

ANÁLISE DENSITOMÉTRICA DO EFEITO DA FOTOTERAPIA LED SOBRE O REPARO ÓSSEO EM RATOS DIABÉTICOS

Alessandra Pais de Barros Almeida^{1,2}, Danila Xênia de Miranda Matos^{1,2}, Alexandre Greca Diamantino², Renata Amadei Nicolau^{1,2}, Marco Antonio de Oliveira^{2,3}

¹Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), Faculdade de Ciências de Saúde, Curso de Odontologia

²UNIVAP, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento/ Laboratório de Biomodulação Tecidual

³Univap, IP&D, Laboratório de Parasitologia e Biotecnologia

Av. Shishima Hifumi 2911 Urbanova - 12244-000 São José dos Campos – SP Brasil,
alessbarros@hotmail.com, danilaxenia@ig.com.br, agdiamantino@gmail.com, rani@univap.br,
oliveirama@univap.br

Resumo: Com o objetivo de investigar a densidade mineral óssea (DMO) sob o efeito da terapia LED em ratos diabéticos, produziu-se um defeito cirúrgico no fêmur direito em 30 ratos Wistar com diabetes induzida por uma injeção endovenosa de Streptozotocin® (65mg/kg de peso) através da veia caudal. Os animais foram divididos em 6 grupos, com três controles: CI (14 dias), CII (21 dias), CIII (28 dias) e três irradiados: LI (14 dias), LII (21 dias) e LIII (28 dias). Para a irradiação foi utilizado um LED (945 nm, 48 mW). Sete sessões de irradiação foram realizadas, respeitando o intervalo de 48 horas entre as sessões. Aguardado o período de 14, 21 e 28 dias do procedimento cirúrgico, os animais foram sacrificados. Foram realizadas tomadas radiográficas das amostras. As películas foram processadas e a DMO analisada dos diferentes grupos, tanto em áreas híginas quanto em processo de reparo. Observou-se aumento significativo ($p < 0,05$) da DMO nos grupos tratados quando comparados aos grupos controle em 14 e 21 dias. Não houve diferença significativa entre os grupos em 28 dias. Os resultados obtidos no emprego da terapia LED, sobre o reparo ósseo, apontam perspectivas de redução de tempo na osseointegração em diabéticos devido ao aumento da DMO nos animais tratados.

Palavras chave: Terapia LED, diabetes, reparação óssea.

Área de Concentração: IV- Ciências da Saúde

Introdução

O *Diabetes Mellitus* (DM) compreende uma desordem metabólica caracterizada por distúrbios no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos, resultante da deficiência absoluta ou relativa de insulina (DIB et al., 1992). Dois transtornos assumem maior importância clínica: o Diabetes tipo 1 e o Diabetes tipo 2 que, embora tenham etiologias diferentes, compartilham de sintomas comuns e complicações similares, decorrentes da hiperglicemia. O Diabetes tipo 1 é uma doença auto-imune específica e resulta da falha do pâncreas em produzir insulina, como consequência da destruição das células beta-pancreáticas, produtoras deste hormônio, nas ilhotas de Langerhans (EXPERT COMMITTEE, 2002). Segundo autores o DM pode alterar o processo de reparo tecidual, devido à redução do aporte sanguíneo periférico, déficit nutricional, reduzida resposta imune local e sistêmica (GOODMAN; HORI, 1984; DEVLIN et al., 1996; WARD et al., 2001; MELLADO et al., 2007;

RETZEPI; DONOS, 2010; GRAVES et al., 2004). Estudos demonstraram uma diminuição significativa na massa óssea, densidade mineral óssea e cicatrização da fratura diminuída na população diabética (BEDI et al., 2010; KAYAL et al., 2010; KIDDER et al., 2010). Um estudo clássico retrospectivo de 1972 a 1982, envolvendo 31 pacientes diabéticos, identificou retardo no processo de consolidação de fraturas em 70% dos casos (LODER, 1998).

