



**MESTRADO PROFISIONAL EM TECNOLOGIA MINIMAMENTE INVASIVA E
SIMULAÇÃO NA ÁREA DE SAÚDE**

TIBÉRIO GOMES MAGALHÃES

**EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NO REPARO DE ENXERTO
ÓSSEO AUTÓGENO PARTICULADO: ANÁLISE HISTOLÓGICA E
HISTOMORFOMÉTRICA**

FORTALEZA

2017

TIBÉRIO GOMES MAGALHÃES

EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NO REPARO DE ENXERTO
ÓSSEO AUTÓGENO PARTICULADO: ANÁLISE HISTOLÓGICA E
HISTOMORFOMÉTRICA

Dissertação apresentada ao curso de mestrado em Tecnologia Minimamente Invasiva e Simulação na Área de Saúde do Centro Universitário Christus, como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Abrahão Cavalcante Gomes de Souza Carvalho

Fortaleza

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Ficha catalográfica elaborada por Tereza Cristina Araújo de Moura – Bibliotecária – CRB-3/884

M188e Magalhães, Tibério Gomes.

Efeito do laser de baixa intensidade no reparo de enxerto ósseo autógeno particulado: análise histológica e histomorfométrica / Tibério Gomes Magalhães. – 2017.

60 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado) – Centro Universitário Christus - Unichristus, Mestrado Profissional em Tecnologia Minimamente Invasiva e Simulação na Área de Saúde, Fortaleza, 2017.

Orientador: Prof. Dr. Abrahão Cavalcante Gomes de Souza Carvalho.

Área de concentração: Simulação do ensino da área cirúrgica.

1. Terapia a laser de baixa intensidade. 2. Transplante ósseo. 3. Osso parietal. I. Título.

CDD 617.6059

TIBÉRIO GOMES MAGALHÃES

EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NO REPARO DE ENXERTO
ÓSSEO AUTÓGENO PARTICULADO: ANÁLISE HISTOLÓGICA E
HISTOMORFOMÉTRICA

Dissertação submetida à coordenação do curso de Pós-Graduação em Tecnologia Minimamente Invasiva do Centro Universitário Christus, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Abrahão Cavalcante Gomes de Souza Carvalho

Aprovada em: 06/04/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Abrahão Cavalcante Gomes de Souza Carvalho (Orientador)
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

Prof. Dr. Fabrício Bitu Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Ramilye Araújo Lima
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pelo dom da vida e por sempre estar ao meu lado nessa caminhada, me guiando e fazendo com que a serenidade e a fé estejam sempre presentes.

Aos meus pais, Manuel e Magda, meus grandes exemplos de bondade, honestidade e ética. Tudo que sou hoje devo a vocês. Serei eternamente grato por todo o esforço que sempre fizeram para me proporcionar o melhor que podiam. Vocês que, muitas vezes, renunciaram seus sonhos para que eu e meus irmãos pudéssemos realizar os nossos. Amo vocês.

Ao meu amor, minha esposa Fabiana, que está comigo em toda minha caminhada profissional. Você foi a maior incentivadora para que eu fizesse mais essa pós-graduação. Sem seu apoio, com toda certeza, não estaria subindo mais esse degrau. Essa conquista também é sua! Te amo muito.

À minha filha Laís, razão e inspiração da minha vida. Você me mostrou o verdadeiro significado do que é um amor incondicional. A você, meu bem mais precioso, dedico toda e qualquer conquista.

Aos meus irmãos Tiago e Rafael pela amizade e convivência harmoniosa. Saibam que sempre podem contar comigo.

Ao meu sogro Tadeu e minha sogra Alcilene por todo o apoio e pelos momentos felizes que temos vivido ao longo desses anos. Sou muito feliz por fazer parte dessa família.

Ao amigo/irmão Gabriel. Tenho a sorte de ter sua amizade e companheirismo ao longo desses 18 anos. Fico muito feliz por saber que nossa amizade só se fortalece ao longo dos anos. Que venham mais conquistas juntos, meu amigo!

Ao meu orientador e amigo Abrahão pelos ensinamentos e palavras de motivação transmitidos. Você é uma referência como pessoa e como profissional para mim. Muito obrigado por tudo!

Ao professor Paulo Goberlânio por todo o tempo dedicado e conhecimentos transmitidos. Sua colaboração foi essencial para a realização desta pesquisa.

Aos alunos da iniciação científica, Gabriela Maia, Juliana Vechio, Amanda Girão, Cássia Nóbrega, Francisco Chagas, Lia Mayra, José Carlos, Wallyson, Mikaella e Paulo Vitor, pela amizade e colaboração na realização deste trabalho.

Aos funcionários do biotério da Unichristus, Emanuel, Ailton e Anilson, pelo excelente trabalho realizado e pela amizade construída nesses últimos meses.

A todos os colegas da primeira turma do mestrado em Tecnologia Minimamente Invasiva e Simulação em Saúde. Enfrentamos juntos esse desafio que é ser a primeira turma de mestrado em saúde da Unichristus.

Ao Centro Universitário Christus, por proporcionar toda a estrutura e apoio necessário para a realização desta pesquisa.

“É graça divina começar bem. Graça maior é persistir na caminhada certa. Mas a graça das graças é não desistir nunca.”

Dom Helder Câmara

RESUMO

Magalhães, T.G. **EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NO REPARO DE ENXERTO ÓSSEO AUTÓGENO PARTICULADO: ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA** [Dissertação]. Fortaleza: Centro Universitário Christus, 2017

Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do laser de baixa intensidade (LBI) no reparo ósseo em defeitos de crânio criados cirurgicamente em calvária de ratos tratados com enxerto ósseo autógeno (AB).

Material e métodos: O estudo foi realizado em 40 ratos machos (*Rattus norvegicus*, albinus, Wistar), pesando 200 - 250 g. Para a realização dos procedimentos experimentais, os ratos foram anestesiados e dois defeitos com 4 mm de diâmetro foram criados em cada animal. Os animais foram divididos em dois grupos: Grupo Controle (defeito direito - preenchido com coágulo sanguíneo; defeito esquerdo - preenchido com osso autógeno) Grupo Experimental (defeito direito - preenchido com coágulo sanguíneo + LBI; defeito esquerdo - preenchido com osso autógeno + LBI). Os animais tratados com LBI receberam aplicações de laser no comprimento de onda do espectro infravermelho ($\lambda = 808 \text{ nm}$) e densidade de energia de 70 J / cm^2 , durante 20 s. Os animais foram sacrificados nos dias 3, 7, 14 e 28 do pós-operatório e receberam 1,3, 5 e 7 aplicações de LBI, respectivamente. Foi realizada análise histológica. A porcentagem de áreas de neoformação óssea foi avaliada através da análise histomorfométrica e os dados submetidos à análise estatística. Adicionalmente, os autores sugeriram no estudo um protocolo de laserterapia para ser testado em procedimentos em procedimentos clínicos de enxerto ósseo.

Resultados: O grupo experimental (enxerto ósseo + LBI) apresentou maior área de osso neoformado ($p < 0,001$) no período de 7 dias de pós-operatório. No período de 14 dias o Grupo Experimental (coágulo + LBI; enxerto ósseo + LBI) apresentou maior neoformação óssea que o Grupo Controle ($p = 0,038$). Foi sugerido um novo protocolo para ser avaliado em cirurgia de enxerto ósseo

Conclusão: A terapia com laser de baixa intensidade pode acelerar o processo de reparo de defeitos ósseos.

Palavras chave: Terapia a laser de baixa intensidade, transplante ósseo, osso parietal

ABSTRACT

Magalhães, T.G. **EFFECT OF LOW LEVEL LASER IN REPAIR OF PARTICULATED AUTOGENOUS BONE GRAFT: HISTOLOGICAL AND HISTOMORPHOMETRIC ANALYSIS** [Dissertation]. Fortaleza, Ce: Centro Universitário Christus, 2017.

Objective: The objective of this study was to evaluate the effect of low-level laser (LLL) on bone healing process in surgically created defects in rat calvaria treated with autogenous bone graft (AB).

Material and methods: The study was conducted on 40 male rats (*Rattus norvegicus*, albinus, Wistar), 200–250 g weight. For accomplishment of the experimental procedures, the rats were anesthetized and two defects in the parietal bone with 4-mm diameter were created in each animal. The animals were divided into two groups: Control Group (right defect – filled with blood clot; left defect – filled with autogenous bone) Experimental Group (right defect – filled with blood clot + LLL; left defect – filled with autogenous bone + LLL). The animals treated with LLL received applications of laser at the infrared spectrum wavelength ($\lambda = 808$ nm) and energy density of 70 J/cm^2 , during 20 s. The animals were euthanized at 3, 7, 14 and 28 days postoperatively and received 1, 3, 5 and 7 LLL applications, respectively. A histological analyses was performed. The percentage of newly formed bone area was evaluated through histomorphometric analysis and the data were submitted to the statistical analysis. Additionally, the authors suggested a laser protocol to be tested in bone graft procedures.

Results: The experimental group (bone graft + LLL) presented larger newly formed bone area ($p < 0.001$) at 7 days post-operation. In the period of 14 days, the Experimental Group (blood clot + LLL; bone graft + LLL) presented greater newly bone formation area than the Control Group ($p = 0,038$)

Conclusion: Low level laser therapy can accelerate the healing of bone defects.

Key Words: Low-level light therapy, bone transplantation, parietal bone

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Desenho esquemático dos grupos e defeitos criados.....	20
Figura 2 - Infiltração de solução anestésica por via intraperitoneal para sedação dos animais	21
Figura 3 - Infiltração de anestésico local	22
Figura 4 - Vista superior da calota craniana do animal após o rebatimento do retalho de espessura total para região posterior	22
Figura 5 - Posicionamento da broca trefina, acoplada ao contra-ângulo redutor 20:1 durante a osteotomia.....	23
Figura 6 - Posicionamento da espátula Hollenback 3s para remoção do bloco ósseo.....	24
Figura 7 - Vista superior da calota craniana após realização das osteotomias . No lado direito o defeito ósseo foi preenchido naturalmente com coágulo e no lado esquerdo o defeito foi preenchido com osso autógeno	24
Figura 8 - Vista superior mostrando a sutura interrompida simples na pele do animal.....	25
Figura 9 - Aplicação do laser de baixa intensidade	26
Figura 10 - Software LAS (Leica Application Suite) utilizado para captura das imagens no microscópio.....	29
Figura 11 - Processo de análise das imagens para a histomorfometria.....	30
Figura 12 - Fotomicrografia dos defeitos controle e experimental com 3 dias de observação. H.E. Original. 100x.....	33
Figura 13 - Fotomicrografia dos defeitos controle e experimental com 07 dias de observação. H.E. Original. 40x.....	35
Figura 14 - Fotomicrografia dos defeitos Controle Enxerto e Laser Enxerto com 07 dias de observação. H.E Original 40X.....	36
Figura 15 - Fotomicrografia do defeito Laser Enxerto no período de 7 dias. H.E. Original. 100X.....	37
Figura 16 - Fotomicrografia dos defeitos Controle Coágulo e Laser Coágulo com 14 dias de observação. H.E. Original. 40x.....	39
Figura 17 - Fotomicrografia dos defeitos Controle Enxerto e Laser Enxerto com 14 dias de observação. H.E. Original 40x.	40

Figura 18 Fotomicrografia do defeito Laser Coágulo no período de 14 dias. H.E. Original. 100x.	41
Figura 19 - Fotomicrografia dos defeitos Controle Coágulo e Laser Coágulo com 28 dias de observação. H.E. Original. 40x.....	43
Figura 20 - Fotomicrografia dos defeitos Controle Enxerto e Laser Enxerto com 28 dias de observação. H.E. Original 40x.	44
Figura 21 - Fotomicrografia do defeito Controle Coágulo no período de 28 dias. H.E. Original. 100X.....	45
Figura 22 - Gráfico mostrando a percentagem de osso neoformado nos períodos de 7,14 e 28 dias.....	46
Figura 23 - Gráfico mostrando a percentagem de osso total nos períodos de 7,14 e 28 dias.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sessões de laserterapia por períodos do estudo	27
Tabela 2 - Sugestão de protocolo de laserterapia para ser testado na prática clínica de cirurgias de enxerto ósseo	49

LISTA DE ABREVIATURAS

LBI – Laser de baixa intensidade

HeNe - Hélio-Neônio

AsGa - Arseneto de Gálio

AsGaAl - Arseneto de Gálio e Alumínio

ATP – Trifosfato de adenosina

nm - nanômetro

μm – Micrômetro

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

UNICHRISTUS – Centro Universitário Christus

R.P.M - Rotações por minuto

J – Joules

J/cm^2 – Joules por centímetro quadrado

mW – Miliwatt

A_n – Área total do osso neoformado

A_t - Área total do defeito

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Problematização	16
1.2 Hipótese	17
1.3 Justificativa	17
2 OBJETIVOS	188
2.1 Gerais	18
2.2 Específicos.....	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1 Tipo de estudo	19
3.2 Considerações éticas.....	19
3.3 Descrição da amostra	19
3.4 Técnica operatória e materiais utilizados	21
3.5 Terapia com laser de baixa intensidade.....	25
3.6 Eutanásia e coleta das amostras	27
3.7 Preparo das lâminas histológicas.....	27
3.8 Análise histológica descritiva	28
3.9 Análise histomorfométrica	29
3.10 Análise estatística	31
4 RESULTADOS.....	32
4.1 Análise qualitativa	32
4.1.1 Período de 3 dias	32
4.1.2 Período de 7 dias	33
4.1.3 Período de 14 dias	37
4.1.4 Período de 28 dias	41
4.2 Análise histomorfométrica.....	45

4.2.1 Avaliação do percentual de área referente ao osso neofornado	45
4.2.2 Avaliação do percentual de área referente ao osso total	46
4.3 Sugestão de protocolo de terapia com laser de baixa intensidade para aplicação clínica.....	48
5 DISCUSSÃO	50
6 CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXO.....	61

1 INTRODUÇÃO

A Implantodontia é uma especialidade odontológica que visa a reabilitação do sistema estomatognático após perdas teciduais devido a doenças, traumatismos, atrofia, intervenções cirúrgicas, ou defeitos congênitos, restaurando a função, forma, estética e a autoestima de pacientes (KAZANCIOGLU; EZIRGANLI; AYDIN, 2013; VALIATI et al., 2012). É estimado que cerca de 2,2 milhões de procedimentos de enxerto ósseo são realizados em todo o mundo para reconstruir defeitos nos campos da cirurgia ortopédica, neurocirurgia, implantodontia e cirurgia buco-maxilo-facial (CUNHA et al., 2014; GARCIA et al., 2014).

