

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA  
CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA BUCO-MAXILO-FACIAIS**

Fernando Vacilotto Gomes

**REPARO ÓSSEO PERIMPLANTAR APÓS LLLT EM COELHOS:  
ESTERIOLOGIA E MEV**

Porto Alegre – RS

2013

**FERNANDO VACILOTTO GOMES**

**REPARO ÓSSEO PERIMPLANTAR APÓS LLLT EM COELHOS:  
ESTERIOLOGIA E MEV**

**Linha de Pesquisa**

Biomateriais e Técnicas Terapêuticas em Odontologia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, na Área de Concentração em Clínica Odontológica – Cirurgia e Traumatologia Bucal-Maxilo-Faciais.

**Orientador:** Prof. Dr. Carlos Eduardo E. Baraldi

Porto Alegre – RS

2013

### CIP - Catalogação na Publicação

Gomes, Fernando Vacilotto  
REPARO ÓSSEO PERIMPLANTAR APÓS LLLT EM COELHOS:  
ESTERIOLOGIA E MEV / Fernando Vacilotto Gomes. --  
2013.  
119 f.

Orientador: Carlos Eduardo Espíndola Baraldi.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia,  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto  
Alegre, BR-RS, 2013.

1. Implantes Dentários. 2. Terapia a Laser de  
Baixa Intensidade. 3. Microscopia Eletrônica de  
Varredura. 4. Histologia. I. Baraldi, Carlos Eduardo  
Espíndola, orient. II. Título.

**FERNANDO VACILOTTO GOMES**

**REPARO ÓSSEO PERIMPLANTAR APÓS LLLT EM COELHOS:  
ESTERIOLOGIA E MEV**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, na Área de Concentração em Clínica Odontológica – Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais.

Examinado em 26 de julho de 2013.

**Banca Examinadora**

---

Profa. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira

---

Prof. Dr. Marcelo Lazzaron Lamers

---

Prof. Dr. Luciano Mayer

*Aos meus queridos pais, Ivan e Ana Gomes, ao meu irmão Eduardo e a  
minha namorada Juliana agradeço o apoio diário, a paciência pelos  
diversos momentos de ausência, o carinho nas horas difíceis e a alegria  
nos momentos de vitória.*

*É com amor que dedico este trabalho a vocês.*

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

À Profa. Dra. Edela Puricelli, pelo exemplo de profissional e pessoa que é. Contagia seus alunos e colegas professores diariamente com o entusiasmo com que trabalha e com a dedicação prestada aos seus pacientes. Da mesma forma, compartilha seu conhecimento tendo como único objetivo ensinar. Nesses dois anos, aprendi não apenas as técnicas cirúrgicas desenvolvidas pela Doutora, mas uma Filosofia de Trabalho, que ao meu ver se traduz em elevada Capacidade Técnico-Científica, Ética Profissional, Atualização Constante e o 'Cuidar' do paciente. Agradeço a oportunidade e honrarei todo o conhecimento adquirido.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Baraldi, meu orientador, agradeço a dedicação e a paciência a mim prestada ao longo deste mestrado. Lembrarei, sempre, das diversas horas de conversa sobre a minha dissertação, fato que me despertou e incentivou a estudar e a escrever. Aprendi muito com a sua orientação e procurarei exercer a especialidade que escolhi com maestria, fato notório em sua forma de trabalhar.

À Profa. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira, minha orientadora na graduação e no especialização em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais (PUCRS) pela amizade que construímos e pela dedicação constante em todos os trabalhos que tive a oportunidade de participar em conjunto. Agradeço a oportunidade de ter sido seu orientado e o muito que aprendi sobre pesquisa de alto nível, coerência, generosidade e humildade.

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dra. Deise Ponzoni, pela amizade, pela dedicação constante aos seus alunos, pela responsabilidade e carinho com que trata seus pacientes. Agradeço os ensinamentos compartilhados, a convivência e a disponibilidade prestadas. Meu muito obrigado.

Aos Profs. Drs. Angelo Luiz Freddo e Marcel Fasolo de Paris, pela amizade, convívio agradável, confiança e incentivo durante todo o período do curso.

Ao Prof. Dr. Carlos dos Reis Pereira Araújo e à Dra. Fernanda Stancari pela possibilidade de trabalhar em conjunto na USP/Bauru e aprender uma metodologia diferenciada e de elevada qualidade. Os meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Luciano Mayer, pela amizade, conhecimento, entusiasmo e dedicação prestados na realização e conclusão deste projeto. Tenho a certeza que muitos outros virão, com a mesma qualidade, responsabilidade e respeito aos preceitos éticos, fato que o torna um profissional de excelência.

Ao meu colega de graduação, especialização e mestrado e grande amigo Fabrício Poletto Massotti, pelo convívio, amizade e aprendizado diário. Agradeço os bons momentos que passamos juntos ao longo de nossa vida acadêmica e desejo muito sucesso em sua carreira profissional.

Aos meus colegas de mestrado Jules e Viviane, agradeço o convívio, a amizade e o respeito compartilhados ao longo do curso. Desejo muito sucesso profissional.

Aos alunos do 1º curso de especialização em CTBMF da UFRGS, Bernardo, Thales, Estevan e Juliane pelo convívio, apoio e amizade.

Aos funcionários do Setor de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais da Faculdade de Odontologia da UFRGS, em especial a Sra. Lourdes, Sra. Fernanda, Sra. Joslaine e o Sr. Eduardo pela agilidade e auxílio prestados ao longo das disciplinas cirúrgicas do mestrado.

Aos funcionários da Zona 18, do Bloco Cirúrgico e do Centro Cirúrgico Ambulatorial do HCPA, pelo auxílio e dedicação prestados a equipe.

Ao Prof. Dr. Vinícius Carvalho Porto, coordenador do Centro Integrado de Pesquisa-I, da Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo (USP), pelo acolhimento em seu laboratório. Sem essa oportunidade, este trabalho não teria a qualidade com que hoje se apresenta. Estendo os meus agradecimentos ao Sr. Renato Pereira Murback pela atenção e dedicação prestados durante a fase de preparo das amostras.

À Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial à Médica Veterinária Sra. Fabíola Meyer e à Enfermeira Sra. Marta Justina Giotti Cioato, pela amizade, dedicação, disponibilidade e auxílio prestado durante a fase experimental deste trabalho. Com certeza, a qualidade obtida na fase cirúrgica deste experimento foi em virtude da excelência do vosso trabalho e das ótimas instalações oferecidas pela UEA. Estendo meus agradecimentos aos funcionários dessa unidade, a Sra. Rosa e ao Sr. Eduardo, pelo auxílio prestado na execução da fase experimental deste trabalho.

À Unidade de Patologia Experimental (UPE/HCPA), na pessoa da Dra. Luise Meurer e dos funcionários Sra. Flávia e Sr. Roger pela colaboração e orientação na coloração das lâminas e interpretação esteriológica deste trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), na pessoa do seu Diretor, o Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados, agradeço com grande estima esta casa que me acolheu tão bem e que muito contribuiu para minha formação pessoal e profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGODO) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), na pessoa de seu coordenador, o Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho, pela excelência e empenho na coordenação desta pós-graduação.

À CAPES pelo apoio financeiro durante parte do curso de mestrado.

Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do HCPA, pelo financiamento deste trabalho.

À PROPESQ por parte do financiamento deste trabalho e importação de uma serra fita EXAKT®.

À Reitoria da UFRGS e ao setor de Importação desta Universidade pelos serviços prestados.

Aos meus amigos e colegas de profissão que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigado.

*“Se tu podes crer, tudo é possível ao que crê”*

***Marcos 9, versículo 23***

## RESUMO

Estudos prévios sugerem que a laserterapia de baixa potência (LLLT) favorece o reparo ósseo perimplantar. Este estudo avaliou a influência da LLLT sobre o reparo ósseo perimplantar *in vivo* em 32 coelhos Nova Zelândia submetidos à exodontia do incisivo inferior esquerdo imediatamente seguida pela inserção de um implante osseointegrável. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: um grupo controle C (animais não irradiados) e três experimentais. Estes receberam 7 sessões de terapia laser (AsGaAl, infravermelho, 830 nm, 50mW, CW), com intervalos de 48 horas. A dose de laser por sessão variou entre os grupos EI (10 J/cm<sup>2</sup>), EII (5 J/cm<sup>2</sup>) e EIII (20J/cm<sup>2</sup>). Os animais foram mortos e os espécimes preparados histologicamente para análise da superfície de contato entre osso e implante (BIC) e da área de neoformação óssea entre as espiras (BA), em esteriologia e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A concentração de cálcio na interface do tecido ósseo com o implante foi analisada por espectrometria de raios-X por dispersão de energia (EDS). Os resultados foram analisados estatisticamente. Para MEV, as médias de BIC foram significativamente maiores para os grupos EI (977,9 µm) e EIII (1021,1 µm), comparados a EII (761,5 µm) e C (807,8 µm). Em BA, EIII (122573,7 µm<sup>2</sup>) superou os valores de neoformação dos demais grupos. O EDS para concentração de cálcio não apresentou diferença entre os grupos. A análise de BIC por meio de esteriologia mostrou valores significativamente maiores para EIII (1045,3 µm) em relação aos demais grupos. Para a BA, os grupos EI (100068,3 µm<sup>2</sup>) e EIII (103934,5 µm<sup>2</sup>) mostraram grandezas significativamente maiores. O uso da LLLT, no protocolo descrito, influenciou positivamente o reparo ósseo perimplantar com aumento do contato do tecido ósseo com o implante principalmente na dose de 20 J/cm<sup>2</sup> por sessão, bem como maior volume ósseo neoformado entre as espiras.

**Palavras-chave:** Implantes Dentários; Terapia a Laser de Baixa Intensidade; Microscopia Eletrônica de Varredura; Histologia.

## ABSTRACT

Previous studies suggest that the low level laser therapy (LLLT) has a favorable effect on perimplant bone healing. This study evaluates the LLLT influence over perimplant bone healing pattern in 32 New Zealand male rabbits which were submitted to a lower incisor extraction followed by an osseointegrated implant immediated insertion. The animals were randomly divided into four groups of eight animals each: a control group C (non-irradiated animal) and three experimental groups. They received seven laser therapy sessions (GaAlAs, infrared, 830 nm, 50 mW, CW), every 48 hours. The LLLT per session dose ranged between the groups EI (dose – 10 J/cm<sup>2</sup>), EII (dose – 5 J/cm<sup>2</sup>) and EIII (dose – 20 J/cm<sup>2</sup>). The animals were killed and the specimens received histological preparation for bone implant contact analysis (BIC) and Bone Area evaluation (BA) among the implant threads, both steriology and Scanning Electron Microscopy (SEM). The calcium concentration in bone implant interface were analysed by Energy-Disperse X-Ray Spectroscopy (EDS). The results were statistically analyzed. For SEM results, the BIC's mean were significantly higher for the irradiated groups EI (977,9 µm) and EIII (1021,1 µm) compared to EII (761,5 µm) and C (807,8 µm). For BA, EIII (122573,7 µm<sup>2</sup>) showed better values for bone neoformation compared to other groups. For EDS calcium concentration there was no significantly difference between groups. The steriology analysis showed significantly higher values for BIC in EIII (1045,3 µm) compared to the other groups. For BA, EI (100068,3 µm<sup>2</sup>) and EIII (103934,5 µm<sup>2</sup>) were significantly higher. In this laser protocol, the use of LLLT induced positively perimplantar bone repair specially due to the bone implant contact improvement (20 J/cm<sup>2</sup> per session dose), as well as, better bone area neoformation within treads.

**Keywords:** Dental Implants; Low-Level Laser Therapy; Scanning Electron Microscopy; Histology.

## Lista de Figuras

Figura 1- Unidade de Experimentação animal .....	39
Figura 2- Identificação dos animais.....	40
Figura 3- Procedimento cirúrgico de extração dentária.....	42
Figura 4- Procedimento cirúrgico de inserção de um implante osseointegrável.....	43
Figura 5- Aplicação da LLLT .....	45
Figura 6- Ressecção total da mandíbula dos coelhos.....	48
Figura 7- Demarcação das amostras para osteotomia.....	49
Figura 8- Osteotomia da mandíbula .....	49
Figura 9- Desidratação das peças.....	51
Figura 10- Polimerização das amostras. ....	51
Figura 11- Recorte das amostras .....	52
Figura 12- Avaliação da resina polimerizada.....	52
Figura 13- Colagem da peça nas lâminas de acrílico com cola rápida. ....	53
Figura 14- Colagem da peça em duas superfícies de acrílico.....	53
Figura 15- Micrótomo Exakt .....	55
Figura 16- Corte da lâmina no micrótomo Exakt .....	55
Figura 17- Primeiro corte no micrótomo Exakt .....	56
Figura 18- Politriz metalográfica Exakt.....	57
Figura 19- Mensuração da lâmina em um micrômetro de precisão.....	57
Figura 20- Passos do protocolo de coloração com azul de toluidina.....	59
Figura 21- Captura das imagens em Microscópio Óptico Olympus® .....	60
Figura 22- Desidratação das oito peças para MEV .....	62
Figura 23- Imersão das peças para MEV em resina específica .....	63
Figura 24- Corte da amostra sendo realizada em serra Logitech.....	63
Figura 25- Lixamento e Polimento das peças para MEV.....	64
Figura 26- Antes e depois do protocolo de preparo das amostras para MEV.....	65
Figura 27- Microscópio Eletrônico de Varredura Philips.....	66
Figura 28- Calibração e transformação da mensuração de pixels para milímetros. ...	67
Figura 29- Mensuração de imagem em microscópio óptico – BIC .....	68
Figura 30- Mensuração de imagem em microscópio óptico – BA .....	69
Figura 31- Calibração das imagens MEV .....	70

Figura 32- Mensuração de imagem MEV – BIC .....	71
Figura 33- Mensuração de imagem MEV – BA .....	71
Figura 34- Relação entre a avaliação macroscópica e em MEV .....	72
Figura 35- Comparação dos resultados encontrados em MEV .....	75
Figura 36- Comparação MEV e EDS para cada um dos grupos .....	76
Figura 37- Avaliação topográfica realizadas em aumento de 200x .....	79

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Caracterização dos grupos .....	.45
<b>Tabela 2:</b> Parâmetros do laser .....	.46
<b>Tabela 3:</b> Protocolo de irradiação com laser AsGaAl .....	.47
<b>Tabela 4:</b> Correlação para transformação de pixels para milímetros .....	.68
<b>Tabela 5:</b> Apresentação dos resultados .....	.73
<b>Tabela 6:</b> Relação entre o grupo e o percentual de neoformação óssea tanto para BIC quanto para BA durante a análise por MEV .....	.74
<b>Tabela 7:</b> Apresentação dos resultados para as análises EDS para valores de cálcio (Média/Desvio Padrão).....	.75
<b>Tabela 8:</b> Relação entre o grupo e o percentual de neoformação óssea tanto para BIC quanto para BA durante a análise por Esteriologia .....	.78
<b>Tabela 9:</b> Relação entre o percentual de BIC e BA para cada região do implante observado nas lâminas esteriológica.....	.78

## Lista de Quadros

<b>Quadro 1:</b> Tipo amostral em estudos pré-clínicos em comparação ao estudo clínico sobre a ação da LLLT sobre o reparo ósseo perimplantar com os respectivos protocolos terapêuticos .....	25
--	----

## Lista de Gráficos

<b>Gráfico 1:</b> Relação BIC para cada tipo de análise realizada (MEV e Esteriologia).....	80
<b>Gráfico 2:</b> Relação de BA para cada tipo de análise realizada (MEV e Esteriologia).....	81

## Lista de Abreviaturas

- AsGaAl / GaAlAs** = Laser de Arseneto (Ar) de Gálio (Ga) e Alumínio (Al)
- BA** = *Bone Area* (Área de neoformação óssea)
- BIC** = *Bone Implant Contact* (Contato entre osso e implante)
- BSE** = *Backscattering Electrons* (Elétrons Retroespalhados)
- CEUA** = Comissão de Ética no Uso de Animais
- EDS** = *Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy* (Espectrometria de Raios-X por Dispersão de Energia)
- eV** = elétron-Volt
- ISQ** = *Implant Stability Quotient* (Quociente de Estabilidade do Implante)
- J** = Joule(s)
- J/cm<sup>2</sup>** = Joule(s) por centímetros quadrados
- LASER** = *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*
- LLLT** = *Low-Level Laser Therapy* (Terapia laser de baixa intensidade)
- MB** = *Mega bite(s)*
- mbar** = milibar
- MEV** = Microscopia Eletrônica de Varredura
- μm** = micrômetro(s)
- μm<sup>2</sup>** = micrômetro(s) quadrado(s)
- mm** = milímetros
- mW** = miliWatts
- mW/cm<sup>2</sup>** = miliWatts por centímetro quadrado
- N** = Newton(s)
- n** = número amostral

