

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

RODRIGO CARVALHO PINTO COELHO

**EFEITOS LOCAIS E SISTÊMICOS DA LLLT NO REPARO
ÓSSEO INICIAL DE ÁREAS COM PARAFUSO PLLA-PGA –
ESTUDO EM COELHOS**

Porto Alegre

2011

RODRIGO CARVALHO PINTO COELHO

**EFEITOS LOCAIS E SISTÊMICOS DA LLLT NO REPARO
ÓSSEO INICIAL DE ÁREAS COM PARAFUSO PLLA-PGA –
ESTUDO EM COELHOS**

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

Orientador: Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber

Porto Alegre

2011

C672e Coelho, Rodrigo Carvalho Pinto

Efeitos locais e sistêmicos da LLLT no reparo ósseo inicial de áreas com parafuso PLLA-PGA – estudo em coelhos. / Rodrigo Carvalho Pinto Coelho – Porto Alegre, 2011.
112 f.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2011.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber.

1. Odontologia. 2. Lasers. 3. Implante absorvível. 4. Terapia a laser de baixa intensidade. 5. Coelhos. I. Weber, João Batista Blessmann. II. Título.

CDD 617.52

Bibliotecária Responsável

Isabel Merlo Crespo
CRB 10/1201



Dedicatória

A Deus, por estar sempre presente em minha vida. Por permitir que eu siga no caminho do aprendizado e do crescimento, junto àqueles que carregam o dom de ensinar.

À minha querida família, por me incentivar e me fazer acreditar que tudo é possível. A distância me fez crescer e amá-los cada vez mais.



Agradecimientos

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, **Prof Dr. João Batista Blessmann Weber**, por toda a disponibilidade, presteza e pelos grandes ensinamentos a mim passados durante o mestrado. Por dar apoio em todos os momentos deste trabalho, por oferecer soluções rápidas às eventuais dificuldades, por contribuir diretamente para que o sonho de me tornar mestre se concretizasse.

À **Profa. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira**, pela grande ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Prof Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli**, pelo auxílio no desenvolvimento desta pesquisa.

À enfermeira **Marta** e à veterinária **Fabiola Schons Meyer**, da **Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UEA-HCPA / UFRGS)**, não apenas por todo o apoio técnico na execução da parte experimental, mas também por abrirem as portas de tão conceituada instituição, esforçando-se de forma admirável e tornando viável o desenvolvimento desta pesquisa.

À **Profa. Dra Luise Meurer**, da **Unidade de Patologia Experimental (UPE) do HCPA / UFRGS**, pela inestimável colaboração e orientação no preparo das amostras e na interpretação histológica deste trabalho. Agradeço pela imensa disponibilidade em ensinar e por abrir as portas da UPE-HCPA / UFRGS.

Aos **funcionários da UEA e UPE – HC / UFRGS: Rosa, Vera, Ângela, Juliana e Eduardo**, por toda a dedicação, disponibilidade e competência no auxílio indispensável à realização deste trabalho. À Funcionária **Flávia**, pela paciência e grande apoio técnico no processamento das amostras e na obtenção das lâminas.

À querida **Fran**, por estar presente neste momento tão importante. Obrigado pela compreensão, pela paciência e pelo auxílio.

AGRADECIMENTOS

À **Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS**, representada pelo Magnífico Reitor, **Prof. Dr. Joaquim Clotet**.

À **Faculdade de Odontologia da PUCRS**, em nome do seu Diretor, **Prof. Marcos Túlio Mazzini Carvalho**, pela realização do Curso de Pós-Graduação em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial – CTBMF.

Ao **Ministério da Educação**, por intermédio da **CAPES**, por viabilizar recursos para a realização do Curso de Mestrado em Odontologia, na área de concentração em CTBMF, investindo na formação qualificada de novos docentes e pesquisadores.

Ao **Exército Brasileiro**, por incentivar a qualificação de seus militares e por me oferecer as condições necessárias à realização deste curso.

Aos **professores de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da PUCRS**, por toda a excelência e dedicação no ensino da Odontologia e da CTBMF.

Aos **funcionários da Faculdade de Odontologia da PUCRS**.

Aos professores **Evandro Guimarães de Aguiar, Carlos Eduardo Assis Dutra, Cláudio Rômulo Comunian, Bruno Pereira Campanha, Luiz Cláudio Noman Ferreira**, do Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, com os quais eu pude muito aprender durante minha formação profissional, primeiro na graduação e depois na especialização em CTBMF.

Aos professores **Adriano do Valle Fernandes, Peter Reher, Antônio Albuquerque de Brito e Vasco de Oliveira Araújo**, cirurgiões bucomaxilofaciais com os quais eu muito aprendi durante o período em que participei do Serviço de CTBMF dos Hospitais João XXIII e Maria Amélia Lins - FHEMIG.



Resumo

RESUMO

A presente pesquisa avaliou os efeitos locais e sistêmicos da LLLT no processo inicial de reparo ósseo, após a implantação de um parafuso PLLA-PGA em tíbias de 24 coelhos linhagem Nova Zelândia. A amostra foi dividida aleatoriamente em 2 grupos, experimental e controle. Em cada animal, foi implantado 1 parafuso PLLA-PGA de 5mm de comprimento por 1,5mm de diâmetro em cada tíbia, direita e esquerda. No grupo experimental, os coelhos receberam aplicações de *laser* infravermelho (830nm; 4J/cm²; 100mW; 40,4 segundos), apenas na pata direita, no pós-operatório imediato e a cada 48 horas, até o máximo de 7 aplicações. O grupo controle não foi irradiado. Ambos foram divididos em 3 subgrupos, de acordo com o tempo de observação de 5, 15 e 30 dias, após o qual os animais foram mortos e submetidos à análise histológica para avaliação do grau de formação óssea perimplantar. Esta foi mensurada pelo número de campos de aumento de 200 vezes, ao microscópio ótico, que apresentavam osso neoformado perimplantar. Foram comparados os resultados entre as patas direita do grupo experimental, esquerda do grupo experimental e ambas as patas do grupo controle, ao longo dos 3 períodos de observação. Os resultados da análise quantitativa demonstraram que houve uma maior formação óssea inicial nas patas direita e esquerda do grupo experimental, quando comparadas às amostras do grupo controle, no período de 5 dias. A análise descritiva mostrou que as trabéculas dos animais irradiados, em 5 dias, apresentavam-se ligeiramente maiores e com maior distribuição. Nos demais intervalos, não houve diferenças estatisticamente significativas. A LLLT, nos padrões utilizados, acelerou a formação óssea precoce no intervalo de 5 dias.

Descritores¹: *lasers*, implante absorvível, terapia a *laser* de baixa intensidade, coelhos

¹ Descritores em Ciências da Saúde (DeCS); disponível em <http://desc.bvs.br/> Acesso em 13 de dezembro de 2011.



Abstract

ABSTRACT

This study evaluated the local and systemic effects of LLLT in the initial process of bone repair after implantation of a PLLA-PGA screw in tibia of 24 New Zealand white rabbits. The sample was randomly divided into two groups, experimental and control. A PLLA-PGA screw was implanted in each tibia. In the experimental group, rabbits received applications of infrared laser (830nm, 4J/cm², 100mW, 40.4 sec), only in the right tibia, in the immediate postoperative period and every 48 hours up to a maximum of 7 applications. The control group was not irradiated. Both were divided into 3 subgroups according to the observation time of 5, 15 and 30 days, after which the animals were killed. A histological analysis was performed to assess the degree of peri-implant bone formation, using a quantitative parameter and qualitative analysis. We compared the results between the right and the left tibia of the experimental group and both tibias of the control group over the three observation periods. The results of quantitative analysis showed greater initial bone formation in both tibias of the experimental group compared to the control group, in 5 days. The descriptive analysis showed that the newly formed trabeculae of the irradiated bones were slightly larger and thicker, in 5 days. In the other intervals, there were no statistically significant differences. The LLLT accelerated bone formation in 5 days, exerting both local and systemic effects.

Descriptors²: lasers, absorbable implants, rabbits, laser therapy, low-level.

² Medical Subject Headings (MeSH); disponível em <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>. Acesso em 13 de dezembro de 2011.



Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

(Al)GaAs	Arseneto de Gálio e Alumínio
AlGaInP	Fosfeto de Índio-Gálio-Alumínio
ANOVA	Análise de Variância
BGJb	Meio de Biggers, Gwatkin e Judath, modificado por Fitton-Jackson
CCE-FO	Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia
CEUA	Comitê de Ética para o Uso de Animais
D.E	Densidade de energia
DO	Distração osteogênica
DPO	Dia Pós-Operatório
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
He-Ne	Hélio-Neônio
HE	Hematoxilina-eosina
Hz	Hertz
J/cm ²	Joule por centímetro quadrado
LLLT	<i>Low-Level Laser Therapy</i> (Laserterapia de Baixa Intensidade)
mW	Miliwatt
Nm	Nanômetro
OSBRM	Osteotomia sagital bilateral do ramo mandibular
P	Potência
PBS	Solução tampão fosfato-salino
PDS	Polidioxano
PGA	Ácido poliglicólico
PLLA	Ácido poli-L-lático
PO	Pós-operatório
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
SR-PLLA	<i>Self-reforced</i> PLLA (PLLA autorreforçado.)
TC	Tomografia computadorizada
UEA	Unidade de Experimentação Animal
UPE	Unidade de Patologia Experimental
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UPE	Unidade de Patologia Experimental
XDF	Espectroscopia por difração de raios X
XRF	Espectroscopia por fluorescência de raios X
W	Watt
λ	Comprimento de onda (lambda)
®	Marca registrada
μm	Micrômetro
%	Porcento / Porcentagem / Percentagem
20x	Vinte vezes
40x	Quarenta vezes
100x	Cem vezes
200x	Duzentas vezes
400x	Quatrocentas vezes



Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Biotério de coelhos e centro cirúrgico da UEA-HCPA / UFRGS	59
Figura 2 – Sistema de parafuso bioabsorvível LactoSorb®	60
Figura 3 – Desenho esquemático da tíbia direita, demonstrando o posicionamento do parafuso e a aplicação do <i>laser</i>	62
Figura 4 – A - Mesa cirúrgica preparada para o procedimento. B - Ambiente do centro cirúrgico da UEA-HCPA / UFRGS	64
Figura 5 – A – Entubação orotraqueal do coelho e animal posicionado. B – Entubação concluída, monitorização com oxímetro e antissepsia de pele	65
Figura 6 – Sequência de passos para acesso à face medial da tíbia direita	66
Figura 7 – Sequência de perfuração para instalação do parafuso PLLA-PGA	68
Figura 8 – Sequência de instalação do parafuso PLLA-PGA	69
Figura 9 – A e B – Amostras removidas após a eutanásia	71
Figura 10 – Blocos de parafina já desgastados, prontos para a obtenção das lâminas de histologia	73
Figura 11 – Fotomicrografia da área perimplante PLLA-PGA em aumento de 20x	74
Figura 12 – Fotomicrografia da área perimplante PLLA-PGA. Grupo I-A. Pata direita .	81
Figura 13 – Fotomicrografia da área perimplante PLLA-PGA. Grupo I-A. Pata esquerda	82
Figura 14 – Fotomicrografia da área perimplante PLLA-PGA. Grupo II-A. Pata direita.	82
Figura 15 – Fotomicrografia da área perimplante PLLA-PGA. GI-B. Pata direita	83
Figura 16 – Fotomicrografia da área perimplante PLLA-PGA. Grupo I-B. Pata esquerda	84
Figura 17 – Fotomicrografia da área perimplante PLLA-PGA. Grupo II-B. Pata direita.	84
Figura 18 – Fotomicrografia da área perimplante PLLA-PGA. Grupo I-C. Pata direita.	85
Figura 19 – Fotomicrografia da área perimplante PLLA-PGA em aumento de 20x. Grupo I-C. Pata direita	86
Figura 20 - Fotomicrografia da área perimplante PLLA-PGA. Grupo I-C. Pata esquerda	86
Figura 21 - Fotomicrografia da área perimplante PLLA-PGA. Grupo II-C. Pata esquerda	87



Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição dos animais dentro dos grupos GI e GII, de acordo com o período de observação/eutanásia do animal	61
Tabela 2 – Distribuição das densidades de energia do <i>laser</i> por sessão e doses totais, dentro dos subgrupos de GI	63
Tabela 3 – Número de campos de 20 vezes preenchidos com trabéculas ósseas neoformadas na região perimplante PLLA-PGA	80
Tabela 4 – Comparação da formação óssea no tecido perimplantar entre os grupos experimental e controle, através do número de campos de 20 vezes preenchidos com trabéculas ósseas neoformadas	87
Tabela 5 – Comparação da formação óssea entre os lados direito e esquerdo do mesmo grupo	88
Tabela 6 – Comparação da formação óssea entre os subgrupos A, B e C de um mesmo grupo	89



Sumário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISTA DE LITERATURA	26
2.1 LLLT – <i>Low-Level Laser Therapy</i>	26
2.2 Efeitos Sistêmicos da LLLT	40
2.3 Materiais de Fixação à Base de PLLA-PGA	45
3 PROPOSIÇÃO	55
3.1 Objetivo Geral	55
3.2 Objetivos Específicos	55
4 METODOLOGIA	57
4.1 Delineamento da Pesquisa	57
4.2 Problema	57
4.3 Hipóteses	58
4.4 Seleção da Amostra	58
4.5 Organização dos Grupos	60
4.6 Aplicação do <i>Laser</i>	62
4.7 Procedimentos Cirúrgicos para Implantação dos Parafusos	64
4.8 Eutanásia dos Animais e Avaliação Macroscópica das Amostras	70
4.9 Preparo das Amostras para Processamento Histológico	72
4.10 Análise dos Resultados da Microscopia	74
4.11 Análise dos Resultados da Microscopia - Análise Estatística	76
5 RESULTADOS	79
5.1 Análise Macroscópica	79
5.2 Análise Microscópica	79
5.3 Análise Estatística	87
6 DISCUSSÃO	91
7 CONCLUSÃO	101

REFERÊNCIAS	103
APÊNDICE A – Ficha de Controle dos Procedimentos Cirúrgicos	108
APÊNDICE B – Ficha de Análise – Escore Histológico da Formação Óssea	109
ANEXO A	111
ANEXO B	112



Introdução

1 INTRODUÇÃO

O interesse pela LLLT (*Low Level Laser Therapy* – Laserterapia de Baixa Intensidade) como método de biomodulação do processo inflamatório vem crescendo nos últimos anos. Suas características de monocromaticidade e coerência podem afetar o comportamento celular, sem produção de calor. De acordo com seu comprimento de onda e densidade de energia, é possível ter estimulação ou inibição de atividades bioquímicas, fisiológicas ou proliferativas em diversos tecidos. A LLLT tem sido estudada com o objetivo de promover uma maior rapidez no reparo ósseo, melhor cicatrização tecidual, menor desconforto e menor edema pós-operatórios (TAKEDA, 1988; BELKIN e SCHWARTZ, 1989; WEBER *et al.*, 2006; FREDDO *et al.*, 2009; RODRIGO *et al.*, 2009).

Na literatura, há uma grande variedade de estudos *in vitro*, *in vivo*, em modelo animal e humano, sobre os efeitos da LLLT nos mecanismos de reparo ósseo. Dentre as reações teciduais biomoduladas pela irradiação a *laser*, citam-se um aumento da proliferação celular, aumento da atividade dos osteoblastos, da vascularização e da formação óssea, maior deposição de colágeno, além de propriedades analgésicas e anti-inflamatórias, acelerando o início do processo cicatricial. (LUGER, 1998; WEBER *et al.*, 2006; PINHEIRO e GERBI, 2006; CERQUEIRA *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2007; FREEDO *et al.*, 2009).

Muitos destes estudos utilizaram o *laser* diodo de arseneto de gálio e alumínio, (Al)GaAs, com resultados efetivos em várias situações que envolvem reparo ósseo. Seus efeitos biomoduladores positivos foram demonstrados em áreas de fraturas (LIU *et al.*, 2007; SHAKOURI *et al.*, 2010), em defeitos ósseos *in vitro*

(GUZZARDELLA *et al.*, 2002), defeitos ósseos *in vivo*, (SILVA JÚNIOR *et al.*, 2002; AKYOL e GÜNGÖRMÜS, 2010), defeitos periodontais (ABOELSAAD *et al.*, 2009), em áreas de enxerto (GERBI *et al.*, 2005; WEBER *et al.*, 2006), áreas de distração osteogênica (HÜBLER *et al.* 2010) e na osseointegração de implantes (CAMPANHA *et al.*, 2010). O seu comprimento de onda infravermelho lhe confere uma maior capacidade de penetração nos tecidos biológicos, permitindo alcançar e agir sobre o osso subjacente (SILVA JÚNIOR, *et al.*, 2002; PINHEIRO e GERBI, 2006; CAMPANHA *et al.*, 2010; SHAKOURI *et al.*, 2010).

Embora haja muitas pesquisas avaliando os efeitos locais da LLLT no processo de reparo ósseo, suas ações biomoduladoras em áreas tratadas com parafusos bioabsorvíveis foram pouco relatadas. Além disso, os possíveis efeitos sistêmicos desta irradiação são escassos na literatura.

Nos últimos anos, os implantes bioabsorvíveis têm ganhado bastante aceitação como dispositivos de fixação esquelética, representando uma alternativa às fixações metálicas. Trata-se de materiais aloplásticos, compostos por homo ou copolímeros, cujos principais componentes são o ácido poliglicólico (PGA), o ácido polilático (PLA) e o polidioxano (PDS) (SUURONEN *et al.*, 1998, HOCHULI-VIEIRA *et al.*, 2005;). Sua indicação mais comum na cirurgia ortopédica e bucomaxilofacial é a fixação óssea, como em casos de fraturas e também em movimentos esqueléticos eletivos (EDWARDS *et al.*, 2001).

Introduzidas no mercado em 1996, as placas e parafusos compostos por 82% de ácido poli-L-lático (PLLA) e 18% de ácido poliglicólico (PGA) possuem

características químicas e físicas que as classificam como biocompatíveis. Porém, alguns relatos têm apresentado reações de corpo estranho aos biomateriais compostos por PLLA-PGA. Estas reações são associadas à presença de grande quantidade de PLLA na fórmula dos bioimplantes. Em contrapartida, formulações anteriores, contendo menor quantidade de PLLA apresentaram uma menor resistência do material à tração e uma maior taxa de reabsorção (BERGSMA *et al.*, 1993; SUURONEN *et al.*, 2001; FERRETTI, 2008; THIELLI *et al.*, 2008).

Desde a introdução dos implantes bioabsorvíveis no mercado, vários sistemas de placas e parafusos estão disponíveis para o uso em cirurgia e traumatologia bucomaxilofacial. Apesar de transcorridos mais de 15 anos desde o início da utilização destes materiais, seu comportamento biológico durante a bioabsorção, em contato com tecido ósseo, ainda é discutido.

Assim, o presente trabalho se propõe a avaliar os possíveis efeitos locais e sistêmicos da LLLT no processo inicial de reparo ósseo em áreas adjacentes a parafusos PLLA-PGA.



Revista de literatura

2 REVISTA DE LITERATURA

2.1 LLLT – *Low-Level Laser Therapy*

A palavra *LASER* é um acrônimo de *Ligth Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (amplificação da luz por emissão estimulada de radiação). Trata-se de um tipo especial luz, monocromática, com coerência e unidirecionalidade, capaz de transferir uma alta densidade de energia aos tecidos, concentrada em pequenos pontos, permitindo o seu emprego em diagnósticos e terapias nas mais diversas áreas. (BRUGNERA JÚNIOR *et al.*, 2003; GENOVESE, 2007).

A monocromaticidade é uma propriedade do *laser* que significa que seus fótons, partículas de carga luminosa, possuem o mesmo comprimento de onda. De forma simplista, trata-se de uma luz pura. A coerência, outra característica do *laser*, refere-se ao fato de que as cristas e os vales das trajetórias em forma de onda de seus fótons coincidem em termos de direção, amplitude, comprimento e fase. Em outras palavras, suas ondas são alinhadas, sincronizadas, propagando-se na mesma direção. Por fim, o *laser* é uma luz unidirecional, com feixe de fótons paralelos. A divergência angular é muito pequena, permitindo concentrar toda a energia do *laser* em um ponto focal, obtendo-se uma maior densidade de energia (ALMEIDA-LOPES, 2003; BRUGNERA JÚNIOR *et al.*, 2003; GENOVESE, 2007).

