

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

ISABELA POLESİ BERGAMASCHI

AVAlIAÇÃO DO EFEITO SISTÊMICO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE O  
PROCESSO DE REPARO ÓSSEO COM BIOMATERIAIS: ESTUDO EM COELHOS

PORTO ALEGRE  
2016

ISABELA POLESI BERGAMASCHI

AVALIAÇÃO DO EFEITO SISTÊMICO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE O  
PROCESSO DE REPARO ÓSSEO COM BIOMATERIAIS: ESTUDO EM COELHOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Cirurgiã-Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Espindola Baraldi  
Coorientadores: Prof. Dr. Luciano Mayer  
Prof. MSc. Fernando Vacilotto Gomes

Porto Alegre  
2016

CIP - Catalogação na Publicação

Bergamaschi, Isabela Polesi

Avaliação do efeito sistêmico do laser de baixa intensidade sobre o processo de reparo ósseo com biomateriais: estudo em coelhos / Isabela Polesi Bergamaschi. -- 2016.

48 f.

Orientador: Carlos Eduardo Espindola Baraldi.

Coorientadores: Luciano Mayer, Fernando Vacilotto Gomes.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Curso de Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. LLLT. 2. Efeito sistêmico. I. Baraldi, Carlos Eduardo Espindola, orient. II. Mayer, Luciano, coorient. III. Gomes, Fernando Vacilotto, coorient. IV. Título.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a minha família, a qual me deu apoio constante e incentivo em todos os momentos desta trajetória. Aos meus pais, pelo amor incondicional, e aos meus irmãos, por nossa relação verdadeira de proteção e cuidado.

Obrigada a todos os professores da Faculdade de Odontologia UFRGS por sua doação diária e paciência para com os alunos. Agradeço ainda, de forma muito carinhosa, aos professores das disciplinas de Cirurgia, com os quais mais tive contato durante o período da Graduação, identificando-me muito com os mesmos. Também, deixo meu agradecimento especial ao meu prof. orientador, Prof. Carlos Eduardo Baraldi, o qual, além da orientação neste trabalho de conclusão, proporcionou-me experiências muito válidas na prática clínica do Cirurgião-Dentista.

Junto a ele, meu muito obrigada está destinado aos colaboradores nesta pesquisa, o Prof. Luciano Mayer, por sua paciência e confiança dedicada a mim, e aos Prof. Fernando Vacilotto Gomes e Prof. Rafael Ciotta Alves, por suas fundamentais contribuições neste trabalho.

Dedico um sincero agradecimento às minhas amigas e colegas Fernanda, Danielle e Thaíse, as quais tornaram esta etapa mais leve e muito feliz. Meu reconhecimento destina-se, ainda, a todos meus colegas da ATO 16/01, dos quais sempre terei orgulho de ser colega de profissão.

## RESUMO

BERGAMASCHI, Isabela Polesi. **Avaliação do efeito sistêmico do laser de baixa intensidade sobre o processo de reparo ósseo com biomateriais**: estudo em coelhos. 2016. 48 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

Os lasers não cirúrgicos interagem com os tecidos, resultando em fotobiomodulação celular. Trata-se de uma terapia simples, segura e de baixo custo, indicada isoladamente ou como terapia adjuvante a outros métodos. Recentemente, o efeito sistêmico (distante do sítio de irradiação) desta terapia foi sugerido, não estando claro seu alcance, tampouco mecanismos de ação. Estimulados por tal incerteza, operamos 20 coelhos da raça Nova Zelândia, criando um defeito de tamanho crítico (4,1 mm) na tíbia esquerda de cada um dos animais. Tais perfurações foram preenchidas com osso liofilizado sinterizado de origem bovina (Bio-Oss®) e recobertas com membrana de colágeno (Bio-Gide®). Houve 7 perdas, resultando em 13 amostras, divididas em: um grupo experimental (n=8) que recebeu terapia de laser de baixa intensidade, realizada utilizando diodo infravermelho (GaAlAs), 830nm, na dose de 10J/cm<sup>2</sup>, pontual, com potência de 50 mW em emissão contínua, em um total de 7 aplicações com intervalos de 48 horas. As aplicações foram realizadas na calota craniana, portanto à distância da área operada; e um grupo controle (n=5) que não recebeu aplicação de laser. A morte dos animais se deu no 45º dia pós-operatório. Lâminas histológicas do tecido ósseo enxertado da tíbia foram preparadas, coradas com hematoxilina-eosina e analisadas por microscopia de luz. As variáveis escolhidas para análise foram a porcentagem de área óssea neoformada e biomaterial remanescente (medida por programa de imagens), além de contagem de células ósseas regiões distintas do defeito. Não houve diferença significativa entre os grupos (p<0,05). Nas condições do estudo, não se observou efeito sistêmico da terapia laser sobre o processo de reparo ósseo.

Palavras-chave: LLLT. Efeito sistêmico. GaAlAs. Enxerto ósseo. Processo de reparo ósseo.

## ABSTRACT

BERGAMASCHI, Isabela Polesi. **Assessment of the systemic effects of low-level laser therapy on bone healing with biomaterial:** a rabbit model. 2016. 47 p. Final Paper (Graduation in Dentistry) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

Soft lasers interact with body tissues, resulting on cellular photobiomodulation. It is a simple, low cost and safe therapy and may be used alone or in combination with other procedures. Recently, systemic effects (far from the irradiation site) have been suggested, but their dimension and mechanism of action are unknown. Stimulated by these doubts, critical size defects (4,1 mm) were made on the left tibia of 20 New Zealand rabbits. The perforations were filled by inorganic bovine bone grafting (BioOss®) and covered with a collagen membrane (BioGide®). Seven samples were lost. An experimental group (n=8) received 7 applications of low level laser treatment (GaAIs, 830 nm, 50 mW, continuous emission, 10J/cm<sup>2</sup> total), every 48 hours, over a 14-day period. The laser was applied on calvaria, thefore away from the operation site. Control group (n=5) did not receive any laser application. The animals were killed on day 45 after surgery. Histological sections of the tibia surgical site were processed and stained with hematoxylin-eosin. The variables studied were percentage of newly formed bone tissue and residual biomaterial, in addition to cell count in different parts of the defect. There were no significant difference between groups. Under the study conditions, there were no systemic effects of soft laser on bone healing process.

Keywords: LLLT. Systemic effects. GaAIs. Bone graft. Bone healing.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Trifosfato de adenosina
CAM	Concentração alveolar mínima
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
Cm	Centímetro
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DBCA	Diretrizes Brasileiras para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos
ERM	Expansão rápida de maxila
FBML	Fotobiomodulação do laser
GaAlAs	Arseneto de Gálio e Alumínio
GaAs	Arseneto de Gálio
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HE	Hematoxilina e Eosina
HeNe	Hélio Neônio
HLLT	High reactive-Level Laser Treatment / Terapia de laser de alta intensidade
J/cm <sup>2</sup>	Joules por centímetro quadrado
Kg	Quilograma
LLLT	Low Level Laser Therapy / Terapia de laser de baixa intensidade
Mg	Miligramas
mm	Milímetros
MPA	Medicação pré-anestésica
mW	MilliWatts
NIH	Instituto Nacional da Saúde
nm	Nanômetro
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
UEA	Unidade de Experimentação Animal
W	Watts

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>10</b>
2.1	OBJETIVOS GERAIS .....	10
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	10
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>11</b>
3.1	REPARO ÓSSEO E ENXERTOS .....	13
3.2	INTERAÇÃO DO LLLT COM TECIDO ÓSSEO .....	14
3.3	EFEITO SISTÊMICO DO LLLT .....	16
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>19</b>
4.1	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO .....	21
4.2	DIVISÃO DOS GRUPOS .....	23
4.3	IRRADIAÇÃO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE .....	24
4.4	PREPARO DAS PEÇAS, CALIBRAÇÃO E ANÁLISE .....	24
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>27</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>31</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>37</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>38</b>
	<b>ANEXO A - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE SOB O PROTOCOLO 14-0661 EM 14 DE JANEIRO DE 2015</b> .....	<b>44</b>
	<b>ANEXO B - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE SOB O PROTOCOLO 15-0387 EM 10 DE NOVEMBRO DE 2015</b> .....	<b>45</b>
	<b>ANEXO C - TERMO DE COMPROMISSO PARA UTILIZAÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO E INFORMAÇÕES ASSOCIADA</b> .....	<b>46</b>
	<b>ANEXO D - ORÇAMENTO DA PESQUISA DE APROVEITAMENTO DE MATERIAL BIOLÓGICO, INCLUINDO OS DOIS SUBPROJETOS E SEUS RESPECTIVOS FINANCIAMENTOS</b> .....	<b>47</b>
	<b>ANEXO E - RELOCAÇÃO DE RECURSOS APROVADA NO DECORRER DO PROJETO</b> .....	<b>48</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As mais de 75 trilhões de células em todo corpo humano precisam de elétrons para se comunicar umas com as outras. A luz laser entrega os elétrons requeridos diretamente para as células e aumenta sua capacidade de comunicação e de síntese de ATP (energia) (HUSSEIN et al., 2011).

O Laser é composto por ondas eletromagnéticas que apresentam algumas características específicas: monocromaticidade, paralelismo espacial e temporal. Ele interage com os tecidos biológicos pelo menos de quatro formas: parte da luz é refletida; parte transmitida através do tecido sem atenuação; parte absorvida pelos componentes do tecido, ocasionando, no caso dos processos ressonantes, uma transferência de energia para o tecido; e, finalmente, parte da luz pode ser dissipada no tecido, podendo ocasionar interação em locais distantes da região de aparente propagação da luz – este sem mecanismo de ação conhecido. Além disso, resultam dessa interação diferentes alterações celulares, principalmente de membranas, bem como a secreção de citocinas. Tais efeitos podem potencialmente interferir na comunicação celular, tanto local quanto sistemicamente.

Os lasers de baixa intensidade, ou não cirúrgicos, são usados para fins terapêuticos desde a década de 1960 por suas características de baixa intensidade de energia e comprimento de onda capaz de penetrar nos tecidos (BRUGNERA JÚNIOR; VILLA; GENOVESE, 1991; BRUGNERA JÚNIOR; PINHEIRO, 1998). Essa terapia tem ação biomoduladora no processo de reparo tecidual e é empregada amplamente nas diversas áreas da saúde, sendo a Odontologia uma das ciências que mais investiga essa tecnologia.

A LLLT (Low Level Laser Therapy ou Terapia Laser de Baixa Intensidade) tem sido indicada para agir no processo de reparo tecidual devido aos seus efeitos fotoquímicos, fotofísicos e fotobiológicos gerados pela interação da luz laser com os componentes teciduais. A estimulação do processo de reparo, a redução da inflamação e o controle da dor pós-operatória (ALMEIDA-LOPES; MASSINI, 2002; PINHEIRO; FRAME, 1992; ROCHKIND et al., 1989) são efeitos desejáveis descritos. A terapia promove mudanças de caráter metabólico, energético e funcional nos tecidos submetidos à radiação, resultando na evolução para a cura em um período de tempo menor (ALMEIDA-LOPES, 2003; BRUGNERA JÚNIOR et al., 2003; CATÃO, 2004). A LLLT parece estimular o reparo tecidual, melhorando processo de reparo de tecidos por meio da promoção da proliferação celular (KARU, 1989; GARCIA et al., 2000; HUBLER et al., 2010); da aceleração na

formação de tecidos de granulação (KOLÁVORÁ; DITRICHOVÁ; WAGNER, 1999); do estímulo à síntese do colágeno, com formação das fibras pró-colágenas tipo I e tipo III (PINHEIRO, 2009).

Embora a LLLT tenha se tornado uma prática comum nas áreas biomédicas, ainda não se tem um entendimento claro sobre seus efeitos no processo de reparo do tecido ósseo. Lesões ósseas (fraturas, defeitos por ressecção e fixação de implantes) ativam o processo de reparo local pela liberação de fatores de crescimento. No entanto, a formação óssea necessita de dois requisitos indispensáveis: amplo suprimento vascular e suporte mecânico. A união desses fatores irá ativar os osteoblastos na produção de tecido ósseo (GUIMARÃES, 2006; HOLLINGER; BUCK; BRUDER, 1999; MARINO, 2003).

