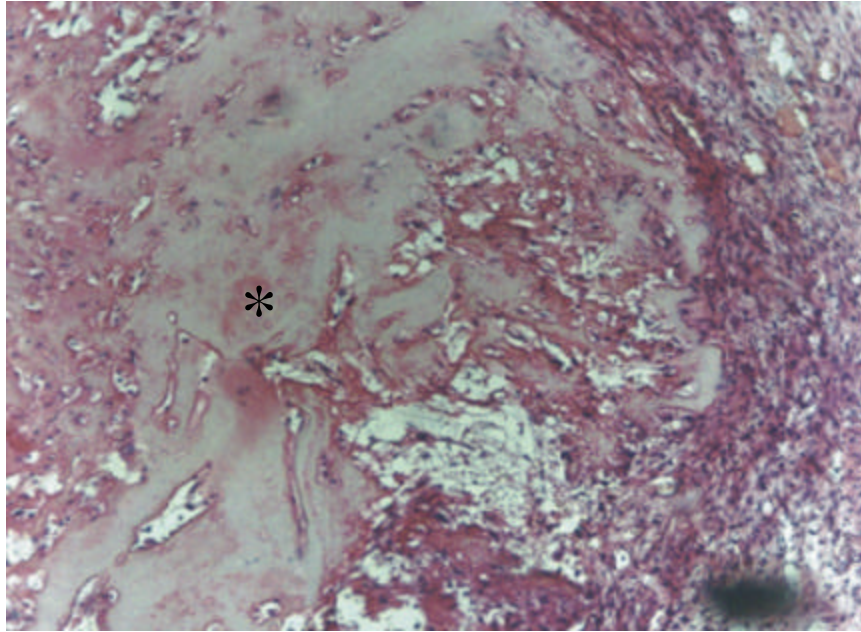


Figura 39- Grupo III (PRP). Fotomicrografia do centro da loja, exibindo remanescente de gel plaquetário (*) (10 x 2,5).

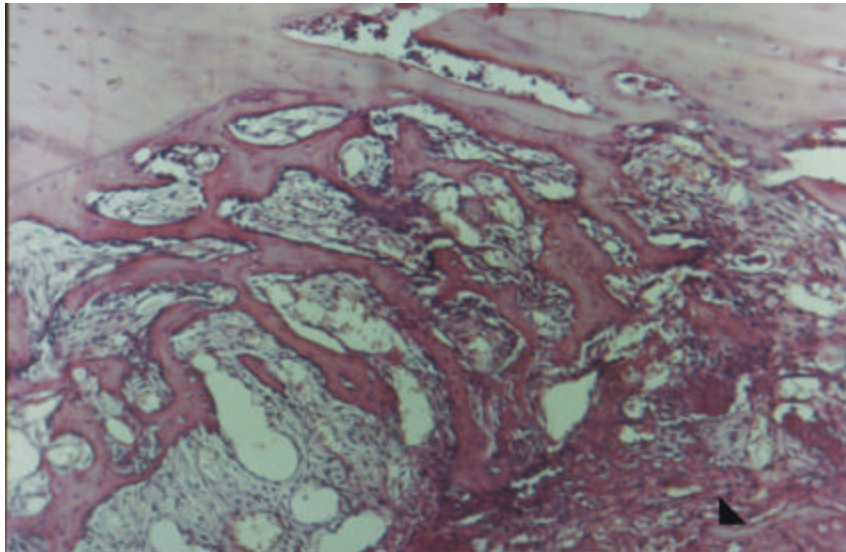


Figura 40 - Grupo III (PRP). Fotomicrografia evidenciando tecido conjuntivo presente na periferia da loja (▴) (4 x 2, 5).

No Grupo IV (PRP e Laser) discreta formação trabecular pode ser observada em alguns pontos, na periferia do defeito. Loja ocupada quase que totalmente pelo

concentrado plaquetário e pouco infiltrado inflamatório pode ser visto (Fig.41, 42 e 43 e 44). Infiltrado inflamatório indica início da dissolução do gel plaquetário (Fig . 45).