Portanto, o *laser* é uma forma de radiação não ionizante, concentrada, que, em contato com os tecidos biológicos, produz efeitos fototérmicos, fotoquímicos e

fotofísicos, dependentes do seu comprimento de onda e da sua densidade energética. Quando a densidade de energia oferecida aos tecidos é baixa, mas suficiente para que a célula alvo utilize essa energia, de forma a estimular sua membrana ou suas mitocôndrias, o *laser* é classificado como de baixa potência ou intensidade (LLLT), capaz de induzir as células à biomodulação, ou seja, favorecendo a recuperação do estado normal dos tecidos afetados (ALMEIDA-LOPES, 2003, GENOVESE, 2007; ANGELETTI *et al.*, 2010).

O *laser* utilizado em aplicações clínicas com finalidade biomoduladora possui comprimento de onda que varia, no espectro de radiações eletromagnéticas, entre 600 e 1000nm, na faixa de luz visível e infravermelho próximo. A potência é inferior a 1W, a densidade de potência ou irradiância média situa-se entre 0,01 e 100mW, enquanto a densidade de energia, ou fluência, entre 0,1 e 10J/cm². Dentro dessas características, apresenta potencial para biomodular positivamente eventos celulares, favorecendo o processo de reparo tecidual (ALMEIDA-LOPES, 2003; BRUGNERA JÚNIOR *et al.*, 2003; ANGELETTI *et al.*, 2010).

A cicatrização de feridas e o reparo tecidual são processos complexos que envolvem eventos dinâmicos como a coagulação, inflamação, granulação, contração da ferida e reparo tecidual (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Atualmente, muitos estudos têm defendido o uso da LLLT na biomodulação destes eventos celulares.

Em 1989, Karu afirmou que a LLLT favorece a reparação tecidual, melhorando a regeneração e a cicatrização de tecidos, através da estimulação da proliferação celular e da síntese do colágeno, da aceleração na formação de tecidos

de granulação e do aumento da síntese de ATP. Entretanto, os efeitos da LLLT são ainda controversos, uma vez que há pesquisas que indicam efeitos estimulatórios e outras que mostram efeitos inibitórios do *laser* nas culturas celulares.

Os efeitos da LLLT no reparo ósseo da tíbia de ratos, após a criação de um defeito de 1,6mm de diâmetro, foram avaliados por Barushka *et al.* (1995). Ao todo, 292 ratos foram operados, sendo que o grupo experimental recebeu *laser* He-Ne (632nm; 6,0mW; 31J/cm²; 2,3 minutos) no 5º e 6º dias após a cirurgia, e o controle recebeu luz vermelha (660nm, 0,4J/cm²). Os períodos de observação foram de 9, 10, 11, 12 e 15 dias, após os quais o tecido da região do defeito foi coletado e submetido a métodos para avaliação bioquímica da atividade da fosfatase alcalina e da fosfatase ácida resistente ao tartarato. A tíbia de 3 ratos irradiados, de cada tempo de observação, foi dissecada para avaliação quantitativa histomorfométrica. Esta análise também foi conduzida em 6 tíbias de ratos do grupo controle, em cada intervalo de tempo de 0, 10, 13, 15 dias após a cirurgia. Houve um aumento significativo da atividade da fosfatase alcalina, no grupo experimental, ao 10º dia (2,2 vezes), em relação ao grupo controle. A fosfatase ácida resistente ao tartarato diminuiu de forma significativa no grupo *laser*, nos dias 11 e 12, comparada com o grupo controle. Tais achados, segundo os autores, demonstraram a ação da LLLT alterando as populações de osteoblastos e osteoclastos e, assim, acelerando a neoformação óssea. A análise histomorfométrica revelou que o preenchimento do defeito com osso compacto neoformado ocorreu de forma mais rápida no grupo com *laser*. Além disso, a redução gradual na fração de volume de osso trabecular foi mais rápida também no grupo *laser*. Portanto, houve um acúmulo mais rápido de osso neoformado no defeito de ratos submetidos à LLLT.

Luger *et al.* (1998) avaliaram os efeitos da laserterapia na cicatrização de fraturas ósseas, por meio de métodos biomecânicos. Esse estudo envolveu 2 grupos com 25 ratos Wistar cada. Em todos os animais, foi criada uma fratura óssea na tíbia direita, fixada com fio de Kirschner de 1mm de diâmetro. O grupo experimental recebeu irradiação com *laser* de Hélio-Neônio (He-Ne, 632,8nm, 35mW), aplicados transcutaneamente, por 30 minutos, em três pontos de 10 minutos cada, diariamente, por 14 dias. O segundo grupo serviu como controle, sem receber irradiação. Após 4 semanas, a tíbia foi removida e submetida a testes de tensão até a fratura. Os resultados mostraram que, no grupo irradiado, a carga máxima de fratura foi significativamente maior e a área do calo ósseo formado foi menor. A rigidez estrutural também foi superior nas amostras do grupo irradiado. Os autores concluíram que a LLLT desempenha um importante papel no reparo ósseo em ratos.

Outro estudo investigou os efeitos do *laser* (Al)GaAs (830nm, 500mW), de modo pulsado, na formação óssea, usando culturas de células osteogênicas derivadas da calvária de fetos de ratos (OZAWA *et al.*, 1998). O período de irradiação das culturas variou entre o 1º e o 16º dia após à subcultura (3,82J/cm² por 10 minutos, diariamente), e o acompanhamento ocorreu até o 21º dia. Foram avaliadas a proliferação celular, a formação de nódulos ósseos, a atividade da fosfatase alcalina e a expressão gênica da osteocalcina, comparando grupos irradiados com grupos controles, sem *laser*. Quando a irradiação foi feita no dia 1, houve uma significativa estimulação da proliferação celular nos dias 6 e 9. Quando a irradiação foi feita após o 1º dia, não ocorreram diferenças na proliferação celular. Considerando a formação de nódulos ósseos, nas culturas irradiadas até o 13º dia,

uma maior formação óssea foi encontrada, com diferenças significativas, quando comparadas às culturas controles. Além disso, a área média dos nódulos ósseos nas placas de cultura, irradiadas até o 6º dia, foi significativamente maior. As culturas irradiadas no dia 1 apresentaram um aumento significativo na atividade da fosfatase alcalina e da expressão da osteocalcina. Assim, o *laser*, em fases iniciais da cultura celular, promoveu aumento da proliferação celular, da formação óssea, da atividade da fosfatase alcalina e da osteocalcina. Os autores concluíram que o *laser* desempenhou 2 papéis principais na estimulação da formação óssea. O primeiro, na estimulação da proliferação celular, especialmente células formadoras de nódulos ósseos, da linhagem dos osteoblastos. O segundo, na estimulação da diferenciação celular, resultando no aumento do número de osteoblastos diferenciados e no aumento da formação óssea.

Já Guzzardella *et al.* (2002) conduziram um estudo *in vitro* para avaliarem o papel da LLLT em defeitos ósseos. O estudo incluiu 12 fêmures de ratos, nos quais se criou um defeito ósseo na epífise distal, mantendo-os, então, em um meio de cultura BGJb (meio de Biggers, Gwatkin e Judath, modificado por Fitton-Jackson) por 21 dias. Os autores monitoraram níveis de fosfatase alcalina / proteínas totais, cálcio e óxido nítrico, através da análise do sobrenadante, em 4, 14 e 21 dias, além de determinarem a porcentagem de tecido reparado, com análise histomorfométrica. O grupo experimental teve 6 peças, recebendo aplicações do *laser* (Al)GaAs (780nm; 300J/cm²; 1 W, ;300 Hz, modo pulsátil, por 10 minutos), iniciadas no dia seguinte ao preparo, por 10 dias. O grupo controle não recebeu *laser*. Os resultados mostraram que os níveis de fosfatase alcalina/ proteínas totais e óxido nítrico foram maiores no meio de cultura do grupo irradiado, com diferenças estatisticamente

significativas. Já os íons cálcio tiveram um acúmulo progressivo no meio de cultura do grupo controle, ao passo que no grupo irradiado, houve diminuição significativa em 21 dias, o que poderia ser explicado pela mineralização maior deste grupo. A análise histomorfométrica revelou um reparo mais acelerado nas amostras do grupo *laser*. Os autores concluíram que a LLLT desempenhou um papel positivo no reparo dos defeitos ósseos criados.

A quantidade de osso neoformado em ratos irradiados com *laser* foi avaliada, através de histomorfometria, por Silva Júnior *et al.* (2002). A pesquisa incluiu 40 ratos Wistar, divididos em 4 grupos e submetidos a um procedimento cirúrgico para criar um defeito ósseo no fêmur direito. Após 48 horas, os grupos A e C receberam aplicações de *laser* com 830nm, 40mW e $4,8\text{J}/\text{cm}^2$ por sessão, 3 vezes por semana. O grupo A recebeu 12 sessões (D.E total= $57,6\text{J}/\text{cm}^2$), com acompanhamento de 28 dias. Os animais do grupo C receberam 3 sessões (D.E total= $14,4\text{J}/\text{cm}^2$), acompanhados por 7 dias. Os grupos B e D foram grupos controles de 28 e 7 dias, respectivamente. Após a morte, a área do defeito foi removida, preparada histologicamente e analisada com um *software* próprio para morfometria. Os resultados mostraram diferenças estatisticamente significantes, com relação à quantidade de osso neoformado, entre os grupos C e D. Em 7 dias, o grupo irradiado obteve valores bem superiores aos do grupo controle. Em 28 dias, não houve diferenças significativas. Segundo os autores, o *laser* aumentou a formação óssea, nas fases iniciais do reparo ósseo.

O estudo de Otremski *et al.* (2004) não mostrou efeitos benéficos com a LLLT na cicatrização de fratura de tíbia em pintos. Os autores usaram 120 aves, operadas

no 21º dia de vida. Criou-se uma fratura na metade da tíbia direita, a qual foi fixada com fio de Kirschner. O grupo experimental continha 90 animais, os quais receberam *laser* He-Ne ($\lambda=632,8\text{nm}$; modo contínuo, por 5 minutos), começando no dia seguinte à cirurgia e, diariamente, por sete dias. Em 30 destes, a densidade de energia (D.E) diária foi de $0,7\text{J}/\text{cm}^2$, em 30, a D.E diária foi de $1,5\text{J}/\text{cm}^2$ e nos 30 restantes, a D.E foi de $3\text{J}/\text{cm}^2$. 30 animais formaram o grupo controle, sem *laser*. Em cada grupo, os períodos de observação foram de 8, 15 e 23 dias. Após a morte, a tíbia foi removida e submetida a avaliações radiográfica, histológica e biomecânica. Radiograficamente, não houve diferenças significativas com relação ao tamanho e a densidade do calo ósseo. O padrão histológico, nas fases iniciais, foi similar em ambos os grupos, com uma combinação de calo fibroso e cartilaginoso. Nos intervalos de 23 e 30 dias, houve um discreto atraso na reparação do grupo experimental. Quanto aos aspectos biomecânicos, não houve diferenças significativas nos calos analisados, em testes de rigidez, torque máximo e grau de deformação de torção. Os autores concluíram que o tipo e a intensidade do *laser* usado não demonstraram efeitos positivos no reparo de fraturas na tíbia, em animais saudáveis.

Os efeitos do *laser* de baixa intensidade no reparo de defeitos ósseos que receberam biomateriais também foram avaliados. Gerbi *et al.* (2005) investigaram histologicamente a ação do (Al)GaAs (830nm ; 40mW ; $16\text{J}/\text{cm}^2$ por sessão, D.E total de $112\text{J}/\text{cm}^2$) em áreas que receberam osso bovino liofilizado, associado ou não a uma membrana bioabsorvível. O estudo em modelo animal incluiu 42 ratos, em cujo fêmur direito realizou-se um defeito ósseo. No grupo 1, controle, o defeito não foi preenchido. Nos grupos 2 a 5, o defeito foi preenchido com osso orgânico bovino.

Nos grupos 4 e 5, o defeito preenchido foi coberto com uma membrana bioabsorvível. O *laser* foi realizado nos grupos 3 e 5, em 7 sessões, a cada 48 horas, em 4 pontos ao redor do defeito. Os períodos de observação foram de 15, 21 e 30 dias, quando então as peças foram preparadas para análise histológica. Os autores observaram que nos grupos irradiados houve uma maior quantidade de deposição de fibras colágenas nas fases iniciais do reparo ósseo (15 dias). Estas se apresentavam melhor distribuídas e mais bem organizadas na área do defeito. No período de 30 dias, uma maior quantidade de osso trabecular bem organizado foi observada nos grupos irradiados, comparados aos controles. Assim, a LLLT foi capaz de promover uma biomodulação positiva no reparo ósseo das áreas preenchidas com osso bovino orgânico, com ou sem membrana bioabsorvível.

A ação da LLLT no reparo de defeitos ósseos de fêmures de ratos tratados com enxertos autógenos foi avaliada por Weber *et al.* (2006). Utilizou-se o *laser* infravermelho ($\lambda=830\text{nm}$, modo contínuo, $P=50\text{mW}$, $D.E.=10\text{J}/\text{cm}^2$ por sessão), aplicado no período trans-operatório e, a cada 2 dias, nos 15 dias seguintes. O estudo incluiu 60 ratos Wistar, aleatoriamente divididos em 4 grupos. O grupo 1, controle, não recebeu *laser*. No trans-operatório, o grupo 2 recebeu *laser* apenas no leito cirúrgico. O grupo 3 apenas no enxerto removido e o grupo 4 recebeu irradiação tanto no leito cirúrgico quanto no enxerto. Os animais foram acompanhados por períodos de 15, 21 e 30 dias. Na análise histológica, observou-se que a remodelação óssea foi mais evidente, qualitativa e quantitativamente, nos grupos 2 e 4, que receberam o *laser* no leito cirúrgico, no trans-operatório. Os autores argumentaram que a irradiação do leito cirúrgico pode estimular diretamente células imaturas da medula óssea, tornando seu efeito biomodulador mais evidente. Por fim,

concluíram que a LLLT, empregada nos parâmetros deste trabalho, demonstrou ter um efeito biomodulador positivo na cicatrização de defeitos ósseos com enxertos autógenos. Ademais, tais efeitos tornam-se mais pronunciados quando a irradiação é feita diretamente no leito cirúrgico, no trans-operatório.

Pinheiro e Gerbi (2006) afirmaram que inúmeros trabalhos demonstraram resultados positivos sobre a capacidade da LLLT em promover a bioestimulação no processo de reparo ósseo. Segundo os autores, os efeitos do *laser* de baixa intensidade foram associados a uma maior taxa de formação óssea, de proliferação e diferenciação celular, aumento do número de osteoblastos, aumento na atividade da fosfatase alcalina, na vascularização e na concentração de cálcio e fósforo, maior deposição de colágeno, além de acelerar a deposição da matriz óssea. Os efeitos positivos são mais proeminentes quando o *laser* é aplicado nas fases iniciais do processo de reparo ósseo, momento em que ocorre a proliferação celular. Nesta fase, a proliferação de osteoblastos e a diferenciação de células mesenquimais são estimuladas pela irradiação a *laser*. Tal irradiação promove um aumento nos níveis de fatores de crescimento, os quais estimulariam a diferenciação e proliferação celulares, a secreção e a maturação da matriz óssea.

Segundo Genovese (2007), a laserterapia apresenta como efeito direto uma ação na resposta inflamatória em sua fase inicial, atuando sobre a microcirculação, podendo estimular a neoformação celular na fase de reparo regenerativo.

Cerqueira *et al.* (2007) avaliaram o uso do *laser* diodo (Al)AsGa (830nm) em mandíbulas de ovelhas submetidas a distração osteogênica. Os resultados

mostraram que os grupos submetidos à laserterapia apresentaram maior disposição de trabéculas ósseas mineralizada do que o grupo controle.

Liu *et al.* (2007) desenvolveram um estudo para demonstrar os efeitos biológicos da LLLT no reparo de fraturas tibiais em coelhos, por meio de avaliações radiográfica, histológica e da densidade óssea. Foram incluídos 14 coelhos, sendo 7 no grupo controle, apenas com simulação de irradiação, sem *laser*, e 7 no grupo experimental ($\lambda=830\text{nm}$, modo contínuo, $P=200\text{mW}$, D.E total= $40\text{J}/\text{cm}^2$). Todos os animais foram submetidos a uma fratura na parte média da diáfise tibial esquerda, estabilizada com um fixador externo, e acompanhados por 4 semanas. Nesse período, radiografias laterais e caudo-craniais foram realizadas a cada semana. Radiograficamente não houve diferenças significativas entre os grupos, com relação à espessura do calo formado ao redor da fratura. Porém, na 3ª e 4ª semana, percebeu-se uma redução da diastase entre os fragmentos fraturados e uma maior formação óssea intramedular no grupo com *laser*. Com relação à densidade óssea, medida por microtomografia computadorizada (Micro-CT Scanner), as fraturas irradiadas apresentaram melhor remodelação óssea que aquelas do grupo controle, com significância estatística. Na análise histológica, ao final das 4 semanas, as fraturas do grupo experimental apresentavam menos fibrocartilagem e um aumento da estrutura trabecular, comparado ao grupo controle. Os autores concluíram que a LLLT pode acelerar o processo de reparo ósseo, estimulando o crescimento ósseo e o aumento na densidade óssea, especialmente em estágios precoces do reparo.

Um trabalho realizado por Blaya *et al.* (2008) avaliou histologicamente o efeito da laserterapia (830nm e 650nm) no reparo ósseo de cavidades feitas em fêmures

de ratos. Comparando-se os grupos irradiados com o grupo controle (sem aplicação de *laser*), o estudo mostrou que a laserterapia, tanto com *laser* infravermelho quanto com *laser* vermelho, facilita o reparo ósseo, acelerando o processo regenerativo primário, melhorando a qualidade da estrutura óssea e produzindo um osso mais compacto do que no grupo controle.

Freddo *et al.* (2009) avaliaram os efeitos da LLLT, utilizando *laser* vermelho (fosfeto de índio-gálio-alumínio - AlGaInP, 685nm, 35mW, 10 J/cm²) e infravermelho (Al)GaAs (830nm, 50mw, 10 J/cm²), na fotobiomodulação dos tecidos ao redor de fêmures de ratos Wistar, após a implantação de uma placa bioabsorvível de PLLA-PGA (LactoSorb[®]). Os autores analisaram aspectos relacionados às respostas inflamatórias e ao padrão de reparação tecidual, comparando um grupo controle, sem *laser*, com dois grupos experimentais, um recebendo o *laser* vermelho e o outro, infravermelho. Os períodos de observação foram de 3, 7, 15 e 21 dias em cada um dos 3 grupos, os quais foram, então, avaliados histologicamente. O estudo mostrou que nos estágios iniciais, de 3 e 7 dias, tanto o *laser* vermelho quanto o infravermelho tiveram efeito fotobiomodulador positivo, demonstrando um padrão histológico mais avançado que o do grupo controle, com estímulo à vascularização, proliferação de fibroblastos e deposição de colágeno. Em 21 dias, o grupo que recebeu o *laser* vermelho apresentou um aumento do tecido de granulação, em comparação com os outros grupos, sugerindo que esse tipo de *laser* pode retardar o processo de reparo tecidual.

Os efeitos da LLLT no processo de reparo ósseo também foram investigados na regeneração de defeitos ósseos periodontais. O estudo de AboElsaad *et al.*

(2009) avaliou clínica e radiograficamente a influência do *laser* (Al)GaAs ($\lambda=830\text{nm}$, $P=40\text{mW}$, $D.E=4\text{J/cm}^2$, com D.E total de 16J/cm^2) na cicatrização de defeitos infraósseos, preenchidos com vidro bioativo. Foram incluídos 20 pacientes com doença periodontal crônica, apresentando perda de suporte periodontal moderada a avançada e defeito infraósseo bilateral. Assim, 40 defeitos foram avaliados. Em cada paciente, um defeito ósseo recebeu enxerto com vidro bioativo e aplicação de *laser*, enquanto no outro lado apenas o enxerto foi utilizado, como grupo controle. Percebe-se, pois, que os grupos experimental e controle foram selecionados em um mesmo paciente. O laser foi aplicado durante a cirurgia e nos dias 3, 5 e 7 após o procedimento. A avaliação clínica constou de medição da profundidade de sondagem e da perda de inserção, enquanto a avaliação radiográfica foi conduzida com radiografias periapicais padronizadas. Em ambos os grupos, foi constatada redução dos parâmetros de profundidade de sondagem e perda de inserção, nos intervalos de 3 e 6 meses. O grupo *laser* apresentou níveis menores que o grupo controle em 3 meses, com diferença estatisticamente significativa. Radiograficamente, houve uma diminuição do defeito infraósseo e um aumento da área de osso preenchendo o defeito. O grupo *laser* apresentou um maior preenchimento e um defeito menor, quando comparado ao controle, em 3 meses, sendo tal fato estatisticamente significativo. Os autores concluíram que a LLLT teve eficácia nas fases iniciais do reparo, acelerando a regeneração de defeitos infraósseos, melhorando a qualidade da recuperação e diminuindo o tempo de tratamento.

