

Osso neoformado por distração osteogênica: análises histológicas e físicas

Bone neof ormation by osteogenesis distraction: histological e physical analysis

Juliana Dreyer¹, Marcello Gaieta Vannucci², Paulo Kreisner³, Leônilson Gaião⁴, João Feliz Duarte Moraes⁵, Roberto Hübler⁶, Marília Gerhardt de Oliveira⁷

¹Graduada em Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Brasil; ²Doutorando em Odontologia pela PUCRS; ³ Doutor em CTBMF pela PUCRS; ⁴ Doutor em CTBMF pela PUCRS, Professor da Faculdade de Imperatriz, Maranhão, Brasil; ⁵ Professor da Faculdade de Matemática na PUCRS e na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); ⁶ Coordenador do Laboratório GEPSI-LMN no TECNOPUC da PUCRS; Pesquisador por Produtividade CNPq; ⁷ Doutora em Odontologia e Professora Titular na PUCRS; Pesquisadora por Produtividade CNPq, Brasil.

Resumo

Este estudo teve como objetivo avaliar, por métodos histológicos, tomográficos e físicos, o efeito do laser de baixa potência (LLLT – 830 nm) no osso neoformado em mandíbulas de coelhos submetidas à fratura, sem ou com distração osteogênica (DO). Foi utilizado um total de doze coelhos. Para as análises histológicas, foram utilizados oito (quatro para o grupo de controle e quatro para o experimental), além de quatro coelhos para as análises tomográficas e físicas (um não-distraído e sem irradiação laser; um não-distraído e com irradiação laser; um distraído e sem irradiação laser; um distraído e com irradiação laser). Para os coelhos que sofreram alongamento ósseo por DO, foi adotado o seguinte protocolo: latência – três dias; ativação – sete dias 0,7mm/d; e consolidação – dez dias. Para os animais irradiados, utilizou-se o laser infravermelho (GaAl)As (λ=830 nm, 40 mW) com o seguinte protocolo: dose pontual de 10 J/cm², diretamente sobre o sítio ósseo submetido à fratura e (ou) DO, no período de consolidação óssea, respeitando-se intervalos de 48 horas. O percentual do osso neoformado foi maior no grupo com LLLT (57,89%) do que no de controle (46,75%), p=0,006. A análise tomográfica revelou aumento da densidade, medida em Unidades Hounsfield (HU), dos ossos fraturados que foram irradiados com laser. Com relação às propriedades físicas, nos ossos submetidos à DO, o laser não promoveu alteração da nanodureza, mas modificou os valores do módulo de elasticidade. A composição química revelou, a partir das razões de Ca e P, uma mineralização maior no grupo com LLLT. Os percentuais de cristalinidade indicaram maiores percentuais cristalinos nos coelhos com LLLT. As amostras indicaram semelhança da estrutura cristalina com as hidroxiapatitas, a partir dos difratogramas obtidos. Concluiu-se que o LLLT apresentou efeito positivo na densidade, no percentual de osso neoformado, na composição química e na cristalinidade do sítio da DO.

Palavras-chave: Osteogênese por distração. Lasers. Tomografia computadorizada.

Abstract

This study evaluated, by histological methods, tomography, and physical, examination, the effect of low level laser therapy (LLLT - 830 nm) in the newly formed bone in the mandible of rabbits subjected to fracture, with or without distraction osteogenesis (DO). Twelve rabbits were used, for histological analysis were used eight (four for the control group and four for the trial) and four rabbits for the tomographic analysis and physical (a non-distracted and without laser irradiation, a non-distracted and laser irradiation, a distracted and without laser irradiation, a distracted and laser irradiation). For rabbits that underwent bone lengthening by DO was adopted the following protocol: latency - three days, activation - seven days 0.7 mm / d and consolidation - ten days. For the irradiated animals, was used infrared laser (GaAlAs) the (λ = 830 nm, 40 mW) with the following protocol: point dose of 10 J/cm², directly on the site underwent bone fracture and / or DO, the period of bone healing, respecting every 48 hours. The percentage of newly formed bone was higher in the LLLT group (57.89%) than controls (46.75%), p = 0.006. The tomographic analysis revealed increased density, measured in Hounsfield units (HU), fractured bones that were irradiated with laser. With respect to physical properties, bones undergoing DO, the laser did not promote change in nanohardness, but changed the values of modulus of elasticity. The chemical composition has, from the ratios of Ca and P to a mineralization higher in patients with LLLT. The percentage of crystallinity showed higher percentages in rabbits with crystalline LLLT. The samples showed similarity with the crystal structure of hydroxyapatite from the diffraction patterns obtained. It was concluded that LLLT had a positive effect on density, the percentage of new bone formation, chemical composition and crystallinity of the DO site.