**N/cm** = Newton(s) por centímetro

**nm** = nanômetro(s)

**p**= probabilidade de erro

**RANK** = *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa*

**RANK-L** = *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B*

**rpm** = rotações por minuto

**s** = segundo (s)

**SE** = *Secondary Electrons* (Elétrons Secundários)

**SPSS** = *Statistical Package for Social Science*

**W** = Watt

**$\lambda$  lambda** = comprimento de onda

**®** = marca registrada

**%** = por cento, porcentagem / percentagem

**<** = menor

**≤** = menor e igual

# SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1	Laser no Reparo Ósseo Perimplantar – estudos pré-clínicos .....	26
2.2	Laser no Reparo Ósseo Perimplantar – estudos clínicos .....	30
2.3	MEV .....	31
2.4	Esteriologia com Azul de Toluidina ( <i>BIC</i> e <i>BA</i> ) .....	33
2	OBJETIVOS.....	34
3	METODOLOGIA .....	35
3.1	Local de origem.....	35
3.2	Locais de realização .....	35
3.3	Delineamento .....	35
3.4	Respaldo Ético.....	36
3.5	Paradigma.....	36
3.6	Variáveis .....	36
3.6.1	Dependentes .....	36
3.6.2	Independentes.....	37
3.7	Definição Conceitual .....	37
3.7.1	Laser de Baixa Potência (GaAIs) .....	37
3.7.2	Osseointegração.....	38
3.8	Configuração da Amostra .....	38
3.9	Distribuição dos Grupos.....	39
3.10	Instalações.....	39

3.11	Procedimento Cirúrgico.....	40
3.12	Irradiação com Laser .....	44
3.12.1	Grupo Experimental EI .....	46
3.12.2	Grupo Experimental EII .....	47
3.12.3	Grupo Experimental EIII.....	47
3.13	Esteriologia .....	47
3.13.1	Realização das lâminas e coloração com azul de toluidina.....	54
3.14	Avaliação por MEV.....	61
3.14.1	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	65
3.15	Análise Esteriológica das Imagens .....	66
3.16	Análise das Imagens em MEV .....	69
3.17	Análise Estatística.....	72
4	RESULTADOS .....	73
4.1	MEV .....	73
4.2	Esteriologia .....	77
5	DISCUSSÃO.....	82
6	CONCLUSÃO .....	89
	REFERÊNCIAS .....	90
	ANEXOS .....	97
	Anexo I – Aprovação no CEUA/HCPA: registro nº 110449.....	97
	Anexo II – Aprovação no CEUA/HCPA: registro nº 120112.....	98
	Anexo III – Justificativa do cálculo do tamanho da amostra. ....	99
	Anexo IV – Autorização para uso do Centro de Microscopia e Microanálise da PUCRS. ....	100
	APÊNCIDE .....	101

Apêndice I – Publicações realizadas no CEUA/HCPA: registro nº 120112. ....	101
Apêndice II – Artigos submetidos a periódicos nacionais e internacionais realizadas com o registro nº 120112 (CEUA/HCPA). ....	102
Apêndice III – Artigo da dissertação que será submetido à avaliação de periódico internacional. ....	103

## 1 INTRODUÇÃO

---

O uso dos implantes na cavidade bucal representou um grande avanço na perspectiva de reabilitação do edentulismo tanto parcial quanto total. A reposição dos elementos dentários perdidos por próteses implanto-suportadas possibilitou melhor reabilitação física e maior expectativa psicossocial aos pacientes que até então eram reabilitados com próteses removíveis (ADELL e colaboradores, 1981).

A osseointegração implica na união entre osso vital e a superfície de um implante. O fenômeno é dependente de diversos fatores, dentre eles a morfologia, a composição e as características desta superfície. Pode ser alcançada e mantida a partir de um adequado procedimento cirúrgico de inserção dos implantes. Deve-se ainda respeitar o tempo de reparo ósseo necessário para a integração implante-osso e a posterior biomecânica de distribuição de forças sobre as peças implantadas (CARLSSON e colaboradores, 1986; BRANEMARK e colaboradores, 1998). Dentre as diversas formas de se avaliar ou quantificar a osseointegração, um fenômeno basicamente clínico, pode-se levar a interface do implante e osso a escalas microscópicas, procedendo a mensuração por meio da quantidade de contato existente entre essas duas estruturas, como também, pelo volume de osso neoformado naquela região (PEREIRA e colaboradores, 2009; GARCIA-MORALES e colaboradores, 2012).

Os equipamentos emissores da radiação laser são muito utilizados por diferentes profissionais da área da saúde, em especial, para fins terapêuticos. Na Odontologia, o uso do laser com diferentes comprimentos de onda e em distintas aplicações no campo da saúde bucal possibilitou a aplicação desta tecnologia nos mais diversos procedimentos clínicos (KUCEROVÁ e colaboradores, 2000; GARCIA-MORALES e colaboradores, 2012).

Os efeitos da laserterapia no processo de reparo ósseo, assim como do reparo ósseo perimplantar tem sido pesquisados contemporaneamente. Busca-se com a terapia laser de baixa intensidade (LLLT – “*Low Level Laser Therapy*”) reduzir o desconforto pós-operatório, acelerar o processo de reparo ósseo perimplantar e

ainda, obter algum potencial bactericida (SHIBLI e colaboradores, 2004; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2008; PEREIRA e colaboradores, 2009).

Segundo Pinheiro e colaboradores (2001), a dose é o parâmetro mais importante da terapia laser de baixa intensidade. No entanto, mesmo sendo a dose um parâmetro importante na terapia com laser, ainda não existe um protocolo definitivo para uso em diferentes situações clínicas, sendo essa ainda uma questão de discussão na literatura (JAKSE e colaboradores, 2007; MALUF e colaboradores, 2010; CAMPANHA e colaboradores, 2010).

Estudos sugerem que a LLLT tem efeito favorável sobre o reparo ósseo em estudos pré-clínicos (KARU, 1989; GARCIA e colaboradores, 2001; SILVA JR e colaboradores, 2002; PINHEIRO e colaboradores, 2003; LIRANI-GALVÃO e colaboradores, 2006; WEBER e colaboradores, 2006; BLAYA e colaboradores, 2008; PINHEIRO e colaboradores, 2008; MATSUMOTO, 2009; SARACINO e colaboradores, 2009; BASHARDOOTS e colaboradores, 2010; KAZEN SHAKOURI e colaboradores, 2010; KREISNER e colaboradores, 2010; NASCIMENTO e colaboradores, 2010; GRASSI e colaboradores, 2011) e clínicos (ABOELSAAD e colaboradores, 2009; MOZZATI e colaboradores, 2011). Especificamente sobre o processo de osseointegração quando da instalação de implantes de titânio, os achados pré-clínicos tem a mesma direção (PRETTO, 2004; LOPES e colaboradores, 2005; JAKSE e colaboradores, 2007; LOPES e colaboradores, 2007; CAMPANHA e colaboradores, 2010; MALUF e colaboradores, 2010; PETRI e colaboradores, 2010).

Na investigação do efeito da laserterapia sobre o processo de reparo ósseo perimplantar, estudos prévios descreveram a maturação óssea mais evidente no osso irradiado (JAKSE e colaboradores, 2007; CAMPANHA e colaboradores 2010; MALUF e colaboradores, 2010), bem como maior contato entre osso-implante (KHADRA e colaboradores, 2004), aplicado em dose única ou múltipla (KHADRA, 2005). Dessa forma, a LLLT apresenta potencial benéfico na melhoria do reparo ósseo perimplantar, podendo ser útil na irradiação de tecido ósseo de baixa qualidade, ou para a osseointegração de implantes sem estabilidade primária desejável, se aplicada nos estágios primários do reparo ósseo (CAMPANHA e colaboradores 2010; MALUF e colaboradores, 2010).

Os modelos animais geralmente descritos utilizam a inserção de implantes nas tíbias de coelhos (KHADRA e colaboradores, 2004; PEREIRA e colaboradores, 2009; CAMPANHA e colaboradores, 2010), tíbias de ratos (MALUF e colaboradores, 2010) e em crista ilíaca de babuínos (DÖRTBUDAK e colaboradores, 2002). Contudo, acredita-se na possibilidade da aplicação desses implantes osseointegráveis contemporaneamente nos ossos maxilares (KOCH e colaboradores, 2010), podendo simular a realidade clínica em humanos. Modelos experimentais na região anatômica da face são necessários, considerando particularidades morfo-fisiológicas dos tecidos nesta região (DE JONG e colaboradores, 2010).

A interpretação dos referidos estudos permite a formulação do seguinte problema de pesquisa: a LLLT pode melhorar o processo de reparo ósseo perimplantar em mandíbulas de coelhos? Este estudo busca possíveis respostas para este problema.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

---

Há grande quantidade de estudos pré-clínicos que evidenciam a facilidade da realização de pesquisa em animais, devido não apenas a possibilidade de acesso às amostras a qualquer momento nos biotérios, mas a condição de se realizar diversos tipos de análises *post-mortem* (DÖRTBUDAK e colaboradores, 2002; KHADRA e colaboradores, 2004; KHADRA, 2005; JAKSE e colaboradores, 2007; LOPES e colaboradores, 2005; KIM e colaboradores, 2007; LOPES e colaboradores, 2007; PEREIRA e colaboradores, 2009; MALUF e colaboradores, 2010; PETRI e colaboradores, 2010; PRETTO, 2010). Tal fato acaba por desencorajar alguns estudos clínicos (OSTMAN e colaboradores, 2010; GARCIA-MORALES e colaboradores, 2012), pela dificuldade de manejo com o paciente, das inúmeras consultas, possibilidade de ausência ou desistência e um número amostral em geral pequeno para o curto prazo de tempo das pesquisas (Quadro 1). Assim sendo, o que se verifica é uma quantidade significativa de estudos em animais contra um número pequeno de estudos clínicos, no escopo do quadro apresentado, apenas um.

**Quadro1:** Tipo amostral em estudos pré-clínicos em comparação ao estudo clínico sobre a ação da LLLT sobre o reparo ósseo perimplantar com os respectivos protocolos terapêuticos: (+) efeito positivo da LLLT sobre uma variável / (++) efeito positivo da LLLT sobre mais de uma variável / (-) sem diferença significativa do efeito da LLLT sobre as variáveis.

Autor/Ano	Tipo de pesquisa	Tipo amostral	'n'	Laser*	Dose total (J/cm <sup>2</sup> )	Efeito LLLT
Dörtbudak e cols., 2002	Pré-clínica	Babuínos	5	V	30	++
Khadra e cols., 2004	Pré-clínica	Coelho	12	IV	270	++
Lopes e cols., 2005	Pré-clínica	Coelho	14	IV	602	++

Jakse e cols., 2007	Pré-clínica	Ovelha	12	V	12	++
Kim e cols., 2007	Pré-clínica	Rato	20	IV	40.32	++
Lopes e cols., 2007	Pré-clínica	Coelho	14	IV	602	++
Pereira e cols., 2009	Pré-clínica	Coelho	12	IV	367.5	+
Campanha e cols., 2010	Pré-clínica	Coelho	30	IV	602	++
Maluf e cols., 2010	Pré-clínica	Rato	24	IV	48	++
Petri e cols., 2010	Pré-clínica	Células	-----	IV	6	++
Pinheiro e cols., 2012	Pré-clínica	Coelho	6	IV	602	++
Garcia-Morales e cols., 2012	Clínica	Humanos	8	IV	92.1	-

\*Laser: IV= Infravermelho / V= Vermelho

Fonte: Dados da Pesquisa.

## 2.1 Laser no Reparo Ósseo Perimplantar – estudos pré-clínicos

O reparo ósseo em seres humanos requer de 4 a 6 meses para que o osso possa se tornar maduro e resistente, para então ser capaz de receber carga sem comprometer a estabilidade do implante (BRANEMARK e colaboradores, 1969; CARLSSON e colaboradores, 1986). Alguns autores indicam que a maturação óssea ao redor dos implantes se dá devido ao aumento da deposição de Hidroxiapatita de Cálcio pelos osteoblastos irradiados pela terapia a laser de baixa potência (LOPES e colaboradores, 2007).

Na avaliação da incorporação da hidroxiapatita de cálcio e da qualidade do tecido ósseo ao redor de implantes dentários em tíbias de 14 coelhos após aplicação

da LLLT (830nm), Pinheiro e Gerbi (2006) verificaram através da espectroscopia Raman ou microscopia eletrônica de varredura (MEV) que o laser infravermelho melhorou o reparo ósseo. A razão pelo qual o efeito do laser foi detectado somente aos 30 dias após a cirurgia, segundo os autores, deveu-se ao fato que, durante os estágios iniciais de reparo ósseo, o componente celular é mais proeminente e mais propenso a ser afetado pela fotobiomodulação. Posteriormente, a matriz óssea se torna o principal componente do tecido reparado. Dessa forma, a frequência de aplicação de laser é importante, pois a irradiação é realizada durante a fase de cicatrização celular, levando ao aumento do número de osteoblastos. Esta elevação do número de células resulta em uma maior deposição de matriz óssea, que mais tarde, ao ter a hidroxiapatita de cálcio incorporada, caracteriza a maturação do osso ao redor do implante.

Khadra (2005) realizou um trabalho baseado em uma série de investigações *in vivo* e *in vitro* na tentativa de avaliar se após a aplicação da LLLT haveria maior interação celular aos tecidos adjacentes. Para tal, realizou cinco estudos: o primeiro buscou avaliar o efeito da LLLT sobre o reparo ósseo de defeitos ósseos criados em calvária de ratos, o qual trouxe como resultados que a LLLT acelera o metabolismo, como também, a fase de mineralização durante o reparo ósseo. Baseado nas evidências do primeiro estudo, um segundo trabalho foi realizado buscando-se resolver a hipótese de que a LLLT poderia facilitar a interação entre implante e osso. Assim, implantes osseointegráveis foram inseridos em tíbias de coelhos e a irradiação laser fora oferecida. Como resultado, verificou-se que a LLLT aumenta a interação entre implante e osso após um período de oito semanas de osseointegração. No terceiro e quarto estudos, foram realizados modelos *in vitro* comparando-se doses múltiplas ou únicas de 1 a 3 J/cm<sup>2</sup> de LLLT (GaAIs), buscando-se avaliar qual a dose ideal a ser oferecida aos tecidos no intuito de se aumentar a atividade celular, como também, a sua proliferação e adesão celular sobre implantes dentários. Como resultado, obteve-se que tanto as doses múltiplas (1 a 3 J/cm<sup>2</sup>) quanto uma dose única (3 J/cm<sup>2</sup>) de laser de baixa potência podem ativar essas propriedades. Um quinto estudo foi realizado, onde o objetivo fora avaliar se a LLLT permitiria a ativação de células osteoblásticas derivadas de uma cultura de osso alveolar humano em direção a amostras de implante de titânio. Concluiu-se, pois, que nas primeiras 96 horas após aplicação do LLLT, a resposta

celular era dose-dependente. Após a avaliação dessa série de estudos, presume-se que a LLLT pode promover a aceleração na mineralização e no reparo ósseo, promovendo um benefício clínico-histológico na promoção da neoformação óssea em defeitos previamente criados. Também, esta tecnologia pode ser utilizada como tratamento adicional para a aceleração no reparo ósseo perimplantar, sendo que ela pode modular os passos iniciais do crescimento e proliferação celular sobre a superfície de titânio. Doses múltiplas de LLLT podem aumentar a sua eficácia, acelerando a adesão e o comportamento de fibroblastos em direção à superfície do implante. O uso de doses de LLLT entre 1 a 3 J/cm<sup>2</sup> pode modular a atividade celular quanto a interação com o implante, facilitando a sua osseointegração e aumentando as chances de sucesso do tratamento.

Na investigação do efeito da LLLT sobre os osteócitos e a reabsorção óssea da região perimplantar em 30 ratos da raça *Holtzman*, Pretel e colaboradores (2007) observaram maior viabilidade do osteócito quando da irradiação imediatamente após a colocação do implante, tendo efeitos positivos sobre a osseointegração dos mesmos. A taxa de reabsorção óssea normalmente não é afetada pela laserterapia, sugerindo que o tecido ósseo vital está em maior quantidade nas áreas irradiadas, esperando-se um reparo ósseo perimplantar mais acelerado com o uso da LLLT.

Em investigação do potencial da LLLT na interação entre osso e implante, Lopes e colaboradores (2007) demonstraram em 14 coelhos da raça *New Zealand* que a ação do laser aumentou a resistência mecânica da interface entre o implante e o osso após um período de reparo em aproximadamente oito semanas. Nesse caso, a laserterapia promoveu o reparo e a mineralização óssea, sendo clinicamente benéfica na promoção da neoformação óssea em defeitos do esqueleto, podendo ser utilizada como tratamento adicional na aceleração do reparo ósseo perimplantar. Verificaram, também, que o uso do laser com doses entre 1,5 e 3 J/cm<sup>2</sup> podem biomodular a atividade celular interagindo com o implante, melhorando assim, a cicatrização do tecido e aumentando as chances de sucesso da osseointegração do implante.

