

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

TAINÃ RAFAEL SILVA NAKAMURA

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE UM CAMPO MAGNÉTICO E DE
LASERTERAPIA NA QUALIDADE DO OSSO MANDIBULAR DE COELHOS
SUBMETIDOS À DISTRAÇÃO OSTEOGÊNICA: ESTUDO PILOTO

Porto Alegre
2013

TAINÃ RAFAEL SILVA NAKAMURA

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE UM CAMPO MAGNÉTICO E DE
LASERTERAPIA NA QUALIDADE DO OSSO MANDIBULAR DE COELHOS
SUBMETIDOS À DISTRAÇÃO OSTEOGÊNICA: ESTUDO PILOTO

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 Cirurgião-Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Angelo Luiz Freddo

Porto Alegre
2013

CIP – Catalogação na Publicação

Nakamura, Tainã Rafael Silva.

Avaliação da influência de um campo magnético e de laserterapia na qualidade do osso mandibular de coelhos submetidos à distração osteogênica : estudo piloto / Tainã Rafael Silva Nakamura. – 2013.

38 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Curso de Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

Orientador: Angelo Luiz Freddo

1. Distração osteogênica. 2. Laserterapia. 3. Campo magnético. I. Freddo, Angelo Luiz. II. Título.

Dedico esta obra ao Cauã Coutinho (*in memoriam*) meu amigo, colega e parceiro de muitas jornadas dentro da Odontologia e também fora dela, certamente suas ideias geniais se farão presentes em todos os caminhos que ainda tenho a seguir.

AGRADECIMENTOS

À minha família que me deu todo suporte, amor, carinho e compreensão, meus pais Paulo e Maria Lúcia, meus irmãos Tayane, Juliano e Rafael, os quais sem o apoio incondicional, nada seria possível.

À Raiza, minha namorada, amiga e parceira que nunca deixou de estar ao meu lado.

Agradeço a meus amigos que participaram dessa construção.

Às companheiras de pesquisa que facilitaram muito o andamento desse trabalho, sempre dispostas a ajudar e com grande sorriso no rosto, Alessandra Junges e Ana Paula Padilha.

Às pessoas que de alguma forma contribuíram para que o trabalho terminasse com êxito Rafael Silveira Braga e Fernando Gomes.

À equipe da Unidade de Experimentação Animal Fabíola, Marta e todos funcionários que sempre me receberam tão bem no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

À Flávia, Jorge e professora Luise Meurer da Unidade de Patologia Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre que contribuíram muito para o meu conhecimento.

À Bruna Maraschin, mestranda de patologia da Faculdade de Odontologia da UFRGS pela dedicação em me ajudar a construir este trabalho e por todos ensinamentos passados.

Ao meu orientador professor Angelo Luiz Freddo que, certamente, contribui para meu crescimento profissional, transmitindo conhecimento técnico e científico, sendo não apenas professor, mas também um amigo.

RESUMO

NAKAMURA, Tainã Rafael Silva. **Avaliação da influência de um campo magnético e de laserterapia na qualidade do osso mandibular de coelhos submetidos à distração osteogênica:** Estudo Piloto. 2013. 38f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

Hoje temos um desafio diante da necessidade de avançar na busca por tratamento das deformidades faciais que, muitas vezes, não são satisfatórios. Nesse contexto, o emprego do LLLT tem sido estudado por suas propriedades fotoquímicas e fotobiológicas proporcionando maior neoformação óssea e maior rapidez na cicatrização óssea. Além disso, o uso de campo magnético promove o aumento do metabolismo e da proliferação celular proporcionando maior reparo ósseo. Este estudo piloto tem por objetivo testar uma metodologia para posteriormente aplicar em uma amostra mais significativa, podendo assim, avaliar o efeito da laserterapia e do campo magnético associado à técnica de distração osteogênica para avaliar a qualidade do osso mandibular neoformado em coelhos. Foram realizadas cirurgias em 3 coelhos subdivididos em 3 grupos de avaliação, 1 grupo controle, 1 grupo experimental submetido à ação do campo magnético e 1 grupo experimental submetido à laserterapia. As peças ósseas foram analisadas através de microscopia óptica (MO) com as técnicas de hematoxilina e eosina (HE), Picrosirius e AgNOR. Os resultados demonstraram que a metodologia foi satisfatória, além disso, há uma maior tendência de proliferação celular, formação de tecido ósseo e de fibras colágenas nos grupos experimentais, não podendo ser conclusivo no momento.

Palavras-chave: Distração osteogênica. Laserterapia. Campo magnético.

ABSTRACT

NAKAMURA, Tainã Rafael Silva. **Evaluation of the influence of a magnetic field and laser therapy on mandibular bone quality in rabbits undergoing to distraction osteogenesis: pilot study.** 2013. 38f. Final Paper (Graduation in Dentistry) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

Today, we have a challenge given the need to advance in the search for treatment of facial deformities that often are not satisfactory. In this context, the use of LLLT has been studied for their photochemical and photobiological properties, providing greater bone formation and faster bone regeneration. Furthermore, the use of magnetic field promotes increased metabolism and cell proliferation providing greater bone repair. This pilot study aims to test a methodology for applying in a most significant sample later, thus being able to correlate the effect of laser therapy and magnetic field associated with the technique of distraction osteogenesis to assess the quality of mandibular bone neof ormation in rabbits. It was performed a surgery on 3 rabbits that were divided into 3 groups of evaluation, 1 control group, 1 experimental group subjected to the action of the magnetic field and 1 experimental group that underwent the laser therapy. The bone specimens were analyzed by optical microscopy with the techniques of hematoxylin and eosin (HE), Picrosirius and AgNor. The results showed that the method was satisfactory, moreover, there was a trend towards higher cellular proliferation, bone formation and collagen fibers in the experimental groups and cannot be conclusive at this time.

Keywords: Distraction osteogenesis. Laser therapy. Magnetic field.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1	DISTRAÇÃO OSTEOGÊNICA	9
2.2	CAMPO MAGNÉTICO X CRESCIMENTO ÓSSEO	12
2.3	LASERTERAPIA X CRESCIMENTO ÓSSEO	14
2.4	ANÁLISE HISTOLÓGICA	16
3	MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1	CONFIGURAÇÃO DA AMOSTRA	17
3.2	ETAPAS TÉCNICAS DA PESQUISA	17
3.2.1	<u>ELABORAÇÃO DO APARELHO DISTRATOR</u>	17
3.2.2	<u>SEQUÊNCIA CIRÚRGICA</u>	18
3.2.3	<u>DISTRATOR OSTEOGÊNICO</u>	21
3.2.4	<u>IRRADIAÇÃO COM LASER</u>	21
3.2.5	<u>CAMPO MAGNÉTICO</u>	22
3.2.6	<u>MORTE DOS ANIMAIS</u>	22
3.3	PREPARO LABORATORIAL	23
4	RESULTADOS	25
5	DISCUSSÃO	29
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
	REFERÊNCIAS	34
	ANEXO – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA ..	38

1 INTRODUÇÃO

A Distração Osteogênica (DO) é uma técnica cirúrgica com a finalidade de corrigir defeitos ósseos em situações de deformidades congênitas, traumas e posterior a cirurgias oncológicas. Essa técnica é realizada a partir de uma fratura cirúrgica, seguida da fixação de um aparelho distrator na superfície óssea com a função de estimular e guiar o crescimento ósseo e as estruturas que o envolvem, estimulando o reparo tecidual pelo próprio organismo (MEHRA; FIGUEROA, 2008).

A fim de acelerar e aumentar a qualidade do tecido ósseo neoformado estuda-se a adição de um campo magnético como estímulo para a formação de células reparadoras de tecido ósseo (ISHISAKA et al., 2000; FREDERICKS et al., 2003).

Os trabalhos de Puricelli et al. (2006) demonstrou que a presença de um ímã sepultado formando um campo magnético contínuo acelera o crescimento ósseo quando comparado com grupo sem o estímulo do campo magnético.

Outro método utilizado é a LLLT (Low Level Laser Therapy) a qual também se busca acelerar o crescimento e maturação óssea para diminuir o tempo de permanência do aparelho distrator diminuindo os riscos de intercorrências. Segundo Freddo et al. (2012) o uso da LLLT na fase de consolidação da cirurgia de distração osteogênica aumenta o processo regenerativo. A LLLT estimula a regeneração e cicatrização dos tecidos por meio da proliferação celular (KARU, 1989).

Assim, o objetivo deste trabalho é realizar um estudo piloto para delinear e testar uma metodologia de pesquisa que embase um trabalho com um maior número de animais posteriormente. Além disso, objetiva-se avaliar a qualidade do tecido ósseo neoformado por osteodistração, com o estímulo de um campo magnético ou de LLLT. Os espécimes serão avaliados por microscopia óptica, com colorações de hematoxilina e eosina (HE), Picrosirius e AgNor.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DISTRAÇÃO OSTEOGÊNICA

Codivilla (1905) foi o primeiro cirurgião a descrever uma técnica de alongamento ósseo. Utilizando pinos e um peso para gerar tensão contínua e proporcionar o alongamento de fêmur ele mostrou possível a neoformação de tecido ósseo. Entretanto, sua técnica apresentou diversas limitações devido a grande morbidade. O autor relata grande preocupação com os tecidos moles adjacentes à fratura que apresentaram altas taxas de necrose e infecção. Outra limitação citada pelo autor está relacionada a falta de conhecimento científico sobre o funcionamento e metabolismo de células e tecidos naquela época, dificultando a compreensão dos fatores que envolvem o insucesso dessa técnica.

Ilizarov (1989a, 1989b) lança bases biológicas que permitem criar protocolos para a técnica de distração osteogênica. Seus estudos demonstraram que a taxa de ativação pode ter influencia no sucesso da cirurgia, alongamentos ósseos realizados a uma taxa de 0,5mm por dia causavam maior consolidação prematura, assim como ativações a 2mm por dia geravam alterações indesejáveis nos tecidos alongados sendo a ativação de 1mm por dia a mais indicada e com menores complicações. Além disso, os estudos apresentaram melhores resultados com a frequência de 4 ativações por dia em relação a uma ativação por dia, assim, podemos considerar maior sucesso na proporção em que aumentavam a frequência de ativação. Esse autor também demonstra que podemos obter maior sucesso com maior preservação do periósteo, máximo cuidado com a medula óssea e manutenção do aporte sanguíneo de forma adequada.