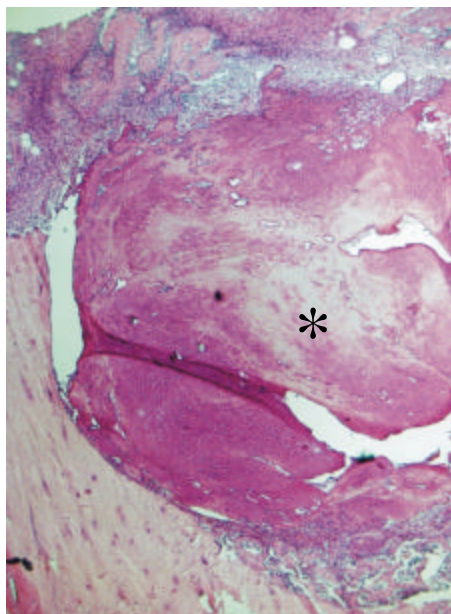


Figura 41 - Animal A - Grupo IV

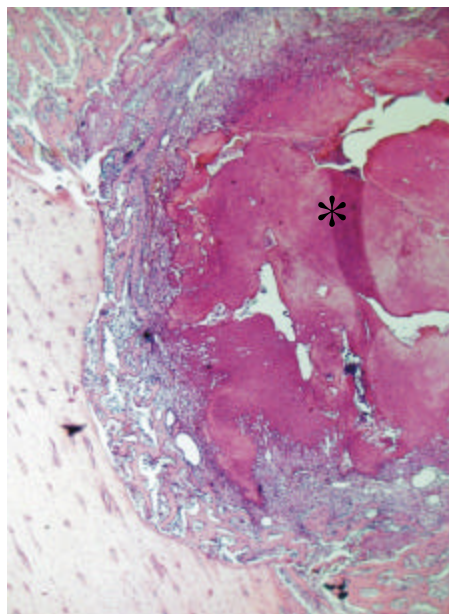


Figura 42 - Animal B - Grupo IV

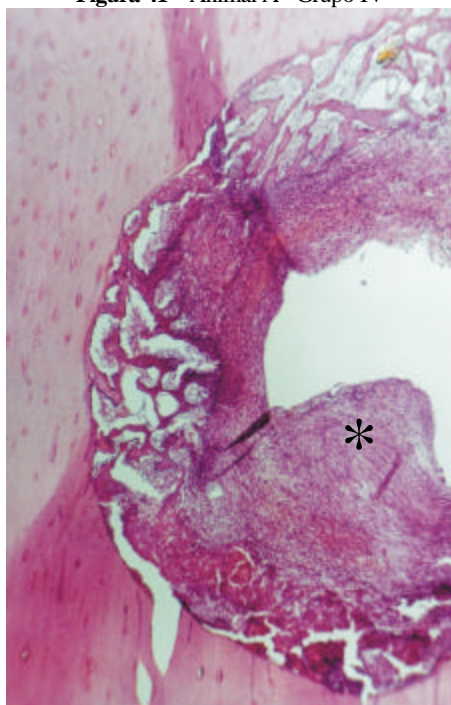


Figura 43 - Animal C - Grupo IV

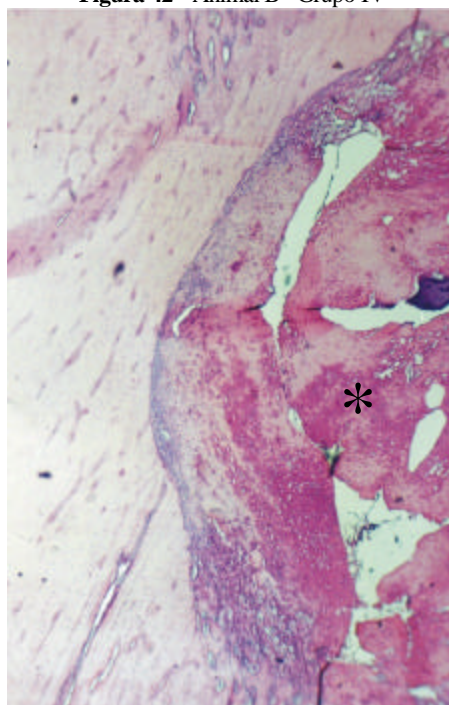


Figura 44 - Animal D - Grupo IV

Figuras 41, 42, 43 e 44. Gel plaquetário ocupando centro da loja(*) (4x2,5).

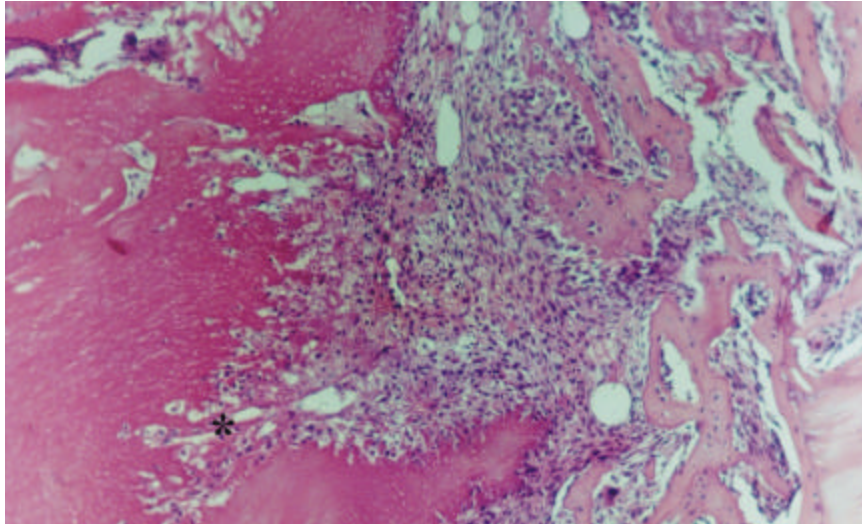


Figura 45-Grupo IV (PRP e Laser). Fotomicrografia evidenciando células do infiltrado inflamatório iniciando dissolução do gel plaquetário (*) (10 x 2,5).

Um maior aumento da região trabecular neoformada exhibe osteoblastos ativos e vasos capilares (Fig.46).

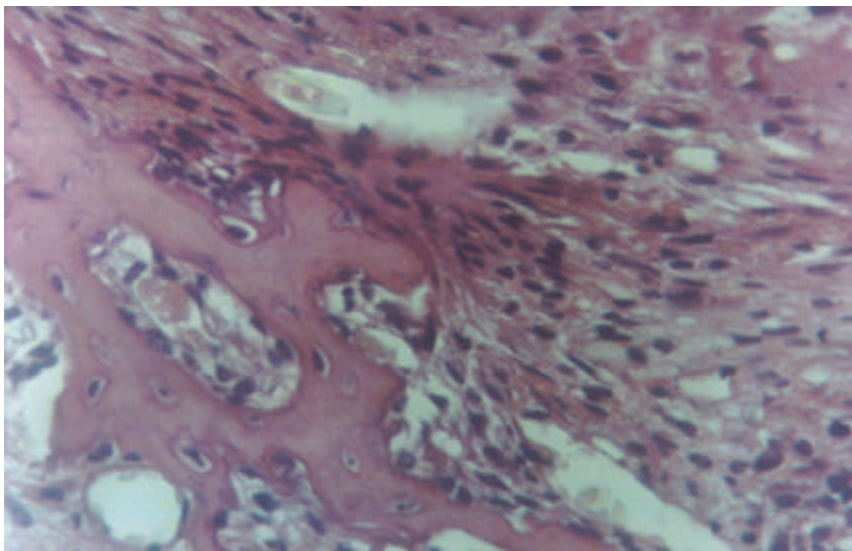


Figura 46 – Grupo IV (PRP e Laser). Fotomicrografia mostrando osteoblastos ativos e neovascularização. (40 x 2,5).

6 - DISCUSSÃO:

O presente trabalho avaliou a utilização da terapia com plasma rico em plaquetas (PRP) isolada e / ou associada à terapia com laser de baixa potência (As -Ga -Al) no processo de regeneração óssea.