Keywords: Distraction osteogenesis. Lasers. Computed tomography.

INTRODUÇÃO

A distração osteogênica (DO) apresenta-se como uma alternativa promissora e cada vez mais sedimentada em reconstruções ósseas faciais, podendo ser empregada nos casos de deformidades congênitas,

Recebido em 22 de fevereiro de 2011; revisado em 02 de abril de 2011.
Correspondência / Correspondence: Juliana Dreyer da Silva de Menezes. Rua Aurélio Porto, 144. Partenon. Porto Alegre , RS. CEP: 90620-090. Email: dreyer.ju@gmail.com

traumas, ou após cirurgias oncológicas. A DO é baseada no emprego de aparelhos distratores, visando a possibilitar o crescimento ósseo em um sítio deformado.^{1,2}

Em decorrência do tempo de maturação óssea exigido para a remoção do distrator, alguns pacientes relatam desconforto, especialmente quando são utilizados aparelhos externos, que podem induzir infecções de superfície, parestesias, cicatrizes hipertróficas e dificuldade de convívio social². Assim, pesquisadores buscam soluções no sentido de acelerar o processo de maturação óssea e melhorar as propriedades físicas do sítio ósseo neoformado.^{3,4}

O uso do laser terapêutico tem demonstrado algum grau de benefício no processo de reparação em tecidos moles e ósseos. A DO envolve atividades metabólicas que podem ser passíveis de biomodulação pelo uso de laser, podendo reduzir o tempo global do tratamento.^{5,6}

Estudos avaliativos do tecido ósseo podem empregar diversos testes que diferem dos demais por sua acurácia e complexidade de execução, a fim de determinar as variações quantitativas e qualitativas do tecido ósseo entre os grupos estudados. A tomografia computadorizada faz-se uma importante ferramenta de avaliação da densidade e da geometria óssea, na medida em que proporciona detalhes sobre a qualidade e a quantidade de osso neoformado com grande precisão e mínimo erro, em relação direta com os achados histológicos.^{7,8}

A análise histológica com coloração de hematoxilina/eosina (HE) constitui-se em um teste amplamente empregado na avaliação de alterações em tecido ósseo, permitindo a compreensão dos mecanismos de reparo tecidual.⁹

As espectroscopias por fluorescência e difração de raios X (XRF e XRD) são análises físicas que envolvem equipamentos de alta tecnologia e são empregadas na caracterização de diversos materiais na indústria¹⁰. Entretanto, esses métodos podem ser aplicados no estudo do tecido ósseo, com possibilidade de gerar dados relativos às suas características minerais, como tipo de cristal (estrutura cristalina), a perfeição desses cristais (cristalinidade) e seu conteúdo mineral (quantidade de cálcio, fósforo e outros elementos químicos).

As diversas aplicações da DO, além de seu uso crescente em Odontologia, tornam necessário conhecer, de forma precisa, as características e as limitações das propriedades mecânicas do osso alongado por meio dessa técnica. Experimentos laboratoriais, denominados testes instrumentados de dureza (IHT), permitem determinar propriedades físicas a partir da simulação de situações mecânicas a que tecidos são submetidos. Nesse contexto, durante os IHT, podemos aferir o módulo de dureza e a elasticidade dos materiais,

os quais fornecem o comportamento do osso neoformado quando submetido a uma determinada força, bem como sua resistência à deformação elástica.^{11,12}

Como a DO engloba a formação óssea desde os estágios iniciais até seu amadurecimento, suas características minerais são passíveis de alterações. Assim, este estudo propõe a avaliação das propriedades físicas e biológicas do osso neoformado, as quais podem ser úteis na identificação dessas possíveis alterações, permitindo o surgimento de protocolos inovadores mais precisos na análise desses processos do metabolismo ósseo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados 12 coelhos da ordem *Lagomorpha*, espécie *Oryctolagus cuniculus*, raça Nova Zelândia, machos, de peso entre 3,5 e 4,5Kg, livres de malformações congênitas ou adquiridas.

As cirurgias foram realizadas em condições estéreis. A anestesia foi obtida por uma associação de drogas: Solução Cloridrato de Xilazina a 2% (Anacedan®) e Cloridrato de Zolazepam com Cloridrato de Tiletamina (Zoletil®).