A distração osteogênica é uma técnica cirúrgica que utiliza os mecanismos de reparo do próprio organismo para a reconstrução de tecidos moles e duros deficientes, tendo muito sucesso no aumento vertical e horizontal do rebordo alveolar possibilitando a colocação de implantes em áreas sem a quantidade de osso desejada. Além disso, a técnica da distração osteogênica está muito bem indicada em alguns casos devido, principalmente, ao acompanhamento dos tecidos moles ao longo da distração osteogênica (MEHRA; FIGUEROA, 2008). Pacientes com deformidades faciais congênicas podem ser tratados com essa técnica que costuma apresentar resultados funcionais e estéticos favoráveis (HEGGIE; KUMAR; SHAND, 2013).

Esses mesmos autores sugerem que em pacientes com deformidades faciais congênicas muitas vezes não é possível obter resultados satisfatórios somente com cirurgia ortognática,

sendo necessária a associação com a técnica de distração osteogênica apresentando resultados estáveis, alcançando uma oclusão e simetria facial equilibrada, favorecendo um desfecho esteticamente superior.

Segundo Nação (2002) as cirurgias de distração osteogênica estão divididas em 4 fases:

- Osteotomia: fratura do segmento ósseo, com máxima preservação do periósteo e endósteo proporcionando maior suprimento vascular e maior capacidade osteogênica.
- Latência: formação do calo ósseo com regeneração tecidual e maior proliferação de células osteogênicas.
- Distração: separação mecânica dos segmentos ósseos através de um dispositivo fixo produzindo o estímulo necessário para a formação de tecido ósseo na região separada.
- Consolidação: os segmentos distraídos permanecem fixos para que ocorra consolidação e formação de tecido ósseo maduro.

Com o objetivo de diminuir a morbidade e desconforto provocado por distratores antes usados de forma externa que podem induzir infecção, parestesias, cicatrizes visíveis dificultando a vida social dos pacientes que utilizavam estes dispositivos, Diner et al. (2006) criaram um dispositivo interno colocado intrabucal e testaram em uma paciente com deficiência mandibular congênita reabilitando essa paciente. Os autores concluíram que havia necessidade de acompanhamento por maiores períodos para melhor avaliar a técnica.

Chiapasco et al. (2004) avaliou o aumento da dimensão vertical em regiões edêntulas para posterior colocação de implantes comparando as técnicas de Regeneração Óssea Guiada e Distração Osteogênica, além disso, avaliar a capacidade de manter o ganho ósseo ao redor dos implantes instalados. No período de 3 anos foram observados 21 pacientes entre 18 e 59 anos com defeitos de crista óssea alveolar vertical dividindo-os em 2 grupos, o primeiro grupo com 11 pacientes foi feito Regeneração Óssea Guiada com membrana e-PTFE reforçado com barreira de titânio e osso particulado autógeno e foram colocados 25 implantes. O grupo 2 foi tratado com a técnica de Distração Osteogênica com dispositivo intraoral em 10 pacientes com total de 34 implantes. As análises foram feitas por meio de radiografias panorâmicas e periapicais por profissionais calibrados avaliando a perda óssea entre as cirurgias de ROG e DO e a colocação de implantes, avaliação da reabsorção óssea Peri implantar após a aplicação de carga, avaliação radiográfica após 1, 2 e 3 anos de instalação das próteses e a avaliação da taxa de sucesso e sobrevivência dos implantes. A técnica de Distração Osteogênica demonstra maior previsibilidade obtendo maior ganho de dimensão vertical, menor taxa de reabsorção óssea alveolar após a colocação dos implantes, menor taxa de complicações pós-operatórias, a

taxa de sobrevivência se mostrou semelhante entre os 2 grupos, entretanto a taxa de sucesso do grupo submetido a DO foi superior alcançando 94% contra 68% do outro grupo.

Um importante método para avaliar o crescimento ósseo em cirurgias de distração osteogênica se dá pela análise radiográfica. O trabalho de Mazzonetto e Maurette (2005) mostrou o ganho de tecido ósseo avaliando a altura do rebordo alveolar através de 2 radiografias panorâmicas realizadas antes e depois do emprego dessa técnica, foram realizadas 60 cirurgias em 55 pacientes. O valor médio de ganho de tecido ósseo foi de 6,27mm sendo que a região onde obteve maior ganho de altura do rebordo foi anterior de maxila (7,46mm) seguido por anterior de mandíbula (6,73mm), posterior de maxila (6,32mm) e posterior de mandíbula (4,60mm) concluindo que a técnica de distração osteogênica é uma ferramenta eficaz no tratamento de defeitos verticais de rebordo alveolar com uma taxa de sucesso de 91,66%.

O estudo de Block et al. (1998) objetivou determinar a resposta do osso alveolar após a distração osteogênica. Quatro cachorros foram submetidos à distração osteogênica até o ganho de 10 mm de comprimento do rebordo alveolar e colocados 4 implantes em cada animal, após 1 ano os animais foram sacrificados para avaliação histológica do osso. Radiograficamente, foi possível analisar após 6 semanas uma densidade óssea compatível com tecido ósseo maduro, similar ao osso das regiões não distraídas. A avaliação histológica após 1 ano mostrou que não havia diferença na qualidade do osso entre as regiões submetidas à distração osteogênica e regiões sem distração osteogênica.

Enislidis et al. (2005) estudou as possíveis complicações com o emprego da técnica de distração osteogênica avaliando 37 pacientes parcialmente edêntulos sendo 45 áreas tratadas com distração osteogênica. Nessas áreas foram colocados 93 implantes (72 implantes no momento da remoção do distrator e 21 implantes em um momento posterior). O ganho médio de altura do rebordo alveolar foi de 8,2mm sendo essa análise realizada por radiografias pré e pós distração. No total 75,7% dos pacientes tiveram complicações sendo a maioria em menor grau, entretanto, ocorreram casos de fratura do osso basal, fratura do segmento transportado pelo distrator e quebra ou problemas mecânicos com o distrator. Foram necessários 11 aplicações de enxerto após sua implantação.

Mofid et al. (2001) realizou a aplicação de um questionário de quatro páginas enviado para 2476 cirurgões craniofaciais ou orais e maxilofaciais sendo que 148 cirurgões afirmaram realizar a distração osteogênica em sua prática profissional, relatando um total de 3278 casos. O objetivo foi avaliar questões técnicas das cirurgias, procedimentos pós-operatórios, indicações para cirurgia. Não houve diferença estatística entre o grupo que

utilizou a fase de latência em suas cirurgias em relação ao grupo que não utilizou a fase de latência. O estudo demonstrou ainda que a taxa de complicações foi de 35,6%, sendo mais frequente em cirurgias aplicadas por cirurgiões menos experientes. Além disso, houve menor número de complicações relacionadas ao nervo alveolar inferior em distrações mandibulares quando o ritmo de ativação não era maior que 1mm por dia.

Diversos modelos animais já foram utilizados em estudos de distração osteogênica, o coelho é um modelo frequentemente relatado na literatura (Al-Sebaei et al., 2005; Djasim et al., 2008). Al-Sebaei et al. (2005) usou em seus estudos mandíbulas de coelhos usando uma amostra de 25 animais. Foram feitas osteotomias em ambos os lados da mandíbula e fixado os aparelhos de distração, entretanto, somente um lado foi ativado após 3 dias de latência, 7 dias de ativação, 2 vezes ao dia e 14 dias de consolidação, o outro lado se manteve inativo sendo o grupo controle. As avaliações foram feitas nos dias 3, 7, 10, 17 e 24 demonstrando histologicamente a formação de tecido ósseo através da técnica de coloração por HE concluindo, portanto, que os coelhos podem ser um importante modelo animal para ser utilizado em pesquisas empregando esta técnica.

Para o emprego desta técnica dois diferentes tipos de aparelhos podem ser utilizados para promover a osteodistração, aparelhos extraoral e intraoral. O aparelho intraoral tem maior preferência de uso pelos profissionais por apresentar vantagens em relação ao aparelho extraoral como a presença mínima de cicatriz, ocorrendo somente na mucosa, não havendo comprometimento estético. Além disso, os aparelhos intraorais apresentam menor peso que os dispositivos extraorais (NUNTANARANONT, 2008).

2.2 CAMPO MAGNÉTICO X CRESCIMENTO ÓSSEO

O estudo do campo magnético relacionando-o com o crescimento ósseo está aumentando. Tem sido estudada a ação do campo magnético na função das células e estruturas que as compõem, a fim de que possamos ter conhecimento da correlação entre o campo magnético e o crescimento celular (ISHISAKA et al., 2000).

O uso de sistema magnético tem sido pesquisado em diversas áreas incluindo as da área da saúde. A utilização de um campo magnético contínuo demonstrou capacidade de redução do tempo de formação do calo ósseo em fraturas de pulso em 35%. Esse campo magnético foi gerado por ímãs fixados junto ao gesso de imobilização da fratura (COSTANTINO et al., 2007).

Temos variadas situações em que o tempo de formação do osso pode influenciar no sucesso do tratamento. O uso do campo magnético sepultado testado *in vivo*, associado a capacidade osteocondutora dos enxertos ósseos provocam maior indução de neoformação óssea (PURICELLI; DUTRA; PONZONI, 2009).

Buscando compreender a ação do campo magnético sobre as células do tecido ósseo foi demonstrado que o uso de campo elétrico, gerando magnetismo através da corrente elétrica, foi capaz de gerar significativo aumento da proliferação celular assim como aumento de sua maturação. Esse estímulo gera aumento de formação de matriz extracelular pelos osteoblastos, assim como maior diferenciação, além disso, o aumento na formação de colágeno tipo I, sialoproteínas, osteocalcinas e osteonectinas e maior atividade da Fosfatase Alcalina (HARTIG; JOOS; WIESMAN, 2000). Possivelmente o aumento da vascularização, produção de colágeno, proliferação e diferenciação de células osteogênicas estão entre os mecanismos que geram a indução de neoformação óssea na presença de um campo magnético (MATSUMOTO et al., 2000).