Durante o ato cirúrgico alguns parâmetros importantes foram considerados, dentre eles, a padronização do local e dimensão da loja cirúrgica, o que possibilitou uma análise uniforme dos cortes histológicos. Também a padronização da incisão e divulsão dos tecidos cutâneo e muscular respectivamente, permitiu um processo de reparação regido por estímulos extrínsecos (incisão e divulsão) de intensidade relativamente igual em todos os animais, reduzindo dessa maneira a inclusão de variáveis.

Nos Grupos II e IV cujos animais foram irradiados, o aparelho utilizado foi um laser de diodo de Arseniato-Gálio-Alumínio, o qual segundo KOLARI (1985) e HEUSSLER ET AL (1993) tem mostrado ser simples, seguro e eficiente nos estudos bem controlados, além de fornecer um feixe de luz monocromático, coerente e colimado, características que asseguram a penetração. Tal aparelho se encontra dentro dos limites de sensibilidade de potência e densidade de energia para promover efeitos biológicos sem dano tecidual. (OSHIRO, 1991).

Os efeitos do LBP são baseados nos mecanismos não térmicos (BASFORD, 1995; KITCHEN e BAZIN, 1996), ou seja, a partir da interação da luz com o tecido pode influenciar nas funções celulares, tais como, estimulação ou inibição de atividades bioquímicas, fisiológicas e proliferativas promovendo efeitos de biomodulação. Porém a magnitude do efeito depende do comprimento de onda empregado, da intensidade do laser e do número de doses (BECKERMAN ET AL, 1992).

O comprimento de onda eleito (660nm) está de acordo com KARU (1989), que menciona que os componentes celulares, fotorreceptores, presentes no ciclo respiratório são capazes de absorver energia da radiação laser na região do espectro eletromagnético com comprimento de onda entre 600-700 nm (região visível). Nessa região, a energia absorvida estimula a cadeia respiratória, aumentando a produção de ATP (WILDEN e KARTHEIN, 1998).

De acordo com GENOVESE (2000), a densidade de energia é um dado importante que favorecerá um parâmetro de medição de eficácia e referência à

repetibilidade da terapia. COLLS (1984) citou que os valores de densidade de energia variam de acordo com o efeito desejado, como: efeito antiálgico (de 2 a 4 J/cm²), efeito antiinflamatório (1 a 3 J/cm²), efeito regenerativo (3 a 6 J/cm²) e efeito circulatório (1 a 3 J/cm²). Contudo, o profissional pode variar ou alterar essas doses em função da resposta do paciente e/ou tipo da lesão, desde que não ultrapasse a dosimetria de 12 J/cm², o que poderia produzir um efeito inibidor e mesmo de rebote.

O protocolo de aplicação utilizado foi baseado na metodologia proposta por GENOVESE (2000) já utilizado na prática clínica, quando envolvendo procedimentos cirúrgicos. Parte da dosimetria total é aplicada no trans-cirúrgico (6 a 8J/cm²) e parte no pós-cirúrgico imediato, sobre a sutura (8 J/cm²), com os efeitos de bioestimulante, analgésico e antiinflamatório, devendo continuar nas 24 , 48 e 72 horas seguintes. Dessa maneira, a dosimetria total (20 J/cm²) foi dividida no trans-operatório (5J/cm²) e no pós-operatório (15J/cm²) sendo distribuídos em 3 pontos equidistantes, de forma pontual e no 1º-, 3º-, 5º-, 7º- e 9º- dias subseqüentes. De acordo com GENOVESE (2000), o número de sessões é variável (1 a 12), diariamente, a cada 48 horas ou semanalmente.

Os resultados obtidos nos animais do Grupo I (controle) sugerem que o processo de regeneração óssea primária, fisiológica, ocorreu de maneira semelhante à descrita por OKAMOTO e RUSSO (1973) apresentando, cronologicamente, uma proliferação celular, desenvolvimento de tecido conjuntivo e início de deposição óssea.

A análise dos resultados obtidos nos animais do Grupo II, irradiados com laser de diodo As-Ga-Al (660 nm), sugere processo de regeneração óssea primária mais favorável, quando comparado com Grupo I (controle), exibindo uma organização celular na área do defeito bem avançada, caracterizada pela existência de tecido de granulação, grande quantidade de trabéculas imaturas e vasos sanguíneos neoformados. Estas observações estão em conformidade com os achados de BENEDICENTI (1982b), que menciona que os efeitos bioestimulantes da luz laser atuam no fisiologismo celular, acelerando a produção de ATP das mitocôndrias. Para MESTER (1974) esta alteração nas estruturas da mitocôndria promovem aumento da síntese de colágeno e incremento do tecido conjuntivo. O autor relata, ainda, que um dos fatores mais benéficos atribuídos ao LBP, para a melhora na reparação tecidual em feridas cirúrgicas, dá-se pelo desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, fato

observado no Grupo II. Também, em 1994, TRELLES e MAYAYO demonstraram que o laser de baixa potência aumenta a celularidade nos tecidos irradiados por aceleração dos processos de mitose, principalmente no processo de cicatrização de lesões, propiciando maior vascularização com abundante formação de tecido de granulação (PIMENTA, 1990).

Para CONWAY (1952) na cicatrização de feridas cirúrgicas, a formação de tecido de granulação é um dos fatores de maior importância. Segundo LINDNER (1962) esta formação está relacionada com o metabolismo de fibroblastos, o que nos leva a crer que nos animais irradiados houve um estímulo, promovendo a gênese mais precoce do tecido de granulação.

A evidência da aceleração no processo de regeneração óssea primária observada no Grupo II quando comparada com Grupo I, sugere que a radiação laser estimulou estágios iniciais da reparação óssea, fato este verificado nos estudos de TAKEDA (1988); NICCOLI (1991); GARCIA (1995b), fortalecendo os achados de ANIC (1988).

Avaliação dos resultados obtidos nos animais do Grupo III, que receberam plasma rico (PRP) sugeriu uma potencialização no processo de regeneração óssea primária quando comparada com o Grupo I (controle), em decorrência do alto índice de formação de trabéculas. GARG (1999a) menciona que estudos com PRP têm apresentado prematura consolidação e mineralização, na metade do tempo, com 15 a 30% de ganho efetivo na necessidade de osso trabecular.