Após a perda da consciência dos animais, a região submandibular à direita de cada espécime foi tricotomizada. Na região a ser incisada, realizou-se infiltração local 0,9 ml de Lidocaína a 2% com Epinefrina 1:100.000 e uma incisão de aproximadamente 3cm na borda inferior da mandíbula, dando-se início ao acesso do osso mandibular. Foi realizado descolamento periosteal, junto com as inserções musculares, e corticotomia vestibular entre o dente pré-molar e o forame mentoniano, utilizando-se broca *carbide* 701. Foi feita a estabilização e fixação do distrator (PROMM® – Indústria de Materiais Cirúrgicos LTDA, Porto Alegre/RS) nos segmentos medial e distal. A ferida cirúrgica foi fechada por planos, com fio monofilamentar de náilon nº. 4-0, em pontos isolados nos planos profundos e sutura com pontos simples para a epiderme.

Após o período de latência de três dias, iniciaram-se as ativações do aparelho distrator, com o ritmo de 0,7 mm de extensão por dia, durante uma semana (aproximadamente 4,9 mm de extensão). O distrator osteogênico permaneceu instalado nos animais por mais 10 dias, como fixação rígida, para que a maturação óssea pudesse ser alcançada.

Os espécimes deste estudo foram divididos aleatoriamente em grupo de controle, que não receberam a terapia a laser, e grupo experimental, ao qual o LLLT era aplicado (Quadro 1).

A irradiação dos grupos selecionados foi realizada pelo aparelho Thera Laser®, 830 nm, devidamente calibrado, empregando-se a seguinte dosimetria: dose pontual de 10 J/cm² de laser, com

Grupo	LLLT	n
Controle	Não	6
Experimental	Sim	6

Quadro 1 - Distribuição dos grupos experimental e de controle.

potência de 40 mW, modo de emissão contínua, diretamente sobre o sítio ósseo submetido à DO, no período de consolidação óssea, respeitando-se intervalos de 48 horas, totalizando 50 J/cm² por animal.

Após atingir o período de consolidação óssea, os animais foram mortos, as mandíbulas foram dissecadas, isoladas e separadas na região do corpo. Os espécimes para análise histológica foram armazenados em formalina tamponada 10%, e os demais foram armazenados em glutaraldeído a 2%, até sua preparação.

As hemimandíbulas para análise histológica foram coradas por HE (cortes de 4µm de espessura no sentido látero-medial), num total de três lâminas de cada espécime. Contudo, para a mensuração das áreas de neoformação óssea, cada lâmina foi subdividida em unidades experimentais (UE), a partir de um aumento aproximado de 100X, no microscópio óptico, com consequente captura das imagens por câmera fotográfica digital acoplada ao microscópio.

Áreas neoformadas foram mensuradas em *pixels* quadrados, empregando-se o *software* livre ImageTool® for Windows 3.0 (The University of Texas Health Science Center in San Antonio, Estados Unidos). O percentual de neoformação óssea foi obtido a partir da relação entre a mensuração da área neoformada e da área total da UE.

As hemimandíbulas dos coelhos submetidas à análise física foram dissecadas, removidas e armazenadas em glutaraldeído a 2%, embutidas em resina acrílica, e receberam polimento manual, com sequência de lixas da gramatura desde 180 até 4000, sob constante irrigação, para posterior incidência direta dos raios X no espectrômetro. Depois de lixadas e polidas, as peças experimentais estavam prontas para serem tomografadas e sofrerem os testes instrumentados de dureza.

A aquisição de imagens das amostras foi obtida pelo tomógrafo Siemens Somatom Plus 4, obtendo-se cortes axiais de 1mm de espessura. As imagens foram armazenadas em formato Digital Imaging and Communications in Medicine (DICOM) e exportadas para o software OsiriX Imaging Software 3 para reconstrução tridimensional. Além disso, o software permitiu estabelecer limiares de atenuação, produzindo imagens com base em determinados números de unidades Hounsfield (HU).

A fim de realizar a análise das imagens e obter a densidade, foi utilizado o software Image J, freeware,

desenvolvido pelo National Institutes of Health. Selecionou-se o corte anterior e foi traçada uma linha com o intuito de se obterem as Unidades Hounsfield (HU) ao longo do trajeto. Esses números, obtidos em forma de tabela, foram exportados para o programa Origin 6.0 (Microcal SoftwareTM), a fim de serem obtidos os gráficos das variações de densidade das unidades experimentais, em HU.