Jakse e colaboradores (2007) encontraram um efeito positivo com a utilização da laserterapia de baixa intensidade sobre a osseointegração de implantes em maxila, observando-se uma maior superfície de contato entre osso e implante. No

entanto, o mesmo estudo demonstrou que, após a enxertia óssea da crista ilíaca em seio maxilar bilateral de ovelhas, a LLLT não apresentou resultados significativos sobre integração do enxerto.

Pereira e colaboradores (2009) investigaram o efeito da irradiação por LLLT no processo de reparo ósseo ao redor de implantes inseridos em tíbias de 12 coelhos. Avaliaram a superfície de contato entre osso e implante (BIC – “*Bone Implant Contact*”) e a área preenchida por osso (BA – “*Bone Area*”) na região perimplantar. Através da avaliação das lâminas histológicas coradas com azul de toluidina, esses autores concluíram que a laserterapia aumentou a superfície de contato entre osso e implante comparando-se ao grupo controle, porém a área total de osso obtido foi semelhante entre todos os grupos.

Jakse e colaboradores (2007) realizaram um trabalho buscando avaliar o processo de osseointegração quando da fixação de implantes de titânio após enxertia óssea em seios maxilares de ovelhas. Os autores notaram que após a aplicação da LLLT (75 mW, 680 nm, 3-4 J/cm<sup>2</sup>), em 16 semanas de pós-operatório, houve melhora no BIC. As mesmas considerações podem ser atribuídas aos resultados de um trabalho realizado por Pereira e colaboradores (2009), na qual realizaram a inserção de implantes em tíbias de coelhos, avaliando o efeito da laserterapia sobre o processo de reparo ósseo perimplantar. Os autores verificaram através da análise topográfica com MEV, rugosidades homogêneas das amostras sugerindo que a maturação óssea fora processada mais rapidamente no osso irradiado. Da mesma forma, a avaliação esteriológica sugeriu maior contato entre osso e implante no grupo irradiado.

Em um trabalho realizado por Kim e colaboradores (2007), os autores buscaram investigar a ação do laser sobre fatores locais e gerais que interferem na proliferação, diferenciação e ativação dos osteoblastos e osteoclastos no processo de neoformação óssea. Entre os fatores analisados, estão a osteoprotegerina (OPG), o receptor do ativador de fator nuclear kB-ligante (RANKL) e o receptor do ativador de fator nuclear-kB (RANK). O RANKL é o responsável pelo processo de diferenciação do osteoclasto, estimula a sua atividade e promove a reabsorção óssea por meio da adesão desta célula ao tecido ósseo. O OPG combinado ao RANK impede a função do osteoclasto quando ligado ao precursor deste tipo

celular. Dessa forma, os autores realizaram um experimento em 20 ratos *Sprague-Dawley* com a instalação de pequenos implantes de 2.0mm X 3.5mm na tíbia desses animais, onde dos dois grupos estudados, apenas um recebeu a irradiação com laser (AsGaAl, 830 nm, 96 mW e dose total de 40.32 J). Após a realização da imunohistoquímica, os autores concluíram que quando da aplicação do protocolo de laserterapia, a expressão de OPG, RANKL e RANK apresentou maior expansão metabólica na atividade óssea e um aumento na atividade das células do tecido ósseo, representando maior ação na neoformação óssea do que no grupo controle.

Outro problema pesquisado na literatura é o efeito da laserterapia no reparo perimplantar em osso baixa qualidade, ou em implantes de baixa estabilidade inicial (PRETTO, 2004; CAMPANHA e colaboradores; MALUF e colaboradores, 2010). Em um estudo realizado por Campanha e colaboradores (2010) em 30 coelhos da raça *New Zealand*, onde os autores avaliaram o efeito do laser infravermelho sobre os valores de torque de remoção de implantes com baixa estabilidade inicial, puderam verificar que a laserterapia promoveu a osseointegração de implantes com estabilidade inicial pobre, especialmente quando aplicada nos estágios primários do reparo ósseo, este sendo nas duas primeiras semanas de pós-operatório.

Resultado semelhante foi apresentado em um estudo realizado por Maluf e colaboradores (2010), onde foi feita a instalação de implantes em tíbia de 24 ratos da linhagem *Wistar*. Os implantes foram inseridos com um travamento inicial pobre e os animais do grupo experimental foram submetidos a seis sessões de laserterapia de baixa intensidade, através de laser infra-vermelho (795 nm) no pós-operatório. Após 14 dias do procedimento cirúrgico, os animais foram mortos e submetidos a avaliação de torque de remoção dos implantes das peças ósseas. Dessa forma, pode-se verificar um efeito positivo no maior imbricamento entre osso e implante no grupo irradiado com laser.

## **2.2 Laser no Reparo Ósseo Perimplantar – estudos clínicos**

Em um ensaio clínico randomizado duplo-cego, realizado por Garcia-Morales e colaboradores (2012), oito pacientes foram selecionados para a colocação de

implantes osseointegráveis em cavidade bucal, devido a algumas ausências dentárias. O procedimento cirúrgico fora realizado por um cirurgião experiente, após adequado nivelamento, seguindo um protocolo estabelecido pelos autores. Todos os implantes apresentaram estabilidade primária boa, acima de 40N, sendo que, além disso, fora realizada mensuração através da análise de frequência de ressonância medida pelo quociente de estabilidade do implante (ISQ). O protocolo de laser utilizado (830nm, 86 mW e dose de energia de 92.1 J/cm<sup>2</sup>) foi feito através de 20 pontos pré-estabelecidos em torno do implante no lado experimental, sendo estes no pós-operatório imediato e a cada 40 horas durante 14 dias (7 sessões). O controle clínico foi realizado através de exames radiográficos periapicais e mensuração periódica do ISQ (10 dias, 3, 6, 9, 12 semanas). Segundo os resultados apresentados pelos autores, não houve diferença significativa entre o lado controle e o lado experimental (estudo em boca dividida) quanto aos valores de ISQ.

### **2.3 MEV**

Com o avanço tecnológico na Odontologia, em que se utilizam implantes dentários para ancoragem de próteses na reabilitação bucal, ou mesmo de estruturas faciais, há a necessidade de constante avaliação dos aspectos biológicos da união entre o osso e os biomateriais (OTULAKOWSKA e colaboradores, 2006; LOPES e colaboradores, 2007; PEREIRA e colaboradores, 2009; CAMPANHA e colaboradores, 2010; GALLI e colaboradores, 2012). A Microscopia Eletrônica de Varredura é um recurso tecnológico que permite observar a morfologia superficial do biomaterial e dos tecidos. Obtêm-se, assim, informações quantitativas e/ou qualitativas para avaliação desta modalidade terapêutica (OTULAKOWSKA e colaboradores, 2006; DEDAVID e colaboradores, 2007).

A MEV ainda é capaz de fornecer informações rápidas sobre a identificação de elementos químicos de amostras sólidas. Os aparelhos mais atuais possibilitam magnificação de até 300.000 vezes, conservando a profundidade de campo compatível com a observação de superfícies rugosas, assim como, uma alta definição de imagem no espectro de 1 a 5 nanômetros. O método EDS (Espectrometria de Raios-X por Dispersão de Energia – ‘Energy-Disperse X-Ray Spectroscopy’) disponível em alguns dispositivos permite identificar a composição

química das substâncias presentes na superfície, em pontos determinados das amostras (DEDAVID e colaboradores, 2007).

A MEV pode ser utilizada em praticamente todas as especialidades da Odontologia que visam a avaliação por varredura da superfície de componentes orgânicos ou inorgânicos. Possibilita, ainda, a avaliação dos componentes químicos desses materiais. Verificam-se, hoje, pesquisas nas áreas de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais (LOPES e colaboradores, 2007), Ortodontia (GALLI e colaboradores, 2012), Materiais Dentários (OTULAKOWSKA e colaboradores, 2006) e Implantodontia (VAQUERO-AGUILAR e colaboradores, 2012) que utilizam esta tecnologia. Suas vantagens incluem obtenção de imagens em escala nanométrica, a possibilidade de avaliação química, bem como capacidade elevada de magnificação. Além disso, permite a avaliação da superfície de materiais tridimensionais nas mais diversas posições, diferentemente, por exemplo, de um microscópio eletrônico de transmissão ou microscópio óptico, cuja avaliação dos objetos é realizada em apenas duas dimensões (DEDAVID e colaboradores, 2007).

A MEV possibilita a avaliação da superfície amostral em dois tipos básicos de visualização, o SE (elétrons secundários – ‘*Secondary Electrons*’) e o BSE (elétrons retroespalhados – ‘*Backscattering electrons*’). Na imagem em SE, através de elétrons resultantes de baixa energia (<50 eV), formam-se imagens com alta resolução (3 a 5 nm), sendo que o contraste é dado, sobretudo, pelo relevo da amostra. Este é o principal modo de formação de imagem no MEV, possibilitando o aumento de magnificação sem ocorrer perda na qualidade visual. Já no modo BSE, os elétrons retroespalhados de alta energia, por serem resultantes de uma simples colisão elástica, provêm de camadas mais superficiais da amostra. Logo, as informações de profundidade contidas na imagem serão poucas se comparadas com a profundidade de penetração do feixe. A imagem gerada por esses elétrons fornece diferentes informações em relação ao contraste que apresentam: além de uma imagem topográfica (contraste em função do relevo) também se obtém uma imagem de composição - contraste em função do número atômico dos elementos presentes na amostra (DEDAVID e colaboradores, 2007).

## 2.4 Esteriologia com Azul de Toluidina (*BIC* e *BA*)

Uma das diversas formas de avaliação dos trabalhos pré-clínicos é por meio da análise de interação entre o tecido ósseo e o implante. O BIC ou interface de contato entre osso e implante, possibilita a aferição numérica da quantidade de contato entre essas duas estruturas, possibilitando a comparação entre os grupos quanto a osseointegração dos implantes. Da mesma forma, o BA ou volume de osso neoformado em uma determinada área, permite quantificar se em um determinado espaço, aquele tecido apresenta-se em maior ou menor quantidade entre os grupos, também avaliando, a osseointegração.

Pereira e colaboradores (2009) realizaram um trabalho em 12 coelhos adultos, onde inseriram, bilateralmente, 24 implantes osseointegráveis e promoveram a laserterapia de baixa intensidade no lado experimental. Realizaram, pois, a esterilogia corando as lâminas com azul de toluidina, avaliando *BIC* e *BA* nas três espiras mais cervicais. Os autores verificaram que a laserterapia aumentou o contato entre osso e implante, mas não teve uma resposta significativa quanto ao volume de osso neoformado.

## 2 OBJETIVOS

---

Avaliar as alterações no processo de reparo perimplantar em alvéolo do incisivo inferior de coelhos após extração seguida da inserção imediata de um implante osseointegrável, irradiadas ou não com laser de baixa intensidade, em diferentes parâmetros. A avaliação ocorreu por meio de:

- a) análise esteriológica da interação entre osso e implante, para verificar de forma quantitativa o contato ósseo-implante (BIC) e a área de neoformação óssea (BA).
- b) análise da superfície amostral por MEV, medindo de forma quantitativa o contato ósseo-implante (BIC) e a área de neoformação óssea (BA).
- c) análise por espectrometria de raios X por dispersão de energia (EDS), verificando a concentração de cálcio na zona de contato entre osso e implante.

### **3 METODOLOGIA**

---

#### **3.1 Local de origem**

- Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)  
Faculdade de Odontologia  
Programa de Pós-graduação em Odontologia (PPGODO)  
Mestrado em Clínica Odontológica / Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais

#### **3.2 Locais de realização**

- Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)  
Unidade de Experimentação Animal (UEA)  
Unidade de Patologia Experimental (UPE)
- Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)  
Centro de Microscopia e Microanálises (CEMM)
- Universidade de São Paulo (USP)  
Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB)  
Laboratório de Pesquisa I do Centro Integrado em Pesquisa-I (CIP-I)

#### **3.3 Delineamento**

Os autores apresentam um estudo experimental, controlado, em animais, cego para algumas das variáveis.

### **3.4 Respaldo Ético**

Utilizaram-se amostras da pesquisa de Doutorado do Cirurgião-dentista Luciano Mayer, cujo projeto foi apresentado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, recebendo em 21 de dezembro de 2011 a aprovação através do protocolo nº 110449 (ANEXO I). Da mesma forma, o projeto que originou esta dissertação foi aprovado conforme o CEUA do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, através do protocolo nº 120112 (ANEXO II) em 24 de maio de 2012.

Foram cumpridos 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, respeitando-se também os Princípios Éticos na Pesquisa Experimental, determinados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

### **3.5 Paradigma**

Este estudo pré-clínico foi desenvolvido dentro do paradigma tradicional, quantitativo, no delineamento experimental verdadeiro, com as amostras selecionadas de forma aleatória.

### **3.6 Variáveis**

#### **3.6.1 Dependentes**

- a) Contato entre osso e implante
- b) área de neoformação óssea entre as espiras
- c) concentração de íons cálcio na interface entre osso e implante

### 3.6.2 Independentes

- a) aplicação ou não do laser
- b) dosimetria do laser

## 3.7 Definição Conceitual

### 3.7.1 Laser de Baixa Potência (GaAIAs)

A palavra 'LASER' é um acrônimo para "*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*" ou amplificação da luz por emissão estimulada de radiação. Constitui uma forma de radiação não-ionizante, altamente concentrada, que, em contato com os diferentes tecidos, resulta em efeitos fototérmicos, fotoquímicos e não lineares. A luz laser pode ser descrita como uma onda eletromagnética, apresentando algumas características ondulatórias que a identificam. Uma das características importantes do laser é o comprimento de onda, traduzida pela distância entre dois picos consecutivos de sua trajetória, entidade que define a cor da luz. Tal propriedade associada à frequência e à amplitude define a luz dentro do espectro completo de ondas eletromagnéticas.

O laser em baixa intensidade como uma fonte de energia muito intensa e monocromática, após absorvido, pode induzir a uma resposta tecidual. Através de aplicações em doses adequadas, com comprimentos de onda ajustados aos sítios celulares previamente determinados, pode-se observar que parte dessa luz é refletida, parte é transmitida através do tecido, sem atenuação, resultando em algum remanescente que é absorvido pelos componentes teciduais ou espalhado dentro do próprio tecido, podendo ocasionar interações em locais distantes da região de aparente propagação da luz.

### 3.7.2 Osseointegração

O conceito de osseointegração é definido como o contato direto entre o osso e a superfície do titânio (implante), sem a interposição de tecido mole, sendo também denominada de anquilose funcional. Esse processo deve gerar um contato rígido e assintomático entre ambas as estruturas, propriedades que serão mantidas com o estabelecimento de função mastigatória sobre as próteses implanto-suportadas. Sabe-se, que para maiores chances de sucesso da osseointegração, um dos pré-requisitos é uma estabilidade inicial adequada (BRANEMARK e colaboradores, 1969; BRANEMÅRK e colaboradores 1977; BRANEMÅRK e colaboradores, 1998).

### 3.8 Configuração da Amostra

A amostra desta pesquisa constituiu-se de 32 coelhos (justificativa do cálculo do tamanho da amostra – ANEXO III) da ordem *Lagomorpha*, gênero *Oryctolagus*, espécie *Oryctolagus cuniculus*, raça Nova Zelândia, variedade branco, machos, pesando entre 3 e 4 kg e com idade compatível ao peso, clinicamente sadios, selecionados aleatoriamente, provenientes da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – UFRGS.

As amostras foram utilizadas em conjunto com a pesquisa do aluno de doutorado do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da PUCRS, Cirurgião-dentista Luciano Mayer, cujo projeto foi aprovado no CEUA/HCPA através do nº 110449, coordenado pela Profa. Dra. Deise Ponzoni. Também em conjunto com o mestrando Fabrício Poletto Massotti, da Faculdade de Odontologia da UFRGS.

### 3.9 Distribuição dos Grupos

Os animais foram identificados e distribuídos de forma aleatória em quatro grupos distintos, sendo um grupo controle (C) e três grupos experimentais EI, EII, EIII, diferenciados pela dosimetria energética da laserterapia.

### 3.10 Instalações

A manutenção dos animais, os procedimentos cirúrgicos, as aplicações do laser de baixa intensidade, bem como todos os procedimentos que envolveram os animais foram realizados na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, através da supervisão direta da Médica Veterinária Dra. Fabíola Schons Meyer (CRMV-9721), responsável técnica pela UEA.

Todos os animais passaram, previamente à cirurgia, por um período de cinco dias para ambientação na UEA. Os coelhos permaneceram em gaiolas individuais suspensas, evitando o contato direto com fezes e urina, durante todo o período do experimento (Figura 1).

**Figura 1-** Unidade de Experimentação animal



Fonte: Dados da Pesquisa.

Os animais foram alimentados com dieta sólida<sup>1</sup> e a água fornecida *ad libitum*. As instalações eram climatizadas, mantendo-os sob condições normais de iluminação, umidade e temperatura. Todas as gaiolas foram devidamente etiquetadas durante todo o período do experimento, conforme o grupo a que pertenciam os animais. Além disso, todos os animais receberam uma identificação na forma de brinco<sup>2</sup> colocado na orelha esquerda, identificados por cor de acordo com o grupo a que pertenciam e numerados de 1 a 8 (Figura 2).