A literatura tem teorizado que a quantidade acentuada de fatores de crescimento do PRP inicia a atividade das células ósseas indiferenciadas de forma mais completa do que ocorreria, naturalmente, no enxerto e na área de coagulação, o que leva a um aumento ou melhoria do caminho natural da regeneração óssea. (MARX, 1999; GARG, 1999b).

LENHARO e COSSO (2001) relatam que a potencialização ocorre em função do alto grau de células diferenciadas a partir dos processos de especificidade celular a cada região onde os fatores de crescimento agem, o que demonstra que as plaquetas são fontes ricas de PDGF e TGF- β , condicionando uma ótima regeneração tecidual.

MARX (1999) relata que a regeneração óssea mais rápida e com qualidade elevada deve-se ao fato de que os osteoblastos, quando testados com anticorpo monoclonado para receptores de PDGF, TGF- β_1 , TGF- β_2 e IGF, demonstraram resultados positivos.

O PRP utilizado foi obtido no trans-operatório, que de acordo com WHITMAN (1997) reduz os riscos de uma pré-doação, bem como, preserva a função máxima das plaquetas (RAVEL, 1997). Ainda, de acordo com WHITMAN (1997), por ser fruto de uma preparação autógena realizada durante o procedimento cirúrgico, o uso de PRP reduz o risco de transmissão de doenças infecto-contagiosas.

A utilização do PRP como modulador dos processos cicatriciais, tem como estratégia a exploração dos caminhos naturais da regeneração a partir da presença de todos os fatores de crescimento neles contidos (MARX, 1998). Porém, MARX (1999) cita como inconveniente, o curto período de vida das plaquetas no gel, uma vez que todas as plaquetas fragmentam-se em torno de 3 a 5 dias e atividade de seus fatores se extinguem por volta de 7 a 10 dias.

Os resultados obtidos nos animais do Grupo IV, submetidos à ambas terapias não foram promissores, sugerindo um retardo no processo inicial da regeneração óssea, quando comparado com os demais grupos, evidenciado pela discreta formação de trabéculas em apenas alguns pontos da periferia da loja e presença marcante do concentrado plaquetário ocupando, quase que totalmente o interior desta. Esses resultados fortalecem os achados de ARORA e MUELLER (1993), que demonstraram que exposição de PRP à irradiação laser durante 30 segundos reduziu o limiar de concentração de adenosina difosfato e L-epinefrina, necessárias para completar agregação plaquetária.

BRILL ET AL (2000) avaliaram o efeito da radiação laser de He-Ne (632,8 nm, 7mW) na adesão, ativação e desgranulação plaquetárias. A irradiação laser foi seguida pelo decréscimo na adesão e agregação plaquetária. A irradiação laser de ambos PRP e gel infiltrado de plaquetas revelou marcada redução na resposta plaquetária para ambos receptor e ativador peptide de trombina.

Porém, Al-WATBAN e ANDRES (2000) obtiveram resultados positivos em experimento utilizando, simultaneamente, laser de He-Ne (632,8nm) e fatores de crescimento na proliferação celular .

Considerando a metodologia empregada e os resultados observados neste estudo, a terapia com LBP e a terapia com PRP favorecem o processo de regeneração óssea primária, quando utilizadas isoladamente. Entretanto, frente a controvérsias, sugiro mais estudos os quais possam explicar melhor os benefícios dessas modalidades terapêuticas na cicatrização de feridas e neoformação óssea .

7- CONCLUSÕES:

Diante do exposto podemos concluir:

1. Os resultados mais favoráveis foram nos Grupos II e III, quando do uso isolado das terapias com laser de diodo (As-Ga-Al) e com PRP, respectivamente, sendo que mais evidente no Grupo II, em função da maior formação trabecular.
2. A julgar pelos resultados obtidos, a associação das terapias não promoveu aceleração na cronologia do processo de regeneração óssea.
3. A terapia com LBP mostrou-se eficaz na bioestimulação do processo de regeneração óssea, em decorrência da aceleração da atividade celular, porém, o protocolo de irradiação apesar de exibir resultados positivos, deve ser mais bem avaliado, elegendo dessa maneira uma dosimetria e forma de aplicação ideais objetivando melhor aproveitamento de sua capacidade bioestimulativa.
4. O uso da terapia com PRP proporcionou benefícios que levaram à otimização do processo de regeneração óssea, entretanto, mais estudos se fazem necessários para determinar a concentração ideal dos diferentes fatores de crescimento, identificar outros fatores que porventura possam melhor explicar as vantagens dessa terapia na cicatrização das feridas e na neoformação óssea e aperfeiçoar as técnicas de obtenção e processamento do PRP possibilitando utilização na prática clínica rotineira.

O potencial de regeneração tecidual e óssea através da aplicação clínica dos avanços feitos na biologia celular e molecular é enorme. O desenvolvimento de técnicas avançadas nesse campo promete prover poderosos instrumentos que nos ajudarão a determinar os mecanismos que governam os eventos da cicatrização para se alcançar em um futuro muito próximo uma regeneração óssea em bases previsíveis.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABERGEL, R; LYONS, R; CASTEL, J. Biostimulation of wound healing by lasers: experimental approaches in animal models and fibroblast cultures. **J Dermatol Surg Oncol**, v. 13, n. 2, p.127-133, Feb. 1987.

AL-WATBAN, F. A. H. ; ANDRES, B. L . Effect of He-Ne laser (632,8 nm) and polygen (TM) on CHO cells. **J. Clin . Laser Med Surg**, v. 18, n .3, p. 145 -150, 2000.

ANDERS, J; BORKER, S; WOOLERY, S. Low-power laser irradiation alters the rate of regeneration of rat facial nerve. **Lasers Surg Med**, v.13, n.1, p.72-82, 1993.

ANDREU, G; ZALDÍVAR, MI; VALIENTE, CJ. Empleo de la terapia láser en la reparación ósea periapical: Use of laser in the periapical bone reparation. **Rev Cuba Estomatol**, v. 1, n. 34, p. 11-14, 1997.

ANIC, I . Ga-As laser in the treatment of adult periodontosis. **Arch Stomat Croat**, v. 22, n. 2, p.141-146, 1988.