Para realizar uma reabilitação oral é necessário, em muitos casos, submeter os pacientes à procedimentos de reconstruções ósseas antes da instalação de implantes dentários. O objetivo é induzir a regeneração, isto é, a neoformação óssea que, depois de passar por processos de remodelação, forma tecido ósseo idêntico ao tecido pré-existente (VALIATI et al., 2012). O processo de regeneração óssea, que inclui a proliferação e diferenciação dos fibroblastos, formação de matriz e calcificação, é influenciado por uma série de fatores biomecânicos, bioquímicos, celulares e hormonais (MONEA et al., 2015). Apesar dos avanços tecnológicos na Implantodontia, o volume ósseo suficiente no local de inserção de um implante, associado à sua correta posição tridimensional, são cruciais para o sucesso a longo prazo de uma reabilitação com implante dentário (GULTEKIN et al., 2016; CHAPPUIS et al., 2016).

Muitos métodos e materiais têm sido utilizados para reconstruir defeitos ósseos alveolares. Biomateriais são utilizados em cirurgias de enxerto ósseo e podem ser classificados em sintéticos ou aloplásticos e naturais. Exemplos de biomateriais sintéticos são sulfato de cálcio, fosfato de cálcio, polímeros e vidros bioativos. Biomateriais naturais são: enxerto ósseo autógeno (quando coletados do mesmo indivíduo), homogêneos (quando coletados de indivíduos da mesma espécie) e heterogêneos (coletados de espécies diferentes). Devido às suas propriedades osteogênicas, osteoindutoras e osteocondutoras, o enxerto autógeno é considerado o padrão ouro para reconstrução de defeitos ósseos alveolares, apresentando uma excelente previsibilidade e sucesso nos

resultados para a posterior instalações de implantes dentários (KAZANCIOGLU; EZIRGANLI; AYDIN, 2013; WU et al., 2015; GULTEKIN et al., 2016). Isso se deve a características de biocompatibilidade, gerando assim reações imunológicas mínimas, a presença de células osteogênicas viáveis e proteínas da matriz óssea que permitem a osteoindução e osteogênese nos defeitos tratados (GARCIA et al., 2014).

Terapias adjuvantes aos procedimentos de enxerto ósseo têm sido investigadas para reduzir a incapacidade funcional, o tempo de tratamento e os elevados custos socioeconômicos relacionados com os defeitos ósseos dos maxilares (BARBOSA et al., 2013; BABUCCU et al., 2014; GARCIA et al., 2014). Terapias com laser são frequentemente utilizadas como adjuvantes em vários tratamentos na Odontologia (MONEA et al., 2015). O termo laser é um acrônimo da língua inglesa que significa Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, ou seja, Amplificação de luz por emissão estimulada de radiação. Atualmente, no que diz respeito à nomenclatura, o termo laserterapia é utilizado para laser de baixa intensidade (LBI).

Os lasers são classificados na literatura, como lasers de baixa e alta intensidade, sendo as principais diferenças entre eles relacionadas à potência e o mecanismo de ação. Os lasers de alta intensidade agem por aumento de temperatura e os de baixa por mecanismos fotoquímicos, fotofísicos e fotobiológicos. O tipo de laser mais utilizado nos tratamentos clínicos odontológicos é o laser em baixa intensidade, uma vez que tem ação analgésica, antiinflamatória e bioestimulante, contribuindo para regeneração tecidual (NEVES et al., 2005)

A radiação laser de baixa intensidade é bem tolerada pelos tecidos e pode ser utilizada sem riscos para o paciente. Os tipos mais utilizados com estas finalidades são radiação laser Hélio-Neônio (HeNe), Arseneto de Gálio (AsGa) e Arseneto de Gálio e Alumínio (AsGaAl) (NEVES et al., 2005; ASNAASHARI & ZADSIRJAN, 2014).

O uso do LBI envolve a aplicação de uma luz monocromática com baixa densidade energética, que promova efeitos fotoquímicos não-térmicos no nível celular (BARBOSA et al., 2013). Trata-se de uma ferramenta terapêutica acessível, que não requer o uso concomitante de medicamentos e não promove danos térmicos ao tecido (SELLA et al., 2015). Investigações *in vivo* e

in vitro demonstraram que o uso do laser de baixa intensidade pode acelerar o processo de reparo de defeitos ósseos (BARBOSA et al., 2013).

O exato mecanismo de ação da terapia com o laser de baixa intensidade no reparo ósseo não é bem compreendido (BOSCO et al., 2016), mas tem sido descrito que pode promover angiogênese e aumentar o fluxo sanguíneo local (aumentando o fornecimento de células circulantes, nutrição, oxigênio e sais inorgânicos), aumento da atividade osteoblástica, organização das fibras colágenas e alterações nos níveis mitocondriais e de trifosfato de adenosina (ATP) intracelulares (BARBOSA et al., 2013; BATISTA et al., 2014; CUNHA et al., 2014; BABUCCU et al., 2014).

Em baixas doses, demonstrou-se que a terapia com o laser de baixa intensidade melhora a proliferação *in vitro* de vários tipos de células: fibroblatos, queratinócitos, células endoteliais, osteoblastos e linfócitos. Trata-se de um método não-invasivo de estimular a osteogênese e acelerar a cicatrização de defeitos ósseos (CUNHA et al., 2014). Essa modalidade terapêutica apresenta um importante efeito positivo na produção de fator de crescimento fibroblástico (bFGF), que estão envolvidos na transferência de sinalização entre o epitélio e o tecido conjuntivo, colaborando na deposição de fibras colágenas mais organizadas.

A fototerapia com laser pode proporcionar efeitos antiinflamatórios, analgésicos e bioestimulantes, aumentando a microcirculação da área irradiada e promovendo melhores condições de reparo (DE ALMEIDA et al., 2014).

1.1 Problematização

O uso de enxerto ósseo autógeno para posterior reabilitação com implante dentário é uma opção terapêutica para reconstrução de defeitos no rebordo alveolar, apresentando bons resultados e alta previsibilidade. Entretanto, o tempo prolongado para a cicatrização dos enxertos ósseos causa uma insatisfação dos pacientes, que permanecem com reabilitações provisórias ou até mesmo edêntulos durante esse período de reparo tecidual.

1.2 Hipótese

A terapia com laser de baixa intensidade diminui o tempo de reparo e aumenta a neoformação óssea dos enxertos autógenos realizados na calota craniana de ratos.

1.3 Justificativa

Na prática clínica do Cirurgião-Buco-Maxilo-Facial e Implantodontista, as cirurgias de enxerto ósseo, visando a reabilitação do sistema estomatognático, estão entre os procedimentos mais realizados. Esses tratamentos reabilitadores necessitam muitas vezes de múltiplos procedimentos cirúrgicos. Terapias com laser de baixa intensidade, adjuvantes às cirurgias de enxerto ósseo, têm sido investigadas para reduzir a incapacidade funcional relacionada ao defeito ósseo dos maxilares e ao edentulismo. A falta de estudos que proponham e avaliem protocolos para a aplicação de LBI em tratamentos de reconstrução óssea por enxerto justificam a presente pesquisa.

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

Avaliar o efeito do laser de baixa intensidade no processo de reparo dos enxertos ósseos autógenos particulados, colhidos da calota craniana de ratos.

2.2 Específicos

Realizar análise descritiva da cronologia do reparo ósseo em defeitos na calota craniana de ratos e a influência do LBI neste processo.

Quantificar a neoformação óssea de defeitos ósseos reconstruídos com enxerto ósseo autógeno particulado.

Sugerir um novo protocolo de laserterapia para ser avaliado em cirurgias de enxerto ósseo dos maxilares em humanos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo do tipo experimental, laboratorial, longitudinal, *in vivo*, de caráter analítico quantitativo, auto-controlado, com amostras independentes.

3.2 Considerações éticas

O presente trabalho foi encaminhado ao Comitê de Ética no uso de Animais (CEUA) da Unichristus e aprovado sob número do protocolo 004/16 (ANEXO). A pesquisa foi realizada seguindo as normas e diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), visando princípios e condutas que permitam garantir o cuidado e o manejo éticos de animais utilizados para fins científicos ou didáticos.

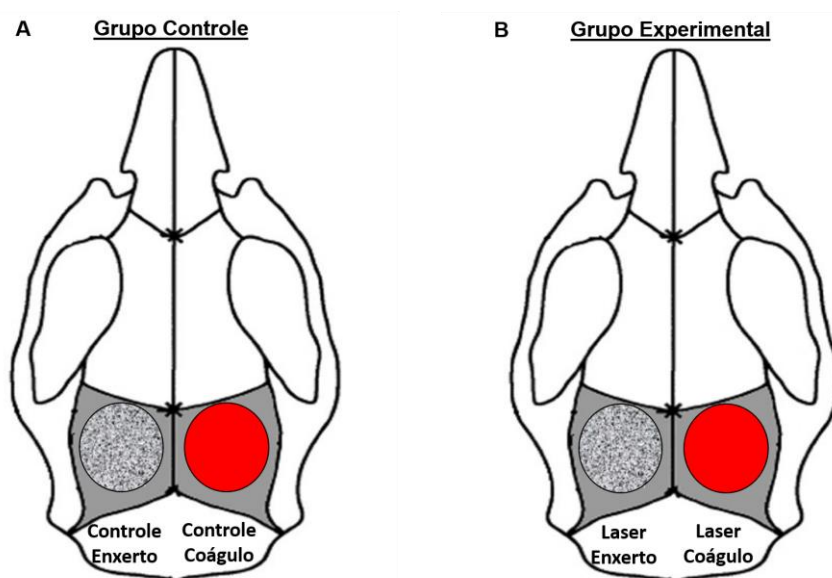
3.3 Descrição da amostra

Foram utilizados 40 ratos machos da linhagem Wistar (*Ratus norvegicus albinus*), clinicamente saudáveis, adultos jovens (entre 70 e 90 dias de vida), com massa corporal entre 200 – 250g, provenientes do Biotério da Unichristus. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno com assoalho forrado por serragem de pinho estéril, regularmente higienizadas, com acesso à ração peletizada padronizada e água *ad libitum*, sendo interrompida a distribuição destas 12 horas antes do procedimento cirúrgico. As condições de iluminação e climatização foram controladas, obedecendo a ciclos claro/escuro de 12 horas e temperatura entre 22 e 24°C. No pré-operatório, foram mantidos 5 animais em cada gaiola. No pós-operatório, devido ao porte cirúrgico, os animais foram mantidos em gaiolas individualizadas.

Os animais foram divididos em dois grupos: grupo controle e experimental com 20 ratos em cada grupo. Todos foram submetidos a duas osteotomias na região parietal, criando-se dois defeitos de 4 mm de diâmetro em cada animal. Nos grupos avaliados, os animais foram eutanasiados nos períodos de 3, 7, 14 e 28 dias pós-operatório, com 5 animais em cada período.

No grupo controle, o defeito do lado direito foi naturalmente preenchido por coágulo, sendo denominado de Controle Coágulo (CC), já no lado esquerdo deste grupo, o defeito foi preenchido por enxerto autólogo particulado manualmente, sendo denominado de Controle Enxerto (CE) (Figura 1A). Para o grupo experimental, o defeito do lado direito foi preenchido naturalmente por coágulo e recebeu aplicações de Laser conforme será descrito, sendo denominado de Laser Coágulo (LC), enquanto que o lado esquerdo do mesmo grupo foi preenchido por enxerto particulado manualmente e foi submetido a terapia com LBI, sendo denominado de Laser Enxerto (LE) (Figura 1B).

Figura 1- Desenho esquemático dos grupos e defeitos criados



Fonte: Elaborada pelo próprio autor

3.4 Técnica operatória e materiais utilizados

Cada animal recebeu medicação anestésica através da associação das drogas cloridrato de xilazina 2% (0,025ml/100g) (Francotar, Virbac do Brasil Ind. Com. Ltda., São Paulo, Brasil) e cloridrato de ketamina 5% (0,05ml/100g) (Vyrbaxil, Virbac do Brasil Ind. Com. Ltda., São Paulo, Brasil), por via intraperitoneal (Figura 2).

Figura 2 - Infiltração de solução anestésica por via intraperitoneal para sedação dos animais



Fonte: Elaborada pelo próprio autor

Em seguida, realizou-se tricotomia na região craniana, antissepsia com solução de clorexidina 2% (Indústria Farmacêutica Rioquímica, São José do Rio Preto, São Paulo), aposição de campos cirúrgicos e infiltração de anestésico local com lidocaína 2% e epinefrina 1:200.000 (DFL, Indústria & Comércio S.A, Rio de Janeiro, Brasil) no couro cabeludo (Figura 3) para promover anestesia trans e pós-operatória imediata, além de proporcionar uma hemostasia satisfatória durante o procedimento cirúrgico.

Figura 3 - Infiltração de anestésico local



Fonte: Elaborada pelo próprio autor

Em seguida, com o auxílio de uma lâmina de bisturi N°15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) montada em um cabo de bisturi N°3 (Golgran, São Caetano do Sul, São Paulo) foi realizado uma incisão semilunar no couro cabeludo, na região anterior da calvária, permitindo o rebatimento de um retalho de espessura total (Figura 4) para a região posterior (GARCIA et al.,

Figura 4 - Vista superior da calota craniana do animal após o rebatimento do retalho de espessura total para região posterior



Fonte: Elaborada pelo próprio autor

2014).

Com uso de brocas trefinas cirúrgicas (4 mm de diâmetro) montadas em um contra-ângulo redutor 1:20 (Kavo, Santa Catarina, Brasil) (Figura 5) acoplado a um motor elétrico cirúrgico, com velocidade constante de 1200 RPM, e sob irrigação externa contínua e abundante com solução fisiológica, foram realizadas osteotomias na região parietal bilateralmente, abrangendo toda a espessura da díploe, preservando a dura-máter e o cérebro durante a craniotomia.

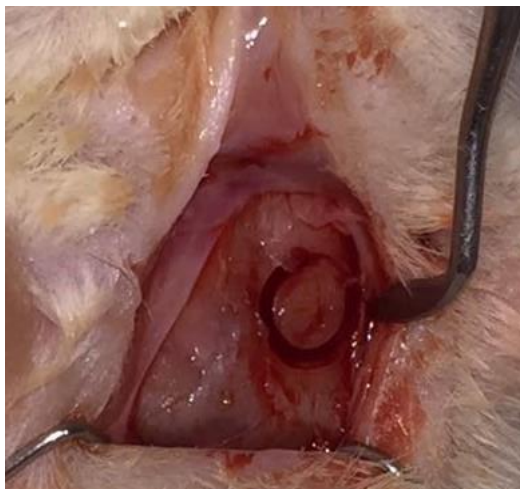
Figura 5 - Posicionamento da broca trefina, acoplada ao contra-ângulo redutor 20:1 durante a osteotomia



Fonte: Elaborada pelo próprio autor

Em seguida, o bloco ósseo parietal, foi cuidadosamente removido com ajuda de espátula Hollenback 3s (Golgran, São Caetano do Sul, São Paulo) (Figura 6) e armazenado temporariamente em uma cuba com soro fisiológico 0,9%.