Os efeitos da biomodulação no reparo de defeitos ósseos em ratos diabéticos foram investigados por Akyol e Güngörmüs (2010). Neste trabalho, foram incluídos

14 ratos diabéticos, induzidos quimicamente, e 14 ratos saudáveis, estes como grupo controle (grupo 1). Nos ratos diabéticos, criou-se um defeito ósseo na epífise distal de cada fêmur. No defeito do lado direito (grupo 3), foi aplicada radiação *laser* [(Al)Ga-As; $\lambda=808\text{nm}$; modo contínuo, $P=0,1/\text{cm}^2$; a cada 2 dias, por 5 sessões, com D.E total de $10\text{J}/\text{cm}^2$). O defeito do lado esquerdo (grupo 2) não foi irradiado. No grupo controle, o defeito foi realizado na pata esquerda. Os animais foram mortos em 10 e 20 dias após a cirurgia. Os autores observaram uma formação mais precoce e ativa de osso esponjoso no grupo controle e no grupo 3, que recebeu *laser*, quando comparados com o grupo 2, no 10º dia. No 20º dia, foi observada uma união osteocondral maior no grupo 3, o qual também apresentou um maior escore histológico, quando comparado aos demais grupos. O estudo concluiu que a LLLT, com os parâmetros empregados, tem um efeito benéfico no osso esponjoso, em reparos ósseos de animais diabéticos.

Hübler *et al.* (2010) avaliaram a composição química, a estrutura cristalina e a cristalinidade do osso em área de distração osteogênica (DO) em coelhos. Os métodos de análise foram a espectroscopia por fluorescência de raios X (XRF) e espectroscopia por difração de raios X (XRD). Foram avaliados 4 coelhos, sendo os coelhos 1 e 2 submetidos a DO, e os coelhos 3 e 4 sem DO. A DO foi realizada após um período de latência de 3 dias, com ativação diária de 0,7 mm, por 7 dias, seguido por um período de consolidação de 10 dias. A LLLT, com (Al)GaAs (830nm, 40mW, $10\text{J}/\text{cm}^2$ a cada 48 horas, D.E total de $50\text{J}/\text{cm}^2$), foi realizada nos coelhos 1 e 3. A análise pela XRF mostrou que a relação de cálcio e fósforo nos coelhos 3 e 4 manteve-se constante. No coelho 2, com DO sem *laser*, houve maior flutuação da composição da matriz óssea, na área de DO, o que evidencia uma fase ainda

imatura da osteogênese. Já no coelho 1, houve uma maior homogeneidade da composição da matriz, indicando uma maior mineralização. A estrutura cristalina das amostras foi similar, enquanto a cristalinidade foi superior no coelho 1, quando comparado ao 2. Os autores concluíram que a LLLT teve um efeito positivo na biomodulação do osso neoformado.

Campanha *et al.* (2010) avaliaram os efeitos da LLLT no torque de remoção de implantes com estabilidade primária baixa, instalados em tíbias de coelhos. Nesta pesquisa foram usados 30 coelhos, os quais receberam um implante no osso tibial. O implante foi instalado de forma a manter uma estabilidade inicial pobre. O grupo controle não foi irradiado. O grupo experimental recebeu *laser* infravermelho ($\lambda=830\text{nm}$, $D.E=21,5\text{J}/\text{cm}^2$, $P=10\text{mW}$, 51 segundos, em modo contínuo) imediatamente após a cirurgia e mantido por 7 dias, a cada 48 horas. Os animais foram mortos em 15, 30 e 45 dias, as tíbias foram removidas e os implantes submetidos a um contra-torque com um torquímetro digital. Os resultados mostraram que os valores do torque de remoção, nas amostras do grupo laser, foram significativamente maiores que os do grupo controle, nos intervalos de 15 e 30 dias. Em 45 dias, não houve diferenças estatisticamente significativas. Os autores concluíram que o *laser* usado promoveu a osseointegração em implantes com baixa estabilidade inicial, nas fases iniciais do reparo ósseo.

Shakoury *et al.* (2010) analisaram os efeitos da LLLT no reparo ósseo de fraturas em tíbias de coelhos. O estudo avaliou 28 coelhos, os quais foram submetidos à osteotomia da tíbia direita, simulando uma fratura, estabilizada com um fixador externo. Os coelhos foram divididos em 2 grupos, sendo o grupo

experimental exposto a irradiação com *laser* [(Al)Ga-As, $\lambda=780\text{nm}$, 4Jcm^2 , 5 min/dia) na área operada, iniciando no 4º dia após a cirurgia, durante 4 semanas. O grupo controle passou por uma simulação de irradiação, sem *laser*. Os animais foram acompanhados por 12 semanas. Nesse período, realizaram-se exames de tomografia computadorizada (TC) na 2ª, 5ª e 8ª semana, para avaliar a formação e a densidade óssea do calo. Após a 12ª semana, os animais foram mortos e as tíbias submetidas a testes biomecânicos. A densidade óssea das fraturas tratadas com *laser* foi bem superior àquelas do grupo controle, nos intervalos avaliados, com resultados estatisticamente significativos. No entanto, quando se avaliaram aspectos biomecânicos, pôde-se perceber que a resistência a tensão nas fraturas do grupo controle foi bem superior às fraturas tratadas com *laser*. Os autores concluíram que a LLLT facilita o reparo ósseo de fraturas, nas fases iniciais do processo, porém com enfraquecimento de suas propriedades biomecânicas. Assim, o *laser* poderia ser usado em casos de não-união óssea, mas não em casos convencionais.

2.2 Efeitos Sistêmicos da LLLT

Um aspecto importante, no que tange à ação do *laser* de baixa potência, refere-se aos seus possíveis efeitos sistêmicos, isto é, aqueles manifestados à distância do local de aplicação. Embora a maioria dos estudos com a LLLT concentre atenções nos efeitos locais, algumas pesquisas também avaliaram os possíveis efeitos sistêmicos.

Rochkind *et al.* (1989) investigaram os efeitos sistêmicos da LLLT na reparação de feridas, queimaduras cutâneas e de lesões nos sistemas nervosos

periférico e central de ratos. Os animais, os quais apresentavam feridas cutâneas bilaterais, foram irradiados com *laser* He-Ne (632,8nm, 16mW e diferentes densidades de energia) por um período de 21 dias, somente no lado direito. Os autores observaram melhora no reparo de ambas as feridas do grupo experimental, quando comparadas com o grupo controle, não irradiado. Resultados similares foram obtidos em queimaduras bilaterais: a irradiação em uma das lesões também causou uma aceleração da cicatrização no sítio não-irradiado. No entanto, em todos os ratos do grupo controle ocorreu necrose avançada na perna e gangrena bilateral. A irradiação em lesões por compressão do nervo ciático, no lado direito de um animal com lesão bilateral, aumentou significativamente o potencial de ação na perna esquerda não-irradiada. A análise estatística mostrou uma diferença significativamente maior no grupo tratado com *laser*, em relação ao grupo controle, não irradiado. Por fim, o efeito sistêmico foi observado em segmentos da medula espinhal, correspondendo aos nervos ciáticos lesados. A degeneração retrógrada bilateral dos neurônios motores da medula espinhal, esperada após a lesão bilateral dos nervos periféricos, foi significativamente reduzida no grupo que recebeu *laser*. Os autores concluíram que o *laser* He-Ne exerceu um efeito sistêmico evidente na pele, nos tecidos adjacentes, nos nervos periféricos severamente lesados e nas regiões correspondentes da medula espinhal. Tais efeitos persistiram por longo período após a aplicação do *laser*.

Em 1989, Mester e Mester relataram o efeito sistêmico da LLLT ao irradiar feridas provocadas por queimaduras *in vivo*. Os animais do grupo experimental receberam irradiação a *laser* em apenas uma das duas feridas contralaterais provocadas; o grupo controle não recebeu laserterapia. As feridas do grupo

experimental apresentaram padrão similar de reparação, mas em um período de tempo menor do que as do grupo controle.

Já Hall *et al.* (1994) concluíram que a irradiação a *laser*, nos moldes empregados, não exerceu influência no processo de reparo de feridas. Nesse estudo, também em ratos, foram criadas feridas padronizadas bilateralmente na porção caudal desses espécimes. Os animais foram divididos em dois grupos, com 19 exemplares em cada um. O grupo A foi irradiado com *laser* em um lado, sendo o lado oposto o controle para avaliação de possíveis efeitos sistêmicos. O grupo B recebeu uma irradiação placebo (luz convencional) em um dos lados. No outro, não foi feito nenhum tratamento. A frequência utilizada foi de 500Hz e a potência, de 1mW. A aplicação foi feita perpendicularmente, a uma distância de 2mm do alvo. A dose diária foi de 0,2J/cm² e o período de observação total, de 21 dias. Dois animais de cada grupo foram mortos a cada dois dias, a partir do terceiro dia do experimento. Não houve diferenças clínicas ou histológicas, durante o período observado, entre os grupos.

Schindl *et al.* (2002) avaliaram os efeitos sistêmicos da LLLT na circulação sanguínea da pele, em pacientes diabéticos com microangiopatia. Nesse estudo, foram incluídos 30 pacientes com diabetes, os quais apresentavam temperatura da região do dorso do pé diminuída e níveis de hemoglobina glicada maiores que 6%. Os indivíduos foram divididos aleatoriamente em 2 grupos. O grupo experimental recebeu uma irradiação única, de modo contínuo, com *laser* He-Ne ($\lambda=632,8\text{nm}$, P=30mW, D.E 30J/cm², 50 minutos) em um dos pés, sendo o outro não irradiado. O grupo controle foi submetido a uma simulação de irradiação, com o aparelho

desligado. Durante a pesquisa, os pacientes permaneceram em posição supina, após 30 minutos de repouso e a temperatura ambiente foi mantida em 24 graus. Os efeitos na microcirculação foram medidos através de variações na temperatura do dorso do pé, captadas por termografia infravermelha em ambos os pés. As medidas ocorreram no início da irradiação, em 20 minutos, 50 minutos e após 15 minutos do término. Houve um aumento da temperatura média do dorso dos pés dos pacientes tratados com *laser*, nos intervalos medidos. Esse aumento foi observado tanto no pé irradiado, quanto no contralateral. O aumento da temperatura da pele começou mais precocemente no pé irradiado, embora níveis similares tenham sido atingidos em ambos os pés ao final das medições. Em contrapartida, no grupo controle, ocorreu uma ligeira queda da temperatura ao longo dos intervalos avaliados. Os gráficos de variação média das temperaturas mostraram diferenças significativas entre os 2 grupos, com aumento no grupo irradiado e redução no controle. Os autores concluíram o *laser* usado provocou uma significativa melhora na circulação da pele do dorso, em ambos os pés de pacientes com microangiopatia diabética. Tal achado aponta para a possibilidade de ação sistêmica do *laser*.

Khadra *et al.* (2004) afirmaram que a LLLT é capaz de estimular a liberação de substâncias como fatores de crescimento e citocinas na circulação sistêmica, com potencial para afetar o lado não irradiado de um animal ou sujeito da pesquisa. Tal característica pode explicar por que alguns estudos usando grupos experimental e controle no mesmo animal têm falhado em demonstrar efeitos positivos do *laser*. Assim, os autores destacam a importância de se utilizarem controles externos, ou seja, animais distintos, para avaliarem os efeitos da LLLT.

Rodrigo *et al.*(2009) avaliaram os efeitos sistêmicos do *laser* vermelho e infravermelho no reparo de feridas no dorso de ratos Wistar. Foram avaliados 36 ratos machos, divididos de forma randomizada em 4 grupos. No dorso de cada animal foram criadas 3 feridas, com 1 cm de diâmetro cada, distantes 7 cm uma da outra. Nos grupos experimentais, o laser foi aplicado apenas na ferida mais cranial, de modo pontual e com emissão contínua. O grupo 1, controle, não recebeu irradiação. O grupo 2 recebeu irradiação com *laser* infravermelho, [(Al)GaAs, $\lambda=830\text{nm}$, $P=50\text{mW}$, $D.E=20\text{J}/\text{cm}^2$]. O grupo 3 recebeu *laser* vermelho (AlGaInP, $\lambda=685\text{nm}$, $P=30\text{mW}$, $D.E=20\text{J}/\text{cm}^2$). O grupo 4 recebeu uma combinação dos *lasers* vermelho e infravermelho, com fluência total também de $20\text{J}/\text{cm}^2$ [(Al)GaAs, $\lambda=830\text{nm}$, $P=50\text{mW}$, $D.E=10\text{J}/\text{cm}^2$; AlGaInP, $\lambda=685\text{nm}$, $P=30\text{mW}$, $D.E=10\text{J}/\text{cm}^2$]. Cada grupo foi subdividido em subgrupos, de acordo com o tempo de observação de 3, 5 e 7 dias. Considerando apenas os tipos de *laser* usados, não houve diferenças estatisticamente significativas na cicatrização, embora as melhores médias tenham sido observadas nos grupos 3 e 4. Considerando o local da ferida, também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. As melhores médias foram achadas nas feridas médias e as piores, nas craniais. Houve diferenças estatisticamente significativas quanto ao grau de cicatrização, na ferida caudal, no 3º e no 7º dia. Ao 3º dia, a ferida caudal apresentou melhor cicatrização no grupo 4, ao passo que no 7º dia, a ferida caudal teve melhor cicatrização no grupo controle. Os autores concluíram que a aplicação de uma combinação de *laser* vermelho e infravermelho, nas doses usadas, teve um efeito sistêmico no processo de reparo, observado nas feridas localizadas mais distais ou caudais, no 3º dia pós-operatório. Assim, o efeito sistêmico ficou demonstrado no grupo que recebeu a combinação do *laser* vermelho e do infravermelho, na fase inicial do reparo tecidual.

Na literatura, observa-se uma grande variedade de protocolos nos estudos *in vivo* envolvendo o uso de *laser* de baixa potência, quanto ao tipo do *laser* usado, dose de aplicação e metodologia de irradiação, o que dificulta a comparação entre eles, ao mesmo tempo em que são escassas as avaliações sobre seu efeito sistêmico (LUGER, 1998; CAMPANHA *et al.*, 2010).

2.3 Materiais de Fixação à Base de PLLA-PGA

A utilização do ácido polilático (PLA) como fixação interna na cirurgia e traumatologia craniomaxilofacial, iniciada por Getter *et al.* (1972), demonstrou que esse material possui absorção lenta e produz reações inflamatórias tardias, além de induzir à formação de uma cápsula fibrosa. Posteriormente, foram fabricadas placas de ácido poli-L-lático (PLLA).

Em 1993, Bergsma *et al.* relataram a presença de tumefação na área onde foi colocada placa de PLLA de alto peso molecular para redução de fraturas isoladas do osso zigomático, em nove de dez pacientes operados, em um período de três anos de acompanhamento. Seis destes pacientes foram submetidos à intervenção cirúrgica para remoção das placas. Os autores constataram a presença de material fibroso, facilmente separado do tecido adjacente e de consistência firme. A análise microscópica deste material demonstrou reação de corpo estranho, sem sinais de inflamação e com presença de partículas de PLLA. Os autores concluíram que as

placas e parafusos de PLLA são capazes de propiciar o aparecimento de reações de corpo estranho em longo prazo, provavelmente em decorrência da sua cicatrização.

Esses achados foram corroborados por Thaller *et al.* (1995), ao avaliarem histologicamente o uso de placas compostas por ácido poliglicólico (PGA) em coelhos, durante intervalos de observação entre 3 e 12 meses. No terceiro mês, foi observado que as áreas ao redor das placas possuíam significativa quantidade de material amorfo celular, envolto por uma fina camada de tecido de granulação, composto de numerosas células gigantes de corpo estranho, histiócitos e linfócitos. Aos doze meses, apesar de não se observarem vestígios das placas, encontraram-se diversos focos de inflamação crônica. Entretanto, nenhum efeito adverso foi observado na cicatrização óssea.

Já Eppley e Sadove (1995) compararam um material constituído de um copolímero do ácido polilático e do poliglicólico (PLLA-PGA) à fixação metálica, em enxertos ósseos no crânio de coelhos. Foram realizados cortes histológicos após dois, seis, nove e doze meses, nos quais não foram observadas reações inflamatórias no tecido, durante todo o período do estudo.

Nesta mesma direção, Törmälä *et al.* (1998) afirmaram que, apesar de serem encontradas sequelas clínicas no uso de homopolímeros de PGA puro e de PLLA puro, copolímeros destas duas substâncias são amorfos e possuem características de degradação intermediária, o que proporciona uma combinação clínica com relevante força inicial e tolerância pelo organismo.

De acordo com Suuronen *et al.* (1998), os polímeros PLLA se degradam em compostos ácidos, através de reações de hidrólise. Pode também haver autocatalização dos polímeros por grupos carboxílicos terminais de produtos de sua própria degradação. A ação de enzimas teciduais, sobretudo nas fases mais tardias do processo de bioabsorção, também tem sido relatada. Na literatura, todavia, os resultados de pesquisas investigando a degradação, a resistência à tração e as reações teciduais são bastante variados. Tal fato decorre de fatores como diferenças de espécies e locais de implantação entre os estudos, além de diferenças nas propriedades dos materiais analisados, como peso molecular, morfologia, presença de impurezas, tamanho e forma dos implantes.

O tempo de degradação das placas de PGA é muito rápido, enquanto as placas produzidas com PLLA absorvem em um tempo bastante extenso. Peltoniemi *et al.* (1999) indicam que a busca de um material com tempo de degradação intermediário entre o PLLA e o PGA seria ideal. Sugerem, ainda, a incorporação de copolímeros para obtenção desse resultado. Os autores avaliaram a biodegradação e as reações teciduais em parafusos SR-PLLA e SR-PGA, implantados na calvária de ovelhas. Não foram observadas complicações clínicas. As reações de corpo estranho foram leves. Os parafusos SR-PGA foram bioabsorvidos em 12 semanas, enquanto os de SR-PLLA mantiveram sua integridade por 26 semanas.

Bähr *et al.* (1999) avaliaram copolímeros PLLA-PGA (90%-10%) na fixação de osteotomias tipo Le Fort I em ovelhas, comparando-os com a fixação com titânio. Os autores observaram que a formação óssea na área da osteotomia foi ligeiramente mais rápida com as fixações metálicas. Foi possível perceber uma atividade

fagocitária maior nas áreas de PLLA-PGA, apesar de as reações inflamatórias tipo corpo estranho terem sido esparsas. Os autores concluíram que os materiais bioabsorvíveis testados são adequados para o uso em áreas submetidas à baixa tensão.

A utilização de placas e parafusos constituídos por copolímeros PLLA-PGA (82%-18%) em cirurgia ortognática foi investigada por Edwards *et al.* (2001). Os autores observaram que o reparo ósseo nas áreas de osteotomia foi normal, sem evidência de reação inflamatória local. Além disso, os copolímeros PLLA-PGA mostraram reabsorção completa, sem osteólise nos locais de fixação, entre 18 e 24 meses após a cirurgia.

Mollaoglu *et al.* (2003) compararam as respostas teciduais iniciais seguidas da implantação de 2 tipos de parafusos, um de titânio e outro de material bioabsorvível (82% de PLLA, 18% de PGA - LactoSorb[®]). O estudo envolveu 44 cobaias, com idades avançadas, divididas em 2 grupos. No grupo A, foi instalado um parafuso de titânio na calvária. No grupo B, foi instalado um parafuso bioabsorvível (LactoSorb[®]). Os animais foram acompanhados em períodos de 3, 7, 14, 30 e 60 dias. Após, foram mortos e preparados para análise histológica. Ambos os parafusos foram bem tolerados pelos tecidos. O padrão histológico foi similar, nos intervalos testados. Não houve evidências de degradação do parafuso PLLA-PGA em 60 dias. A neoformação óssea foi medida por histomorfometria, não havendo diferenças significativas entre os 2 grupos testados. Os autores concluíram que os parafusos PLLA-PGA representam uma opção interessante no tratamento de fraturas. Em pacientes idosos, nos quais se espera uma resposta reparadora mais lenta, a não

degradação dos parafusos PLLA-PGA em 60 dias torna-se um fato positivo para a escolha desses materiais. Isso porque eles manteriam a estabilidade por mais tempo, sem a necessidade de uma eventual 2ª cirurgia para removê-los.