ANITUA, E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. **Int J Oral Maxillofac Impl**, v. 14, p. 529-535, 1999.

ANNEROOTH, G; HALL, G; RUDEN, H; ZETTERQVIST, L. The effects of low - energy infra-red laser radiation on wound healing in rats. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 26, n. 1, p.12-17, Feb.1988.

ANTIPA, C; VLAICULESCU, M. Low power diode lasers in clinical practice. **J American Soc Laser Med Surg Abst**, Suppl. 11, 1999.

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

BASFORD, JR .Low intensity laser therap: controversies and new research findings. **Lasers Surg Med** ,v. 9, p. 1-5, 1989.

BASFORD, JR. Laser Therapy: Scientific Basis and clinical role. **Orthopedics**, v. 16, n. 5, p.541-547 May. 1993.

BASFORD, J. R. Low intensity laser therapy-still not in established clinical tool. **Lasers Surg Med**, v. 16, n. 4, p. 331-342, 1995.

BAXTER, D; BELL, A; ALLEN, J. Low level laser therapy. **Physiotherapy**, v. 77, p. 171-178, 1991.

BAXTER, D. Laserterapia de baixa intensidade. In: KITCHEN, S; BAZIN, S. **Eletroterapia de Clayton**. São Paulo: Manole.1998. p.191-210.

BECKERMAN, H; DE BIE, R; BOUTER, L; DE CUYPER, H. The efficacy of laser therapy for musculoskeletal and skin disorders: A criteria-based met analysis of randomized clinical trials. **Physical Therapy**, v. 72, p. 483-491, 1992.

- BENEDICENTI, A. **Manuale di Laser Terapia del Cavo Orale**, Castello: Magioli, 1982a.
- BENEDICENTI, A. La valutazione dell'effetto della luce laser 904 nm nella circolazione ematica in vivo. In: BENEDICENTI, A. **Atlante di Laser-terapia**. Gênova: Langa. 1982b. p.71-83.
- BENEDICENTI, A; MARTINO, A. La Valutazione Dell' incremento di ATP Endocellulare in Linfociti Sotto posti a Bioestimulação com Lince Laser 904 nm Infrard. **Paradont**, v. 1, n. 1, 1983.
- BRILL, A. G; SHENKMAN, B; BRILL, G. E; VARON, D. Blood irradiation by He-Ne induces a decrease in platelet responses to physiological agonists and an increase in platelet cyclic GMP. **Platelets** , v. 11, n. 2, p. 87-93, 2000.
- CAMBIER, D; VANDERSTRAETEN, G. Helium-neon laser: A contraindication for wounds? In vitro on *Pseudomonas aeruginosa*. **Lasers Med Science**, v. 2, n. 12, p. 51-156, 1997.
- COLLS, J. La Terapia Laser, Hoy. Barcelona, **Centro de Documentacion Laser de Medtec**, 1984.
- CONWAY, H. Principles of wound healing with indication for use on several types of skin grafts. **Surg. Clin. North Am.** , v. 32, p. 419-44, 1952.
- CRUANTES, J. C. La Terapia Laser, Hoy. Barcelona, **Centro de Documentacion Laser de Meditec**, 1984.
- DE TEJADA, THG; MARIN, DR; SORIANO, FM. Efecto de la irradiación con laser de He-Ne en el callo de fractura experimental. Repercusión ultra-estructural, morfométrica y hormonal. **Rev Ortop Traum**, v. 34, p. 84-91, 1990.
- DINATO, C. J; BARRETO, M. A; MENDONÇA, R. G; SCARSO, J. Plasma rico em plaquetas. In: DINATO, CJ; POLIDO, DW. **Implantes Osseointegrados: Cirurgia e Prótese**. São Paulo: Artes Médicas. 2001. p. 315-342.
- DORTBUDAK, O; HASS, R. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. **Clin Oral Impl Research**, v. 11, n. 6, p. 540-545, 2000.
- FREITAS, IG; BARANAUSKAS, V. Lasers effects on osteogenesis. **Appl Surf Sci**, n. 154, p. 548-554, 2000.
- FUERTES-LANZUELA, S. Laser de baja potencia y biostimulación. **Ivest y Clin. Laser** , v. 3, p. 21-26, 1986.
- FULLER, A. T. Fundamental of lasers in surgery and medicine. In: DIXON, J. A **Surgical applications of lasers** . Chicago:Year Book Medical Publishers, 1983.

- GARCIA ,V.G; REBELLATO, R.J; KINA, J. R; THEODORO, L.H . Avaliação clínica da ação do raio laser de bioestimulação em tecido gengival hiperplásico. **Rev RGO**, v.8, n.2, 1995 a.
- GARCIA, V.G; CARVALHO, P. S; OLIVEIRA, J. A. Ação da radiação laser na reparação de feridas de extração dental infectadas: Estudo histológico em ratos. **Rev RGO**, v. 4, n. 43, p. 191-194, 1995b.
- GARG, D.M. Emprego de PRP nos enxertos ósseos em implantes dentários e periodontia. In: _____. **Prática da Implantodontia**. São Paulo: Premier. 2001. p. 81-87, 1999a.
- GARG, A. K. Grafting materials in repair and restoration. **Tissue Enginnering**. Illions: Quintessence, p. 83-101, 1999b.
- GENOVESE,W.J. EFEITOS TERAPÊUTICOS DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE - **Laser de Baixa Intensidade: Aplicações Terapêuticas em Odontologia**. São Paulo: Lovise. 2000. p. 79-86.
- GIANNOBILE, W.V. Periodontal regeneration: Potencial role of bone morphogenetic proteins. **J Period Res**, v. 29, p. 225-235, 1996.
- GIANNOBILE, W.V. Periodontal tissue regeneration by polypeptide growth factors and gene transfer. In.: _____. **Tissue Engennering: Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics**. Illinois: Quintessence, 1999. p. 231-243.
- GIANNOBILE, W.V; FINKELMAN, RD; LYNCH, SE. Comparison of canine and non-human primate animal models for periodontal regenerative therapy: results following a single administration of PDGF/IGF. **J Period**, v. 65, p.1158-1168, 1994.
- GLINKOWSKY, W; ROWINSKI, J. Effect of low incident levels of infrared laser energy on the healing of experimental bone fractures. **Laser Ther**, v.7, p. 67-70, 1995.
- GOLDBERG, S. **Descomplicando a Fisiologia**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. p. 61-65.
- GÓMEZ-VILLAMANDOS, R.J; SANTIESTEBAN, J.M; AVILA, I. Efectos de la radiación láser en la cicatrización de lesiones superficiales en la mucosa del caballo. **Bol SELMQ**, n.12, p.5 -15, 1997 .
- GORDJESTANI, M; DERMAUT, L. Infrared laser and bone metabolism: a pilot study. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 23, n. 1, p. 54-56, 1994.
- GRAVES, D. T; DELGADO, R; VALENTE, A. J; PICHE, J. The potencial role of Platelet: Derived Growth Factor as na autocrine or paracrine factor for human bons cells. **Connective Tissue Research**, v. 23, p. 209-218, 1989.
- GREEN, R.J; USUI, M. L; HART, C. E; AMMONS, W. Immuno localização of platelet-derived growth factor A and B chains and PDGF-alpha e beta receptors in human gingival nounds. **J Period Res**. v. 32, p. 209-214, 1997.