Na busca de terapias que modulem positivamente o processo de reparo ósseo em diabéticos, estudos tem apontado para o emprego do laser de baixa intensidade. Observa-se resultados favoráveis acerca da terapia empregando radiação coerente (laser) na região infravermelha do espectro eletromagnético no estímulo da reparação óssea (SAITO; SHIMAZU, 1997; NICOLAU et al., 2003; STEIN et al., 2005; AIHARA et al., 2006). A terapia com luz coerente modula o metabolismo celular permitindo a aceleração do processo de reparo do tecido ósseo, uma vez que a irradiação estimula a

proliferação e diferenciação de células de linhagem osteoblástica, resultando em um aumento do número de células osteoblásticas diferenciadas, bem como na formação de tecido ósseo (OZAWA et al., 1998; NICOLAU et al., 2003; STEIN et al., 2005). Lopes et al. (2007) observou redução no tempo de osseointegração em animais tratados com fototerapia.

Atualmente, grande ênfase tem sido dada ao estudo do efeito da radiação não coerente (LED) na região infravermelha do espectro eletromagnético. Os LED's são dispositivos menos dispendiosos e com maior durabilidade, quando comparados aos lasers (CASALECHI et al.; 2009; DALL-AGNOL et al., 2009; DIAMANTINO et al., 2010 e 2011). Segundo autores, a terapia LED é responsável por efeitos semelhantes aos obtidos pela terapia laser próximo a 630 nm (QUEIROZ et al., 2008; CALIFANO et al., 2008; DALL-AGNOL et al., 2009). Vários estudos empregando terapia LED no vermelho tem sido realizados observando a atividade celular e metabólica de tecido biomodulado, contudo um restrito número de estudos foram desenvolvidos com emprego de LED infravermelho sobre o reparo ósseo. O presente estudo objetivou a análise densitométrica do tecido ósseo após lesão em ratos diabéticos com e sem terapia LED.

Materiais e Métodos

Foram utilizados 30 ratos machos (Wistar, *Rattus norvegicus albinus*) com 300 g (3 meses de idade), divididos em 6 grupos (14, 21 e 28 dias após a cirurgia): CI e LI (14 dias), CII e LII (21 dias), CIII e LIII (28 dias). Os animais foram mantidos em gaiolas e alimentados com ração e água *ad libitum*. Toda pesquisa esteve em conformidade com os critérios aprovados pelo Comitê de Ética da UNIVAP (protocolo nº H013/CEP/2009).

A indução do diabetes foi realizada através da administração de Streptozotocin® na dosagem de 65mg/kg de peso corpóreo na veia caudal dos animais previamente anestesiados. A constatação do estado diabético dos animais se deu após 15 dias da indução, com a glicemia capilar superior a 200 mg/dL (RABELLO et al., 2003).

Previamente à realização do procedimento cirúrgico os animais foram pesados e submetidos à administração subcutânea de atropina 1% (Fraga® Farmagrícola S.A.) numa dose de 0,04 ml por 100 g de peso corporal com a finalidade de promover um relaxamento muscular. Após um período de 15 minutos os animais foram anestesiados com uma injeção intramuscular de cloridrato de xilazina 2% (Xylazin®, Syntec do

Brasil Ltda.) e cloridrato de cetamina (Cetamin®, Syntec do Brasil Ltda.), ambos numa dose de 0,01 ml por 100 g de peso corporal.

Para a confecção do defeito cirúrgico no fêmur direito, foi realizado a tricotomia na região cirúrgica e assepsia com Povidine tópico e a área isolada com campos operatórios. Posteriormente, foi realizada a incisão com a lâmina 15, seguida de divulsão do tecido muscular e descolamento do perióstio para exposição da superfície da porção média do fêmur direito. O defeito ósseo de 2 mm de diâmetro, monocortical e atingindo a porção medular do osso foi então realizado com auxílio de uma broca carbide nº 8 acoplada em um micromotor (35000 rpm) cirúrgico e irrigação constante e abundante com soro fisiológico. Sequencialmente, foi realizada a síntese por planos, sendo a musculatura e a fáscia muscular suturados com fio absorvível 6-0 (Vicryl) e a pele com fio de Nylon 3-0. Como terapia pós-cirúrgica, todos os animais receberam pentabiótico (Fort Dodge®) de amplo espectro via intramuscular profunda numa única dose de 0,02 ml para cada 100 g de peso corporal.