Sabe-se que um importante fator que gera o aumento do tempo de maturação do tecido ósseo se dá pela formação de tecido cartilaginoso. A presença de suprimento sanguíneo na região medular influenciada pelo campo magnético pode explicar o fato de não haver formação de cartilagem ao longo da cicatrização óssea, acelerando o processo de regeneração (PURICELLI et al., 2006).

Estudos apontam para a técnica da distração osteogênica como uma boa opção para o uso do campo magnético. Segundo Fredericks et al. (2003), após 16 dias de exposição ao campo magnético, sendo de forma intermitente, em distração osteogênica realizada na tíbia de ratos mostrou que o osso já apresentava resistência à torção semelhante ao osso normal. Em todos os estágios 9, 16 e 23 dias, o grupo com uso de campo magnético apresentou maior nível de regeneração óssea em relação ao grupo teste.

O trabalho de Puricelli et al. (2006), demonstrou que a utilização de campo magnético acelera a cicatrização óssea sendo observado nas análises histológicas nos períodos de 15, 45 e 60 dias em cavidades geradas cirurgicamente nos fêmures de ratos.

Kesemenli et al. (2003) avalia a ação do campo magnético em coelhos submetidos à distração osteogênica. O grupo experimental, com ação de campo magnético intermitente, seguindo um protocolo de aplicação de 3 horas ao dia durante 3 semanas, foi relacionado com o grupo controle, sem ação do campo magnético, sob análises radiográficas, cintilográfica e histológica nas semanas 4, 8 e 13. As análises radiográficas foram semelhantes para ambos os grupos em todas as avaliações, entretanto, nas análises de cintilografia e histologia

apresentaram dados semelhantes nas semanas 4 e 13, enquanto que na semana 8 apresentou maior atividade de osteoblastos e maior formação de tecido ósseo. No período de 13 semanas foi encontrado tecido ósseo maduro, indicando baixo efeito do campo magnético no período de remodelação óssea.

O uso do campo magnético tem sido investigado em diversas áreas de atuação. São necessários estudos que mostrem com maior exatidão qual a frequência e tempo de exposição a um campo magnético mais adequado para a neoformação óssea ocorrer de forma rápida (MATSUMOTO et al., 2000).

2.3 LASERTERAPIA X CRESCIMENTO ÓSSEO

O uso da terapia à laser de baixa potência ou Low Level Laser Therapy (LLLT) vem sendo empregado para fim de reparação tecidual devido a sua capacidade biomoduladora. O laser gera efeitos de crescimento epitelial e fibroblástico, estimulação da síntese de colágeno, aumento da capacidade de fagocitose e liberação de endorfinas (MESTER; MESTER; MESTER, 1985). Além disso, a LLLT estimula a regeneração e cicatrização dos tecidos através da proliferação celular, da aceleração na formação de tecidos de granulação, do aumento da síntese de ATP e da síntese de colágeno (KARU, 1989).

Para Pretel, Lazarelli e Ramalho (2007) a LLLT acelera a regeneração de feridas, de tecido mole e duro, por meio da estimulação de fibroblastos, tecidos especializados e endotélio vascular tendo a capacidade de acelerar o processo de reparo pelo aumento da proliferação celular e a vascularização de tecidos lesados.

Estudos demonstraram que a LLLT gera aumento na concentração de beta-endorfina promovendo efeito analgésico. Ocorre também um efeito anti-inflamatório atuando nas prostaglandinas, inibindo e bloqueando a ação da enzima ciclooxigenase e na ativação dos linfócitos (CATÃO, 2004; RODRIGO et al., 2009).

Miloro, Miller e Stoner (2007), demonstraram em cirurgias de distração osteogênica realizada em mandíbulas de coelhos com o estímulo da LLLT que houve aumento da regeneração óssea durante a fase de consolidação permitindo menor tempo de uso do aparelho distrator e reduzindo a morbidade.

Para a determinação do período de uso do laser nas cirurgias de distração osteogênica observou-se que a estimulação por LLLT no período de consolidação foi mais favorável que a estimulação no período de ativação, pois promove a formação de tecido cartilaginoso em estágios precoces enquanto que no período de consolidação foi encontrado tecido ósseo

neoformado. Entretanto, independentemente do período de exposição ao laser, a regeneração óssea com o uso da LLLT acelerou mais fortemente que a regeneração de forma natural (CERQUEIRA et al., 2007; SHAKOURI et al., 2010).

Kreisner et al. (2010) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a ação da LLLT na porcentagem de osso neoformado em mandíbulas de coelhos submetidos à distração osteogênica. Com uma amostra de 10 coelhos sendo 4 coelhos do grupo controle e 6 coelhos do grupo teste submetidos à LLLT e um protocolo de 3 dias de latência, 7 dias de ativação e 10 dias de consolidação. Os animais foram irradiados com LLLT infravermelho de 830nm recebendo a aplicação em um ponto de 10J/cm², a cada 48h, com uma potência de 40mW. O grupo controle apresentou taxa de neoformação óssea de 46,75% enquanto que o grupo teste apresentou taxa de neoformação óssea de 57,89% apresentando um maior benefício na formação de tecido ósseo em mandíbula de coelhos submetidos à LLLT. O autor sugere que a aplicação de LLLT pode diminuir o tempo total de tratamento.

Freddo et al. (2012) avaliaram os efeitos da LLLT no osso mandibular de ovelhas para determinar os valores de dureza e módulo de elasticidade do osso neoformado após cirurgia de distração osteogênica através de testes de nanoidentação. Os resultados apresentados demonstram que os animais irradiados por LLLT durante o período de maturação óssea apresentaram maiores valores de dureza e do módulo de elasticidade em relação aos animais irradiados nos períodos de latência e ativação.

Kan et al. (2013) demonstrou em seu estudo de distração osteogênica que o LLLT pode ter efeito positivo no processo de reparo do tecido ósseo, utilizando tomografia computadorizada, radiografia simples e histomorfometria para avaliar um grupo experimental com LLLT e um grupo controle. Essas análises foram feitas com 28 e 56 dias após o procedimento de distração osteogênica. A análise histomorfométrica mostrou diferença significativa entre o grupo experimental e controle após 28 dias, assim como as análises de tomografia computadorizada e radiografia simples demonstraram maior radiopacidade no grupo experimental em relação ao grupo controle. Portanto, em um período curto esse estudo sugere um efeito positivo da estimulação do reparo ósseo por LLLT. Já no período de 56 dias não houve diferença no processo de reparo do osso para os dois grupos.

2.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA

A combinação de hematoxilina e eosina (HE) é um dos corantes mais comumente usados. A hematoxilina cora em azul ou violeta o núcleo das células e outras estruturas ácidas (como matriz de cartilagem hialina), por outro lado, a eosina cora em rosa o citoplasma e o colágeno (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). A coloração de HE tem sido largamente usada em pesquisas de distração osteogênica devido a sua capacidade de demonstrar com nitidez áreas de neoformação óssea, assim como tecidos inflamatórios, áreas de vascularização, presença de fibroblastos e osteoblastos (KESEMENLI et al., 2003; CERQUEIRA et al., 2007; KAN et al., 2013).

A avaliação histológica em tecido ósseo pode ser avaliada por AgNor. No estudo de Paparella et al. (2007) pacientes com osteosarcoma de mandíbula ou maxila foram submetidos a essa avaliação para determinar grau de malignidade, as células usadas para determinar a proliferação celular foram os condroblastos, os osteoblastos e os fibroblastos, tendo concluído que essa técnica além de ser valiosa para determinar a malignidade possui fácil aplicabilidade.

Crocker, Boldy e Egan (1989) demonstraram que o aumento do número de AgNor está relacionado com a proliferação celular, pois há uma desagregação nucleolar com o correspondente aumento de AgNor na fase S do ciclo celular. Foi demonstrado também que quanto maior a atividade proliferativa menor é o tamanho dos AgNor quando comparado com células em menor atividade proliferativa.

A coloração por Picrosirius que tem por característica marcar a disposição das fibras colágenas é uma técnica bastante utilizada em estudos para avaliação de enxertos ósseos devido à função das fibras colágenas de formar um tecido de sustentação para a formação do tecido ósseo (STEIN; SILVA; SILVA, 2009; CONTAR et al., 2011).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CONFIGURAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra deste estudo piloto foi constituída de 3 coelhos, fêmeas, jovens, ordem *Lagomorpha*, gênero e espécie *Oryctolagus cuniculus*, raça Nova Zelândia, variedade branca, com peso compreendido entre 3,0 e 4,0Kg, livres de malformações congênitas e feridas. Foram operados três coelhos, com intuito de verificar a metodologia *in vivo*.

Os animais foram adquiridos através do Hospital de Clínicas da UFRGS (Unidade de Experimentação Animal/HCPA) e permaneceram no unidade deste Hospital, sendo sempre supervisionados pelo pesquisador e Médico-veterinário.

Após a admissão no Biotério, os espécimes selecionados foram divididos em três grupos, compostos por um coelho cada (Quadro 1). Todos os animais foram submetidos ao mesmo protocolo para alongamento ósseo.

Quadro 1 - Tipo de tratamento para cada grupo

Grupos	Tratamento
Coelho 1 (Controle)	Distração Osteogênica
Coelho 2	Distração Osteogênica + Campo Magnético
Coelho 3	Distração Osteogênica + Laserterapia (LLLT)

Fonte: autor

3.2 ETAPAS TÉCNICAS DA PESQUISA

3.2.1 ELABORAÇÃO DO APARELHO DISTRATOR

O primeiro passo deste trabalho foi a elaboração de um aparelho de distração osteogênica para coelhos. Apesar da existência de experimentos neste mesmo animal, inclusive no mesmo sítio de alongamento ósseo, optou-se pelo desenvolvimento próprio pela dificuldade de acesso a tais dispositivos, mas, sobretudo visando-se obter uma qualidade que pudesse suprir os objetivos da pesquisa.