Os parafusos PLLA-PGA também foram testados como uma alternativa aos parafusos de titânio, na fixação de enxertos ósseos autógenos *onlay*. Chacon *et al.* (2004) conduziram um estudo com 15 coelhos, cada um recebendo 2 enxertos ósseos tibiais, no corpo mandibular direito e esquerdo, em um total de 30 áreas de enxerto. Os animais foram divididos em 3 grupos. No grupo 1, a fixação foi feita com PLLA-PGA (82%-18% - LactoSorb[®]) à esquerda e titânio à direita. No grupo 2, sem fixação à direita (controle) e PLLA-PGA à esquerda. No grupo 3, titânio à direita e controle à esquerda. Após 6 semanas, os animais foram mortos e as áreas enxertadas foram preparadas para análise histológica. Nas áreas com fixação, os enxertos estavam consolidados, sem mobilidade ou interposição de tecido fibroso. Na área controle, não houve consolidação do enxerto. Não foram observadas reações inflamatórias moderadas ou acentuadas em nenhum grupo. Quanto à espessura, os enxertos fixados com titânio ou com PLLA-PGA não apresentaram diferenças significativas. Já nas áreas controles, a espessura foi consideravelmente menor. Os autores concluíram que os parafusos PLLA-PGA conferem uma excelente estabilidade inicial para o enxerto, sem evidências de reação inflamatória, mobilidade ou reabsorção acentuada, quando comparados aos enxertos fixados com titânio.

Um estudo semelhante foi conduzido por Hochuli-Vieira *et al.* (2005), para comparar, por meio de uma análise histológica qualitativa, a eficácia de dois

métodos de fixação interna rígida: titânio e LactoSorb[®] (PLLA-PGA) em fraturas mandibulares de coelhos. Em 30 coelhos, realizou-se uma osteotomia mandibular esquerda, entre canino e 1º pré-molar. O grupo 1 teve a osteotomia fixada com placa e parafusos de titânio. O grupo 2 recebeu fixação com placa e parafusos LactoSorb[®], de tamanhos similares. O período de acompanhamento foi de 15, 30 e 60 dias. O padrão histológico descrito para ambos os materiais foi similar, com um reparo ligeiramente mais rápido no grupo 1, em 15 e 30 dias. Após 60 dias de implantação dos parafusos, os resultados de ambos os sistemas de fixação mostraram formação de novo osso preenchendo praticamente toda a área da osteotomia. Foi possível notar irregularidades na superfície de certos parafusos PLLA-PGA, sugerindo bioabsorção. O processo de bioabsorção PLLA-PGA não causou nenhuma reação inflamatória ou de corpo estranho durante o tempo de estudo.

Sanger *et al.* (2007) acompanharam 52 pacientes submetidos a cirurgias corretivas para tratamento de craniossinostoses, utilizando material bioabsorvível para as fixações. Os pacientes foram acompanhados por 18 meses. Complicações pós-operatórias relacionadas ao material absorvível foram observadas em 8 pacientes. Em 5 destes, as placas ficaram palpáveis, mas sem exposição na pele. Em 2 casos, houve fraturas do material, associadas a quedas após a cirurgia. Nestes 7 casos, as alterações observadas tiveram resolução completa dos sintomas com tratamento conservador. Um paciente apenas teve infecção pós-operatória, com necessidade de uma nova intervenção cirúrgica para remoção da fixação.

Resultados similares foram observados por Ahmad *et al.* (2008). Os autores usaram placas e parafusos PLLA-PGA (82%-18%) para tratamento de craniossinostoses em 146 pacientes pediátricos. O acompanhamento foi realizado em 3, 6 e 12 meses. Foram avaliados aspectos clínicos como presença de inflamação e/ou infecção, processo de cicatrização e palpabilidade dos materiais de osteossíntese, além da análise tomográfica tridimensional. Em 3 meses, 5 pacientes possuíam placas e parafusos palpáveis. Em 6 meses, apenas 3 pacientes puderam ter as placas palpáveis. Em 5 casos (3,4%) houve infecção pós-operatória, sendo que em apenas 2 pacientes foi necessária intervenção cirúrgica para drenagem de secreção. Os materiais bioabsorvíveis mostraram uma alternativa atraente às fixações metálicas, no tratamento das craniossinostoses em pacientes pediátricos.

Em 2008, Ferretti apresentou os resultados do acompanhamento de 29 pacientes adultos com 40 fraturas mandibulares tratadas com fixação usando material bioabsorvível (PLLA-PGA, 82%-18%). Os casos foram acompanhados por 12 meses, com avaliações clínicas da ferida cirúrgica e da estabilidade oclusal, e avaliações radiográficas da estabilidade dos segmentos fraturados, da cicatrização da fratura e da ossificação na área dos parafusos. Em 9 pacientes (22,5% das fraturas) foi observado algum grau de complicação, entre deiscência, com exposição da placa, e sepse, com necessidade de remoção da fixação e debridamento. De acordo com o autor, os resultados foram similares ao de outros estudos envolvendo fixações metálicas. Por fim, ele argumenta que a fixação com material bioabsorvível, em fraturas mandibulares, é uma alternativa viável à fixação metálica, em pacientes selecionados, com boa higiene bucal, capazes de seguir as medidas de limitação de dieta e de controle pós-operatório.

A comparação entre a fixação interna com titânio e com material bioabsorvível (PLLA-PGA, 82%-18%) também foi investigada em osteotomias de maxila. Dohl *et al.* (2008) acompanharam 50 pacientes tratados com osteotomia tipo Le Fort I, para impactação maxilar de pelo menos 2mm. Em 25 casos, utilizou-se fixação com titânio e nos outros 25, PLLA-PGA. Os pacientes foram acompanhados por 12 meses, realizando radiografias celalométricas laterais em 3 períodos: 1 semana antes da cirurgia, 1 mês e , no mínimo, 8 meses após o procedimento. As radiografias foram digitalizadas e, então, realizaram-se medidas lineares e angulares para avaliar as alterações esqueléticas bidimensionais. As medidas horizontais, verticais e angulares mostraram que não houve diferenças significativas ou evidência radiográfica de recidiva em ambos os grupos. O estudo mostrou que as fixações com os polímeros bioabsorvíveis usados foram suficientemente fortes para garantir estabilidade e resistir às forças musculares e oclusais. Portanto, tornam-se uma alternativa às fixações com placas e parafusos de titânio.

O sistema de osteossíntese bioabsorvível à base de PLLA a 82% e PGA a 18%, comercialmente apresentado como LactoSorb[®], é capaz de manter uma resistência adequada por um tempo superior ao necessário para a formação do calo ósseo. De acordo com o manual do fabricante, esse dispositivo conserva 70% da sua resistência após 8 semanas e sua bioabsorção se completa em um período de 12 meses. O processo de bioabsorção ocorre com uma moderada reação inflamatória, que promove a hidrólise dos componentes, criando microfragmentos que serão absorvidos por macrófagos e convertidos em dióxido de carbono e água.

Em 15 meses, há preenchimento do sítio do parafuso com tecido fibroso ou neoformação óssea (MANUAL DO FABRICANTE, 2011).



Proposição

3. PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem o objetivo de avaliar, qualitativa e quantitativamente, os efeitos locais e sistêmicos da LLLT (830nm) no estágio inicial do processo de reparo ósseo, após a implantação de parafusos PLLA-PGA em tíbias de coelhos.

3.2 Objetivos Específicos

- a. Avaliar os efeitos locais da LLLT na formação óssea, na região adjacente aos parafusos PLLA-PGA, quantitativamente, por meio de valores numéricos, comparando os resultados da área diretamente irradiada com aqueles do grupo controle.
- b. Avaliar os efeitos sistêmicos da LLLT na formação óssea perimplantar, quantitativamente, por meio de valores numéricos, comparando os resultados da área contralateral de coelhos irradiados com o lado irradiado e com o grupo controle, sem irradiação.
- c. Avaliar qualitativamente as trabéculas ósseas neoformadas na região perimplante, descrevendo sua distribuição e morfologia, a presença de osteoblastos e de osteócitos, sob os efeitos local e sistêmico da LLLT.



Metodologia

4. METODOLOGIA

Este trabalho foi realizado *in vivo* (modelo animal). O projeto para a execução do presente estudo foi aprovado pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CCE-FO-PUCRS), protocolado sob o número 0083/10 (Anexo A), e pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da PUCRS (CEUA-PUCRS), sob o registro CEUA 10/00218 (Anexo B).

Durante o desenvolvimento da pesquisa, os princípios éticos que regem a pesquisa experimental com animais de laboratório foram respeitados, em observância à Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais.

4.1 Delineamento da Pesquisa

A pesquisa foi desenvolvida no paradigma tradicional, quantitativo, em uma abordagem experimental, com grupo controle e pós-teste (CAMPBELL e STANLEY, 1979).

4.2 Problema

A LLLT com *laser* arseneto de gálio e alumínio (830nm, 100mW, 4J/cm²) é capaz de exercer um efeito local, estimulando a formação óssea perimplantar em áreas adjacentes a parafusos PLLA-PGA, em tíbias de coelhos?

A LLLT, nos mesmos padrões, é capaz de exercer um efeito sistêmico, a distância do local de aplicação, no processo de reparo ósseo em tíbias de coelhos, implantadas com parafusos PLLA-PGA?

4.3 Hipóteses

- O tecido ósseo neoformado perimplante PLLA-PGA apresenta padrão histológico de osso normal, observado em 5, 15 e 30 dias pós-implante do biomaterial.
- Há efeito biomodulador positivo local e sistêmico do *laser* de baixa potência [(Al)GaAs-830 nm] sobre o processo de reparo ósseo adjacente a parafusos PLLA-PGA, estimulando a formação óssea, sem alterar o curso de bioabsorção do biomaterial ao longo do experimento.

4.4 Seleção da Amostra

Para a amostra foram selecionados 24 coelhos machos (*Oryctolagus cuniculus* – linhagem Nova Zelândia), com peso aproximado de 2.500 gramas. O tamanho da amostra foi embasado em trabalhos similares publicados na literatura internacional (CHACON *et al.*, 2004; EPPLEY e SADOVE, 1995; HOCHULI-VIEIRA *et al.*, 2005; TAVANO *et al.*, 1999). Os animais utilizados foram mantidos em condições de biotério convencional, na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

(UEA-HCPA / UFRGS.). Os coelhos eram clinicamente sadios e foram submetidos a controle de ectoparasitas antes de constituírem a população desta pesquisa. Os animais foram submetidos a exames laboratoriais veterinários básicos (hemograma completo, coagulograma e parasitológico) para descartar a possibilidade de quaisquer doenças presentes, prévias à intervenção cirúrgica, que poderiam vir a influenciar os resultados deste trabalho.

A manutenção e a execução dos procedimentos cirúrgicos foram realizadas no biotério da UEA-HCPA / UFRGS, devidamente equipado e com salas cirúrgicas apropriadas. Os procedimentos cirúrgicos foram acompanhados pela Médica-Veterinária Fabíola Schons Meyer, CRMV/RS 9721, responsável técnica pela UEA-HCPA / UFRGS (Figura 1).



Figura 1 – Biotério de coelhos e centro cirúrgico da UEA-HCPA / UFRGS.

Em todos os animais, foi implantado um parafuso em cada tíbia, direita e esquerda, com a dimensão de 5,0mm de comprimento por 1,5mm de diâmetro, de material bioabsorvível, marca LactoSorb[®] (Direct Drive Screw, empresa W Lorenz, Jacksonville, EUA: 82% PLLA e 18% PGA) (Figura 2). A implantação de um

parafuso em todos os animais, em ambas as tíbias, garantiu um padrão homogêneo da amostra.



Figura 2 – Sistema de parafuso bioabsorvível LactoSorb®.

O local anatômico escolhido para a colocação dos parafusos foi o osso tibial, devido à altura e à espessura de corticais favoráveis, além do acesso mais fácil, livre de estruturas nobres que poderiam comprometer a locomoção do animal ou a recuperação pós-operatória.

4.5 Organização dos Grupos

Os animais foram divididos, por amostragem aleatória simples, em 2 grupos constituídos por 12 coelhos cada, denominados grupo experimental (GI) e grupo controle (GII). Cada grupo foi subdividido de acordo com o período de observação (5, 15 e 30 dias – Tabela 1). No primeiro subgrupo (GI-A e GII-A), a eutanásia ocorreu após 5 dias da implantação; nos grupos subseqüentes, a eutanásia foi realizada com 15 e 30 dias. Os subgrupos A, B, e C de GI e GII foram avaliados quanto às reações no tecido ósseo perimplantar.

A aplicação do *laser* se deu somente na pata direita implantada de cada animal do GI, buscando-se observar o efeito biomodulador local da aplicação do *laser* e, na pata contralateral, seu efeito sistêmico. Assim, o GI foi dividido em subgrupos para análise quanto ao **fator tempo** e também quanto ao **fator influência local e sistêmica do laser**.

Para padronizar o experimento, todos os animais foram identificados por numeração e acomodados no Biotério da UEA-HCPA / UFRGS, individualmente, em gaiolas plásticas ou metálicas. As gaiolas foram diariamente higienizadas e mantidas em temperatura ambiente de 20°C, no intuito de diminuir os riscos de contaminação e infecções. Água e ração (Linha Natural, Purina®, Paulínia/SP, Brasil) foram fornecidas *ad libitum*.

Tabela 1 – Distribuição dos animais dentro dos grupos GI e GII, de acordo com o período de observação/eutanásia do animal

GRUPO	LASERTERAPIA	SUBGRUPOS	EUTANÁSIA	n
GI n = 12	Pata direita – laserterapia +	GI-A	5 dias	4
		GI-B	15 dias	4
	Pata esquerda – sem laserterapia	GI-C	30 dias	4
GII n = 12	Patras direita . e esquerda . sem laserterapia	GII-A	5 dias	4
		GII-B	15 dias	4
		GII-C	30 dias	4

4.6 Aplicação do Laser

Nesta pesquisa foi utilizado *laser* de baixa intensidade (infravermelho) do tipo (Al)GaAs (arseneto de gálio e alumínio), com comprimento de onda de 830nm, potência de 100mW, em modo contínuo, aplicado em 4 pontos periféricos ao redor do implante, com densidade de aplicação de $1\text{J}/\text{cm}^2$ em cada ponto, totalizando $4\text{J}/\text{cm}^2$ por aplicação, em todos os animais do GI. Foi utilizado o aparelho Thera Lase[®] (D.M.C. Equipamentos LTDA, São Paulo). O tempo de aplicação em cada ponto foi de 10,1 segundos. Antes de cada sessão de *laser*, o aparelho, após ser ligado, foi calibrado para que a dose padronizada de aplicação fosse verificada. A irradiação foi feita somente na tíbia direita implantada de cada animal do GI, conforme o esquema da figura 3. A posição exata do parafuso sob a pele foi marcada com tinta nanquim preta, durante o procedimento cirúrgico, imediatamente antes da sutura.

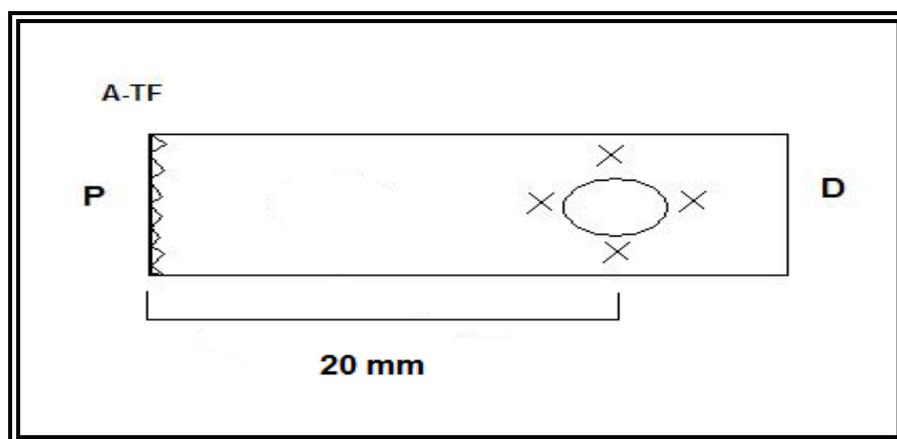


Figura 3 – Desenho esquemático da tíbia direita, demonstrando o posicionamento do parafuso e a aplicação do laser. **A-FT** – articulação tíbio-femural; **P** – proximal; **D** – distal; **X** – pontos de aplicação do *laser*, ao redor do parafuso bioabsorvível, localizado pela marcação na pele.

As aplicações de *laser* ocorreram imediatamente após a cirurgia e, depois, a cada 48 horas. O total de sessões de aplicação foi de sete, até o décimo segundo dia pós-cirúrgico nos grupos GI-B e GI-C. O grupo GI-A recebeu apenas as três primeiras sessões de aplicação, devido ao tempo de observação/eutanásia do animal (Tabela 2). É importante ressaltar que os animais do grupo controle (GII) foram submetidos ao mesmo tipo de estresse que os animais do grupo experimental (GI), no que se refere ao protocolo para aplicação do *laser*, apenas não recebendo a irradiação, pois o aparelho permaneceu desligado.

Tabela 2 – Distribuição das densidades de energia do *laser* por sessão e doses totais, dentro dos subgrupos de GI.

APLICAÇÕES	GI-A	GI-B	GI-C
<i>P.O imediato</i>	4J/cm ²	4J/cm ²	4J/cm ²
<i>2 dias após</i>	4J/cm ²	4J/cm ²	4J/cm ²
<i>4 dias após</i>	4J/cm ²	4J/cm ²	4J/cm ²
<i>6 dias após</i>	X	4J/cm ²	4J/cm ²
<i>8 dias após</i>	X	4J/cm ²	4J/cm ²
<i>10 dias após</i>	X	4J/cm ²	4J/cm ²
<i>12 dias após</i>	X	4J/cm ²	4J/cm ²
D.E TOTAL	12J/cm ²	28J/cm ²	28J/cm ²
EUTANÁSIA	5 ^o dia	15 ^o dia	30 ^o dia

PO – pós-operatório. **D.E** – densidade de energia.

4.7 Procedimentos Cirúrgicos para Implantação dos Parafusos

As cirurgias foram realizadas utilizando instrumental padronizado para todos os grupos, respeitando os princípios de biossegurança e controle de infecção. Toda equipe cirúrgica utilizou equipamentos de proteção individual (EPI) (Figura 4).



Figura 4 – A - Mesa cirúrgica preparada para o procedimento. B - Ambiente do centro cirúrgico da UEA-HCPA / UFRGS.

O protocolo anestésico iniciou-se com a medicação pré-anestésica para tranquilização do animal e realização da tricotomia. Foram administrados, por via intramuscular, cetamina 15mg/kg, midazolam 1mg/kg e meperidina 5mg/kg (Seringa de 3 ml e agulha estéril 25x7, descartáveis – Plastipak[®], B.D do Brasil, São Paulo, Brasil). A indução da anestesia geral foi realizada com Isoflurano 5% em O₂ 100%, através de máscara facial. Ao se observar a perda do reflexo de retirada do membro anterior, foi realizada a intubação para manutenção da anestesia inalatória. Os seguintes parâmetros anestésicos foram aferidos: frequência cardíaca e respiratória, capnometria, oximetria e temperatura retal. A profilaxia antibiótica foi realizada imediatamente antes da cirurgia, com a administração intramuscular de

enrofloxacino 5mg/kg. Foi feita a antissepsia da pele do animal com polivinil pirrolidona iodo – PVPI a 10% (Handex[®], Saneativo Laboratório Farmacêutico Ltda., Gama/DF, Brasil) (Figura 5). Em seguida, a área da cirurgia foi isolada com campo plástico estéril.

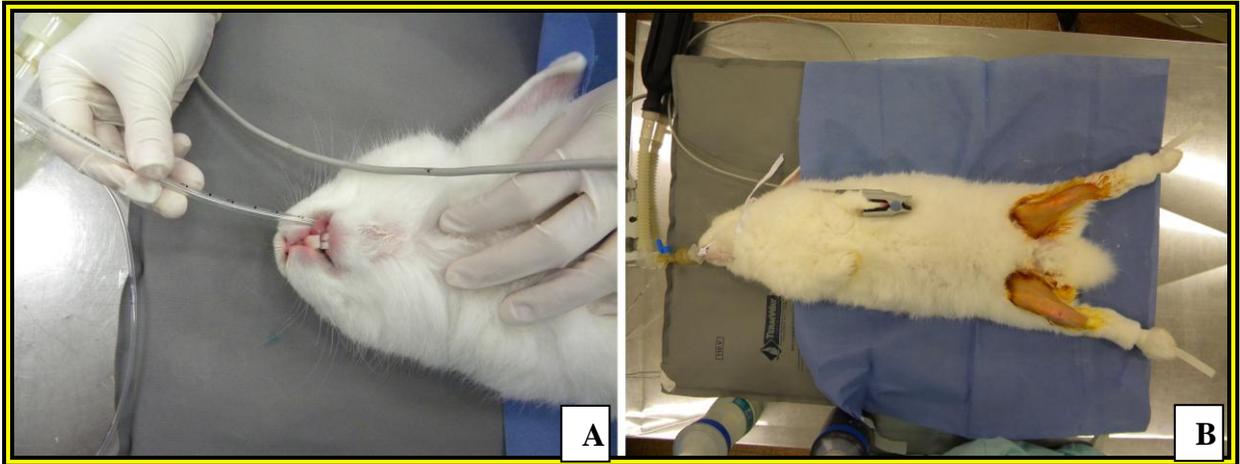


Figura 5 – A – Entubação orotraqueal do coelho e animal posicionado. B – Entubação concluída, monitorização com oxímetro e antissepsia de pele.