HERNÁNDEZ, G. D; DÍAZ, M. C; RODRÍGUEZ, T. Tratamiento de defectos óseos horizontales en periodoncia com laser Hélio-Neón. **Rev Cub Med Militar**, v. 26, n.2, p.110-115, 1997.

HEUSSLER, J. K; HINCHEY, G; QUINN, R; BUTLER, P. A double blind randomised trial of low power laser and treatment in reumatoid arthritis. **Annals Of Rheumatic Diseases**, v. 52, p. 703-706, 1993.

HOWELL ,T.H; FIOELLINI, J.P; PAQUETTE, D.W. Evaluation of platelet -derived growth factor -BB / purified insulin - like growth factor -I in patients with periodontal disease. **J Dent Res**, v. 74 , p . 253 , 1995 .

HOWES, R; BOWNESS, J. M; MARTIN, G. R.; REDDI, A. H. Platelet-Derived Growth Factor enhances desmineralized bone matrix-induced cartilage and bone formation. **Calcified Tissue International**, v. 42, p. 34-38, 1988.

JOHNER, R. Zur Knochenheilung in Abhängigkeit von der Defektgröße. **Helv Chir Acta**, v.39, p.409, 1972.

KAMEYA, T; IDE, S. H; ACORDA, J. A; YAMADA, H; ABE, N. Effects of different wavelengths of low level laser therapy on wound healing in mice. **Laser Ther**, v.7, p.33-36, 1995.

KARU, T. Laser biostimulation: a photobiological phenomenon. **J Photochem Photobiol B.**, v. 3, n. 4, p.638-639, 1989.

KARU, T. Molecular mechanism of therapeutic effects of low intensity laser radiation. **Lasers life Sci**, v. 2, n. 1, p. 53 -74 ,1988.

KARU, T; TIPHLOVA, O.A. Effect of irradiation with Monochromatic visible light on camp content in chinese hamster fibroblasts. **II Nuovo Cimento**, v.10, p.1245, 1987.

KASSOLIS, J. D; ROSEN, P. S; REYNOLDS, M. A. Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: case series. **J Period**, v.10, n.71, p.1654-1661, 2000.

KAWASAKI, K; SHIMIZU, N. Effects of low-energy laser irradiation on bone remodeline during experimental tooth movement in rats. **Lasers Surg Med**, v. 3, n. 26, p. 282-291, 2000.

KITCHEN, S. S. , PARTRIDGE, C. H. A review of low intensity laser therapy: parts 1, 2 and 3 .**Physiotherapy**, v. 77, n. 3, p. 166-170, 1991 .

KITCHEN, S. S., BAZIN, S. **Eletroterapia de Clayton**, São Paulo: Manole Ltda,1996.

KOLARI, P. J. Penetration of unifocused laser light into the skin. **Arch Dermatol**, v. 277, p.342-344, 1985.

- KUBOTA, J; KOBAYASHI, M. Effects of GaAlAs diode laser on the axial pattern skin flap in rat model. **J American Soc Laser Med Surg**, Suppl, 11, 1999.
- LABBE, R. F; SKOGERBOE, K. J; DAVIS, H. A; RETTMER, R. L. Laser photobioactivation mechanisms: in vitro studies using ascorbic acid uptake and hydroxyproline formation as biochemical markers of irradiation response. **Lasers Surg Med**. v. 10, p. 201, 1990.
- LEE, Ph; KIM, K; KIM, K. Effects of low incident energy levels of infrared laser irradiation on healing of infected open skin wound in rats. **Lasers Ther**, v. 5, n. 2, p. 177-190, 1993.
- LENHARO, A; COSSO, F. Fatores de crescimento quando usar? **Innovations J**, v.5, n. 1, p. 21-25, 2001.
- LIEVENS, P. The influence of laser irradiation on the motricity of lymphatic system and on the wound-healing process. **Proc Int Congress on Laser in Med Surg**, 1986.
- LINDNER, I. Die morphology der wundheilung longenbecks. **Arch Klin Chir**, v.301, p. 39-70, 1962.
- LIZARELLI, R. F. Z; LAMANO, C. T. L. Histometrical evaluation of the healing of the dental alveolus in rats after irradiation with a low-powered GaAlAs laser. **Lasers Dent**, n.3543, p. 49-56, 1999 .
- LOMBARD, A; ROSSETTI, V; CASSONE, M. Neurotransmitter content and enzyme activity variations in rat brain following in vivo He-Ne irradiation. **Proceedings Round Table on Basic and Applied Research in Photobiology and Photomedicine**. Italy, nov., 1990.
- LUGER, E. J; ROCHKIND, D. Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. **Lasers Surg Med**, v.2, n.22, p. 97-102, 1998.
- LYNCH, S.E.; WILLIAMS, R. C; POLSON, A. M; HOWELL, T. H . A combination of platelet-derived and insuline like growth factors enhances periodontal regeneration. **J Clin Period**, v. 16, p. 545-548, 1989.
- LYONS, R; ALBERGEL, R; WHITE, R. Biostimulation of wound healing in vivo by a helium neon laser. **Annals Plastic Surg**, v. 18, p.47-50, 1987 .
- MAREI, M.K; ABDEL, A; MEGVID, S. H. Effect of low-laser application in the treatment of denture-induced mucosal lesions. **J Prost Dent**, v. 3, n.77, p.256-264, 1997.
- MARX, R.E. Platelet-Rich plasma: a source of multiple autologous growth factors for bone grafts. In: _____. **Tissue Engennering: Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics**. Illinois: Quintessense, 1999. p.71-82 .