3.2.2 SEQUÊNCIA CIRÚRGICA

Todas as etapas dos procedimentos anestésicos foram executadas por uma Médica-veterinária que acompanhou o pré, o trans e o pós-operatório dos animais.

Os animais foram sedados com Ketamina (15mg/kg), Midazolam (1 mg/kg) e Meperidina (10 mg/Kg), via intramuscular. Os animais foram pré-oxigenados através de máscara facial e a indução da anestesia geral foi realizada com propofol (2-4mg/kg). Os animais foram intubados com tubo 3.0 e a anestesia geral foi mantida com propofol (0,3mg/kg/min) e Fentanil (7 µg/Kg). A profilaxia antibiótica foi realizada por meio da injeção intramuscular de Enrofloxacino (5 mg/kg).

Após a sedação foi realizada a tricotomia próxima à região do ramo mandibular esquerdo. Também foi realizado o acesso venoso na veia marginal da orelha com cateter tipo *extracath* tamanho 24G, para fluidoterapia (Sol. Fisiológica 0,9%) e administração do propofol, seguindo-se com a antissepsia da pele com degermante polivinilpirrolidona iodo (PVPI).

Campos cirúrgicos estéreis isolaram o campo operatório. Na região a ser incisada, procedeu-se a infiltração local com Lidocaína (2mg/kg) e Bupivacaína (1mg/kg), no espaço subcutâneo e próximo ao nervo alveolar inferior.

Com um bisturi no. 3 e lâmina descartável no. 15 uma incisão linear foi realizada, na região do bordo inferior do corpo mandibular esquerdo, iniciando-se 1,5 cm a frente do ângulo e estendendo-se até 2,5 cm no sentido anterior. Os planos foram dissecados com tesoura de Matzenbaum e a elevação do periósteo foi realizada utilizando-se os descoladores do tipo Molt. Afastadores do tipo Farabeuf foram posicionados expondo a superfície lateral da mandíbula.

Após a exposição da região de corpo mandibular, a região do forame mentoniano foi identificada, sendo o nervo e os vasos sanguíneos que por ele emergem cuidadosamente dissecados. A corticotomia inicial foi realizada pela face lateral da mandíbula, entre o primeiro pré-molar e o forame mentoniano, utilizando-se broca com ponta esférica no. 1 em baixa rotação e sob irrigação constante de soro fisiológico a 0,9%, da basilar até a crista alveolar para demarcar a linha de fratura. Durante este procedimento, os tecidos cutâneos e musculares separados pelos afastadores.

Em seguida, um gabarito ou guia de perfuração foi posicionado sobre a linha de corticotomia e com broca de baixa rotação de 1,5mm, sob irrigação com soro fisiológico, foram realizadas as perfurações dos parafusos do aparelho distrator. As perfurações iniciais

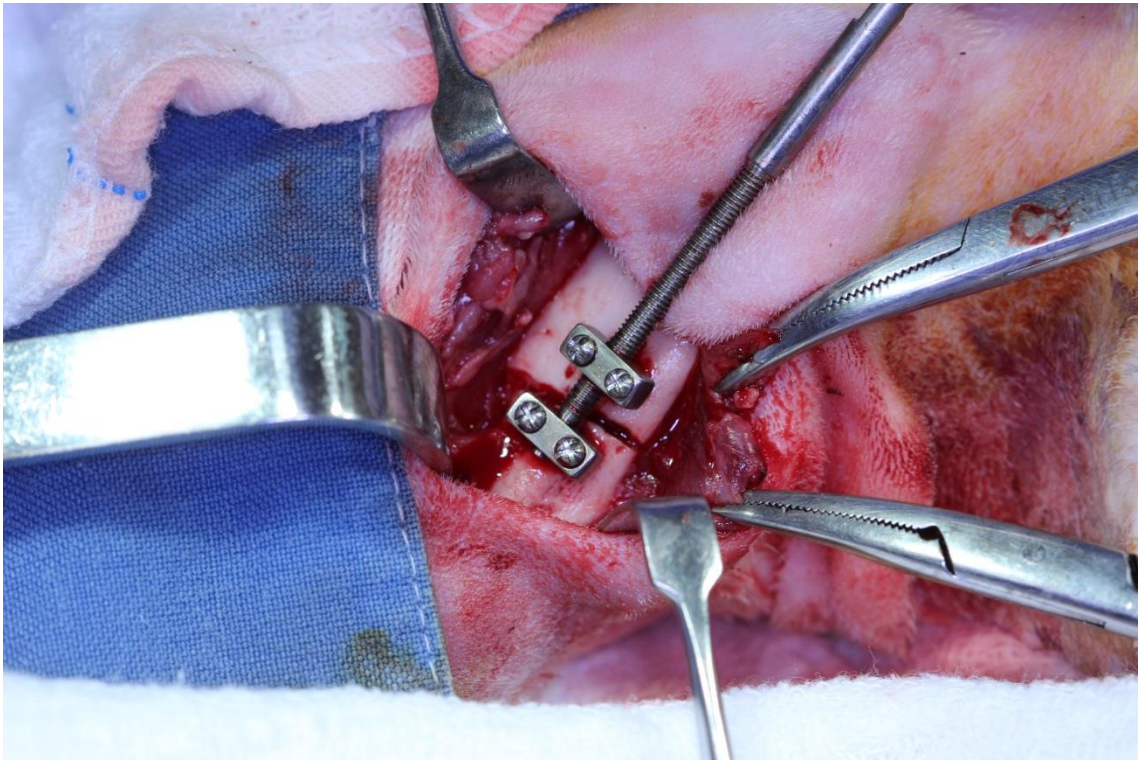
foram unidas com ponta tronco-cônica 701 (1,0 mm de diâmetro), sem, no entanto, completar a osteotomia. O aparelho distrator foi, então, colocado no local do gabarito, fixado com quatro parafusos de titânio de 1,5mm de espessura e comprimentos que variaram entre 7mm, 9mm e 11mm sendo ativado até a obtenção de uma resistência à ativação do aparelho, para que a fratura pudesse ser concluída com o uso de cinzéis retos (Figura 1). No animal 2, logo após a instalação do dispositivo de distração, um ímã de cada lado da corticotomia, na região da basilar da mandíbula, foi inserido e fixado por um parafuso de titânio de 1,5mm de espessura por 9mm de comprimento com cabeça expandida. Os ímãs foram fixados com uma força de atração, formando um campo magnético ao redor deles (Figura 2).

Após irrigação abundante para a limpeza do leito operatório, a ferida cirúrgica foi fechada por planos com fio reabsorvível (Vicryl) n° 4-0 nos planos profundos e náilon n° 4-0 em pontos isolados e sutura simples para a epiderme.

No período pós-operatório, os animais permaneceram na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em gaiolas individuais, sob os cuidados dos pesquisadores e orientação da equipe de Médicos-veterinários e equipe de enfermagem. Eles receberam, por via intramuscular, analgesia por meio da utilização de Tramadol 2 mg/Kg (12/12 hs), durante 2 dias; medicação antiinflamatória com Cetoprofeno 1 mg/Kg (24/24 hs), durante 3 dias e antimicrobiano Enrofloxacino 5 mg/Kg (12/12 hs), por 5 a 7 dias.

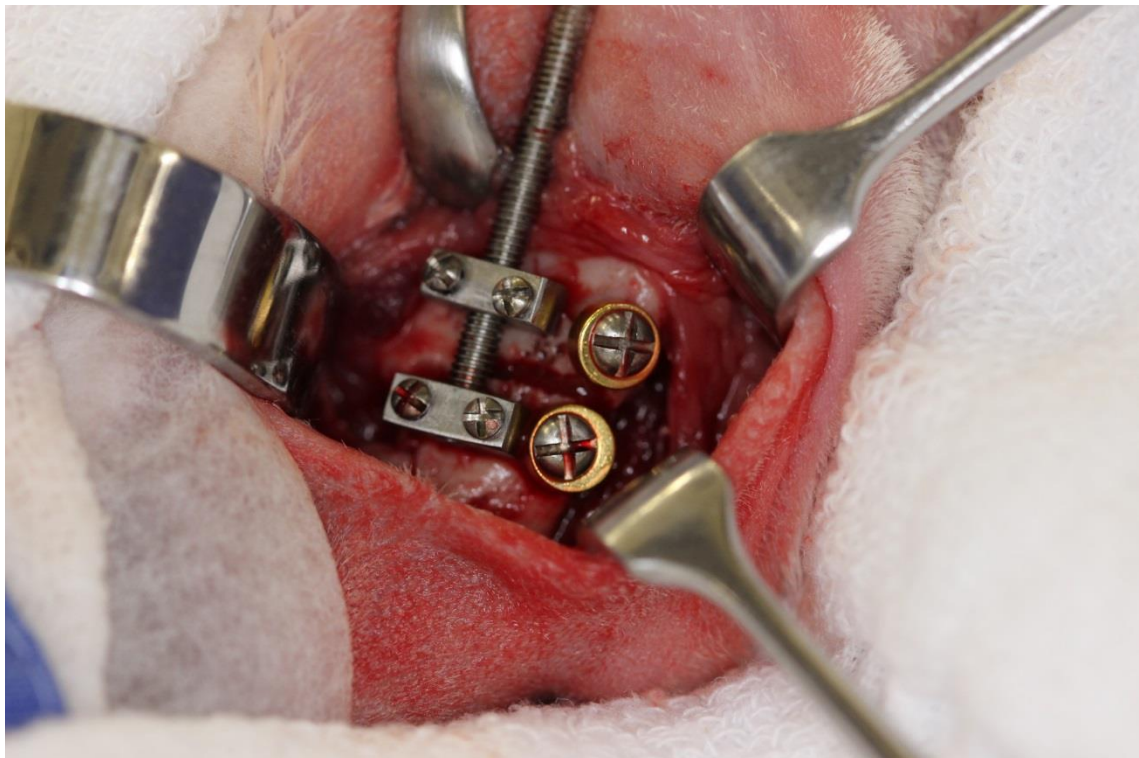
A recuperação anestésica foi realizada em ambiente aquecido para evitar hipotermia. A dieta foi mantida por meio de folhas verdes e de ração sendo iniciada imediatamente após a cirurgia.