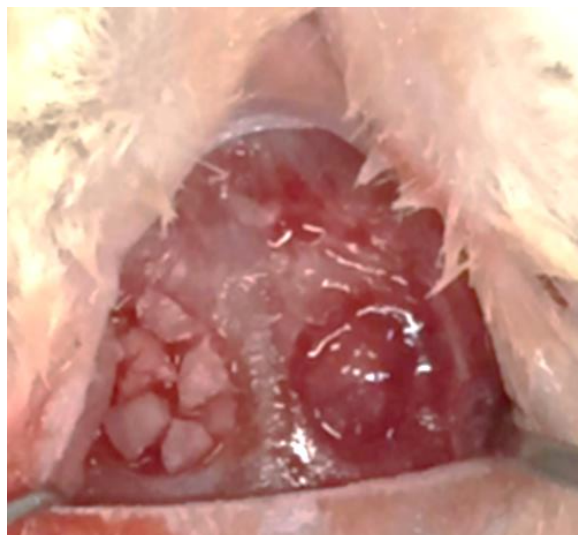
Figura 6 - Posicionamento da espátula Hollenback 3s para remoção do bloco ósseo



Fonte: Elaborada pelo próprio autor

Nos dois grupos, os defeitos criados no lado esquerdo foram preenchidos com osso autógeno particulado e inseridos no defeito. No lado direito o defeito foi naturalmente preenchido com coágulo (Figura 7).

Figura 7 - Vista superior da calota craniana após realização das osteotomias . No lado direito o defeito ósseo foi preenchido naturalmente com coágulo e no lado esquerdo o defeito foi preenchido com osso autógeno



Fonte: Elaborada pelo próprio autor

Em seguida, os tecidos moles foram reposicionados e suturados para permitir o fechamento primário (4-0 Nylon, Ethicon, Johnson & Johnson, São Paulo, Brasil) (Figura 8). Após os procedimentos cirúrgicos, cada animal recebeu uma injeção intramuscular de 24.000 UI de penicilina G benzatina (Pentabiótico veterinário pequeno porte, Fort Dodge, Saúde Animal Ltda., Campinas, SP, Brasil) e analgésico (Dipirona sódica 0.25mg/kg, Fort Dodge, Campinas, Brasil) subcutâneo no pós-operatório imediato. Todos os passos cirúrgicos foram realizados pelo mesmo cirurgião.

Figura 8 - Vista superior mostrando a sutura interrompida simples na pele do animal

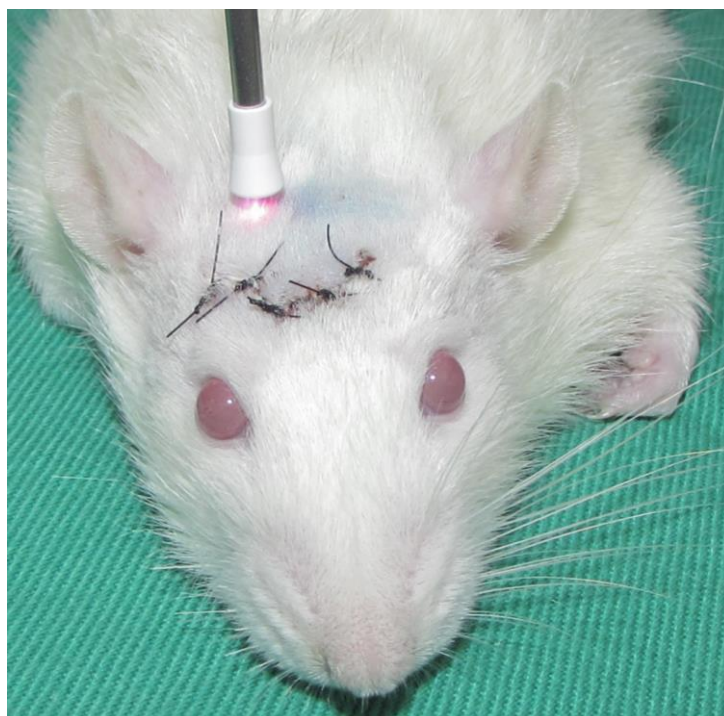


Fonte: Elaborada pelo próprio autor

3.5 Terapia com laser de baixa intensidade

Os animais do grupo experimental foram submetidos a terapia com laser de baixa intensidade, usando um laser diodo de Arseneto de Gálio Alumínio (AsGaAl) (Therapy XT-ESTM, DMC Equipamentos, São Carlos, SP, Brasil) que apresenta luz infravermelha com comprimento de onda de 808 nm, 100 mW de potência e spot size 0.028 cm². A aplicação foi feita de forma pontual, com uma dose por sessão de 2J e densidade de energia de 70 J/cm² na área do defeito ósseo durante 20 segundos, com a ponta do laser posicionada por cima e perpendicularmente ao longo eixo do osso e uma distância \leq 5mm (Figura 9).

Figura 9 - Aplicação do laser de baixa intensidade



Fonte: Elaborada pelo próprio autor

A primeira sessão foi realizada logo após a adaptação do enxerto no leito receptor esquerdo e autopreenchimento com coágulo no lado direito, antes do reposicionamento dos tecidos moles. Os animais eutanasiados com 3 dias receberam apenas uma aplicação do laser (no trans-operatório). Os animais que receberam eutanásia nos períodos de 7 e 14 dias de pós-operatório foram submetidos a terapia com LBI em intervalos de 72 horas entre as aplicações (totalizando 3 e 5 sessões para cada um dos respectivos grupos). Os animais eutanasiados com 28 dias de pós-operatório receberam laserterapia com intervalos de 72 horas até a segunda semana de pós-operatório. A partir desta, as aplicações de laser passaram a ser realizadas semanalmente, totalizando 7 sessões de laserterapia (Tabela 1).

Tabela 1 - Sessões de laserterapia por períodos do estudo

	Dia 0	Dia 3	Dia 6	Dia 9	Dia 12	Dia 19	Dia 26
Eutanásia 3 dias	X						
Eutanásia 7 dias	X	X	X				
Eutanásia 14 dias	X	X	X	X	X		
Eutanásia 28 dias	X	X	X	X	X	X	X

3.6 Eutanásia e coleta das amostras

A eutanásia dos animais foi realizada em quatro períodos diferentes (3,7,14 e 28 dias de pós-operatório) por meio da administração de uma sobredose de anestésica, utilizando-se cloridrato de ketamina 5% (0,15ml/100g) por via intraperitoneal (ESTEVES et al., 2013; MOURARET et al., 2014). Em cada um dos períodos de avaliação realizou-se a eutanásia de cinco animais de cada grupo, gerando uma amostra de 20 espécimes (lado esquerdo e direito) por período.

O osso da calvária foi removido e os ossos parietais foram separados, mantendo o tecido mole suprapariosteal. As peças foram fixadas em solução de formalina tamponada a 10% (Reagentes Analíticos®, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) e mantidos em frascos de plásticos previamente etiquetados, durante 48h. em seguida, foram lavadas em água corrente por 24 horas.

3.7 Preparo das lâminas histológicas

As peças obtidas foram descalcificadas em solução de ácido fórmico 7% por quatro dias, com troca do ácido a cada 48 horas. Após a descalcificação, os espécimes foram colocados devidamente identificados em cassetes e passaram por um processo automatizado (LEICA TP 1020), por 24 horas, de desidratação em uma concentração gradual de etanol (70%, 80%, 90%, 95% e 100%), posteriormente foram diafanizados em xilol para remoção do excesso de álcool. Em seguida foram imersos em parafina à 65°C e imediatamente resfriadas à -4°C por 10 minutos para confecção dos blocos de parafinas. Nos blocos obtidos, foram realizados cortes longitudinais de aproximadamente 5µm de espessura, seguidos de coloração com Hematoxilina – Eosina (H.E).

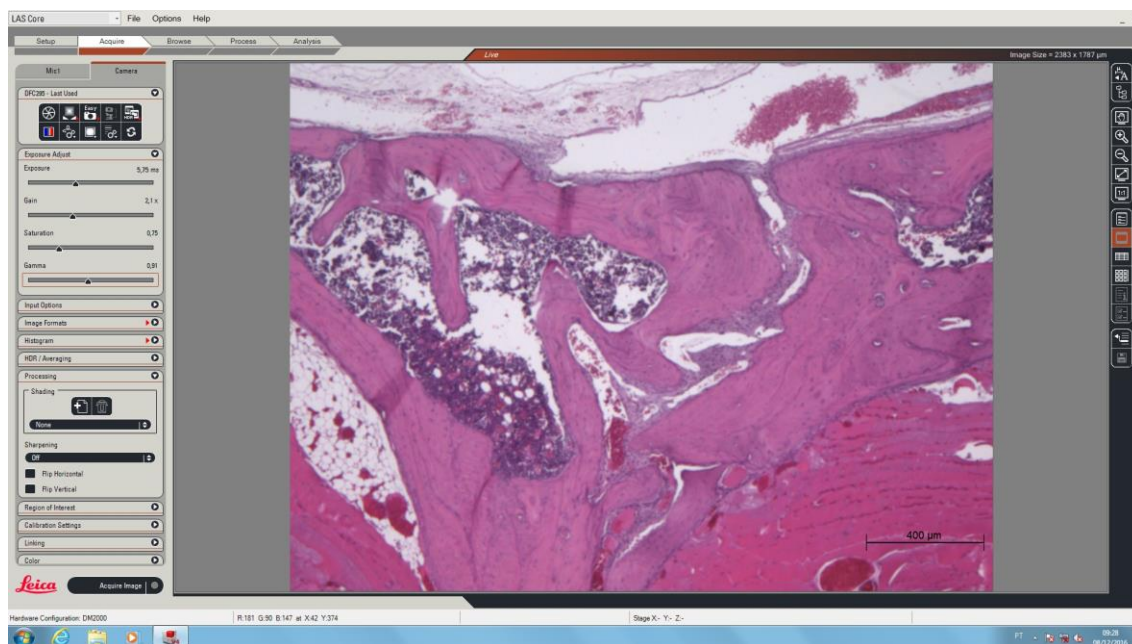
3.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA DESCRITIVA

Três secções histológicas representando o centro do defeito cirúrgico foram selecionadas para análise histológica e histomorfométrica. As imagens dos cortes longitudinais foram obtidas com uma câmera digital (Leica Microsystems, DFC295) acoplado a um microscópio de luz (Leica Microsystems, DM2000) com aumentos de 40X. As imagens foram capturadas pelo software LAS (Leica Application Suite) (Figura 10).

As imagens digitais obtidas foram salvas em computador. Foram criadas imagens compostas pela combinação das três imagens menores, pois não era possível capturar todo o defeito em uma única imagem ao nível de ampliação usado (DE OLIVEIRA GONÇALVES et al., 2016).

Na análise descritiva os seguintes parâmetros foram analisados: presença ou ausência de infiltrado inflamatório, tecido de granulação, áreas de osso neoformado, padrão de organização das fibras colágenas no tecido conjuntivo.

Figura 10 - Software LAS (Leica Application Suite) utilizado para captura das imagens no microscópio



Fonte: Elaborada pelo próprio autor

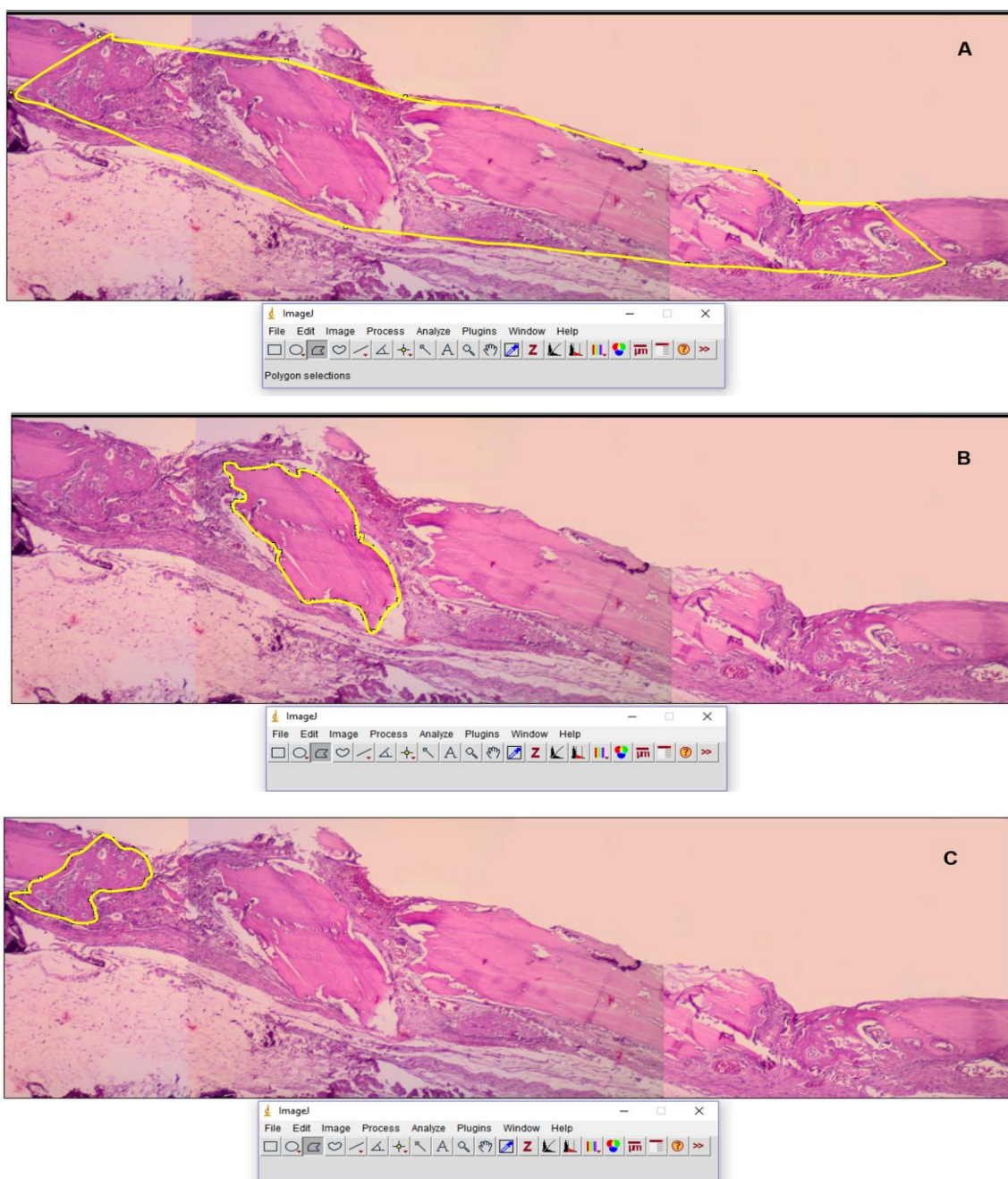
3.9 Análise histomorfométrica

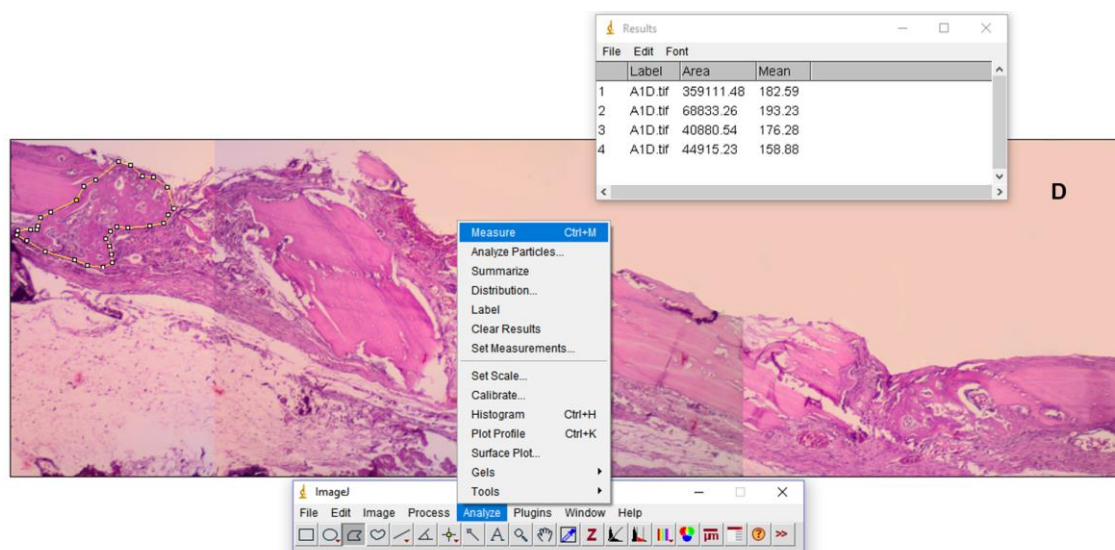
A percentagem de neoformação óssea dentro dos defeitos criados nas calotas dos animais foi mensurada por meio da histomorfometria nos períodos de 7, 14 e 28 dias após as cirurgias. O período de 3 dias não entrou nesta fase do estudo por não haver relatos de neoformação óssea em ratos nesse período (ESTEVES et al., 2013). Foi realizado também a quantificação da área referente ao osso total, que inclui as partículas enxertadas e as áreas de neoformação óssea, nos defeitos Controle Enxerto e Laser Enxerto.

