

Lênilson Gaião de Melo

**ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO EFEITO DO LLLT NO TECIDO ÓSSEO
NEOFORMADO POR DISTRAÇÃO OSTEOGÊNICA COM ENSAIOS
PRELIMINARES DE FLUORESCÊNCIA E DIFRAÇÃO DE RAIOS X**

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

ORIENTADORA

Prof^ª. Dr^ª. Marília Gerhardt de Oliveira

CO-ORIENTADOR

Prof. Dr. Roberto Hübler

Porto Alegre, 2008

À **Aracelly Xavier**, minha esposa, pela amizade, companheirismo, ajuda e incentivo.

Aos meus pais, **Nilson e Lia**, e ao meu irmão **Lydnilson**, pelos esforços e incentivo à minha formação acadêmica, e por compreenderem minha vocação profissional.

À **Maria Clara**, minha sobrinha, a mais nova esperança da nossa família.

Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

À **Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul**, representada pelo **Prof. Dr. Joaquim Clotet**, a quem presto minha admiração pela capacidade de condução desta universidade.

À **Faculdade de Odontologia da PUCRS**, dirigida pelo **Prof. Dr. Marcos Túlio Mazzini de Carvalho**, meu respeito pelo trabalho nesta faculdade.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia**, coordenado pelo **Prof. Dr. José Antonio Poli de Figueiredo**, pela seriedade na condução deste programa.

À **Profa. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira**, minha orientadora, pelo apoio, oportunidade, companheirismo e disponibilidade desde meu estágio no Hospital Cristo Redentor, no curso de mestrado e, agora, de doutorado, demonstrando-me princípios docentes, profissionais e pessoais. Valeu, Doutora!

Ao **Prof. Dr. Roberto Hübler**, meu co-orientador, pelo incentivo e empolgação na execução deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho**, pelo apoio na preparação e interpretação das lâminas histológicas.

À **Profa. Dra. Cristina Xavier**, pelo auxílio e disponibilidade na viabilização das cirurgias no Hospital da Medicina-Veterinária da Universidade Federal de Pelotas.

Às **Médicas-Veterinárias Dra. Luisa Maria Braga**, da FEPPS; e **Dra. Isabel Pereira**, da UFPel, pelo auxílio no estabelecimento de protocolos medicamentosos e pelo cuidado no bem-estar dos coelhos durante o experimento.

Ao **Dr. Eduardo Blando**, pela dedicação na realização das análises físicas e pela paciência na explicação preliminar dos resultados.

Aos colegas **Letícia Post, Paulo Kreisner e Marconi Maciel**, pela parceria no planejamento e execução das etapas experimentais deste trabalho.

Aos colegas, **André, Alexandre e Renata**, pelo auxílio bem-divertido e responsável nos laboratórios do Gepsi.

Aos professores da Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, **Dr. Cláiton Heitz, Dra. Daniela Nascimento, Dra. Maria Marta Campos, Dra. Marília Gerhardt de Oliveira, Dr. Rogério Belle e Dr. Rogério Pagnoncelli**, pela oportunidade de aprendizagem, pelo incentivo e confiança.

Aos amigos **Aline Tempel, Diego Blaya, Livia Prates e Marcela Cancino**, pelos exemplos pessoal e profissional, incentivo e parceria.

Aos colegas de turma **André, Hedelson, Paulo, Roger, Taiane e Vinicius**, pelo convívio nas aulas.

Aos funcionários **Ana, Carlos, Davenir, Luíza e Marcos**, pela acolhida durante minha formação.

Arriscar o certo pelo incerto para ir atrás de um sonho...

Pablo Neruda

RESUMO

Esta pesquisa objetivou avaliar a ação do *laser* de baixa potência (LLLT) no percentual de osso neoformado, na composição química, na cristalinidade e na estrutura cristalina do sítio da distração osteogênica (DO). Quinze coelhos foram submetidos à DO (protocolo: latência – três dias, ativação – sete dias 0,7mm/d e consolidação – 10 dias). Foi empregado o LLLT de AsGaAl (830 nm, 40 mW) com o seguinte protocolo: dose pontual de 10 J/cm² diretamente sobre o sítio ósseo submetido à DO, no período de consolidação óssea, respeitando-se intervalos de 48 horas. As amostras foram coletadas no final da consolidação, 10 (seis com LLLT) delas foram analisadas por microscopia óptica, para mensuração do percentual de osso neoformado e seis (três com LLLT, um desses foi excluído por haver união precoce dos fragmentos e outro por ocorrer fratura da peça na dissecação) foram analisadas por fluorescência e difração por raios X, a fim de ser analisada a composição química, a cristalinidade e a estrutura cristalina do sítio da DO. O percentual do osso neoformado foi maior no grupo com LLLT (57,89%) do que no controle (46,75%), $p=0,006$. A composição química revelou, a partir das razões de Ca e P, uma mineralização maior no grupo com LLLT. Os percentuais de cristalinidade indicaram maiores percentuais cristalinos nos coelhos com LLLT. As amostras indicaram semelhança da estrutura cristalina com as hidroxiapatitas, a partir dos difratogramas obtidos. Concluiu-se que o LLLT apresentou efeito positivo no percentual de osso neoformado, na composição química e na cristalinidade do sítio da DO. Ocorreu regeneração no sítio da DO, comprovada pela identificação da hidroxiapatita na estrutura cristalina.

Palavras-chave: Osteogênese por distração. *Lasers*. Análises Físicas.

ABSTRACT

This study evaluated the effect of low level laser therapy (LLLT) on the percentage of new bone formation and on the chemical composition, crystallinity and crystalline structure at the site of distraction osteogenesis (DO). Fifteen rabbits underwent DO (latency: 3 days; activation: 7 days at 0.7 mm/day; consolidation: 10 days). LLLT was performed with 10 J/cm² AsGaAl (830 nm, 40 mW) laser irradiations applied directly to the site that underwent DO at 48-hour intervals during bone consolidation. Specimens were collected after consolidation; 10 specimens, 6 of which received LLLT, were analyzed using light microscopy to measure the percentage of new bone formation, and six, 3 of which were treated with LLLT (one excluded due to early fragment union and another due fracture of specimen after dissection) were analyzed using fluorescence and X-ray diffraction to analyze chemical composition, crystallinity and crystalline structure at the DO site. The percentage of new bone formation was greater in the LLLT group (57.89%) than in the control group (46.75%) ($p=0.006$). The analysis of chemical composition and of Ca and P ratios showed greater mineralization in the LLLT group. Crystallinity percentages were greater in rabbits in the LLLT group. Diffractograms showed that crystalline structures were similar to hydroxyapatite. Results showed that LLLT had a positive effect on the percentage of new bone formation and on the chemical composition and crystallinity of the DO site. The DO site regeneration was confirmed by the detection of hydroxyapatite in the crystalline structure.

Keywords: Distraction Osteogenesis. Lasers. Physical analysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Desenho esquemático da detecção de XRF.	29
Figura 2. Desenho esquemático da detecção de XRD.	31
Figura 3. Animal com tricotomia e anti-sepsia realizadas.	34
Figura 4. Exposição do corpo mandibular direito.	35
Figura 5. Corticotomia vestibular.	36
Figura 6. Distrator osteogênico instalado.	37
Figura 7. Sutura.	37
Figura 8. Colar protetor utilizado no piloto, mas dispensado nos animais do experimento.	38
Quadro 1. Distribuição dos grupos experimentais e controles.	39
Figura 9. Cortes realizados para a análise microscópica: a. Corte lateral; b. Corte médio; c. Corte medial.	41
Figura 10. Exemplo de mensuração do osso neoformado, com emprego da ferramenta de mensuração de área no programa Imagetool®.	42
Figura 11. Resultado estatístico do teste de correlação intraclasse.	43
Figura 12. Área submetida ao lixamento e ao polimento.	44
Figura 13. Amostra incluída em resina acrílica após lixamento e polimento.	45
Figura 14. Pontos de medida na técnica do XRF no sítio da do, seguindo o vetor de alongamento do distrator.	46
Figura 15. O segmento entre a e b foi utilizado no XRD. A. Corte anterior; b. Corte médio.	46
Figura 16. Equipamento para a técnica de XRD empregado.	47
Tabela 1. Distribuição do número de unidades experimentais obtidas por animal.	49
Tabela 2. Distribuição das médias encontradas por animal.	50
Figura 17. Microscopia óptica de ue de coelho irradiado com LLLT (grupo experimental). As setas indicam áreas de neoformação óssea no sítio da DO.	51
Figura 18. Microscopia óptica de ue de coelho não-irradiado com LLLT (grupo controle). As setas indicam áreas de neoformação óssea no sítio da DO.	51

Figura 19. Exemplo da detecção dos fótons emitidos de $pk\alpha$ e $pk\beta$ do cálcio em uma amostra.	53
Gráfico 1. Percentuais de Ca e P encontrados nos espécimes que foram submetidas à DO, empregando a XRF (coelho 1 – com LLLT; coelho 2 – sem LLLT).	54
Gráfico 2. Percentuais ca e p encontrados nos espécimes que não foram submetidas à DO, empregando a XRF (coelho 3 – com LLLT; coelho 4 – sem LLLT).	54
Tabela 3. Média das razões entre Ca e P encontradas, por coelho.	55
Figura 20. Difratoograma do coelho 1.	56
Gráfico 3. Percentuais cristalinos e amorfos encontrados.	57

LISTA DE SIGLAS

FEPPS – Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde

FO – Faculdade de Odontologia

PUCRS – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

UFPel – Universidade Federal de Pelotas

LISTA DE ABREVIATURAS

ArGaAl – Arseneto de Gálio Alumínio

cm – centímetro

cm² – centímetro quadrado

d – dia

DO – Distração osteogênica

h – hora

HA – hidroxiapatita

HE – Hematoxilina/Eosina

J – Joules

kg – kilograma

kV – kilovolts

LLLT – Low Level Laser Therapy (Laserterapia de baixa potência)

µm – micrometro

mA – miliampere

mg – miligrama

mm – milímetro

mW – miliwatts

nm – nanômetro

ONF – osso neoformado

ppm – partes por milhão

UE – unidade experimental

XRD – Difração de Raios X

XRF – Fluorescência de Raios X

LISTA DE SÍMBOLOS

% - por cento

C – Carbono

U – Urânio

Ca – Cálcio

P – Fósforo

n^o. – número

® – marca registrada

° – graus

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	8
LISTA DE SIGLAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS	11
LISTA DE SÍMBOLOS	12
SUMÁRIO	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISTA DE LITERATURA	18
2.1 Bases biológicas da distração osteogênica	18
2.2 Ensaios clínicos	22
2.3 Ação do LLLT no tecido ósseo.....	26
2.4 Análises físicas	28
2.4.1 Espectroscopia por Fluorescência de Raios X (XRF)	28
2.4.2 Espectroscopia por difração de raios X (XRD)	30
3 Metodologia	32
3.1 Caracterização.....	32
3.2 Definição das variáveis	32
3.2.1 Variável independente	32
3.2.2 Variáveis dependentes	32
3.3 Problema	32
3.4 Hipótese.....	32

3.5	<i>Amostra</i>	32
3.6	<i>Etapas técnicas da pesquisa</i>	33
3.6.1	Seqüência cirúrgica	33
3.6.2	Período pós-operatório	38
3.6.3	Grupos	39
3.6.4	Irradiação com o LLLT	40
3.6.5	Morte dos animais	41
3.7	<i>Preparação das amostras</i>	41
3.7.1	Análise histológica	41
3.7.2	Análises físicas	43
3.7.3	Espectroscopia por fluorescência de raios X (XRF)	44
3.7.4	Espectroscopia por difração de raios X (XRD)	46
3.8	<i>Análise Estatística</i>	48
4	<i>RESULTADOS E DISCUSSÃO</i>	49
4.1	<i>Análise histológica</i>	49
4.2	<i>Análises físicas</i>	53
4.2.1	Espectroscopia por fluorescência de raios X (XRF)	53
4.2.2	Espectroscopia por difração de raios X (XRD)	56
5	<i>CONCLUSÕES</i>	61
6	<i>REFERÊNCIAS</i>	62

ANEXO A – Aprovação do Projeto pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

ANEXO B – Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

ANEXO C – Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Experimentação da Universidade Federal de Pelotas.

1 INTRODUÇÃO

Pacientes portadores de deformidades dentofaciais apresentam limitações funcionais e estéticas que afetam seu convívio social. A abordagem desses indivíduos requer aprimoramento constante das técnicas, biomateriais, equipamentos e protocolos empregados, visando a resultados mais satisfatórios com redução da morbidade, relacionada com o constante emprego de enxertos ósseos, oriundos de outros sítios do organismo.

A distração osteogênica (DO) sedimenta-se nas últimas duas décadas como alternativa terapêutica eficaz ao emprego de enxertos ósseos, no tratamento de sujeitos com variadas deformidades dentofaciais, congênicas ou adquiridas. Consiste no emprego de dispositivos distratores implantados em sítios ósseos adjacentes e independentes visando ao seu afastamento, com conseqüente osteogênese entre os mesmos. Após o período de afastamento necessário para reparar o defeito, o distrator osteogênico é mantido sem ativação até ocorrer a mineralização do tecido osteóide interposto, quando deve ser removido.

Em decorrência do tempo de maturação óssea exigido para remoção do distrator, o processo da DO pode gerar desconforto no paciente, levando alguns autores a procurar soluções para acelerar a mineralização do sítio ósseo neoformado.

Como a DO envolve atividades metabólicas passíveis de modulação, por influência de agentes físicos e químicos, o uso do *laser* de baixa intensidade (LLLT) pode reduzir o tempo global de tratamento e proporcionar, assim, maior conforto aos pacientes. O uso do LLLT demonstrou algum grau de benefício no processo reparacional em tecidos moles e ósseos (KAWASAKI; SHIMIZU, 2000; SILVA JUNIOR *et al.*, 2002; WEBER *et al.*, 2006; CERQUEIRA *et al.*, 2007; BLAYA *et al.*, 2008).

Estudos avaliativos do tecido ósseo podem empregar diversos testes que diferem pela sua acurácia e complexidade de execução, a fim de determinar as diferenças quantitativas e qualitativas do tecido ósseo entre os grupos estudados. Outro fator de diferenciação importante é quão independente o teste do

operador/avaliador é, visto a influência que este exerce em relação ao seu objeto de estudo.

A análise histológica com coloração de hematoxilina/eosina (HE) constitui-se em um teste amplamente empregado para avaliação de alterações em tecido ósseo. Outras colorações também são utilizadas com o mesmo objetivo, com método de execução e análise semelhantes.