MARX, R.E; CARLSON, ER. Platelet-rich plasma-growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol and Endod.**, v. 6, n. 85, p. 638-646, 1998.

MARX, RE; GARG, A.K. Bone graft physiology with use of platelet-rich plasma and hiperbaric oxygen. In: _____. **The Sinus Bone Graft**. Colorado: Quintessence, 1999. p. 183-189.

MARX, RE; GARG, A. K. A estrutura óssea, o metabolismo e a fisiologia: seu impacto na implantodontia. **J Impl Dent**, v.5, p.15- 25, 1999-2000.

MASAKI, N; CARMILLIERE, J. **Endocrinology**, v.124, p.2991-2994, 1989.

MATSUDA, N; LIN, W. I; KUMAR, N. M; CHO, M. I. Mitogênese chemotactic and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro. **J Period**, v. 63, p.515-525, 1992.

MERAW, S. J; REEVE, C. M; LOHSE, C. M. Treatment of peri-implant defects with combination growth factor cement. **J Period**, v.1, n.71, p.8-13, 2000.

MESTER, E; BACSY, E; KORENYI, A; SPIRY, Y. Clinical electron optic and enzyme-histochemical studies on the effect of laser irradiation on wound healing. **Langebecks Archv Chir Suppl**, n.261, 1974.

MESTER, E. A laser sugar alkamaza a gyogyaezatban. **Orv Hetilap**, v.107, p.1012, 1966.

MESTER, E. Der biostimulative effekt von laserstrahlen. **Z Exper Chirurg**, v.15, p.67, 1984.

MESTER, E; JASZSAGI, E. The effects of laser radiation on wound healing and collagen synthesis . **Studia Biophysica**, v. 3, n. 35, p. 227, 1973.

MESTER, E; MESTER, AF.; MESTER, A. The biomedical effects of laser application. **Lasers Surg Med**, v. 5, p. 31, 1985.

MICHAEL, E; JOYCE, D. **Clin Exp Ap Dermal Epid Repair**, p. 391-416, 1998.

MIRÓ, L; COUPE, M.; CHARRAS, C; CHEVALIER, J. M. Estudio capiloscópico de la acción de un láser de AsGa sobre la microcirculación. **Inv Clin Láser**, v.1, n.2, p. 9-14 ,1984.

NICCOLI FILHO, W. D. **Efeitos do raio laser tipo He-Ne no processo de reparo em feridas de extração dental. Estudo histológico em ratos**. 1991. 56 p. Tese (Doutorado em Odontologia) Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, Araçatuba.

OBARRIO, J. J; ARAUZ-DUTARI, J. L. The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology-case reports. **Int J Period Rest Dent**. v.5, n.20, p.486-497, 2000.

OKAMOTO, T; RUSSO, M. C. Wound healing following tooth extraction. Histochemical study in rats. **Rev Facul Odont Araçatuba**, v.2, n.2, p.153-169, 1973.

OLIVEIRA, J. A. G. P. **Ação da radiação laser (arsênio-gálio) no reparo alveolar de feridas de extração ental infectadas: Estudo histológico em ratos.** 1992. 78 p.Tese (Doutorado em Odontologia) Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, Araçatuba.

OSHIRO, T. **Low reactive-level laser therapy practical application** Chichester: Jhon Wiley & Sons, 1991. p.3 -10.

OZAWA, Y; SHIMIZU, N; KARIYA, G; ABIKO, Y. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. **Bone**, v.4, n.22, p.347-354, 1998.

PASSARELA, S; CASSAMASSIMA, E; MOLINARI, S; PASTORE, D. Increase of proton electrochemical potencial and ATP syntesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by Helium-Neon láser. **Febs letters**, v.175, n.1, p.95, 1984.

PIMENTA, L. H. M. **Laser em Medicina e Biologia.** São Paulo: Roca, 1990.

PINHEIRO, A.L. EVOLUÇÃO HISTÓRICA E CLASSIFICAÇÃO DOS LASERS. In: BRUGNERA, A.J. **Lasers Odontologia Moderna.** São Paulo: Pancast. 1998. p.17-26.

RAVEL, R. **Laboratório Clínico: Aplicações Clínicas dos Dados Laboratoriais.** Guanabara Koogan, 1997. p.109-129.

REDDY, G; STEHNO-BITTEL; ENWEMEKA, C. S. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendons. **Lasers Surg Med** . v.22, p. 281-287, 1998.

RIGAU, J. **Acción de la luz láser a baja intensidad en la modulación de la función celular.** 208p. 1996. Tese (Doutorado em Histologia)-Facultad de Méd. Ciência de la Salut. Univ. Rovira i Virgili, 1996.

ROBINSON, C. J. Fatores de Crescimento: avanços terapêuticos na cicatrização de feridas. **An Med**, v.25, p.535-538, 1993.

ROCHKIND, S; ROUSO, M; NISSAN, M; REES, P. G. Systemic effects of low-power laser irradiation on peripheral and central nervous system cutaneous wounds, and burns. **Lasers Surg Med**, v.9, p.174-182, 1989.

ROSS, M; ROWRELL, L. J. Osso. In.: _____. **Histologia: texto e atlas** . São Paulo: Panamericana. 1993. p.141-179.

RUTHERFORD, R. B; NIETRASH, C. E. Platelet-Derived and Insulin like Growth Factors stimulate regeneration of periodontal attachment in monkeys. **J Period Research**, v.27, p.285-290, 1992.