**Figura 2-** Identificação dos animais através de brinco com a marcação do grupo e do número do animal.



Fonte: Dados da Pesquisa.

### 3.11 Procedimento Cirúrgico

A intervenção cirúrgica foi sempre realizada pelo mesmo pesquisador, nivelado antecipadamente, com o objetivo de padronizar o procedimento cirúrgico. O nivelamento fora realizada previamente em um estudo-piloto com quatro coelhos.

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no bloco cirúrgico da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (UEA/HCPA), sendo este ambiente separado do ambiente de criação. Assim sendo, os animais não

<sup>1</sup> Linha Natural, Purina®, Nestlé Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil.

<sup>2</sup> Agrobriinco® Produtos Agropecuários Ltda., Porto Alegre, RS, Brasil.

ficaram expostos ou sob tensão de ruídos, odores e até mesmo a visão dos procedimentos que foram realizados.

Todas as etapas dos procedimentos clínicos e anestésicos foram realizados por uma Médica Veterinária<sup>3</sup>, que acompanhou o pré-operatório, transoperatório e pós-operatório dos animais.

Logo após a aferição do peso, na sala de pré-anestesia, os 32 animais foram anestesiados por meio de injeção intramuscular de Dopalen® (Cloridrato de Ketamina)<sup>4</sup>, na dose de 40 mg/kg de peso e de Cloridrato de Xilasina<sup>5</sup>, 3 mg/kg de peso. Após dez minutos da indução anestésica, realizou-se a tricotomia da região submentoniana e a antissepsia da região do incisivo inferior esquerdo com digluconato de clorexidina a 2%<sup>6</sup>. Posteriormente, foi realizada, na região do alvéolo, uma infiltração de 0,5 ml de lidocaína a 2%<sup>7</sup> com epinefrina na proporção de 1:100.000 para anestesia e vasoconstrição local.

Procedeu-se, então, a sindesmotomia, a luxação e a exodontia do incisivo inferior esquerdo com o auxílio de um fórceps infantil nº 5<sup>8</sup> (Figura 3).

Após a exodontia, o alvéolo foi irrigado abundantemente com solução salina de soro fisiológico 0,9%<sup>9</sup> e a seguir preparado para colocação de um implante osseointegrado de 3,25mm de diâmetro por 11,5 mm de comprimento, cônicos, auto-rosqueáveis, com superfície Nanotite<sup>®10</sup>, comercialmente disponíveis e adquiridos especialmente para esta pesquisa junto a empresa Odontodis<sup>®11</sup>.

Toda sequência de fresagem (perfuração óssea com broca) foi realizada de forma gradativa, intermitente e precisa, seguindo a sequência de fresas preconizada pelo fabricante - Biomet 3i<sup>®</sup>, na velocidade de 1200 rpm e torque de 30 N/cm, usando um contra-ângulo redutor de 20:1, modelo *Koncept* da marca Kavo<sup>®</sup>,

---

<sup>3</sup> Dra. Fabíola Mayer CRMV-9721, Médica Veterinária da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

<sup>4</sup> Ketamin®, fabricado por Divisão Vetbrands Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>5</sup> Anasedan®, fabricado por Divisão Vetbrands Saúde Animal. São Paulo, SP, Brasil.

<sup>6</sup> FGM Produtos Odontológicos. Joinville, SC, Brasil.

<sup>7</sup> Probem Laboratório de Produtos Farmacêuticos e Odontológicos Ltda, Catanduva, SP, Brasil.

<sup>8</sup> Fórceps Odontológico Infantil nº5. EDLO S/A. Canoas, RS, Brasil.

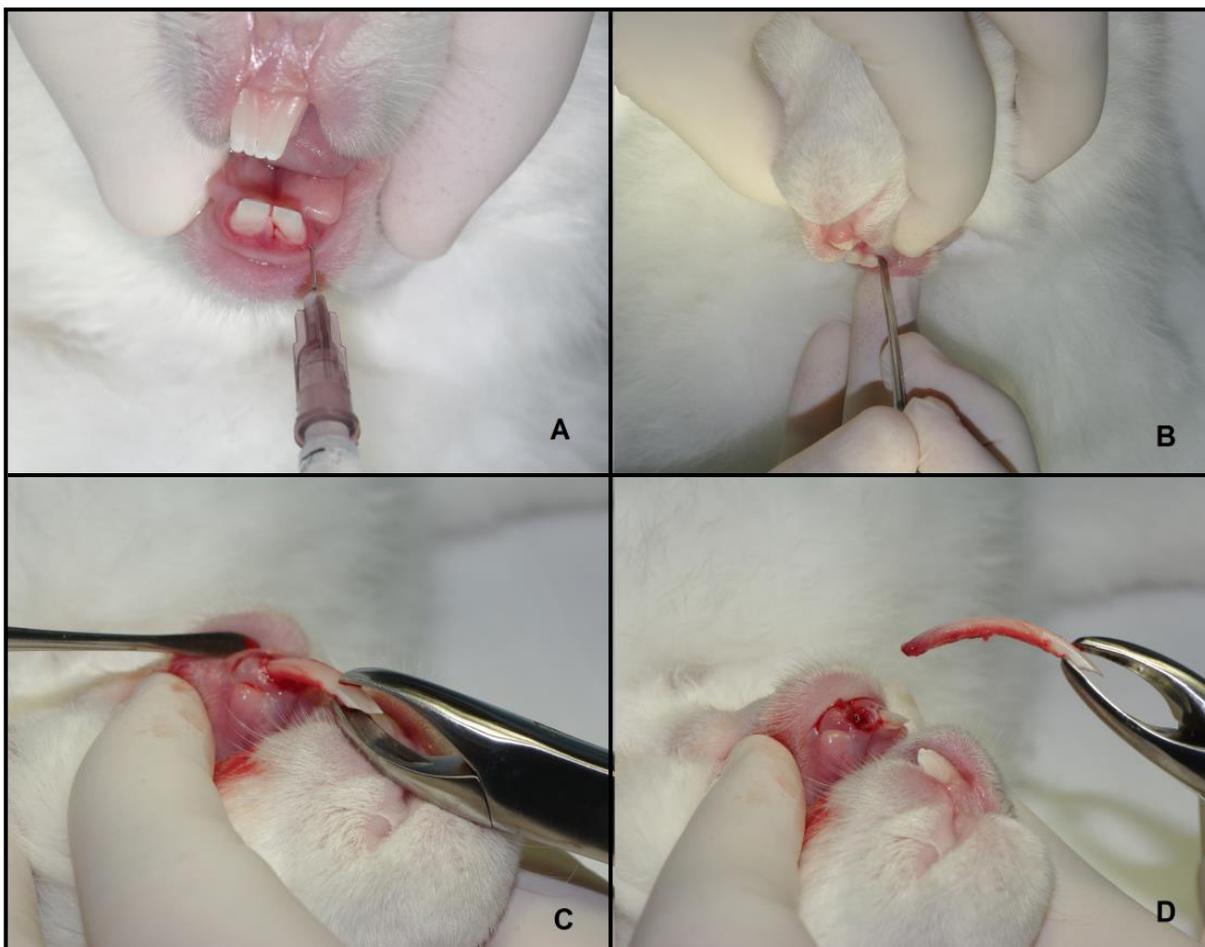
<sup>9</sup> Solução isotônica de Cloreto de Sódio a 0,9%, estéril, apirogênica. BAXTER Hospitalar Ltda., São Paulo, SP, Brasil.

<sup>10</sup> Implante Nanotite® - BIOMET3i - Riverside Drive, Palm Beach Gardens, FL, EUA.

<sup>11</sup> Odontodis® - Representante oficial de Biomet 3i para o Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

conectado ao motor elétrico digital Driller<sup>®</sup>, modelo BLM 600, com uma constante e intensa irrigação externa usando solução fisiológica estéril de cloreto de sódio a 0,9%, evitando o superaquecimento ósseo.

**Figura 3-** Procedimento cirúrgico de extração dentária do incisivo inferior esquerdo: A) infiltração anestésica com vasoconstritor; B) sindesmotomia; C) e D) luxação e extração do dente.



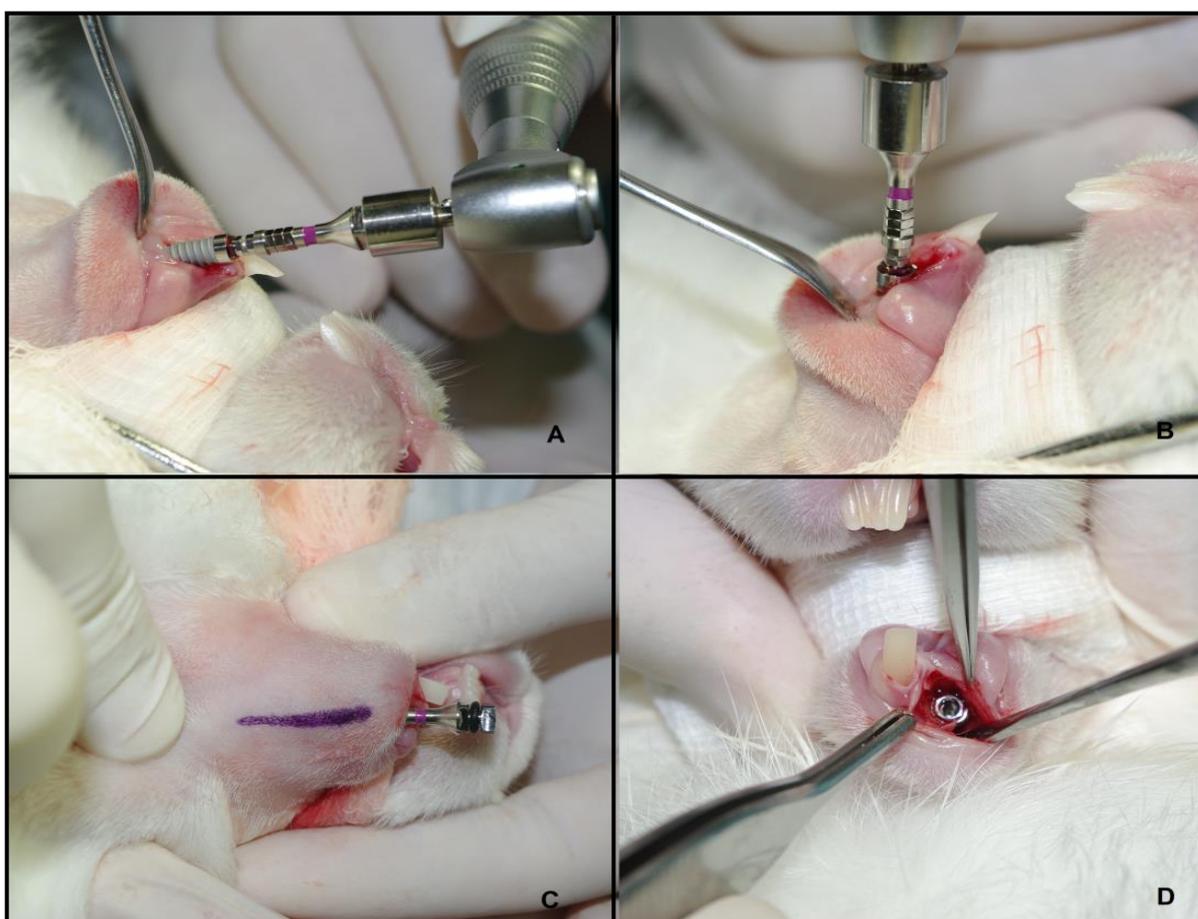
Fonte: Dados da Pesquisa.

A perfuração óssea foi realizada na região mais profunda do alvéolo utilizando a sequência de brocas do kit cirúrgico Biomet 3i<sup>®</sup>. Assim, todos os alvéolos foram preparados obedecendo-se à seguinte sequência (Figura 4):

- 1- fresa com ponta em forma de lança para marcação inicial da perfuração (*ACT<sup>®</sup> Pointed Starter Drill -ACTPSD*);
- 2- fresa com formato helicoidal de 2,0 mm de diâmetro (*2mm Twist Drill*) com penetração de 11,5mm (comprimento dos implantes);

- 3- fresa com formato cônico de 3,25 mm de diâmetro (*3.25mm Quad Shaping Drill - QSD3211*) com penetração de 11,5mm (comprimento dos implantes);
- 4- inserção do implante Nanotite® com 3,25 mm de diâmetro por 11,5mm de comprimento utilizando montador específico (*Handpiece Connector - MDR10*) para inserção com o contra-ângulo, na velocidade de 20 rpm e com o torque de inserção de 30N.

**Figura 4-** Procedimento cirúrgico de inserção de um implante osseointegrável: A) e B) inserção do implante imediatamente após a extração do incisivo inferior esquerdo até o travamento em 30 N; C) marcação com caneta dermatográfica na basilar mandibular do lado esquerdo de onde seria o longo eixo do implante para facilitar a irradiação medial e lateral com LLLT; D) demonstração da posição tridimensional do implante em relação às paredes ósseas medial e lateral, assim como, alveolar e basilar.



Fonte: Dados da Pesquisa.

O travamento inicial dos implantes foi padronizado de acordo com a programação do torque de inserção no motor elétrico digital Driller® em 30N e a

colocação dos mesmos com o contra-ângulo garantiu que todos tivessem o mesmo travamento no momento inicial.

Foi utilizado um conjunto de fresas para cada grupo (oito implantes), objetivando evitar o aquecimento ósseo devido ao desgaste das fresas, seguindo as recomendações do fabricante.

Finalmente, o leito cirúrgico foi suturado com um fio agulhado mononylon Ethicon<sup>12</sup> 4-0. A sutura foi removida após sete dias em todos os animais.

O procedimento foi repetido de forma idêntica para todos os coelhos: a região do alvéolo do incisivo inferior esquerdo recém-extraído recebeu um implante osseointegrado nanotexturizado medindo 3,25 x 11,5mm.

Todos os animais receberam imediatamente após o término dos procedimentos cirúrgicos a terapia medicamentosa composta de analgésico com Tramadol<sup>13</sup> (aplicado via intramuscular, 5 mg/kg, no pós-operatório imediato e uma segunda dose 24 horas após) e para o controle de possíveis infecções pós-operatórias foi utilizado Enrofloxacino<sup>14</sup> (aplicado via intramuscular, 5mg/kg, uma vez ao dia, durante três dias).

### 3.12 Irradiação com Laser

Os animais foram irradiados com laser GaAlAs<sup>15</sup> (Arseneto de Gálio e Alumínio), de diodo infravermelho com meio ativo, com comprimento de onda de 830nm, de forma pontual, com potência de 50mW, no modo de emissão contínua, a cada 48 horas, num total de sete sessões de aplicação, totalizando 13 dias de tempo total de tratamento (Tabela 1 e 2). A ponta do aparelho foi posicionada sobre a basilar da mandíbula, por via extra-bucal, perpendicular ao implante, em dois pontos – mesial e distal a este (Figura 5). Os animais não irradiados (grupo controle - C)

---

<sup>12</sup> Fio monofilamentado 4.0 (45cm), agulha Ethiplast E-16 com curvatura de 3/8 e comprimento de 1,65cm, fabricado pela Ethicon® - Johnson & Johnson.

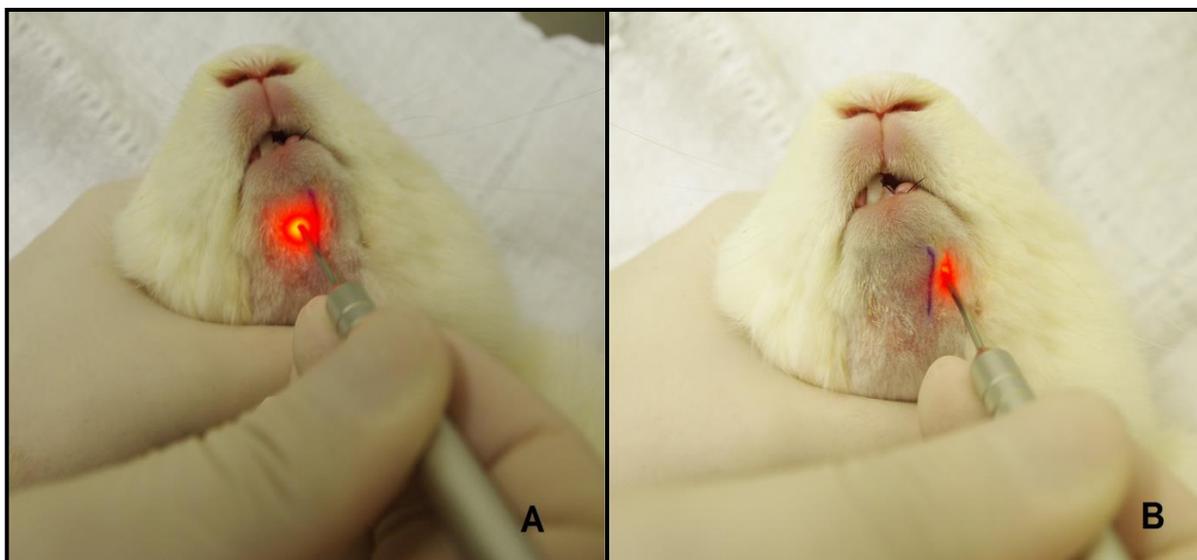
<sup>13</sup> Tramal® 50mg Injetável, produzido por União Química, Embu-Guaçu, SP, Brasil.