Após o procedimento cirúrgico deu-se início à primeira sessão de fototerapia na área lesionada utilizando um aparelho de LED, emitindo na faixa espectral de 945 ± 20 nm, potência de saída de 48 mW, tempo de irradiação de 240 segundos, área do feixe de $0,78 \text{ cm}^2$ e densidade de energia de 15 J/cm^2 . Todos os animais receberam um total de sete sessões de irradiação transcutânea, sobre a ferida cirúrgica, a cada 48 horas. A primeira aplicação foi realizada imediatamente após o procedimento cirúrgico. A potência de emissão dos equipamentos foi verificada com a utilização do dispositivo Integrated 2-Watt Broadband Power and Energy Meter System - 13 PEM 001/J (Melles Griot Photonics Components Group, EUA).

Aguardado o período de 14, 21 e 28 dias do procedimento cirúrgico, os animais foram eutanasiados de acordo com princípios éticos previstos na Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008, capítulo IV, que dispõe das condições de pesquisa científica e Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA/1991). A eutanásia foi realizada sob anestesia com o emprego de tiopental sódico (0,05 ml/100 g de peso corpóreo) e cloreto de potássio 19,1% (0,4 ml/100 g de peso corpóreo) via intracardiaca. O fêmur dos animais foram removidos e submetidos à análise densitométrica. Para tal as amostras, dos diferentes grupos, foram posicionadas em películas de filme oclusal (Kodak *Insight*, IO-41) com presença de um penetrômetro, conforme figuras 1 e 2. Os grupos

foram identificados com marcadores de chumbo sobre a película.

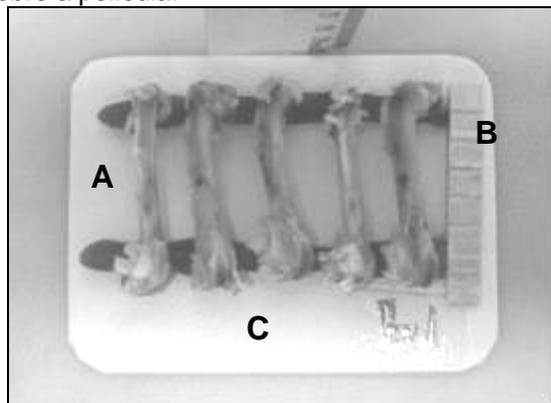


Figura 1- Amostras posicionadas para tomada radiográfica. A - Amostras ósseas posicionadas para tomada radiográfica padronizada. B - Penetrômetro. C - Película radiográfica.

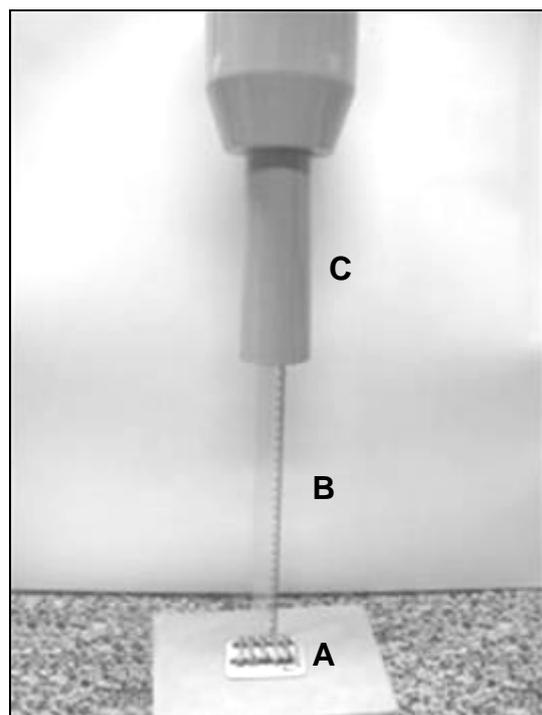


Figura 2- Esquema de tomada radiográfica para análise da DMO. A - Película radiográfica com amostras (por grupo). B - Distância do cone de RX à amostra (30 cm). C - Posição perpendicular do cone de RX (Gnatus, 70 kVp).