Figura 1 – Aparelho distrator fixado aos dois lados da fratura



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 2 – Ímãs fixados abaixo do aparelho distrator



Fonte: dados da pesquisa

3.2.3 DISTRAÇÃO OSTEOGÊNICA

Período de Latência – 3 dias (1º ao 3º dia)

Durante os três primeiros dias pós-operatórios, o distrator osteogênico não foi ativado, apenas inspecionado e higienizado com iodoform alcoólico a 1% quando necessário.

Período de Ativação – 7 dias (4º ao 10º dia)

A partir do quarto dia pós-operatório, foi realizada a primeira ativação do aparelho, avançando 1mm por dia, com frequência de 0,5 mm a cada 12 horas, completando 7 mm de extensão ao final do experimento.

Período de Maturação Óssea – 20 dias (11º ao 30º dia)

Após o período de alongamento, o aparelho distrator foi mantido em ativação por um período 20 dias, isto para que ocorresse a consolidação óssea.

3.2.4 IRRADIAÇÃO COM LASER

O aparelho utilizado para irradiação foi o MM Optics®, com meio ativo GaAlAs (arseneto de gálio e alumínio) com comprimento de onda de 780nm (grupo experimental), devidamente calibrado. A LLLT iniciou no primeiro dia do período da maturação óssea, seguindo com mais 09 aplicações a cada 48 horas, totalizando 10 aplicações.

Por ser indolor, este procedimento não necessitou do uso de sedação ou anestésicos. O animal de número 3 recebeu doses pontuais sobre a região distraída. Tivemos quatro pontos de aplicação de $5\text{J}/\text{cm}^2$ por 10 segundos ao redor do aparelho distrator, totalizando $20\text{J}/\text{cm}^2$, na potência de 20mW, em modo contínuo. A energia total aplicada, ao final do experimento, correspondeu a $200\text{J}/\text{cm}^2$ (Figura 3).

Figura 3 – Quatro pontos de aplicação do laser



Fonte: Dados da pesquisa

3.2.5 CAMPO MAGNÉTICO

Os dispositivos metálicos utilizados foram arruelas constituídas por ímãs de Neodímio revestidas em ouro, com dimensões de 5mm x 2mm x 2,5mm e fixados ao osso por parafusos de titânio comercialmente puro. Os cálculos do campo magnético foram realizados no Laboratório de Eletromagnetismo do Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

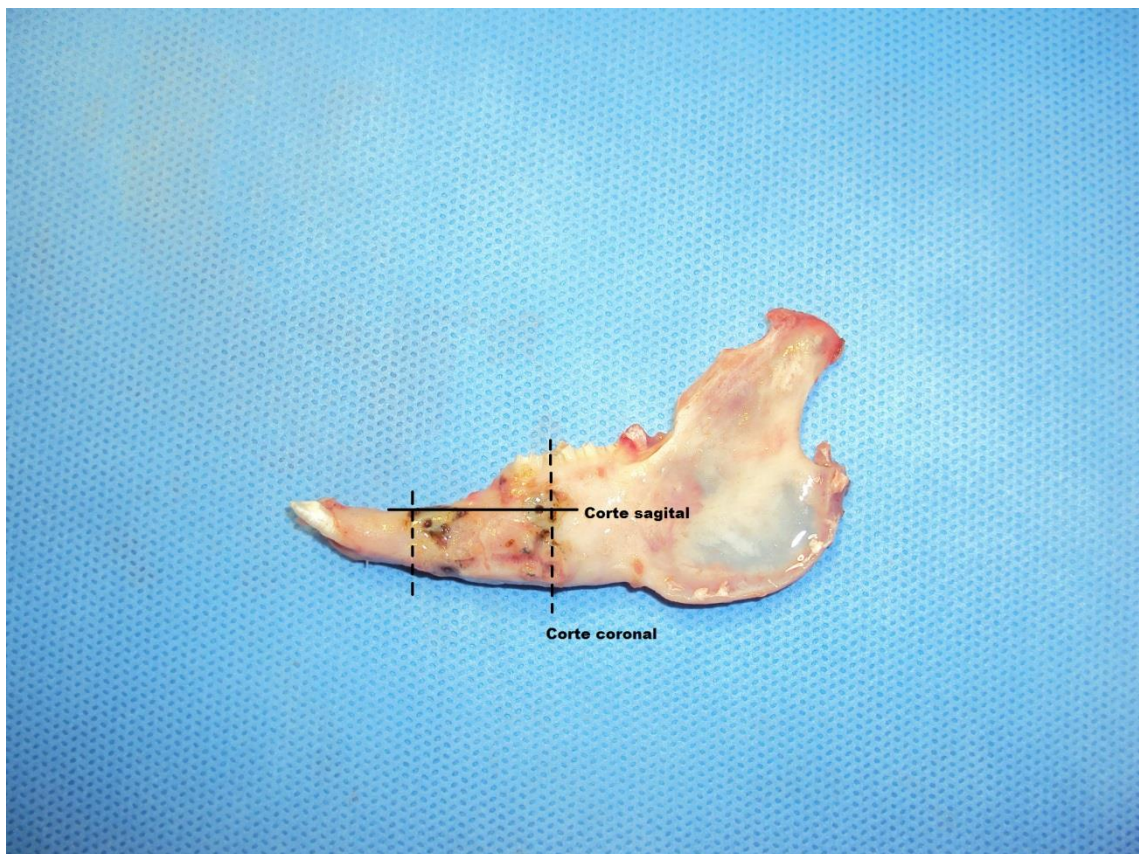
O animal de número 2 teve adicionados junto ao parafuso de fixação do aparelho distrator duas arruelas imantadas, uma em cada lado da osteotomia, na região da basilar da mandíbula formando um campo magnético contínuo de aproximadamente 100 Gauss (G).

3.2.6 MORTE DOS ANIMAIS

Após 30 dias, do procedimento cirúrgico, os coelhos foram sedados com o mesmo protocolo citado acima e anestesiados com sobredose de propofol (10mg/kg) até a perda

completa de reflexos e parada respiratória. Então foi administrado cloreto de potássio para promover a parada cardíaca (1ml/kg). A eutanásia foi realizada pela Médica Veterinária, responsável técnica da UEA-HCPA, respeitando-se, dessa forma, a Resolução no.1000, de 11 de maio de 2012, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, que dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências. Após a constatação da morte dos animais, pelos sinais vitais, os distratores foram removidos, as mandíbulas dissecadas, isoladas e separadas, com descoladores e cinzéis e acondicionadas em meio de conservação (Formalina 10%). A porção óssea de interesse, separada, continha a área neoformada e as extremidades de osso maduro, e esta foi encaminhada para o preparo histológico (Figura 4).

Figura 4 – Cortes para o preparo histológico



Fonte: Dados da pesquisa

3.4 PREPARO LABORATORIAL

As peças foram avaliadas por meio de microscopia óptica em diferentes colorações. As amostras mandibulares foram preparadas para exame de coloração de Hematoxilina e

Eosina (HE), para avaliação morfológica geral, coloração de Picrosírius, para visualização das fibras colágenas e com impregnação por AgNor para a observação da velocidade de proliferação celular.

Na coloração de HE as amostras foram avaliadas de forma qualitativa observando a morfologia da estrutura do osso neoformado, formação de trabéculas ósseas, áreas de reabsorção, tecido ósseo maduro e atividade osteoblástica. Essa avaliação foi realizada pelo autor que passou por período de calibragem no Laboratório de Patologia Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Além disso, foi realizada a avaliação quantitativa de osso neoformado, onde foram selecionadas cinco áreas de formação de tecido ósseo neoformado, perto da linha basilar, ao longo da região distraída, sendo a primeira e a última rente aos vazios deixados pelos parafusos de fixação do distrator, e as outras três medidas entre estas. Para esta análise, utilizou-se um aumento de 200x e as imagens foram capturadas com equipamento fotográfico acoplado ao microscópio. Essas imagens foram transferidas para o software ImageJ no qual foi determinada, através da histomorfometria, a área de formação de tecido ósseo, correlacionando os 3 grupos de avaliação.

A coloração de Picrosírius foi observada de forma qualitativa analisando a disposição e orientação das fibras colágenas do tecido ósseo. Foram capturadas cinco áreas rentes à basilar, sendo duas áreas tangenciando os espaços livres deixados pelos parafusos de fixação e três áreas entre as duas primeiras, ao longo da região distraída. Utilizou-se o aumento de 200x e as imagens foram capturadas com equipamento fotográfico acoplado ao microscópio. Foi realizada a análise quantitativa com o mesmo software, entretanto, neste processo determinamos a porcentagem de fibras colágenas ao longo do tecido ósseo neoformado.

Na avaliação do AgNor realizou-se somente análise quantitativa. As áreas de osso neoformado foram capturadas através de equipamento fotográfico acoplado ao microscópio com aumento de 1000x. O autor passou por procedimento de calibragem no Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da UFRGS para realizar a contagem de AgNor. Selecionou-se as células mais próximas ao tecido ósseo neoformado para garantir que as células quantificadas eram osteoblastos. Foi feito a contagem dos AgNor de 100 osteoblastos, esse número tem valor bastante significativo e tem sido usado em contagens de células do tecido ósseo por outros autores como Arora et al. (2003) e Paparella et al. (2007). Em seguida, processou-se os dados coletados sob os seguintes critérios: média de AgNor por célula, porcentagem de células com mais de 3 AgNor.

4 RESULTADOS

Todos os coelhos apresentaram ótimas condições pós-operatórias, não apresentando intercorrências. Embora a presença do dispositivo de distração possa ser desconfortável todos os coelhos puderam se alimentar de forma adequada apresentando peso compatível com saúde atestado pela equipe de cuidadores e veterinários da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Ao término da distração no dia da morte dos coelhos nenhum processo inflamatório foi verificado nos coelhos do grupo controle e do grupo submetido à LLLT. O grupo submetido ao campo magnético apresentou pequenas áreas de inflamação ao redor dos ímãs, entretanto, não foi verificado alterações ao longo da região distraída.