O processo de reparo do tecido ósseo pode ser dividido resumidamente em três etapas: osteocondução, neoformação e remodelação óssea (DAVIES, 1998; SONIS; FAZIO; FANG, 1996; YOUNG; WHEATH, 2000). Um dos métodos para estudo do processo de reparo ósseo é a criação de defeitos críticos, por meio de cirurgia ressectiva, sendo que este defeito pode ser definido como a menor ferida intra-óssea que não cicatrizará por reparo ósseo durante o tempo de vida do animal (HOLLINGER; KLEINSCHMIDT, 1990).

O uso clínico da LLLT está fundamentada em sua capacidade de promover, a nível celular, efeitos estimuladores sobre os processos moleculares e bioquímicos que ocorrem durante os mecanismos intrínsecos relacionados às etapas do reparo tecidual. Dentre os efeitos terapêuticos podemos citar: o aumento da proliferação epitelial, fibroblástica e da síntese de colágeno, acelerando o processo cicatricial; o aumento no potencial de remodelação e reparo ósseo; o restabelecimento da função neural após lesão; a normalização da função hormonal; a regulação do sistema imunológico; a redução da inflamação e do edema; a modulação e atenuação da sintomatologia dolorosa; e a analgesia pós-operatória (TRELLES; MAYAYO, 1987; RIGAU et al., 1991; PINHEIRO; FRAME, 1992; NASCIMENTO et al., 2004; WEBER et al., 2006; MOHAMMED et al., 2007; SOARES et al., 2008).

O uso potencial dos lasers na biomodulação do reparo ósseo através de suas propriedades fotoquímicas e fotobiológicas tem sido estudado por diversos pesquisadores com o objetivo de proporcionar ao paciente, submetido à cirurgia, maior rapidez e qualidade do processo de reparo ósseo, com redução dos sinais e sintomas inflamatórios (TAKEDA, 1988). Estudos têm evidenciado os efeitos positivos da LLLT sobre o processo de reparo de feridas de tecidos moles. Entretanto, os seus efeitos sobre tecidos ósseos são pouco conhecidos. Na mesma linha, seu uso adjuvante na incorporação do enxerto de osso alógeno na área receptora pode acelerar o processo de incorporação e diminuir a

resposta inflamatória inicial, podendo assim aumentar a revascularização e conseqüentemente o sucesso clínico (VALIATI et al., 2011).

Além disso, A LLLT parece ter efeitos em órgãos e tecidos distantes do sítio de aplicação, conforme estudos recentes. Segundo Hussein et al. (2011), o uso da LLLT para cicatrização de feridas tem se mostrado efetivo na modulação tanto da resposta local como da resposta sistêmica. Outros estudos descreveram resultados em concordância com esta tese – efeito à distância – sem definir claramente seus mecanismos. Alguns destes trabalhos corroboram sobre o fato da LLLT modular o balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias, aumentar o número de mitoses e/ou estimular a liberação de fatores de crescimento e citocinas na corrente sanguínea (RODRIGO, 2009; HENTSCHEKE, 2013; COELHO, 2014; WEBER, 2014). Portanto, é dentro destes questionamentos que o presente estudo se desenvolverá, na busca de novos esclarecimentos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Pesquisar em modelo animal, a ação da LLLT – aplicada distante do sítio cirúrgico – no processo de reparo ósseo de defeitos críticos criados na tíbia, preenchidos com osso liofilizado de origem bovina e recobertos com uma membrana de colágeno.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar por meio de histologia com coloração em Hematoxilina-Eosina, aos 45 dias de reparo, em sítios localizados na porção central do defeito:

1. o processo de neoformação óssea local nos defeitos criados nas tíbias dos coelhos, por meio da mensuração de área óssea, expressa em porcentagem, comparando os grupos controle (animais que não receberam irradiação da LLLT) e experimental (com irradiação da LLLT) quando aplicada à distância do leito cirúrgico;
2. A remanescência de partículas de biomaterial no defeito, por meio da mensuração de sua área, expressa em porcentagem, comparando os dois grupos;
3. A contagem de células ósseas existentes, comparando os dois grupos.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

O primeiro laser foi desenvolvido por Theodore Maiman em 1960, no entanto, sua origem é bastante discutida. Embora tenha sido Einstein, em 1916, quem propiciou o seu desenvolvimento teórico, com a publicação de seu tratado *Zur Quantum Theorie der Strahlung*, foram Schawlow e Townes os autores dos princípios pelos quais todos os lasers operaram. Contudo, Townes, Basov e Prokhorov receberam o prêmio Nobel em 1964, creditando-lhes assim o desenvolvimento desta teoria (PINHEIRO; BRUGNERA JÚNIOR; ZANIN, 2010).

Como componentes característicos importantes do laser, pode-se verificar o comprimento de onda, que nada mais é do que a distância medida entre dois picos consecutivos de sua trajetória, cujo elemento define a cor de sua luz, mensurada em nanômetro (nm). Essa característica, juntamente com a frequência e a amplitude, define a luz dentro do espectro completo de ondas eletromagnéticas.

Segundo Oshiro e Fujino (1993), a absorção e a difusão do laser no tecido resultam numa resposta fotoreativa. Esta é a consequência de uma fotodestruição ou uma fotoativação tecidual, determinadas pelo efeito fotoquímico, fotoelétrico, fototérmico e fotomecânico do laser. De acordo com a reação celular, a terapia com laser é classificada em High reactive-Level Laser Treatment (HLLT), usado em procedimentos cirúrgicos, e Low reactive-Level Laser Treatment (LLLT), usado em procedimentos terapêuticos clínicos. Os lasers não cirúrgicos ou não ablativos têm como seus principais efeitos terapêuticos, a ação antiinflamatória, analgésica e reparadora tecidual. No que se refere a reparação tecidual, acredita-se que o tempo e a qualidade deste processo seja beneficiada pelo uso da laserterapia, acarretada pelo incremento microcirculatório neoformado na área irradiada, permitindo maior nutrição tecidual (BRUGNERA JÚNIOR et al., 2007).

Os lasers de baixa intensidade são aqueles que emitem tanto o espectro vermelho quanto o infravermelho, com uma energia média de 50 mW a 1W. Como sua ação é principalmente baseada em efeitos fotoquímicos, eles podem ter a propriedade ímpar de não aumentar a temperatura do tecido. Os tipos mais comuns de laser de baixa potência são o laser de Arseneto de Gálio (GaAs), laser de Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAlAs) e laser Hélio Neônio (HeNe) (PRADOS-FRUTOS et al., 2016).

O laser diodo de Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAlAs) apresenta penetração de alta profundidade em comparação com outros tipos de laser (KHADRA et al., 2004). A corrente elétrica

formada proporcionará a combinação de elétrons em excesso de um lado e os vazios existentes de outro lado, gerando certas quantidades de energia que, quando ampliadas pelas extremidades polidas do diodo, escapam em forma de radiação laser sob a forma de fótons. O GaAlAs atua no comprimento de onda de 65 a 900 nm, sendo capaz de promover biomodulação (PINHEIRO; BRUGNERA JÚNIOR; ZANIN, 2010).

O comprimento de 830 nm foi extensamente estudado e é utilizado clinicamente. Está disponível comercialmente no Brasil, por mais de um fabricante. Lasers infravermelhos nesta faixa de comprimento de onda penetram até 2 mm nos tecidos antes de perder algum percentual de energia. Por tal, permite-se sua aplicação por interferir no processo de reparo dos ossos maxilo-faciais em humanos, bem como nos modelos animais dedicados a simular tal cenário tecidual (PINHEIRO, 2003), como a tíbia do coelho. Uma dose muito baixa de LLLT não proporciona efeitos. Doses muito altas podem resultar em pouco ou nenhum efeito, enquanto doses extremas podem conduzir a efeitos inibitórios (KHADRA et al., 2004). A literatura mostra que os efeitos biomoduladores são dependentes da dose (PINHEIRO et al., 2003). A Tabela 1 resume as diferentes doses utilizadas em estudos de processo de reparo ósseo com laser diodo de 830 nm.

Tabela 1 - Diferentes protocolos de LLLT utilizados em estudos avaliando reparo ósseo (continua).

<b>Autores</b>	<b>Comprimento de onda (nm)</b>	<b>Potência (mW)</b>	<b>Dose p/ Sessão (J/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Nº Pontos Aplicação</b>	<b>Ano</b>
Pinheiro et al.	830	40	4,8	4	2001
Silva Júnior et al.	830	40	4,8	---	2002
Pinheiro et al.	830	40	16	4	2003
Mendez et al.	830	35	20	4	2004
Khadra et al.	830	75	23	2	2004
Lopes et al.	830	10	21,5	4	2005
Weber et al.	830	50	10	4	2006
Lopes et al.	830	10	21,5	4	2007

Tabela 1 – Diferentes protocolos de LLLT utilizados em estudos avaliando reparo ósseo (conclusão).

<b>Autores</b>	<b>Comprimento de onda (nm)</b>	<b>Potência (mW)</b>	<b>Dose p/ Sessão (J/cm2)</b>	<b>Nº Pontos Aplicação</b>	<b>Ano</b>
Blaya et al.	830	50	10	1	2008
Pozza et al.	830	30	10	---	2008
Pinheiro	830	40	16	4	2009
AboElsaad et al.	830	40	16	4	2009
Rodrigo et al.	830	50	20	1	2009
Kreisner et al.	830	40	10	---	2009
Freddo et al.	830	50	10	2	2009
Nascimento et al.	830	10	20	---	2010
Mayer et al.	830	50	5/10/20	2	2013
Coelho et al.	830	100	4	4	2014
Weber et al.	830	50	5/10/20	2	2014

Fonte: adaptado de FRONZA et al., 2012

### 3.1 REPARO ÓSSEO E ENXERTOS

As técnicas de reconstrução do processo alveolar dos maxilares evoluíram de forma exponencial na Odontologia, a partir do desenvolvimento da reabilitação protética dental sobre implantes osseointegráveis. Em se tratando de reconstrução dos processos alveolares dos maxilares, as técnicas de enxertia óssea empregadas são ditadas pelo tipo de defeito a ser reconstruído e, em função deste, pela forma como o material é empregado. Assim, podemos utilizar o tecido ósseo na forma de blocos ou particulado.

Entre os materiais de enxerto usados para regeneração óssea, o osso autógeno tem sido considerado o material ideal, pois seu potencial osteogênico é superior aos aloenxertos e xenoenxertos (MIRON et al., 2011; PENTRUGARO; AMAR, 2005). Apesar de ser o padrão-ouro para reconstruções, este tipo de enxerto é associado com 8,5 a 20% das complicações do procedimento,

incluindo hematoma, dano as estruturas anatômicas, infecções, dor na área doadora e reabsorção imprevisível do enxerto (KHADRA, 2004; ARAÚJO; LINDHE, 2011; CUNHA et al., 2014). Levando em conta estas desvantagens, diferentes biomateriais tem sido defendidos por preservar ou melhorar a dimensão e o contorno do rebordo após extração dentária, incluindo enxertos sintéticos, alogênicos e/ou membranas. Um enxerto em particular, constituído de osso liofilizado bovino sinterizado (Bio-Oss®<sup>1</sup>), foi utilizado com sucesso em muitos estudos para se conseguir tais efeitos de preservação alveolar e tratamento de defeitos ósseos (ARAÚJO; LINDER; LINDHE, 2011; ARAÚJO; LINDHE, 2009).

O Bio-Oss (Geistlich) é um substituto ósseo líder contemporaneamente em regeneração óssea oral, tem sido aplicado clinicamente com sucesso por mais de 20 anos. Não obstante sua origem xenógena (bovina), o material recebe múltiplas etapas industriais de tratamento, incluindo sinterização, de forma a perder quase totalmente sua fase orgânica. A estrutura, altamente porosa, oferece espaço para a angiogênese e osteogênese. Isso, associado à grande semelhança morfológica com o osso humano, explica sua incorporação ao processo natural de modelagem e remodelagem.