A área de interesse foi dividida 14 outras regiões no sentido anteroposterior, com distância de 500 micrômetros entre elas. Para avaliação da nanodureza e do módulo de elasticidade, realizaram-se 10 medidas em cada uma dessas 14 regiões, com uma distância de pelo menos 50 micrômetros entre cada ponto medido, evitando-se, assim, qualquer influência entre as medidas. Cada indentação foi realizada utilizando-se um único ciclo de carga e descarga de 0 até 1 Nilton e de 1 até 0 Nilton, com um penetrador do tipo Vickers, utilizando-se o aparelho Fischerscope HV 100. Os dados foram, então, exportados para o software Origin 6.0 (Microcal SoftwareTM), visando à obtenção de gráficos que mostrassem a variação ao longo da amostra.

Os blocos foram colocados no espectrômetro modelo XRF-1800 (Sequential X-ray Spectrometer, Shimadzu), para a análise dos elementos Ca e P. As amostras foram medidas empregando-se uma radiação Rh K_α (Ródio, fonte de raios X), em um regime de 40 kV e 95 mA. Para quantificar os elementos Ca e P, empregaram-se os cristais difratores de Fluoreto de Lítio (LiF) e Germânio (Ge), respectivamente, os quais são específicos para “filtrar” as fluorescências de tais elementos. As medidas foram realizadas em vácuo, em uma pressão de 25 Pascal (Pa), com uma velocidade de varredura de 8°/min, com passo de 0,1° e um tempo de 0,75 s por passo.

Foram realizadas medidas em diferentes pontos no vetor de alongamento do sítio analisado, utilizando-se uma malha milimetrada, por haver variação níveis de amadurecimento do tecido ósseo, em virtude do alongamento gradual característico da técnica de DO. Com os valores obtidos para a quantificação de Ca e P, em cada ponto, foram calculadas as razões Ca/P, que foram submetidas à análise estatística e organizadas em tabelas.

Após a obtenção dos dados do XRF, as peças foram seccionadas transversalmente, em micrótomo, nas porções anterior e média do sítio da DO; em seguida, cada peça foi triturada em gral e pistilo de cerâmica até a obtenção de um pó, sendo inserida em placas de vidro para prensagem. Foram realizadas a análise no difratômetro de raios X XRD Maxima 7000 (X-ray Diffractometer, Shimadzu) e a medição da radiação Cu K_α (cobre) (λ = 1,5406 Å), em um regime de 40 kV e 30 mA, respectivamente. De cada amostra foi obtido um difratograma que teve seus picos, com relação entre amplitude de sinal e ruídos identificados e comparados

àqueles das hidroxiapatitas conhecidas, através de *software* específico do próprio equipamento, que aplicava um ajuste de Lorenz para obtenção do grau de cristalinidade.

Análise estatística

Na avaliação histológica, foi utilizado o *software* Biostat 4.0 para avaliar a replicabilidade intraclasse dos examinadores. A existência de normalidade das medidas histomorfométricas, quanto à variável osso neoformado, foi avaliada pelo teste Kolmogorov-Smirnov. O teste t foi utilizado para comparar o percentual de neoformação óssea entre os grupos. Para tal fim, empregou-se o *software* SPSS® (SPSS – Statistic Packet of Social Science. Chigado, EUA)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos experimentais em animais diferentes permitiram a compreensão dos princípios biológicos e biomecânicos de DO, permitindo o aperfeiçoamento da técnica e o estabelecimento de um ritmo de ativação ideal, fator fundamental no processo de neoformação óssea^{13,14}. No presente estudo, foi utilizado um protocolo de ativação do aparelho de 0,7 mm/dia, pois, segundo a literatura, ativações de 0,5 a 1mm/dia resultam em formação óssea, enquanto que distrações maiores e mais rápidas resultam em união fibrosa, fato não observado nesta investigação.^{9,15,16}

Apesar de estarem bem descritos e consagrados os eventos que ocorrem durante o processo de alongamento ósseo por DO, inclusive quando da irradiação com laser, julgou-se importante a realização deste estudo, a fim de avaliar as características físicas e histológicas do osso neoformado com e sem irradiação com laser^{5,6,17}. Os resultados foram compilados e expressos conforme se apresenta no Quadro 2.