O tempo de irradiação durante a tomada foi de 1 segundo. Todas as películas foram processadas simultaneamente em colgadura

múltipla. O processamento em câmara escura a uma temperatura ambiente de aproximadamente 21°C. As películas foram levadas à solução reveladora Kodak contendo na composição água (60 – 65%); sulfito de potássio (5 – 10%); dietilenoglicol (5 – 10%); sulfito de sódio (5 – 10%); hidroquinona (6%); carbonato de potássio (1 – 5%), por 40 segundos, passadas para a lavagem intermediária em água por 20 segundos e fixadas em solução fixadora Kodak contendo na composição e no rótulo atual: bissulfito de sódio (7631-90-5); sulfito de amônio (10196-04-0); tiosulfato de amônio (7783-18-8); ácido acético (64-19-7); ácido bórico (10043-35-3); sulfato de alumínio (10043-01-3), por 10 minutos. A lavagem final foi realizada por 5 minutos em água corrente.

As radiografias foram digitalizadas com auxílio de câmera digital Fuji (5 megapixel) e as imagens foram transferidas para um computador, onde foram analisadas por um programa computacional ImageJ. Estas imagens foram transformadas em tons de cinza para melhor visualização e compreensão das mesmas.

Foram analisadas áreas onde havia tecido ósseo íntegro e sobre o defeito ósseo, medindo-se uma área de osso íntegro e área da lesão, após a calibração do sistema com auxílio do penetrômetro. A sequência dos passos para análise da DMO foram:

1º) Transformação de imagem colorida em 8 bits.

2º) Calibração do sistema a partir das cinco diferentes espessuras do penetrômetro (espessura de alumínio vs radiopacidade).

3º) Medida da densidade óptica na área de tecido ósseo normal e local de perfuração (por amostra), tanto dos grupos controle e quanto irradiados.

Os dados foram submetidos à análise estatística com auxílio do programa GraphPad Prism. Empregou-se a Análise de Variância (ANOVA), com pós-teste de Tukey, considerando valores significativos quando $p < 0,05$.

Resultados

Observou-se aumento significativo ($p < 0,05$) da DMO em todos os grupos tratados quando comparados aos grupos controle. Não houve diferença significativa entre os grupos em 28 dias.

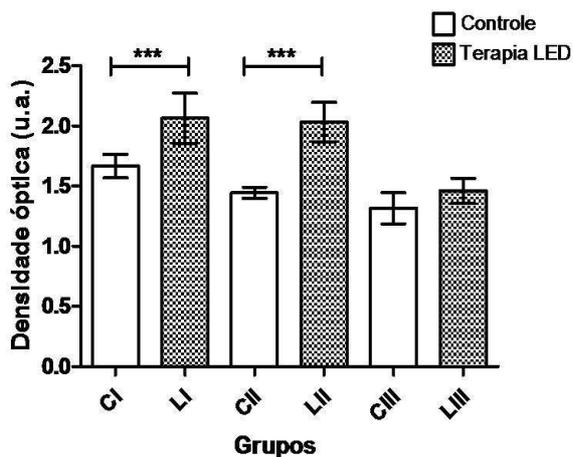


Figura 3- Densidade óptica em diferentes tempos experimentais. CI e LI – 14 DPO, CII e LII - 21 DPO e CIII e LIII 28 – DPO. Dados expressos em média \pm desvio padrão. *** - $p < 0,001$