### 3.2 INTERAÇÃO DA LLLT COM TECIDO ÓSSEO

Embora os efeitos da fotobiomodulação do laser (FBML) sobre os tecidos moles estejam sendo estudados por diversos grupos em todo o mundo, seus efeitos sobre o tecido ósseo ainda não são completamente estabelecidos. Alguns estudos refletem a ideia de que células mesenquimais indiferenciadas podem ser biomoduladas positivamente a se transformarem em osteoblastos que podem se transformar em osteócitos mais rapidamente. Estudos anteriores sugerem que a FBML, agindo sobre as células osteoblásticas, a nível mitocondrial, poderia aumentar a produção de matriz óssea devido a uma melhora na vascularização local e também pelo efeito anti-inflamatório que poderiam resultar em um aumento da liberação de mediadores e da microcirculação local, os quais acelerariam a cicatrização (PINHEIRO; BRUGNERA JÚNIOR; ZANIN, 2010). Desta forma, o uso do laser em biomodulação de reparo ósseo tem sido estudado em defeitos ósseos, porque há aumento de atividade osteoblástica, vascularização e organização de fibras colágenas (BATISTA et al., 2015; KIM et al., 2016).

De acordo com Khadra et al. (2005), implantes foram colocados na tíbia de 13 coelhos, os quais foram divididos em 2 grupos, sendo que o experimental mostrou maior osseointegração do implante do

---

<sup>1</sup>Bio-Oss, Geistlich Pharma do Brasil, São Paulo, SP-Brasil

que o grupo controle (sem LLLT). Após 56 dias da cirurgia, o grupo irradiado teve valores superiores ao grupo controle nos testes de torque de remoção do implante e na análise histomorfométrica.

Kim et al. (2016) inseriram 26 implantes osseointegráveis no fêmur de 13 coelhos (bilateral) para avaliar osseointegração com e sem LLLT. Encontraram resultados favoráveis ao laser. As análises histopatológicas em coloração de HE indicaram que os coelhos dos grupos LLLT apresentaram mais matriz óssea ao redor do implante que os grupos controle. Na coloração de tecidos em Masson, mais colágeno e matriz óssea imatura foram observados nos grupos experimentais, suportando os achados de estudos anteriores. Os resultados da análise de torque de remoção dos implantes também foi favorável ao uso de LLLT. Porém, os testes de relação de contato implante-osso e análise da frequência de ressonância não condisseram com os achados histopatológicos.

Aras e colaboradores (2015) estudaram os efeitos da LLLT na formação óssea e recidiva após expansão rápida de maxila (ERM) em ratos. Neste estudo, o qual avaliou o número de osteoblastos, osteoclastos e vasos sanguíneos capilares, foi possível concluir que a LLLT quando associada a ERM auxilia na regeneração óssea nas suturas. Porém, não se tem evidências de que a terapia de laser previne efetivamente a recidiva após procedimento de ERM em ratos.

Cunha et al. (2014) produziram cirurgicamente defeitos ósseos na calvária de 60 ratos, preenchidos somente com sangue, com osso autógeno ou com osso bovino inorgânico. Para cada tipo de preenchimento, incluíram um grupo controle (sem LLLT) e um grupo experimental (com LLLT). Nos resultados, obteve-se maior formação óssea nos grupos irradiados com laser do que nos grupos não irradiados. Acredita-se que o laser acelera o processo de formação óssea e também a reabsorção das partículas de biomaterial, como mostrado na diferença estatisticamente significativa nos quesitos área de neoformação óssea e área de partículas remanescentes, quando os grupos de enxerto ósseo bovino com e sem LLLT foram comparados.

Já na revisão sistemática de literatura de Prados-Frutos et al. (2016), analisando os trabalhos existentes em relação ao efeito da terapia de laser de baixa intensidade na osseointegração de implantes dentários, os autores concluíram que há falta de estudos clínicos em humanos, principalmente pela carência de padronização dos estudos. Deve ser observado que, apesar do fato da LLLT ter muitos benefícios descritos relacionados a regeneração dos tecidos, não há estudos clínicos suficientes que suportem o efeito deste tratamento na osseointegração de implantes, no atual estado de nosso conhecimento.

Assim como em outros estudos, Khadra et al. (2004) mostram que o efeito do LLLT foi mais pronunciado no 14º dia, sugerindo que esta terapia tem efeito mais favorável nos estágios iniciais do processo de reparo ósseo. Conclui que mais investigações são necessárias para detalhar tais informações. Weber et al. (2006), compartilha este achado, visto que mostra, em seu estudo, que os grupos experimentais (com LLLT) apresentaram a maior remodelação óssea no dia 15 de pós-operatório, mostrando a tendência de início da estabilização no dia 21. Isto indica que o efeito da LLLT é mais efetivo quando o tratamento é realizado nos estágios iniciais, ou seja, quando ocorre a maior proliferação celular.

### 3.3 EFEITO SISTÊMICO DA LLLT

A literatura tem demonstrado que a LLLT é uma terapia localmente segura. Entretanto, já se sugere que esta também esteja relacionada a efeitos sistêmicos, sem que os mecanismos utilizados para tal sejam conhecidos. Logo, a LLLT parece ter efeitos nos órgãos e tecidos distantes do sítio de aplicação (efeitos sistêmicos), como sugerido pelo estudo de Mayer et al. (2013) e de Weber et al. (2014), ambos em coelhos, nos quais foi descrita a influência da aplicação na mandíbula em um órgão diferente do sítio de aplicação, a glândula tireóide, a partir da constatação de alterações nos níveis de T3, T4 e cálcio sérico.

Em outro estudo (COELHO et al., 2014), dois implantes foram colocados, bilateralmente, em tíbias de coelhos, sendo que somente uma das patas recebeu terapia de laser. Os animais (n=24) foram alocados em dois grupos (controle e experimental), sendo ambos divididos em 3 subgrupos de acordo com o período de observação (5, 15 ou 30 dias). Não houve diferença estatística entre a pata esquerda e direita aos 5 dias do experimento, concluindo que o efeito sistêmico foi quase tão intenso quanto o efeito local do laser neste período. Entretanto, não houve diferença significativa em nenhum dos outros tempos, ou seja, a LLLT apresentou efeito sistêmico positivo somente nas fases iniciais da formação óssea.

No trabalho de Rodrigo et al. (2009), o qual avaliou o efeito sistêmico da terapia de laser vermelho e infravermelho no reparo de feridas, 36 ratos foram divididos em quatro grupos: controle (sem laser), laser vermelho, laser infravermelho e o ambos os lasers. Três feridas foram criadas utilizando uma agulha (movimentos circulares) no dorso dos ratos, sendo uma perto da cabeça e as outras 7 cm longe uma da outra (em direção à cauda). A aplicação direta do laser nas feridas estimulou

sua cicatrização, assim como a cicatrização das feridas distantes do ponto de aplicação. Isto foi observado principalmente na fase inicial do reparo das feridas, mas com uma maior intensidade quando os laser vermelho e infravermelho foram utilizados em combinação.

No estudo de Batista et al. (2015), 60 ratos foram operados, criando defeitos ósseos no lado esquerdo do fêmur destes animais para se avaliar neoformação óssea. O laser utilizado no pós-operatório dos grupos experimentais foi do tipo infravermelho, diodo de Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAlAs), com um comprimento de onda de 830 nm, 50 mW de potência, sendo aplicados a cada 48 horas. A remodelação óssea nos grupos que tiveram aplicação direta de laser na ferida foi mais rápida do que o grupo controle ou quando o laser foi aplicado fora do sítio cirúrgico. A maior neoformação óssea foi no período inicial (7 dias), sendo seguida por uma acelerada reabsorção e remodelação óssea, não havendo diferença na porcentagem de osso entre os tempos 15 e 21 dias. Além disso, no presente estudo, não se observou efeitos sistêmicos da LLLT na cicatrização óssea, considerando que a aplicação do laser distante da ferida não interferiu na cicatrização do defeito ósseo.

A LLLT tem sido utilizada como tratamento anti-inflamatório para diversos casos e doenças, porém, o efeito desta nos músculos esqueléticos de ratos com insuficiência cardíaca permanece não sendo clara. Frente a esta questão, Hentschke et al. (2013) foram os pioneiros ao estudar a interação da LLLT e esta doença, a qual é ativada pelo sistema imune, devido ao desequilíbrio entre as citocinas pró e anti-inflamatórias, conduzindo a um estado pró-inflamatório persistente. Ao analisar os resultados encontrados, concluíram que a terapia de laser pode ser utilizada como uma nova forma não farmacológica de tratar o estado pró-inflamatório da síndrome de insuficiência cardíaca, sendo uma estratégia segura, simples e de baixo custo. Ainda, seus resultados mostraram que a LLLT pode modular o balanço entre as citocinas pró e anti-inflamatórias, periféricamente e sistemicamente.

Possíveis explicações para tais efeitos sistêmicos são sugeridas, como a proposta por Rodrigo et al. (2009), na qual a estimulação das células distantes podem estar associadas com o aumento do número de mitoses, o que poderia modular a fisiologia celular em diferentes locais. Ainda, outra explicação sobre o efeito sistêmico do laser seria a habilidade desta terapia de estimular a liberação de fatores de crescimento e citocinas na corrente sanguínea, com o potencial de subsequente ação destes fatores nos sítios não irradiados provocando vasodilatação e angiogênese (KHADRA et al., 2004; SCHINDL et al., 2002).

O estudo de Schindl et al. (2002) foi feito em pacientes diabéticos, o qual analisou a indução do aprimoramento sistêmico na microcirculação sanguínea da pele (da perna) em pacientes com microangiopatia causada por diabetes melito. Os resultados do estudo confirmam a melhora de microcirculação não só no sítio irradiado, mas também sugerem a possibilidade de provocar efeito sistêmico na microcirculação, como descrito anteriormente em modelos animais. O parâmetro utilizado foi a temperatura da pele e o laser utilizado foi do tipo vermelho, HeNe, com comprimento de onda de 632,8 nm.

## 4 METODOLOGIA

Este é um subprojeto com aproveitamento de material biológico (ANEXO C). O projeto original estudou a utilização de biomateriais em calvária de coelhos com aplicação de LLLT no sítio cirúrgico em dose de 10J/cm<sup>2</sup> por sessão, totalizando 7 aplicações durante 14 dias. O uso de amostra biológica na tibia esquerda destes animais possibilita uma segunda avaliação, realizando-se aproveitamento do conteúdo amostral por inteiro, permitindo avaliação sistêmica da LLLT sobre o processo de integração de biomateriais à distância. Outro subprojeto pretende ainda avaliar as amostras por meio de microtomografia computadorizada.

O projeto de pesquisa original foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob o protocolo 14-0661 em 14 de janeiro de 2015 (ANEXO A). Além disso, o projeto de aproveitamento de material biológico, referente ao trabalho aqui descrito, também obteve aprovação pela mesma comissão em 10 de novembro de 2015 sob o protocolo 15-0387 (ANEXO B).

Foram observados os princípios éticos para experimentação em animais, que constam na Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca) que regulamenta e estabelece procedimentos para o uso científico de animais, revogando a Lei 6.638, de 8 de maio de 1979; respeitando-se também os Princípios Éticos na Pesquisa Experimental, determinados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e pelo NIH (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health* – edição revisada em 1996). Da mesma forma, seguiram-se e respeitaram-se as Diretrizes Brasileiras para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA) do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. Os procedimentos de finalização seguem as normas indicadas pelas Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA (2013). Ainda, um termo de compromisso para utilização de material biológico e informações associadas foi feito, sendo assinado por todos membros envolvidos na pesquisa (ANEXO C).

Este trabalho foi desenvolvido dentro do paradigma tradicional, quantitativo, no delineamento de estudo do tipo experimental verdadeiro, com as amostras selecionadas de forma aleatória, com um grupo de controle com pré e pós-teste (CAMPBELL; STANLEY, 1979; GOLDIM, 1995).

A amostra deste estudo foi constituída por 13 blocos ósseos removidos da porção proximal da tibia esquerda de 13 coelhos da ordem *Lagomorpha*, gênero *Oryctolagus*, espécie

*Oryctolagus cuniculus*, raça Nova Zelândia, variedade branco, machos, pesando entre 3 e 4 kg, com aproximadamente 4 meses de idade, clinicamente saudáveis, selecionados aleatoriamente (SCHIMIDT-NIELSEN, 1996). O total de defeitos críticos incluídos no estudo foi de 5 para grupo controle e 8 para experimental.