As espectroscopias por fluorescência e difração de raios X (XRF e XRD) são análises físicas que envolvem equipamentos de alta tecnologia. Já estão disponíveis em alguns laboratórios brasileiros e são empregadas na caracterização de diversos materiais na indústria. Entretanto, podem ser aplicadas no estudo do tecido ósseo, com possibilidade de gerar dados relativos à suas características minerais como tipo de cristal (estrutura cristalina), a perfeição destes cristais (cristalinidade), seu conteúdo mineral (quantidade de cálcio, fósforo e outros elementos químicos). Nestes testes, que são operadores-independentes, há a chamada estatística de medida, em que a medida de cada ponto tem acurácia de 1 a 100 partes por milhão (ppm), o que elimina alguns dos vieses relacionados à coleta de dados.

Estas características minerais do tecido ósseo no sítio da DO ainda não foram documentadas na literatura. Como a DO engloba a formação óssea desde os estágios iniciais até seu amadurecimento, suas características minerais são passíveis de se apresentar de forma alterada. Assim, as análises físicas podem ser úteis na identificação destas possíveis alterações, permitindo o surgimento de protocolos inovadores mais precisos na análise de alterações do metabolismo ósseo.

Assim, com o emprego de análises histomorfométrica e físicas, este trabalho objetivou:

- avaliar a ação do LLLT no percentual de osso neoformado no sítio da DO, empregando a histomorfometria;
- analisar a ação do LLLT na composição química da superfície do sítio da DO, por intermédio da espectroscopia por XRF;
- determinar a estrutura cristalina do sítio da DO, através da espectroscopia por XRD;

- avaliar a ação do LLLT na cristalinidade do sítio da DO, através da espectroscopia por XRD.

2 REVISTA DE LITERATURA

2.1 Bases biológicas da distração osteogênica

Há alguns relatos sobre DO em ossos longos do início do século XX, mas Snyder *et al.* (1973) foram os pioneiros na utilização da técnica no esqueleto facial de animais. Criaram um defeito mandibular de 15 mm em um cão, incluindo mucosa e osso, deixando o animal em uma oclusão classe II. Instalaram um distrator externo e, com um protocolo de 1mm/d, durante 14 dias, foi possível devolver-lhe a oclusão normal. Consideraram bem-sucedido o procedimento por meio de avaliações clínicas e radiográficas quando da consolidação óssea conseguida ao final de seis semanas.

Michieli e Miotti (1977) também utilizaram dois cães, os quais sofreram DO mandibular, por meio de um aparelho dentossuportado, em um ritmo de 1mm/2d. Com a avaliação histológica sob luz polarizada, observaram a deposição de fibras colágenas, com conseqüente evolução para osso secundário. Os resultados satisfatórios levaram os autores a propor uma técnica cirúrgica para a correção de pacientes com deformidade classe II tipo I.

Os estudos de Gavriil Ilizarov, publicados em 1989, são um verdadeiro divisor de águas na evolução, difusão e sedimentação da DO. Por este motivo, o autor é considerado o “Pai da Distração Osteogênica” (CERQUEIRA *et al.*, 2007). São dois experimentos principais que embasaram a técnica (ILIZAROV, 1989_A e 1989_B). Sempre utilizando tibia de cães, Ilizarov avaliou diversas variáveis e observou a sua interferência no processo de neoformação óssea.

As conclusões destes estudos foram: 1. quanto mais rígida a fixação e quanto mais preservadas forem as estruturas de aportes sanguíneo e celular, com mínima lesão do perióstio e do endóstio, maior será o potencial osteogênico; 2. com o ritmo de ativação superior a 1,5 mm/d, formou-se tecido osteóide; 3. nos casos com lesão da medular óssea, formou-se tecido necrótico; 4. a decorticalização parcial ou total não interfere na recorticalização do segmento ósseo alongado; 5. o ritmo de 1mm/d de ativação apresentou-se bem-tolerado, sem que houvesse união precoce; 6. a osteogênese ocorreu mais rapidamente na medida em que a freqüência de ativações aumentava.

O período de latência tem sido alvo de investigação para a redução no tempo de tratamento. Tavakoli *et al.* (1998), com o objetivo de determinar a necessidade do período de latência na região maxilofacial, utilizaram 22 ovelhas, sendo quatro do grupo controle, o qual não sofreu alongamento, e as restantes divididas em três grupos experimentais (Grupo 1: ativação no transoperatório, Grupo 2: quatro dias de latência e Grupo 3: sete dias de latência). Foi realizado o protocolo da DO bilateralmente no corpo mandibular para avanço da região mental. Os resultados da análise biomecânica revelaram uma diferença estatística significativa em carga máxima e de dureza entre o grupo experimental e o controle, sendo o último mais forte. Não foi verificada diferença significativa entre os grupos experimentais. Também não houve diferença entre os grupos experimentais quanto às características histológicas, às propriedades biomecânicas e à densidade óssea do sítio da DO.

A redução no tempo de tratamento na DO, com o aumento no ritmo de ativação, também é motivo de preocupação entre alguns pesquisadores. No entanto, corroborando com os estudos de Ilizarov (1989_A e 1989_B), ritmos de ativação superiores a 1mm/d, evoluem para pseudo-artroses, sítios ósseos com deposição de colágeno de forma desordenada sem nenhum foco de mineralização ou uniões fibrosas.

Assim, os estudos visando reduzir o período da DO empregaram outras variáveis independentes no período de ativação, além do aumento do ritmo de ativação diária.

Hagiwara e Bell (2000), durante a fase de ativação, buscaram acelerar a deposição de matriz óssea, em mandíbula de coelhos, por meio de estimulação elétrica. Com um cátodo posicionado no pino de fixação anterior e o ânodo no pino posterior, uma corrente contínua de 10 μ A foi mantida durante o período de ativação. A formação de osso na região do alongamento foi avaliada por radiografias, porcentagem de densidade mineral utilizando DEXA (*Dual Energy X-ray Absorptiometry*), análise microscópica e histomorfometria. A formação óssea nos estágios iniciais do período de maturação óssea (20 dias após o final da ativação) apresentou-se marcante no grupo experimental.

El-Hakim *et al.* (2004) também analisaram a estimulação elétrica nas diferentes fases da DO, empregando ovelhas submetidas à DO em região de sínfise mandibular, no protocolo de 1mm/d, durante 10 dias. O grupo experimental foi subdividido em três grupos que receberam uma aplicação direta de estímulo elétrico em uma das fases de latência, ativação ou maturação óssea. Por meio de análise histológica e mecânica, concluíram que o efeito é positivo se a estimulação for realizada nas fases de ativação ou consolidação óssea.

Outra possibilidade testada para a redução do tempo da DO reside na utilização de ultra-som de baixa intensidade, aplicado na fase de maturação óssea. Estudo realizado em tibia de coelhos utilizou 20 minutos diários de ultra-som, com $30\text{mW}/\text{cm}^2$ de potência, em protocolos de DO com ritmo diário de 1 mm. Séries temporais no período de consolidação, com zero, sete, 10, 14 e 21 dias, demonstraram por instrumentos de coleta invasivos (ensaio mecânico de tração e análise microscópica) e não-invasivos (radiografias e DEXA), áreas calcificadas do calo ósseo e sua densidade significativamente aumentadas ao final de sete e 14 dias. Ao final da terceira semana, as propriedades físicas do osso apresentavam-se sem diferenças relevantes entre os grupos. Ainda neste estudo, um grupo de seis ratos alongados com um ritmo diário maior (3,0 mm), em que a metade que recebeu estímulo por ultra-som alcançou um padrão de calcificação semelhante aos grupos alongados no ritmo diário de 1 mm, enquanto o grupo controle não alcançou a maturação do calo fibroso. Tais resultados demonstraram que o benefício do ultra-som reside em um estágio precoce da mineralização do calo ósseo imaturo sem, contudo, criar como resultado final um osso com propriedades físicas superiores ao osso natural, podendo também ser aplicados a um ritmo acelerado de alongamento (SHIMAZAKI *et al.*, 2000).

O ácido zoledrônico, associado à osteonecrose dos maxilares, foi empregado via endovenosa no transoperatório da DO. Pampu *et al.* (2008) empregaram coelhos, submetidos ao protocolo de 0,5mm/12h durante cinco dias, distribuídos em dois grupos: grupo experimental com infusão de 0,1 mg/kg de ácido zoledrônico e grupo controle com infusão de solução salina durante o transoperatório. Os animais foram mortos no período de 28 dias, e os sítios da DO foram analisados por DEXA.

Os autores encontraram efeito positivo com este bisfosfonato na DO, sugerindo uma diminuição do tempo da consolidação.

Swennen *et al.* (2005) avaliaram o emprego do plasma rico em plaquetas (PRP) diretamente no sítio da DO em defeitos criados na calvária de ovelhas, no protocolo de 1mm/d, durante 30 dias. Dividiram os animais em quatro grupos: grupo 1 – cinco dias de latência e sem PRP; grupo 2 – sem latência e sem PRP; grupo 3 – cinco dias de latência e com PRP; grupo 4 – sem latência e com PRP. Após seis semanas, os animais foram mortos e os sítios de DO avaliados por radiografias convencionais e tomografia computadorizada tridimensional. Os melhores resultados foram obtidos no grupo 4, indicando que o PRP apresenta maior efeito quando aplicado no início da ativação do distrator sem período de latência.

O sulfato de cálcio foi empregado no início da consolidação óssea, por aplicação direta no sítio da DO mandibular de coelhos (ALRUHAIMI, 2001), pois tem sido associado à aceleração da osteogênese em situações de enxertos ou consolidação de fraturas. Esta propriedade foi verificada frente ao processo de DO mandibular de coelhos, por meio de avaliação microscópica. A DO foi realizada no ritmo de 1 mm/d, durante 10 dias. Uma nova intervenção cirúrgica foi, então, realizada diretamente sobre a superfície alongada ao final do período de ativação, em que o grupo experimental recebeu uma pasta de sulfato de cálcio sobre o osso. Avaliações microscópicas, realizadas em períodos diferentes da fase de maturação óssea, demonstraram que aos 11 dias o grupo que recebeu o sulfato de cálcio já apresentava osso imaturo e tecido conjuntivo em atividade, dispostos sobre a área alongada, enquanto que o grupo controle mostrava tecido conjuntivo fibroso sobre a mesma área. Aos 21 dias pós-distração as mandíbulas cobertas com sulfato de cálcio apresentavam matrizes ósseas densas e calcificadas dispostas no sentido do alongamento, ao passo que o seu grupo controle, no mesmo período, estava preenchido por tecido ósseo imaturo pouco calcificado, exibindo, assim, o benefício de tal aplicação na redução do tempo de tratamento.

Partindo do princípio que as BMPs constituem um grupo de fatores de crescimento responsáveis significativamente pela indução osteogênica, tanto embriológica quanto nas cicatrizações ósseas por fraturas ou DO, Hamdy *et al.* (2003) investigaram se uma única injeção local de BMP-7 (*osteogenic protein 1* –

OP-1) sobre o sítio da DO, no início da consolidação, poderia acelerar a maturação do osso regenerado. O experimento foi realizado em tíbias de coelhos seguindo um protocolo de sete dias de latência, distração de 0,25mm / 12 horas durante três semanas seguida de injeção de OP-1 em quatro dosagens (0, 80, 800 ou 2000 µg) com oito animais por grupo. Após três semanas de consolidação, os animais foram sacrificados e os espécimes submetidos a análises histológicas, densitométrica, imuno-histoquímica e biomecânicas, sem demonstrar diferenças significativas entre nenhum dos grupos. Possivelmente a OP-1 é mais útil quando aplicada em fases precoces da distração.

Neste contexto, fica claro que muitos foram os trabalhos no sentido de definir os parâmetros de sucesso e falhas da DO, bem como no esforço para elucidar os mecanismos biológicos que caracterizam a DO com diversos modelos animais utilizados. Entretanto, é fundamental que tais estudos apresentem um protocolo de eventos biológicos reprodutíveis para compará-los com os fenômenos fisiológicos de cicatrização óssea tecidual. Dessa forma, Al-Sebaei *et al.* (2005) submeteram 25 coelhos a osteotomias mandibulares e colocação de aparelhos distratores bilaterais utilizando como protocolo três dias de latência, ativação de 0,5mm/12h por sete dias e consolidação de 14 dias, em apenas um lado, enquanto no lado oposto o aparelho permanecia inativo. Após os períodos de observação (três, sete, 10, 17 e 24) os resultados clínicos e histológicos definiram o coelho como um modelo animal ideal para DO mandibular, pois combina com sucesso os critérios de controle intra-animal, análise temporal, custo efetivo e bom controle biológico que servem de base para futuros estudos.

2.2 Ensaios clínicos

Além dos experimentos realizados em animais, diversos autores consultados apresentaram resultados clínicos obtidos com seus pacientes e geraram protocolos de DO para a região maxilofacial.

Após as publicações dos princípios da DO de Ilizarov (1989_A e 1989_B) em ossos longos, ocorreu um intervalo até o primeiro ensaio clínico na região maxilofacial, que foi realizado por McCarthy *et al.* (1992). Estes autores submeteram quatro pacientes do gênero masculino, com idade entre 2 e 10 anos, à DO

mandibular. Três apresentavam diagnóstico de microssomia hemifacial e foram submetidos à DO mandibular unilateral. O quarto paciente, portador da Síndrome de Nager, foi submetido à DO mandibular bilateral. Após o período de ativação, com uma média de alongamento de 20 mm, os indivíduos permaneceram com o distrator por um período de nove semanas. O acompanhamento clínico foi de 11 a 20 meses, sem complicações pós-operatórias. O alongamento obtido foi mantido em três pacientes, enquanto um deles apresentou recidiva de 5 mm, atribuída à distância entre o centro de hospitalar e a residência do paciente e ao não-uso das placas-guia de mordida. As cicatrizes causadas pelos pinos transcutâneos foram descritas como a desvantagem da DO, até então realizada com distratores externos.

Diner *et al.* (1996), diante dos inconvenientes dos distratores externos, desenvolveram um distrator interno e empregaram em uma paciente com microssomia hemifacial. O acesso cirúrgico para a instalação do distrator foi intrabucal e a ativação feita por meio de uma haste flexível transmucosa. A paciente foi reabilitada adequadamente, embora os resultados em longo prazo necessitassem de maior acompanhamento.