Discussão

O presente estudo objetivou a análise densitométrica do tecido ósseo após lesão em ratos diabéticos com e sem terapia LED. A densitometria óptica radiográfica é utilizada para a mensuração da DMO, por meio de imagens radiográficas, permitindo avaliar o processo de mineralização óssea com boa precisão e sensibilidade, reprodutibilidade, fácil aplicabilidade e baixo custo (STERMAN, 2001). Para a análise de tecido ósseo, diferentes ferramentas de investigação podem ser utilizadas como: análise histológica, tomografias computadorizadas, densitometria mineral óssea (DMO), entre outras. O processamento digital, para análise da DMO, pode ser realizado com auxílio de uma escala de alumínio (penetrômetro) para permitir calibração (FENYO-PEREIRA et al., 1999; WHAITES, 2003). Em estudos realizados por Bodner et al (1993), os autores afirmaram que o uso de radiografias ainda representa o melhor método não cirúrgico para detecção de formação óssea na existência de lesão.

A grande dificuldade nas análises densitométricas em radiologia é a de reprodutibilidade das densidades ópticas de uma mesma estrutura em sucessivas tomadas radiográficas. Decorre, então, a grande importância da padronização de todos os parâmetros utilizados nas tomadas radiográficas, para que as medidas densitométricas possam ser comparadas sem nenhum fator de correção (CARVALHO et al., 1976; DUTRA et al., 2007). A análise da densitometria em radiografias de rotina realizadas com auxílio de uma escala padrão de alumínio possibilita a aferição do estado de

cicatrização alveolar (MURAMOTO et al., 2005). Relataram também que a formação de osteóide e de mineralização são expressas radiograficamente pelo aumento na radiopacidade, resultante de maior densidade óptica da imagem óssea.

No presente estudo observou-se aumento significativo ($p < 0,05$) da DMO nos grupos tratados quando comparados aos grupos controle em 14 e 21 dias. Não houve diferença significativa entre os grupos em 28 dias. Estes dados corroboram com achados de Nicolau et al. (2003) e Diamantino et al. (2011), demonstrando que padrões de reparo ósseo em fases finais não são inadequadamente afetados pela fototerapia. A DMO aumentada sugere maior da concentração de tecido mineralizado. Durante o processo de reparo ósseo o micro ambiente da lesão apresenta pH reduzido, o qual pode contribuir para perda mineral local, visando tamponamento, permitindo ao estabelecimento de um ambiente propício à liberação de fosfatase alcalina por fibroblastos, com formação de tecido osteóide subsequente (ISMAIL, 1997; GRAVIL; MUCSI, 1997). Segundo autores, a fototerapia com luz coerente (laser) promove normalização do pH local em áreas de reparo ósseo devido ao aumento do aporte sanguíneo local, com subsequente redução da perda de mineral, contribuindo assim para o processo de reparo como um todo (NICOLAU et al., 2003). Os efeitos biomoduladores do laser de baixa intensidade foram atribuídos a sua coerência (BOULTON et al., 1986). Estudos atestam que a coerência da luz não é responsável pela biomodulação, pois esta propriedade se perde nas primeiras camadas de tecido biológico (PÖNTINEN, 2000). A luz emitida por um LED não é coerente, e ao incidir sobre o tecido biológico, se espalha nas primeiras camadas, assim como ocorre com a luz coerente. Com base neste preceito, é possível subsidiar que efeitos semelhantes aos obtidos pelo laser sejam alcançados com a terapia LED.

O presente estudo demonstrou que a terapia com LED (945 ± 20 nm) influenciou o reparo ósseo em animais diabéticos. Considerando que organismos diabéticos podem apresentar retardo no processo de reparo ósseo, a presença de DMO significativamente maior entre os primeiros 21 dias de reparo no grupo tratado com luz não coerente, sugere que pode existir otimização do processo de osseointegração.

Conclusão

Conclui-se que o LED otimiza o processo inicial de reparo ósseo em ratos diabéticos,

conferindo uma DMO significativamente maior na área de lesão ($\approx 30\%$), apontando perspectivas de redução de tempo na osseointegração em diabéticos.