As amostras dos animais selecionados foram identificadas de acordo com o tratamento que o animal receberia e destinados ao grupo controle ou experimental.

Vide quadro 1.

Quadro 1 - Divisão da amostra conforme o grupo correspondente.

GRUPO	INTERVENÇÃO
<b>Controle</b> <b>(sem LLLT)</b>	<b><u>1 perfuração na tíbia esquerda dos animais:</u></b> <b>perfuração:</b> Bio-Oss + membrana de colágeno
<b>Experimental</b> <b>(com LLLT)</b>	<b><u>1 perfuração na tíbia esquerda dos animais:</u></b> <b>perfuração:</b> Bio-Oss + membrana de colágeno (aplicação do LLLT à distância – calota craniana)

Fonte: da autora, 2016.

Os coelhos permaneceram em gaiolas individuais suspensas, evitando o contato direto com fezes e urina, sob observação por um período de 15 dias antes dos procedimentos cirúrgicos para ambientação. Os animais foram alimentados com ração padronizada na UEA e a água fornecidas *ad libitum*. Foram mantidos sob condições controladas de iluminação com ciclo claro/escuro alternado a cada 12 horas, de temperatura entre 16 a 22°C e umidade relativa do ar de 40-60%.

#### 4.1 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no bloco cirúrgico da própria UEA, sendo este ambiente separado do ambiente de criação. Assim sendo, os animais não ficaram expostos ou sob tensão de ruídos, odores e até mesmo a visão dos procedimentos realizados.

Após a aferição do peso, os animais foram submetidos pelo protocolo de medicação pré-anestésica (MPA) por meio de injeção intramuscular de Ketamina – Cetamina (20mg/kg), Meperidina – cloridrato de petidina (10mg/kg) e Midazona – Midazolam (1mg/kg). Foi realizada a tricotomia na região anterior da tíbia esquerda. Após o efeito da medicação anestésica, sob anestesia geral, os animais foram posicionados em decúbito esternal sobre colchão térmico ativo sendo a veia marginal da orelha canulada com cateter 24G para administração de soro fisiológico 0,9% a 6 gotas/minuto. A indução da anestesia foi realizada através de uma máscara acoplada a um sistema sem reinalação de gases com administração de Isoflurano<sup>2</sup> (Isoforine®) 1 a 1,5 CAM (concentração alveolar mínima) diluído em oxigênio a 100%, com fluxo de 2 L/min, através de um vaporizador universal (Oxygel®)<sup>3</sup>. A manutenção da anestesia fora realizada por meio do uso de Fentanil *em bolus* (7µg/Kg).

Ao se observar a perda do reflexo de retirada do membro anterior, foi realizada a intubação para manutenção da anestesia inalatória. Os seguintes parâmetros anestésicos foram aferidos: frequência cardíaca e respiratória, capnometria, oximetria, pressão arterial invasiva e temperatura retal. A profilaxia antibiótica foi realizada imediatamente antes da cirurgia, com a administração intramuscular de Cefazolina (20 mg/Kg).

A epiderme recebeu antissepsia com polivinilpirrolidona-iodo a 1% (Povidine®)<sup>4</sup>. Campos cirúrgicos estéreis isolaram a área operatória. Inicialmente, o procedimento cirúrgico referente ao projeto 14-0661 foi executado, no qual se criou e preencheu defeitos ósseos na calota dos animais, com resultados a serem avaliados em outro estudo.

Posteriormente, dentro do projeto de aproveitamento de material biológico (15-0837), uma incisão foi realizada pelos planos cirúrgicos por meio do uso de uma lâmina nº 15 com aproximadamente 5 cm sobre a porção medial da tíbia esquerda de cada um dos animais, a posterior

---

<sup>2</sup>Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP-Brasil

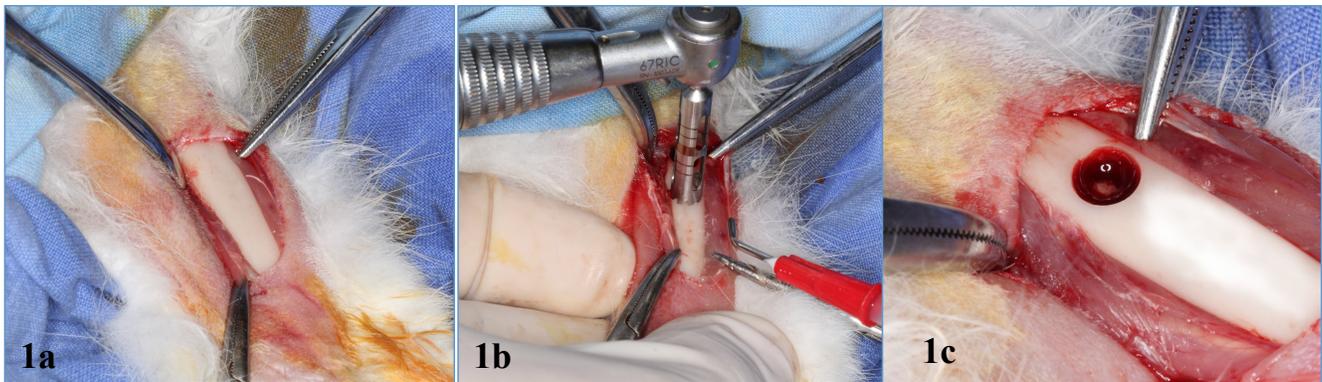
<sup>3</sup>Oxygel®, São Paulo, SP-Brasil

<sup>4</sup>Johnson & Johnson do Brasil Ind. e Com. Prod. para a Saúde Ltda, São Paulo, SP-Brasil

dissecção dos planos musculares, incisão do periósteo e descolamento superiosteal com descolador tipo Freer (Golgran®)<sup>5</sup>.

Após o descolamento e exposição do tecido ósseo, foi realizada a ostectomia na tíbia esquerda das amostras com um motor cirúrgico (Driller®) e peça-de-mão do tipo contra-ângulo (Kavo®)<sup>6</sup> com rotação de 800rpm e com uma broca trefina de 4 mm (Neodent®)<sup>7</sup> sob irrigação abundante com soro fisiológico 0,9% (Figura 1).

Figura 1 - Geração do defeito ósseo na tíbia esquerda do coelho. 1a: dissecção subperióstica. 1b: perfuração com trefina. 1c: defeito resultante.



Fonte: da autora, 2016.

Após irrigação abundante, com soro fisiológico, para a limpeza do leito operatório, o defeito ósseo criado foi preenchido com material de enxertia comercialmente disponível (Bio-Oss) e recoberto com uma membrana de colágeno absorvível (Bio-Gide®<sup>8</sup>). A ferida cirúrgica foi fechada em por planos com fio de nylon 5-0 Ethicon®<sup>9</sup>, com pontos isolados (Figura 2).

Após a remoção dos campos estéreis, a ferida cirúrgica foi embrocada com solução de iodo, recebendo imediatamente um curativo com gaze e micropore. Uma tala ainda permitiu estabilidade adicional e proteção da pata contra manipulação do próprio animal e possíveis fraturas.

<sup>5</sup>Golgran, São Paulo, SP-Brasil

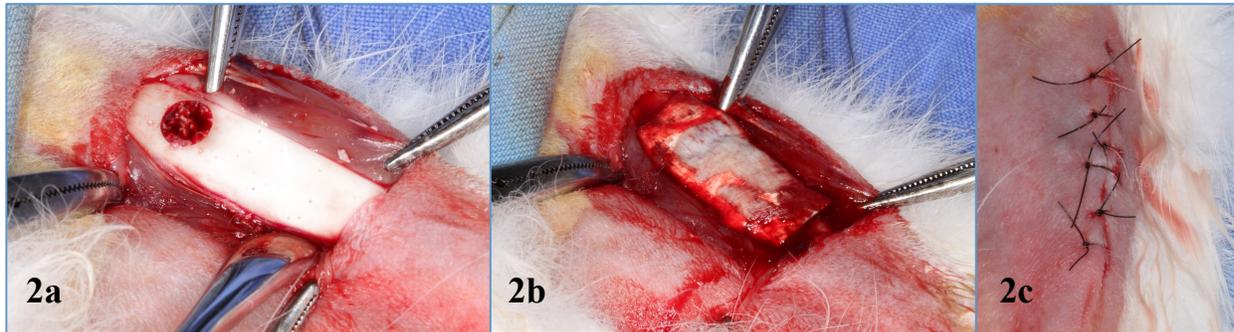
<sup>6</sup>Fábrica Kavo do Brasil Ind. Com. Ltda, Joinville, SC-Brasil

<sup>7</sup>Neodent, JJGC Indústria e Comércio de Materiais Dentários S/A, Curitiba, PR-Brasil

<sup>8</sup>Bio-Gide®, Geistlich Pharma do Brasil, São Paulo, SP-Brasil

<sup>9</sup>Johnson & Johnson do Brasil Ind. e Com. Prod. para a Saúde Ltda, São Paulo, SP-Brasil

Figura 2 - Preenchimento e cuidados com ferida operatória. 2a: preenchimento do defeito com biomaterial. 2b: recobrimento com membrana de colágeno. 3b: sutura por planos a pontos simples.



Fonte: da autora, 2016.

O procedimento foi repetido de forma idêntica em todos os animais pelo mesmo cirurgião. A amostra recebeu imediatamente após o término dos procedimentos cirúrgicos a terapia medicamentosa composta de analgésico com Morfina 2mg/kg subcutânea, Cetroprofeno 2mg/kg (via intramuscular) e Enrofloxacino, um antimicrobiano de amplo espectro, de uso intramuscular, na dose de 5mg/kg. A medicação pós-operatória tardia foi composta de Morfina 2mg/kg subcutânea a cada 12 horas por 3 dias, Cetroprofeno 2mg/kg, aplicado via intramuscular a cada 24 horas durante um período de 03 dias pós-operatórios e Enrofloxacino 5mg/kg a cada 12 horas durante 07 dias. Após os 3 dias de uso da morfina, foi realizado mais 2 dias de tramadol (SC) a cada 12 horas (dose de 4 mg/kg).

Foram feitos controles diários de alimentação e das condições de saúde dos animais, após o procedimento cirúrgico, pela Médica Veterinária responsável.

#### 4.2 DIVISÃO DOS GRUPOS

O que diferenciou os grupos foi os procedimentos durante o pós operatório, quando o grupo experimental foi irradiado com laser não ablativo nos defeitos da calvária. O grupo controle não recebeu nenhuma aplicação de laser, apenas a simulação do posicionamento da ponteira do aparelho para que fossem submetidos a mesma manipulação do grupo experimental.

### 4.3 IRRADIAÇÃO COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE

O aparelho utilizado para irradiação foi o Thera Lase®<sup>10</sup>, laser de diodo infravermelho com meio ativo GaAlAs (Arseneto de Gálio e Alumínio), com comprimento de onda de 830nm. Para os animais irradiados, ao final do procedimento cirúrgico os mesmos foram submetidos à primeira sessão de laserterapia (GaAlAs), na dose de 10J/cm<sup>2</sup>, de forma pontual, com potência de 50 mW, no modo de emissão contínua. Foram realizadas 7 aplicações com intervalos de 48 horas, em período total de 14 dias, em dois pontos da calota craniana dos animais, sendo 5 J em cada um dos pontos.

De acordo com as regulamentações brasileiras, o laser foi aplicado em local isolado, com caracteres e simbologia internacionais para área em uso ou presença de irradiação, observando-se os procedimentos de segurança recomendados para tratamento com luz laser. Para as sessões, os animais foram contidos com contensor apropriado para a espécie.

### 4.4 PREPARO DAS PEÇAS, CALIBRAÇÃO E ANÁLISE

No quadragésimo quinto dia, portanto, 30 dias após a última sessão de laserterapia, os animais foram mortos com sobre dosagem anestésica (5 mg/Kg de propofol IV, seguida da injeção IV de 1ml/kg de Cloreto de Potássio 10%, provocando a morte por parada cardíaca). Dos mesmos, foi removida uma porção da tíbia esquerda (bloco ósseo correspondente à região enxertada), para fins de processamento e preparo das amostras para análise.