As imagens obtidas previamente foram submetidas à análise histomorfométrica realizada com o *Software Image J*[®] (Nacional Institute of Mental Health, USA). Inicialmente, utilizou-se a ferramenta *polygon selections* e foram demarcadas e identificadas: a área total do defeito (Figura 11 A), áreas de enxerto ósseo (Figura 11 B) e áreas de neoformações ósseas (Figura 11 C). Em seguida, utilizou-se os comandos *Analyse > Measure* para obtenção dos resultados em pixels (Figura 11 D).

Para o cálculo da percentagem de neoformação óssea, utilizou-se a fórmula $\frac{An}{At} \times 100\%$, em que o An correspondeu à área total de osso neoformado e At correspondeu à área total do defeito (KIM; KIM; MOON, 2016). Os dados foram inseridos em uma planilha do Excel® para análise dos resultados.(Microsoft Corp., Redmond, WA, EUA).

Figura 11 - Processo de análise das imagens para a histomorfometria.





(A) Demarcação da área do defeito utilizando a ferramenta *Polygon selections*, (B) Delimitação das partículas de enxerto, (C) Delimitação das áreas de neoformação óssea, (D) Através dos comandos *Analyse > Measure* os resultados foram obtidos

3.10 Análise estatística

Os dados foram expressos em forma de média e erro-padrão da média e analisados por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. As comparações se deram por meio dos testes t de Student, ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$, Graph Pad Prism 5,0).

4 RESULTADOS

4.1 Análise qualitativa

Os resultados obtidos das 80 lâminas foram analisados de forma descritiva por meio da microscopia óptica dos grupos controle e experimental em cada período de observação:

4.1.1 Período de 3 dias

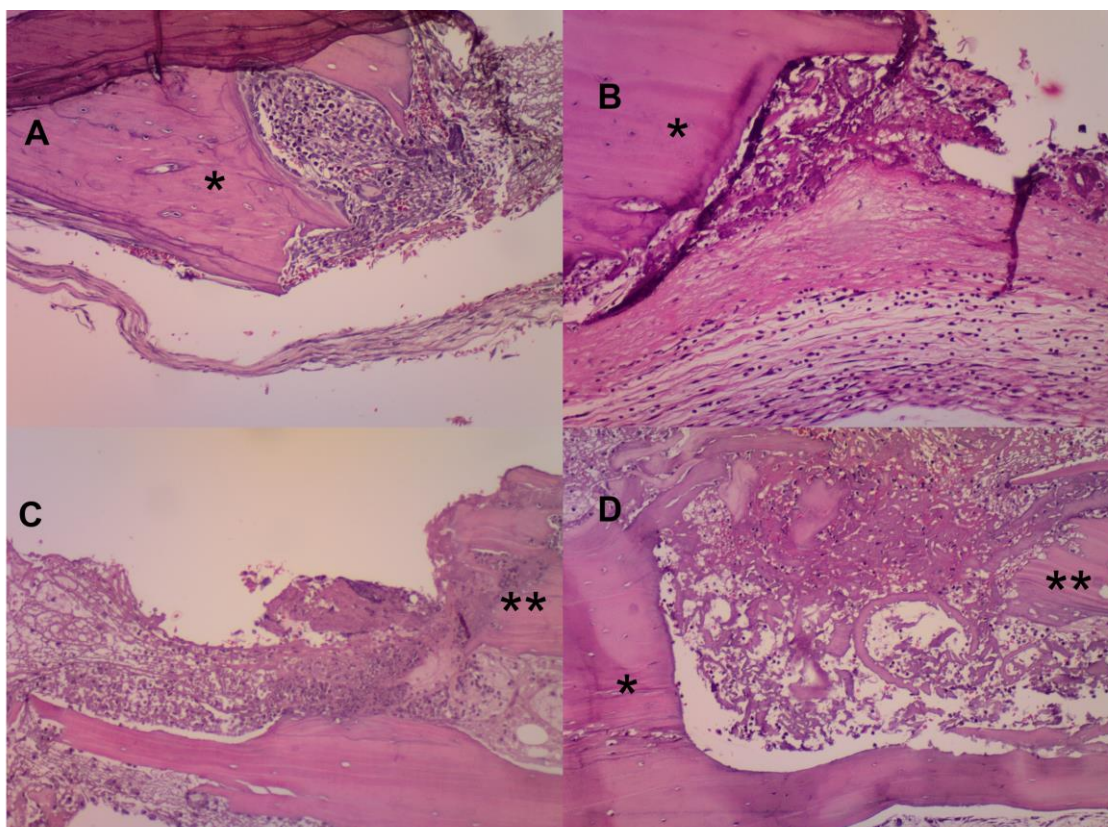
Foi observado no defeito Controle Coágulo o preenchimento do defeito por intenso infiltrado inflamatório permeado por fibras colágenas ainda imaturas, com início do processo de reabsorção e necrose superficial na margem da osteotomia. Neste período não se evidenciou áreas de neoformação óssea (Figura 12 A).

No defeito Controle Enxerto, observou-se a presença de partículas de enxerto, apresentando moderado infiltrado inflamatório entre o leito receptor e o fragmento enxertado, com predominância de células polimorfonucleares do tipo neutrófilos, porém em menor intensidade em relação ao defeito CC (Figura 12 C).

No defeito Laser Coágulo, observou-se uma menor quantidade de tecido inflamatório quando comparado ao defeito CC. Evidenciou-se necrose na borda do leito receptor e ausência de sinais de reparo do defeito (Figura 12 B).

No defeito Laser Enxerto, foi possível observar na maioria dos espécimes que na interface entre a partícula de enxerto e o leito receptor houve deposição de fibras colágenas parcialmente organizadas e infiltrado inflamatório de menor intensidade quando comparadas aos outros defeitos deste período (Figura 12 D).

Figura 12 - Fotomicrografia dos defeitos controle e experimental com 3 dias de observação. H.E. Original. 100x.



(A) Controle Coágulo, (B) Laser Coágulo, (C) Controle Enxerto, (D) Laser Enxerto. * - Leito receptor, ** - osso enxertado.

4.1.2 Período de 7 dias

No defeito CC, observou-se ainda um intenso infiltrado inflamatório, porém com fibras colágenas mais organizadas e ausência de neoformação óssea. Lacunas de Howship são evidenciadas na margem pouco necrótica do defeito, evidenciando-se a presença de osteoclasto (Figura 13 A).

No defeito CE, se observa tecido de granulação mais maduro e fibras colágenas bem estabelecidas entre as partículas de enxerto e o leito receptor (Figura 14 A).

No defeito LC é possível observar moderado infiltrado inflamatório e áreas de neoformação óssea partindo da margem e porção basal do defeito em

direção ao centro e superfície do local da osteotomia, com formação de tecido osteóide sendo depositado por osteoblastos (Figura 13 B).

No defeito LE observa-se fibras colágenas organizadas no tecido entre o leito receptor e o enxerto, presença de osso neoformado nas margens e nas partículas de enxerto. Evidencia-se ainda infiltrado inflamatório moderado (Figura 14B e Figura15).

Figura 13 - Fotomicrografia dos defeitos controle e experimental com 07 dias de observação. H.E. Original. 40x.

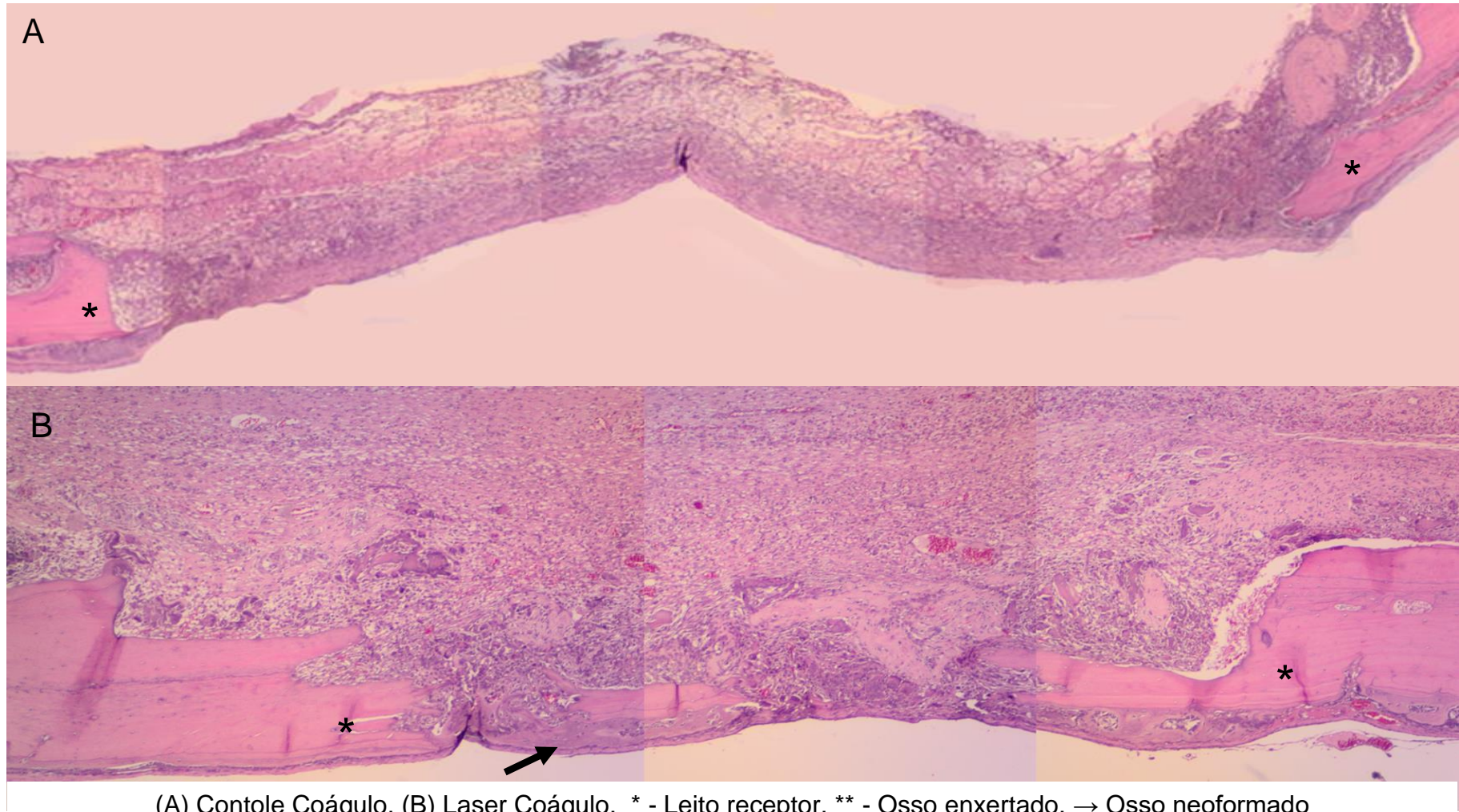
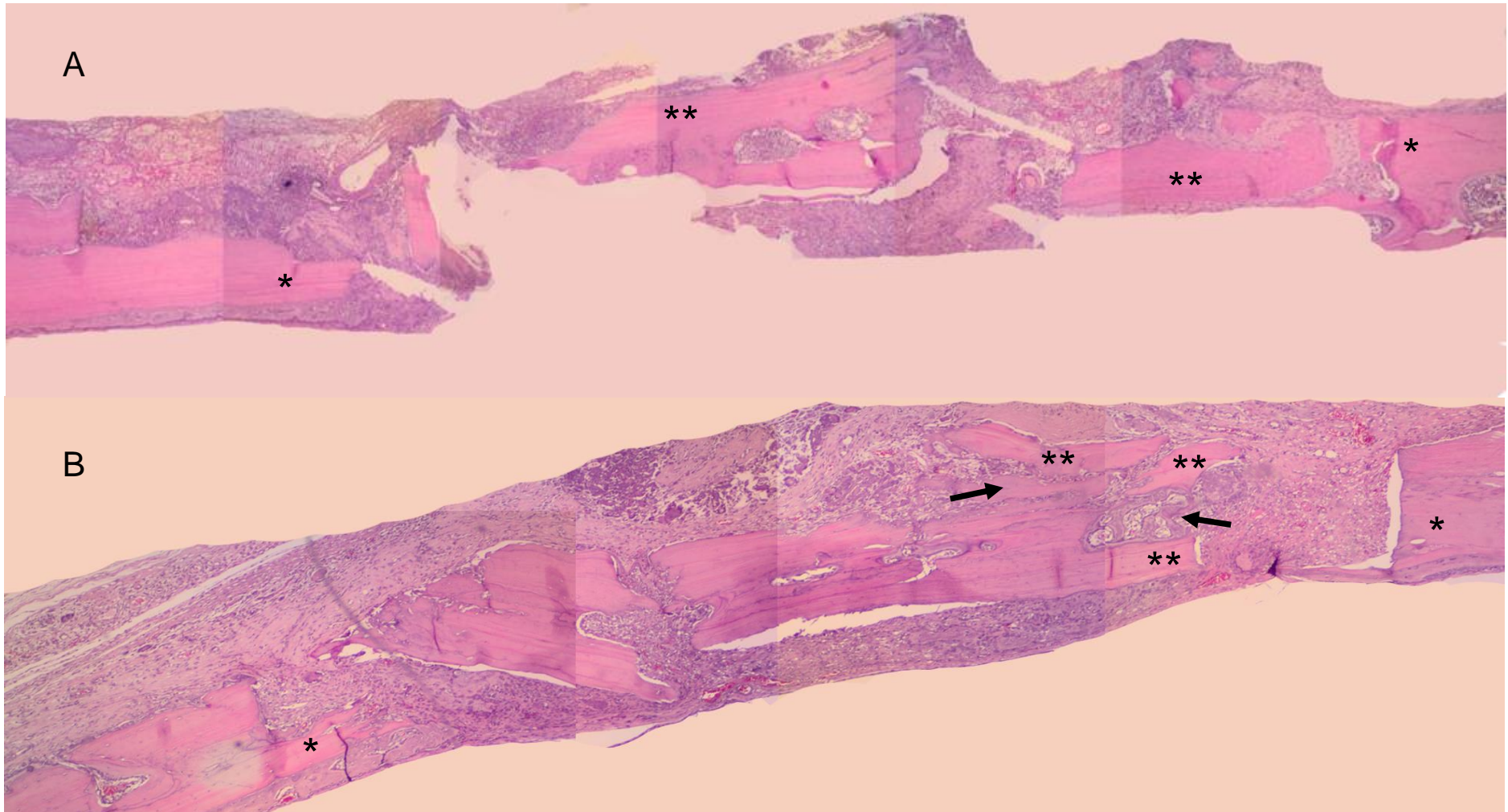
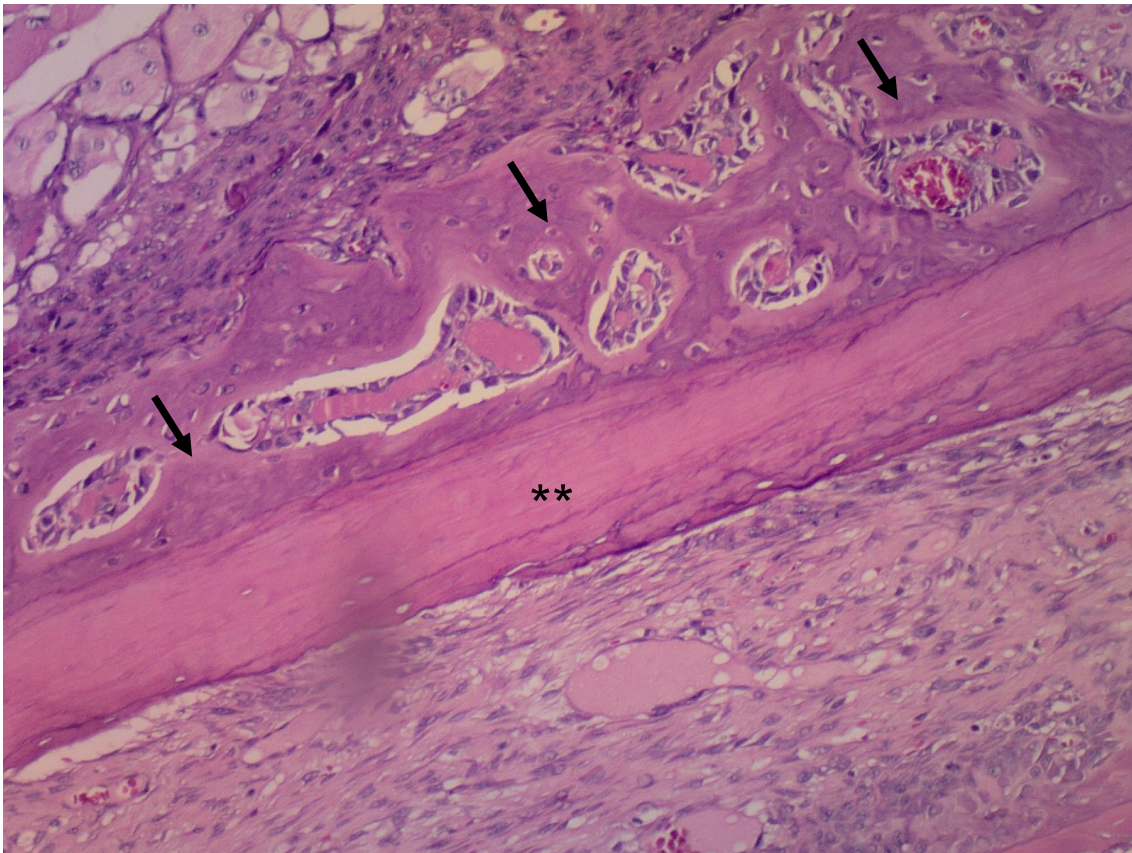