O acesso à tíbia do animal se deu por meio de uma incisão longitudinal na porção medial, com uma lâmina de bisturi nº 15 (Med Blade[®], Huaiyin Med, China), de aproximadamente 3,0cm de extensão, na pele e no tecido subcutâneo. O músculo adjacente foi dissecado até a exposição do periósteo, o qual foi incisado longe da área de implantação dos parafusos, visando afastá-los da área de sutura. O periósteo foi descolado e mantido com um afastador delicado tipo Senn-Muller, para visualização de toda diáfise da tíbia (Figura 6).

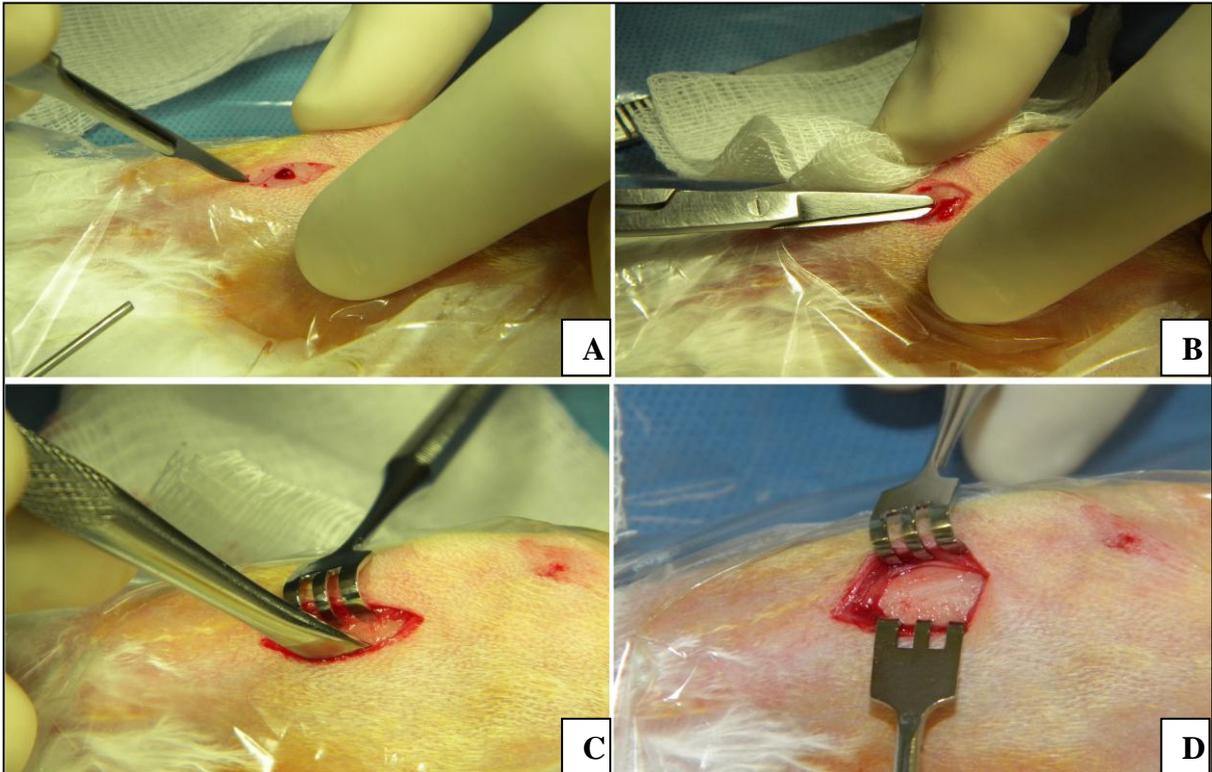


Figura 6 – Sequência de passos para acesso à face medial da tíbia direita. A – Incisão em pele e tecido subcutâneo. B – Dissecção da camada muscular. C – Descolamento do periósteo. D – Afastamento delicado com a superfície óssea medial da tíbia exposta.

O parafuso bioabsorvível foi implantado a uma distância de aproximadamente 20mm da articulação tíbio-femural, no centro da superfície óssea, para padronizar o procedimento.

Primeiramente, foi executada a perfuração com uma broca de perfuração de 1,1mm de diâmetro por 5,0mm de comprimento, com marcação tipo “stop” em 5,0mm (W Lorenz[®], Jacksonville, EUA), para garantir a profundidade de perfuração desejada. A perfuração para colocação dos parafusos foi executada com motor elétrico (Smart, Driller[®], Jaguaré/SP, Brasil) e peça de mão (Kavo[®], Joinville/SC, Brasil), com 700 rotações por minuto, sob abundante irrigação com solução de

cloreto de sódio 0,9% (Texon[®] Indústria Farmacêutica Ltda., Viamão/RS, Brasil) e aspiração concomitante.

Após a perfuração, foram utilizados 2 formadores de rosca para criar as roscas necessárias à introdução e travamento do parafuso. Este foi inserido no defeito ósseo com auxílio de chave manual do kit de instalação (W Lorenz[®], Jacksonville, EUA).

Em seguida, foi realizada a irrigação da ferida com solução fisiológica e uma marcação da localização exata do parafuso implantado foi feita na derme subjacente, com tinta nanquim (Nankin, Trident[®], Itaipu/SP, Brasil) e agulha para aspiração (Precision Glide[®], B.D. do Brasil, São Paulo, Brasil). Na sequência, o perióstio foi cuidadosamente reposicionado em sua posição original e, então, realizou-se a sutura da ferida operatória com pontos simples isolados, utilizando fio agulhado de nylon 4-0 (Ethicon[®], Johnson & Johnson Company, São José dos Campos/SP, Brasil). Previamente à aplicação do *laser* na pata direita do GI, a área cirúrgica foi higienizada, removendo o excesso de substância degermante que permanecera sobre a pele (Figuras 7 e 8).

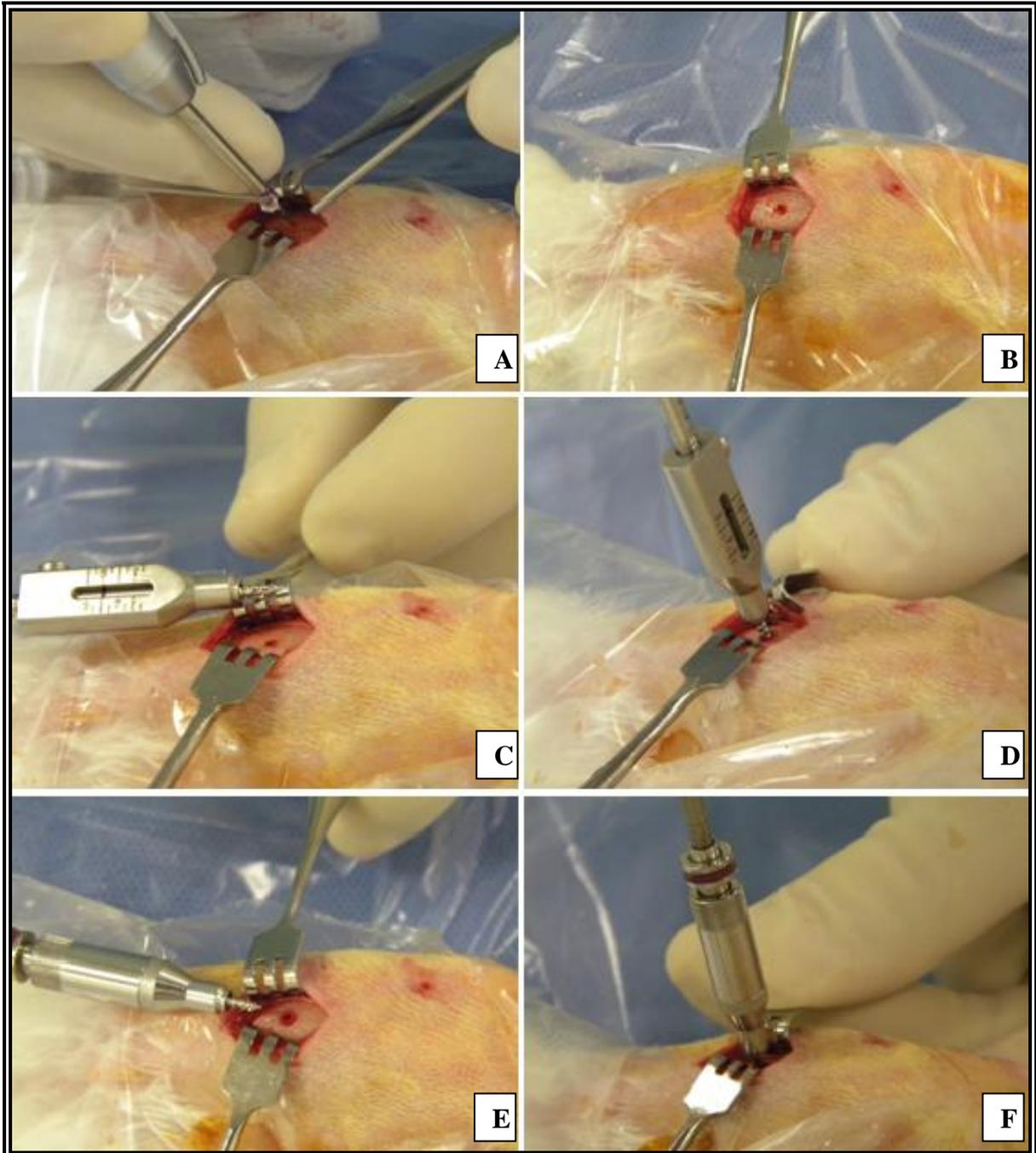


Figura 7 – Sequência de perfuração para instalação do parafuso PLLA-PGA. A – Perfuração com broca de 1,1 x 5mm. B – Orifício inicial. C – Primeiro formador de rosca. Observe a marcação do seu comprimento em 5mm. D – Primeiro formador de rosca criando “caminho” para o parafuso. .. E e F – Segundo formador de rosca.

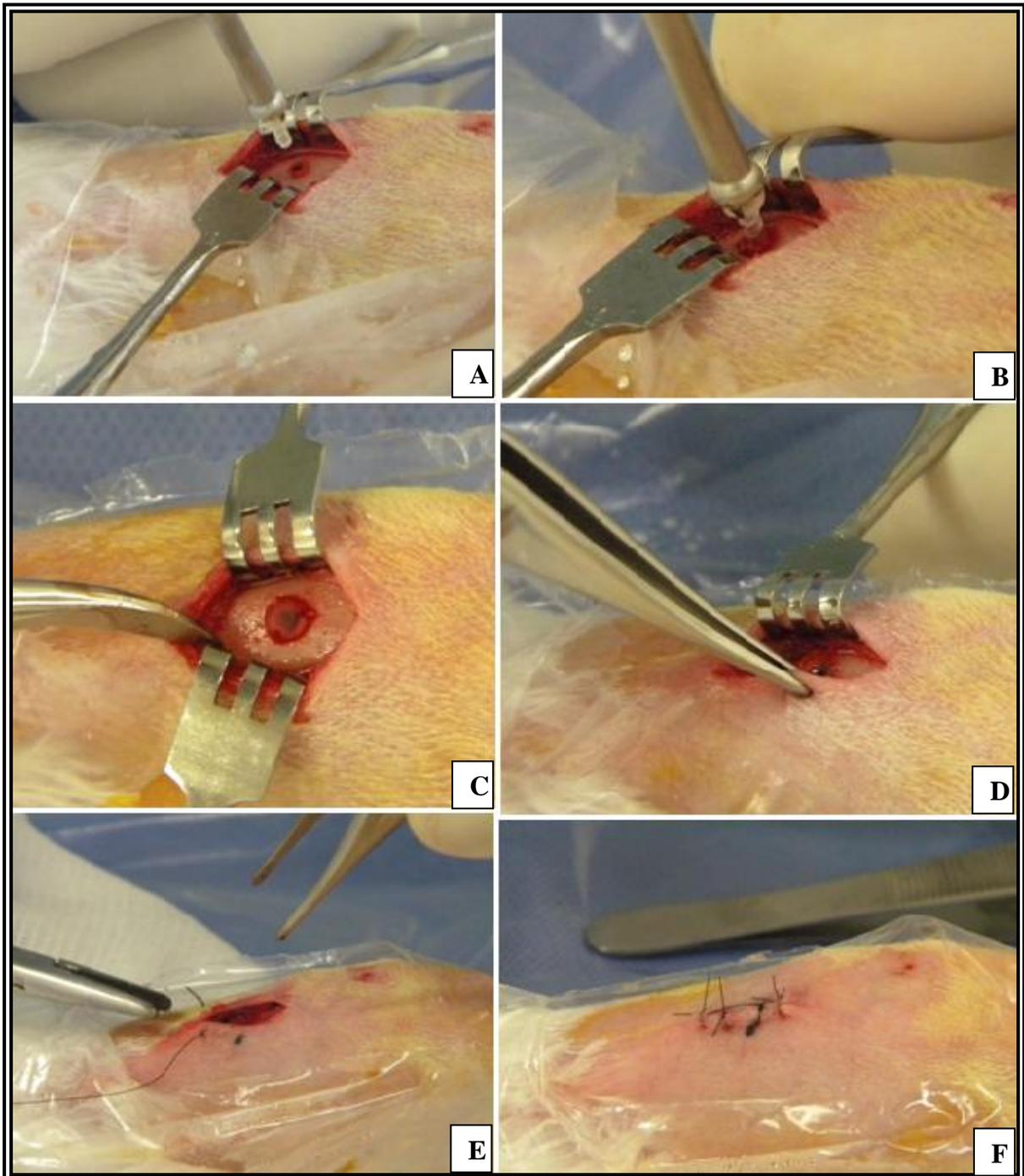


Figura 8 – Sequência de instalação do parafuso PLLA-PGA. A – Parafuso bioabsorvível preso à chave manual de inserção. B – Instalação do parafuso no orifício previamente preparado. C – Parafuso em posição. D – Relaxamento das margens da ferida cirúrgica, para marcação exata da posição do parafuso com tinta nanquim. E e F – Sutura, com a marcação em nanquim.

Após o procedimento cirúrgico, os animais ficaram em observação até a recuperação anestésica, quando então foram recolocados em suas gaiolas originais. A analgesia pós-operatória foi realizada com injeção de Tramadol 2mg/Kg subcutânea a cada 12h, nos 2 primeiros dias pós-operatórios.

Durante todo o período do experimento, os animais foram observados diariamente até o dia da eutanásia. As feridas cirúrgicas foram examinadas a cada 48 horas, no momento das aplicações do laser. No grupo controle, as feridas foram igualmente analisadas.

4.8 Eutanásia dos Animais e Avaliação Macroscópica das Amostras

Os coelhos foram submetidos à eutanásia de acordo com o tempo decorrido desde a cirurgia: 5, 15, 30 dias. A eutanásia foi conduzida com o animal tranqüilizado (conforme protocolo citado na etapa cirúrgica). Após a sedação, foi obtido acesso venoso (veia marginal da orelha), seguido por overdose anestésica de tiopental, na dose de 40mg/kg, e posterior parada cardíaca com cloreto de potássio (5ml/coelho). Constatada a morte dos animais, a amostra removida incluiu a tíbia, o parafuso e os tecidos moles adjacentes. Estes foram mantidos até o preparo da peça para inclusão em parafina, visando proteger a área do parafuso. A peça cirúrgica foi desarticulada na articulação tíbio-femural e serrada na tíbia, próximo a sua extremidade caudal. Antes da desarticulação da peça, foram feitas suturas com fio Nylon 2.0, na profundidade dos tecidos moles cranial e caudal à área de interesse, em toda a circunferência da peça. Tal manobra visou evitar o

deslocamento dos tecidos moles durante a desarticulação e osteotomia da tíbia (Figura 9).

Cada peça cirúrgica obtida foi avaliada macroscopicamente, com o objetivo de se observar a estabilidade do parafuso PLLA-PGA instalado, bem como possíveis alterações relacionadas à reabsorção óssea ou à do biomaterial. A adaptação do parafuso ao osso, nesta etapa, foi verificada com o auxílio de um descolador delicado. Em seguida, cada peça foi fixada em formol tamponado a 10%, em frascos individuais, devidamente identificados.

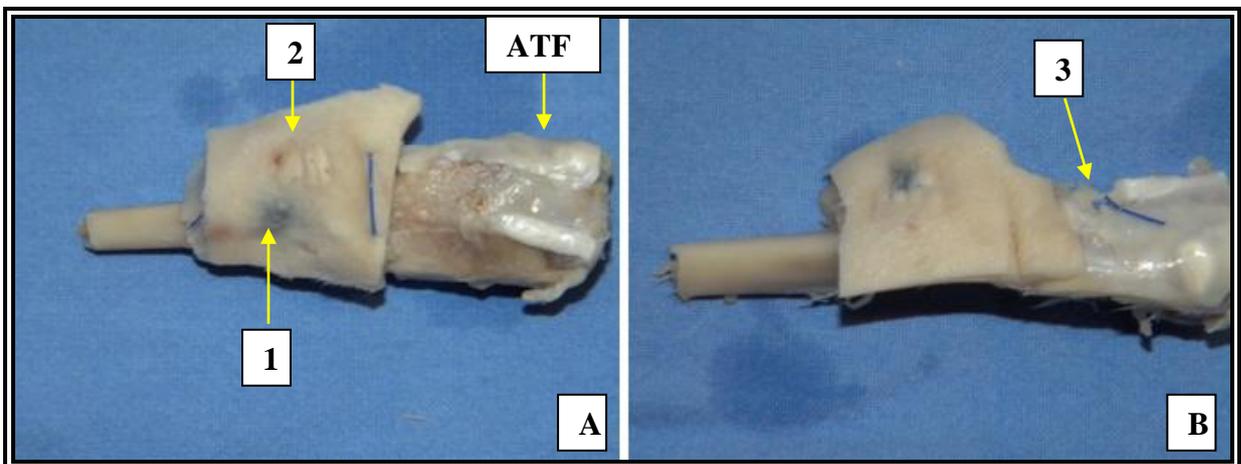


Figura 9 – A e B – Amostras removidas após a eutanásia. Bloco com a tíbia e o tecido mole sobre a região do parafuso. Observar a marcação com tinta nanquim na pele, indicando a posição exata do parafuso (1), a cicatriz do acesso cirúrgico (2) e a articulação tíbio-femural (ATF). Nota-se, ainda, a presença de fios de sutura para estabilizar os tecidos moles durante a obtenção da peça de estudo (3).

O descarte das carcaças dos animais seguiu a rotina da UEA-HCPA / UFRGS. Todos os resíduos biológicos foram encaminhados como lixo hospitalar para a empresa Abogarma (Abogarma do Brasil LTDA, Av Cristovão Colombo, 2360,

sala 303, Floresta, Porto Alegre – RS), onde foram autoclavados e descartados em aterro específico.

4.9 Preparo das Amostras para Processamento Histológico

Após um tempo médio de 48 horas de fixação, a peça cirúrgica foi preparada para que se iniciassem os procedimentos de descalcificação e inclusão. Apenas o tecido mole sobre a face interna da tíbia, local de inserção do parafuso, foi mantido, de forma a preservar a região do implante. Em todas as peças, foi possível definir a posição exata do parafuso pela marcação feita em nanquim, bem como pela presença da cicatriz e de um tecido de cicatrização, de consistência endurecida, sobre a área do parafuso. O osso tibial também foi preparado de maneira a manter cerca de 15mm de estrutura cranial e 25mm caudal à área do parafuso. Esta redução no tamanho da peça teve o objetivo de diminuir o tempo e facilitar a sua descalcificação, porém ainda mantendo uma margem de osso, para que o processo de descalcificação pudesse ser monitorado.

Os espécimes fixados foram enviados à Unidade de Patologia Experimental (UPE-HCPA / UFRGS), sob a supervisão da Profa. Dra. Luise Meurer, chefe da referida seção.