Referências

- AIHARA, N.; YAMAGUCHI, M.; KASAI, K. Low-energy irradiation stimulates formation osteoclast like cells via RANK expression in vitro. **Lasers Med. Sci.** v. 21, p. 24-33, 2006.
- BEDI, A.; FOX A.J.S. ; HARRIS, P.E.; DENG, X.H.; YING, L.A.; WARREN, R.F.; RODEO, S.A. Diabetes mellitus impairs tendon-bone healing after rotator cuff repair. **J Shoulder Elbow Surg.** v 19, n:7, p. 978-988, 2010.
- BOULTON, M.; MARSHALL, J. He-Ne laser simulation of human fibroblast proliferation and attachment in vitro. **Lasers Life Sci.** v.1, p.125-134, 1986.
- CALIFANO, A.R.; KELENCZ, C. A.; NICOLAU, R. A.; MUNOZ, I. S. S.; ZÂNGARO, R A; LOBO, P.D.C. Luz LED (640 20 nm) sobre a atividade, força e tempo de fadiga do músculo masseter - Estudo clínico. **Ter. Manual.** v. 6, p. 163-166, 2008.
- CARVALHO, A. Fator de Correção em Densitometria Radiográfica. **Rev. Fac. Farm. Odont. Araraquara.** v. 10, p. 115-24, 1976.
- CASALECHI, H.L.; NICOLAU, R. A.; CASALECHI, V. L.; SILVEIRA-JÚNIOR, L; PAULA, A.M.B.; PACHECO, M T T. The Effects of Low Level LED on the Repair Process of Achilles Tendon Therapy on Rats. **Lasers Med. Sci.** v. 24, p. 659-665, 2009.
- DALL-AGNOL, M. A.; NICOLAU, R. A.; LIMA, J. C.; MUNIN, E. Comparative analysis of coherent light action (laser) versus non-coherent light (LED) for tissues repair in diabetic rats. **Lasers Med. Sci.** v. 24, p. 909-916, 2009.
- DEVLIN, H.; GARLAND, H.; SLOAN, P. Healing of tooth extraction sockets in experimental diabetes mellitus. **J Oral Maxillofac Surg.** v.54, p.1087-1091, 1996.
- DIAMANTINO, A.G.; NICOLAU, R. A.; OLIVEIRA, M.A.; SANTO, A. M. E. . Evaluation of LED therapy at 945 nm on bone repair by micro x-ray fluorescence spectroscopy and scanning electron microscopy. **Proceedings-SPIE,** v. 8092, 2011.
- DIB, S. A.; RUSSO, E. M.; CHACRA, A. R. **Tratado de endocrinologia clínica.** São Paulo, 1992
- DUTRA, G.; WIENANDTS, P.; COSTA, N.; ARAUJO, F. Avaliação da densidade óptica da superfície oclusal através de radiografias digitalizadas e sua relação com a presença de lesões de cárie em molares decíduos. **Revista Odonto Ciência – Fac. Odonto/PUCRS,** v. 22, n. 57, jul./set. 2007.
- FENYO-PEREIRA M; COSTA, C; PANELLA J. Avaliação fotodensitométrica dos filmes radiográficos periapicais Ektaspeed e Ektaspeed Plus e sua aplicação diagnóstica. **Rev. Inst. Ciênc. Saúde.** v.17, n. 2, p. 103-9, jul/dez. 1999
- FREITAS, A.; ROSA J. E.; SOUZA I. F. **Radiologia Odontológica** 6 ed. São Paulo: Artes Médicas, 2004
- GONZALES, R.C.; WOOD, R.E. Digital image processing. 2 ed. **Pretice-Hall.** 2001 783p.
- GOODMAN, W.G.; HORI, M.T. Diminished bone formation in experimental diabetes. Relationship to osteoid maturation and mineralization. **Diabetes.** v. 33, p. 825-831, 1984.
- GRAVIL, H; MUCSI, I. Adynamic bone disease: pathogenesis, diagnosis and clinical relevance. **Curr. Opin Nephro. Hypertens.** V. 7, p. 356-361, 1997.
- ISMAIL, N. Use of eritropoietin, active vitamine D3 metabolites, and alkali agents in oredialysis patients. **Semi. Nephrol.** V. 17, p. 270-284, 1997.
- JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, J. **Histologia Básica,** 11 Ed., Editora Guanabara/Koogan, p. 135, 2008.
- KAYAL, R.; ALBLOWI, J.; MCKENZIE, E., KROTHAPALLI, N.; SILKMAN, L., GERSTENFELD, L.; EINHORN, T.A.; GRAVES, D.T. Diabetes causes the accelerated loss of cartilage during fracture repair which is reversed by insulin treatment. **Bone.** v.44, n. 2, p. 357-363, 2009.
- KIDDER, L.S.; CHEN, X.Q.; SCHMIDT, A.H.; LEW, W.D. Osteogenic Protein-1 Overcomes