<sup>14</sup> Zelotril 10%, produzido por Agener União, Embu-Guaçu, SP, Brasil.

<sup>15</sup> Thera Lase®, DMC Equipamentos Ltda., São Carlos, SP, Brasil.

foram submetidos a uma simulação da irradiação com o aparelho desligado, passando pela mesma rotina dos animais irradiados.

**Figura 5-** Aplicação da LLLT: A) a medial e B) a lateral do longo eixo do implante sobre a basilar mandibular esquerda do coelho.



Fonte: Dados da Pesquisa.

De acordo com as regulamentações brasileiras, em especial a resolução CFO-82/2008 de 25 de setembro de 2008, que regulamenta o uso da laserterapia pelo Cirurgião-dentista, 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.

**Tabela 1:** caracterização dos grupos.

Grupo	Características	Tamanho
Grupo C	controle (exodontia + implante <b>sem</b> laser)	<b>8 animais</b>
Grupo EI	exodontia + implante + laser (10J/cm <sup>2</sup> )	<b>8 animais</b>
Grupo EII	exodontia + implante + laser (5J/cm <sup>2</sup> )	<b>8 animais</b>
Grupo EIII	exodontia + implante + laser (20J/cm <sup>2</sup> )	<b>8 animais</b>

Fonte: Dados da Pesquisa.

Para padronizar os experimentos, os animais do grupo C, EI, EII e EIII foram submetidos ao procedimento cirúrgico de exodontia do incisivo inferior esquerdo e colocação imediata de um implante osseointegrável no respectivo alvéolo, criando uma condição inicial de similaridade entre os quatro grupos.

**Tabela 2:** Parâmetros do laser

PARÂMETROS	C	EI	EII	EIII
Tipo de luz laser	–	GaAIAs	GaAIAs	GaAIAs
Potência (mW)	–	50	50	50
Comprimento de onda ( $\eta\text{m}$ )	–	830	830	830
Pulso	–	contínuo	contínuo	contínuo
Pontos de irradiação	0	2	2	2
Nº de aplicações por ponto	0	1	1	1
Energia por ponto ( $\text{J}/\text{cm}^2$ )	0	5	2.5	10
Densidade total de energia por sessão ( $\text{J}/\text{cm}^2$ )	0	10	5	20
Tempo de irradiação por ponto (segundos)	0	101	51	201
Dose total ( $\text{J}/\text{cm}^2$ ) em 2 sessões	0	70	35	140

Fonte: Dados da Pesquisa.

### 3.12.1 Grupo Experimental EI

Este grupo recebeu irradiação laser por um tempo de um minuto e 41 segundos, ajustado automaticamente pelo aparelho após a determinação dos demais parâmetros, sendo que as doses pontuais foram de  $5 \text{ J}/\text{cm}^2$ . A dose total por sessão foi de  $10 \text{ J}/\text{cm}^2$ . A irradiação foi realizada a cada 48 horas, num total de sete sessões de aplicação, totalizando  $70 \text{ J}/\text{cm}^2$  (Tabela 3).

### 3.12.2 Grupo Experimental EII

Os animais pertencentes ao grupo EII receberam doses pontuais de 2,5 J/cm<sup>2</sup>, correspondendo a um tempo de aplicação de 51 segundos. A dose total por sessão foi de 5 J/cm<sup>2</sup>. A irradiação foi realizada a cada 48 horas, num total de sete sessões de aplicação, totalizando 35 J/cm<sup>2</sup>.

### 3.12.3 Grupo Experimental EIII

Os animais deste grupo receberam irradiação a laser por um tempo de três minutos e 21 segundos, com doses pontuais de 10 J/cm<sup>2</sup>. A dose total de laser por sessão foi de 20J/cm<sup>2</sup>. A irradiação foi realizada a cada 48 horas, num total de sete sessões de aplicação, totalizando 140 J/cm<sup>2</sup>.

**Tabela 3:** Protocolo de irradiação com laser AsGaAl (doses por sessão e por grupo).

GRUPO	TEMPO POR SESSÃO	DOSE POR SESSÃO
C	00:00:00	0J/cm <sup>2</sup>
EI	00:01:41	10J/cm <sup>2</sup>
EII	00:00:51	5J/cm <sup>2</sup>
EIII	00:03:21	20J/cm <sup>2</sup>

Fonte: Dados da Pesquisa.

## 3.13 Esteriologia

Quarenta e cinco dias após o procedimento cirúrgico e 30 dias após a última aplicação da LLLT, os animais receberam sedação (mesmo protocolo utilizado na etapa cirúrgica) por meio de sobredose anestésica de Propofol<sup>16</sup> na dose de 1mg/kg,

<sup>16</sup> Lipuro 1% 10 mg/ml. Laboratórios Braun SA, São Gonçalo, Rio de Janeiro, Brasil.

seguida da injeção de Cloreto de Potássio<sup>17</sup> 10%, na dose de 1ml/kg, provocando morte por parada cardíaca.

Após a morte dos animais, a mandíbula foi ressecada totalmente e dispensadas em potes com solução de Formol 10% neutro e tamponado durante um período de 72 horas, onde, posteriormente, fez-se o processamento e o preparo das amostras para análise por MEV (08 amostras) e esterilogia (24 amostras).

Assim, as 32 peças foram seccionadas na região de sínfise mandibular, entre o incisivo central direito e o implante osseointegrável inserido à esquerda, permitindo que se obtivessem uma hemi-mandíbula direita e uma hemi-mandíbula esquerda. Na hemi-mandíbula do lado esquerdo, onde foi instalado o implante osseointegrável, realizou-se um segundo corte com finalidade de se obter apenas a área óssea associada ao implante. Para tal, realizou-se uma osteotomia com um disco de aço diamantado<sup>18</sup> para peça reta em baixa rotação, sob irrigação constante com água para injeção, onde se obteve um corte ósseo padronizado exatamente à distal do primeiro molar inferior esquerdo daquela hemi-mandíbula, assegurando a manutenção total do implante em meio ao tecido ósseo (Figuras 6, 7 e 8).

**Figura 6-** Ressecção total da mandíbula dos coelhos, fixação por 72 horas em formol 10% neutro e tamponado e remoção total dos tecidos circunjacentes ao tecido ósseo.

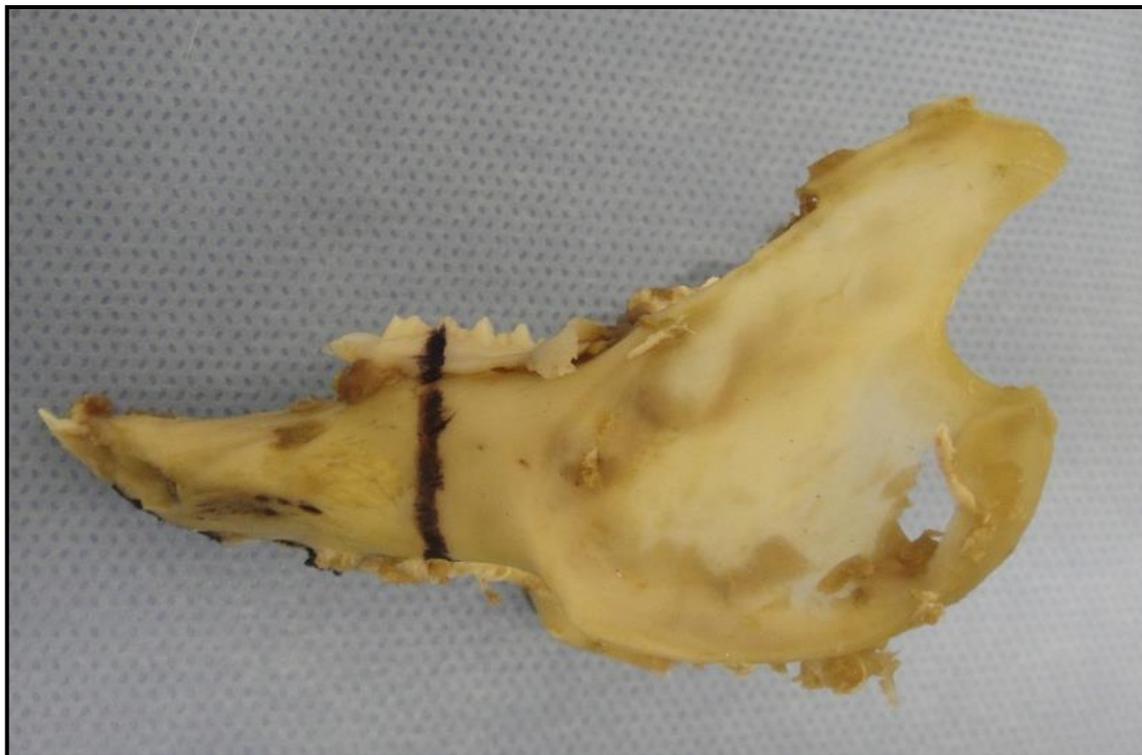


Fonte: Dados da Pesquisa.

<sup>17</sup> KCl 10%. Isofarma Industrial Farmacêutica Ltda. Precabura Eusébio, Ceará, Brasil.

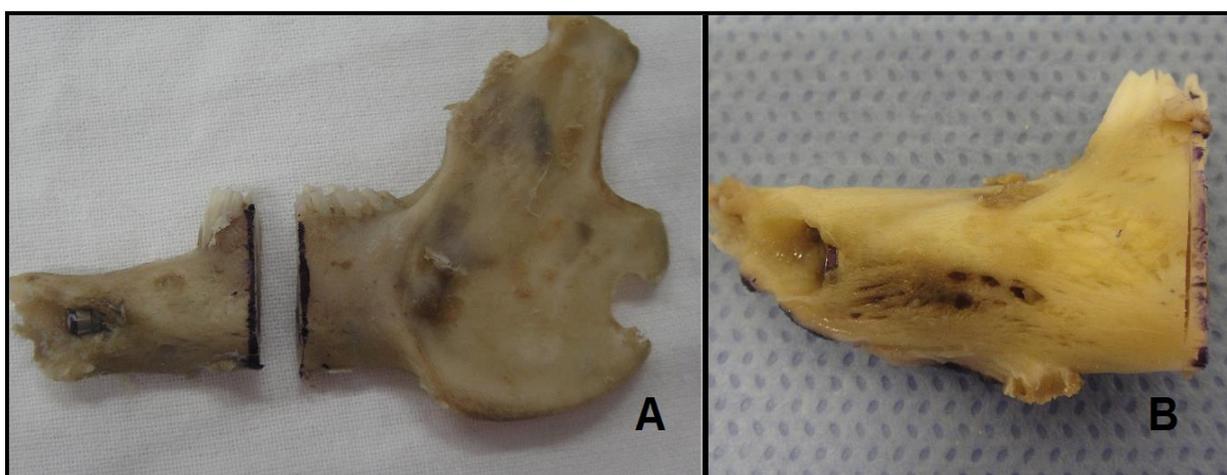
<sup>18</sup> Disco diamantado, 45 mm, Galaxy™ Diamond Disc, City of Commerce, CA, EUA.

**Figura 7-** Demarcação das amostras para osteotomia. Realizou-se na região distal ao primeiro molar esquerdo da amostra.



Fonte: Dados da Pesquisa.

**Figura 8-** Osteotomia da mandíbula: A) todas as amostras foram seccionadas na distal do primeiro molar; B) Manutenção do implante osseointegrável completamente recoberto por tecido ósseo.



Fonte: Dados da Pesquisa.

A seguir, 24 peças foram desidratadas em concentrações sucessivas de álcool (70%, 80%, 90% e 100%), recebendo o seguinte preparo conforme protocolo previamente estabelecidos (ARAUJO, STANCARI, ARAUJO, 2012):

- 1º banho – álcool 70% durante 7 dias;
- 2º banho – álcool 80% durante 7 dias;
- 3º banho – álcool 90% durante 7 dias;
- 4º banho – álcool absoluto durante 7 dias.

Posteriormente aos passos iniciais, procedeu-se a infiltração da resina LR White médium grade<sup>19</sup> colocando a amostra completamente embebida pela solução em fracos de filme fotográfico circulares com dimensões de 50x35 mm, sendo:

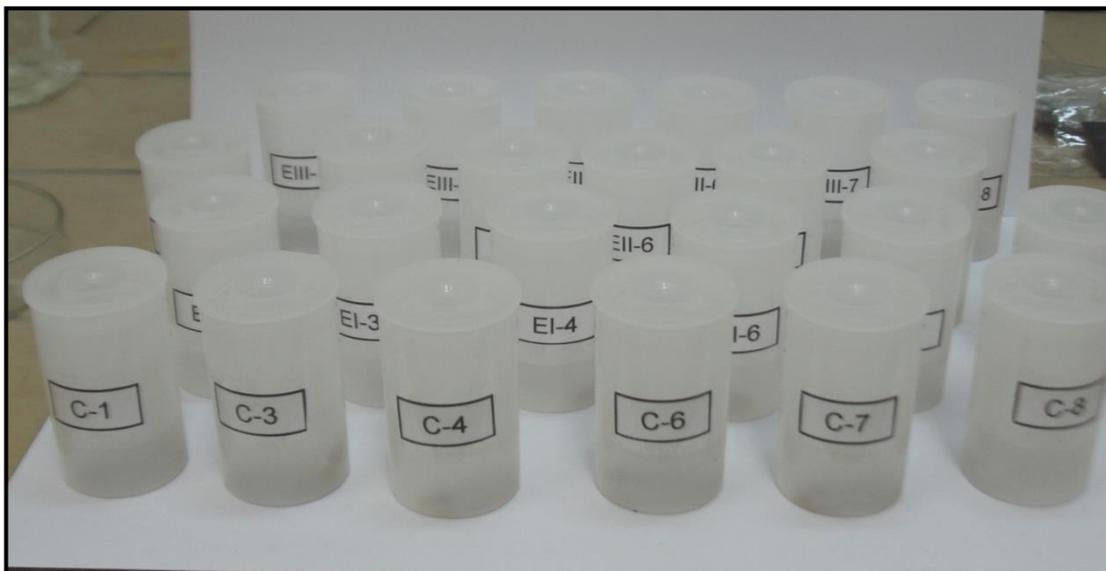
- 1º banho – 50% de álcool absoluto com 50% da mistura da resina durante 7 dias;
- 2º banho – 30% de álcool absoluto com 70% da mistura da resina durante 7 dias;
- 3º banho – 10% de álcool absoluto com 90% da mistura da resina durante 7 dias;
- 4º banho – 100% da mistura da resina durante 7 dias (Figura 9).
- Termopolimerização da resina em forno<sup>20</sup> convencional, a 64° Celsius, por um período de 24 horas ininterruptas (Figura 10).

---

<sup>19</sup> LR White Embedding Resin Kit – Medium Grade. EMSscience, Hatfield, Filadélfia, Estados Unidos.

<sup>20</sup> Forno Diplomata Fischer®, Brusque, SC, Brasil

**Figura 9-** Desidratação das peças: manutenção das 24 amostras imersas em solução de álcool e resina LR White.



Fonte: Dados da Pesquisa.

**Figura 10-** Polimerização das amostras: A) Acondicionamento das peças ósseas em frascos específicos e imersão em 100% de resina LR White; B) Termopolimerização em forno convencional por 24 horas a 60°C.



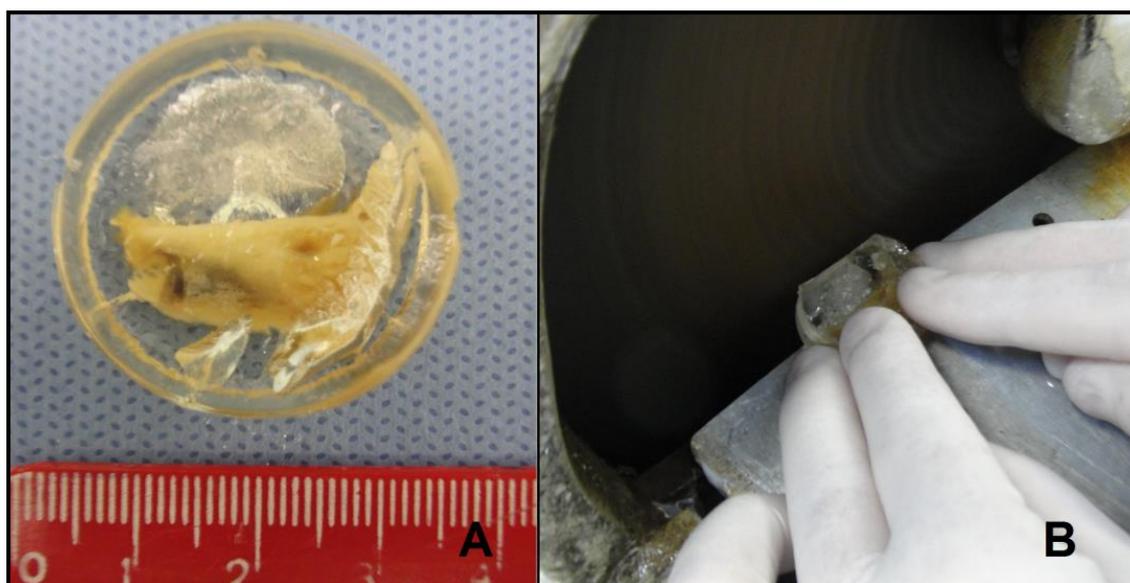
Fonte: Dados da Pesquisa.