As amostras foram descalcificadas em solução aquosa de ácido nítrico 10%, por um tempo médio de 72 horas, com trocas diárias da solução, até que sua consistência permitisse que o osso fosse cortado com uma navalha de histologia, sem oferecer resistência ou ruído. Nesse momento, a peça foi, então, submetida a

processamento histológico para obtenção de blocos de parafina. O tecido mole, junto à área de marcação do parafuso e da cicatriz, foi delicadamente descolado do osso. O parafuso pôde, então, ser visualizado. O osso tibial foi cortado rente à cabeça do parafuso, perpendicularmente ao longo eixo do osso, tanto no sentido cranial como no sentido caudal. Ambos os espécimes, tecido mole e osso contendo o parafuso, foram colocados para inclusão em parafina, de forma que cada bloco mantivesse o osso com o biomaterial e o tecido mole referente.

Após a obtenção do bloco de parafina, este foi levado ao micrótomo para realização dos cortes de 6 μ m de espessura. Como padronização, o bloco foi desgastado até que todo o parafuso, incluindo a cabeça e o corpo, ficasse exposto (Figura 10). A partir de então, foram obtidas 2 lâminas de cada bloco, com 2 selos em cada uma.

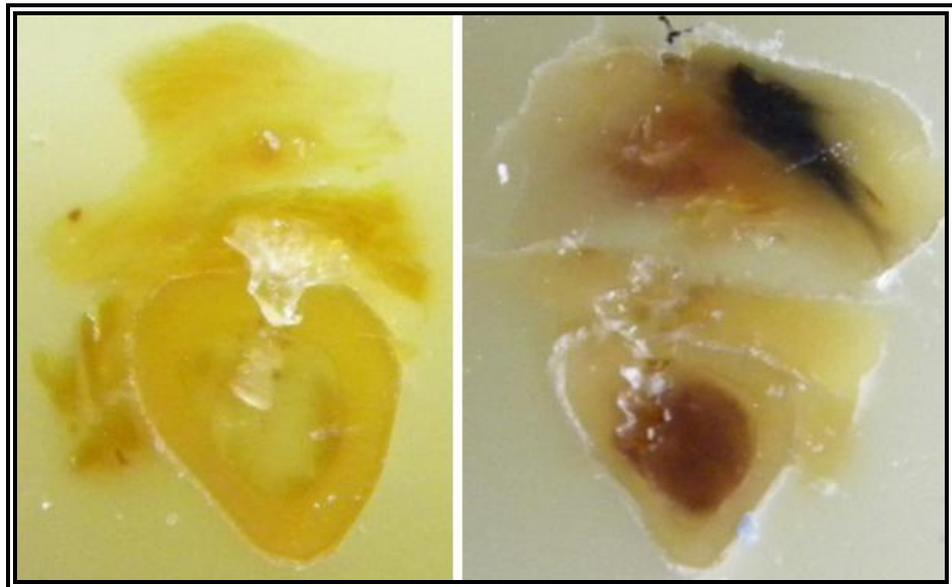


Figura 10 – Blocos de parafina já desgastados, prontos para a obtenção das lâminas de histologia. O parafuso PLLA-PGA está visível em toda sua extensão.

As lâminas foram coradas pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) e analisadas com relação à formação de trabéculas ósseas na região adjacente ao parafuso PLLA-PGA.

4.10 Análise dos Resultados da Microscopia

A análise microscópica das lâminas foi realizada com microscópio ótico em aumentos de 20, 100, 200 e 400 vezes, na UPE-HCPA / UFRGS.

A avaliação quantitativa da formação óssea na região perimplantar foi mensurada pela presença de trabéculas ósseas observadas em campos de aumento de 200 vezes. Para tanto, realizou-se um rastreamento de toda a área perimplantar, desde a entrada do parafuso, junto ao osso cortical, percorrendo a transição do osso cortical e medular, até o ápice do biomaterial (Figura 11).

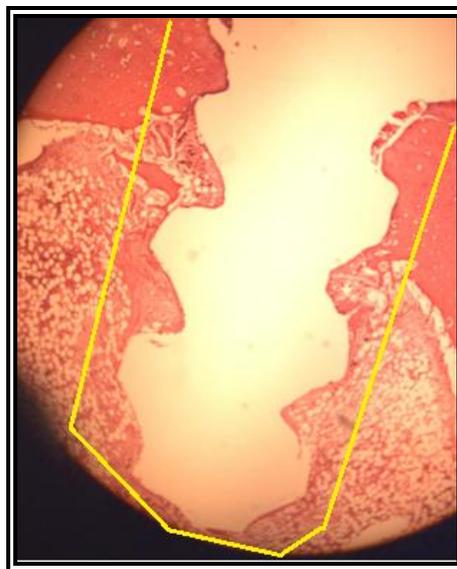


Figura 11 – Fotomicrografia da área perimplante PLLA-PGA em aumento de 20x. Em amarelo, foi indicada a área do rastreamento.

Um total de 10 campos de aumento de 200 vezes foi necessário para analisar toda a área perimplantar. O número de campos de 200 vezes que apresentavam trabéculas neoformadas foi anotado em cada lâmina de HE. Os resultados foram agrupados dentro dos grupos experimental e controle, e dentro dos intervalos de 5, 15 e 30 dias de observação.

As áreas de neoformação óssea foram também analisadas qualitativamente, através de microscopia ótica, com aumentos de 20, 100, 200 e 400 vezes. A morfologia e distribuição das trabéculas, bem como a presença de osteoblastos em sua periferia, presença e tipo de infiltrado inflamatório e sítios de reabsorção foram observados e descritos em cada grupo, GI (pata direita e esquerda) e GII, dentro de cada intervalo de tempo de observação.

As avaliações das lâminas foram realizadas por 2 examinadores calibrados (a patologista e o mestrando autor deste trabalho). Inicialmente, foi realizado um treinamento do mestrando pela patologista, até que aquele estivesse apto a realizar a leitura das lâminas. Em seguida, foi realizada a leitura quantitativa, pelo número de campos de aumento de 200 vezes contendo osso neoformado na área perimplantar, e a análise descritiva, em 10 lâminas aleatoriamente selecionadas. Os resultados obtidos por cada examinador foram confrontados. Esse exercício foi repetido por mais 2 vezes, sendo os resultados comparados, atingindo um índice de concordância de 100% nos resultados obtidos, na avaliação dos campos de aumento, e uma descrição similar do ponto de vista qualitativo. A partir de então, realizou-se a análise de todas as lâminas com cegamento dos examinadores.

4.11 Análise dos Resultados da Microscopia - Análise Estatística

Para análise dos dados obtidos, foi constituído um modelo de análise de comparação das variáveis (utilizar as patas direita e esquerda caracteriza um estudo com amostra pareada) e das médias da análise dos seguintes efeitos:

- **Efeito Experimento:** comparação entre os grupos experimental e também com o controle, dentro dos períodos de observação.
- **Efeito Tempo:** comparação dos resultados dos grupos experimental com aqueles do grupo controle, correspondentes aos seguintes períodos: 5, 15 e 30 dias, para análise tecidual perimplante dos parafusos bioabsorvíveis.

Inicialmente, realizou-se um teste de normalidade de *Kolmogorov-Smirnov*, para avaliar a validade da variável *número de campos de aumento de 200x com osso neoformado*. O teste demonstrou que essa variável satisfaz a suposição de normalidade. Com isso, foi observada a formação óssea perimplantar, nos intervalos de 5, 15 e 30 dias, através das médias e desvio padrão. Para tanto, foram estabelecidas as seguintes comparações:

1. Comparação entre grupos – Em cada tempo de observação, 5, 15 e 30 dias, a pata direita do GI foi comparada à pata direita do GII. De maneira similar, a pata esquerda do GI foi comparada à pata esquerda do GII. Os resultados possibilitaram avaliar estatisticamente os efeitos locais (pata direita) e sistêmicos (pata esquerda) do *laser*.

2. Comparação entre lados – Em cada tempo de observação, 5, 15, 30 dias, a pata direita e esquerda do mesmo grupo (GI ou GII) foram comparadas. Os

resultados permitiram avaliar estatisticamente a presença de efeitos sistêmicos do *laser*, no GI. Outro aspecto importante foi avaliar a homogeneidade dos resultados no GII (controle), como forma de validar a metodologia e a padronização dos procedimentos.

3. Comparação do tempo de observação – Em cada pata, direita ou esquerda, de cada grupo, I e II, os resultados observados em 5, 15 e 30 dias foram analisados estatisticamente. Os resultados possibilitaram avaliar os efeitos do *laser*, locais ou sistêmicos, ao longo do tempo de observação.

Foi utilizado o teste T de *Student* na primeira comparação, o teste T de *Student* para dados pareados na segunda comparação e a análise de variância (ANOVA), complementada pelo teste de comparações múltiplas de *Turkey*, na terceira.

Para o processamento e a análise dos dados, foi empregado o software *Statistical Package for the Social Science* (SPSS[®], versão 18) para Windows[®]. Toda a análise estatística foi orientada e supervisionada pelo Prof. Sérgio Kakuta Kato (Departamento de Estatística, Faculdade de Matemática da PUCRS).



Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Análise Macroscópica

Os animais permaneceram saudáveis, sem evidência de infecção durante o período de observação. Em um animal do grupo G1-B, observou-se no terceiro dia pós-operatório uma discreta deiscência da sutura. A ferida não apresentava secreção ou edema importante e, ao longo do acompanhamento e das aplicações de laser, notou-se uma cicatrização progressiva, até assumir um aspecto sem alteração, compatível com as feridas dos outros animais, no oitavo dia após o procedimento cirúrgico.

Após a eutanásia e preparo dos blocos de necropsia, observou-se macroscopicamente que todos os parafusos, em todos os intervalos de tempo analisados, estavam firmemente adaptados ao osso, sem mobilidade e sem sinais visíveis de degradação ou de bioabsorção.

5.2 Análise Microscópica

Durante o preparo histológico, foram perdidas 5 amostras, indicadas na tabela 3. A perda ocorreu em função da diferença de densidade e consistência entre o parafuso PLLA-PGA e o osso descalcificado. Durante o corte do bloco de parafina no micrótomo, o parafuso se despreendeu do osso. A peça foi danificada e, por conseguinte, retirada da análise.

Os resultados observados foram agrupados na tabela 3 e ilustrados nas figuras abaixo:

Tabela 3 – Número de campos com aumento de 200 vezes preenchidos com trabéculas ósseas neoformadas na região perimplante PLLA-PGA.

Tempo	Pata	GI – Laser		GII – Controle		Subgrupos
		D	E	D	E	
5 dias		4	3	1	1	A
5 dias		2	3	2	1	A
5 dias		3	*	1	2	A
5 dias		4	3	1	2	A
15 dias		5	4	*	*	B
15 dias		4	6	8	7	B
15 dias		6	7	7	6	B
15 dias		6	7	4	7	B
30 dias		3	8	*	*	C
30 dias		4	5	4	7	C
30 dias		4	8	4	5	C
30 dias		7	7	5	5	C

* Amostra perdida durante a preparação histológica

A tabela 3 mostra que houve diferenças na quantidade de trabéculas ósseas neoformadas na região perimplante, ao se compararem os grupos experimental (GI) e controle (GII). Essa diferença foi relevante nas amostras de 5 dias. O número de campos com aumento de 200 vezes, preenchidos por trabéculas, foi claramente superior nas patas direita e esquerda do GI.

Análise Descritiva

- 5 DIAS

As trabéculas neoformadas nos espécimes do GI, tanto na pata direita quanto na pata esquerda, tinham características de osso vital, com espessura delgada, revestidas na periferia por grande quantidade de osteoblastos, os quais ocupavam

mais de 2/3 da sua superfície. Alguns osteócitos já eram vistos no seu interior, a despeito da pequena espessura. Não foi observada reação inflamatória aguda ou crônica na área perimplantar. Restos de fragmento ósseo em reabsorção foram vistos em áreas isoladas com células gigantes escassas. Nas lâminas do GII, notou-se que as trabéculas eram menores tanto em extensão quanto em densidade e distribuição. Apesar disso, o osso tinha características de vitalidade, com grande quantidade de osteoblastos na periferia, revestindo mais de 2/3 da sua superfície. Uma nítida linha divisória entre o osso neoformado e o osso maduro foi vista na maior parte dos espécimes analisados.

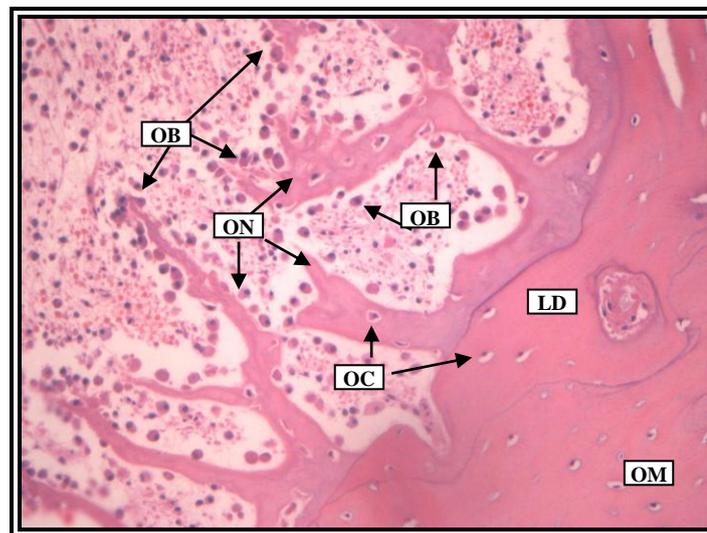


Figura 12 – Fotomicrografia da área perimplante PLLA-PGA. Grupo I-A – Pata direita. Observam-se trabéculas ósseas neoformadas (ON) com padrão normal, partindo da superfície óssea em direção à área de implantação do parafuso. Notam-se, também, muitos osteoblastos (OB) na periferia, osteócitos (OC) no seu interior das trabéculas e uma linha divisória (LD) entre o tecido ósseo neoformado e o osso maduro (OM). HE, aumento de 400x.



Figura 13 – Fotomicrografia da área perimplante PLLA-PGA. Grupo I-A – Pata esquerda. Observam-se formação de trabéculas ósseas finas, com padrão normal, partindo da superfície óssea em direção à área de implantação do parafuso. Osteoblastos (OB) em abundância são vistos na sua periferia e alguns osteócitos (OC) no seu interior. Ainda, a linha divisória (LD) entre o osso neoformado e o maduro (OM) é visível. HE, 400x.

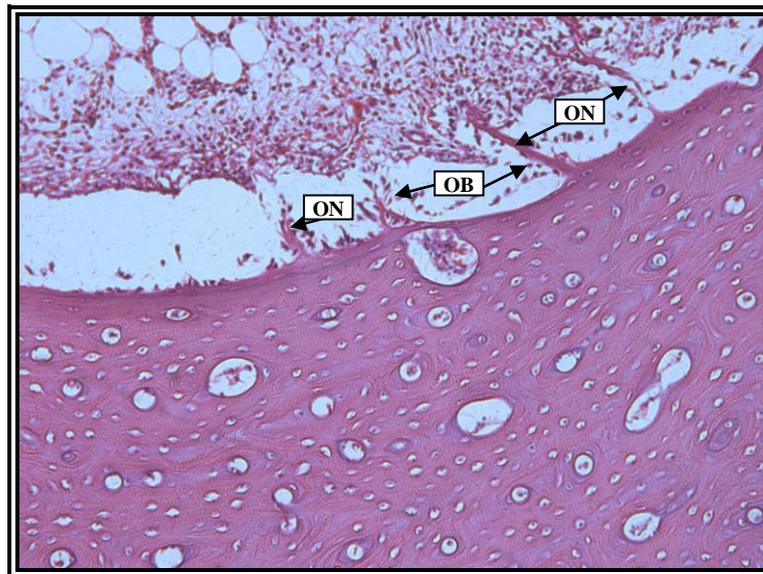


Figura 14 – Fotomicrografia da área perimplante PLLA-PGA. Grupo II-A – Pata direita. Observam-se finas e escassas trabéculas ósseas (ON), diminutas, partindo do osso cortical e medular, próximas à entrada do parafuso. Notam-se, ainda, osteoblastos (OB) acumulando na periferia das trabéculas. HE, 200x.

- 15 DIAS

Não houve diferenças significativas no padrão histológico observado entre os subgrupos GI-B (pata direita), GI-B (pata esquerda) e GII (ambas as patas). Em 15 dias, foi notada uma maior proliferação de trabéculas ósseas neoformadas, partindo em direção à área do parafuso. As trabéculas apresentavam maior espessura e distribuição em ambos os grupos (pata direita e esquerda do GI e patas direita e esquerda do GII). Os osteoblastos encontravam-se preenchendo a periferia das trabéculas, com mais abundância nos espécimes do GI-B (pata direita) e GII, quando comparados aos do GI-B (pata esquerda). No seu interior, foram observados osteócitos e vasos sanguíneos em maior número que nas trabéculas dos subgrupos de 5 dias. Em todos os casos, o osso neoformado apresentava características de vitalidade. Poucas células gigantes adjacentes às trabéculas foram notadas.

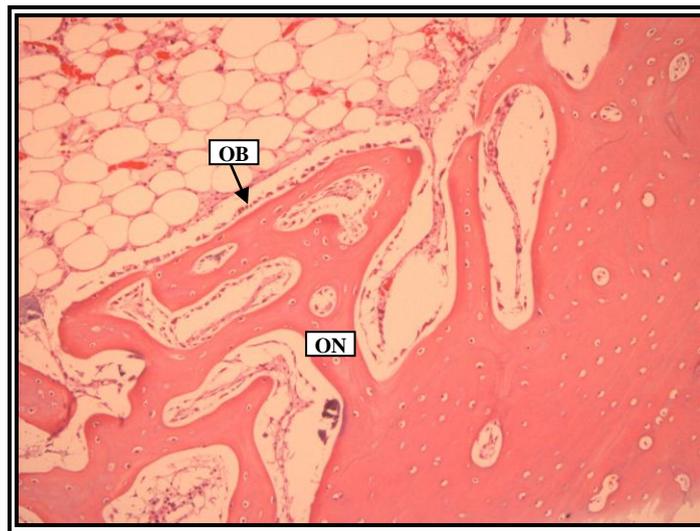


Figura 15 – Fotomicrografia da área perimplante PLLA-PGA. GI-B – Pata direita. Observam-se trabéculas ósseas neoformadas (ON), proliferando em direção à área do parafuso e ao osso medular, com osteócitos no seu interior e uma quantidade moderada de osteoblastos (OB) na periferia. Nota-se um maior volume de osso neoformado, quando comparado às amostras de 5 dias. HE, 200x.



Figura 16 – Fotomicrografia da área perimplante PLLA-PGA. Grupo I-B – Pata esquerda. Notam-se trabéculas ósseas neoformadas (ON), com maior espessura, em direção à área do parafuso e ao osso medular, com osteócitos no seu interior e osteoblastos na periferia. A linha divisória (LD) entre o osso neoformado e o osso maduro é bem visível. HE, 200x.

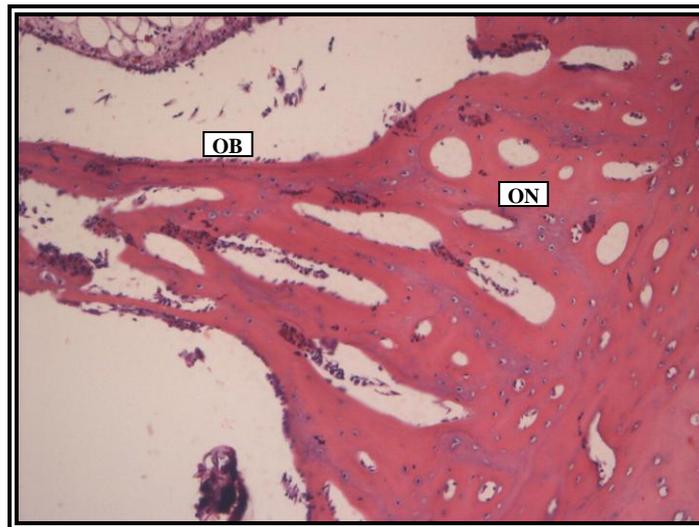


Figura 17 - Fotomicrografia da área perimplante PLLA-PGA. Grupo II-B – Pata direita. Nota-se presença de trabéculas ósseas neoformadas (ON), em direção à área do parafuso, com osteócitos no interior e quantidade moderada de osteoblastos (OB) na periferia. HE, 200x.