Após a remoção do espécime, as amostras do tecido ósseo foram fixadas em formol 10% neutro tamponado e descalcificadas em ácido nítrico 10% durante aproximadamente 36 horas, para que a consistência das amostras ficasse menos rígida para o corte histológico. O processamento histológico foi realizado no Laboratório de Patologia Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A amostra foi cortada em sua porção medial, paralela ao longo eixo do bloco ósseo, de forma que os defeitos foram divididos e incluídos em parafina, contendo osso, biomaterial e membrana de colágeno em todos os cortes, com espessura de 4 µm. As lâminas foram coradas em Hematoxilina e Eosina e

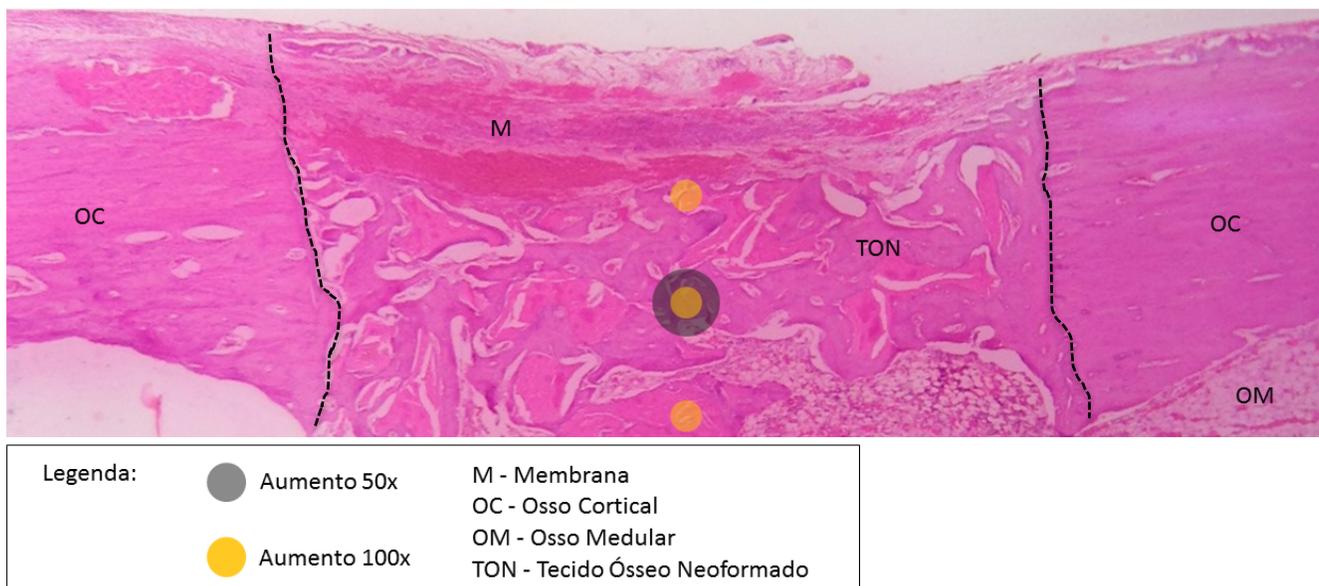
---

<sup>10</sup>Thera Lase®.DMC Equipamentos. São Carlos. São Paulo.

analisadas em microscópio (Zeiss®)<sup>11</sup>.

Para cada defeito crítico (destacado na Figura 3 entre as linhas pontilhadas), 4 fotos foram tomadas, sendo uma em aumento de 50x e três no aumento de 100x (FIGURA 3):

Figura 3 – Fotografia com lupa do defeito crítico, localizado entre as linhas pontilhadas. Os sítios de tomada de fotografias e seus respectivos aumentos. Foto em aumento de 10x, coloração HE.



Fonte: da autora, 2016

A calibração foi realizada com 2 pesquisadores, avaliando as lâminas cegadas, com mensurações independentes e comparadas entre si, objetivando-se um percentual de coincidência de 90%. Foram interpretados e avaliados pelo orientador os valores obtidos do total de área de tecido ósseo, total da área de biomaterial remanescente, como também, a contagem de células por campo. Em situações onde houve discordância, novas medidas foram realizadas independentemente (após discussão entre os examinadores), buscando atingir a referida concordância.

As análises da pesquisa se deram a partir de três parâmetros: porcentagem de tecido ósseo neoformado no defeito; porcentagem de partículas remanescentes do biomaterial utilizado; e contagem

<sup>11</sup> PALM RoboSoftware 4.6 (Zeiss). Alemanha.

de células ósseas por campo. Para o primeiro e segundo critério utilizou-se a imagem capturada no aumento de 50x e para o último as imagens em aumento de 100x. Para a análise da área do tecido ósseo e do biomaterial, o centro do defeito foi a área escolhida, visto que esta é a região mais crítica no que diz respeito à neoformação óssea.

Na contagem de células ósseas (osteoblastos e osteócitos), a área do defeito diferiu quanto à resposta celular nos seus terços devido às características do próprio defeito criado na tíbia dos animais. Na tentativa de evitarmos esse viés metodológico, realizamos a contagem celular em 3 áreas distintas para cada uma das amostras, sendo divididas em terço superficial, terço mediano e terço basal. A análise estatística se deu, inicialmente, comparando terço a terço intergrupos e após uma comparação entre terços dentro do mesmo grupo foi feita.

Todas as imagens capturadas por meio de fotografias adquiridas diretamente das imagens observadas em microscopia ótica de luz (fotomicrografia) foram transferidas para o software ImageJ (versão 1.5) para mensuração. O primeiro passo foi realizar a calibração por meio da transformação de pixels em micrômetros, na qual traçou-se uma linha sobre a barra de micrômetros e utilizando a ferramenta “Analyze”, após “Set scale”, se fez a substituição do valor da distância conhecida para a distância traçada, de forma a calibrar as medidas feitas a partir de então. A seguir, realizou-se a mensuração da área total da imagem, por meio das ferramentas “Analyze” e “Measure”, fazendo com que obtivéssemos a área de 100% da imagem, expressa em micrômetros. Feito isso, utilizando a ferramenta “Freehand” para o traçado das partículas de biomaterial remanescente e de tecido ósseo neoformado, utilizando como separador destes valores, a medida da área total da imagem. Na contagem celular, a calibração da imagem não se faz necessária, e para tal, utilizou-se a ferramenta “Multi-point”. Após, se fez a transcrição dos valores para uma planilha no programa Microsoft Excel®, sendo os valores das áreas obtidos em micrômetros e posteriormente transformados em porcentagem. Os valores da contagem foram expressos em números de células.

Todos os valores foram transportados para o programa Microsoft Excel®, inseridos nas planilhas definitivas e submetidos à análise estatística por meio do programa SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) para Windows®. Para medidas obtidas pelos diferentes tipos de análise de cada tecido, foram aplicados o teste de Análise de Variância – ANOVA, utilizando o delineamento em blocos casualizados, e Teste *t* de Student, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

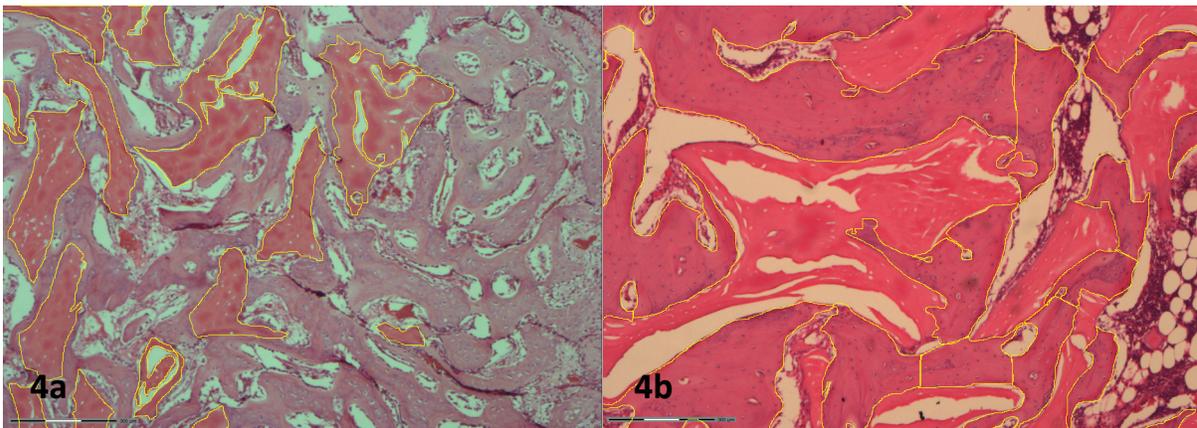
## 5 RESULTADOS

Dos 20 coelhos (C=10, E=10) inicialmente incluídos no trabalho, 13 (C=5 e E=8) contemplaram os requisitos necessários para o estudo das tíbias. Houve sete perdas, sendo que os motivos para tais foram: fratura de tibia, impossibilidade de confecção da lâmina histológica na região, infecção das feridas operatórias durante o período pós-operatório e morte do animal (2 casos) durante o desenvolvimento da pesquisa.

As médias e desvio padrão para as amostras de tibia analisadas em aumento de 50x, obtidas a partir das leituras de porcentagem de tecido ósseo neoformado e biomaterial remanescente, comparando os grupos controle e experimental, estão compiladas na Tabela 2.

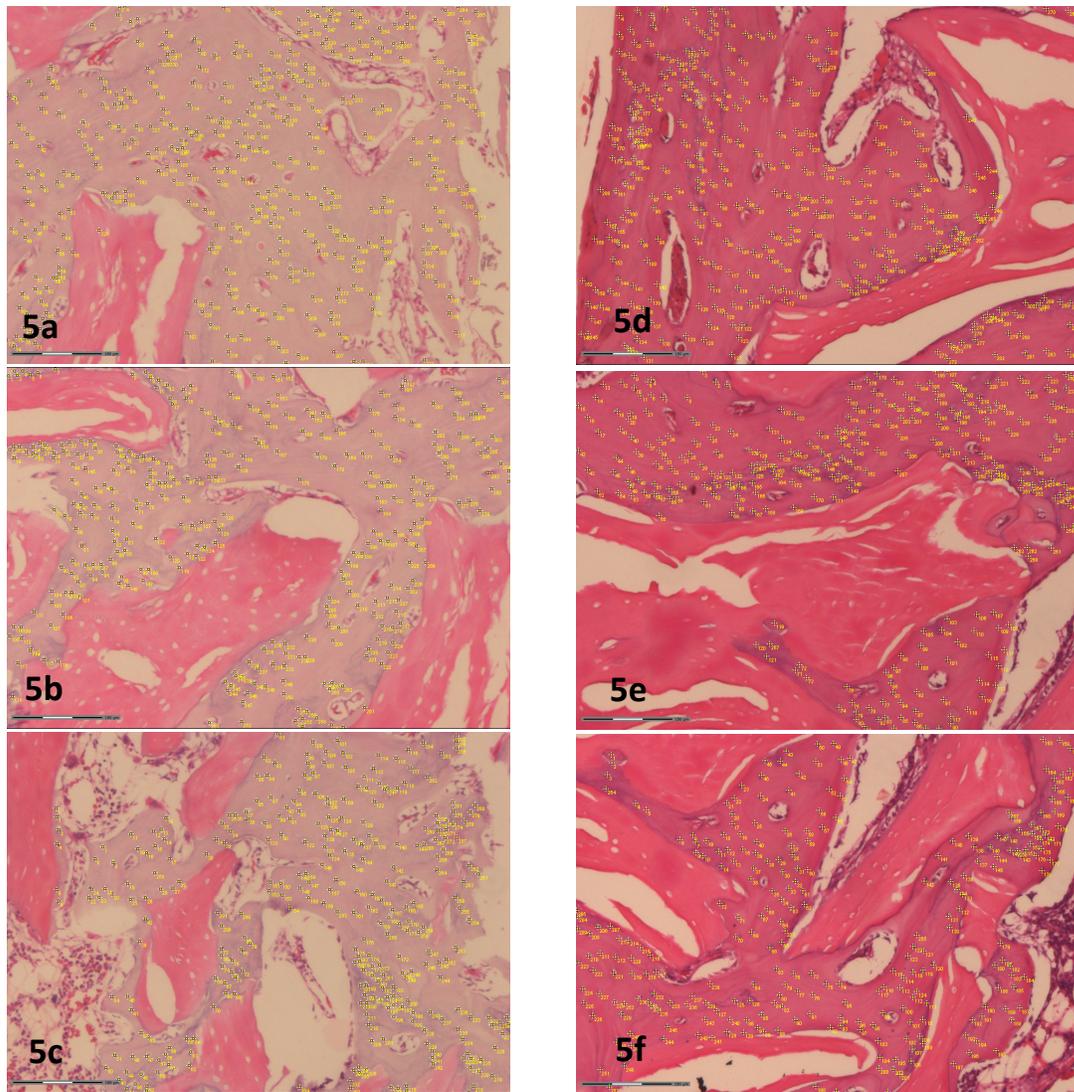
Além disso, a Tabela 2 resume os achados para contagem celular nos diferentes grupos. Já a Tabela 3 descreve uma comparação entre terços dentro do mesmo grupo.