Antes do corte das amostras, realizou-se um desgaste em torno de toda a peça em um recortador de gesso<sup>21</sup>, levando-a do formato circular para o quadro. Também, almejou-se a quase exposição da porção mais cervical do implante até que se

<sup>21</sup> Recortador de gesso Protécni, equipamentos e tecnologia. Araraquara, São Paulo, Brasil.

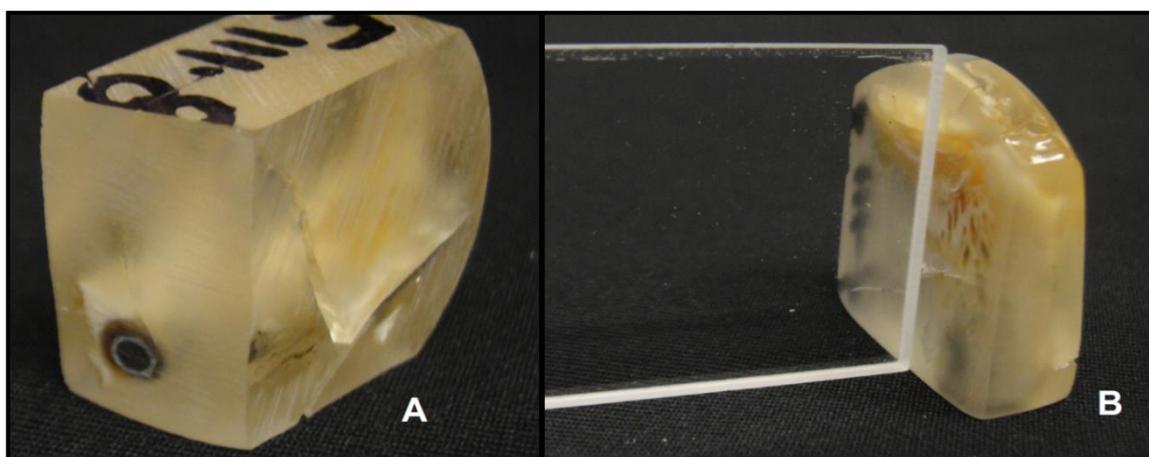
observasse o hexágono externo do mesmo (Figura 11). Este procedimento visava facilitar a colagem das mesmas nas lâminas, assim como, permitir o paralelismo do implante com a serra, fato que garantiria o corte no longo eixo deste implante e a visualização do mesmo por completo (Figura 12).

**Figura 11-** Recorte das amostras: A) Peça óssea recém polimerizada em formato circular; B) Recorte da resina em um recortador de gesso.



Fonte: Dados da Pesquisa.

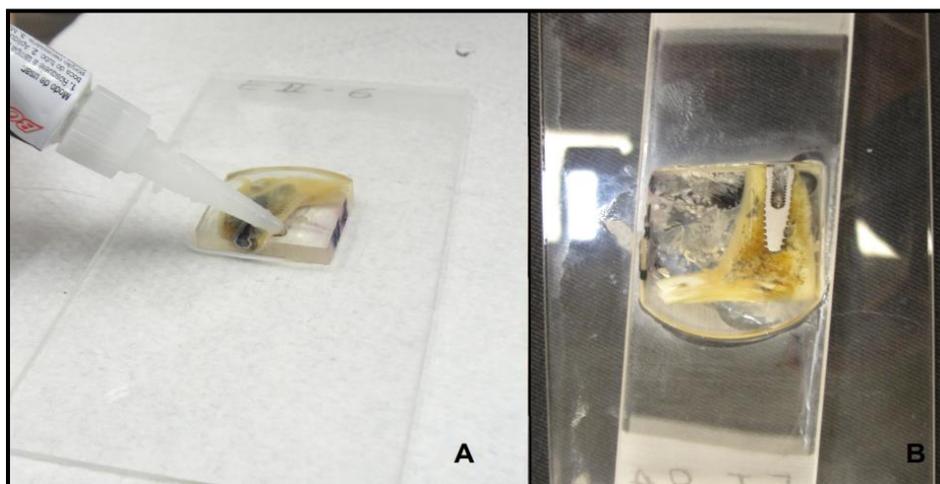
**Figura 12-** Avaliação da resina polimerizada: A) Após recorte da peça, avaliou-se o paralelismo das amostras em relação à lâmina de acrílico; B) Observa-se o cuidado na realização do desgaste fazendo com que o implante ficasse paralelo a uma das superfícies da resina.



Fonte: Dados da Pesquisa.

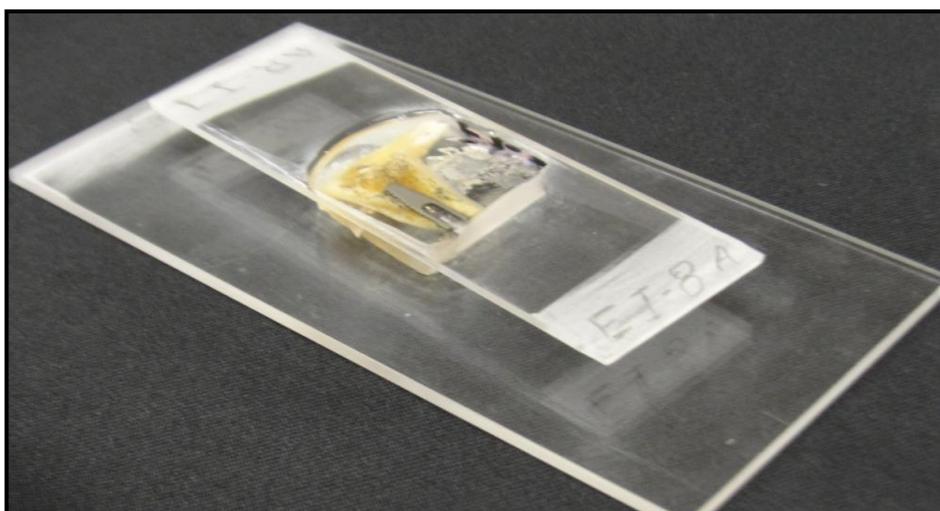
Após a identificação das peças, procedeu-se a colagem da amostra em uma lâmina de acrílico<sup>22</sup> (dimensões de 50x100x2mm), visando facilitar o corte o corte com micrótomos Exakt<sup>23</sup>, específico para corte de associação de metal e tecido orgânico (Figura 13 e 14).

**Figura 13-** Colagem da peça nas lâminas de acrílico com cola rápida.



Fonte: Dados da Pesquisa.

**Figura 14-** Colagem da peça em duas superfícies de acrílico: a lâmina inferior tinha dimensões maiores para facilitar a acoplagem no micrótomos. A lâmina colada na superfície superior da peça é de tamanho convencional.



Fonte: Dados da Pesquisa.

<sup>22</sup> Emporium Acrílicos®. Lâminas de acrílico para histologia 50x100x2mm. Bauru, São Paulo, Brasil.

<sup>23</sup> Micrótomos Exakt Diamond Band Saw, Diamond Cutting Band, 0,2mm, D64, Nordstedt, Schleswing-Holstein, Alemanha.

A lâmina com dimensões maiores permitiu melhor adaptação do conjunto no micrótomo, por meio de vácuo. Ainda preservou o adequado paralelismo entre o longo eixo do implante e a superfície desta lâmina. Posteriormente, procedeu-se um breve lixamento com lixa de granulação 1000, objetivando a exposição do implante o que facilitaria o corte das lâminas propriamente ditas.

Assim, obtiveram-se secções com aproximadamente 200µm de espessura, em velocidade calibrada, até chegar à região de interesse para análise. A seguir, as peças eram colocadas em uma politriz metalográfica EXAKT<sup>24</sup> para realização de desgaste<sup>25</sup> (lixas de granulação 600, 1000 e 1500) e polimento<sup>26</sup> (lixa de granulação 2000) até que se chegasse a uma espessura semelhante a 30µm, sem arranhões profundos na amostra, fatores determinantes para coloração das lâminas.

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Pesquisa I, componente do Centro Integrado de Pesquisa-I (CIP-I), na Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB/USP), em Bauru, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

### **3.13.1 Realização das lâminas e coloração com azul de toluidina**

Para a realização do corte das amostras para confecção das lâminas histológicas, as mesmas foram posicionadas<sup>27</sup> (dimensões de 25x75x2mm) em lâminas de acrílicos e fixadas com cola rápida<sup>28</sup>. As mesmas foram mantidas sob pressão de 180 gramas, durante dois minutos. Assim, posicionava-se a lâmina no micrótomo para realização do corte, sob irrigação constante de água e velocidade calibrada no aparelho (Figura 15 e 16).

---

<sup>24</sup> Politriz Metalográfica Exakt, Nordestedt, Schleswing-Holstein, Alemanha.

<sup>25</sup> Lixas d'água para lixamento, Carbureto de Silício, 230x280mm, Norton, Guarulhos, São Paulo, Brasil.

<sup>26</sup> Lixas d'água para polimento, Carbureto de Silício, 230x280mm, Norton, Guarulhos, São Paulo, Brasil.

<sup>27</sup> Emporium Acrílicos®. Lâminas de acrílico para histologia 25x75x2mm. Bauru, São Paulo, Brasil.

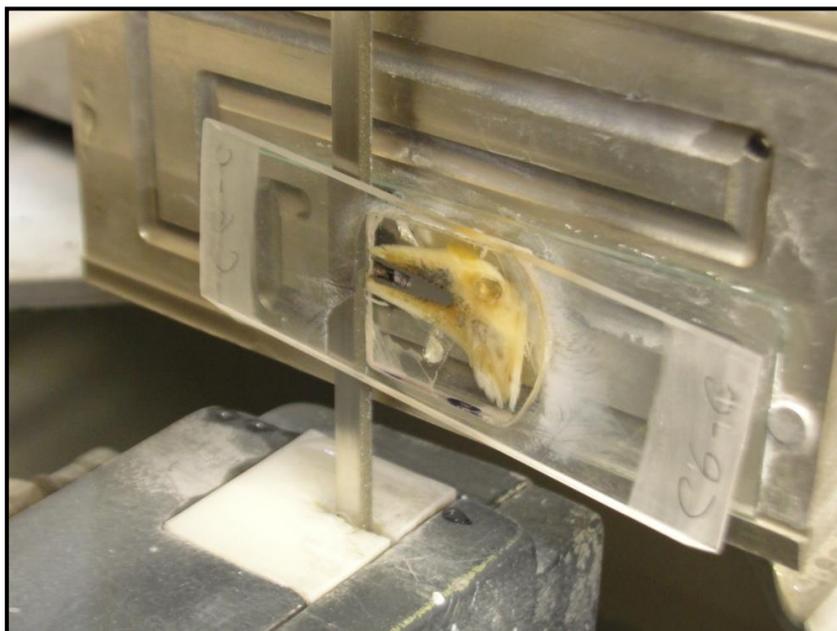
<sup>28</sup> Adesivo Instantâneo. Scotch Bond®. 3M do Brasil Ltda. Sumaré, São Paulo, Brasil.

**Figura 15-** Micrótopo Exakt: Diamond Band Saw, Diamond Cutting Band, 0,2mm, D64, Nordestedt, Schleswing-Holstein, Alemanha.



Fonte: Dados da Pesquisa.

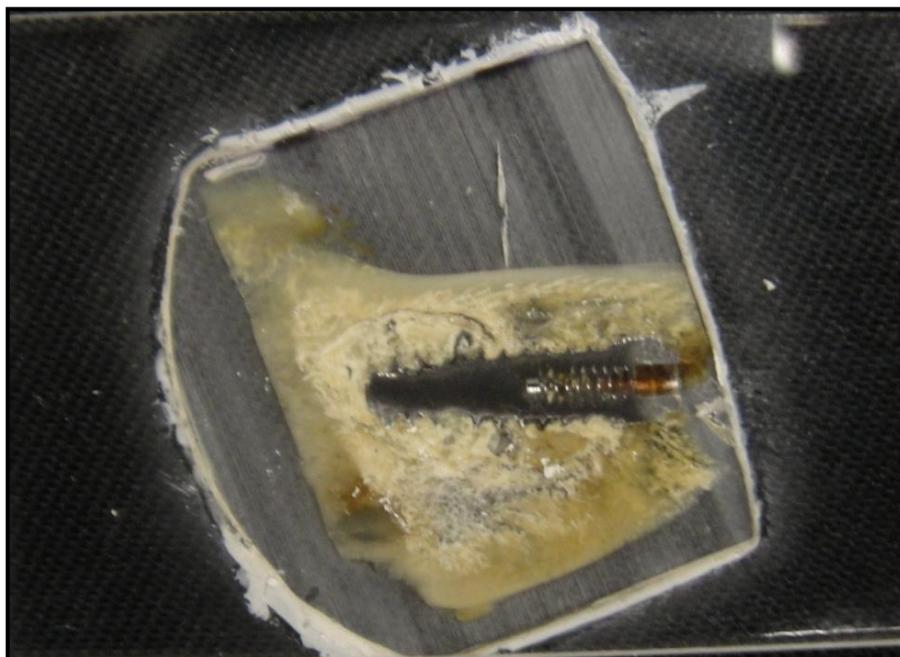
**Figura 16-** Corte da lâmina no micrótopo Exakt, o qual se obtinha uma lâmina de aproximadamente 200 micrômetros.



Fonte: Dados da Pesquisa.

Ao final do corte, obtinha-se uma lâmina com espessura igual a 200 $\mu$ m, ainda sem condições de coloração e de visualização em microscópio óptico (Figura 17).

**Figura 17-** Primeiro corte no micrótomo Exakt: a espessura obtida era de aproximadamente 200 micrômetros.



Fonte: Dados da Pesquisa.

Assim, levava-se novamente a peça à politriz metalográfica Exakt para refinar o lixamento e o polimento (Figura 18). Dessa forma, lixava-se a amostra até que se chegasse à espessura de 50 $\mu$ m, sendo promovida o polimento até que se chegasse a 30 $\mu$ m, sempre realizando-se a avaliação da espessura da amostra por meio de um espessímetro digital de precisão<sup>29</sup> (Figura 19). O aspecto final da lâmina realizada, a olho nu, dava-se pela ausência de riscos profundos na superfície do implante e do tecido ósseo.

---

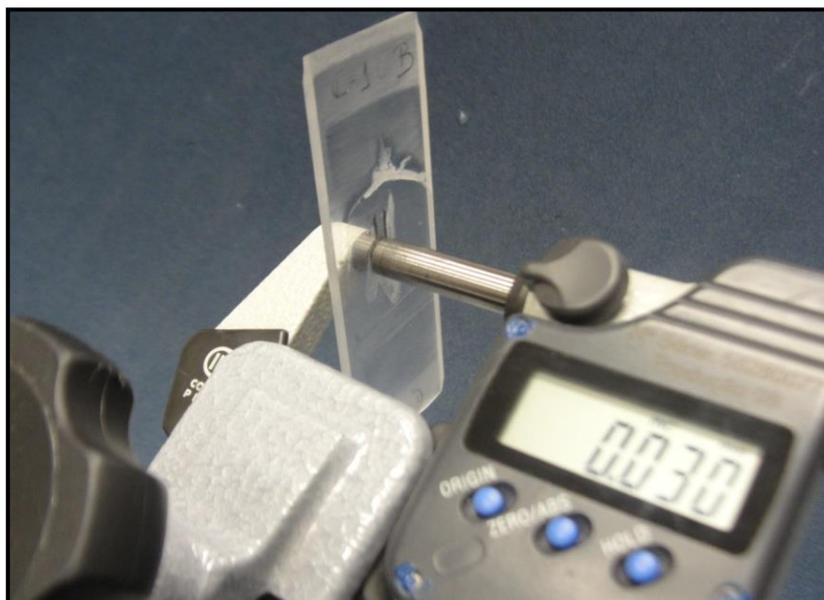
<sup>29</sup> Espessímetro digital de Precisão, 0-25mm, de 0.001mm, Cooland Proof. IP 65. Mitutoyo, Santo Amaro, São Paulo, Brasil.