Análise histológica e histomorfométrica

Na área alongada, verificou-se formação de tecido ósseo com a presença de vasos sanguíneos, osteócitos recém-formados, bem como acentuada atividade osteoblástica, demonstrando intensa capacidade osteogênica. Esse tecido ósseo caracterizou-se por ilhas ou trabéculas entremeadas por tecido conjuntivo. As trabéculas ósseas apresentaram-se paralelas entre si, mas perpendiculares ao traço de fratura, caracterizando o processo fisiológico de reparo com vista a preencher o defeito. Esse padrão seguiu o mesmo encontrado na literatura^{5,6,7,17}. Assim como no estudo de Djasim e colaboradores, houve formação de trabeculado ósseo em todos os grupos estudados, entremeados por tecido fibrovascular, em que o trabeculado ósseo esteve alinhado em direção ao vetor da distração e a área central da regeneração mostrou menor quantidade de formação óssea, indicando que ela se iniciou nos limites ou bordas do osso preexistente, diminuindo em direção à área central.¹⁶

Na avaliação da porcentagem de tecido ósseo neoformado, as mensurações da UE foram submetidas ao teste de Kolmogorov-Smirnov para verificação da normalidade das medidas histomorfométricas, em que se verificou a normalidade na distribuição ($p < 0,05$). Assim, nas análises subsequentes, foram empregados testes paramétricos.

As médias de osso neoformado foram obtidas a partir das mensurações das unidades experimentais de cada lâmina. Essas mensurações foram submetidas ao teste paramétrico “t” para amostras independentes, sendo observada maior porcentagem de neoformação óssea no grupo experimental (57,89%) em relação ao grupo de controle (46,75%) ($p = 0,006$). Tais resultados indicaram a ação positiva do LLLT no grupo experimental, achado semelhante aos apresentados na literatura, visto que pesquisadores encontraram maior neoformação óssea no grupo irradiado.^{5,6}

Análises tomográfica e física

a) Tomografia (HU)

Os coelhos 5 e 11 sofreram fratura, embora não tenham sido alongados por DO. O primeiro não recebeu irradiação com laser, enquanto o segundo foi irradiado. As análises das tomografias revelaram variações de densidade de 0 até 1.000 HU para o coelho 5 e de 250 até 1.250 HU para o coelho 11.

O coelho 5 apresentou densidades ósseas menores do que os valores do osso hígido, conforme os valores de densidade mencionados na literatura e comprovados por pesquisas^{17,18,19}. Tais valores são semelhantes aos do calo ósseo de fraturas produzidas em tíbias de coelhos, mas não-irradiadas com laser, em que os pesquisadores constataram densidade de 297 HU²⁰. Apesar de os valores obtidos serem inferiores aos do osso hígido, ocorreu união dos segmentos ósseos por neoformação, fato comprovado clinicamente e sustentado pelos achados histológicos prévios.

Em relação ao coelho 11, foram observados picos de valores de densidade óssea similares aos apontados na literatura para osso hígido^{18,19,20,21}. Tais valores seguem aqueles observados em pesquisa sobre calo ósseo de fraturas produzidas em tíbias de coelhos irradiadas com laser, cujo valor médio foi de 691 HU²¹. De modo semelhante ao ocorrido com o coelho 5, houve união dos segmentos ósseos comprovada clinicamente e sustentada pelos achados histológicos prévios, na área da neoformação óssea. Esse aumento da densidade em relação ao grupo que sofreu fratura, mas não foi irradiado com laser, pode ser atribuído justamente à biomodulação positiva induzida pela utilização dessa tecnologia. Esse efeito é confirmado por inúmeras pesquisas que demonstraram as vantagens oferecidas pelo laser em termos de cicatrização de feridas ou fraturas ósseas^{5,6,21,22}. Sua utilização no coelho 11 produziu um calo ósseo exuberante, comprovado

cl clinicamente, que traduziu o aumento da densidade observado no estudo da TC.

Já os coelhos 6 e 12 sofreram fratura e alongamento ósseo por DO. O primeiro não recebeu irradiação com laser, enquanto o segundo foi irradiado. As análises das tomografias revelaram variações de densidade de 0 até 1.000 HU para ambos os grupos.

Acredita-se que tais grupos foram os que tiveram o processo de cicatrização mais dificultado devido ao processo específico para obter o alongamento ósseo, pois cada ativação traduzia-se em uma desorganização tecidual e em um trauma adicional local, o que, de alguma forma, poderia dificultar e (ou) retardar o reparo tecidual. Essa seria a principal causa referida na literatura de instabilidades e recidivas dependentes do tempo de consolidação proposto pela equipe de pesquisadores.²³⁻²⁶

b) Testes de nanodureza IHT

Os testes de nanodureza dos espécimes que sofreram somente fratura apresentaram valores superiores aos dos que foram submetidos a alongamento ósseo por DO. A variação entre esses grupos possivelmente se deve ao fato de que, embora tenha sido realizada uma fratura, ela foi adequadamente reduzida e estabilizada, sem sofrer alongamento ósseo, possibilitando um período de silêncio biológico pós-trauma e adequada cicatrização.