Figura 4 - Microfotografias das lâminas histológicas, com marcação das áreas de biomaterial e tecido ósseo neoformado utilizando programa ImageJ 1.5 – aumento de 50x, coloração HE. 4a: lâmina do grupo controle: marcação das áreas de biomaterial remanescente. 4b: lâmina do grupo experimental: marcação das áreas de tecido ósseo neoformado.



Fonte: da autora, 2016

Figura 5 - Microfotografias das lâminas histológicas, com marcação das células ósseas na contagem celular, utilizando programa ImageJ 1.5 – aumento de 100x, coloração HE. As fotos à direita correspondem às amostras do grupo controle, sendo 5a: terço superficial, 5b: terço médio e 5c: terço basal. As fotos à esquerda correspondem as amostras do grupo experimental, sendo 5d: terço superficial. 5e: terço médio e 5f: terço basal.



Fonte: da autora, 2016

Tabela 2 - Comparação entre grupos, analisando: percentis de biomaterial remanescente e osso neoformado, contagem de células ósseas por terços e contagem total de células.

	Grupo				p
	Controle		Experimental		
	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão	
% de biomaterial	21,63	6,71	23,92	4,01	0,453
% de osso neoformado	28,41	11,50	32,11	13,53	0,623
SUPERFICIAL	199,20	112,67	268,00	166,01	0,435
MÉDIO	235,60	132,37	223,13	58,87	0,818
BASAL	248,20	134,45	239,38	73,65	0,880
Contagem total	683,00	327,70	730,50	208,55	0,753

Notas: p = nível mínimo de significância do Teste *t*

Para todas as variáveis, através do Teste *t*, ao nível de significância de 5%, verifica-se não haver diferença significativa na média em relação aos grupos.

Tabela 3 - Análise entre terços, comparando número de células por terço:

	Grupo			
	Controle		Experimental	
	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão
SUPERFICIAL	199,20	112,67	268,00	166,01
MÉDIO	235,60	132,37	223,13	58,87
BASAL	248,20	134,45	239,38	73,65
p	0,614		0,693	

Notas: p= nível mínimo de significância da Análise de Variância utilizando o delineamento em blocos casualizados.

Para cada grupo, através da Análise de Variância, utilizando o delineamento em blocos casualizados, ao nível de significância de 5%, verifica-se não haver diferença significativa na média do número de células em relação aos diferentes terços.

Os resultados encontrados nas análises de área de biomaterial e área de neoformação óssea (TABELA 2), mostram que, apesar dos percentis destas áreas serem superiores no grupo experimental que no grupo controle, não houve diferença significativa.

Quanto à contagem celular, na análise feita entre os grupos controle e experimental, através do teste *t*, ao nível de significância de 5%, não se obteve diferença significativa. Ainda, na análise entre terços do mesmo grupo (controle e experimental foram avaliados), também não houve diferença significativa na média do número de células em relação aos diferentes terços.

Ao desconsiderar a localização da análise, excluindo a variável dos terços, uma contagem total de células foi feita, comparando os grupos entre si. Mais uma vez, não se obteve resultados estatisticamente significativos.

## 6 DISCUSSÃO

De acordo com Hollinger e Kleinschmidt (1990), um defeito de tamanho crítico é aquele que possui menos de 10% de regeneração óssea durante o tempo de vida do animal. Para fins práticos, se este nível não é alcançado em um ano, é improvável que algum dia aconteça. O diâmetro da trefina utilizada foi o maior possível para perfuração do aspecto lateral da tíbia do coelho, respeitando as suas dimensões e preservando mecanicamente as corticais dos aspectos anterior e posterior. Em outros modelos de estudo, o defeito crítico poderá variar em suas dimensões. O uso da tala, decidido a partir de ocorrência de fraturas em animais excluídos do estudo, mostrou-se eficiente na prevenção de fraturas.

Escolheu-se a tíbia de coelhos para este experimento, devido à quantidade e volume de osso disponível serem satisfatórios e pela abordagem cirúrgica ser mais acessível do que na mandíbula. Além disso, os procedimentos são facilmente padronizados e as condições anatômicas e fisiológicas dos sítios teste nos ossos são quase sempre equivalentes (STUBINGER; DARD, 2013; COELHO, 2014). Além de serem utilizados para estudos como este, a tíbia e o fêmur dos coelhos são muito utilizadas para estudos com implantes dentários. Suas dimensões anatômicas permitem a colocação de implantes de aproximadamente 8-10mm de comprimento e de 4mm de diâmetro – disponíveis comercialmente para odontologia. Conseqüentemente, os coelhos aparecem como sendo a primeira escolha para os estudos de desenho de implantes por seu tamanho, fácil manejo, vida curta e condições favoráveis de aquisição e manutenção (STUBINGER; DARD, 2013; COELHO, 2014; KIM, 2016; WEBER, 2014; HUSSEIN, 2011). Dentro desta lógica, um defeito ósseo foi criado na tíbia dos coelhos e preenchido com Bio-Oss, para testar a neoformação com e sem LLLT, analisando se esta terapia interfere ou não no respectivo processo de reparo.

Na metodologia da presente pesquisa, escolhemos a região central do defeito como área de análise, por ser a área com maior dificuldade de neoformação óssea, visto que as paredes ósseas remanescentes são a referência inicial para este processo. Assim, à semelhança de um alvéolo dentário, o reparo ósseo se dá da periferia para o centro e da base para a superfície, sendo então, a região central, a mais crítica para tal neoformação. Ainda, nesta mesma área, levou-se em conta três imagens para contagem celular, sendo uma profunda (mais próxima ao osso medular da tíbia), uma na região mediana e outra superficial (próxima à derme do animal), buscando analisar o resultado diferentes

sítios do defeito, com maior ou menor proximidade em relação ao endósteo e periósteo, tecidos de onde derivam as células diretamente responsáveis pela neoformação óssea.

O uso de biomaterial para preencher os defeitos teve como objetivo evitar o seu preenchimento por fibrose, permitindo estrutura para a deposição do tecido ósseo. Trata-se de uma simulação do uso clínico deste recurso (PINHEIRO, 2003). O Bio-Oss, amplamente testado na literatura, foi o substituto ósseo de escolha. Cardaropoli, Araújo e Lindhe (2003), assim como outros estudos deste grupo de pesquisadores, mostram que alvéolos preenchidos com osso autógeno exibem um padrão de cicatrização com muitas características em comum com os alvéolos pós-exodontia não preenchidos. Ainda, o estudo de Araújo e Lindhe (2011) mostram que os alvéolos – após 3 meses de cicatrização – tiveram preenchimento pós-cicatrização em quantidade similar de osso mineralizado (principalmente tecido ósseo) e medula a alvéolos não preenchidos. Logo, os resultados destes autores indicam que o material autógeno utilizado em seu trabalho falhou no melhora da cicatrização e/ou na estimulação da formação de tecido duro no alvéolo pós-extração. Em contrapartida, em outros estudos, na comparação com os alvéolos preenchidos com osso autógeno, os sítios enxertados com Bio-Oss exibiram um atraso no padrão de cicatrização, mostrando ainda, menos osso mineral formado, menor proporção de medula óssea e uma quantidade substancial de tecido conjuntivo remanescente. A conclusão de que há atraso na cicatrização dos sítios enxertados com Bio-Oss está de acordo com observações feitas anteriormente (ARTZI, 2004; JENSEN, 2006) e com experimentos usando alvéolos pós-extração (ARAÚJO; LINDHE, 2011). Justifica-se a busca de métodos, como a terapia laser, a fim de melhorar esse desempenho, a partir da estimulação celular no sítio de reparo.

A reabsorção das partículas de osso bovino inorgânico é um assunto ainda conflitante na literatura. Há relatos de que algumas partículas, quando no interior de defeitos ósseos, falham no processo de reabsorção e permanecem como um corpo inerte circundado por osso do hospedeiro (CUNHA, 2014). Ainda, Araújo, Liljenberg e Lindhe (2010), os quais estudaram a dinâmica da incorporação de Bio-Oss em alvéolos logo após extração dentária, mostram que a quantidade de biomaterial reabsorvido durante o pós-operatório foi limitada, não havendo redução significativa do volume ocupado por este material no intervalo entre a primeira e quarta semanas. Além disso, corroboram sobre o ideia de que durante o processo de remodelação tecidual, as menores partículas de enxerto não serviram aparentemente somente para neoformação óssea, mas também pareceram se tornar uma parte integral do tecido ósseo, permanecendo inertes no tecido.

Quanto à metodologia de análise das lâminas, o presente estudo apresenta algumas semelhanças a artigos citados aqui, mas também mostrou-se inovador ao analisar os diferentes terços do defeito ósseo criado, para que quaisquer viés de localização da análise fosse evitado. Ainda, tanto as análises de áreas de biomaterial remanescente e neoformação óssea quanto a contagem celular foram todas realizadas por dois examinadores, anteriormente calibrados, com amostras cegadas.

Quanto ao efeito sistêmico do laser, estudos anteriores sugerem que a LLLT age em locais distantes do ponto de aplicação, mostrando efeitos em glândula tireóide, em músculo esquelético cardíaco e em microcirculação periférica (HENTSCHKE, 2013; MAYER, 2013; SCHINDL, 2002; WEBER, 2014). Este efeito sistêmico potencial do laser em tecidos moles foi avaliado em estudos prévios, em tecidos moles. O estudo do efeito à distância em tecido ósseo é mais recente na literatura (BATISTA, 2015; COELHO, 2014).

Rodrigo et al. (2009) mostraram que tanto a aplicação direta do laser nas feridas quanto as feridas distantes a este ponto sofreram estímulo do laser em sua cicatrização, especialmente na fase inicial do reparo (3º dia de pós-operatório). A aplicação combinada de laser vermelho e infravermelho resultou no mais evidente efeito sistêmico no reparo de feridas na pele produzidas nos ratos. Coelho et al. (2014) compartilham do achado de que os efeitos sistêmicos são mais pronunciados nas fases iniciais de reparo, sendo neste caso, estudo em coelhos. Após inserção de dois implantes, um em cada pata do animal, irradiação de laser infravermelho em somente uma delas, os autores compararam os resultados dos grupos com e sem laser e encontraram diferença de resultados somente aos 5 dias de análise. Logo, no estágio inicial, a densidade e a distribuição do osso neoformado foi melhor no grupo experimental do que no grupo controle. Aos 15 e 30 dias, a diferença já não foi mais significativa.

Já no trabalho de Batista et al. (2015), aos 7 dias de análise, os efeitos positivos da terapia de laser estiveram bem evidenciados nos animais em que se fez aplicação direta na área do defeito. O aumento na neoformação óssea neste período provavelmente se deve ao fato do efeito local do laser estimular a diferenciação das células mesenquimais e a proliferação de osteoblastos e fibroblastos. Porém, este estudo não observou nenhum efeito sistêmico do LLLT no reparo ósseo, considerando que a aplicação de laser distante do defeito não interferiu na cicatrização da ferida óssea.

Batista e colaboradores (2015) levantaram o conceito de efeito regional, uma vez que muitos estudos que apresentaram efeito sistêmico positivo, utilizaram feridas próximas umas às outras, como controle e experimental (RODRIGO, 2009). Isso faz com que pensemos que a proximidade espacial

das células, o contato direto célula-a-célula ou a liberação local de mediadores, podem ser potenciais meios para a transmissão dos sinais das células irradiadas para as células não irradiadas. Nosso trabalho (laser na calota e análise na tíbia) assemelha-se ao de Batista et al. (2015), os quais utilizaram a perna contra-lateral dos ratos, sendo portanto a área de irradiação longe da área de observação e fora do trajeto de irradiação. Buscamos de forma mais dura observar um possível efeito à distância, que poderia potencialmente e em tese se dar a partir de ação hormonal de mediadores liberado no sítio original irradiado. Contudo, tal tese não se confirmou em nossas observações.