Mofid *et al.* (2001) buscaram identificar os resultados obtidos, período de latência, ritmo e frequência de ativações, uso de sobrecorreção e período de consolidação utilizados na DO em cirurgia craniomaxilofacial, por médicos e cirurgiões-dentistas da American Society of Maxillofacial Surgeons e da American Cleft Palate-Craniofacial Association, além dos principais autores de artigos sobre DO. Dentre os formulários retornados, aplicados os critérios de exclusão, restaram 145, somando-se o total de 3278 casos. O índice de satisfação quanto aos resultados obtidos chegou a 93% nos casos de deficiências unilaterais de mandíbula. A recidiva foi observada tanto em casos do terço médio quanto em mandíbulas. Os cirurgiões que observaram o problema referem sua ocorrência nos primeiros seis meses após o final do alongamento. Como recidiva e a má-oclusão não foram consideradas complicações pelos entrevistados, estas se resumiram a infecções superficiais e osteomielites que acometeram cerca de 9,5% dos casos, bem como a cicatrizes hipertróficas e quelóides, com 15% de incidência. Os autores observaram não haver diferença na prevalência de pseudo-artroses ou consolidação prematura com a utilização ou não de um período de latência, sendo que a sua

eliminação poderia ser utilizada na redução do tempo global de tratamento. Notaram que aqueles que utilizaram um ritmo de alongamento de 2 mm diários apresentaram aumento significativo de lesão ao nervo alveolar inferior e, finalmente, que a frequência de ativações, desde que mantido um ritmo diário de 1 mm, não interfere na incidência de união fibrosa podendo, portanto, ser restrita a uma ativação diária para maior adesão dos pacientes e dos seus familiares ao tratamento.

Com o passar dos anos e após inúmeros estudos experimentais, a técnica da DO consagrou-se em diversas áreas da medicina e da odontologia. As indicações da DO não se restringiam apenas a ossos longos ou mandíbulas de pacientes com deformidades faciais congênitas, mas, sobretudo, a outras causas de perdas ósseas alveolares causadas por doenças periodontais, infecções, tumores e traumas. A distração alveolar possibilita um ganho ósseo com forma e massa compatíveis com reabilitações protéticas ou com implantes osseointegrados, assim como apresenta as vantagens em relação às técnicas convencionais de baixa reabsorção, ausência de leito ósseo doador, menor morbidade, baixos índices de infecções e menor tempo para a colocação de implantes. Uckan *et al.* (2002) demonstraram que a DO alveolar também apresenta complicações trans e pós-operatórias que devem ser consideradas. Após realizar e acompanhar 10 casos de distração alveolar tanto em mandíbula quanto em maxila com aparelhos intra-buciais, concluíram que a média de complicações foi de 70%, tendo incluído deslocamentos linguais (três casos) e palatinos (dois casos) dos segmentos distraídos; fratura do segmento distraído em um alvéolo muito fino (um caso) e sangramento transoperatório (um caso). Apesar deste alto índice de complicações, a maioria foi discreta e corrigida facilmente ao ponto de obter uma taxa de sucesso com os implantes de 85%.

Os ensaios clínicos sempre objetivaram registrar os índices de complicações da DO no sentido de avaliar a técnica como uma alternativa segura às diversas técnicas cirúrgicas convencionais. Van Strijen *et al.* (2003) avaliaram a possibilidade da DO atuar como alternativa às osteotomias sagitais bilaterais para avanços de mandíbula em pacientes classe II de Angle e, para isso, o grau de complicações transoperatórias, transdistração e pós-distração durante DO mandibular bilateral utilizando esses aparelhos intrabuciais monodirecionais foi mensurada. Os resultados demonstram que, dos 70 pacientes tratados, 28 apresentaram complicações que

incluíam problemas com a técnica e/ou com os aparelhos distratores (10 casos), infecções (cinco casos), danos sensitivos persistentes (três casos), fratura incompleta e imobilização lingual (um caso), problemas condilares (três casos) e problemas relativos ao não-seguimento das orientações (seis casos). Assim, os autores concluíram que a DO pode ser considerada um procedimento seguro e previsível para alongamentos mandibulares, pois apresenta baixos índices de complicações severas.

A estabilidade após DO para alongamento mandibular também foi uma preocupação de Van Strijen *et al.* (2004). Esses autores analisaram 50 pacientes com hipoplasias mandibulares classe II de Angle tratadas com DO bilateral seguindo o protocolo de seis dias de latência, distração unidirecional de 1mm/dia (0,5mm/12h) utilizando aparelhos intrabuciais. Os pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com ângulo mandibular (Sela/Násio – Plano Mandibular) em: ângulo acentuado ($> 38^\circ$) e ângulo normal ou baixo ($\leq 38^\circ$) e as mensurações clínicas realizadas antes da cirurgia, após a distração e aos seis meses e um ano de pós-operatório. Os resultados demonstram que os pacientes que apresentavam ângulo mandibular acentuado apresentaram um grau de recidiva de 57%, enquanto que apenas 8,3% apresentaram recidivas no grupo que tinha ângulo normal ou baixo. Fica claro que os pacientes com um acentuado ângulo mandibular ainda estão em um grupo de risco em relação a recidivas e que a DO não pode evitar tais recidivas, ao passo que naqueles pacientes com ângulo mandibular baixo a DO é segura e previsível.

O objetivo do trabalho de Whitesides e Meyer (2004) foi examinar o efeito da DO sobre o nervo alveolar inferior (NAI) e a estabilidade da oclusão em pacientes submetidos à osteotomia e aos avanços mandibulares para correção de severas retrognatias. Cinco pacientes foram submetidos a osteotomias sagitais mandibulares bilaterais com posterior colocação dos aparelhos distratores para avanço de 10 a 14 mm após período de latência (1mm/dia até alcançar classe I de Angle) e remoção dos mesmo após consolidação de quatro a 11 meses. A função sensitiva do NAI foi avaliada em dois pontos distintos e realizada nos intervalos: pré-operatório (T0), após a cirurgia e pré-distração (T1), sete dias após o fim da distração (T2), três meses após T2 (T3), seis meses após T2 (T4), nove meses após T2 (T5) e um ano

após T2 (T6). Os resultados demonstraram que, após um ano de controle, nenhum dos pacientes demonstrou recidivas, enquanto os avanços mandibulares permaneceram estáveis, bem como nenhum dano significativo ao NAI.

Todos os trabalhos clínicos e científicos foram ao longo dos anos motivo de aperfeiçoamento das técnicas da DO, dos aparelhos distratores, nos vetores de distração, ampliando as indicações e melhorando o prognóstico e as condições dos pacientes necessitados. Nesse contexto, os mais recentes ensaios clínicos utilizando a DO demonstram com sucesso a sua utilização nas mais severas reconstruções maxilomandibulares, inclusive com associações de técnicas de enxerto ósseo autógenos (BLOCK; BAUGHMAN, 2005; RAINER; CHIARI, 2005). Entretanto, ensaios com pacientes buscando estimular o metabolismo ósseo não foram encontrados.

2.3 Ação do LLLT no tecido ósseo

Diversos tipos de LLLT, parâmetros e protocolos têm sido testados com o intuito de obterem-se os melhores resultados biomodulatórios, redução da dor e inflamação, além de estímulo ao reparo e à cicatrização óssea e de tecidos moles.

Guzzardella *et al.* (2002) analisaram a propriedade aceleradora do LLLT sobre a regeneração óssea. Foram criados defeitos ósseos na epífise distal de fêmures de ratos, os quais foram transferidos para meio de cultura celular, onde permaneceram por 21 dias. Seis destas falhas foram irradiadas durante 10 dias com arseneto de gálio-alumínio (ArGaAl) (780 nm, 1 W), em sessões de 10 minutos (30 J/cm²). Os níveis de fosfatase alcalina, cálcio e óxido nítrico no meio de cultura foram aferidos aos sete, 14 e 21 dias do experimento e, ao final do período, foi realizada avaliação microscópica por histomorfometria. Este estudo demonstrou níveis significativamente aumentados de indicadores do metabolismo ósseo nas culturas irradiadas com o LLLT, com aceleração do reparo ósseo, indicando um papel positivo deste LLLT sobre a reparação óssea.

Silva Júnior *et al.* (2002) também demonstraram efeito estimulador do AsGaAl (830 nm, 40 mW) em defeitos ósseos criadas no fêmures de ratos. Em seu estudo, os autores utilizaram doses de 4,8 J/cm² a cada 48h e encontraram uma maior

deposição de matriz óssea no grupo irradiado, sobretudo nos estágios iniciais do reparo ósseo.

Weber *et al.* (2006) observaram a ação biomoduladora de 10 J/cm^2 de ArGaAl (830 nm, 50mW) em defeitos ósseos cirúrgicos em fêmures de ratos associados a enxertos ósseos implantados. Por meio de análise histológica, observaram que o grupo com ação mais expressiva do LLLT consistiu do grupo submetido à irradiação transoperatória antes da colocação do enxerto seguida da irradiação pós-operatória.

Blaya *et al.* (2008) também objetivaram avaliar o efeito de diferentes protocolos de LLLT (10 J/cm^2 de ArGaAl, 830 nm, 50mW e 10 J/cm^2 de InGaAlP, 685 nm, 35mW) no reparo ósseo. Os animais foram mortos aos 15, 21 e 30 dias. Os espécimes foram avaliados por análise histológica. Os autores concluíram que os dois protocolos apresentaram efeitos positivos no reparo ósseo quando comparados ao grupo não-irradiado.

Poucos são os trabalhos analisando o efeito do LLLT na DO. Saito e Shimizu (1997) foram os primeiros a empregar o LLLT na DO em animais. Utilizaram o LLLT de ArGaAl (830 nm, 100 mW) na expansão cirúrgica de maxila de ratos a fim de comparar diversos protocolos de irradiação. Observaram por microscopia ótica que a aplicação do LLLT nos estágios iniciais da DO foi mais efetiva e que pequenas doses aplicadas com um período maior são preferíveis a uma única grande dose.

Cerqueira *et al.* (2007) empregaram o LLLT de ArGaAl (830 nm, 40 mW, 16 J/cm^2) na DO mandibular de ovelhas para analisar sua ação nas fases de latência e consolidação óssea da DO. Observaram por microscopia ótica e ensaio mecânico de tração que o LLLT apresentou efeito positivo no sítio da DO quando aplicado na fase de consolidação óssea.

Miloro *et al.* (2007) utilizaram o LLLT de ArGaAl (820 nm, 400 mW, 36 J/cm^2) na DO mandibular bilateral de coelhos. O LLLT foi aplicado em um dos lados, sendo que o outro serviu de controle. Entretanto, o mesmo coelho não deve ser empregado como controle devido ao efeito sistêmico atribuído ao LLLT. Ainda assim, os autores encontraram, por meio de análise histológica, efeito positivo do LLLT quando aplicado no período de consolidação óssea.

2.4 Análises físicas

São apresentadas descrições básicas das espectroscopias por fluorescência e difração de raios X. Maiores detalhes sobre seus princípios de funcionamento podem ser obtidos em Brundle *et al.* (1992).

2.4.1 Espectroscopia por Fluorescência de Raios X (XRF)

A espectroscopia por fluorescência de raios X (XRF) fornece a identificação dos elementos químicos constituintes de uma amostra (análise qualitativa), permitindo a análise elementar do C(6) até U(92). Seu princípio físico de funcionamento é similar ao da técnica de espectroscopia por dispersão de energia (EDS), disponível nos microscópios eletrônicos, que determina a presença de certos elementos químicos pela emissão de seus raios X característicos. Contudo, na técnica de XRF, é utilizado um conjunto de cristais específicos, para obtenção de uma precisão mil vezes superior à técnica de EDS no que se refere à quantificação dos elementos químicos, como será discutido mais adiante.

Os elementos químicos cálcio (Ca) e fósforo (P) podem ser identificados e quantificados através da técnica de XRF. A regeneração óssea dá-se principalmente com a participação de tais elementos na formação da porção mineral do tecido ósseo. A quantificação do Ca e do P (análise quantitativa) é importante no que se refere à regeneração óssea, pois a razão entre Ca e P é diretamente proporcional ao estágio de maturação óssea. A hidroxiapatita pura apresenta uma razão de 1,2:1 entre o percentual em massa de Ca e P. No tecido ósseo, a razão esperada é menor, uma vez que a encontrada contém, além de toda a porção orgânica presente no tecido ósseo, impurezas (carbonato e magnésio) e imperfeições (KRAWCZYC *et al.*, 2007).

O princípio físico de funcionamento dos equipamentos usados em análises pela técnica de XRF pode ser descrito com base no esquema do espectrômetro (Figura 1), que é constituído de um tubo de raios X o qual emite fótons direcionados a uma amostra que se quer analisar. Esta amostra absorve a energia dos fótons incidentes, excitando ou ionizando seus átomos e gerando vacâncias nas camadas eletrônicas, com conseqüente rearranjo da estrutura eletrônica (saltos quânticos),

caracterizado pela emissão de raios X de fluorescência das camadas eletrônicas envolvidas. Estes fótons de raios X passam por um colimador primário em direção a um cristal difrator (há cristais diferentes para cada grupo de elementos químicos), que funciona como um filtro para o detector identificar exclusivamente a fluorescência (salto quântico) de um único elemento químico, que se apresenta a partir de uma angulação específica do cristal difrator (2θ). A detecção ocorre segundo a lei de Bragg

$$(\lambda = 2 d \sin \theta),$$

onde “ θ ” é o ângulo medido no detector, “ d ” é a distância entre os planos cristalinos do cristal específico e “ λ ” é o comprimento de onda do raio X característico emitido, o qual se relaciona com a energia de transição quântica pela relação de Plank:

$$E = \frac{h.c}{\lambda},$$

onde “ h ” é a constante de Plank e “ c ” é a velocidade da luz (TIPLER, 1981; 2000).

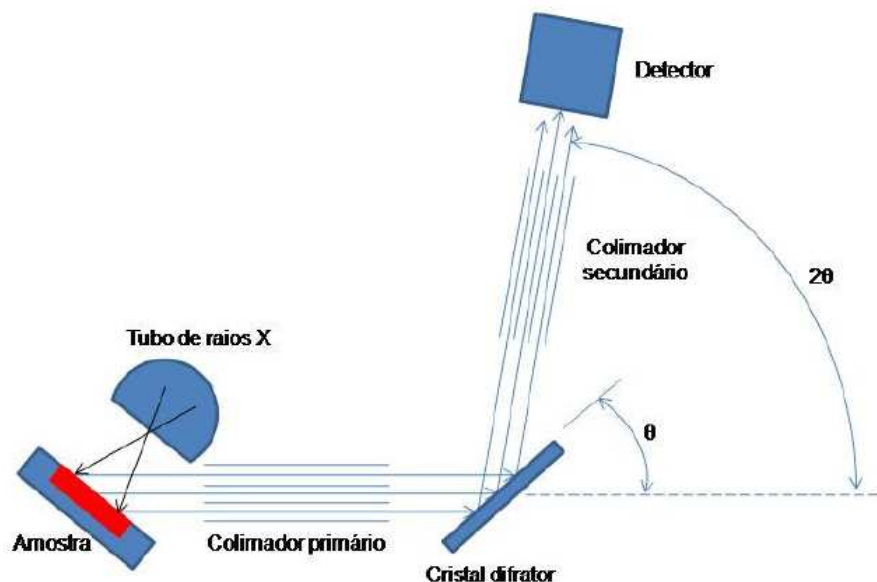


Figura 1. Desenho esquemático da detecção de XRF.