A análise qualitativa dos cortes histológicos em HE sugeriu diferença na formação de tecido ósseo do coelho submetido à LLLT em relação aos coelhos com campo magnético e controle. Embora o coelho com LLLT esteja em um grau de desenvolvimento avançado em relação aos outros coelhos todos apresentam osso imaturo na sua maioria. Não houve diferença na proporção de osso dos coelhos com campo magnético e controle, foi encontrado raízes dos dentes de ambos os coelhos com a presença, provável, de osso alveolar. Os coelhos com campo magnético e LLLT apresentaram maior vascularização que o coelho controle. Entre os fatores que demonstram a imaturidade óssea se dá pela grande presença de osteócitos e desorientação das fibras colágenas analisadas na coloração de picrossirius.

Na coloração de Picrossirius o coelho com campo magnético apresentou predomínio de colágeno da cor vermelha, com alta birrefringência, significando apresentar fibras colágenas com maior espessura, já o coelho com LLLT apresentou colágeno vermelho, porém apresenta predominância de colágeno da cor verde, sugerindo a presença de fibras colágenas de menor espessura. O coelho do grupo controle apresenta colágeno da cor vermelha, mas com baixa birrefringência. Entretanto, nenhum grupo apresenta fibras colágenas dispostas em lamelas, deste modo, não havendo presença de osso maduro.

Na análise microscópica quantitativa de HE, constatou-se grande quantidade de tecido ósseo neoformado no grupo com LLLT em relação ao grupo controle, por sua vez o grupo controle apresentou maior quantidade de osso que o grupo com campo magnético. O grupo com LLLT apresentou média de 67,8% de tecido ósseo neoformado, o grupo controle apresentou média de 41,48% de neoformação óssea enquanto que a menor média foi de 33,8% do grupo com campo magnético (Tabela 1).

A análise quantitativa com Picrosirius mostrou uma média de produção de fibras colágenas também mais consistente no grupo com LLLT (48%) seguido pelo grupo com campo magnético (43,36%), o grupo controle apresentou a menor produção de colágeno (29,46%) (Tabela 1).

Tabela 1 - Porcentagem de tecido ósseo neoformado e porcentagem de fibras colágenas para os 3 grupos

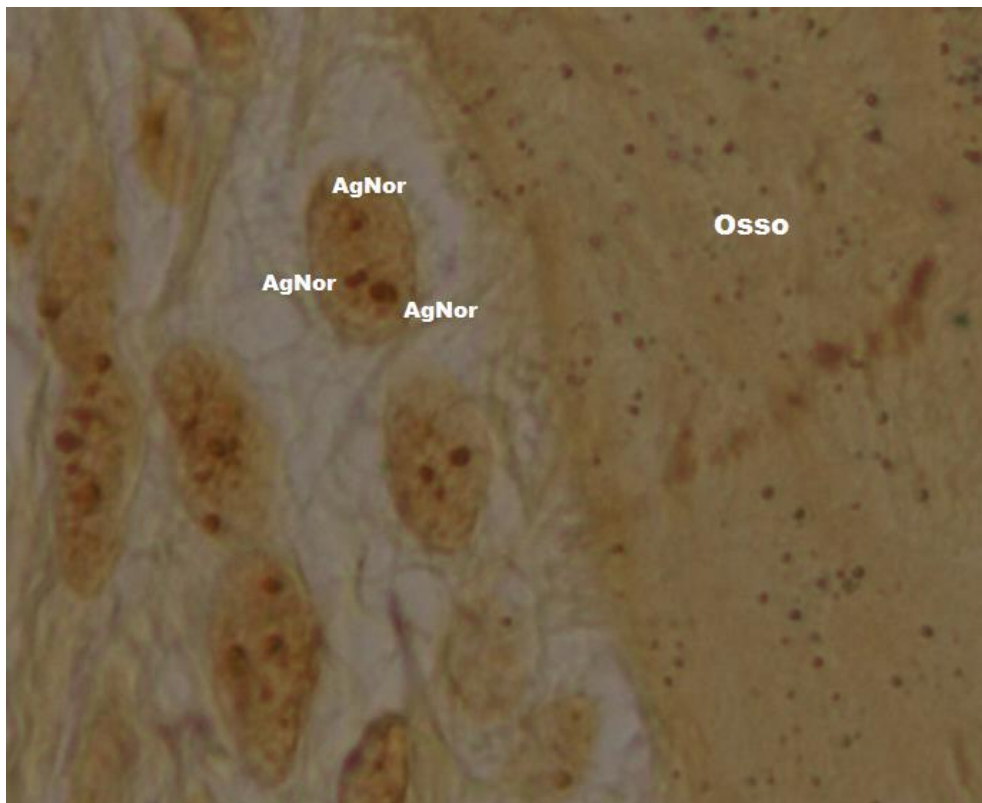
	Neoformação óssea	Fibras colágenas
Controle	41,48%	29,46%
Campo Magnético	33,8%	43,36%
LLLT	67,8%	48%

Para verificar a intensidade da proliferação celular, utilizou-se a média de AgNor por célula, nesse parâmetro o grupo com campo magnético apresentou melhor resultado com média de 2,57 AgNor por célula, o grupo com LLLT apresentou média de 2,13 AgNor por célula, enquanto que a média do grupo controle foi de 1,87. Outro parâmetro avaliado foi a porcentagem de AgNor maior que 3. O grupo com campo magnético apresentou 23% de AgNor > 3, o grupo com LLLT foi de 7% AgNor > 3 enquanto que o grupo controle obteve apenas 2% de AgNor > 3.

Tabela 2 - Média de AgNor por célula e porcentagem de células com mais de 3 AgNor para cada um dos 3 grupos

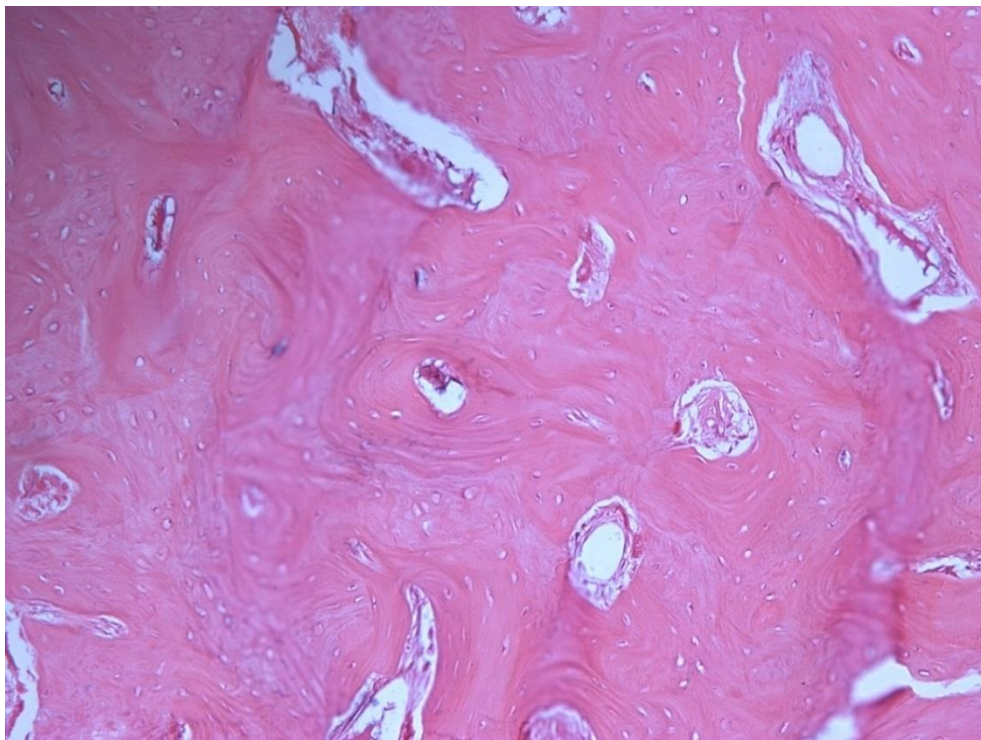
	Média de AgNor	pAgNor > 3
Controle	1,87	2%
Campo Magnético	2,57	23%
LLLT	2,13	7%

Figura 5 - Osteoblasto com 3 AgNor do coelho submetido ao campo magnético



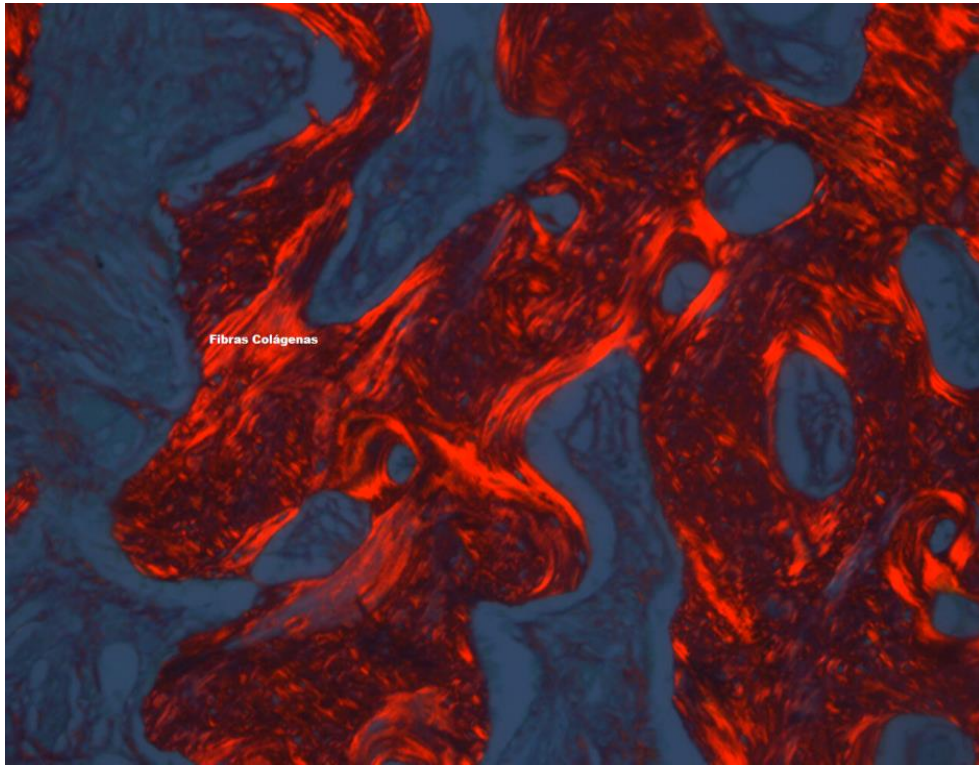
Fonte: Dados da pesquisa

Figura 6 - Tecido ósseo neoformado do grupo submetido à LLLT



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 7 - Disposição das fibras colágenas do grupo submetido à LLLT



Fonte: Dados da pesquisa

5 DISCUSSÃO

A distração osteogênica mostrou ser uma técnica eficaz com o propósito de promover o alongamento ósseo. Os coelhos submetidos a esta técnica apresentaram aumento mandibular com conseqüente formação de tecido ósseo sem que houvesse qualquer manifestação de ordem infecciosa, rejeição ao aparelho distrator ou alguma intercorrência pós-operatória.