Os resultados tomográficos e físicos estão em consonância com aqueles encontrados por um grupo de pesquisadores que observaram, em relação aos testes biomecânicos, não existirem diferenças no que diz respeito à força de tensão entre os grupos com e sem laser que sofreram fraturas. Tais resultados sugerem que a utilização do laser pode favorecer a formação do calo ósseo em estágios precoces do processo de cicatrização, mas com benefícios duvidosos nas propriedades biomecânicas.²¹

Quanto às propriedades mecânicas, tanto o coelho 6 quanto o 12 apresentaram valores de nanodureza e módulo de elasticidade um pouco inferiores aos dos demais grupos. Para esses grupos, os valores de nanodureza foram entre 0 até 550 MPa. O coelho não-irradiado (6) apresentou módulo de elasticidade entre 0 e 6 GPa, enquanto que o irradiado (12) mostrou módulo de elasticidade entre 0-14 GPa. Apesar de se apresentarem inferiores aos demais coelhos, os valores de nanodureza encontraram-se próximos a eles. O módulo de elasticidade do coelho 6 mostrou estar bem inferior ao dos demais, ao passo que, no coelho 12, apesar de mais baixos, os valores encontraram-se mais próximos dos atingidos pelos coelhos 5 e 11. Isso indica que o osso alongado por DO e irradiado com laser apresenta propriedades mecânicas de um processo de cicatrização mais adiantado que o do osso alongado por DO que não foi

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

c) Espectroscopia por fluorescência de raios X (XRF)

A partir dessa análise, foram calculadas as razões entre o percentual em massa de Ca e P, que indicam uma tendência de mineralização maior nos grupos irradiados com LLLT.

Foram encontradas razões inferiores àquelas esperadas das hidroxiapatitas puras conhecidas, embora nos mesmos padrões esperados para o tecido ósseo já publicados por outro método de análise²⁷. A razão entre Ca e P do coelho 11 em relação ao coelho 12, ambos irradiados, indica que o efeito do LLLT dá-se principalmente nos estágios iniciais da osteogênese, o que corrobora com os achados de Saito e Shimizu.²⁸

Os elementos Ca e P encontrados em tecidos ósseos são, principalmente, os constituintes de hidroxiapatita, a qual é encontrada em ossos como pequenos cristais e pode conter impurezas, incluindo carbonato e magnésio. Tais imperfeições são importantes por deixar a hidroxiapatita do tecido ósseo mais solúvel, permitindo trocas de íons necessárias à homeostase. A porção mineral do osso contém 96% do cálcio e 85% do fósforo de todo o organismo. As razões encontradas entre esses elementos indicam as propriedades mecânicas do tecido ósseo, expressando sua organização e estado de amadurecimento.^{29,30}

d) Espectroscopia por difração de raios X (XRD)

Os cálculos de cristalinidade em XRD são baseados na metodologia empregada nas normas ASTM D5357 e D5758 (American Society for Testing and Materials), para determinação de um grupo numeroso de minerais que possuem estrutura porosa. A partir dessa análise, pode-se supor que quanto mais avançado o processo de maturação óssea estiver, maior será seu grau de organização, logo, maior será sua cristalinidade. Assim, com base nessas premissas, a cristalinidade indica o amadurecimento do tecido ósseo.

Os percentuais de cristalinidade indicaram com precisão um efeito biomodulador do LLLT, tornando o tecido ósseo com maior percentual cristalino nos coelhos com e sem DO, o que expressa um tecido ósseo apresentando cristais com tamanho, ordem e perfeição superiores. Os resultados mostram que o percentual de cristalinidade do coelho submetido à DO com LLLT, aproximou-se daqueles dos coelhos não-submetidos à DO, apontando para uma regeneração óssea mais rápida com o emprego da LLLT.