A precisão da medida, tanto qualitativa quanto quantitativa, é garantida pela precisão do arranjo de medida. Desta forma, em vez de medir-se diretamente a energia dos fótons de raios X característicos (que têm resolução em torno de 200

eV), é medido o ângulo de difração que este fóton apresenta em um determinado cristal, em que a precisão angular (geralmente perto de 0,0001 graus) é que permite distinguir dois elementos. Outra vantagem a ser destacada nesta técnica, é que, por possuir excitação por fótons de raios X, em vez de elétrons, as amostras não precisam receber metalização com filme de ouro, aumentando ainda mais a precisão da medida.

2.4.2 Espectroscopia por difração de raios X (XRD)

A espectroscopia por difração de raios X (XRD) fornece a identificação de estruturas cristalinas (fases cristalinas) presentes em uma amostra (análise qualitativa). O principal cristal constituinte do tecido ósseo é a hidroxiapatita, que pode ter sua estrutura cristalina identificada pela técnica da XRD (ZYMAN *et al.*, 1998; LANGSTAFF *et al.*, 1999; LOBATO *et al.*, 2006).

Além desta análise qualitativa, a XRD possibilita a quantificação da cristalinidade, que é razão entre as fases cristalinas e o material amorfo presente em uma amostra (análise quantitativa). Teoricamente, pode-se considerar a porção inorgânica do tecido ósseo como as fases cristalinas e a porção de material amorfo. É possível considerar-se a cristalinidade como um importante indicador da maturidade do tecido ósseo, pois há uma relação proporcional entre o amadurecimento ósseo e o seu conteúdo mineral.

O equipamento empregado nestas análises de XRD é o difratômetro de raios X, que consiste de uma fonte de raios X que incide sobre a amostra e há uma difração destes raios incidentes. O padrão de difração é obtido a partir da angulação da amostra e do ângulo de difração dos raios (2θ). A intensidade de difração dos fótons está relacionada com as fases cristalinas presentes na amostra, isto é, a organização do cristal (Figura 2). A base de funcionamento físico da formação de sinal pelas intensidades de emissão de fótons de raios X em um determinado ângulo obedece, também, à lei de Bragg que foi apresentada na seção anterior (XRF).

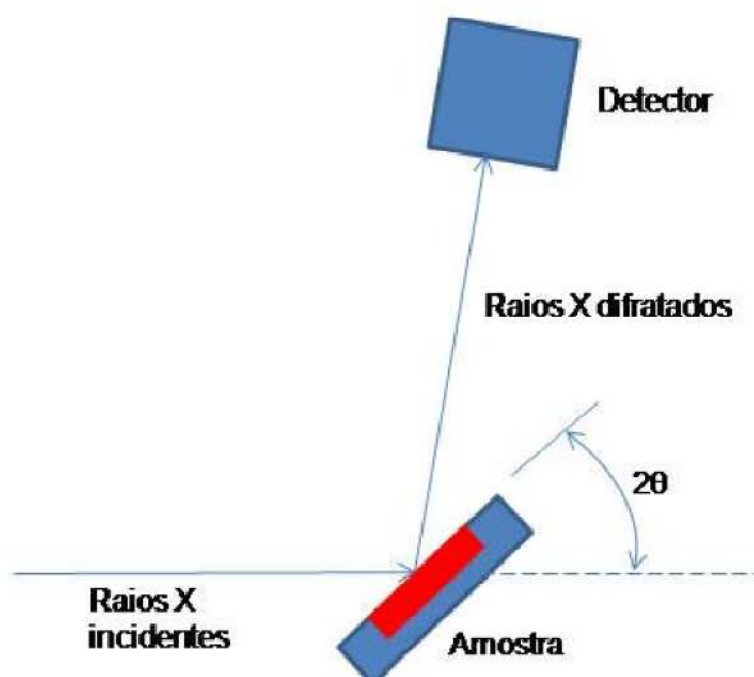


Figura 2. Desenho esquemático da detecção de XRD.

O equipamento fornece um gráfico chamado difratograma o qual se identificam os picos, amplitude dos sinais e ruído de difração, que são comparados com aqueles de cristais conhecidos, disponíveis em banco de dados do difratômetro (PDFWIN[®], ISCD). A amostra é identificada como cristal conhecido quando há uma semelhança com os dados medidos e aqueles publicados na biblioteca (PDFWIN[®], ISCD). A forma do pico e a relação entre amplitude de sinal e ruído permitem avaliar diversas propriedades dos materiais; entre elas podemos destacar o grau de cristalinidade das amostras. Devido à importância tecnológica dos materiais cristalinos, diversas normas técnicas foram instituídas para determinar os cálculos do grau de cristalinidade de um material. Para materiais contendo diferentes fases, a norma que mais se adapta para estes cálculos é a norma ASTM D5357, que é complementada pela ASTM D5758.

3 Metodologia

3.1 Caracterização

Esta pesquisa foi realizada junto ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), fazendo parte da Linha de Pesquisa Diagnóstico e Terapêutica Aplicada. Foi aprovada pela Comissão Científica e de Ética da FO/PUCRS (ANEXO A), pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS (ANEXO B) e pelo Comitê de Ética em Experimentação da Universidade Federal de Pelotas (ANEXO C).

3.2 Definição das variáveis

3.2.1 Variável independente

Irradiação pelo LLLT.

3.2.2 Variáveis dependentes

Percentual de osso neoformado (análise histológica);
composição química do sítio ósseo da DO (XRF);
cristalinidade do sítio ósseo da DO (XRD);
estrutura cristalina do sítio ósseo da DO (XRD).

3.3 Problema

A irradiação pelo LLLT altera o percentual de osso neoformado, a composição química, a cristalinidade e a estrutura cristalina do sítio ósseo produzido pela DO?

3.4 Hipótese

O percentual de osso neoformado, a composição química, a cristalinidade e a estrutura cristalina do sítio ósseo produzido pela DO podem ser melhorados se o sítio operado for irradiado pelo LLLT 830nm durante a DO.

3.5 Amostra

Para a presente investigação, estando de acordo com a literatura internacional, foram selecionadas 15 coelhos da ordem *Lagomorpha*, gênero

Oryctolagos, espécie *Oryctolagos cuniculus*, raça Nova Zelândia, variedade branca, machos, em idade adulta reconhecida e peso compreendido entre 3,5 e 4,5Kg, livres de malformações congênitas e feridas.

Dez dos animais selecionados foram admitidos no Biotério da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), enquanto os outros seis foram admitidos no Hospital de Medicina-Veterinária da Universidade Federal de Pelotas/RS. Houve a necessidade de dois locais para a execução do procedimento, devido à suspensão dos experimentos com coelhos na FEPPS, após a realização da primeira etapa deste experimento.

Os animais foram pesados, identificados e alojados em gaiolas individuais. Ao final de uma semana de observação (período considerado necessário para a adaptação dos animais às novas condições ambientais) foram reavaliados clinicamente e procederam-se às cirurgias.

3.6 Etapas técnicas da pesquisa

Todos os animais foram submetidos ao protocolo das etapas que se seguem.

3.6.1 Seqüência cirúrgica

Todas as etapas dos procedimentos anestésicos foram executadas pelas médicas-veterinárias Dra. Luisa Maria G. de Macedo Braga, na FEPPS; e Dra. Isabel Pereira, na UFPel, que acompanharam o pré, o trans e o pós-operatório dos animais.

A anestesia foi obtida por meio de uma associação de drogas: 1. Solução Cloridrato de Xilazina a 2% 0,1mg/kg (Anasedan[®]) e 2. Cloridrato de Zolazepam com Cloridrato de Tiletamina 3mg/kg (Zoletil[®]), por via intra-muscular. O primeiro caracteriza-se como miorreaxante e analgésico; o segundo, um agente anestésico dissociativo capaz de atuar sobre o córtex cerebral, seletivamente, causando analgesia e perda da consciência. A ação complementar destas duas drogas associadas proporciona uma anestesia efetiva para procedimentos cirúrgicos de estímulos moderados. Ministrados nesta seqüência, com um tempo médio de indução anestésica de quatro minutos, e, eventualmente, doses complementares

intramusculares de manutenção, correspondendo a 1/3 da dose inicial, foram administradas.

Após a perda da consciência dos animais, a região submandibular à direita de cada espécime foi tricotomizada com máquina elétrica. Os espécimes foram, então, levados à sala cirúrgica, posicionados em decúbito lateral direito, sendo fixados à mesa cirúrgica por amarrilhos. A seguir, realizou-se anti-sepsia da pele com Clorexidina 4%. Campos cirúrgicos estéreis isolaram a área operatória (Figura 3).



Figura 3. Animal com tricotomia e anti-sepsia realizadas.

Na região a ser incisada, realizou-se infiltração local 0,9 ml de Lidocaína a 2% com Epinefrina na proporção de 1:100.000, no espaço subcutâneo. A administração de Enrofloxacina (Flotril[®]), na dose de 3mg/kg, por via intramuscular, consistiu a antibioticoprofilaxia.

Uma incisão de aproximadamente 3cm, única e linear, foi realizada na pele com cabo de bisturi n^o. 3 e lâmina de bisturi descartável n^o. 15, na borda inferior da mandíbula, dando-se início ao acesso do osso mandibular. A dissecação por planos foi realizada com tesoura de Matzenbaum. O periósteo foi cuidadosamente descolado junto com as inserções musculares, por meio de descolador do tipo Molt, pelas faces lateral e inferior da mandíbula (Figura 4).

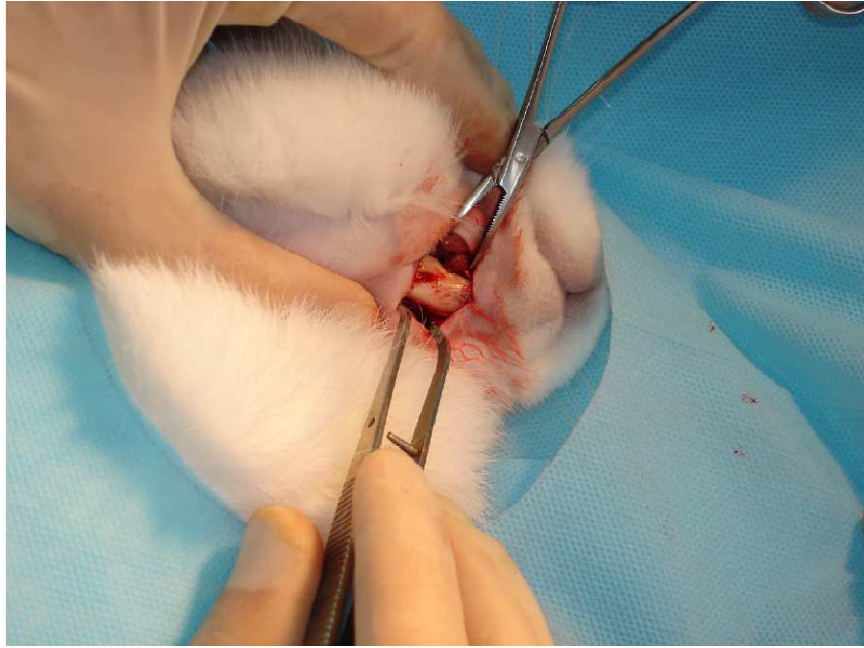


Figura 4. Exposição do corpo mandibular direito.

Após a exposição da região de corpo mandibular, o forame mentoniano com a emergência do nervo e vasos homônimos foram identificados e dissecados. Uma corticotomia vestibular foi realizada entre o dente pré-molar e o forame mentoniano, utilizando broca *carbide* de ponta tronco-cônica 701 (1,0mm de diâmetro) em baixa rotação e sob irrigação constante, com solução salina de soro fisiológico a 0,9% envolvendo toda a face vestibular mandibular. Durante o procedimento, os tecidos cutâneo e muscular foram tracionados pelos reparos. A cortical lingual e seu periósteo adjacente foram preservados (Figura 5).

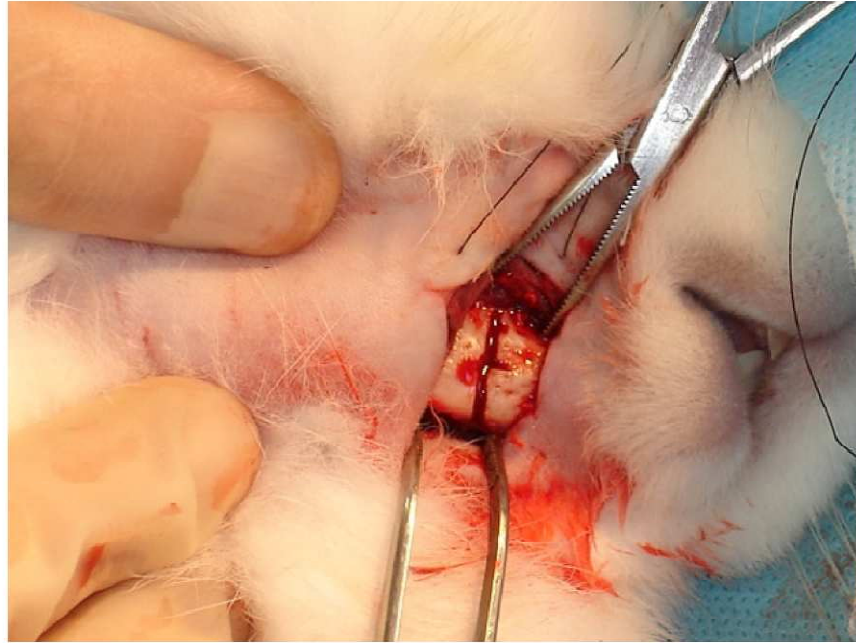


Figura 5. Corticotomia vestibular.

O distrator osteogênico (PROMM[®] – Indústria de Materiais Cirúrgicos LTDA, Porto Alegre/RS) foi instalado através da perfuração de dois orifícios por placa e fixados com parafusos de 1,5 X 5 mm, em cada lado da corticotomia vestibular e abaixo do forame mentoniano e das raízes dentárias (Figura 5). Este distrator foi desenvolvido a partir de Yazawa *et al.* (2003), tendo uma diminuição no número de parafusos: de oito para quatro. Houve necessidade da realização de seis procedimentos cirúrgicos prévios, caracterizados como pilotos, visando desenvolver o distrator e definir a técnica cirúrgica adequada. Todos os parafusos foram adaptados de forma equidistante à área da osteotomia e bicorticais. O parafuso distrator foi adaptado e ativado em duas voltas ou até que se obtivesse uma franca resistência à ativação, quando a fratura da cortical lingual pôde ser finalizada com movimentos de alavanca com cinzéis (Figura 6).