- 30 DIAS

Também não houve diferenças significativas no padrão histológico observado entre os subgrupos GI-C (pata direita), GI-C (pata esquerda) e GII (ambas as patas). A neoformação óssea preencheu uma maior área perimplantar, com trabéculas mais espessas e apresentando graus variados de maturação óssea. Seu interior era preenchido por grande quantidade de osteócitos, possuindo poucos osteoblastos na periferia. Ainda, células gigantes multinucleadas isoladas na área adjacente ao parafuso puderam ser observadas. A região do parafuso ainda era vista sem alterações morfológicas do biomaterial, porém foi possível observar em alguns espécimes um revestimento de tecido conjuntivo ao redor do parafuso. O osso neoformado apresentava características de vitalidade, sendo notada ainda a linha divisória entre este e o osso maduro.

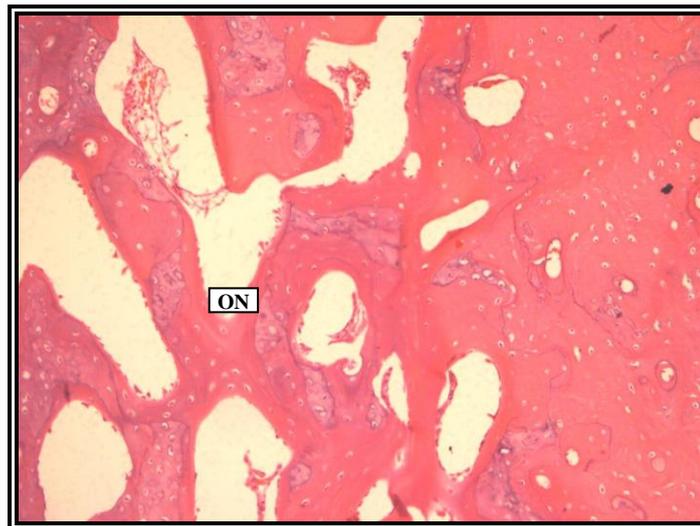


Figura 18 - Fotomicrografia da área perimplante PLLA-PGA. Grupo I-C – Pata direita. Trabéculas ósseas neoformadas (ON), com graus variados de maturação, em direção à área do parafuso. Múltiplos osteócitos no interior e pequena quantidade de osteoblastos na periferia. HE, 200x.

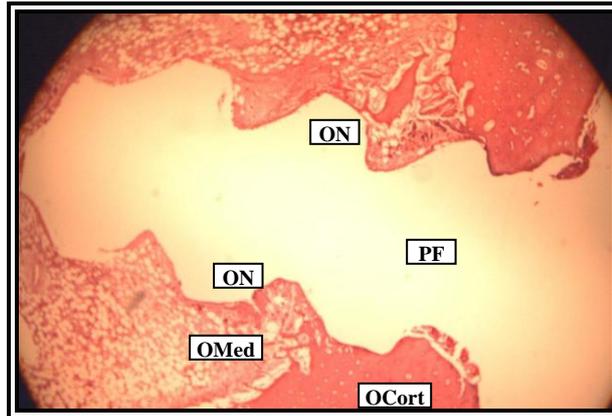


Figura 19 – Fotomicrografia da área perimplante PLLA-PGA em aumento de 20x. Grupo I-C. Área do parafuso PLLA-PGA (PF), com osso cortical externo (OCort) e osso medular interno (OMed). Nota-se áreas de formação óssea (ON) adjacente às espiras e junto à cabeça do parafuso.

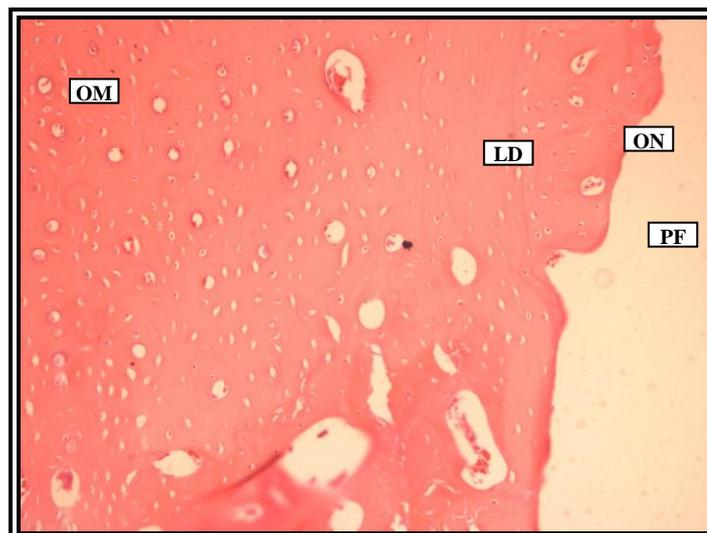


Figura 20 - Fotomicrografia da área perimplante PLLA-PGA. Grupo I-C – Pata esquerda. Pode-se observar osso neoformado (ON) na direção da área do parafuso (PF), com grau avançado de maturação, com osteócitos e vasos sanguíneos no seu interior. Percebe-se ainda a linha divisória (LD) entre o osso neoformado e o osso maduro (OM). HE, 200x.

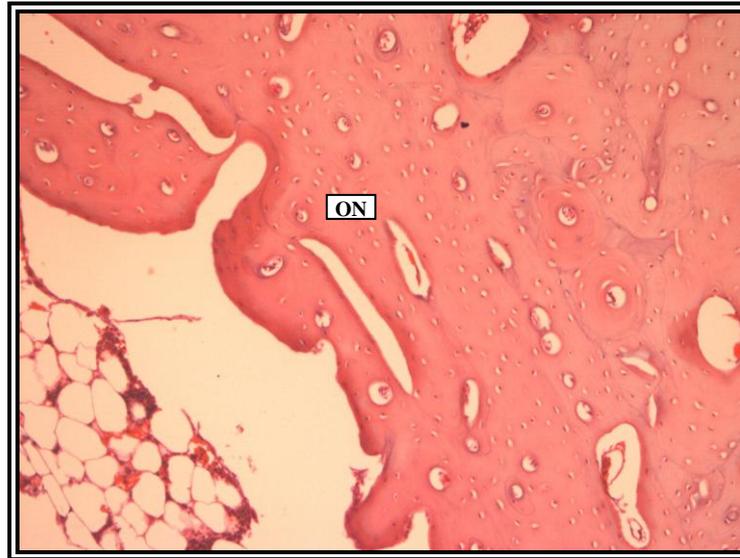


Figura 21 - Fotomicrografia da área perimplante PLLA-PGA. Grupo II-C – Pata esquerda. Observa-se osso neoformado com maior grau de maturação (ON), com osteócitos e vasos sanguíneos no seu interior. HE, 200x.

5.3 Análise Estatística

Os resultados da análise estatística são apresentados nas tabelas 4, 5 e 6.

Tabela 4 – Comparação da formação óssea no tecido perimplantar entre os grupos experimental e controle, através do número de campos de aumento de 200 vezes preenchidos com trabéculas ósseas neoformadas. Média e desvio padrão (DP) observados dentro de cada grupo, nos subgrupos de 5, 15 e 30 dias.

Tempo em dias (subgrupo)	Pata	Grupo				p
		I		II		
		Média	DP	Média	DP	
5 (A)	direita	3,25	0,96	1,25	0,50	0,010*
	esquerda	3,00	0,00	1,50	0,58	0,007*
15 (B)	direita	5,25	0,96	6,33	2,08	0,391
	esquerda	6,00	1,41	6,67	0,58	0,484
30 (C)	direita	4,50	1,73	4,33	0,58	0,881
	esquerda	7,00	1,41	5,67	1,15	0,242

p= nível mínimo de significância do Teste T (0,05)

* diferenças estatisticamente significativas

Na tabela 4, foram avaliadas as médias entre grupos, comparando os resultados das patas direitas de GI-A com as direitas de GII-A, e esquerdas de GI-A com as esquerdas de GII-A. Comparações similares foram feitas nos intervalos de 15 e 30 dias (subgrupos B e C). Observa-se que houve uma diferença estatisticamente significativa na quantidade de trabéculas ósseas neoformadas, na comparação entre os grupos GI e GII, no período de 5 dias. Assim, o efeito local do *laser* foi demonstrado quando se comparou as patas direitas de GI e GII. O efeito sistêmico do *laser* na neoformação óssea perimplante PLLA-PGA foi também evidente, no intervalo de 5 dias, ao se compararem as médias obtidas para a pata esquerda de GI com as da pata esquerda de GII. Nos intervalos de 15 e 30 dias, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, na quantidade de trabéculas ósseas neoformadas.

Tabela 5 – Comparação da formação óssea entre os lados direito e esquerdo do mesmo grupo.

Tempo em dias (Subgrupo)	Grupo	Pata				p
		Direita		Esquerda		
		Média	DP	Média	DP	
5 (A)	I	3,25	0,96	3,00	0,00	0,667
	II	1,25	0,50	1,50	0,58	0,638
15 (B)	I	5,25	0,96	6,00	1,41	0,319
	II	6,33	2,08	6,67	0,58	0,826
30 (C)	I	4,50	1,73	7,00	1,41	0,127
	II	4,33	0,58	5,67	1,15	0,270

p= nível mínimo de significância do Teste T para dados pareados (0,05)

A tabela 5 mostra a comparação das médias entre patas, direita e esquerda, dentro de um mesmo subgrupo. Em nenhuma comparação houve diferenças

estatisticamente significativas. É importante ressaltar a similaridade de resultados entre as patas direita e esquerda do GII.

Tabela 6 – Comparação da formação óssea entre os subgrupos A, B e C de um mesmo grupo.

Tempo em dias (Subgrupo)	Grupo / Pata							
	I / D		I / E		II / D		II / E	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
5 (A)	3,25	0,96	3,00 ^b	0,00	1,25 ^b	0,50	1,50 ^b	0,58
15 (B)	5,25	0,96	6,00 ^a	1,41	6,33 ^a	2,08	6,67 ^a	0,58
30 (C)	4,50	1,73	7,00 ^a	1,41	4,33 ^a	0,58	5,67 ^a	1,15
p	0,134		0,008		0,002		0,001	

p= nível mínimo de significância da Análise de Variância

Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem significativamente através da ANOVA, complementada pelo teste de comparações múltiplas de *Turkey*, ao nível de significância de 5%.

A tabela 6 mostra a comparação das médias de cada pata, ao longo dos 3 períodos de observação. No GI, as médias da pata direita, irradiada, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os tempos. Percebe-se, inclusive, que houve uma diminuição do valor da média entre 15 e 30 dias. Já na pata esquerda de GI e em ambas as patas de GII, houve uma diferença estatisticamente significativa entre a média obtida em 5 dias e aquelas de 15 e 30 dias.



Discussão

6 DISCUSSÃO

As ações biomoduladoras da LLLT no processo de reparo ósseo têm sido amplamente estudadas, com resultados animadores. Vários autores observaram efeitos positivos da LLLT em defeitos ósseos, em áreas de enxerto, fraturas, ou na osseointegração (LUGER *et al.*, 1998; WEBER *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2007; CAMPANHA *et al.*, 2010; SHAKOURI *et al.*, 2010). Não há, entretanto, relatos que avaliam a LLLT no processo de reparo ósseo em áreas com parafusos PLLA-PGA. Ademais, os possíveis efeitos sistêmicos desta terapia são ainda controversos e pouco estudados.

Em um estudo prévio desenvolvido no Programa de Pós-Graduação da FO-PUCRS, demonstrou-se que a LLLT teve efeito biomodulador positivo na inflamação dos tecidos moles ao redor de placas PLLA-PGA em fêmures de ratos (FREDDO *et al.*, 2009). Esse efeito foi predominante em fases precoces. O presente estudo segue uma linha similar de pesquisa, propondo-se a avaliar os possíveis efeitos locais e sistêmicos da LLLT no reparo ósseo de áreas perimplantares aos parafusos PLLA-PGA em tíbias de coelhos.

Quando se analisa os inúmeros trabalhos sobre os efeitos da LLLT no processo de reparo ósseo, percebe-se que há grande dificuldade em se estabelecer comparações confiáveis de resultados entre os estudos. Tal fato decorre da grande variação de metodologias e protocolos usados, no que tange ao tipo de *laser*, densidade de energia, potência, modo de aplicação, início e duração das sessões (SILVA JÚNIOR *et al.*, 2002; WEBER *et al.*, 2006; FREDDO *et al.*, 2009).

Na presente pesquisa, a utilização do *laser* infravermelho, com comprimento de onda de 830nm, está em concordância com vários outros trabalhos que avaliaram a fotobiomodulação no processo de reparo ósseo (OZAWA *et al.*, 1998; SILVA JÚNIOR *et al.*, 2002; KHANDRA *et al.*, 2004; GERBI *et al.*, 2005; CAMPANHA *et al.*, 2010; ANGELETTI *et al.*, 2010; SHAKOURI *et al.*, 2010). O estudo de Basford (1995) mostrou que o *laser* com comprimento de onda de 632,8nm penetra 0,5 a 1mm nos tecidos, antes de perder cerca de 37% de sua intensidade. Já o *laser* infravermelho penetra 2mm antes de perder algum porcentual de energia, o que o faz mais apropriado para o emprego em situações que se queira avaliar o reparo ósseo. De acordo com Almeida-Lopes (2003), o comprimento de onda é um fator extremamente importante, que define a profundidade de penetração do *laser* nos tecidos. Weber *et al.* (2006) e Shakouri *et al.* (2010) afirmaram que o *laser* infravermelho possui maior capacidade de penetração, quando comparado ao *laser* vermelho.

A dose de $4\text{J}/\text{cm}^2$ por sessão está em concordância com AboElsaad *et al.* (2009) e Shakouri *et al.* (2010). Karu (1989) afirmou que os efeitos biológicos estimulados pela LLLT situam-se com densidades de energia entre 1 a $50\text{J}/\text{cm}^2$. De acordo com Rodrigo *et al.* (2009), variações na fluência ou densidade da energia podem estimular ou inibir atividades bioquímicas, fisiológicas e proliferativas. Altas energias podem ser prejudiciais; os efeitos são dose-dependentes. A aplicação do *laser* foi fracionada em 4 pontos ao redor do parafuso, com a ponteira em íntimo contato com a pele, visando minimizar a reflexão e aumentar a absorção da energia

depositada. Os estudos de Nicolau *et al.* (2003), Freddo *et al.* (2009) e Campanha *et al.* (2010) também usaram essa metodologia de aplicação.

O presente estudo foi desenvolvido com 2 grupos, um experimental (GI) e outro controle (GII), divididos aleatoriamente. No GI, o *laser* aplicado na pata direita permitiu que se avaliassem os efeitos locais, ao se compararem seus resultados com os da pata direita do GII. Os possíveis efeitos sistêmicos da irradiação a *laser* foram avaliados comparando os resultados histológicos entre as patas direita e esquerda do GI e comparando também a pata esquerda do GI com a pata esquerda do GII. O estabelecimento de um grupo controle independente, sem receber qualquer tipo de irradiação, constitui um modelo confiável de comparação, quando se deseja avaliar os efeitos do *laser*, locais ou sistêmicos, nos processos de reparo tecidual. De fato, vários estudos ressaltam a importância de se constituírem grupos experimental e controle com diferentes animais (WEBER *et al.*, 2006; FREDDO *et al.*, 2009; RODRIGO *et al.*, 2009) A utilização de um lado contralateral para comparar efeitos locais do *laser* cria um viés de pesquisa, demonstrado neste trabalho pelos efeitos sistêmicos observados no lado não irradiado.

A variável avaliada nesta pesquisa foi a formação óssea na região ao redor do parafuso PLLA-PGA. A quantidade de trabéculas ósseas neoformadas foi comparada em áreas irradiadas, no lado contralateral e no grupo controle, visando avaliar os possíveis efeitos locais e sistêmicos do *laser* no processo de formação óssea perimplante. A bioabsorção dos parafusos PLLA-PGA (82%-18%, LactoSorb[®]) se processa, segundo o fabricante (MANUAL DO FABRICANTE, 2011), em um tempo médio de 12 meses. Os intervalos analisados de 5, 15 e 30 dias permitiram

avaliar o processo inicial de formação óssea na área perimplante, que, associado à hidrólise e bioabsorção dos copolímeros PLLA-PGA, será responsável pelo preenchimento do sítio dos parafusos com osso neoformado e tecido fibroso, num período médio de 15 meses.

Mollaoglu *et al.* (2003) relataram neoformação óssea e osteoblastos ao redor da cabeça e do ápice de parafusos PLLA-PGA em 7 dias. Hochuli-Vieira *et al.* (2005), em um estudo em coelhos, observaram pequenas trabéculas ósseas, com osteoblastos na periferia e osteócitos no seu interior, na área de osteotomia, fixada com placa e parafusos PLLA-PGA, 15 dias após a sua implantação. Se levarmos em consideração que a LLLT pode ter um efeito positivo na formação óssea, acelerando a deposição de novas trabéculas, torna-se justificável a escolha de um período inicial de observação mais precoce.

Dessa maneira, os intervalos de 5, 15 e 30 dias foram estabelecidos para avaliar a evolução da reparação óssea ao redor de parafusos PLLA-PGA, nas fases iniciais. Alguns estudos que analisaram os efeitos do *laser* no reparo ósseo, bem como o comportamento de biomateriais, estabeleceram intervalos mínimos de 15 dias como parâmetro de avaliação das fases iniciais do processo cicatricial (HOCHULI-VIEIRA *et al.*, 2005; GERBI *et al.*, 2005; WEBER *et al.*, 2006). No entanto, outros autores relataram que uma maior formação óssea em defeitos irradiados já foram percebidas em intervalos de 7 (SILVA JÚNIOR *et al.*, 2002) e 10 dias (BARUSHKA *et al.*, 1995; AKYOL e GÜNGÖRMÜS, 2010). É importante salientar que, na presente pesquisa, não houve criação de defeito ósseo. Analisou-se a área perimplantar, a qual era composta por osso cortical, externamente, e

medular, no aspecto interno, em contato com o parafuso PLLA-PGA. Assim, a região investigada constituiu a extensão do contato osso – parafuso, o que, em última análise, significa uma área mais restrita para preenchimento pelo tecido neoformado, já que nos períodos do estudo ainda não houve degradação do parafuso.

Na presente pesquisa, foi observado que o *laser*, nos padrões utilizados, teve um efeito local positivo na estimulação da formação óssea em 5 dias. Tal achado foi verificado ao se comparar a pata direita dos animais do GI-A com a pata direita do GII-A (Tabela 3). Nos animais do GI-A, houve uma média de 3,25 campos de 200 vezes, ao microscópio ótico, na área perimplante, preenchidos com trabéculas neoformadas. Nos animais do GII-A, a média foi de 1,25. Esta diferença foi estatisticamente significativa (Tabela 4). Percebe-se, pois, que houve um claro efeito local positivo do *laser*, acelerando a formação óssea, nas fases precoces do processo de reparo ósseo de áreas perimplante PLLA-PGA. Esses achados vão ao encontro dos estudos de Ozawa *et al.* (1998) e Guzzardella *et al.* (2002), que relataram uma maior formação óssea após a irradiação com *laser* em fases iniciais de culturas celulares. Os trabalhos de Silva Júnior *et al.* (2002) e Akyol e Güngörmüs (2010) também encontraram resultados positivos em 7 e 10 dias de observação.

Nos intervalos de 15 e 30 dias, não houve diferenças estatisticamente significativas entre a quantidade de trabéculas ósseas neoformadas, comparando a pata direita de GI com a pata direita de GII (Tabela 4). Já os estudos de Gerbi *et al.* (2005) Weber *et al.* (2006) e Liu *et al.* (2007) encontraram diferenças estatisticamente significativas na quantidade de tecido ósseo neoformado entre o

grupo irradiado e o controle, em períodos de 15 ou mais dias. Novamente cabe ressaltar que, em todos eles, houve a criação de um defeito ou fratura óssea, no interior dos quais o tecido neoformado seria depositado. Além disso, a densidade de energia do *laser* utilizado, bem como o número de sessões de aplicação e a potência não foram os mesmos desta atual pesquisa. Silva Júnior *et al.* (2002) não encontraram diferenças entre os grupos, em 28 dias.