Figura 14 - Fotomicrografia dos defeitos Controle Enxerto e Laser Enxerto com 07 dias de observação. H.E Original 40X.



(A) Controle Enxerto, (B) Laser Enxerto. * - Leito receptor, ** - Osso enxertado, → Osso neoformado

Figura 15 - Fotomicrografia do defeito Laser Enxerto no período de 7 dias. H.E. Original. 100X.



** - osso enxertado, → Osso neoformado

4.1.3 Período de 14 dias

No defeito Controle Coágulo observou-se em alguns espécimes áreas de neoformação óssea somente nas bordas da osteotomia. Em nenhuma das amostras foi observado neoformação óssea em todo o comprimento do defeito. Ainda foram encontradas células inflamatórias, embora em quantidade bem reduzida (Figura 16 A).

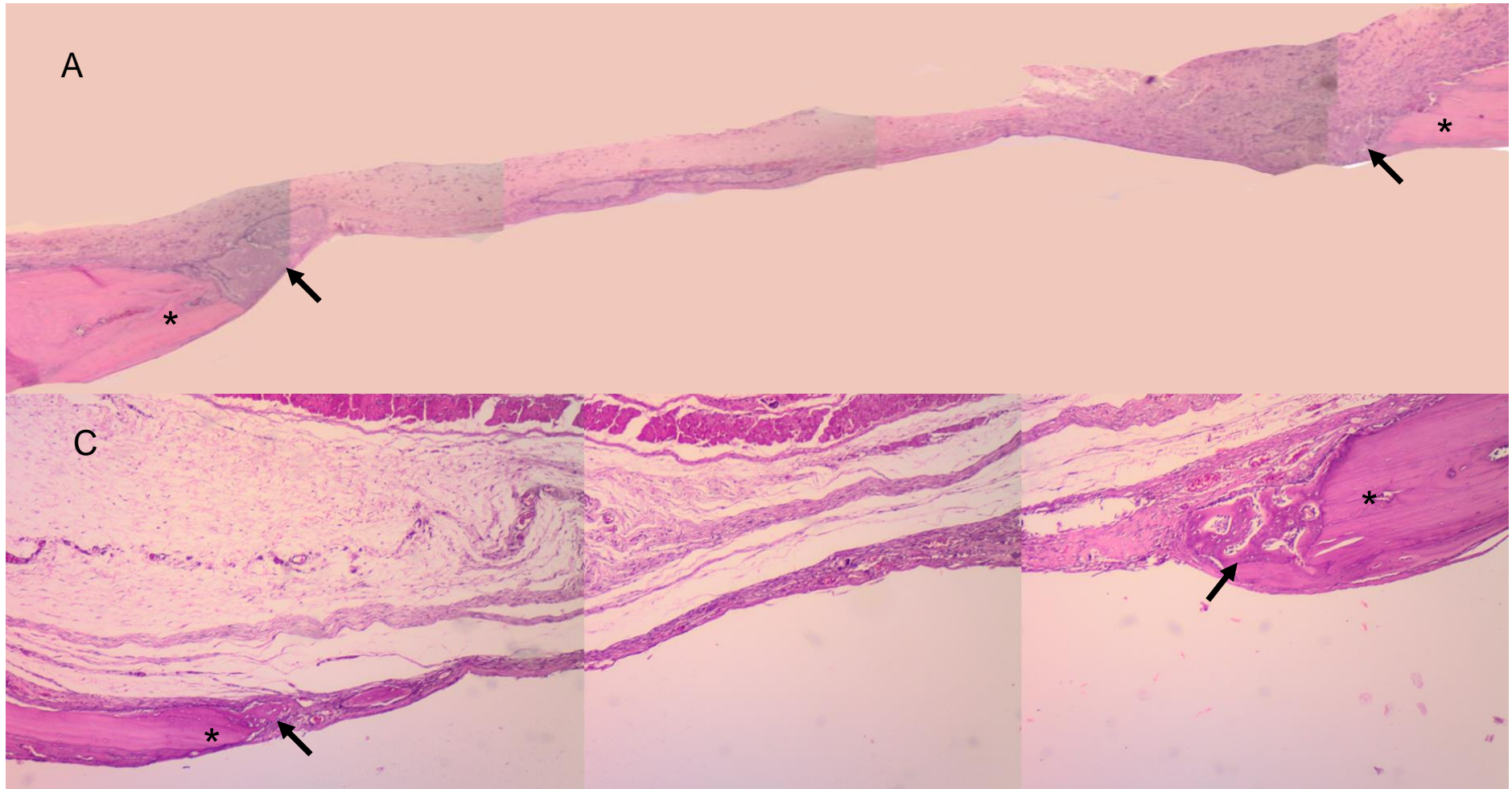
No defeito Controle Enxerto, todos dos espécimes apresentaram áreas de neoformação nas bordas dos defeitos e entre as partículas enxertadas. Não foi observado o processo de união entre os blocos enxertados, porém as fibras colágenas já se apresentaram bem organizadas no interior do tecido

conjuntivo. Áreas de neoformação óssea ao longo da extensão do defeito foram evidenciadas nas amostras (Figura 17 A).

No defeito Laser Coágulo foi observado deposição de matriz osteóide em todos os espécimes analisados e o tecido conjuntivo apresentou fibras colágenas bem organizadas. O infiltrado inflamatório apresentou-se bastante reduzido. Áreas de neoformação óssea foram observadas em todas as amostras deste grupo (Figura 16 B e Figura 18).

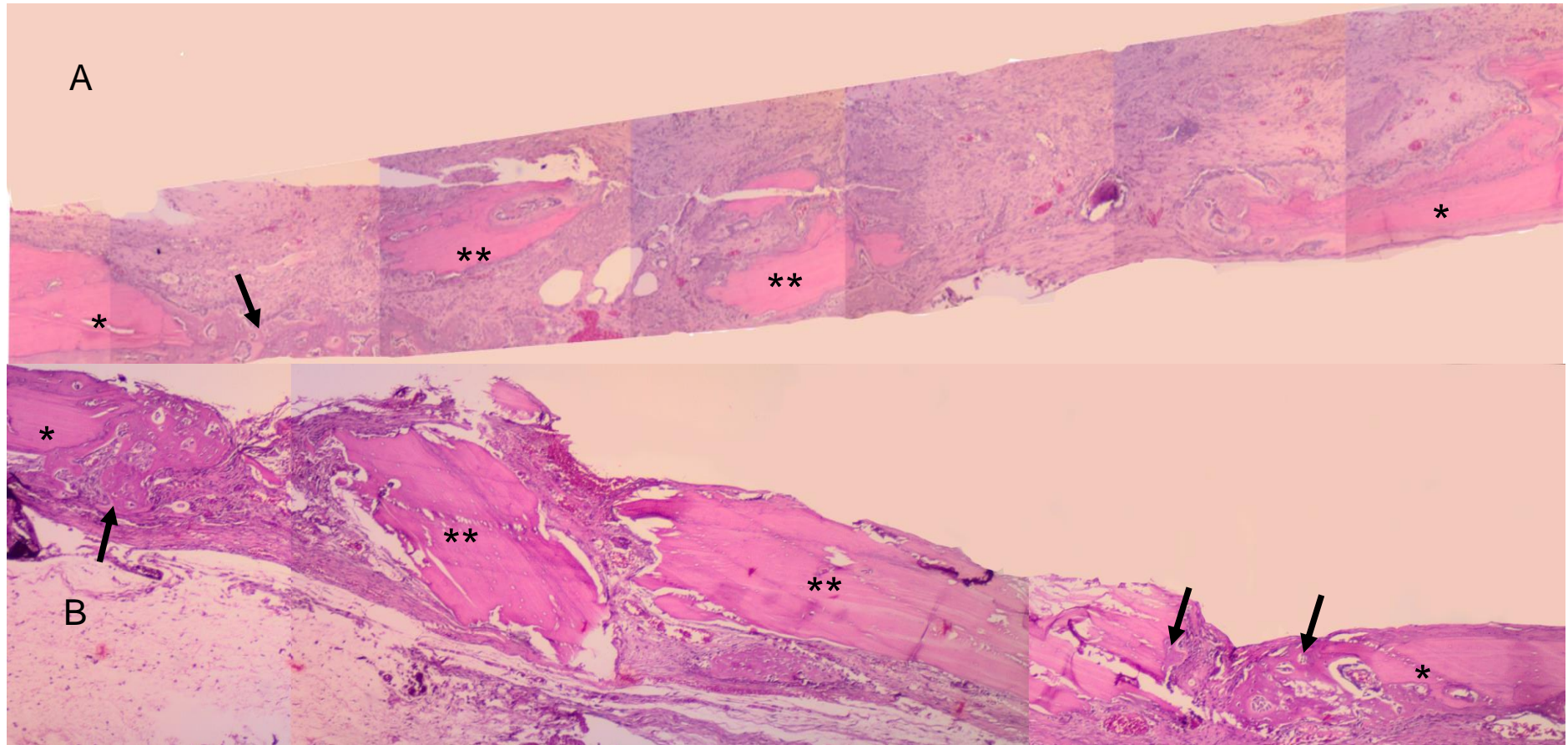
No defeito Laser Enxerto foi possível observar muitas áreas de neoformação óssea e início do processo de união entre as partículas de enxerto. Em alguns espécimes foi observado o preenchimento da porção basal do defeito com osso neoformado com fibras colágenas bem organizadas, demonstrando maior grau de maturação da área enxertada (Figura 17 B).

Figura 16 - Fotomicrografia dos defeitos Controle Coágulo e Laser Coágulo com 14 dias de observação. H.E. Original. 40x.