Grupos	Espécimes	DO	LLLT	Análise histológica		Propriedades tomográficas (HU)	Propriedades físicas						
				EU	%ONF		Dureza (Mpa)	Elasticidade (Gpa)	Médias Ca/P (XRF)	Amplitude	DP	% cristalinos (XRD)	% amorfos (XRD)
Controle	1	+	-	19	38.07	*	*	*	*	*	*	*	*
	2	+	-	33	61.34	*	*	*	*	*	*	*	*
	3	+	-	17	47.01	*	*	*	*	*	*	*	*
	4	+	-	29	40.59	*	*	*	*	*	*	*	*
	5	x	-	*	*	0-1000	50-600	3-20	0.81	0.75-0.88	0.6	71.35	28.69
	6	+	-	*	*	0-1000	0-500	0-6	0.83	0.36-1.25	0.4	41.14	58.86
Experimental	7	+	+	21	44.41	*	*	*	*	*	*	*	*
	8	+	+	17	63.71	*	*	*	*	*	*	*	*
	9	+	+	14	48.53	*	*	*	*	*	*	*	*
	10	+	+	18	68.27	*	*	*	*	*	*	*	*
	11	x	+	*	*	250-1250	50-550	3-16	0.84	0.74-0.97	0.9	76.28	23.72
	12	+	+	*	*	0-1000	0-500	0-14	0.98	0.75-1.21	0.6	54.57	45.43

Quadro 2 - resultados obtidos a partir das análises propostas nos grupos experimental e de controle.

* animal não submetido à análise

A análise dos coelhos não-submetidos à DO possibilitou a comparação com os coelhos submetidos ao procedimento cirúrgico, funcionando como controle negativo no experimento. Esse tipo de desenho metodológico foi empregado por Pampu e colaboradores, que analisaram a influência do PRP na DO, com período de latência e com ativação imediata do distrator³¹. Os resultados de cristalinidade concordaram com os resultados obtidos nos estudos de histomorfometria, indicando uma coincidência do grau de maturação com a cristalinidade das amostras.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com amostragem pequena, como foi o caso da presente pesquisa, devem ser interpretados com cautela. Entretanto, sendo este um trabalho pioneiro e preliminar, balizador de pesquisas sequenciais, os achados histológicos, tomográficos e físicos obtidos e relacionados parecem convergir quanto ao efeito bioestimulante no que diz respeito ao processo de reparo tecidual quando da utilização da LLLT.

REFERÊNCIAS

- SAMCHUKOV, M. L.; CHERKASHIN, A. M.; COPE, J. B. Distraction osteogenesis: history and biologic basis of new bone formation. In: LYNCH, S. E.; GENCO, R. J.; MARX, R. E. (Org.). **Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics**. Illinois: Quintessence, 1999. p. 131-146.
- MOFID, M. M. et al. Craniofacial distraction osteogenesis: a review of 3278 cases. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v. 108, n. 5, p. 1103-1114, Oct. 2001.
- KESSLER, P.; NEUKAM, F. W.; WILTFANG, J. Effects of distraction forces and frequency of distraction on bony regeneration. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Edinburgh, v. 43, n. 5, p. 392-398, Oct. 2005.
- CAKARER, S. et al. Acceleration of consolidation period by thrombin peptide 508 in tibial distraction osteogenesis in rats. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Edinburgh, v. 48, n. 8, p. 633-636, Dec. 2010. [Epub ahead of print].
- CERQUEIRA, A. et al. Bone tissue microscopic findings related to the use of diode Laser (830 nm) in ovine mandible submitted to distraction osteogenesis. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 92-97, Mar.-Apr. 2007.

6. MILORO, M.; MILLER, J. J.; STONER, J. A. Low-Level Laser effect on mandibular distraction osteogenesis. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 65, n. 2, p.168-176, Feb. 2007.

7. ZIMMERMANN, C. E. et al. Assessment of bone formation in a porcine mandibular distraction wound by computed tomography. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Copenhagen, v. 33, n. 6, p. 569-574, Sep. 2004.

8. SWENNEN, G. R. et al. Assessment of the distraction regenerate using three-dimensional quantitative computer tomography. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Copenhagen, v. 34, n. 1, p. 64-73, Jan. 2005.

9. ELSHAHAT, A. Role of guided bone regeneration principle in preventing fibrous healing in distraction osteogenesis at high speed: experimental study in rabbit mandibles. **J. Craniofac. Surg.**, Boston, v. 15, n. 6, p. 916-921, Nov. 2004.

10. BRUNDLE, C. R.; EVANS, C. A.; WILSON, S. **Encyclopedia of materials characterization**. Butterworth-Heinemann: Greenwich, 1992.