A utilização do coelho como modelo animal para a realização dos estudos de distração osteogênica foi bem sucedida, entretanto, para melhor acomodação dos aparelhos distratores utilizamos somente animais do sexo feminino que apresentam masseter menos desenvolvido, e um corpo mandibular mais plano, facilitando a fixação do dispositivo. Uma dificuldade para utilização de coelhos está no fato de a mandíbula ser pequena, proporcionando menor espaço para a colocação do aparelho distrator e ímãs para a criação do campo magnético.

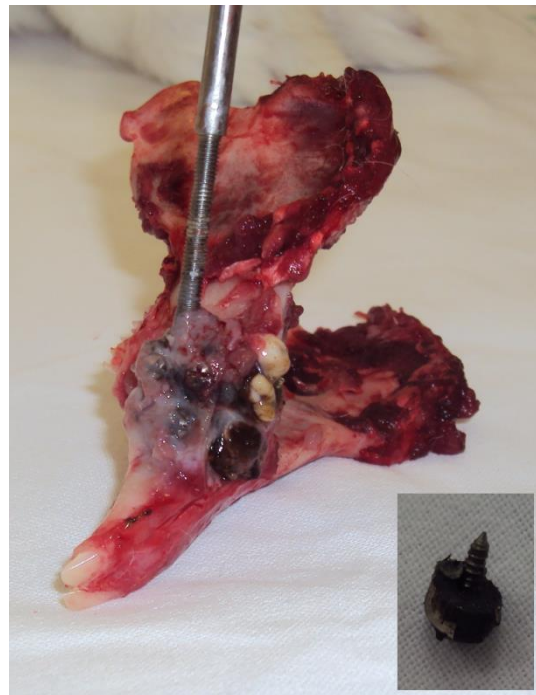
Há uma clara preocupação a cerca da necessidade de diminuição do tempo de tratamento para produzirmos melhores resultados nesta técnica. Diversos protocolos são descritos na literatura confrontando tempos de execução para cada etapa cirúrgica, sendo os trabalhos de Ilizarov (1989a, 1989b) precursores nesse quesito. Alguns autores como Tavakoli et al. (1998) relatam não haver necessidade de usar o período de latência no emprego da técnica. Para Ilizarov (1988) o período de latência é importância no processo de acomodação dos tecidos e formação do calo ósseo para obter melhores resultados ao final do tratamento.

Temos também diferentes tempos empregados no período de consolidação, estudados por diferentes autores. O menor tempo encontrado foi de 10 dias por alguns autores como Miloro, Miller e Stoner (2007) e Kreisner et al. (2010) apresentando resultados satisfatórios para o propósito de formação de tecido ósseo. Nesse estudo utilizamos 20 dias para consolidação e maturação do tecido ósseo por apresentar boas propriedades mecânicas após esse tempo, assim como apresentado por Cerqueira et al. (2007).

No presente estudo aplicamos um protocolo de distração com 3 dias de latência, 7 dias de ativação e 20 dias de consolidação, protocolo semelhante a outros estudos que utilizaram 3 dias de latência, 7 dias de ativação e 10 dias de consolidação (HUBLER et al., 2010; KREISNER et al., 2010). Al-Sebaei, Gagari e Papageorge (2005) apresentou um estudo utilizando 3 dias de latência, 7 dias de ativação e 14 dias de consolidação. Tavakoli et al. (1998) testou 20 dias de consolidação. Alguns estudos apresentam maior tempo de consolidação em relação a este trabalho, como o de Mazzonetto e Maurette (2005), que utilizaram 12 semanas de consolidação.

Necessita-se de mais estudos que demonstrem a intensidade do campo magnético necessária para formar tecido ósseo com a melhor qualidade e no menor tempo possível, pois diferentes forças de campo magnético são descritas na literatura Puricelli et al. (2006), Bodamyali et al. (1998) e Costantino et al. (2007) com forças de 41, 18 e 12,5 Gauss, respectivamente, variando o tempo de exposição, porém nenhum estudo comparativo foi descrito até o momento. Além disso, há a necessidade de abordagem sobre o tipo de ímã mais adequado, com melhor compatibilidade dentro dos tecidos. O tratamento com campo magnético é relativamente novo e muitas possibilidades devem ser discutidas, acreditamos que esse estudo seja precursor de muitos outros nesse sentido. Esta pesquisa, teve o cuidado de utilizar ímãs de neodímio revestidos por ouro que além da biocompatibilidade, são altamente resistentes à corrosão pelas enzimas orgânicas. Num ensaio precursor a este trabalho, ímãs de neodímio não revestidos foram testados e os mesmos apresentaram corrosão da superfície e formação de abscessos no animal.

Figura 5 – Ímã corroído e abscesso



Fonte: Dados da pesquisa

A LLLT vem sendo aplicada em diversos tratamentos dentro da medicina e odontologia nos últimos anos, despertando o interesse de cirurgiões que utilizam a técnica da distração osteogênica, entretanto, ainda não foi descrito em pacientes humanos. Favorece o

fato de não ser uma técnica invasiva, nem mesmo dolorida ao paciente, porém é necessário que se crie protocolos de utilização do laser, especificando potência e tempo de aplicação.

O meio ativo do laser mais comumente utilizado é o meio ativo de GaAlAs com luz infravermelho podendo ser usado no comprimento de onda entre 780nm e 830nm. Diversas potências também são relatadas na literatura que compreende entre 20mw e 40mw. (PRETEL; LAZARELLI; RAMALHO, 2007; MILORO; MILLER; STONER, 2007, KREISNER et al., 2010; KAN et al., 2013). O protocolo de LLLT desta pesquisa, baseou-se no artigo de Freddo et al., 2012, com resultados satisfatórios para LLLT na fase de consolidação da distração osteogênica.

A fim de analisarmos a qualidade do tecido ósseo neoformado usamos como método de avaliação as colorações de HE, Picrosirius e AgNor.

O método de HE foi capaz de demonstrar as áreas de tecido ósseo, assim como áreas de maior ou menor vascularização. Na análise qualitativa verificamos que o grupo estimulado por campo magnético apresentou maior atividade proliferativa e maior neoformação de vasos sanguíneos, constatados pelo presente estudo. Além disso, apresentou grande quantidade de osteoblastos e fibras colágenas tanto dentro da matriz óssea como no tecido intersticial e áreas de osso trabecular, assim como já descrito por Puricelli et al. (2006).

Já o grupo estimulado por LLLT apresentou a maior formação de tecido ósseo entre os três grupos, grande vascularização e formação de fibras colágenas, resultado corroborado por estudos como o de Lins et al. (2010).

Diante de um paradoxo relacionado ao fato de o grupo com campo magnético apresentar maior proliferação celular, no entanto, a proporção de área de tecido ósseo neoformado foi inferior ao grupo controle e LLLT, pode-se pensar, antecipadamente, que há uma significativa diferença entre os diferentes tempos de maturação das células ao longo do tempo da distração. Segundo Junqueira e Carneiro (2008) para que ocorra o processo de reparo, células indiferenciadas precursoras de osteoblastos entram em plena atividade proliferativa, porém, ainda não possuem maturidade suficiente para deposição de matriz óssea, sendo esta função desenvolvida apenas pelos osteoblastos já diferenciados. Seguindo a lógica, o grupo com campo magnético apresentaria maior formação de células osteoprogenitoras enquanto que no grupo controle haveria maior quantidade de células diferenciadas proporcionando maior deposição de tecido ósseo. Essa teoria deverá ser observada e analisada em um estudo com um n maior.

Inúmeros trabalhos avaliam a qualidade do tecido ósseo por microscopia óptica com coloração de HE por se tratar de uma técnica que consegue definir bem as áreas de tecido

ósseo neoformado, assim como possíveis áreas de tecido inflamatório, áreas de vascularização (CERQUEIRA et al., 2007; KREISNER et al., 2010; KAN et al., 2013). Entretanto, pouquíssimos trabalhos demonstram a atividade proliferativa osteoblástica através da técnica de AgNor em tecido ósseo, não tendo sido encontrada em publicações, em cirurgias de distração osteogênica, apenas em situações de neoplasia maligna em tecido ósseo ou patologias ósseas (PAPARELLA et al., 2007; FARINA et al., 2011).

Outro método avaliado, a coloração de Picrosirius é uma técnica bastante utilizada em trabalhos de enxerto ósseo pelo fato de as fibras colágenas marcadas por essa coloração terem função semelhante às partículas dos enxertos no processo de osteogênese. Pretel, Lazarelli e Ramalho (2007) relataram a análise de Picrosirius em seu estudo associando LLLT à técnica de distração osteogênica. Os autores observaram que esta coloração possibilita visualizar áreas de tecido ósseo maduro com as fibras colágenas formando lamelas concêntricas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo deste estudo piloto foi averiguar as possibilidades de aplicação da metodologia proposta, para se obter resultados consistentes dentro do projeto com amostra significativa maior para fins de comparação.