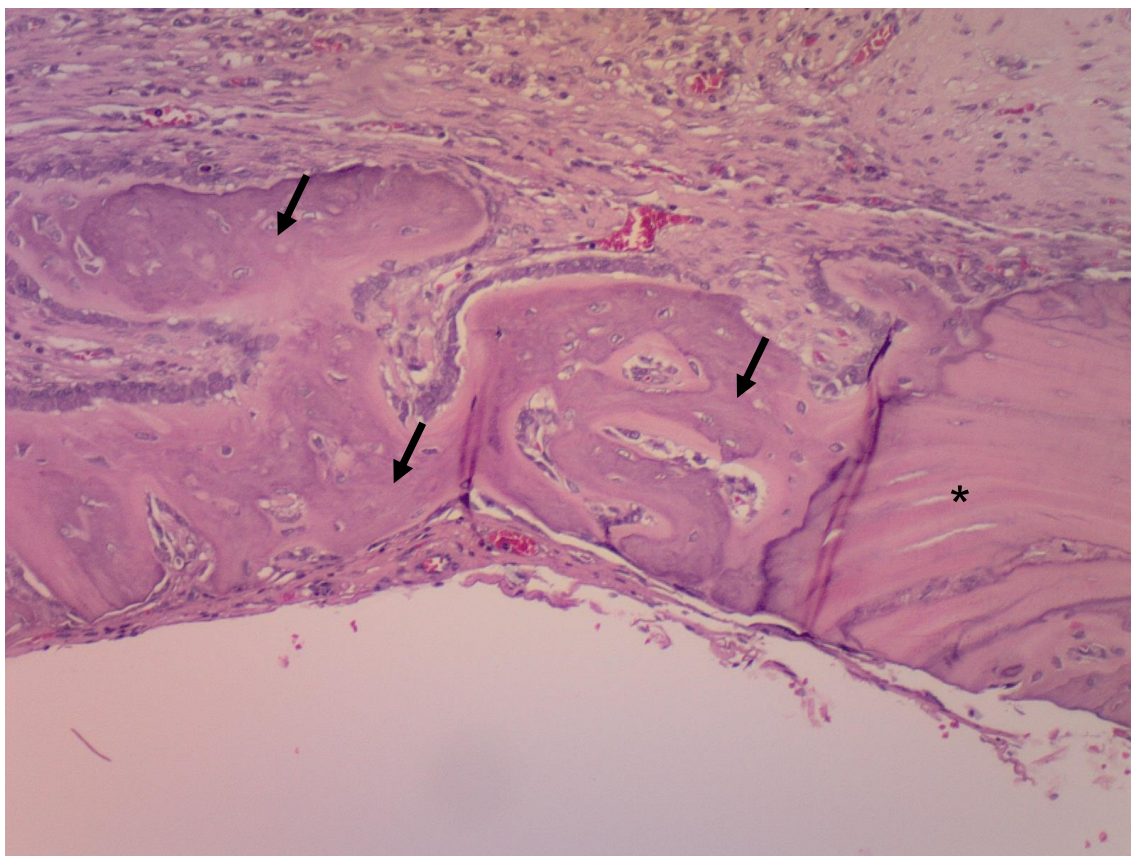
(A) Controle Coágulo, (B) Laser Coágulo. * - Leito receptor, → Osso neoformado

Figura 17 - Fotomicrografia dos defeitos Controle Enxerto e Laser Enxero com 14 dias de observação. H.E. Original 40x.



(A) Controle Enxerto, (B) Laser Enxerto. * - Leito receptor, ** - Osso enxertado, → Osso neoformado

Figura 18 Fotomicrografia do defeito Laser Coágulo no período de 14 dias. H.E. Original. 100x.



* - Leito receptor, → Osso neoformado

4.1.4 Período de 28 dias

No defeito CC, evidenciou-se um processo de neoformação óssea, partindo da borda em direção ao centro do defeito, com grau de maturação mais acentuado, porém não foi observado ainda o preenchimento de toda extensão da cavidade (Figura 19 A).

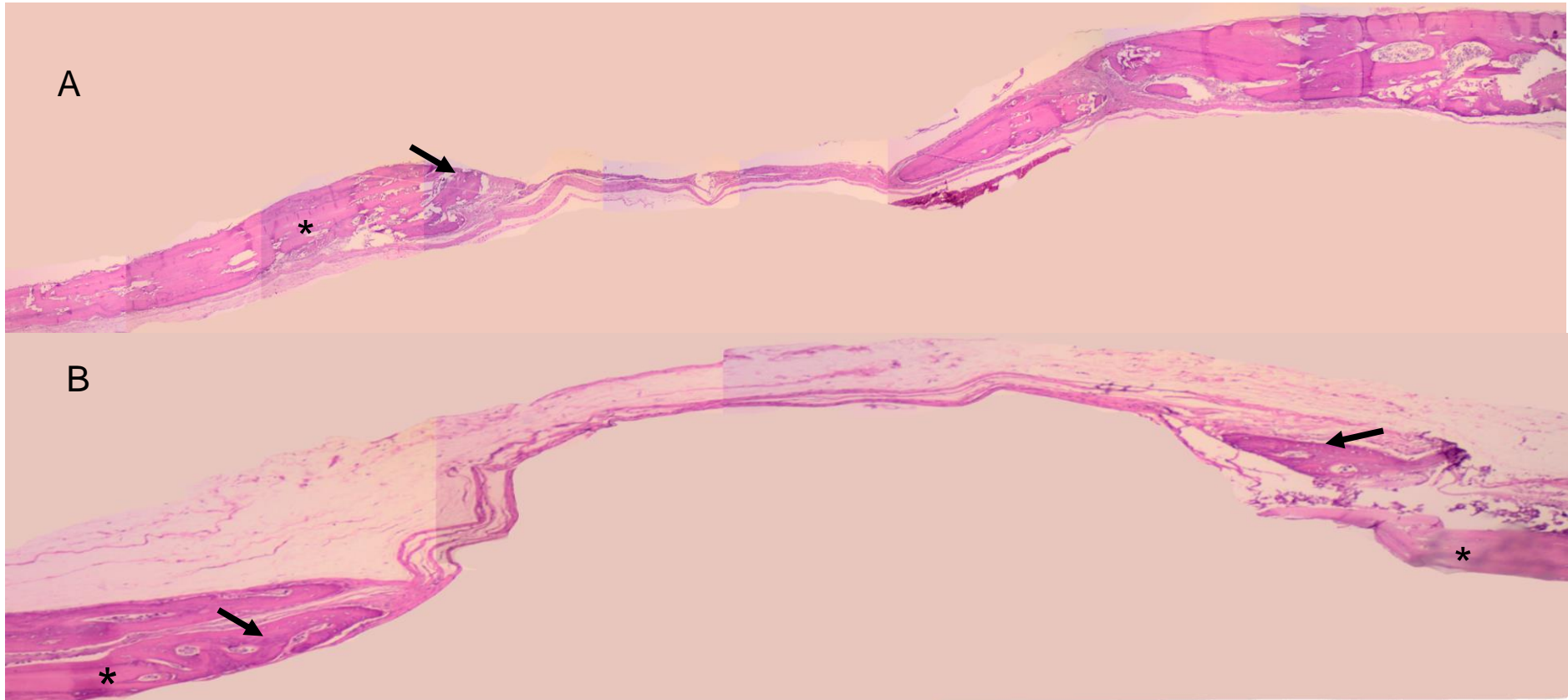
No defeito CE, observou-se um processo de neoformação óssea intenso, no qual as partículas de enxerto sofreram processos de remodelação e percebeu-se uma união entre os blocos enxertados com osso neoformado provenientes da borda do defeito e da dura-máter (Figura 20 A).

No defeito LC, notou-se a presença de neoformação óssea nas bordas do defeito, porém sem o preenchimento de todo o defeito. Fibras colágenas

foram observadas em maior quantidade e mais bem organizadas, demonstrando um maior grau de maturação do tecido conjuntivo (Figura 19 B).

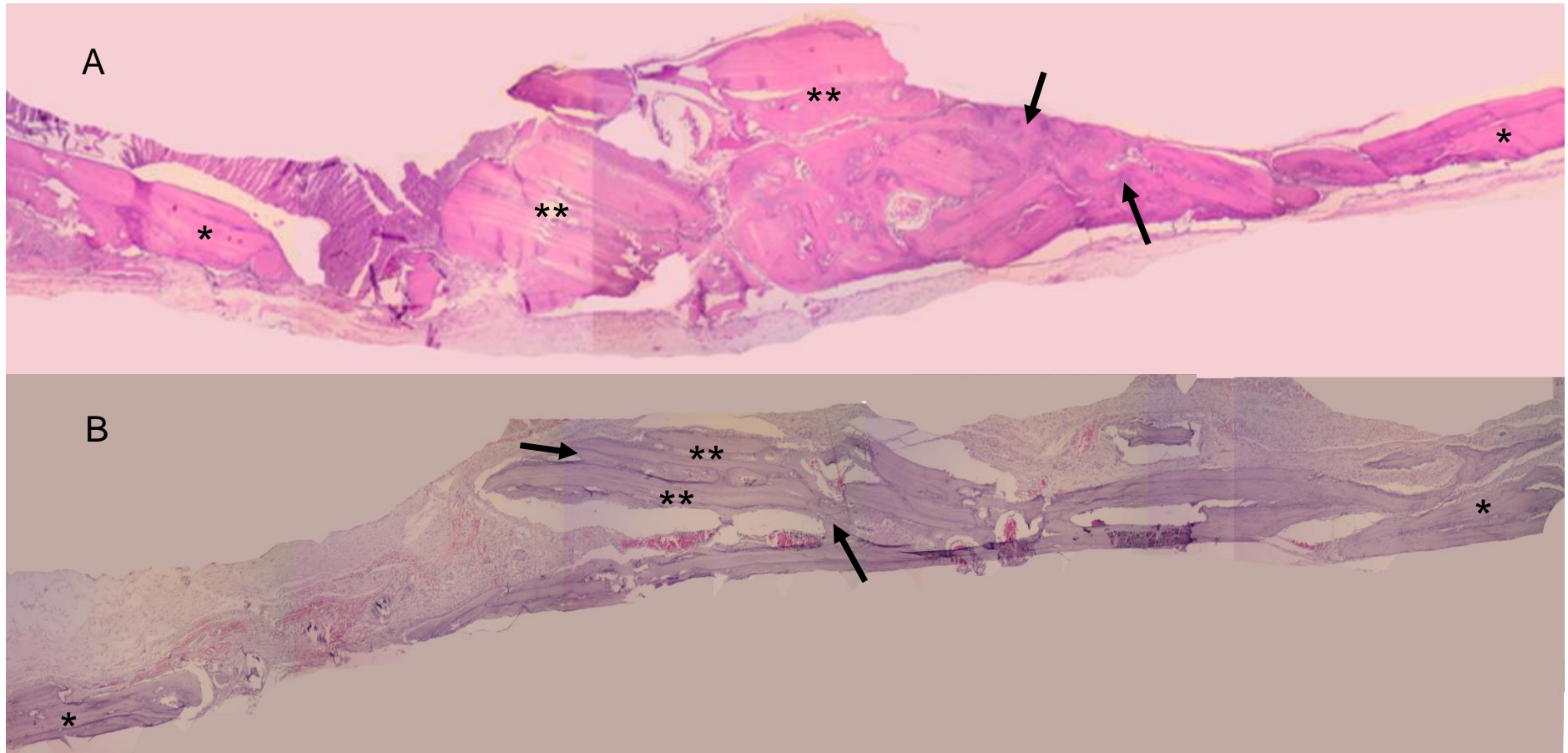
No defeito LE, evidenciou-se neoformação óssea nas bordas do defeito e entre as partículas de enxerto ósseo, uma proliferação acentuada de tecido conjuntivo em toda a extensão da osteotomia (Figura 20 B).

Figura 19 - Fotomicrografia dos defeitos Controle Coágulo e Laser Coágulo com 28 dias de observação. H.E. Original. 40x.



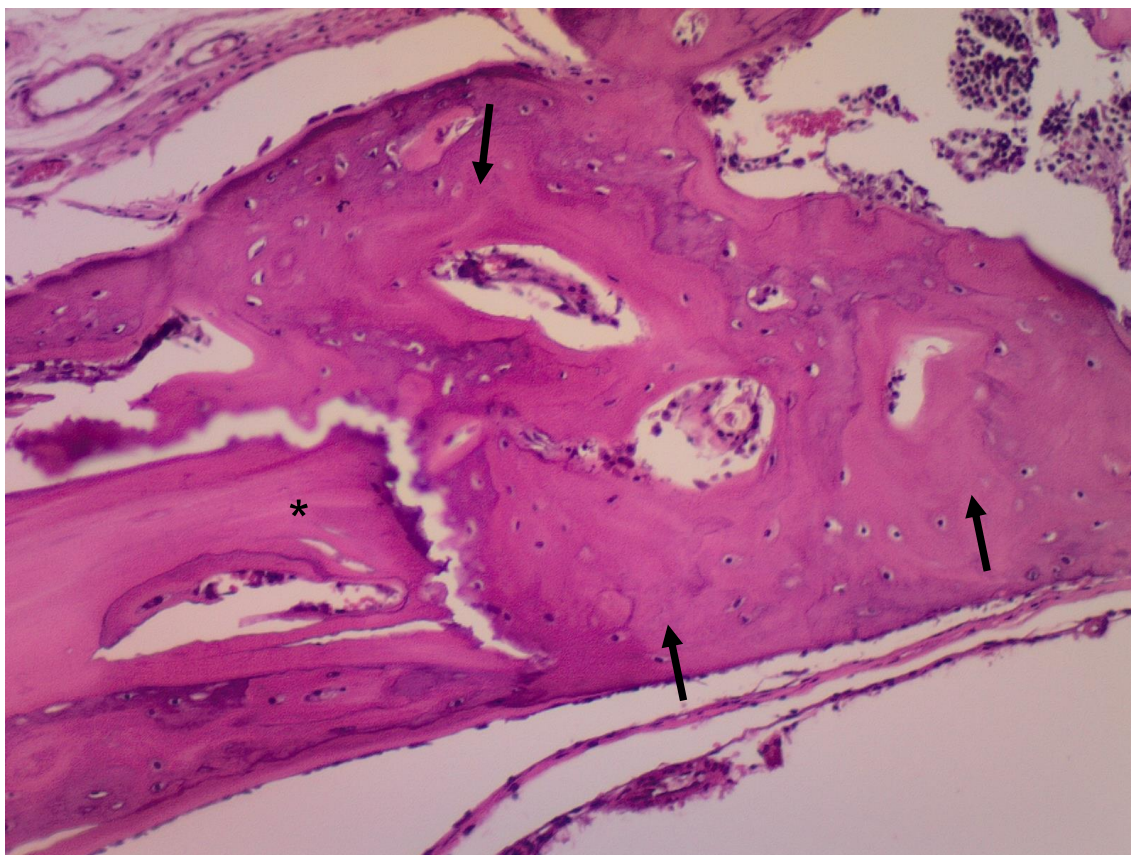
(A) Controle Coágulo, (B) Laser Coágulo. * - Leito receptor, → Osso neoformado

Figura 20 - Fotomicrografia dos defeitos Controle Enxerto e Laser Enxerto com 28 dias de observação. H.E. Original 40x.



(A) Controle Enxerto, (B) Laser Enxerto. * - Leito receptor, ** - Osso enxertado, → Osso neoformado

Figura 21 - Fotomicrografia do defeito Controle Coágulo no período de 28 dias.
H.E. Original. 100X.