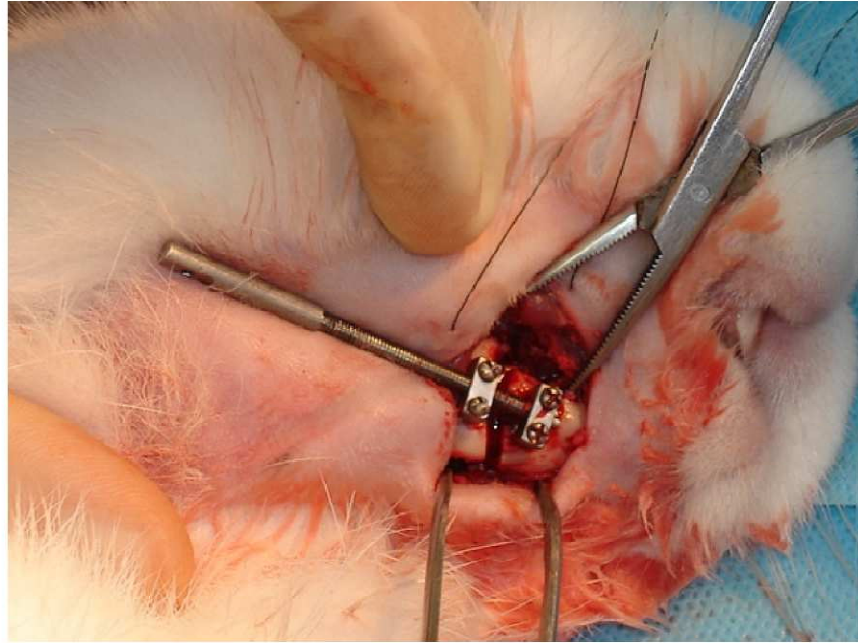


Figura 6. Distrator osteogênico instalado.

Após irrigação abundante para a limpeza do leito operatório, a ferida cirúrgica foi fechada por planos com fio monofilamentar de náilon nº. 4-0 em pontos isolados nos planos profundos e sutura com pontos simples para a epiderme (Figura 7).



Figura 7. Sutura.

3.6.2 Período pós-operatório

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

Durante os três primeiros dias, os espécimes receberam novas doses de analgésicos (Ibuprofeno[®]) bem como doses antibióticas (Enrofloxacina 50mg/dia) durante todo o período experimental, diluídos no depósito de água disponível nas gaiolas.

Distração osteogênica (20 dias)

a) Período de latência (três dias)

Durante os três primeiros dias pós-operatórios, o distrator osteogênico não foi ativado, apenas inspecionado e higienizado com clorexidina 4%. A dieta administrada consistiu de ração umidificada e triturada manualmente. Colares protetores não foram empregados, uma vez que dificultaram a alimentação dos animais no experimento piloto (Figura 8).

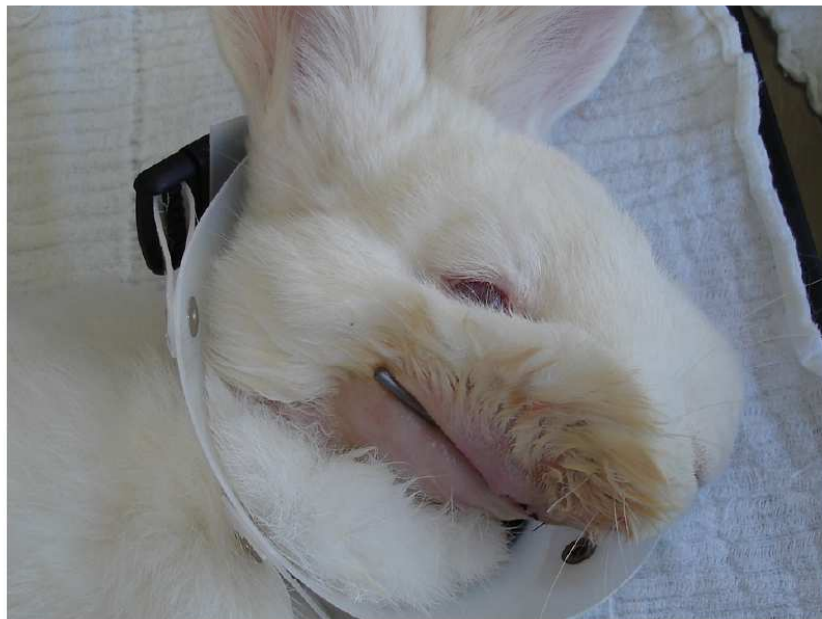


Figura 8. Colar protetor utilizado no piloto, mas dispensado nos animais do experimento.

b) Período de ativação (sete dias)

A partir do terceiro dia pós-operatório, iniciaram-se as ativações do aparelho distrator com o ritmo de 0,7 mm de extensão por dia, que corresponde a uma volta inteira do parafuso de ativação do distrator utilizado neste experimento, até que se completassem sete dias de ativação (aproximadamente 4,9 mm de extensão).

c) Período de consolidação (dez dias)

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

3.6.3 Grupos

Os espécimes deste estudo foram divididos em quatro grupos experimentais de acordo com a análise histológica ou física a que seriam submetidos, a realização da DO e a irradiação LLLT, além de dois grupos controle que não realizaram o procedimento cirúrgico (Quadro 1).

Grupos	DO	LLLT	Nº. de animais
1	Sim	Sim	6
2	Sim	Não	4

Quadro 1. Distribuição dos grupos experimental e controle, analisados por histomorfometria.

Fonte: O autor (2008).

Grupos	DO	LLLT	Nº. de animais
3	Sim	Sim	2*
4	Sim	Não	2**
5	Não	Sim	1
6	Não	Não	1

Quadro 2. Distribuição dos grupos experimentais e controles, analisados pelo XRf e XRD.

* Um animal deste grupo foi excluído; houve união precoce dos segmentos ósseos.

** Um animal deste grupo foi excluído; a peça foi fraturada na dissecação.

Fonte: O autor (2008).

3.6.4 Irradiação com o LLLT

Para a irradiação pelo LLLT (830 nm, 40 mW) foi utilizada uma unidade de LLLT Thera Lase[®] (DMC Equipamentos, São Carlos, SP).

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

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

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

A densidade de energia do estudo seguiu média dos estudos anteriores (SILVA JÚNIOR *et al.*, 2002; WEBER *et al.*, 2006; CERQUEIRA *et al.*, 2007; MILORO *et al.*, 2007). Entretanto, como equipamento Thera Lase emprega uma fibra óptica com diâmetro 20 vezes menor que a área de 1cm² (ALMEIDA-LOPES; MASSINI, 2000), necessita-se fazer o seguinte ajuste:

$$\frac{\text{ENERGIA NOMINAL}}{\text{ÁREA NOMINAL}} = \frac{\text{ENERGIA REAL (ER)}}{\text{ÁREA REAL (AR)}}$$

Assim, neste estudo tem-se a Energia Real de 10J:

$$\frac{200 J}{20 cm^2} = \frac{\text{ENERGIA REAL (ER)}}{1 cm^2}$$

Assim, nos animais que receberam irradiação LLLT, foi empregada a seguinte dosimetria: dose pontual de 10 J/cm² de LLLT, diretamente sobre o sítio ósseo submetido à DO, no período de consolidação óssea, com intervalos de 48 horas.

3.6.5 Morte dos animais

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

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

Os espécimes que seriam avaliados por histomorfometria, foram levados imediatamente para o laboratório, seguindo o procedimento a seguir descrito. Os demais foram armazenados em glutaraldeído a 2%, até sua preparação.

3.7 Preparação das amostras

3.7.1 Análise histológica

Os 10 espécimes para a análise histológica foram preparados no Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da PUCRS.

Neste laboratório, as peças receberam uma numeração no livro de registro, sem o conhecimento dos pesquisadores sobre o grupo ao qual pertenciam, caracterizando este estudo como cego.

As peças foram descalcificadas com ácido cítrico a 5%, submetidas a procedimento de rotina para inclusão em parafina e colocação por HE, com cortes de 4µm de espessura no sentido látero-medial. Foram selecionados três cortes de cada peça (Figura 9).

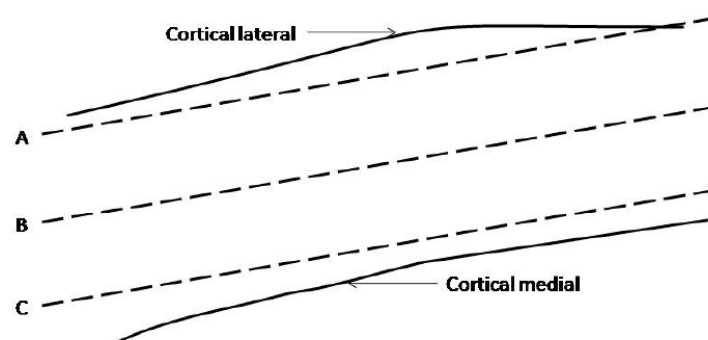


Figura 9. Cortes realizados para a análise microscópica: A. corte lateral; B. corte médio; C. corte medial.

Foram obtidas três lâminas de cada espécime. Contudo, para a mensuração das áreas de neoformação óssea, cada lâmina foi subdividida em unidades experimentais (UE), a partir de um aumento aproximado de 100X no microscópio óptico, com conseqüente captura das imagens por câmera fotográfica digital acoplada ao microscópio.

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

As imagens das UE foram organizadas em arquivos com a mesma numeração do livro de registro do laboratório, mantendo o cegamento dos examinadores.

Para mensuração das áreas neoformadas em *pixels* quadrados, foi empregado o *software* livre ImageTool[®] for Windows 3.0 (The University of Texas Health Science Center in San Antonio, Estados Unidos). A partir da mensuração da área neoformada (A^N) e da área total da UE (A^T), foram calculadas as porcentagens da neoformação óssea ($A^N/A^T * 100$) (Figura 10).

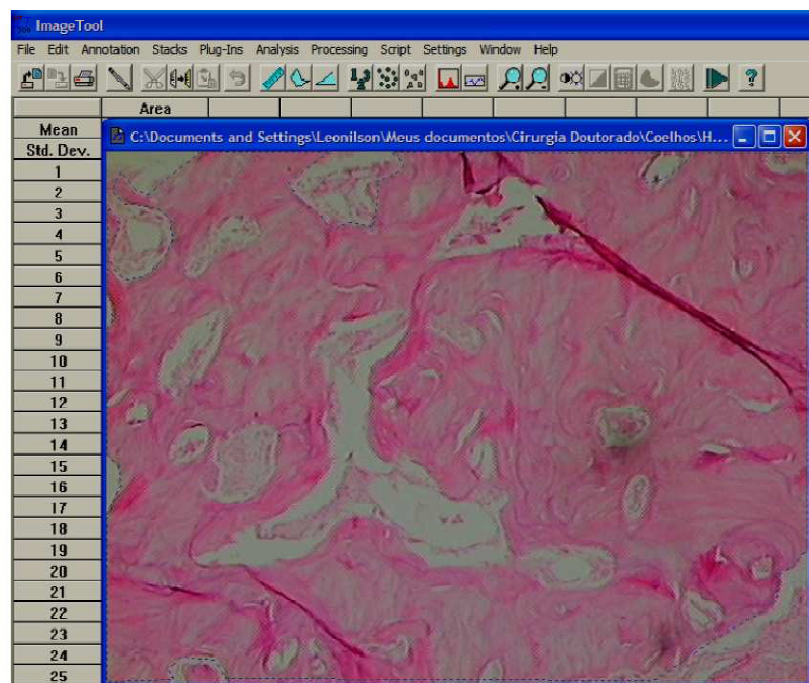


Figura 10. Exemplo de mensuração do osso neoformado, com emprego da ferramenta de mensuração de área no programa ImageTool[®].

Dois examinadores receberam treinamento de patologista experiente (Prof. Dr. Manoel Sant'Anna Filho, FO/PUCRS) e subsequente calibração, com mensuração de UE aleatórias. As mensurações foram utilizadas para obtenção do Coeficiente de Correlação Intraclasse (CCI), que foi de 0,9939. O CCI observado indica "Replicabilidade Excelente" (Figura 11).

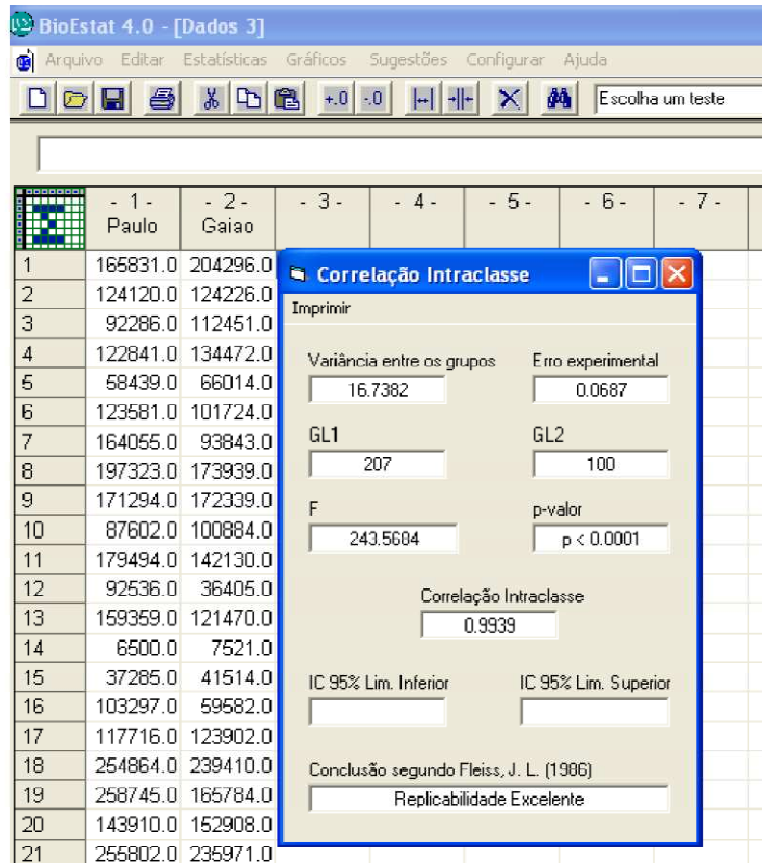


Figura 11. Resultado estatístico do teste de correlação intraclasse.

3.7.2 Análises físicas

As análises físicas foram realizadas nos laboratórios do Grupo de Estudos das Propriedades de Superfícies e Interfaces (GEPSI) da Faculdade de Física da PUCRS, localizado no Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Física no Parque Tecnológico da PUCRS (TECNOFUC).