**Figura 18-** Politriz metalográfica Exakt (Nordestedt, Schleswing-Holstein, Alemanha) promovia o lixamento e o polimento gradual da peça até atingir 30 micrômetros de espessura.



Fonte: Dados da Pesquisa.

**Figura 19-** Mensuração da lâmina em um micrômetro de precisão. Verifica-se que a espessura obtida foi de 30 micrômetros.



Fonte: Dados da Pesquisa.

A seguir, as 24 lâminas foram submetidas a um protocolo específico de coloração em azul de toluidina realizada na Unidade de Patologia Experimental (UPE), no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, sob a orientação da médica patologista, chefe deste setor.

Esta coloração foi realizada da seguinte maneira (Figura 20):

- a) Colocação das 24 lâminas em solução de xilol<sup>30</sup> durante 15 minutos sendo cinco minutos em três cubas distintas.
- b) Colocação em solução de álcool absoluto em quatro cubas distintas, passando rapidamente pelas três primeiras e mantendo na quarta cuba as lâminas por um período de 3 minutos.
- c) Lavagem abundante das lâminas em água destilada.
- d) Realização da diluição do corante em pó de 1g azul de toluidina<sup>31</sup> em 10 ml de água, obtendo-se uma solução de azul de toluidina a 10%. Manteve-se o corante sobre a lâmina durante dois minutos.
- e) Lavagem abundante das lâminas em água destilada.
- f) Colocação das lâminas em álcool absoluto através de uma passagem rápida sobre a solução apenas para remover o excesso do corante e fixar o mesmo sobre o tecido ósseo.
- g) Passagem das lâminas sobre duas cubas de xilol.
- h) Remover o excesso de cola rápida que foi plastificada pelo xilol através de uma pinça metálica.
- i) Colocação de Bálsamo do Canadá<sup>32</sup> e de uma lamínula<sup>33</sup>.

---

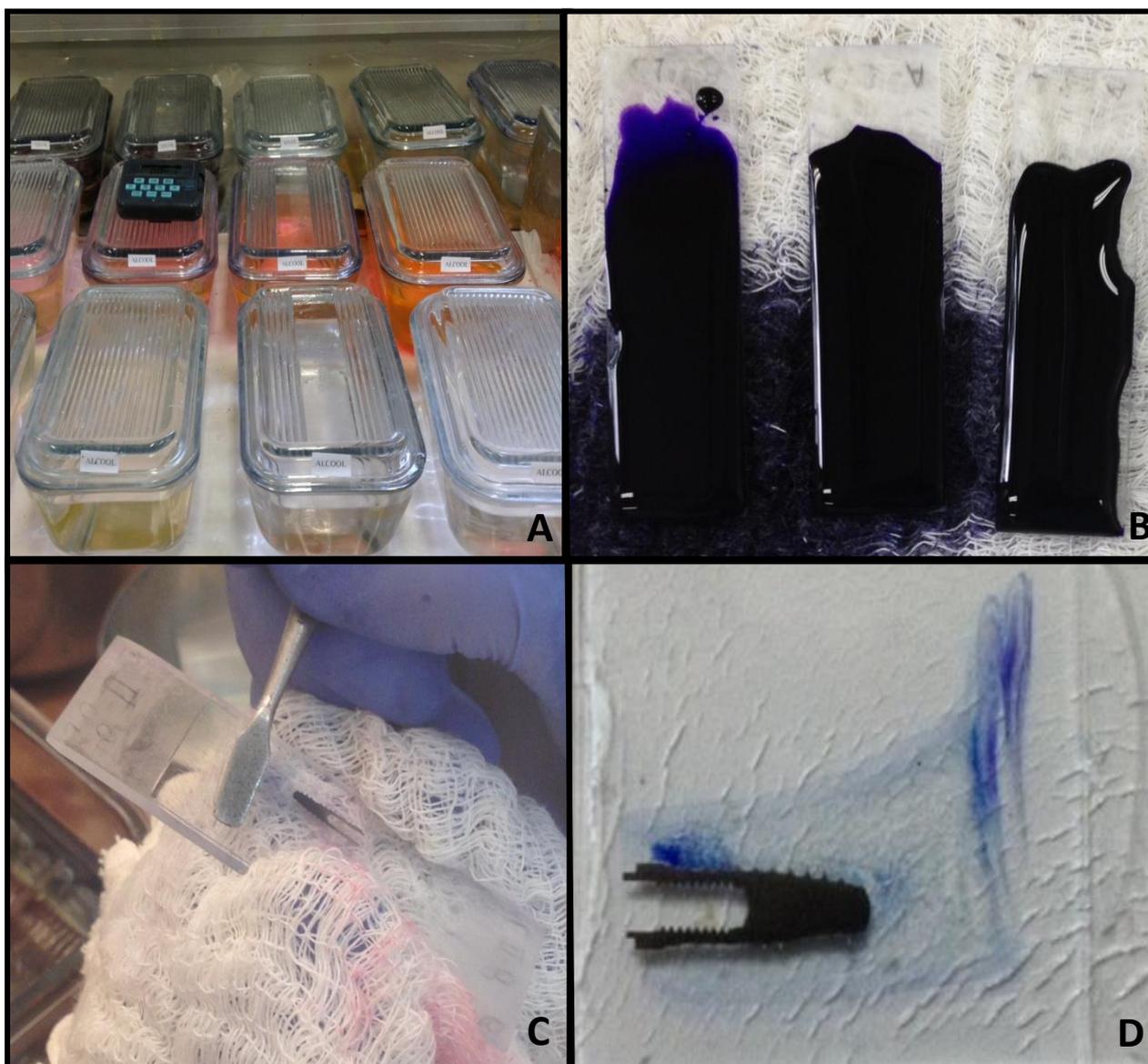
<sup>30</sup> Xilol. Quimesp Química Ltda. São Paulo, SP, Brasil.

<sup>31</sup> LABSYNTH Produtos para Laboratórios Ltda. Diadema, São Paulo, Brasil.

<sup>32</sup> Bálsamo do Canadá. Quimesp Química Ltda. São Paulo, SP, Brasil.

<sup>33</sup> Lamínula de 24x40mm. Cequímica. Fortaleza, CE, Brasil.

**Figura 20-** Passos do protocolo de coloração com azul de toluidina: A) Colocação das lâminas em álcool; B) Colocação das lâminas em solução de azul de toluidina 1%; C) Colocação da lamínula sobre a lâmina recém corada através do uso de bálsamo do Canadá; D) Aspecto macroscópico da lâmina recém corada.



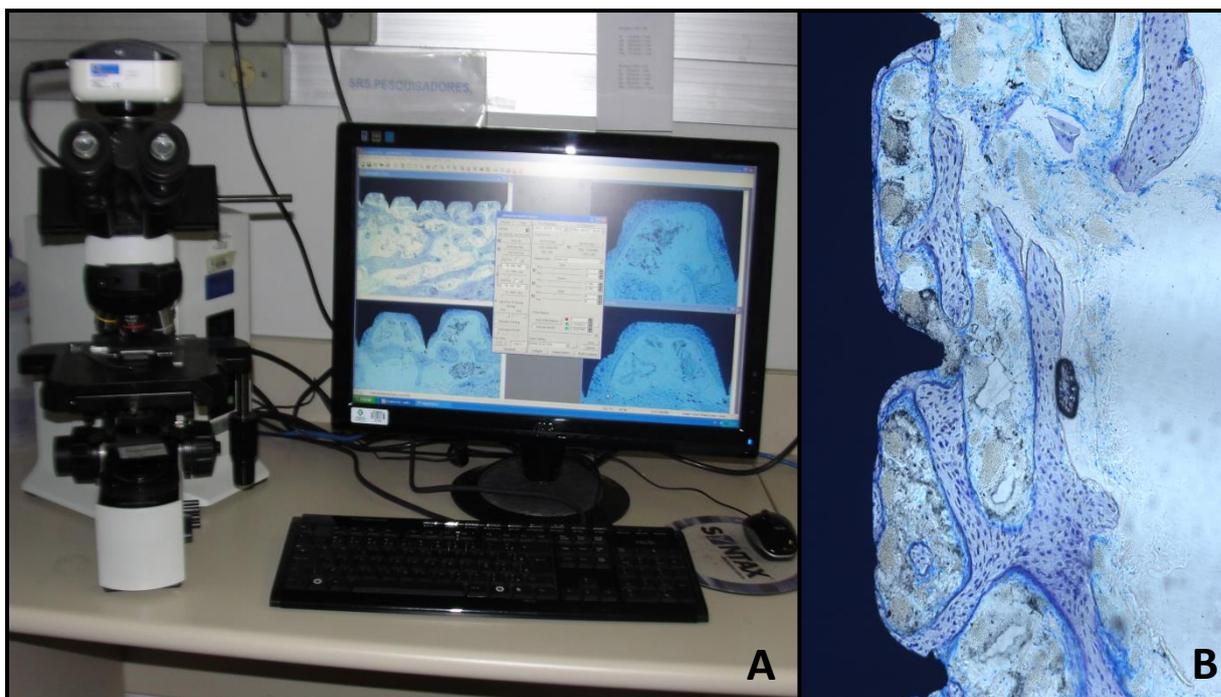
Fonte: Dados da Pesquisa.

Posteriormente, a análise das lâminas foi realizada através de microscopia óptica de luz, por examinador cegado. O microscópio óptico convencional possuía uma câmera acoplada, sendo que as imagens obtidas eram diretamente passadas para um computador. A cópia das imagens foram realizadas em um programa específico<sup>34</sup> vinculado ao microscópio, que possibilitou fotos de elevada qualidade,

<sup>34</sup> Software QCapture Pro, High Performance Digital Imaging, Qimaging Corporation, Canada

em 300 dpi, com dimensões de 2560 x 1920, com tamanho médio de 14 MB (Figura 21).

**Figura 21-** Captura das imagens em Microscópio Óptico Olympus®: A) Computador acoplado e um microscópio óptico e câmera que faz a digitalização das imagens; B) Imagem da superfície entre osso e implante, em 200x de aumento, com coloração em azul de toluidina.



Fonte: Dados da Pesquisa.

O aspecto histomorfométrico das peças ósseas submetidas à irradiação com laser, bem como das peças ósseas do grupo controle foram descritos levando-se em consideração a interação entre as superfícies do osso e do implante, avaliando a quantidade de contato entre essas duas estruturas (BIC) e o volume de osso neoformado entre as espiras (BA).

As medidas obtidas de cada tecido foram transferidas para tabelas. Os valores foram transportados para o programa Microsoft Excel®, inseridos nas tabelas definitivas e submetidos à análise estatística por meio do programa SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) para Windows® 7 (Microsoft Corporation, EUA).

A análise esteriológica foi realizada respeitando o cegamento proposto na metodologia. As lâminas foram codificadas para garantir que, durante a leitura, os examinadores desconhecêssem a qual grupo pertencia, sendo que dois

examinadores foram calibrados para realizar esta etapa. Para isto, a cada 20 lâminas observadas, o examinador repetiu, individual e separadamente, a observação de 10 lâminas, comparando as medidas obtidas entre as observações e aplicando o método de concordância de *Bland-Altman* intraexaminador a fim de verificar a congruência das medidas. Da mesma forma, compararam-se os valores interexaminadores, também, pelo mesmo teste. Em ambas as avaliações, houve concordância intra e inter-examinador com resultado de semelhança excelente entre os avaliadores, com 95% dos valores dentro do limite de concordância.

Para o cálculo das regiões previamente selecionadas, áreas de contato entre osso e implante, as imagens adquiridas em microscópio óptico<sup>35</sup> equipado com câmera digital acoplada<sup>36</sup> foram analisadas por dois *softwares* específicos: o *UTHSCSA Image Tool*® (versão 3.0), para obtenção das medidas lineares de contato osso-implante. O programa quantifica o tecido ósseo na lâmina, estabelecendo a quantidade óssea em relação à densidade óssea. Esses valores são fornecidos em milímetros (mm) e milímetros quadrados (mm<sup>2</sup>).

De posse das imagens obtidas através da microscopia óptica e carregadas no programa *UTHSCSA Image Tool*® (versão 3.0)<sup>37</sup>, a imagem do implante foi dividida em três terços, onde foi realizada mensuração nos terços cervical, médio e apical, os quais contemplam o corpo do implante. Desta forma, escolheram-se as espiras n°1, n°5 e n°9, em geral as que continham maior formação óssea, evitando-se locais que apresentassem vazios ósseos ou descolamento da união osso-implante. Reforçando que objetivo foi o de aferir a área de osso neoformado entre as espiras de cada região, como também, o contato entre implante e osso.

### **3.14 Avaliação por MEV**

Oito amostras foram fixadas em formol 10% neutro tamponado por um período de 72 horas. Posteriormente, foram colocadas individualmente em frascos tampados, identificados conforme o grupo, passando pelas seguintes fases de

---

<sup>35</sup> Olympus Canada Inc. Microscope Optical Bx51. Qimaging Corporation, Canada.

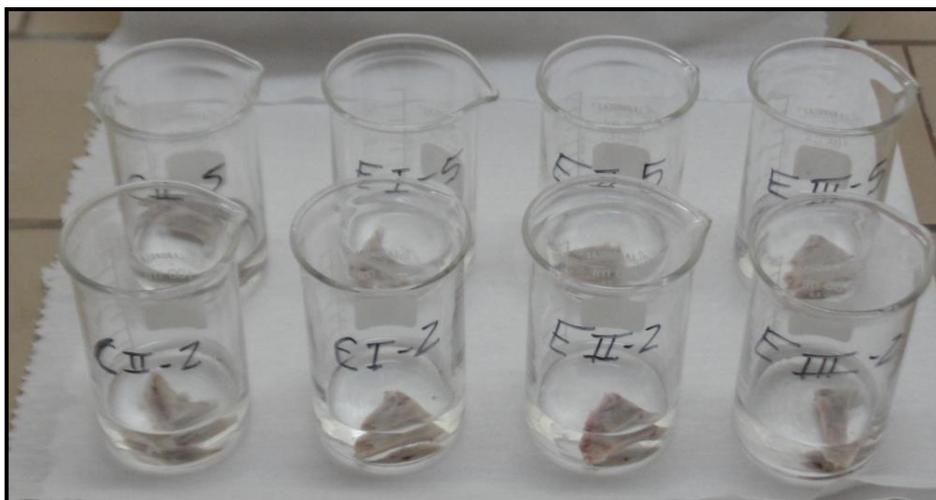
<sup>36</sup> Camera QColor 5, RTV. Olympus Canada Inc. Qimaging Corporation, Canada.

<sup>37</sup> UTHSCA ImageTool for Windows, versão 3.0. Copyright 1995-2000, San Antonio, Texas, EUA.

preparo: lavagem, desidratação, dessecação, imersão em resina, corte, polimento, metalização e, por fim, avaliação em MEV.

As peças passaram por um processo de lavagem através do uso de solução tampão composta de fosfato 0,2 molar<sup>38</sup> associado à água destilada na proporção de 1:1. Nesta fase, o material passou por três lavagens de 30 minutos cada. A seguir, a desidratação constou de seis lavagens com álcool<sup>39</sup> nas proporções de 30% (10 minutos), 50% (10 minutos), 70% (10 minutos), 90% (30 minutos) e 100% (30 minutos). Na dessecação, as amostras foram enroladas em papel toalha, identificadas e colocadas em uma câmara de baixo vácuo composto por sílica gel que fez a absorção lenta dos líquidos que estavam no interior dos tecidos. O tempo desse procedimento foi de dois dias (Figura 22).

**Figura 22-** Desidratação das oito peças para MEV: as amostras de osso/implante passaram em diferentes concentrações de álcool.



Fonte: Dados da Pesquisa.

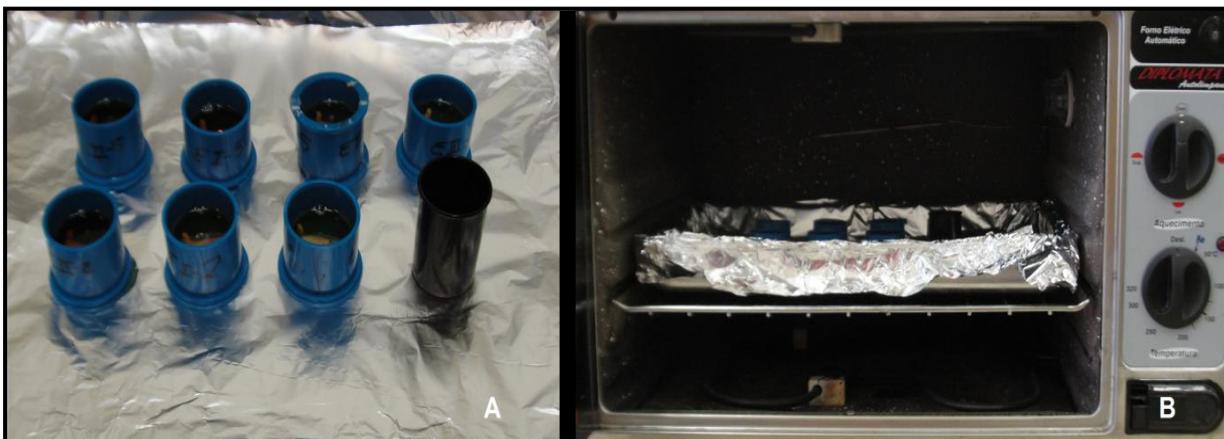
Na sequência, as amostras foram embutidas em resina acrílica<sup>40</sup> específica para preparo em MEV, através do uso de pequenos frascos que comportam 20 ml de solução, sendo colocados para polimerizar em um forno convencional a 60° C por 48 horas (Figura 23).