* - Leito receptor, → Osso neoformado

4.2 Análise histomorfométrica

4.2.1 Avaliação do percentual de área referente ao osso neoformado

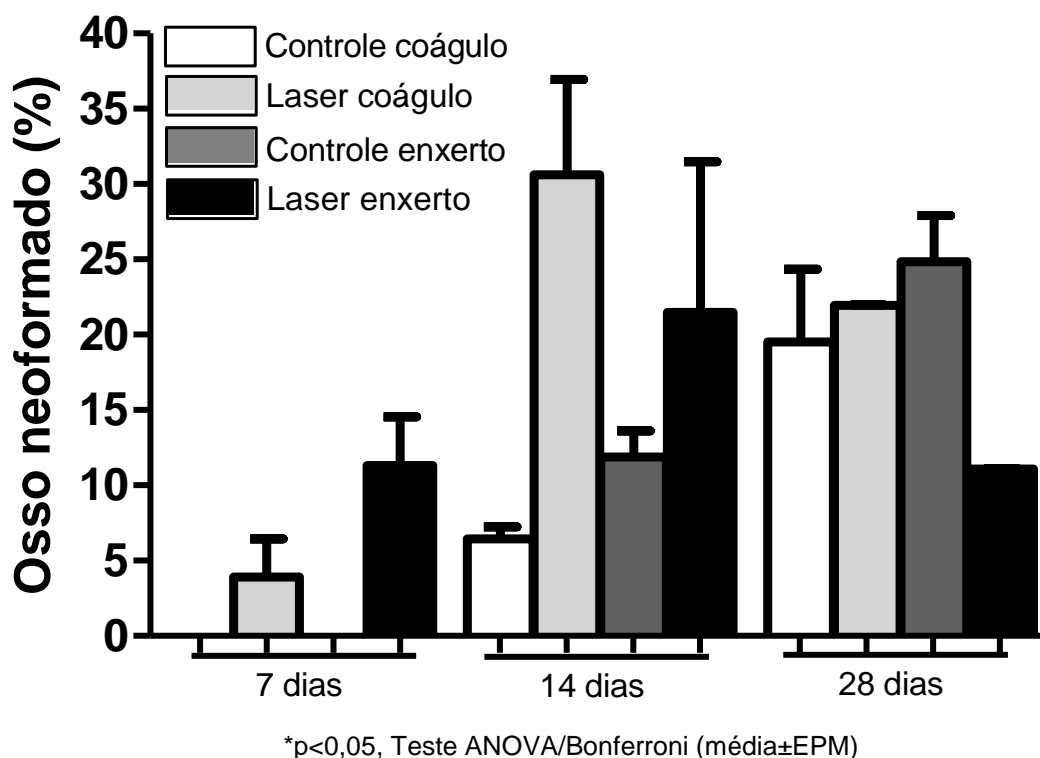
O grupo controle coágulo não mostrou aumento da área total de osso do dia sete ($0,0 \pm 0,0\%$) para o dia 14 ($6,4 \pm 0,8\%$), com aumento significativo apenas a partir do 28º dia ($19,5 \pm 4,8\%$) ($p=0,002$). O grupo laser coágulo mostrou aumento significativo da área total do osso do dia sete ($3,9 \pm 2,5\%$) para o dia 14 ($30,6 \pm 6,3\%$), sem alteração significativa deste dia para o dia 28 ($21,9 \pm 0,1\%$) ($p=0,003$).

O grupo controle enxerto mostrou aumento significativo do dia sete ($0,0 \pm 0,0\%$) para o dia 14 ($11,9 \pm 1,7\%$) e deste para o dia 28 ($24,8 \pm 3,1\%$)

($p < 0,001$). Por sua vez o grupo laser enxerto não mostrou variação significativa do dia sete ($11,3 \pm 3,2\%$) para o dia 14 ($21,4 \pm 10,1\%$), nem para o dia 28 ($11,1 \pm 0,1\%$) ($p = 0,331$).

No período de sete dias, o grupo laser enxerto apresentou maior percentual de osso neoformado que os demais grupos ($p < 0,001$), no 14º os grupos laser coágulo e laser enxerto apresentaram maior neoformação óssea que os grupos não tratados com laser ($p = 0,038$) e no 28º dia todos os grupos apresentaram maior neoformação óssea que o grupo tratado com laser e enxerto ($p = 0,001$).

Figura 22 - Gráfico mostrando a percentagem de osso neoformado nos períodos de 7,14 e 28 dias



4.2.2 Avaliação do percentual de área referente ao osso total

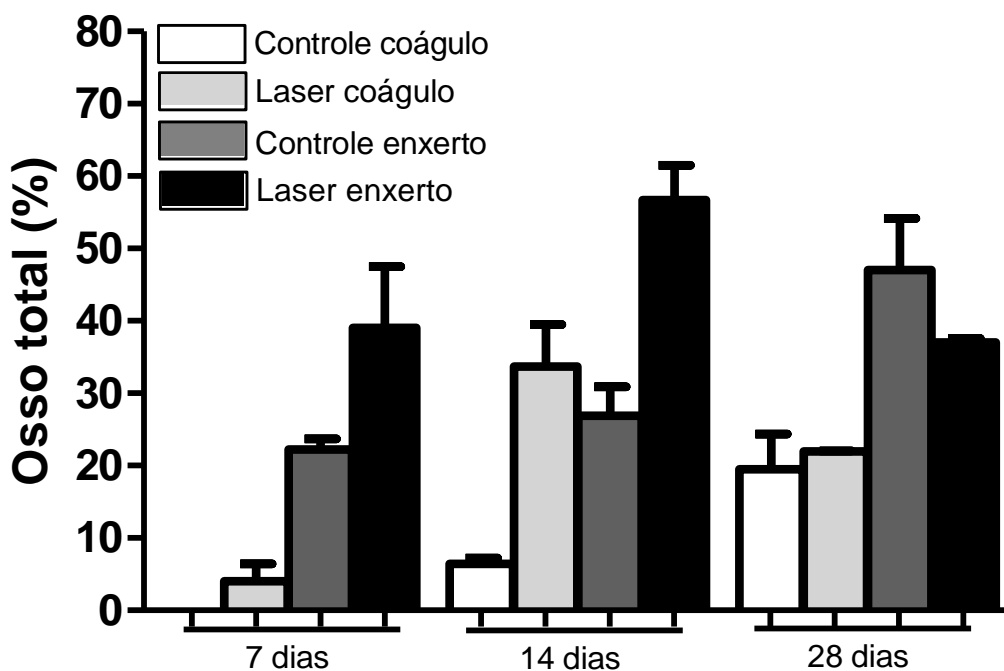
O grupo controle coágulo não mostrou aumento da área total de osso do dia sete ($0,0 \pm 0,0\%$) para o dia 14 ($6,4 \pm 0,8\%$), com aumento

significante apenas a partir do 28º dia ($19,5\pm 4,8\%$) ($p=0,002$). O grupo laser coágulo mostrou aumento significativo da área total do osso do dia sete ($4,0\pm 2,4\%$) para o dia 14 ($27,9\pm 4,0\%$), sem alteração significativa deste dia para o dia 28 ($47,0\pm 11,4\%$) ($p=0,006$).

O grupo controle enxerto não mostrou diferença significativa entre a quantidade de osso total do dia sete ($22,0\pm 1,5\%$) para o dia 14 ($26,9\pm 4,0\%$) e para o dia 28 ($47,0\pm 7,2\%$) ($p=0,097$). Da mesma forma, o grupo laser enxerto não mostrou variação significativa do dia sete ($39,0\pm 8,5\%$) para o dia 14 ($56,7\pm 4,8\%$), nem para o dia 28 ($37,0\pm 0,60\%$) ($p=0,106$).

No sétimo dia o grupo laser enxerto apresentou maior percentual de área de osso total que os demais grupos ($p<0,001$). No 14º dia o grupo laser enxerto apresentou maior área de osso total que os grupos laser coágulo e controle enxerto e estes dois grupos mais osso total que o grupo controle coágulo ($p=0,001$). No 28º dia, os grupos controle enxerto e laser enxerto mostraram mais osso total que os grupos não enxertados ($p=0,033$).

Figura 23 - Gráfico mostrando a percentagem de osso total nos períodos de 7,14 e 28 dias



* $p<0,05$, Teste ANOVA/Bonferroni (média±EPM)

4.3 Sugestão de protocolo de terapia com laser de baixa intensidade para aplicação clínica

Levando-se em consideração que o metabolismo dos ratos é em torno de três vezes mais acelerado que o metabolismo humano (FIALHO, 1986; CARVALHO & OKAMOTO, 1987), os autores do presente estudo sugerem uma adaptação do protocolo utilizado na realização desta pesquisa para ser avaliado em procedimentos de enxertia óssea em humanos.

O processo de cicatrização tem três fases: fase de substrato, fase proliferativa e fase de remodelação. A maioria dos relatos de biostimulação a laser sugerem que seus maiores efeitos ocorrem durante a fase proliferativa (ABOELSAAD et al., 2009).

Baseado nesses achados, a sugestão de protocolo de aplicação de laser para ser testado na prática clínica de cirurgia de enxerto ósseo apresenta os seguintes parâmetros:

- 1 Utilização de laser de Arseneto de Gálio e Alumínio
- 2 Utilização de laser com comprimento de onda no espectro de luz infravermelha
- 3 Avaliação das dimensões da área a ser enxertada
- 4 Utilização de um ponto de aplicação a cada 6 mm²
- 5 Aplicação de 2J por ponto
- 6 Sessões de laser realizadas nos seguintes períodos:
 - a. Trans-operatório (antes do fechamento do retalho cirúrgico)
 - b. Pós-operatório 7 dias
 - c. Pós-operatório 14 dias
 - d. Pós-operatório 21 dias
 - e. Pós-operatório 30 dias

Tabela 2 - Sugestão de protocolo de laserterapia para ser testado na prática clínica de cirurgias de enxerto ósseo

Comprimento de onda (nm)	808 nm
Potência do aparelho (mW)	100 mW
Dose de energia por ponto de aplicação (J)	2 J
Densidade de energia (J/cm ²)	70 J/cm ²
Frequência das sessões de laserterapia (contados em dias a partir da cirurgia)	Dias 0, 7, 14, 21, 30 de pós-operatório

5 DISCUSSÃO

Para a realização deste estudo utilizou-se ratos da linhagem Wistar, por serem de fácil manuseio, baixo custo, necessitam de menos espaço e pela facilidade de conseguir por meio do biotério. Foram escolhidos animais machos para evitar alterações ósseas geradas por hormônios femininos, permitindo um padrão de aumento da massa corporal (LÉO et al., 2012).

Utilizou-se um modelo de defeitos em calotas cranianas de ratos. O modelo de defeito ósseo em calvária é apropriado para exame da regeneração óssea maxilar devido às suas semelhanças com a região maxilofacial. Anatomicamente, a calvária apresenta duas corticais entremeadas por camada esponjosa, como a mandíbula. Fisiologicamente, o padrão de cicatrização é semelhante ao da maxila (LIM; LEE; YEO, 2000; BOSCO et al., 2016). Em termos de embriologia e morfologia, a calvária se desenvolve de uma membrana precursora, como os ossos da face, incluindo a maxila e mandíbula. Este processo é denominado ossificação intramembranosa, pois ocorre no interior de membranas de tecido conjuntivo frouxo. O processo de formação do osso intramembranoso é semelhante à ossificação dos ossos da face (BOSCO et al., 2016; DE ALMEIDA et al., 2015).

O osso autógeno foi o material de escolha para cirurgias devido às suas propriedades osteogênicas, osteoindutoras e osteocondutoras. As desvantagens na utilização do osso autógeno incluem a quantidade disponível, o aumento da morbidade devido à necessidade de um segundo leito cirúrgico e a reabsorção óssea imprevisível durante o processo de reparo (DE ALMEIDA et al., 2014; CUNHA et al., 2014b; DE OLIVEIRA GONÇALVES et al., 2016).

Estudos utilizando materiais de enxerto demonstram que a terapia com laser de luz infravermelha estimula a proliferação de osteoblastos, deposição de colágeno e neoformação óssea (KHADRA et al., 2004; PINHEIRO; GERBI, 2006). Em relação ao efeito do laser no reparo dos enxertos, é geralmente aceito que o efeito biológico do LBI depende de três parâmetros principais: comprimento de onda, potência e densidade de energia. Uma razão para os resultados abaixo do esperado com o uso do laser de baixa potência em alguns estudos pode estar relacionada a utilização de doses extremamente baixas (GÁL et al., 2006; BABUCCU et al., 2014).

Em relação ao comprimento de onda, os maiores comprimentos são mais resistentes à dispersão do que os menores e penetram mais profundamente na pele. Foi relatado que luz de laser com comprimento de onda de 632,8 nm (luz vermelha) penetra 0,5-1,0 mm antes de perder 37% de sua intensidade. Por outro lado, os comprimentos de onda infravermelhos penetram 2 mm antes de perder algum percentual de energia (PINHEIRO et al., 2003). Esta é uma indicação clara para o uso da luz infravermelha em tecido ósseo, justificando a escolha do comprimento de onda maior (luz infravermelha) no presente estudo.

Diversos trabalhos realizados com o objetivo de avaliar a influência da laserterapia no reparo ósseo utilizaram o laser de Arseneto de Gálio e Alumínio, com comprimentos de onda no espectro de luz infravermelha (PINHEIRO et al., 2003; ABOELSAAD et al., 2009; CUNHA et al., 2014; DE ALMEIDA et al., 2014; DE OLIVEIRA GONÇALVES et al., 2016), semelhantes ao utilizados pelos autores do presente estudo.

Alguns autores demonstram o sucesso da terapia com laser de baixa intensidade no reparo de enxertos ósseos (PINHEIRO et al., 2003; SELLA et al., 2015; CUNHA et al., 2014; GARCIA et al., 2014). Porém, apesar dos resultados positivos encontrados, os estudos utilizam tipos de aparelhos para emissão de radiação laser com diferentes comprimentos de onda, além de apresentarem doses e duração de tratamentos muito diferentes, dificultando a comparação dos mesmos e a padronização de um protocolo de tratamento.

A melhora da vascularização é um dos prováveis mecanismos para a eficácia clínica da terapia com o LBI (BARBOSA et al., 2013; DE ALMEIDA et al., 2014; CUNHA et al., 2014). Também foi relatado que a terapia com laser de baixa intensidade aumenta a atividade dos osteoblastos e osteoclastos, estimula a produção da matriz óssea na formação de calos ósseos e também acelera a dinâmica da matriz óssea, modificando a expressão dos componentes da matriz extracelular e aumentando a área de neoformação óssea, o que reduz o tempo necessário para o reparo ósseo (DE SOUZA MERLI et al., 2012). Outra explicação para a cicatrização óssea acelerada observada para grupos irradiados com laser é que as células mesenquimais indiferenciadas podem ser positivamente biomoduladas para se tornar osteoblastos e evoluir para osteócitos mais rapidamente. Sabe-se que o

potencial osteogênico das células mesenquimais depende, além dos fatores genéticos, dos fatores locais e sistêmicos induzidos. O laser de baixa intensidade poderia atuar como tal fator indutor (ABRAMOVITCH-GOTTLIB et al., 2005; ABOELSAAD et al., 2009).