Na presente pesquisa, a primeira análise que se fez do efeito à distância da LLLT foi a avaliação de neoformação óssea e de biomaterial remanescente da amostra de tíbia, comparando os grupos experimental e controle, aos 45 dias de pós-operatório. A partir dos resultados, expressos em porcentagem, verifica-se que, embora os valores referentes ao grupo experimental sejam constantemente mais altos, não houve diferença significativa na média em relação aos grupos.

Acreditamos que isso pode se dever ao fato de que a marcação do tecido ósseo foi feita independentemente de seu grau de maturação. Logo, o osso imaturo fez parte da mesma classificação que o tecido ósseo já bem consolidado. Estuda-se, então, a possibilidade de repetição desta análise, criando mais um variável, para que se obtenha a diferenciação entre osso imaturo e maduro. Além disso, os estudos anteriores que confirmam o efeito sistêmico do laser, mostram que os efeitos mais pronunciados são nos estágios iniciais da análise (3 e 5 dias), diferentemente do presente estudo, no qual a morte dos animais se deu aos 45 dias de pós-operatório. Logo, se obteve concordância com Rodrigo et al. (2009) e Coelho et al. (2014), os quais mostram que, aos 15 e 30 dias, a diferença não foi mais significativa.

Quanto à contagem celular, a análise se deu no terço superficial, terço médio e terço basal do defeito ósseo das amostras de cada grupo. Três comparações foram realizadas considerando os terços: média da contagem celular de cada grupo comparada intergrupos; comparação entre grupos terço a terço; e, finalmente, comparação dos terços intragrupos. Ainda, uma quarta análise foi feita, desconsiderando os terços, ou seja, a soma do total de células foi calculada, comparando os valores entre os grupos. Em todas estas análises, através do teste ANOVA e teste *t*, ambos com nível de significância de 5%, não se verificou diferenças.

Apesar disso, pode-se observar uma diferenciação no padrão da análise da contagem celular entre os grupos. O grupo controle se manteve no padrão normal de reparo, ou seja, número maior de

células no 1/3 basal, visto que é a área mais próxima do tecido medular. Já no grupo experimental, o maior número de células se fez presente no 1/3 superficial, distinguindo-se do padrão de reparo normal dos defeitos. Esta é uma constatação potencialmente interessante, visto que, houve alteração da normalidade, mas sem interferência expressiva no reparo ósseo. Estudos futuros podem avaliar tal hipótese - mudança de padrão de acordo com a profundidade - considerando ainda que os efeitos sistêmicos da LLLT foram melhor demonstrados em tecidos moles.

Na literatura atual, alguns trabalhos sugeriram o efeito sistêmico da LLLT, os quais mostram ser uma terapia benéfica e segura, porém, nenhum deles conseguiu ainda descrever os mecanismos utilizados para tal. O que se sugere até então é que o laser estimula a liberação de fatores de crescimento, modula o balanço entre as citocinas pró e anti-inflamatórias (HENTSCHKE et al., 2013; KHADRA et al., 2004; SCHINDL et al., 2002); aumenta a vascularização e número de mitoses (RODRIGO et al., 2009; SCHINDL et al., 2002); reduz o edema por melhor oxigenação do tecido (RODRIGO et al., 2009); ativa os fatores quimiotáticos por irradiação e facilita a fibroplasia durante fase de reparo da cicatrização tecidual (HUSSEIN et al., 2011).

Além disso, Rodrigo et al. (2009) destaca que raramente pessoas saudáveis demandam tratamentos complementares para cicatrização de feridas. Assim, o uso da luz é interessante em casos de feridas que apresentam atraso na cicatrização, usualmente resultantes de complicações como desnutrição, diabetes, malignidade, doença vascular relacionada à isquemia e idade avançada. Schindl et al. (2002), à luz de uma incidência crescente de diabetes e de suas complicações tardias, mostram que a LLLT pode ser capaz de contribuir em parte para a melhoria desta situação, por induzir a cicatrização à distância, melhorando a microcirculação sistêmica.

Os resultados dos trabalhos até então publicados mostram-se conflitantes também devido ao fato da dificuldade de padronização de técnica de irradiação com o laser. Nesse campo de conhecimento, enfrenta-se uma série de dificuldades, pois as metodologias empregadas não se apoiam nessa lógica de rotina e padronização no que se refere ao modelo animal experimental, assim como aos parâmetros de aplicação do laser, incluindo comprimento de onda e fluência ou dose (MAYER et al., 2013).

Levando em conta todos os fatores acima descritos, e, considerando a variedade de protocolos, células e de tipos de estudo, os efeitos da LLLT podem ainda ser melhor investigados. Trata-se de uma área com potencial para estudos em biologia celular, por meio de mais estudos *in vitro* e em animais.

O atual estágio do conhecimento não suporta ainda modelos em humanos, nos desfechos avaliados em nosso estudo.

## **7 CONCLUSÕES**

Não houve alteração na área óssea, quantidade de biomaterial remanescente ou contagem celular entre os grupos estudados. Nas condições do estudo, não se observou efeito do laser à distância no processo de reparo ósseo em defeitos críticos na tíbia de coelhos preenchidos com enxerto bovino liofilizado.

## REFERÊNCIAS

- ABOELSAAD, N. S. et al. Effect of soft laser and bioactive glass on bone regeneration in the treatment of infra-bony defects (a clinical study). **Lasers Med. Sci.**, London, v. 24, no. 3, p. 387-395, 2009.
- ALMEIDA-LOPES, L. Laserterapia na odontologia. **Clín. Odontol. Integrada**, Bauru, v. 1, n. 1, p. 10-88, 2003.
- ALMEIDA-LOPES, L.; MASSINI, R. J. **Laseres e suas aplicações: manual do usuário**. [S.l.]: DMC Equipamentos, 2002.
- ARAS, M. H. et al. Effects of low-level laser therapy on osteoblastic bone formation and relapse in an experimental rapid maxillary expansion model. **Niger. J. Clin. Pract.**, Mumbai, v. 18, no. 5, p. 607-611, Sept./Oct. 2015.
- ARAÚJO, M.G.; LILJENBERG, B.; LINDHE, J. Dynamics of Bio-Oss collagen incorporation in fresh extraction wounds: an experimental study in the dog. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 21, no. 1, p. 55-64, Jan. 2010.
- ARAÚJO, M. G.; LINDER, E.; LINDHE, J. Bio-Oss collagen in the buccal gap at immediate implants: a 6-month study in the dog. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 22, no. 1, p. 1-8, Jan. 2011.
- ARAÚJO, M. G.; LINDHE, J. Ridge preservation with the use of Bio-Oss collagen: A 6-month study in the dog. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 20, no. 5, p. 433-440, May 2009.
- ARAÚJO, M. G.; LINDHE, J. Socket grafting with the use of autologous bone: an experimental study in the dog. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 22, no.1, p. 9-13, Jan. 2011.
- ARTZI, Z. et al. Biomaterial resorption rate and healing site morphology of inorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate in the canine: a 24-month longitudinal histologic study and morphometric analysis. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Copenhagen, v. 19, no. 3, p. 357-368, May/June 2004.
- BATISTA, J. D. et al. Low-level laser therapy on bone repair: is there any effect outside the irradiated field?. **Lasers Med. Sci.**, London, v. 30, no. 5, p. 1569-1574, July 2015.
- BLAYA, D. S. et al. Histologic study of the effect of laser therapy on bone repair. **J. Contemp. Dent. Pract.**, Cincinnati, v. 9, p. 41-48, 2008.
- BRUGNERA JÚNIOR, A. et al. **Atlas de laserterapia aplicada à clínica odontológica**. São Paulo: Santos, 2007. 119 p.
- BRUGNERA JÚNIOR, A. et al. **Laserterapia aplicada à clínica odontológica**. São Paulo: Santos, 2003.

BRUGNERA JÚNIOR, A.; PINHEIRO, A. L. B. **Lasers na odontologia moderna**. São Paulo: Pancast, 1998.

BRUGNERA JÚNIOR, A.; VILLA, R. G.; GENOVESE, W. J. **Laser na odontologia**. São Paulo: Pancast, 1991.

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

CARDAROPOLI, G., ARAÚJO, M.; LINDHE, J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 30, no. 9, p. 809-818, 2003.

CATÃO, M. H. C. V. Os benefícios do laser de baixa intensidade na clínica odontológica na estomatologia. **Rev. Bras. Patol. Oral**, Natal, v. 3, n. 4, p. 214-218, 2004.

COELHO, R. C. et al. Systemic effects of LLLT on bone repair around PLLA-PGA screws in the rabbit tibia. **Lasers Med. Sci.**, London, v. 29, no. 2, p. 703-708, Mar. 2014.

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. Res. International**, New York, v. 2014, p. 1-10, May 2014.

DAVIES, J. E. Mechanisms of endosseous integration. **Int. J. Prosthodont.**, Lombard, v. 11, no. 5, p. 391-401, Sept./Oct. 1998.

FREDDO, A. L. et al. Effect of low-level laser therapy after implantation of poly-L- lactic/polyglycolic acid in the femurs of rats. **Lasers Med. Sci.**, London, v. 24, no. 5, p. 721-728, Sept. 2009.

FRONZA, B. et al. Assessment of the systemic effects of LLLT on thyroid hormone function in a rabbit model. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, London, v. 42, no. 1, p. 26-30, Jan. 2012.

GARCIA, G. V. et al. Influência do número de aplicações de raio laser de bioestimulação sobre a reparação de feridas de extração dentária: estudo histológico em ratos. **Rev. Fac. Odontol. Lins**, Lins, SP, v. 12, n. 1-2, p. 29-37, jan./dez. 2000.

GOLDIM, J. R. **Pesquisa em saúde: normas leis e diretrizes**. 2. ed. Porto Alegre: HCPA, 1995.

GUIMARÃES, K. B. **Fotoengenharia do processo de reparo ósseo induzido pela laserterapia de baixa potência (GaAlAs): estudo em fêmurs de ratos**. 2006. 154 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

HENTSCHKE, V. S. et al. Low-level laser therapy improves the inflammatory profile of rats with heart failure. **Lasers Med. Sci.**, London, v. 28, no. 3, p. 1007-1016, 2013.

- HOLLINGER, J. O.; KLEINSCHMIDT, J. C. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. **J. Craniofac. Surg.**, Burlington, v. 1, no. 1, p. 60–68, Jan. 1990.
- HOLLINGER, J. O.; BUCK, D. C.; BRUDER, S. P. Biology of bone healing: its impact on clinical therapy. In: LYNCH, S. E.; GENCO, J. R.; MARX, R. E. **Tissue Engineering**, Chicago, Quintessence, p. 17-54, 1999.
- HÜBLER, R. et al. Effects of low-level laser therapy on bone formed after distraction osteogenesis. **Lasers in Med. Sci.**, London, v. 25, no. 2, p. 213-219, 2010.
- HUSSEIN, A. J. et al. Effects of a low level laser on the acceleration of wound healing in rabbits. **North Am. J. Med. Sci.**, Hamilton, v. 3, no. 4, p. 193-197, Apr. 2011.
- JENSEN, S. S. et al. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate: A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 17, no. 3, p. 237-243, June 2006.
- KADRA, M. et al. Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, Oslo, v. 97, no. 6, p. 693-700, June 2004.
- KHADRA, M. et al. The effect of low level laser irradiation on implant- tissue interaction: in vivo and in vitro studies. **Swed. Dent. J. Suppl.**, Malmö, v. 172, p. 1-63, 2005.
- KARU, T. Photobiology of low-power laser effects. **Health Physics**, Baltimore, v. 56, no. 5, p. 691-704, May 1989.
- KIM, J. R. et al. Low-level laser therapy affects osseointegration in titanium implants: resonance frequency, removal torque, and histomorphometric analysis in rabbits. **J. Korean Assoc. Oral Maxillofac. Surg.**, Seoul, v. 42, no.1, p. 2-8, Feb. 2016.
- KOLÁVORA, H.; DITRICOVÁ, D.; WAGNER, J. Penetration of the laser light into the skin in vitro. **Lasers Surg. Med.**, New York, v. 24, no. 3, p. 231-235, 1999.
- KREISNER, P. E. et al. Histological evaluation of the effect of low-level laser on distraction osteogenesis in rabbit mandibles. **Med. Oral. Patol. Oral. Cir. Bucal**, Valencia, v. 15, no. 4, p. 616-618, 2009.
- LOPES, C. B. et al. Infrared laser light reduces loading time of dental implants: a Raman spectroscopic study. **Photomed. Laser Surg.**, Larchmont, v. 23, no. 1, p. 27-31, 2005.
- LOPES, C. B. et al. Infrared laser photobiomodulation ( $\lambda$  830 nm) on bone tissue around dental implants: a Raman spectroscopy and scanning electronic microscopy study in rabbits. **Photomed. Laser Surg.**, Larchmont, v. 25, no. 2, p. 96-101, 2007.