Portanto, os resultados deste estudo apenas sugerem tendências de quais grupos tem maior ou menor capacidade de responder aos questionamentos levantados pelos autores, servindo como guia e desvendando as melhores formas de construirmos nossa pesquisa.

Dentro do proposto, a metodologia em geral, suportou o desenvolvimento da pesquisa e resultados promissores são esperados no decorrer deste projeto.

REFERÊNCIAS

- AL-SEBAEI, M.O.; GAGARI, E.; PAPAGEORGE, M. Mandibular distraction osteogenesis: a rabbit model using a novel experimental design. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 63, no. 5, p. 664-672, May 2005.
- ARORA, B. et al. Quantitative evaluation of AgNORs in bone tumours. **Pathology**, London, v. 35 no. 2, p. 106-108, Apr. 2003.
- BLOCK, M. S. et al. Bone response to functioning implants in dog alveolar ridges augmented with distraction osteogenesis. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 13, n. 3, p. 342-351, May/June 1998.
- BODAMYALI, T. et al. Pulsed electromagnetic fields simultaneously induce osteogenesis and upregulate transcription of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in rat osteoblasts in vitro. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v. 250, no. 2, p. 458-461, Sept. 1998.
- CATÃO, M.H.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, out./dez. 2004.
- CERQUEIRA, A. et al. Bone tissue microscopic findings related to the use of diode laser (830nm) in ovine mandible submitted to distraction osteogenesis. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 22, no. 2, p. 92-97, Mar./Apr. 2007.
- CHIAPASCO, M. et al. Alveolar distraction osteogenesis vs. vertical guided bone regeneration for the correction of vertically deficient edentulous ridges: a 1-3-years prospective study on humans. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 15, no. 1, p. 82-95, Feb. 2004.
- CODIVILLA, A. On the means of lengthening in the lower limbs, the muscles and tissue which are shortened through deformity. **Am. J. Orthop. Surg.**, New York, v. 2, p. 253-259, 1905.
- CONTAR, C.M. et al. Fresh-frozen bone allografts in maxillary ridge augmentation: histologic analysis. **J. Oral Implantol.**, Lawrence, v. 37, no. 2, p. 223-231, Apr. 2011.
- COSTANTINO, C. et al. Treatment of wrist and hand fractures with natural magnets: preliminary report. **Acta Biomed.**, Parma, v. 78, no. 3, p. 198-203, Dec. 2007.
- CROCKER, J.; BOLDY, D.A.; EGAN, M.J. How should we count AgNORS? Proposals for a standardized approach. **J. Pathol.**, London, v. 158, no. 3, p. 185-188, July 1989.
- DINER, P.A. et al. Intraoral distraction for mandibular lengthening: a technical innovation. **J. Craniomaxillofac. Surg.**, Edinburgh, v. 24, n. 2, p. 92-95, Apr. 1996.
- DJASIM, U.M. et al. Rabbits as a model for research into craniofacial distraction osteogenesis. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Edinburgh, v. 46, no. 8, p. 620-624, Dec. 2008.

ENISLIDIS, G. et al. Analysis of complications following alveolar distraction osteogenesis and implant placement in the partially edentulous mandible. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 100, no. 1, p. 25-30, July 2005.

FARINA, R.A. et al. Correlation between single photon emission computed tomography, AgNOR count, and histomorphologic features in patients with active mandibular condylar hyperplasia. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 69, no. 2, p. 356-361, Feb. 2011.

FREDDO, A.L. et al. A preliminary study of hardness and modulus of elasticity in sheep mandibles submitted to distraction osteogenesis and low-level laser therapy. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.**, Valência, v. 17, no. 1, p. 102-107, Jan. 2012.

FREDERICKS, D.C. et al. Effect of pulsed electromagnetic field stimulation on distraction osteogenesis in the rabbit tibial leg lengthening model. **J. Pediatr. Orthop.**, New York, v. 23, no. 4, p. 478-483, July/Aug. 2003.

HARTIG, M.; JOOS, U.; WIESMANN, H.P. Capacitively coupled electric fields accelerate proliferation of osteoblast-like primary cells and increase bone extracellular matrix formation in vitro. **Eur. Biophys. J.**, Berlin, v. 29, no. 7, p. 499-506, 2000.

HEGGIE, A.A.; KUMAR R.; SHAND J.M. The role of distraction osteogenesis in the management of craniofacial syndromes. **Ann. Maxillofac. Surg.**, Mumbai, v. 3, no. 1, p. 4-10, Jan. 2013.

HUBLER, R. et al. Effects of low-level laser therapy on bone formed after distraction osteogenesis. **Lasers Med. Sci.**, London, v. 25, no. 2, p. 213-219, Mar. 2010.

ILIZAROV, G.A. The principles of the Ilizarov method. **Bull. Hosp. Jt. Dis. Orthop. Inst.**, New York, v. 48, no. 1, p. 1-11, Spring 1988.

ILIZAROV, G.A. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. Part I. The influence of stability of fixation and soft-tissue preservation. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, New York, v. 238, p. 249-281, Jan. 1989a.

ILIZAROV, G.A. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: Part II. The influence of the rate and frequency of distraction. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, New York, v. 239, p. 263-285, Feb. 1989b.

ISHIZAKA, R. et al. Effects of a magnetic field on the various functions of subcellular organelles and cells. **Pathophysiology**, Amsterdam, v. 7, no. 2, p. 149-152, July 2000.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KAN, B. et al. Histomorphometrical and radiological comparison of low-level laser therapy effects on distraction osteogenesis: experimental study. **Lasers Med. Sci.**, London, Apr. 2013.

KARU, T.I. Photobiology of low-power laser effects. **Health Phys.**, New York, v. 56, no. 5, p. 691-701, May 1989.

KESEMENLI, C.C. et al. The effects of electromagnetic field on distraction osteogenesis. **Yonsei Med. J.**, Seoul, v. 44, no. 3, p. 385-391, June 2003.

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.**, Valência, v. 15, n. 4, p. e616-618, July 2010.

LINS, R.D. et al. Biostimulation effects of low-power laser in the repair process. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 6, p. 849-855, Nov./Dec. 2010.

MATSUMOTO, H. et al. Pulsed electromagnetic fields promote bone formation around dental implants inserted into the femur of rabbits. **Clin. Oral Implants Res.** Copenhagen, v. 11, no. 4, p. 354-360, Aug. 2000.

MAZZONETTO, R.; MAURETTE M.A. Radiographic evaluation of alveolar distraction osteogenesis: analysis of 60 cases. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 63, no. 12, p. 1708-1711, Dec. 2005.

MEHRA, P.; FIGUEROA, R.; Vector control in alveolar distraction osteogenesis. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 66, no. 4, p. 776-779, Apr. 2008.

MESTER, E.; MESTER, A.F.; MESTER, A. The biomedical effects of laser application. **Lasers Surg. Med.**, New York, v.5, no. 1, p. 31-39, Jan. 1985.

MILORO, M.; MILLER, J.J.; STONER, J.A. Low-level laser effect on mandibular distraction osteogenesis. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 65, n. 2, p. 168-176, Feb. 2007.

MOFID, M. M. et al. Craniofacial distraction osteogenesis: a review of 3276 cases. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v. 108, n. 5, p. 1103-1117, Oct. 2001.

NACAO, M. Distração osteogênica – revisão de literatura. **Rev. Dent. Press Ortodon. Ortopedi. Facial.** Maringa, v. 7, n. 3, p. 105-114, maio/jun. 2002.

NUNTANARANONT, T. Distraction osteogenesis: role and clinical applications in the maxillofacial region. **Ann. R. Australas Coll. Dent. Surg.** Sydney, v.19, p.125-32, June 2008.

PAPARELLA, M.L. et al. Evaluation of nucleolar organizer regions in maxillary osteosarcoma. **Acta Odontol. Latinoam.** Buenos Aires, v. 20, n. 1, p. 55-60, 2007.

PRETEL, H.; LAZARELLI, R.F.; RAMALHO, L.T. Effect of low-level laser therapy on bone repair: histological study in rats. **Lasers Surg. Med.**, New York, v. 39, n. 10, p. 788-796, Dec. 2007.

PURICELLI, E.; DUTRA, N.B.; PONZONI, D. Histological evaluation of the influence of magnetic field application in autogenous bone grafts in rats. **Head Face Med.** London, v. 5, no. 1, Jan. 2009. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/24142>>. Acesso em 10 jun. 2013.

PURICELLI, E. et al. Histological analysis of the effects of a static magnetic field on bone healing process in rat femurs. **Head Face Med.**, London, v. 2, no. 43, Nov. 2006. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/21534>>. Acesso em 10 jun. 2013.

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, Dec. 2009.

STEIN, R. S.; SILVA, J. B.; SILVA, V. D. Estudo comparativo da neoformação óssea utilizando-se o enxerto autógeno e três substitutos: defeitos ósseos em ratos. **Rev. bras. ortop.**, São Paulo, v.44, n.4, 2009.

SHAKOURI, S.K. et al. Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process. **Lasers Med. Sci.**, London, v.25, no. 1, p. 73-77, Jan. 2010.

TAVAKOLI, K. et al. The role of latency in mandibular osteodistraktion. **J. Craniomaxillofac. Surg.**, Edinburgh, v. 26, no. 4, p. 209-219, Aug. 1998.

ANEXO – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



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

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão Científica e a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisaram o projeto:

Projeto: 110402

Data da Versão do Projeto: 16/11/2011

Pesquisadores:

DEISE PONZONI

ANGELO LUIZ FREDDO

EDELA PURICELLI

Título: AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA LASERTERAPIA E DE UM CAMPO MAGNÉTICO NA QUALIDADE DO OSSO MANDIBULAR DE COELHOS SUBMETIDOS À DISTRAÇÃO OSTEOGÊNICA

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, 13 de janeiro de 2012.

Dr. Alessandro Bersch Osvaldt
Coordenador da CEUA/HCPA