3.7.3 Espectroscopia por fluorescência de raios X (XRF)

Neste estudo, a preparação das amostras para os ensaios de XRF foi feita em três etapas:

- a) as quatro hemimandíbulas direitas dos coelhos foram dissecadas, removidas e armazenadas em glutaraldeído a 2%;
- b) em seguida, as mesmas foram embutidas em resina acrílica, para possibilitar o lixamento e o polimento;
- c) para o polimento, realizado de forma manual, foi empregada uma seqüência de lixas da gramatura desde 180 até 4000, fixas em bloco de vidro e sob irrigação com água corrente.

O objetivo deste preparo foi a obtenção de uma superfície polida no sítio da DO e nas suas adjacências (Figura 12), para posterior incidência direta dos raios X no espectrômetro.

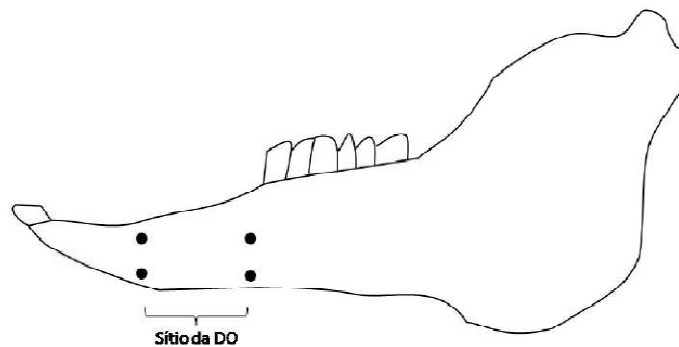


Figura 12. Representação esquemática da área submetida ao lixamento e ao polimento.

Os blocos obtidos de resina acrílica com o sítio de DO (Figura 13) foram colocados diretamente no espectrômetro modelo XRF-1800 (Sequential X-ray Spectrometer, Shimadzu), para a análise dos elementos Ca e P. As amostras foram medidas empregando uma radiação Rh K α (Ródio, fonte de raios X), em um regime de 40 kV e 95 mA. Para quantificar os elementos Ca e P, empregaram-se os cristais difratores de Fluoreto de Lítio (LiF) e Germânio (Ge), respectivamente, os quais são específicos para “filtrar” as fluorescências de tais elementos. As medidas foram

realizadas em vácuo em uma pressão de 25 Pascal (Pa), com uma velocidade de varredura de $8^\circ/\text{min}$, com passo de $0,1^\circ$ e um tempo de 0,75 s por passo.



Figura 13. Amostra incluída em resina acrílica após lixamento e polimento.

Foram realizadas medidas em diferentes pontos no vetor de alongamento do sítio da DO, utilizando uma malha (gabarito) milimetrada. O objetivo das múltiplas medidas foi avaliar a flutuação do conteúdo de Ca e P no sítio da DO, pois havia diferentes níveis de amadurecimento do tecido ósseo, em virtude do alongamento gradual característico da técnica de DO (Figura 14). Foi possível medir entre três e cinco pontos no sítio da DO, devido às pequenas irregularidades (espaços medulares) do tecido ósseo, presentes mesmo após o polimento, o que distorce os resultados de forma muito intensa. Assim, quando encontraram-se resultados muito diferentes entre si, verificou-se, no microscópio óptico, o ponto onde foi realizada a medida, e, caso estivesse em área topograficamente irregular, esta medida era descartada.

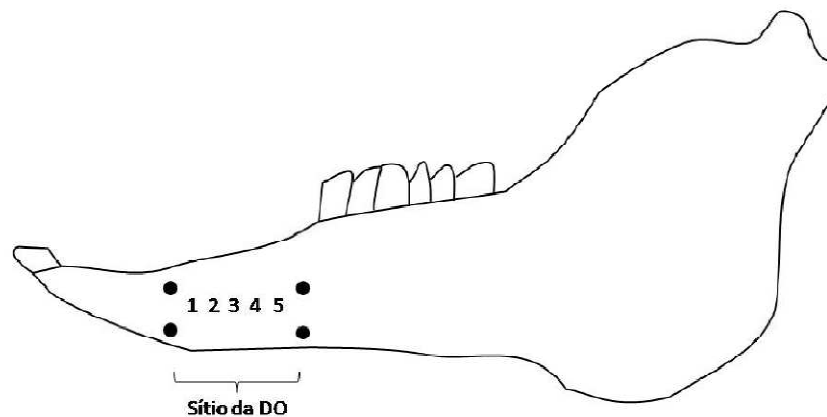


Figura 14. Pontos de medida na técnica do XRF no sítio da DO, seguindo o vetor de alongamento do distrator.

Com os valores obtidos para a quantificação de Ca e P, em cada ponto, foram calculadas as razões Ca/P, que foram tratadas pelo modelo estatístico já descrito anteriormente e organizadas em tabelas.

3.7.4 Espectroscopia por difração de raios X (XRD)

Após a obtenção dos dados do XRF, as peças foram seccionadas transversalmente, em micrótomo, nas porções anterior e média do sítio da DO obtendo-se uma secção do osso neoformado (Figura 15).

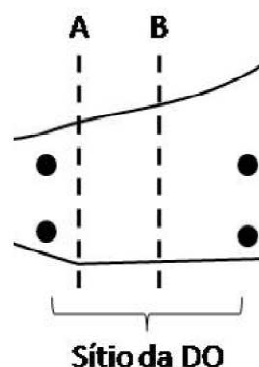


Figura 15. O segmento entre A e B foi utilizado no XRD. A. Corte anterior; B. Corte médio.

A secção do osso neoformado de cada espécime, com a porção cortical e a medular, foi triturada em gral e pistilo de cerâmica até a obtenção de um pó. Para a análise de XRD, é necessário que o material (pó) seja prensado em dispositivos específicos do equipamento. Entretanto, devido à pequena quantidade de material obtida, foi necessária a fabricação de poços de 6 mm de diâmetro por 1 mm de profundidade, em placas de vidro (que não apresentam picos de difração de raios X), onde o material obtido de cada peça foi satisfatoriamente prensado.

Cada placa de vidro, com o pó obtido, foi analisada no difratômetro de raios X XRD Maxima 7000 (X-ray Diffractometer, Shimadzu). As amostras foram medidas empregando-se a radiação $\text{Cu } \kappa\alpha$ (cobre) ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$), em um regime de 40 kV e 30 mA, respectivamente. As medidas foram feitas empregando-se a geometria Bragg – Brentano ($\theta - 2\theta$), em uma varredura de 30° a 45° , em uma velocidade de $2^\circ/\text{min}$, com passo de $0,02^\circ$ e um tempo de 6s por passo (Figura 16). A varredura angular limitou-se à região entre 30° e 45° por ser apenas nesta região que se encontram os picos de difração da HA. O tempo de medida total para cada amostra foi de 4.500 segundos, gerando uma estatística de medida excelente.



Figura 16. Equipamento para a técnica de XRD empregado.

De cada amostra foi obtido um difratograma que teve seus picos, relação entre amplitude de sinal e ruídos identificados e comparados àqueles das hidroxiapatitas conhecidas, sendo buscadas as semelhanças através de *software* específico do próprio equipamento.

O próprio *software* da Shimadzu aplica um ajuste de Lorenz para obter a cristalinidade das amostras. Os cálculos de cristalinidade são baseados na metodologia empregada nas normas ASTM D5357 e D5758 (American Society for Testing and Materials), usadas para o cálculo de cristalinidade por XRD para zeolitas, que constituem um grupo numeroso de minerais que possuem estrutura porosa.

Com base no processo de neoformação óssea, em que, em uma etapa inicial, após a reabsorção dos tecidos envolvidos, o organismo precisa prover a região com:

- a) as quantidades minerais suficientes para formar o tecido inorgânico (Razão Ca/P);
- b) organização celular para diferenciar os tecidos (deposição dos minerais);
- c) especialização dos tecidos para suportar as cargas a que são destinados (cristalinidade),

Pode-se supor que quanto mais avançado o processo de maturação óssea estiver, maior será seu grau de organização, logo maior será sua cristalinidade. Assim, com base nestas premissas, a cristalinidade indica o amadurecimento do tecido ósseo.

3.8 Análise Estatística

Foram empregados os *softwares* estatísticos Bioestat 4.0, para avaliar a replicabilidade intraclasse, e SPSS[®] (SPSS – Statistic Packet of Social Science. Produzido por SPSS[®] Inc. Chigado, EUA), para comparação entre os percentuais de osso neoformado na análise histológica.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estão apresentados a seguir os resultados referentes aos grupos de animais analisados por histomorfometria, seis deles irradiados com LLLT e quatro pertencentes ao grupo controle.

4.1 Análise histológica

As mensurações das unidades experimentais foram submetidas ao teste de Kolmogorov-Smirnov para verificação da normalidade das medidas histomorfométricas relacionadas à variável osso neoformado (Tabela 1), onde foi verificada a normalidade na distribuição ($z > 0,05$). Desta forma, nas análises subseqüentes foram empregados testes paramétricos.

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

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

Fonte: O autor (2008).

Na análise histológica, foi empregado o percentual de neoformação óssea, que é o teste-padrão em estudos que avaliam tecido ou substitutos ósseos. Em DO, já foi empregado por Saito e Shimizu (1997), Cerqueira *et al.* (2007) e Miloro *et al.* (2007).

Na Tabela 2, observam-se as médias de osso neoformado por animal. Tais médias foram obtidas a partir das mensurações das unidades experimentais de cada lâmina.

Estas mensurações foram submetidas ao teste paramétrico “t” para amostras independentes, sendo observada a não-homogeneidade do osso neoformado entre os grupos controle e experimental ($p < 0,05$).

Tabela 2. Distribuição das médias encontradas por animal.

Grupos	Animal	% ONF	% média ONF
Controle	1	38,07	46,75
	2	61,34	
	3	47,01	
	4	40,59	
Experimental	1	53,78	57,89*
	2	44,41	
	3	63,71	
	4	48,53	
	5	68,27	
	6	68,65	

% ONF: Porcentagem de osso neoformado em relação à área de distração osteogênica.

* $p=0,006$

Fonte: O autor (2008).

Quando os grupos foram comparados, considerando-se a não-homogeneidade da variável entre os mesmos, obteve-se diferença estatística significativa (Tabela 2), indicando a ação positiva do LLLT no grupo experimental (Figuras 17 e 18), pelo maior percentual do osso neoformado.

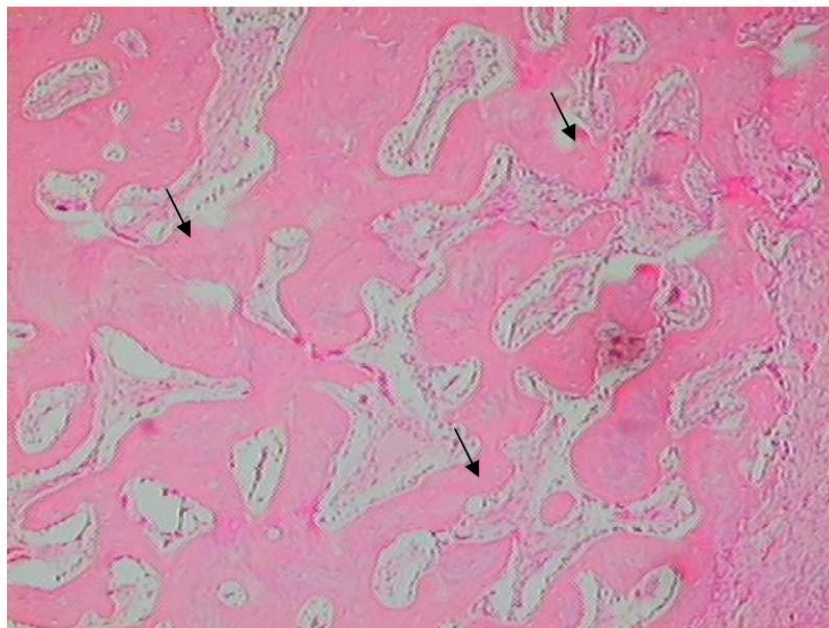


Figura 17. Microscopia óptica de UE de coelho irradiado com LLLT (grupo experimental). As setas indicam áreas de neoformação óssea no sítio da DO. Aumento aproximado de 100X.

Fonte: O autor (2008).

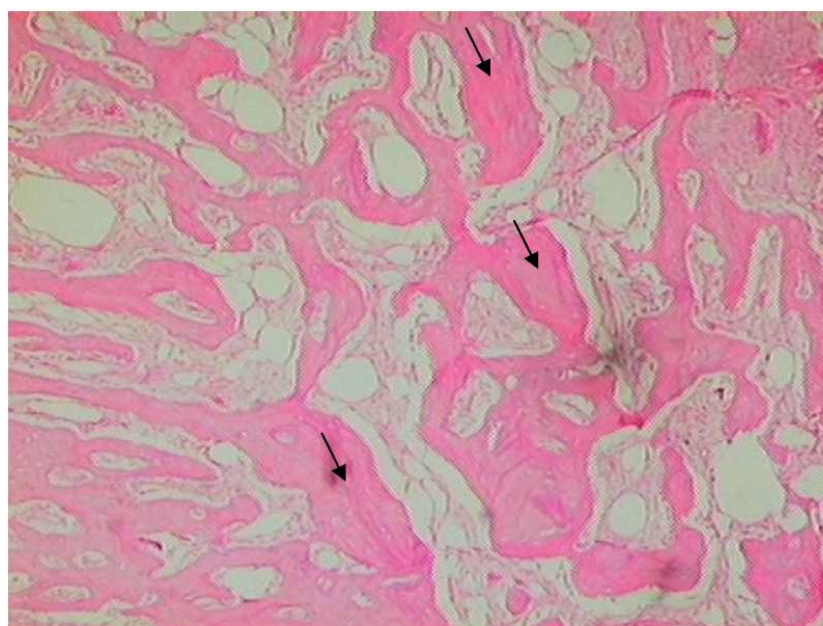


Figura 18. Microscopia óptica de UE de coelho não-irradiado com LLLT (grupo controle). As setas indicam áreas de neoformação óssea no sítio da DO. Aumento aproximado de 100X.

Fonte: O autor (2008).

A adoção de uma medida quantitativa, como o percentual de osso neoformado, possibilita uma análise com menor interferência do examinador, quando comparada às análises qualitativas, com descrição pelo examinador de itens específicos nas lâminas, e às análises semiquantitativas, com atribuição de escores pelo examinador a um grupo de itens que caracterizam determinado processo. Como esta descrição ou atribuição de escores é atribuída pelo examinador de forma subjetiva, há maior possibilidade de interferência nos resultados.

A busca de alternativas a estas análises operador-dependentes, como as análises físicas empregadas neste estudo, pode produzir conhecimentos menos vulneráveis aos vieses relacionados à coleta de dados.