Os achados clínicos em humanos confirmam a eficácia da aplicação do laser durante os estágios iniciais da cicatrização. Os períodos iniciais de preenchimentos dos defeitos são mais susceptíveis aos efeitos da terapia a laser. Numa fase posterior, a matriz óssea é o principal componente do tecido cicatricial. Isso demonstra que a frequência de aplicação da terapia a laser é eficaz quando realizada durante a fase celular, enquanto o número de osteoblastos aumenta. Posteriormente, o maior número de células resulta em maior deposição de matriz óssea, caracterizando a maturação do osso (ABOELSAAD et al., 2009). Baseados nestas evidências, optou-se por iniciar a aplicação de laser no pós-operatório imediato e continuar com as aplicações em intervalos de 72 horas entre as sessões até o final da segunda semana. A partir da terceira semana, quando se evidencia áreas de neoformação óssea, as sessões passaram a ser realizadas semanalmente.

No estudo de Merli et al. (2005), os autores observaram que a aplicação do laser em intervalos de 24, 48 e 72 horas mostrou resultados satisfatórios no reparo tecidual, coincidindo com os achados de Saito & Shimizu (1997) que encontraram maior efetividade da radiação laser aplicada nos três primeiros dias. BATISTA et al. (2014) sugerem que os efeitos benéficos da terapia com laser sobre os tecidos moles e ossos são mais expressivos quando aplicados nos primeiros sete dias pós-operatórios. Durante os estágios iniciais do reparo ósseo, há uma fase proliferativa celular, quando a absorção completa da luz infravermelha é mais eficaz, o que não ocorre nos últimos períodos do reparo ósseo. Contudo, isto não significa que a laserterapia seja ineficiente na fase final do reparo ósseo. Neste estudo, o crescimento de tecido conjuntivo no período de 28 dias nos defeitos tratados com laser até o 26º dia pós-operatório, pode representar uma eventual competição pela neoformação óssea, especialmente neste trabalho onde não foram utilizadas barreiras de regeneração óssea guiada.

Existem evidências sólidas de que as irradiações múltiplas são mais eficazes do que uma dose única, agindo como um fator de neoformação óssea e crescimento fibroblástico (MERLI et al., 2005).

Na análise qualitativa do presente estudo, foi possível observar que nos períodos iniciais de avaliação (3 e 7 dias) o grupo experimental apresentou infiltrado inflamatório reduzido em relação ao grupo controle como observado por outros pesquisadores (SELLA et al., 2015). Essa observação leva os autores a supor que os animais que foram submetidos a terapia com laser de baixa intensidade foram possivelmente menos afetados pela fase inflamatória do reparo ósseo, permitindo assim uma fase reparadora mais precoce. Como consequência disto, foi observado, no período de 7 dias, a presença de áreas de neoformação óssea no grupo experimental. Essa constatação só foi vista no grupo controle no período de 14 dias.

Sella et al. (2015) afirmam que a irradiação com LBI não eliminou a inflamação, mas acelerou as etapas do processo de neoformação óssea, incluindo esta fase inflamatória. A redução do infiltrado inflamatório, juntamente com o aumento do desenvolvimento periosteal e da matriz trabecular, mostraram que os animais do grupo laser passaram por um processo mais precoce da formação óssea.

No presente trabalho observou-se que, nos períodos até 14 dias, o grupo submetido à terapia com laser de baixa intensidade apresentou maior área de neoformação óssea quando comparado ao grupo controle, sugerindo que a laserterapia pode aumentar o osso formado e acelerar o processo de reparo ósseo. Estes resultados corroboram com alguns estudos que demonstram um efeito positivo do laser na neoformação óssea quando usado sozinho, ou associado com enxerto ósseo (CUNHA et al., 2014; BOSCO et al., 2016).

Na análise histomorfométrica, no período de 14 dias, foi observado que o grupo laser (laser coágulo e laser enxerto) apresentou área de neoformação óssea significativamente superior em relação ao grupo controle. Resultados semelhantes aos encontrados por De Souza Merli et al. (2012).

Almeida et al., em 2014, num estudo com o objetivo de avaliar o efeito do laser de baixa intensidade no reparo ósseo de defeitos críticos na calvária de ratos, tratados com ou sem enxerto autógeno, utilizaram 40 animais,

divididos em quatro grupos (coágulo, coágulo e laser, enxerto autógeno, enxerto autógeno e laser) e realizaram a eutanásia com 30 dias de pós-operatório. Os grupos tratados com laser receberam aplicações com comprimento de onda do espectro infravermelho ($\lambda = 810 \text{ nm}$), dose de 6 J por ponto de aplicação e densidade de energia de 210 J / cm^2 , 60 s por ponto, totalizando cinco pontos em todo o defeito criado. Na análise histomorfométrica, os grupos laser coágulo e laser enxerto apresentaram maior área de neoformação óssea que os demais grupos. Este resultado diverge do encontrado no período de 28 dias do presente estudo em que foi evidenciado uma menor área de neoformação óssea no defeito laser enxerto quando comparada ao grupo controle.

Nesse estudo de Almeida et al. (2014) os autores realizaram aplicação do LBI somente no trans-operatório, divergindo do protocolo realizado no presente estudo, em que foram realizadas sessões múltiplas de laserterapia. No presente trabalho não houve diferença significativa na neoformação óssea do grupo laser enxerto no período de 14 para o de 28 dias. Foi possível observar que houve uma maior proliferação do tecido conjuntivo entre as partículas de enxerto, havendo provavelmente uma maior proliferação e maturação de fibroblastos do que de osteoblastos entre um período e outro.

A presença de maiores quantidades de fibras colágenas em espécimes irradiados com laser pode ser um achado importante, o que pode representar um efeito do LBI no reparo, já que outros estudos demonstraram que há um aumento da produção de colágeno após laserterapia (PINHEIRO et al., 2003). Como o colágeno é um componente importante da matriz extracelular do osso, quantidades aumentadas podem indicar um efeito positivo do laser no reparo ósseo apesar do fato de que em alguns espécimes deste trabalho não foi observada diferença significativa na quantidade de osso neoformado. É necessário considerar que uma grande quantidade de fibras de colágeno representará uma neoformação óssea aumentada após a mineralização da matriz. (REDDY; STEHNO-BITTEL; ENWEMEKA, 1998).

AboElsaad et al. (2008) avaliaram a influência do LBI e do vidro bioativo na regeneração óssea e no tratamento de defeitos periodontais. Os autores utilizaram o laser arseneto de gálio alumínio no comprimento de luz infravermelho (830 nm), potência de 40 mW, densidade de energia de 16 J/cm^2 , por

60 segundos e um total de 4 sessões de laserterapia e observaram um efeito positivo do laser em acelerar o processo de reparo em defeitos periodontais.

Como sugestão de protocolo de laserterapia para aplicação clínica em cirurgias de enxerto ósseo, diante dos resultados obtidos no grupo laser enxerto de 28 dias, os autores do presente estudo sugeriram que as sessões com LBI aconteçam preferencialmente na fase inflamatória do processo de reparo ósseo, com a finalidade de diminuir a bioestimulação excessiva de fibroblastos.

6 CONCLUSÕES

Através da realização do presente estudo, os autores puderam concluir que o uso do laser de baixa intensidade alterou a cronologia do reparo tecidual de enxertos autógenos, acelerando o início do processo de reparo dos defeitos ósseos estudados. Baseado nos critérios utilizados para a realização da laserterapia no presente estudo, os autores sugeriram um novo protocolo de laserterapia para experimentação clínica em cirurgias de enxerto ósseo. Esse novo protocolo necessita, entretanto, de estudos clínicos para avaliar sua eficácia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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 in Medical Science**, v. 24, n. 3, p. 387–395, 2009.

ABRAMOVITCH-GOTTLIB, L. et al. Low level laser irradiation stimulates osteogenic phenotype of mesenchymal stem cells seeded on a three-dimensional biomatrix. **Lasers in Medical Science**, v. 20, n. 3–4, p. 138–146, 2005.

ASNAASHARI, M.; ZADSIRJAN, S. Application of laser in oral surgery. **J Lasers Med Sci**. v.5, n.3, p. 97–107, 2014.

BABUCCU, C. et al. Cumulative effect of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound on bone repair in rats. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 43, n. 6, p. 769–776, 2014.

BARBOSA, D. et al. Effects of low-level laser therapy (LLLT) on bone repair in rats: Optical densitometry analysis. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 2, p. 651–656, 2013.

BATISTA, J. D. et al. Effect of low-level laser therapy on repair of the bone compromised by radiotherapy. **Lasers in Medical Science**, v. 29, n. 6, p. 1913–1918, 2014.

BOSCO, A. F. et al. Effects of low-level laser therapy on bone healing of critical-size defects treated with bovine bone graft. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 163, p. 303–310, 2016.

CARVALHO, A. C. P.; OKAMOTO, T. **Cirurgia bucal: fundamentos experimentais aplicados à clínica**. São Paulo: Médica Panamericana, 1987.

CHAPPUIS, V. et al. Lateral Ridge Augmentation Using Autogenous Block Grafts and Guided Bone Regeneration: A 10-Year Prospective Case Series Study. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, p. 1–12, 2016.

CUNHA, M. J. S. et al. Effect of Low-Level Laser on Bone Defects Treated with Bovine or Autogenous Bone Grafts: In Vivo Study in Rat Calvaria. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–9, 2014.

DE ALMEIDA, A. L. P. F. et al. The effect of low-level laser on bone healing in critical size defects treated with or without autogenous bone graft: An experimental study in rat calvaria. **Clinical Oral Implants Research**, v. 25, n. 10, p. 1131–1136, 2014.

DE ALMEIDA, J. M. et al. Effects of oestrogen deficiency and 17 β -estradiol therapy on bone healing in calvarial critical size defects treated with bovine bone graft. **Archives of Oral Biology**, v. 60, n. 4, p. 631–641, 2015.

DE OLIVEIRA GONÇALVES, J. B. et al. Effects of low-level laser therapy on autogenous bone graft stabilized with a new heterologous fibrin sealant. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 162, p. 663–668, 2016.

DE SOUZA MERLI, L. A. et al. The low level laser therapy effect on the remodeling of bone extracellular matrix. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 5, p. 1293–1301, 2012.

ESTEVEZ, J. C. et al. Dynamics of bone healing after osteotomy with piezosurgery or conventional drilling - histomorphometrical, immunohistochemical, and molecular analysis. **Journal of translational medicine**, v. 11, p. 221, 2013.

FIALHO, A. C. V. **Processo de reparo em feridas de extração de incisivo superior de ratos. Estudo histológico e comparativo entre dois métodos de obtenção dos cortes dos alvéolos.** 31 f., 1986. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba . UNESP, Araçatuba, 1986.

GÁL, P. et al. Histological Assessment of the Effect of Laser Irradiation on Skin Wound Healing in Rats. **Photomedicine and laser surgery**, v. 24, n. 4, p. 480–488, 2006.

GARCIA, V. G. et al. Effect of LLLT on autogenous bone grafts in the repair of critical size defects in the calvaria of immunosuppressed rats. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 42, n. 7, p. 1196–1202, 2014.

GULTEKIN, B. A. et al. Comparison of Bone Resorption Rates after Intraoral Block Bone and Guided Bone Regeneration Augmentation for the Reconstruction of Horizontally Deficient Maxillary Alveolar Ridges. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–9, 2016.

KAZANCI OGLU, H. O.; EZIRGANLI, S.; AYDIN, M. S. Effects of laser and ozone therapies on bone healing in the calvarial defects. **The Journal of craniofacial surgery**, v. 24, n. 6, p. 2141–6, 2013.

KHADRA, M. et al. Low-level laser therapy stimulates bone-implant interaction: An experimental study in rabbits. **Clinical Oral Implants Research**, v. 15, n. 3, p. 325–332, 2004.

KIM, R.; KIM, J.; MOON, S. Effect of hydroxyapatite on critical-sized defect. **Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgery**, v.38, n.26, p. 2–7, 2016.

LÉO, J. A. et al. Efeito do laser de baixa intensidade (ASGA, 904 nm) na reparação óssea de fraturas em ratos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 47, n. 2, p. 235–240, 2012.

LIM, S. C.; LEE, M. J.; YEO, H. H. Effects of various implant materials on regeneration of calvarial defects in rats. **Pathology International**, v. 50, n. 8, p. 594–602, 2000.

MERLI, L. A. D. S. et al. Effect of low-intensity laser irradiation on the process of bone repair. **Photomedicine and laser surgery**, v. 23, n. 2, p. 212–215, 2005.

MONEA, A. et al. Bone healing after low-level laser application in extraction sockets grafted with allograft material and covered with a resorbable collagen dressing: a pilot histological evaluation. **BMC oral health**, v. 15, n. 1, p. 134, 2015.

MOURARET, S. et al. Cell viability after osteotomy and bone harvesting: Comparison of piezoelectric surgery and conventional bur. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 43, n. 8, p. 966–971, 2014.

NEVES, L. S. et al. A utilização do laser em Ortodontia. **Dental Press Ortodon Ortop Facial**, v. 10, n. 5, p. 149–156, 2005.

PINHEIRO, A. L. et al. Effect of low level laser therapy on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone. **Braz.Dent.J.**, v. 14, n. 1806–4760 (Electronic), p. 177–181, 2003.

PINHEIRO, A. L. B.; GERBI, M. E. M. M. Q1Photoengineering of Bone Repair Processes. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, n. 2, p. 169–178, 2006.

REDDY, G. K.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C. S. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendons. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 22, n. 5, p. 281–287, 1998.

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 orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics**, v. 111, n. 5, p. 525–532, 1997.

SELLA, V. R. G. et al. Effect of low-level laser therapy on bone repair: a randomized controlled experimental study. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 3, p. 1061–1068, 2015.

VALIATI, R. et al. Effect of low-level laser therapy on incorporation of block allografts. **International Journal of Medical Sciences**, v. 9, n. 10, p. 853–861, 2012.

WU, Y. et al. Oral Rehabilitation of Adult Edentulous Siblings Severely Lacking Alveolar Bone Due to Ectodermal Dysplasia: A Report of 2 Clinical Cases and a Literature Review. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, n. May, p. 1–12, 2015.

ANEXOS

Anexo: Documento de aprovação do projeto pelo CEUA



CEUA INSTITUTO PARA DESENVOLVIMENTO DA EDUCAÇÃO LTDA IPADE
CENTRO UNIVERSITÁRIO CHRISTUS

Of. No. 004/16

Protocolo do CEUA: 004/16

Pesquisador Responsável: Prof. TIBÉRIO GOMES MAGALHÃES

Título do Projeto: EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NO REPARO DE ENXERTO ÓSSEO AUTÓGENO PARTICULADO. ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA E IMUNOISTOQUÍMICA EM RATOS.

Levamos ao conhecimento de V. Sa que a Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA - IPADE considerou **APROVADO** o projeto supracitado na reunião do dia 14(quatorze) de março de 2016.

Descrição do animal utilizado:

Espécie: Wistar (ratos *novergicus albinus*) Número 40
Amostral:

Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEUA/Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA - IPADE ao término do estudo, período máximo 14/03/2016.

Fortaleza, 14 de março de 2016.

Olga Vale Oliveira Machado
Coordenadora

CEUA/Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA - IPADE