Com relação à ação do *laser* à distância do ponto de aplicação, foi observado um claro efeito sistêmico positivo na formação óssea perimplante PLLA-PGA, no intervalo de 5 dias. A média de campos de aumento de 200 vezes preenchidos com trabéculas neoformadas foi de 3,00 na pata esquerda do GI-A, contra 1,50 na pata esquerda do GII-A. Essa diferença foi estatisticamente significativa (Tabela 4), revelando que o *laser*, nos parâmetros utilizados, foi capaz de estimular uma maior formação de trabéculas ósseas na área perimplantar, à distância do seu ponto de aplicação, em 5 dias. O *laser* acelerou a formação óssea nas fases iniciais, com efeitos tanto locais quanto sistêmicos. Embora ainda haja controvérsias sobre os possíveis efeitos sistêmicos, alguns estudos mostraram resultados positivos em tecidos moles (ROCHKIND *et al.*, 1989; MESTER e MESTER, 1989; SCHINDL *et al.*, 2002). Rodrigo *et al.* (2009) encontrou um efeito sistêmico apenas com a combinação de *lasers* vermelho e infravermelho, em 3 dias de observação, enquanto Hall *et al.* (1994) relatou que não houve efeitos positivos, locais ou sistêmicos, com o *laser* a uma dose de $1\text{J}/\text{cm}^2$. Novamente se faz necessário ressaltar as diferenças no tocante aos parâmetros da irradiação utilizados.

O efeito sistêmico do *laser* em 5 dias foi quase tão intenso quanto seus efeitos locais. Não houve diferenças estatisticamente significativas com relação à quantidade de trabéculas ósseas neoformadas, entre a pata direita e a esquerda do GI-A (Tabela 5). Tal achado pode estar associado a uma maior liberação de substâncias como fatores de crescimento, citocinas, na circulação, com potencial para estimularem áreas distantes, não irradiadas (KHADRA, 2004).

Analisando os dados constantes na tabela 6, observa-se que a ação do *laser* resultou na aceleração da formação óssea em nível local e sistêmico, em 5 dias, quando comparada ao GII. Já em 15 dias, as médias do GII foram maiores, porém sem diferenças estatisticamente significativas. Além disso, no GI, pata direita, a comparação das médias entre 5, 15 e 30 dias não teve diferenças estatisticamente significativas. Já nos demais subgrupos, houve diferenças estatísticas entre as médias de 5 dias e as de 15 e 30 dias. Assim, o *laser* foi capaz de promover um início mais rápido na formação óssea perimplantar, quando comparado ao grupo controle, em 5 dias.

Em todos os subgrupos de 5 dias e 15 dias, foram observadas quantidades moderadas de osteoblastos na periferia das trabéculas neoformadas, ocupando mais de 2/3 da sua superfície. Essa concentração mostrou-se reduzida nos espécimes de 30 dias (GI-C e GII-C). Nesta fase, o espaço existente entre o osso e o parafuso, criado durante a fresagem, pela ação da broca e pela própria necrose superficial do osso superficial, estava preenchido, já em grande porcentagem, pelo osso neoformado, em fases avançadas de maturação. Assim, é de se esperar que as concentrações de osteoblastos estivessem reduzidas em 30 dias. Ozawa *et al.*

(1998) encontraram uma estimulação da proliferação celular em culturas de 6 e 9 dias, irradiadas com *laser* infravermelho. Além disso, os autores relataram um pico de concentração de atividade da fosfatase alcalina, marcador da diferenciação de osteoblastos, em 18 dias. Guzzardella *et al.* (2002) encontraram resultados similares, com aumento da fosfatase alcalina e proteínas totais ao longo do experimento.

A formação óssea investigada no presente estudo refere-se à atividade inicial de reparo ósseo, que se segue ao trauma cirúrgico. Durante o procedimento cirúrgico, criou-se uma perfuração para que o parafuso fosse instalado. Este, porém, foi colocado de forma extremamente passiva, sem travamento importante, conforme preconiza sua técnica de instalação. Isso indica que permaneceu um espaço entre o biomaterial e o osso, o qual foi preenchido pelo tecido ósseo neoformado. O processo de bioabsorção dos copolímeros PLLA-PGA segue uma média de 12 meses e sua substituição por tecido ósseo se completa em 15 meses (HOCHULI-VIEIRA *et al.*, 2005; MANUAL DO FABRICANTE, 2011). As reações de hidrólise e a ação fagocitária não foram observadas no intervalo estudado. Ao longo do período observado, não houve degradação do parafuso PLLA-PGA. Isso porque as alterações morfológicas do biomaterial tornam-se perceptíveis a partir de 60 dias (SUURONEN *et al.*, 1998; BÄHR *et al.*, 1999, MOLLAOGLU *et al.*, 2003). Hochuli-Vieira *et al.* (2005), no entanto, relataram início de degradação de parafusos LactoSorb® em 30 e 60 dias, com um revestimento de tecido conjuntivo fibroso e algumas células fagocitárias adjacentes.

Outro aspecto a ser discutido é a similaridade dos resultados observada no grupo controle. As tíbias direita e esquerda de GII receberam um parafuso PLLA-PGA cada, sem irradiação, com o propósito de padronizar o experimento e expor todos os animais ao mesmo estresse cirúrgico. A metodologia se mostrou válida na medida em que não se percebeu nenhuma disparidade dos achados, dentro dos tempos observados.



Conclusão

7 CONCLUSÃO

- A LLLT (Arseneto de Gálio e Alumínio, $\lambda = 830\text{nm}$, $4\text{J}/\text{cm}^2$, 100mW) apresentou um efeito local positivo na neoformação óssea perimplantar (parafusos PLLA-PGA) em tíbias de coelhos, aumentando a quantidade de trabéculas ósseas em 5 dias, quando comparada a do grupo controle.
- A LLLT foi também capaz de promover um efeito sistêmico, acelerando a formação óssea na pata contralateral de coelhos irradiados com o *laser* infravermelho, em 5 dias, quando comparada a do grupo controle.
- O efeito sistêmico da LLLT foi quase tão intenso quanto o efeito no local de aplicação, quanto à capacidade de promover formação óssea perimplantar a parafusos PLLA-PGA em 5 dias, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre ambos.
- A LLLT promoveu uma formação óssea acelerada, com trabéculas ósseas neoformadas apresentando uma maior dimensão e distribuição que as do grupo controle, no intervalo inicial de 5 dias.



Referências

REFERÊNCIAS³

ABOELSAAD, N. S. *et al.* Effect of soft laser and bioactive glass on bone regeneration in the treatment of infra-bony defects (a clinical study). **Lasers Med Sci**, v.24, p.387-395, 2009.

AHMAD, N.; LYLES, J.; PANCHAL, J. Outcomes and complications based on experience with resorbable plates in pediatric craniosynostosis patients. **J Craniofac Surg**, v.19, n.3, p.855-860, May 2008.

AKYOL, U. K.; GÜNGÖRMÜS, M. Effect of biostimulation on healing of bone defects in diabetic rats. **Photomed Laser Surg**, v.28, n.3, p.411-416, 2010.

ALMEIDA-LOPES, L. Análise *in vitro* da proliferação celular de fibroblastos da gengiva humana tratados com laser de baixa intensidade utilizando diferentes parâmetros de irradiação. 165p. **Tese (doutorado)** – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

ANGELETTI, P. *et al.* Effect of low level laser therapy (GaAlAs) on bone regeneration in midpalatal anterior suture after surgically assisted rapid maxillary expansion. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod**, v.109, p.e38-e46, 2010.

BÄHR, W. *et al.* Biodegradable osteosynthesis material for stabilization of midface fractures: experimental investigation in sheep. **J Cranio-Maxillofac Surg**, v.27, p.51-57, 1999.

BARUSHKA, O.; YAAKOBI, T.; ORON, U. Effect of low-energy laser (He-Ne) irradiation on the process of bone repair in the rat tibia. **Bone**, v.16, n.1, p.47-55, Jan. 1995.

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

BELKIN, M.; SCHWARTZ, M. New biological phenomena associated with Laser radiation. **Health Phys**, New, York, v. 56, n. 5, p. 687-690, May 1989.

BERGSMA, E. J. *et al.* Foreign body reactions to resorbable poly (L-lactide) bone plates and screws used for the fixation of unstable zygomatic fractures. **J Oral Maxillofac Surg**, v.51, n.6, p.666-670, Jun. 1993.

BLAYA, D. S. *et al.* Histological study of the effect of laser therapy on bone repair. **J Contemp Dent Pract**, v.9, n.6, Sept. 2008.

BRUGNERA JÚNIOR, A. *et al.* **Atlas de laserterapia aplicada à clínica odontológica**. São Paulo: Santos, 2003, 119p.

CAMPANHA, B. P. *et al.* Low-level laser therapy for implants without initial stability. **Photomed Laser Surg**, v.28, n.3, p.365-369, 2010.

³ Referências conforme ABNT – NBR 6023 de agosto de 2002.

CAMPBELL, D. T.; STANLEY, J. C. **Delineamentos experimentais e quase experimentais de pesquisa**. São Paulo: Ed. Pedagógica e Universitária, 1979.

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**, v.22, n.2, p.92-97, 2007.

CHACON, G. E. *et al.* Using resorbable screws for fixation of cortical onlay bone grafts: an in vivo study in rabbits. **J Oral Maxillofac Surg**, v.62, p.1396-1402, 2004.

CILASUN, U. *et al.* Immediate mechanical stability of sagittal split ramus osteotomy fixed with resorbable compared with titanium bicortical screws in mandibles of sheep. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v.44, p.534-537, 2006.

DOHL, W., *et al.* Comparison of titanium and resorbable copolymer fixation after maxillary impaction. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v.134, n.1, p.67-73, 2008

EDWARDS, R. C.; KIELY, K. D.; EPPLEY, B. L. The fate of resorbable poly-L-lactic / polyglycolic acid (LactoSorb) bone fixation devices in orthognathic surgery. **J Oral Maxillofac Surg**, v.59, p.19-25, 2001.

EPPLEY, B. L.; SADOVE, M. D. A comparison of resorbable and metallic fixation in healing of calvarial bone grafts. **Plast Reconstr Surg**, v.96, n.2, p.316-322, Aug. 1995.

FERRETTI, C. A prospective trial of poly-L-lactic/polyglycolic acid co-polymer plates and screws for internal fixation of mandibular fractures. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v.37, n.3, p.242-248, Mar. 2008.

FREDDO, A. L. *et al.* Effect of low-level laser therapy after implantation of poly-L-lactic/polyglycolic acid in the femurs of rats. **Lasers Med Sci**, v.24, p.721-728, 2009.

GENOVESE, W. J. Laser de baixa intensidade: aplicações terapêuticas em odontologia. São Paulo: Santos; 2007. 130p.

GERBI, M. E. M *et al.* Assessment of bone repair associated with the use of organic bovine bone and membrane irradiated at 830 nm. **Photomed Laser Surg**, v.23, n.4, p.382-388, 2005.

GETTER, L. *et al.* A biodegradable intraosseous appliance in the treatment of mandibular fractures. **J Oral Surg**, v.30, n.5, p.344-348, May 1972.

GUZZARDELLA, G. A. *et al.* Laser stimulation on bone defect healing: an in vitro study. **Lasers Med Sci**, v.17, p.216-220, 2002.

HALL, G. *et al.* Effect of low level energy Laser irradiation on wound healing. An experimental study in rats. **Swedish Dental Journal**, Stocholm, v.18, n.1, p.29-34, 1994.

HOCHULI-VIEIRA, E. *et al.* Rigid internal fixation with titanium versus bioresorbable miniplates in the repair of mandibular fractures in rabbits. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v.34, n.2, p.167-173, Mar. 2005.

HÜBLER, R. *et al.* Effects of low-level laser therapy on bone formed after distraction osteogenesis. **Lasers Med Sci**, v.25, p.213-219, 2010.

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 9ª Ed. São Paulo: Guanabara Koogan; 2004. 433p.

KARU, T. I. Photobiology of low-power laser effects. **Health Phys**, v.56, n.5, p.691-701, May 1989.

KHADRA, M. *et al.*, Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy. **Oral Surg Oral Med Oral Path Oral Rad Endod**, Saint Louis, v. 97, p. 693-700, 2004.

LIU, X. *et al.* Effect of lower-level laser therapy on rabbit tibial fracture. **Photomed Laser Surg**, v.25, n.6, p.487-494, 2007.

LUGER, E. J. Effect of low-power irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. **Laser Surg Med**, v.22, n.2, p.97-102, 1998.

MANUAL DO FABRICANTE Disponível em:
<http://www.lorenzurgical.com/product.php?cat=5&item=17>. Acesso em: 07 de março de 2011.

MESTER, A. F; MESTER, A. Wound healing. **Laser Therapy**, v.1, n.1, p.7, 1989.

MOLLAOGLU, N. *et al.* The early tissue response to titanium and LactoSorb screws. **Dental Traumatol**, v.19, p.139-144, 2003.

NICOLAU, R.A. *et al.* Effect of low-power GaAlAs laser (660nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. **Lasers Med Sci**, London, v.18, n.2, p.89-94, May 2003.

OTREMSKI I, *et al.* Does laser irradiation effect fracture healing? **Med Laser Appl**, v.19, n.4, p.146-149, 2004.

OZAWA, Y. *et al.* Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. **Bone**, v.22, n.4, p.347-354, Apr. 1998.

PELTONIEME, H. H. *et al.* SR-PLLA and SR PGA miniscrews: biodegradation and tissue reactions in the calvarium and dura-mater. **J Craniomaxillofac Surg**, v.27, n.1, p.42-50, Feb. 1999.

PINHEIRO, A.L.B.; GERBI, M.E. Photoengineering of bone repair processes. **Photomed Laser Surg**, v.24, n.2, p.169-178, 2006.

POLIMENI, G. Histopathological observations of a polylactic acid-based device intended for guided bone/tissue regeneration. **Clin Implant Dent Relat Res**, v.10, n.2, p.99-105, May 2008.

ROCHKIND, S. *et al.* Systemic effects of Low-Power Laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds, and burns. **Lasers Surg Med**, v.9, p.174-182, 1989.

RODRIGO, S. M. *et al.* Analysis of the systemic effect of red and infrared laser therapy on wound repair. **Photomed Laser Surg**, v.27, n.6, p.929-935, 2009.

SANGER, C. *et al.* Maximizing results in craniofacial surgery with bioresorbable fixation devices. **J Craniofac Surg**, v.18, n.4, p.926-930, Jul. 2007.

SCHINDL, A. *et al.* Systemic effects of low-intensity Laser irradiation on skin microcirculation in patients with diabetic microangiopathy. **Microvascular Research**, v.64, p.240-246, 2002.

SHAKOURI, S. K. *et al.* Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process. **Lasers Med Sci**, v.25, p.73-77, 2010.

SILVA JÚNIOR, A. N. *et al.* Computerized morphometric assessment of the effect of low-level laser therapy on bone repair: an experimental animal study. **J Clin Laser Med Surg**, v.20, n.2, p.83-87, 2002.

SUURONEN, R. *et al.* A 5-year *in vitro* and *in vivo* study of the biodegradation of polylactide plates. **J Oral Maxillofac Surg**, v.56, n.5, p.604-614, May 1998.

TAKEDA, Y. Irradiation effect of low-energy laser on alveolar bone after tooth extraction: experimental study in rats. **Int J of Oral and Maxillofac Surg**, v.17, n.6, p.388-391, 1988.

TAVANO, O.; PAVAN, A. J.; GUIMARÃES, S. A. C. Estudo da densidade radiográfica digital do tecido ósseo face ao implante do polímero de mamona em coelhos. **Rev Fac Odontol Bauru**, v.7, n.3, p.53-58, jul/dez 1999.

THALLER, S. R.; MOORE, C.; TESLUK, H. Biodegradable polyglyconate plates and screws: a histological evaluation in rabbit model. **J Craniofac Surg**, v.6, n.4, p.282-287, Jul. 1995.

THIELE, A. *et al.* Foreign body reaction to materials implanted as biocompatible for internal fixation. **HNO**, v.56, n.5, p.545-548, Feb. 2008.

TÖRMÄLÄ, P.; POHJENEN, T.; ROKKANEN, P. Bioabsorbable polymers: materials technology and surgical applications. **Proc Inst Mech Eng**, v.212, n.2, p.101-111, Jun. 1998.

WEBER, J.B.B. *et al.* Laser therapy improves healing of bone defects submitted to autologous bone graft. **Photomed Laser Surg**, v.24, n.1, p.38-44, 2006.



Apêndices

APÊNDICE A – Ficha de Controle dos Procedimentos Cirúrgicos

GRUPO	COELHO	DIAS	CIRURGIA	EUTANÁSIA	OBSERVAÇÃO
GI-A	A	5	10/fev	15/fev	
GI-A	R	5	16/fev	21/fev	
GI-A	S	5	18/fev	23/fev	
GI-A	T	5	17/fev	22/fev	
GI-B	D	15	14/fev	01/mar	
GI-B	M	15	15/fev	02/mar	
GI-B	P	15	16/fev	03/mar	Deiscência de sutura ao 3º DPO. Aspecto adequado ao 8º DPO.
GI-B	Q	15	17/fev	04/mar	
GI-C	B	30	10/fev	12/mar	
GI-C	G	30	15/fev	17/mar	
GI-C	H	30	15/fev	17/mar	
GI-C	K	30	14/fev	16/mar	
GII-A	U	5	18/fev	23/mar	
GII-A	V	5	10/fev	15/mar	
GII-A	X	5	17/fev	22/mar	
GII-A	Z	5	14/fev	19/fev	
GII-B	C	15	14/fev	01/mar	
GII-B	E	15	15/fev	02/mar	
GII-B	N	15	17/fev	04/mar	
GII-B	O	15	15/fev	02/mar	
GII-C	F	30	15/fev	17/mar	
GII-C	I	30	14/fev	16/mar	
GII-C	J	30	17/fev	19/mar	
GII-C	L	30	14/fev	16/mar	

APÊNDICE B – Ficha de Análise – Escore Histológico da Formação Óssea

GRUPO	COELHO	PATA	Nº DE CAMPOS	OBSERVAÇÃO
GI-A	A	D	4	
GI-A	A	E	3	
GI-A	R	D	3	
GI-A	R	E	<i>Perdido</i>	Durante o preparo histológico
GI-A	S	D	2	
GI-A	S	E	3	
GI-A	T	D	4	
GI-A	T	E	3	
GII-A	U	D	1	
GII-A	U	E	1	
GII-A	V	D	2	
GII-A	V	E	1	
GII-A	X	D	1	
GII-A	X	E	2	
GII-A	Z	D	1	
GII-A	Z	E	2	
GI-B	D	D	5	
GI-B	D	E	4	
GI-B	M	D	4	
GI-B	M	E	6	
GI-B	P	D	6	
GI-B	P	E	7	
GI-B	Q	D	6	
GI-B	Q	E	7	
GII-B	C	D	<i>Perdido</i>	Durante o preparo histológico
GII-B	C	E	<i>Perdido</i>	Durante o preparo histológico
GII-B	E	D	8	
GII-B	E	E	7	
GII-B	N	D	7	
GII-B	N	E	6	
GII-B	O	D	4	
GII-B	O	E	7	
GI-C	B	D	3	
GI-C	B	E	8	
GI-C	G	D	4	
GI-C	G	E	5	
GI-C	H	D	4	
GI-C	H	E	8	
GI-C	K	D	7	
GI-C	K	E	7	
GII-C	F	D	<i>Perdido</i>	Durante o preparo histológico
GII-C	F	E	<i>Perdido</i>	Durante o preparo histológico
GII-C	I	D	4	
GII-C	I	E	7	
GII-C	J	D	4	
GII-C	J	E	5	
GII-C	L	D	5	
GII-C	L	E	5	



Anexos

ANEXO A - Protocolo da Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS.



*Comissão Científica e de Ética
Faculdade da Odontologia da PUCRS*

Porto Alegre 24 de Novembro de 2010

O Projeto de: Dissertação

Protocolado sob nº: 0083/10
Intitulado: Efeitos da bioabsorção de parafusos PLLA-PGA e da biomodulação da LLLT em tecidos periimplantares
Pesquisador Responsável: Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber
Pesquisadores Associados Rodrigo Carvalho Pinto Coelho; Marília Gerhardt de Oliveira; Rogério Miranda Pagnoncelli
Nível: Dissertação / Mestrado

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 24 de Novembro de 2010.

Este projeto deverá ser imediatamente encaminhado ao CEUA/PUCRS

Profa. Dra. Ana Maria Spohr
Presidente da Comissão Científica e de Ética da
Faculdade de Odontologia da PUCRS

**ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética para o Uso de Animais –
CEUA.**



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS

Ofício 028/11 – CEUA

Porto Alegre, 26 de janeiro de 2011.

Senhor Pesquisador:

O Comitê de Ética para o Uso de Animais apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 10/00218, intitulado: **“Efeitos da bioabsorção de parafusos PLLA-PGA e da biomodulação da LLLT em tecidos periimplantares”**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Paulo Márcio C. Pitrez
Coordenador-Adjunto do CEUA/PUCRS

Ilmo. Sr.
Prof. João Batista Blessmann Weber
Faculdade de Odontologia
N/Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60, sala 314
CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: ceua@pucrs.br