4.2 Análises físicas

Estudos com DO empregando análises físicas com espectroscopias por fluorescência e difração de raios X não foram encontrados, o que constitui o ineditismo deste estudo. As amostras foram analisadas, em seqüência, pelas técnicas de XRF e XRD.

4.2.1 Espectroscopia por fluorescência de raios X (XRF)

Nesta análise foram identificados os elementos químicos cálcio e fósforo presentes nas amostras, por meio de seus fótons emitidos de $p\alpha$ e $p\beta$, emitidos pelo Ca e P, e detectados pelo espectrômetro (Figura 19).

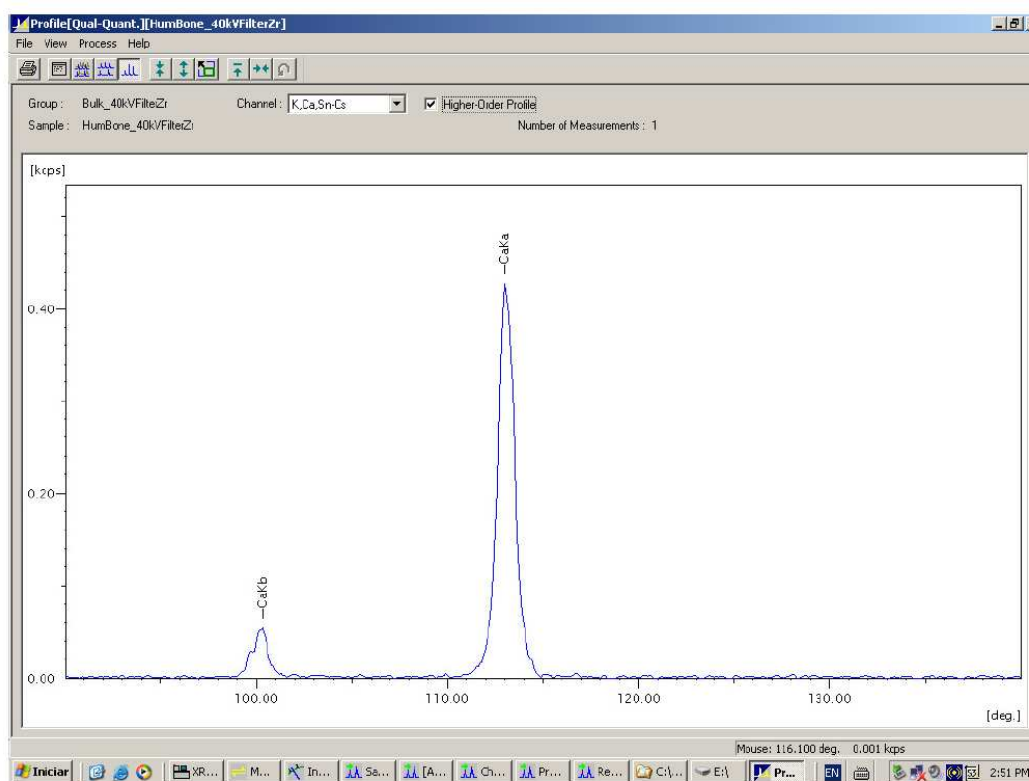


Figura 19. Exemplo da detecção dos fótons emitidos de $p\alpha$ e $p\beta$ do cálcio em uma amostra.

A partir da detecção dos elementos químicos Ca e P, foram em seguida mensurados seus percentuais, que estão apresentadas nos gráficos 1 e 2.

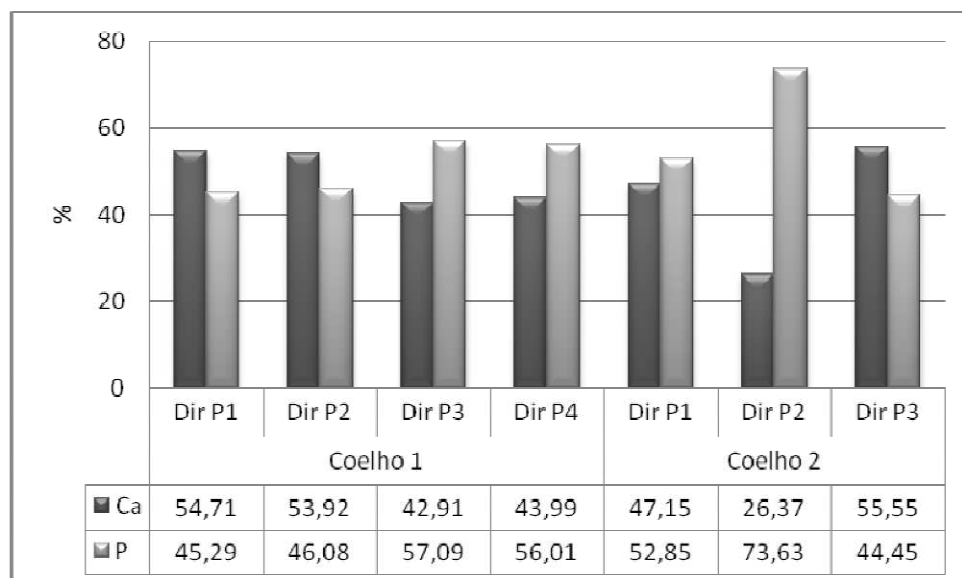


Gráfico 1. Percentuais de Ca e P encontrados nos espécimes que foram submetidas a DO, empregando a XRF (coelho 1 – com LLLT; coelho 2 – sem LLLT).

Fonte: Gaião, L (2008).

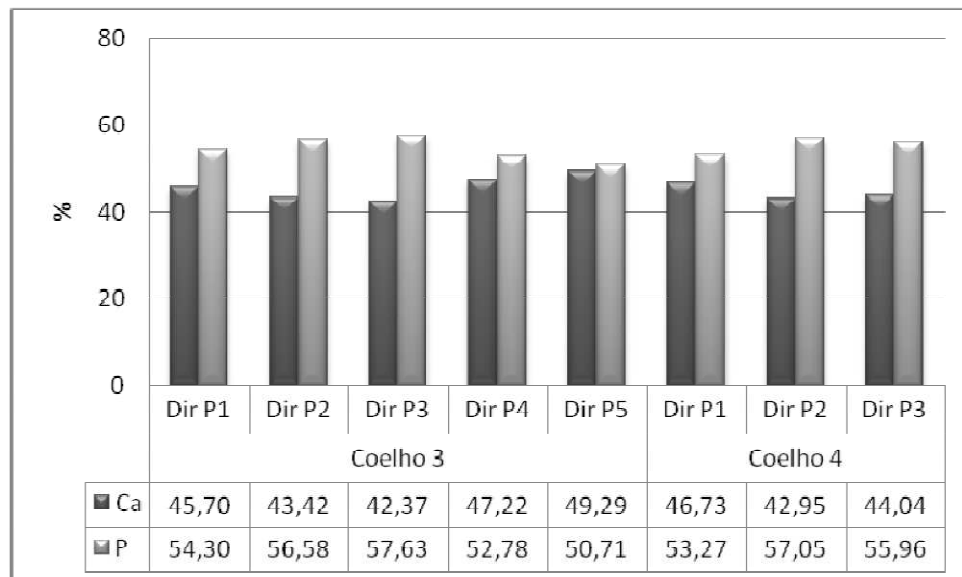


Gráfico 2. Percentuais Ca e P encontrados nos espécimes que não foram submetidas a DO, empregando a XRF (coelho 3 – com LLLT; coelho 4 – sem LLLT).

Fonte: O autor (2008).

A partir dos percentuais apresentados nos gráficos anteriores, foram calculadas as razões entre o percentual em massa de Ca e P, que indicam uma tendência de mineralização maior nos grupos irradiados com LLLT (Tabela 3). Foram encontradas razões inferiores às esperadas das hidroxiapatitas puras conhecidas (1,2), entretanto nos mesmos padrões esperados para o tecido ósseo já publicados, por outro método de análise (KRAWCZYK *et al.*, 2007).

Tabela 3. Média das razões entre Ca/P encontradas, por coelho.

	Média	Dp	Mínimo	Máximo
Coelho 1	0,98	0,24	0,75	1,21
Coelho 2	0,83	0,44	0,36	1,25
Coelho 3	0,84	0,09	0,74	0,97
Coelho 4	0,81	0,06	0,75	0,88

Fonte: O autor (2008).

A razão entre Ca e P do coelho 1 em relação ao coelho 3, ambos irradiados, indicam o que o efeito do LLLT dá-se principalmente nos estágios iniciais da osteogênese, o que corrobora com os achados de Saito e Shimizu (1997).

Os elementos Ca e P encontrados em tecidos ósseos são, principalmente, os constituintes de hidroxiapatita, a qual é encontrada em ossos como pequenos cristais e pode conter impurezas, incluindo carbonato e magnésio. Tais imperfeições são importantes por deixar a hidroxiapatita do tecido ósseo mais solúvel, permitindo trocas de íons necessárias a homeostase. A porção mineral do osso contém 96% do cálcio e 85% do fósforo de todo o organismo. As razões encontradas entre estes elementos indicam as propriedades mecânicas do tecido ósseo, expressando sua organização e estado de amadurecimento (BOHIC *et al.*, 1998; SHEA e MILLER, 2005).

4.2.2 Espectroscopia por difração de raios X (XRD)

O objetivo desta análise foi identificar, nos difratogramas obtidos da amostras, semelhança com àqueles da hidroxiapatita pura. De forma a caracterizar a estrutura cristalina do tecido ósseo do sítio da DO.

A partir do banco de dados PDFWIN[®] (ICSD), foram encontrados 20 diferentes tipos de hidroxiapatita (ANEXO D), os quais tiveram os picos de seus difratogramas comparados àqueles obtidos dos espécimes do estudo.

Foram encontrados nos espécimes analisados difratogramas com intensidades nos ângulos $2\theta = 31,8^\circ$ e $25,9^\circ$ (Figura 20), apresentando semelhança com as hidroxiapatitas, conforme os pdf#03-0747, 09-0432, 24-0033, 72-1243, 73-0293, 74-0565, 74-0566, 74-1731, 76-0694, 82-1943, 84-1998, 86-0740, 86-1199, 86-1201, 86-1203, 89-6437, 89-6438, 89-6439, 89-6440 (estrutura cristalina hexagonal) e 89-4405 (estrutura cristalina monoclinica).

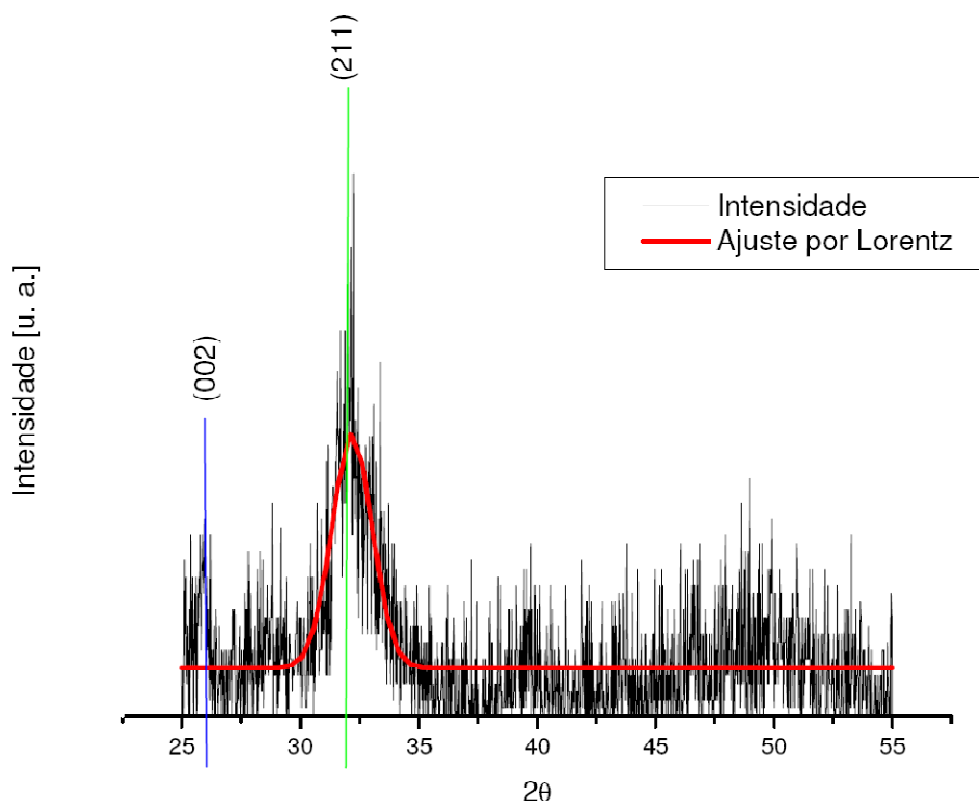


Figura 20. Difratograma do coelho 1.

Fonte: O autor (2008).

Os difratogramas obtidos indicaram que as amostras analisadas são hidroxiapatitas, mesmo tendo alto nível de ruído e picos expressados em baixas intensidades, o que pode limitar a análise qualitativa dos difratogramas. Este alto nível de ruído pode ser atribuído à pequena quantidade de material disponível para análise, impossibilitando de obtenção de um pó de granulação mínima e homogênea. O emprego de animais de maior porte, como ovelhas e porcos, pode suprimir tal limitação.

A largura de uma linha de XRD (por exemplo, 002 e 211) indica a cristalinidade num plano específico de difração, quanto mais estreita mais cristalina é a amostra.

Além da identificação da hidroxiapatita, nos difratogramas pode ser calculada a cristalinidade (razão entre os percentuais cristalinos e amorfos) dos espécimes. O ajuste de Lorentz foi empregado nestes cálculos, conforme descrito na metodologia (Gráfico 3).

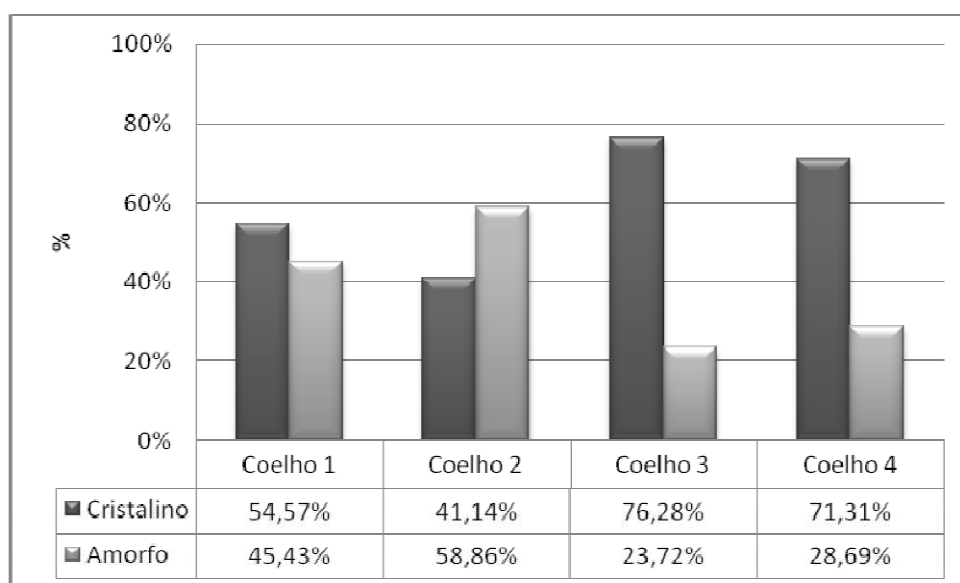


Gráfico 3. Percentuais cristalinos e amorfos encontrados.