11. BLANDO, E. **Estudo de técnicas de indentação para avaliação de materiais na região de nano e microdureza**. 2001. 171 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Faculdade de Engenharia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

12. NEWEY, D.; POLLOCK, H. M.; WILKINS, M. A. The ultra-microhardness of ion-implanted iron and steel at sub-micron depths and its correlation with wear-resistance. **J. Mater. Sci.**, London, v. 12, p. 157-166, 1983.

13. SWENNEN, G.; DEMPFF, R.; SCHLIEPHAKE, H. Cranio-facial distraction osteogenesis: a review of the literature. Part II. Experimental studies. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Copenhagen, v. 31, n. 2, p. 123-135, Apr. 2002.

14. WILLIAMS, B. E. et al. Sequential histomorphometric analysis of regenerate osteogenesis following mandibular distraction in the rat. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 50, n. 5, p. 497-506, May 2005.

15. BOCCACCIO, A.; PAPPALETERE, C.; KELLY, D. J. The influence of expansion rates on mandibular distraction osteogenesis: a computational analysis. **Ann. Biomed. Eng.**, New York, v. 35, n. 11, p. 1940-1960, Nov. 2007.

16. DJASIM, U. M. et al. Histomorphometric comparison between continuous and discontinuous distraction osteogenesis. **J. Craniomaxillofac. Surg.**, Stuttgart, v. 37, n. 7, p. 398-404, May 2009. [Epub ahead of print].

17. HÜBLER, R. Effects of low-level laser therapy on bone formed after distraction osteogenesis. **Lasers Med. Sci.**, London, v. 25, n. 2, p. 213-219, June 2010. [Epub ahead of print].

18. BONTRAGER, K. L. **Tratado de técnica radiológica e base anatômica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 2003. 814 p.

19. TURKYILMAZ, I.; TÖZÜM, T. F.; TUMER, C. Bone density assessments of oral implant sites using computerized tomography. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, v. 34, n. 4, p. 267-272, Apr. 2007.
20. PARK, H. S. et al. Density of the alveolar and basal bones of the maxilla and the mandible. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.**, St. Louis, v. 133, n. 1, p. 30-37, 2008.
21. KAZEM SHAKOURI, S. et al. Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process. **Lasers Med. Sci.**, London, v. 25, n. 1, p. 73-77, 2010. [Epub ahead of print]
22. CHUN, Y. S.; LIM, W. H. Bone density at interradicular sites: implications for orthodontic mini-implant placement. **Orthod. Craniofac. Res.**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 25-32, Feb. 2009.
23. PRETEL, H.; LAZARELLI, R. F.; RAMALHO, L. T. Effect of low-level laser therapy on bone repair: histological study in rats. **Lasers Surg. Med.**, New York, v. 39, n. 10, p. 788-796 Dec. 2007.
24. McCARTHY, J. G. Lengthening the human mandible by gradual distraction. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v. 89, n. 1, p. 1-8, Jan. 1992.
25. DOUGLAS, L. R.; DOUGLAS, J. B.; SMITH, P. J. Intraoral mandibular distraction osteogenesis in a patient with severe micrognathia secondary to TMJ ankylosis using a tooth and boneanchored device (PIT Device): a case report. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 58, n. 12, p. 1429-1433, Dec. 2000.
26. MARQUEZ, I. M.; FISH, L. C.; STELLA, J. P. Two-years follow-up of distraction osteogenesis: its effect on mandibular ramus height in hemifacial microsomia. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.**, St. Louis, v. 117, n. 2, p. 130-139, Feb. 2000.
27. KRAWCZYK, A. et al. Experimental studies on the effect of osteotomy technique on the bone regeneration in distraction osteogenesis. **Bone.**, New York, v. 40, n. 3, p. 781-791, Mar. 2007.
28. 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.**, St. Louis, v. 111, n. 5, p. 525-532, May 1997.
29. BOHIC, S. et al. Transmission FT-IR microspectroscopy of mineral phases in calcified tissues. **C. R. Acad. Sci., Sér. 3 Sci. Vie.**, Paris, v. 321, n. 10, p. 865-876, Oct. 1998.
30. SHEA, J. E.; MILLER, S. C. Skeletal function and structure: implications for tissue targeted therapeutics. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, Amsterdam, v. 57, n. 7, p. 945-957, May 2005. [Epub ahead of print].
31. PAMPU, A. A. et al. Histomorphometric evaluation of the effects of zoledronic acid on mandibular distraction osteogenesis in rabbits. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 66, n. 5, p. 905-910, May 2008.