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**, v.5, n.111, p.525-532, 1997.

SCHENK, R. Regeneração óssea: bases biológicas. In: BUSER, D; DAHLIN, C; SCHENK, R. **Regeneração Óssea Guiada na Implantodontia**. São Paulo: Quintessence, 1996. p.49-100.

SCHIND, A; MARTIN, S. Systemic effects of low intensity laser irradiation: Results in patients with diabetic microangiopathy and literature review. **J American Soc Laser Med Surg**, Suppl, 11, 1999a.

SCHIND, A; MARTIN, S. Increased dermal neovascularization after low intensity laser therapy of a chronic radiation ulcer. **J American Soc Laser Med Surg**, Suppl, 11, 1999b.

SHIMNELE, S. R; STRAUSS, J. E; GEOGERFF, K; MARX, R. E. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Maxillofac Surg**, v. 85, p. 638-646, 1998.

SILVEIRA, J. C; LOPES, E. E. Alguns aspectos o Comportamento do Mastócito sob a Ação do Raio Laser de GaAs-904 nm (Estudo Experimental em Cobaías - Cavia Porcellus). **Arq. Centro Est Curso Odont**, v.28, p.71-94, 1991.

SIMUNOVIC, Z. M. D. Application of low level laser therapy on operated sport and traffic na accident injuries: A Randomized Clinical Study on 74 patients with control group. **J American Soc Laser Med Surg**, Suppl, 11, 1999.

SLATER, M; PATAVA, J; KINGHAM, K. Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity. **J Bone Joint Surg**. v.5, n.13, p. 655-663, 1993.

SROKA, R; SCHAFFER, M. Efeitos na mitose em células normais e tumorais induzidos por tratamento a luz de diferentes comprimentos de onda. **Lasers Surg Med**, v. 25, p.263-271, 1999.

STEFANI, C. M; MACHADO, M. A; SALLUM, E. A; TOLEDO, S. Platelet-derived growth factor / Insulin-like growth Factor-I combination and bone regeneration around implants placed into extraction sockets: histometric study in dogs. **Implant Dent**. v.9, n. 2 , p.126-131, 2000.

STEVENS, A; LOWE, J. SISTEMA MUSCULAR ESQUELÉTICO. In.: _____. **Histologia Humana**. São Paulo: Manole, 200. p.227 -250.

TAKEDA, Y. Irradiation effect of low-energy laser on alveolar bone after tooth extraction: An experimental study in rat. **Int J Oral Maxillofac Surg**. v.17, p.388-391, 1988.

TELFER, J.; FILONENKO, N.; SALANSKY, N. Leg ulcers: plastic descent by laser therapy. In: **Medical applications of lasers, Budapest, 1993: Proceedings**. Bellingham: SPIE, 1993. P.258-161. (SPIE Proceedings Series, v.2086).

THAWER, H. A; HOUGHTON, P. E. Effect of laser irradiation on the growth and development of fetal mouse limbs in vitro model. **Lasers Surg Med**, v.24, n.4, p. 285-295, 1999.

TRELLES, M ; MAYAYO, E. Bone fracture consolidates faster with low power laser. **Lasers Surg Med**, v.7, p.36-45, 1987.

TRELLES, M. A; MESTER, A. Úlceras crônicas en las extremidades inferiores. **Inv Clin. Laser**, v. 2, p. 32,1983.

TRELLES, M. A ; MAYAYO, E. II Laser He-Ne, 632,8 nm come attivatore della cicatrizzazione. **Bolletino AIVPA**. Ano XXIII, n.2, Itália, 1994.

TRIPPEL, S. Potencial role of insulin-like growth factors in fracture healing. **Clin Orthop Research**, v.35, p.301-313, 1998.

TSUCHIDA,T; AIZAWA, K; BABA, J; YAMAMOTO, H. Wound healing in mice using He-ne scanning laser. **J Clin Laser Med Surg**. p.265-266, 1991.

VIKJAER, D; BLOM, S; HJORTING, E; PINHOLT, E.M. Effect of platelet-derived growth factor-BB on bone formation in calvarial defects: an experimental study in rabbits. **Europe J Oral Science**. v.1, n.105, p.59-66, 1997.

WANG, L. L; ZHU, H; LIANG, T. Changes of transforming growth factor beta 1 in rat periodontal tissue during orthodontic tooth movement. **Chin J Dent Rest**, v.1, n. 3, p.19-22, 2000.

WANG, H. L; PAPPERT, T. D; CASTELLI, W. A. The effect of platelet-derived growth factor on the cellular response of the periodontium: na mitoradiographic study on dogs. **J Period**, . v. 65, p. 429-436, 1994.

WELSH, W. **Platelet Gel usage in cosmetic surgery**. In.: AMERICAN ACADEMY OF COSMETIC SURGERY, 16th, 2000, Orlando. Annual Scientific Meeting-New Technologies, Orlando, 2000.

WHITMAN, D. H; BERRY, R. L; GREEN, D. M. Platelet Gel: An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. **J Oral Maxillofac Surg**, v.55, p.1294-1299, 1997.

WILDEN, L. KARTHEIN, R. Import of phenomena of electrons and therapeutic low-level laser in regard to the mitochondrial energy transfer. **J Clin Laser Med Surg**, v. 16, n. 3, p.159-165, 1998.

YAMADA, K. Biological effect of low-power laser on clonal osteoblastic cells (Mc 3T3 -E1). **Nippon Seikergaka Gakkai Zasshi**, v. 65, p.787-799, 1991.

YEW, D; LING, W. S; CHAN, Y. Stimulation of collagen formation in the intestinal anastomosis by dose He-Ne laser. **Scanning Microscopy**. v.3, n.1, p.379-386, 1989.

YU, W; NAIM, J. O; LANZAFAME, R. J. Effects of photostimulation on wound healing in diabetic mice. **Lasers Surg Med**, v.20, n.1, p.56-63, 1997.

ZARAGOZA, J. R; RODRIGO, P; LERMA, E. Efectos de la radiación laser sobre el tiroides. Estudio experimental en la rata blanca. **Inv Clin Laser**, v.11, n.1, p.7-9, 1985.