MARINO, J. A. M. **Efeito do laser terapêutico de baixa potência sobre o processo de reparação óssea em tibia de rato.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia das Radiações e dos Materiais) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

MAYER, L. et al. Assessment of LLLT systemic effects on thyroid hormones function after dental titanium implant installation: an experimental rabbit model. **Natural Science**, [S.l.], v. 5, no. 8, p. 933-940, 2013.

MAYER, L. et al. Metodologia para avaliação do efeito sistêmico e local da LLLT na osseointegração de implantes dentários em mandíbula de coelhos: nota prévia. **RFO UPF**, Passo Fundo, v. 18, n. 2, p. 235-245, maio/ago. 2013

MENDEZ, T. M. et al., Dose and wavelength of laser light have influence on the repair of cutaneous' wounds. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, New York, v. 22, no.1, p. 19-25, 2004.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, Tecnologia e inovação conselho nacional de controle de experimentação animal – CONCEA. **Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos – DBCA.** Brasília, DF – Brasil.

MIRON, R. J. et al. Osteogenic potential of autogenous bone grafts harvested with four different surgical techniques. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 90, no. 12, p. 1428-1433, 2011.

MOHAMMED, I. F. R. et al. Promotion of regenerative processes in injured peripheral nerve induced by low level laser therapy. **Photomed. Laser Surg.**, Larchmont, v. 25, no. 2, p. 107-111, 2007.

NASCIMENTO, P. M. et al. A preliminary report on the effect of laser therapy on the healing of cutaneous surgical wounds as a consequence of an inversely proportional relationship between wavelength and intensity: histological study in rats. **Photomed. Laser Surg.**, Larchmont, v. 22, no. 6, p. 513-518, 2004.

NASCIMENTO, S. B. et al. Effect of low-level laser therapy and calcitonin on bone repair in castrated rats: a densitometric study. **Photomed. Laser Surg.**, Larchmont, v. 28, no. 1, p. 45-49, 2010.

OSHIRO, T.; FUJINO, T. Laser applications in plastic and reconstructive surgery. **Keio J. Med.**, Tokyo, v. 42, no. 4, p. 191-195, Dec. 1993.

PETRUNGARO, P. S.; AMAR, S. Localized ridge augmentation with allogenic block grafts prior to implant placement: case reports and histologic evaluations. **Impl. Dent.**, Baltimore, v. 14, no. 2, p. 139-148, 2005.

PINHEIRO, A. L. B.; GERBI M. E. M. Laserterapia: uma visão atual sobre as aplicações clínicas na prática implantodôntica. In: QUERIDO, M. R. M.; FAN, Y. L. **Implantes osseointegrados - inovando soluções.** São Paulo: Artes Médicas, 2004. Cap. 15, p. 285-288, 297-298.

- PINHEIRO, A. L. B. et al. Effect of low level laser therapy on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v. 14, no. 3, p. 177-181, 2003.
- PINHEIRO, A. L. B.; BRUGNERA JÚNIOR, A.; ZANIN, F. A. A. **Aplicação do laser na Odontologia**. São Paulo: Santos, 2010. 436 p.
- PINHEIRO, A. L. B.; FRAME, J. W. Laser em odontologia: seu uso atual e perspectivas futuras. **Rev. Gaúcha Odontol.**, Porto Alegre, v. 40, n. 5, p. 327-332, 1992.
- PINHEIRO, A. L. Advances and perspectives on tissue repair and healing. **Photomed. Laser Surg.**, Larchmont, v. 27, no. 6, p. 833-836, 2009.
- PINHEIRO, A. L. B. et al. Biomodulatory effects of LLLT on bone regeneration. **Laser Therapy**, Tokyo, v. 13, no. 1, p. 73-79, 2001.
- PINHEIRO, A. L. B. et al. Effect of 830-nm laser light on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone and decalcified cortical osseous membrane. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, New York, v. 21, no. 6, p. 301-306, 2003.
- POZZA, D. H. et al. Analgesic action of laser therapy (LLLT) in an animal model. **Med. Oral. Patol. Oral. Cir. Bucal**, Valencia, v. 13, no. 10, p. 648-652, 2008.
- PRADOS-FRUTOS, J. C. et al. Lack of clinical evidence on low-level laser therapy (LLLT) on dental titanium implant: a systematic review. **Lasers Med. Sci.**, London, v. 31, no. 2, p. 383-392, 2016.
- RIGAU, J. et al. Changes in fibroblast proliferation and metabolism following “in vitro” helium-neon laser irradiation. **Laser Therapy**, Tokyo, v. 3, no. 1, p. 25-33, 1991.
- ROCHKIND, S. et al. Systemic effects of low-power laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds, and burns. **Lasers Surg. Med.**, London, v. 9, no. 2, p. 174-182, 1989.
- RODRIGO, S. M. et al. Analysis of the systemic effect of red and infrared laser therapy on wound repair. **Photomed. Laser Surg.**. Larchmont, v. 27, no. 6, p. 929-935, 2009.
- SCHINDL, A. et al. Systemic effects of low-intensity laser irradiation on skin microcirculation in patients with diabetic microangiopathy. **Microvasc. Res.**, New York, v. 64, no. 2, p. 240-6, Sept. 2002.
- SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia animal: adaptação e meio ambiente**. 5. ed. São Paulo: Santos, 1996.
- SILVA JÚNIOR, A. N. et al. Computerized morphometric assessment of the effect of low-level laser therapy on bone repair: an experimental animal study. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, New York, v. 20, no. 2, p. 83-87, 2002.

SOARES, L. P. et al. Effects of laser therapy on experimental wound healing using oxidized regenerated cellulose hemostat. **Photomed. Laser Surg.**, Larchmont, v. 26, no. 1, p. 10-13, 2008.

SONIS, S. T.; FAZIO, R. C.; FANG, L. **Princípios e Prática de Medicina Oral**. In: \_\_\_\_\_. Distúrbios da tireóide. 2. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1996. p. 137-143.

STUBINGER, S.; DARD, M. The rabbit as experimental model for research in implant dentistry and related tissue regeneration. **J. Invest. Surg.**, v. 26, no. 5, p. 266-282, Oct. 2013.

TAKEDA, Y. Irradiation effect of low-energy laser on alveolar bone after tooth extraction: experimental study in rats. **Int. J. Oral and Maxillofac. Surg.**, Copenhagen, v. 17, no. 6, p. 388-391, 1988.

TRELLES, M. A.; MAYAYO, E. Bone fracture consolidates faster with low-power laser. **Lasers Surg. Med.**, New York, v. 7, no. 1, p. 36-45, 1987.

VALIATI, R. **Análise do efeito da laserterapia na incorporação de aloenxertos ósseos em blocos processados por congelamento profundo**: estudo em coelhos. 2011, 125 f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

WEBER, J. B. B. et al. Effect of three different protocols of low-level laser therapy on thyroid hormone production after dental implant placement in an experimental rabbit model. **Photomed. Laser Surg.**, Larchmont, v. 23, no. 11, p. 612-617, 2014.

WEBER, J. B. B. et al. Laser therapy improves healing of bone defects submitted to autologous bone graft. **Photomed. Laser Surg.**, Larchmont, v. 24, no.1, p. 38-44, 2006.

WEBER, J. B. B. et al. Systemic effects of LLLT on bone repair around PLLA–PGA screws in the rabbit tibia. **Lasers Med. Sci.**, London, v. 29, no. 2, p. 703-708, 2014.

YOUNG, B.; WHEATH, J. **Histologia funcional: texto e atlas em cores**. 4. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2000.

**ANEXO A - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)  
DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE SOB O PROTOCOLO 14-0661  
EM 14 DE JANEIRO DE 2015.**



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisou o projeto:

**Projeto:** 140661

**Data da Versão do Projeto:** 10/12/2014

**Pesquisadores:**

LUCIANO MAYER

LUCIANA MARIA PEDREIRA RAMALHO

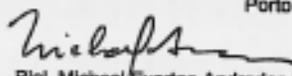
FERNANDO VACILOTTO GOMES

**Título:** ANÁLISE DO EFEITO LOCAL DA LLLT NO REPARO TECIDUAL ÓSSEO DE ÁREAS  
ENXERTADAS: ESTUDO EM COELHOS

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

Porto Alegre, 14 de janeiro de 2015.

  
Biol. Michael Everton Andrades  
Coordenador CEUA/HCPA

**ANEXO B - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE SOB O PROTOCOLO 15-0387EM 10 DE NOVEMBRO DE 2015.**



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisou o projeto:

**Projeto:** 150387

**Data da Versão do Projeto:** 23/10/2015

**Pesquisadores:**

CARLOS EDUARDO E BARALDI  
ISABELA POLESI BERGAMASCHI  
LUCIANO MAYER

**Título:** AVALIAÇÃO DO EFEITO SISTÊMICO DO LASER NÃO ABLATIVO SOBRE O PROCESSO DE REPARO ÓSSEO COM BIOMATERIAIS: ESTUDO EM COELHOS

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

Porto Alegre, 10 de novembro de 2015.

  
Biol. Michael Everton Andrades  
Coordenador CEUA/HCPA

## ANEXO C - TERMO DE COMPROMISSO PARA UTILIZAÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO E INFORMAÇÕES ASSOCIADAS.



**Hospital de Clínicas de Porto Alegre**

Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

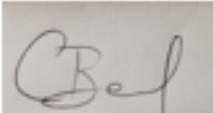
### Termo de Compromisso para Utilização de Material Biológico e Informações Associadas

**Título do Projeto**

AVALIAÇÃO DO EFEITO SISTÊMICO DO LASER NÃO ABLATIVO SOBRE O PROCESSO DE REPARO ÓSSEO COM BIOMATERIAIS: ESTUDO EM COELHOS

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar a privacidade dos pacientes cujos materiais biológicos estão mantidos em ~~biorepositório~~, bem como de suas respectivas informações associadas, contidas em prontuários e bases de dados do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto. As informações somente poderão ser divulgadas de forma anônima.

Porto Alegre, 14 de agosto de 2015.

Nome dos Pesquisadores	Assinatura
Prof. Dr. Carlos Eduardo <del>Baraldi</del>	
Prof. Dr. Luciano Mayer	
Prof. MSc. Fernando <del>Vacilotto</del> Gomes	
Acc. Isabela Polesi Bergamaschi	



## ANEXO E - RELOCAÇÃO DE RECURSOS APROVADA NO DECORRER DO PROJETO

### Mudança de Rubrica

Ao GPPG,

Solicito troca de rubrica, referente ao orçamento do Projeto 15-0387, do valor de 6.400,00 reais, aprovado para a utilização em micro-CT, sendo que este recurso deverá ser relocado e utilizado para realização de lâminas no Laboratório de Patologia do HCPA. Será necessário toda a verba disponibilizada pela FIPE (8.000,00) para a realização das lâminas e os custos com micro-CT serão acertados oportunamente pelo pesquisador.



Dr. Carlos Eduardo E. Baraldi  
Cir. Traum. Buco-Maxilo-Facial  
CRO-RS 010316 - CPF 170608788-82

Assinatura pesquisador responsável  
(Prof. Dr. Carlos Eduardo Baraldi)

Porto Alegre, 24 de janeiro de 2016.