Fonte: O autor (2008).

Os percentuais de cristalinidade indicaram com precisão um efeito biomodulador do LLLT, tornando o tecido ósseo com maior percentual cristalino nos coelhos com e sem DO, o que expressa um tecido ósseo apresentando cristais com tamanho, ordem e perfeição superiores. Os resultados mostram que o percentual de cristalinidade do coelho submetido à DO com LLLT, aproximou-se

daqueles dos coelhos não submetidos à DO, apontando para uma regeneração óssea mais rápida com o emprego da LLLT.

A análise dos coelhos não submetidos à DO possibilitou a comparação com os coelhos submetidos ao procedimento cirúrgico, funcionando como controle negativo no experimento, este tipo de desenho metodológico foi empregado por Pampu *et al.* (2008), que analisou a influência do PRP na DO, com período de latência e com ativação imediata do distrator.

Os resultados de cristalinidade concordaram com os resultados obtidos nos estudos de histomorfometria, indicando uma coincidência do grau de maturação com a cristalinidade das amostras. Estes estudos, conforme já descrito, são de fácil preparação e não exigem nenhuma alteração das amostras, como ataques ácidos para desmineralização, cortes precisos para obtenção de lâminas nem leituras que são operador-dependente. Assim, o uso da cristalinidade como padrão para medir a maturação do tecido ósseo, é uma medida rápida e precisa que fornece uma avaliação quantitativa da grandeza que se quer medir.

Os coelhos 3 e 4, não submetidos à DO, apresentaram-se com cristalinidades equivalentes, mostrando a inexpressiva ação do LLLT no osso normal, já maduro. Espera-se que com o aumento do tempo de consolidação óssea, o coelho submetido à DO com LLLT evolua mais rapidamente para uma cristalinidade semelhante ao coelho sem DO.

Assim, tem-se que tanto na análise histológica quanto na física encontrou-se ação positiva do LLLT nos grupos irradiados, comprovada, estatisticamente, entre os grupos da análise histológica.

Miller *et al.* (2001) encontrou uma relação inversamente proporcional entre a quantidade de íon fosfato (PO_4^{3-}) e a cristalinidade. A observação, na análise do XRF, do conteúdo de P (presente no PO_4^{3-}) menor nos coelhos irradiados, pode indicar um osso mais maduro, o que corrobora com a cristalinidade superior destes animais e também com o grupo irradiado analisado por meio do percentual de neoformação óssea. Este estudo foi o único encontrado, empregando a análise de XRD em amostras de ossos.

Outros estudos empregaram o XRD, visando caracterizar os seguintes materiais: 1. Zyman *et al.* (1998): implantes cerâmicos de fosfato de cálcio; 2. Hayakawa *et al.* (2001): a hidroxiapatita presente na superfície de implantes de

titânio revestidos com fosfato de cálcio; 3. Lobato *et al.* (2006): implantes de α e β -tricálcio fosfato; e 4. Zhou *et al.* (2008): superfície de implantes de titânio.

Entretanto, tais pesquisas empregaram a técnica de XRD apenas na caracterização de materiais comercializáveis, diferentemente do que é proposto neste estudo, ou seja: empregar um teste de precisão nas análises quantitativa e qualitativa do tecido ósseo, sem a interferência da subjetividade do pesquisador nos resultados.

A utilização de diversificadas técnicas de análise nos mesmos animais segue influência dos comitês de ética em pesquisa com animais para maximizar os resultados de estudos empregando animais. O emprego de animais submetidos à DO sem aplicação do LLLT como grupos controle procede do efeito sistêmico atribuído à variável independente empregada neste trabalho. Miloro *et al.* (2007) desconsideraram este efeito, ao compararem em uma DO mandibular bilateral o efeito do LLLT aplicada em um dos lados, servindo o outro como controle, o que limita a inferência de seus resultados, mesmo demonstrado efeito positivo do LLLT.

Na análise histológica, para minimizar o viés de avaliação dos examinadores, foi realizado treinamento, calibração, cegamento e teste inter-examinadores. Nas análises físicas, há um risco menor de interferência do examinador nos resultados, entretanto a interpretação exige conhecimento e experiência nas técnicas, mas que já estão disponíveis em alguns laboratórios no Brasil.

A avaliação dos espectros de fluorescência apresenta informações precisas da proporção entre Ca e P no tecido ósseo, indicando se há o ambiente necessário para a formação de um osso de qualidade. A avaliação dos difratogramas de raios X indica se as fases formadas são as correspondentes à hidroxiapatita, enquanto a cristalinidade mostra o estágio de maturação dos ossos neoformados. Desta forma, as análises físicas de difração e fluorescência de raios X combinadas permitiram obter resultados equivalentes aos obtidos nos testes de HE, porém sem o inconveniente de ser operador-dependente.

O emprego de um teste já consolidado e amplamente utilizado (HE) foi importante por possibilitar a comparação dos resultados obtidos nos testes físicos empregados neste experimento, para propor novas e qualificadoras alternativas

de análise. A partir da equivalência dos resultados aferidos, é possível gerar protocolos inovadores para a análise de tecido ósseo.

5 CONCLUSÕES

A partir da metodologia empregada e dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- a LLLT apresentou efeito positivo no percentual de osso neoformado no sítio da DO, através de análise histomorfométrica;
- o resultado da ação da LLLT sugere um efeito positivo na composição química do sítio da DO, quanto às razões entre cálcio e fósforo;
- ocorreu a possibilidade de comprovação da quantificação da regeneração óssea do sítio da DO, por intermédio da identificação operador-independente da hidroxiapatita na estrutura cristalina;
- o emprego da LLLT resultou em efeito biomodulador positivo na cristalinidade do sítio da DO.

6 REFERÊNCIAS

ALMEIDA-LOPES, L; MASSINI, A.S. Laser de Baixa Potência e seus Parâmetros Energéticos. **J Bras Odontol Clin**, v. 1, n. 4, p.3-5, 2000.

ALRUHAIMI, K. A. Effect of calcium sulphate on the rate of osteogenesis in distract bone. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 30, n. 3, p.228-233, 2001.

AL-SEBAEI, M.O.; GAGARI, E.; PAPAGEORGE, M. Mandibular distraction osteogenesis: a rabbit model using a novel experimental design. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 63, p. 664-672, 2005.

BLAYA, D. S. et al. Histologic study of the effect of Laser therapy on bone repary. **J Contemp Dent Pract**, v. 9, n. 6, p. 41-48, 2008.

BLOCK, M. S.; BAUGHMAN, D. G. Reconstruction of severe anterior maxillary defects using distraction osteogenesis, bone grafts, and implants. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 63, p. 291-297, 2005.

BOHIC, S. et al. Transmission FT-IR microspectroscopy of mineral phases in calcified tissues. **Biophysics**, v. 321, p. 865-876, 1998.

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

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.

EL-HAKIM, I. E. et al. Preliminary investigation into the effects of electrical stimulation on mandibular distraction osteogenesis in goats. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 33, n. 1, p. 42-47, 2004.

GUZZARDELLA, G. A. et al. Laser stimulation on bone defect healing: an in vitro study. **Lasers in Medical Science**. v. 17, n. 3, p. 216-220, 2002.

HAGIWARA, T.; BELL, W. H. Effect of electrical stimulation on mandibular distraction osteogenesis. **J Cranio-Maxillofac Surg**, v. 28, n. 1, p.12-19, 2000.

HAMDY, R. C. et al. Effects of osteogenic protein-1 on distraction osteogenesis in rabbits. **Bone**, v. 33, p. 248-255, 2003

HAYAKAWA, T. et al. Trabecular bone response to surface roughened and calcium phosphate (Ca-P) coated titanium implants. **Biomaterials**, v. 23, p. 1025-1031, 2002.

ILIZAROV, G. A. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: Part 1. The influence of stability of fixation and soft tissues preservation. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 238, p. 249-281, 1989a.

_____. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: Part 2. The influence on rate and frequency of distraction. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 239, p. 263-285, 1989b.

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

KRAWCZYK, A. K., et al. Experimental studies on the effect of osteotomy technique on the bone regeneration in distraction osteogenesis. **Bone**, v. 40, n. 3, p. 781-791, 2007.

LOBATO, J. V. et al. Assessment of Bonelike[®] graft with a resorbable matrix using an animal model. **Thin Solid Films**, v. 515, p. 362-367, 2006.

MICHIELI, S.; MIOTTI, B. Lengthening of mandibular body by gradual surgical-orthodontic distraction. **J Oral Surg**, v. 35, p. 187-197, 1977.

MILLER, L. M. et al. In situ analysis of mineral content and crystallinity in bone using infrared micro-spectroscopy of the ν_4 PO_4^{3-} vibration. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1527, p. 11-19, 2001.

MILORO, M.; MILLER, J.J.; STONER, J.A. Low-Level Laser effect on mandibular distraction osteogenesis. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 65, p. 168-76, 2007.

MOFID, M. M. et al. Craniofacial distraction osteogenesis: a review of 3276 cases. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Baltimore, v. 108, n. 5, p. 1103-1117, 2001.

PAMPU, A. A. et al. Histomorphometric evaluation of the effects of zoledronic acid on mandibular distraction osteogenesis in rabbits. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 66, n. 5, p. 905-910, 2008.

RAINER, A. G. H.; CHIARI, F. M. Horizontal distraction of the anterior maxilla in combination with bilateral sinuslift operation – preliminary report. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 34, p. 37-44, 2005.

SAITO, S.; SHIMIZU, N. Stimulatory effects of low-power Laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopaedics**, v. 111, p. 525-32, 1997.

SHEA, J. E.; MILLER, S. C. Skeletal function and structure: implications for tissue-targeted therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 945-957, 2005.

SHIMAZAKI, A. et al. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates bone maturation in distraction osteogenesis in rabbits. **Journal of Bone and Joint Surgery (Br)**, v. 82B, p. 1077-1082, 2000.

SILVA JÚNIOR, A. N. et al. Computerized Morphometric Assessment of the Effect of Low-Level LLLT therapy on bone repair: an experimental animal study. **J Clinic Laser Med Surg**, v. 20, n. 2, p. 83-87, 2002.

SNYDER, C. C. et al. Mandibular lengthening by gradual distraction: preliminary report. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 51, p. 506-508, 1973.

SWENNEN, G. R. J. et al. Effect of platelet-rich-plasma on cranial distraction osteogenesis in sheep: preliminary clinical and radiographic results. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 34, n. 3, p. 294-304, 2005.

TAVAKOLI, K. et al. The role of latency in mandibular osteodistraction. **J Cranio Surg**, v. 26, p. 209-219, 1998.

TIPLER, P. A. **Física: Física Moderna: Mecânica Quântica, Relatividade e a Estrutura da Matéria**. 4a ed. Rio de Janeiro: LTC. 2000, 187p.

TIPLER, P. A. **Física Moderna**. Rio de Janeiro: Guanabara Dois. 1981, 422p.

UCKAN, S.; HAYDAR, S. G.; DOLANMAZ, D. Alveolar distraction: analysis of 10 cases. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 94, p. 561-565, 2002.

Van STRIJEN, P. J. et al. Complications in bilateral mandibular distraction osteogenesis using internal devices. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 96, p. 392-397, 2003.

_____. Stability after distraction osteogenesis to lengthen the mandible: results in 50 patients. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v. 62, p. 304-307, 2004.

WEBER 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.

WHITESIDES, L. M.; MEYER, R. A. Effect of distraction osteogenesis on the severely hypoplastic mandible and inferior alveolar nerve function. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 62, p. 292-297, 2004.

YAAKOBI, T.; MALTZ, L.; ORON, U. Promotion of bone repair in the cortical bone of the tibia in rats by low energy Laser (He-Ne) irradiation. **Calcifying Tissue International**, v.59, n. 4, p. 297-300, Oct. 1996.

YAZAWA, M.; KISHI, K.; NAKAJIMA, H.; NAKAJIMA, T. Expression of bone morphogenetic proteins during mandibular distraction osteogenesis in rabbits. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 61, p. 587-592, 2003.

ZHOU, Y. et al. Roles of bone scintigraphy and resonance frequency analysis in evaluating osseointegration of endosseous implant. **Biomaterials**, v. 29, p. 461-474, 2008.

ZYMAN, Z. et al. Inorganic phase composition of remineralisation in porous CaP ceramics. **Biomaterials**, v. 19, p. 1269 – 1273, 1998.

ANEXO A – Aprovação do Projeto pela Comissão Científica e de Ética da
Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do
Sul.



Comissão Científica e de Ética
Faculdade da Odontologia da PUCRS

Porto Alegre 08 de agosto de 2005

O Projeto de: Pesquisa

Protocolado sob nº: 0058/05

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

do(a) aluno(a): *Marconi Eduardo Sousa Maciel Santos, Leônilson Gaião
de Melo, Diego Segatto Blaya*

Programa de: *Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial*

do curso de: *Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial*

Nível: *Mestrado*

Orientado pelo(a): *Profa. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira*

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia
da PUCRS em *05 de agosto de 2005*.

Profa. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira
Presidente da Comissão Científica e de Ética da
Faculdade de Odontologia da PUCRS

ANEXO C – Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Experimentação da
Universidade Federal de Pelotas.



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



Ofício 1393/06-CEP

Porto Alegre, 01 de dezembro de 2006.

Senhor(a) Pesquisador(a):

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

Sua investigação está autorizada a partir da
presente data.

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

Atenciosamente,


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

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

ANEXO C – Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Experimentação da
Universidade Federal de Pelotas.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
BIOTÉRIO CENTRAL

COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO

Protocolo CEEA n°

Parecer n° 03/07

Pesquisador: Prof^ª. Dr^ª. Marília Gerhardt de Oliveira

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

Entrada: 10 de maio de 2007

Reunião: 27/07/2007

Situação do Projeto:

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

Relator: Prof. Milton Oliveira Amado.

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