Inhibition of Fracture Healing in the Diabetic Rat: A Pilot Study. **Clin. Orthop. Relat. Res.** V.467, n. 12, p 3249-3256, 2009.

- LOPES, C. B.; PINHEIRO, A. L. B.; SATHIAH, S.; SILVA, N. S.; SALGADO M. A. C. Infrared Laser Photobiomodulation (830nm) on Bone Tissue Around Dental implants: A Raman Spectroscopy and Scanning Eletronic Microscopy Study in Rabbits. **Photomed. Laser Surg.** v. 25, n. 2, p. 96-101, 2007.

- MELLADO-VALERO A.; FERRER-GARCÍA J.C.; HERRERA-BALLESTER, A.; LABAIG-RUEDA, C. Effects of diabetes on the osseointegration of dental implants. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.** v.12, p.38-43, 2007.

- MURAMOTO, C.; STERMAN, F.; FONSECA PINTO, A. Estabelecimento de valores de densidade mineral óssea (DMO) das regiões metafisária e diafisária do rádio em cães da raça Poodle por meio da Densitometria Óptica Radiográfica. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** v.42, n.2, p.89-97, 2005.

- NICOLAU, R. A.; JORGETTI, V.; RIGAU, J.; PACHECO, M. T. T.; REIS, L. M; ZÂNGARO, R. A. Effect of low-power GaAlAs laser (660 nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. **Lasers Med. Sci.** v. 18, p. 89-94, 2003.

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

- PONTINEN, P. **Laseracupuncture.** In: Simunovic Z (ed.) Lasers in Medicine and Dentistry. Part One: Basic Science, and Up-to-date Clinical Application of Low Energy-Laser Laser Therapy LLLT. 1ed. Rijeka: Vitgraf, p.455-475, 2000.

- QUEIROZ, L.S.; WOLLMANN, D. E. R.; NICOLAU, R. A.; PACHECO, M T T . Effect of LED irradiation on microcirculation of auricular mouse. **Rev. APCD**, v. 62, p. 138-142, 2008.

- RETZEPI, M.; DONOS, N. The effect of diabetes mellitus on osseous healing. **Clin. Oral Impl.** v. 21,; p.673-681, 2010.

- SAITO S.; SHIMIZU N. Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat.

J. Orthod. Dentofac. Orthop. v.111, n.5, p.32-525, 1997.

- STEIN, A.; BENAYAHU, D.; MALTZ, L.; ORON, U. Low-Level Laser Irradiation Promotes Proliferation and Differentiation of Human Osteoblasts *in Vitro*. **Photom. Laser Surg**, v. 23, p. 161-166, 2005.

- WARD, D.T.; YAU, S.K.; MEE, A.P.; MAWER, E.B.; MILLER, C.A.; GARLAND, H.O.; RICCARDI, D. Functional, molecular, and biochemical characterization of streptozotocin-induced diabetes. **J. Am. Soc. Nephrol.** v. 12, p. 779-790, 2001.

- WEBER, J. B. B.; PINHEIRO, A. L. B.; OLIVEIRA, M. G.; OLIVEIRA, F. A. M.; RAMALHO, R. L. M. P., Laser therapy improves healing of bone defects submitted to autologus bone graft. **Photomed. Laser Surg.** v.24, n.1, p.38-44, 2006.

- WHAITES, E. **Princípios de radiologia odontológica** 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2003, 444p.