<sup>38</sup> Phosphate Buffered Saline 1x (PBS pH 7.4). GIBCO®, Grand Island, Nova Iorque, EUA.

<sup>39</sup> F.maia Indústria e Comércio Ltda., Cotia, SP, Brasil.

<sup>40</sup> EMBED-812 Embedding Kit. Electron Microscopy Sciences. EMSdiazum, Industry Road. Hatfield, Filadélfia, EUA.

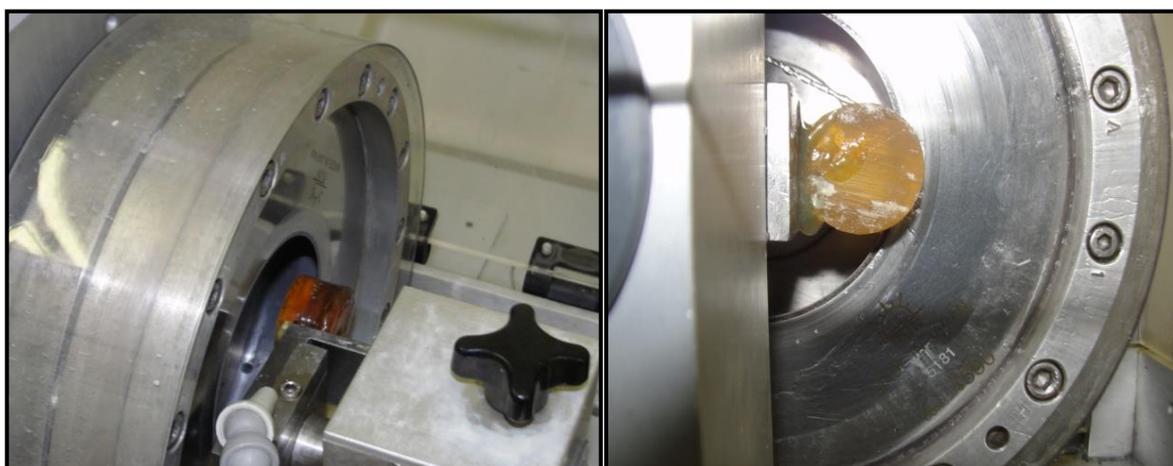
**Figura 23-** Imersão das peças para MEV em resina específica: A) Colocação das amostras em frascos específicos imersas em resina EMBed-812, específica para MEV; B) Termopolimerização da resina a 60° Celsius, por 48 horas, em forno convencional.



Fonte: Dados da Pesquisa.

As peças foram seccionadas no sentido do longo eixo do implante usando uma serra diamantada<sup>41</sup> com 0.3 mm de espessura. Cada corte tinha um tempo médio de três minutos, sendo que a irrigação era feita constantemente com água destilada e solução aditiva anticorrosiva<sup>42</sup> (Figura 24).

**Figura 24-** Corte da amostra sendo realizada em serra Logitech (AXL1 Precision Annular Saw), a 1000 rpm sob irrigação constante. Objetivou-se a secção no longo eixo do implante.



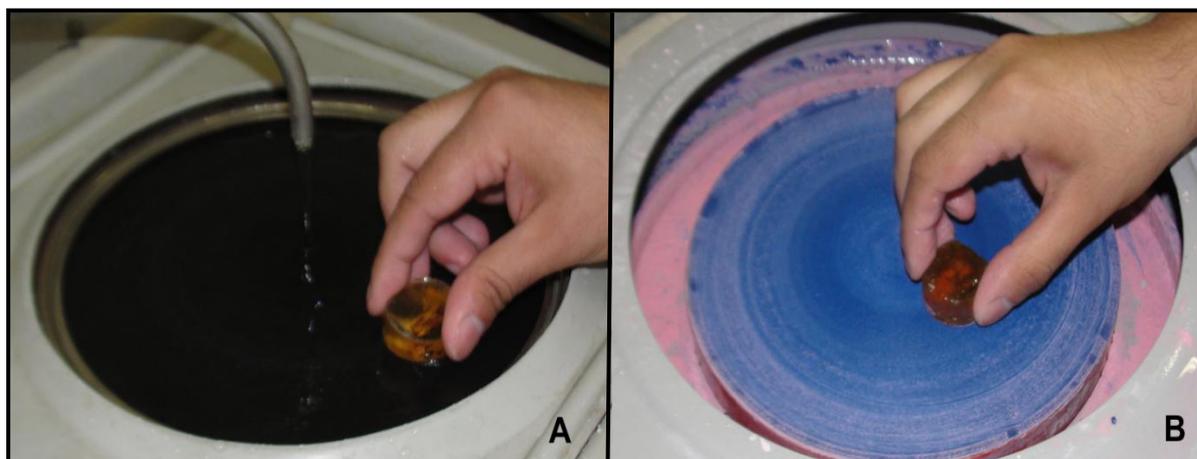
Fonte: Dados da Pesquisa.

<sup>41</sup> Logitech AXL1 Precision Annular Saw. Logitech® Materials Technologists & Engineers. Glasgow, Escócia, Reino Unido.

<sup>42</sup> Aditivo anti-oxidante PANTEC ADITOM®. PANAMBRA Industria e Técnica S.A. Distribuido por REDsul, Viamão, RS, Brasil.

Todas as amostras foram lixadas e polidas com lixas de carbureto de silício<sup>43</sup> variando o tamanho de grão entre 150-4000, sempre, sob irrigação constante de água destilada. Novamente, as peças ósseas passaram por nova dessecação em uma câmara de baixo vácuo composto por sílica gel que fez a absorção lenta dos líquidos que estavam no interior dos tecidos por um tempo total de 14 dias (Figuras 25).

**Figura 25-** Lixamento e Polimento das peças para MEV: A) lixamento das amostras através das granulações 150, 220, 320, 400 e 600; B) polimento foi realizado em lixas de granulação 1000, 1500 e 2000, sendo posteriormente levadas a feltros com pasta diamantada.



Fonte: Dados da Pesquisa.

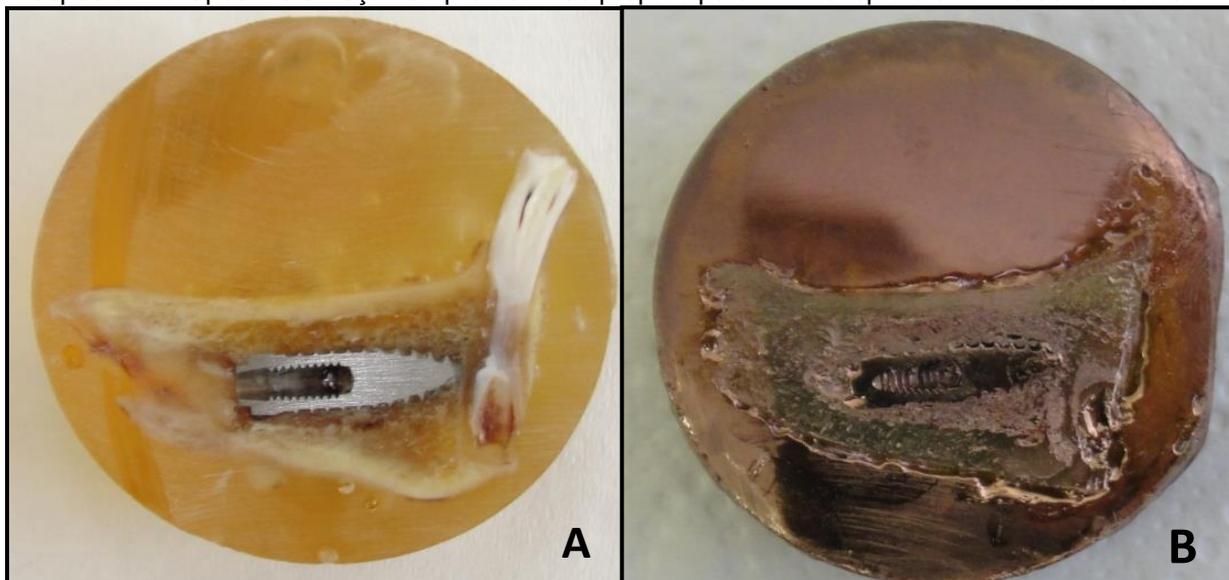
Dessa forma, todas as amostras seccionadas foram enviadas ao Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) para serem preparadas através da técnica de metalização<sup>44</sup> em ouro, por meio de duas intervenções de duas horas cada (Figura 26).

As peças foram, então, submetidas a análises por Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectrometria de Raios-x por Dispersão de Energia.

<sup>43</sup> Lixas d'água, Carbureto de Silício, 230x280mm, Norton, Guarulhos, São Paulo, Brasil.

<sup>44</sup> BAL-TEC SCD 050 Sputter Coater. Capovani Brothers Inc, Nova Iorque, EUA.

**Figura 26-** Antes e depois do protocolo de preparo das amostras para MEV: A) aspecto inicial e B) aspecto final após metalização do protocolo de preparo para microscopia eletrônica de varredura.



Fonte: Dados da Pesquisa.

### 3.14.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

As peças ósseas preparadas conforme descrito foram analisadas no microscópio eletrônico de varredura<sup>45</sup> pertencente ao Centro de Microscopia e Microanálises da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) (ANEXO IV). As ampliações foram de 35x, 100x, 250x e 300x (Figura 27). A morfologia da superfície das amostras foi avaliada com o detector de elétrons retroespalhados (BSE), nas ampliações propostas, conseguidos com a calibração do aparelho, tal como a intensidade da corrente e condições de vácuo.

<sup>45</sup> Microscópio Philips, modelo XL 30 FEG EDX. Eindhoven, Holanda.

**Figura 27-** Microscópio Eletrônico de Varredura Philips (modelo XL 30 FEG EDX. Eindhoven, Holanda)



Fonte: Dados da Pesquisa.

Realizaram-se avaliações em três pontos específicos (um cervical, um médio e um apical – espiras nº1, nº5 e nº9) na interface osso-implante, analisando-se separadamente os dados numéricos, como também, as médias de neoformação óssea perimplantar nessas regiões, comparando-se entre os grupos controle e experimental.

Da mesma forma, com magnificação de 300 vezes sobre os três pontos anteriormente citados (cervical, médio e apical), procedeu-se a análise de espectrometria de raios-X por dispersão de energia (EDS – “*Energy-Disperse X-Ray Spectroscopy*”), identificando a composição química das substâncias presentes na superfície, em especial, as concentrações de cálcio.

### **3.15 Análise Esteriológica das Imagens**

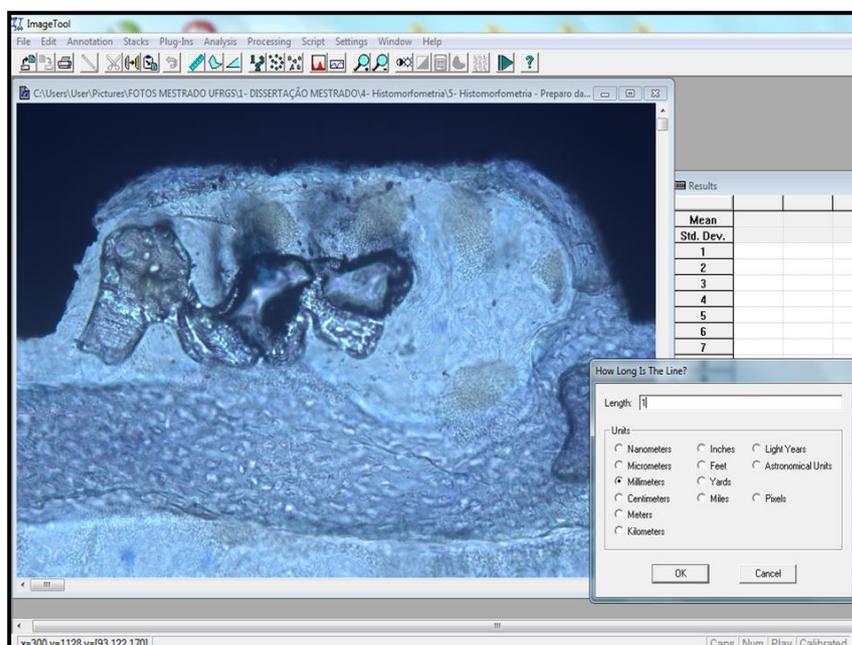
Todas as imagens capturadas por meio de fotografias adquiridas diretamente das imagens observadas em microscopia ótica de luz (fotomicrografia) foram

transferidas para o software *UTHSCSA Image Tool*® (versão 3.0)<sup>46</sup> para mensuração. O primeiro passo foi realizar a calibração (Figura 28) por meio da transformação de *pixels* em milímetros, na qual, esta referência, fora obtida diretamente na Unidade de Patologia Experimental, afixada no microscópio (Tabela 4). Com isso, obteve-se a relação de que, para o aumento de 200x na observação do microscópio óptico, a cada 3000 pixels havia a proporção métrica de 1 mm.

A seguir, realizou-se a mensuração tanto em BIC (contato entre osso-implante), como também, a avaliação em BA (volume de osso neoformado entre as espiras) e a transcrição dos valores para uma tabela em Excel. Todos esses valores foram obtidos em micrômetros (BIC) e em micrômetros quadrados (BA) – Figuras 29 e 30.

Tanto em BIC quanto em BA tomou-se a cautela de realizar todas as medidas entre as espiras do implante, nos vales dessa região, não passando de suas cristas, no intuito de padronizar a mensuração em todas as fotomicrografias.

**Figura 28-** Calibração e transformação da mensuração de pixels para milímetros.



Fonte: Dados da Pesquisa.

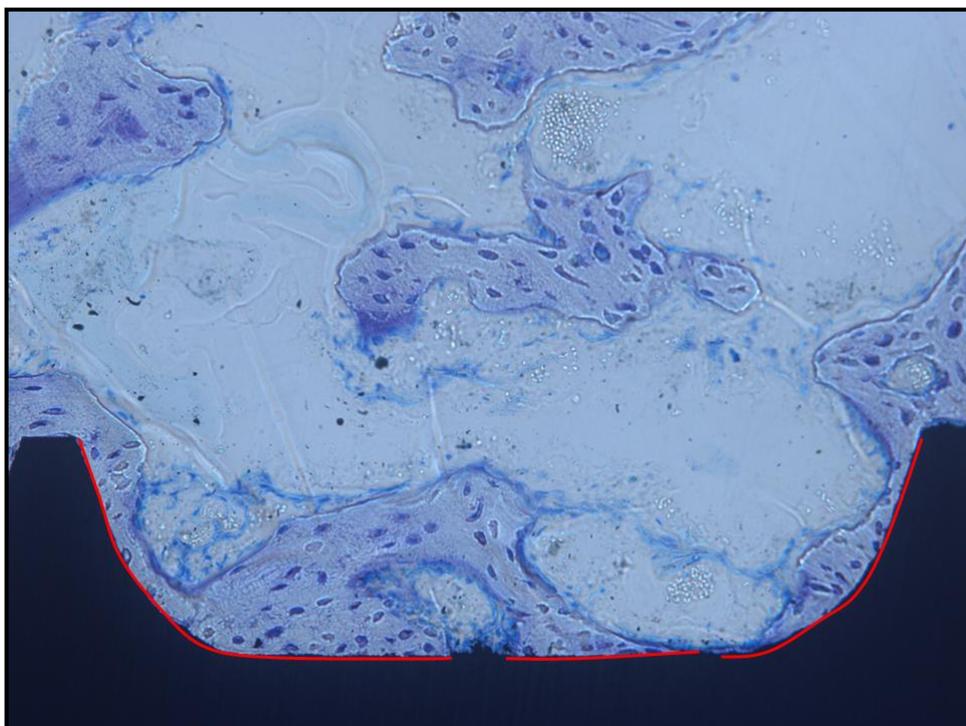
<sup>46</sup> UTHSCA ImageTool for Windows, versão 3.0. Copyright 1995-2000, San Antonio, Texas, EUA.

**Tabela 4:** Correlação para transformação de pixels para milímetros, dependendo do aumento em que a fotomicrografia fora realizada. Calibração realizada pela Coordenadora da Unidade de Patologia Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Resolução da Imagem	Aumento no Microscópio	Qualidade da Imagem (Pixels)	Proporção (mm)
2560x1920	40x	600	1
2560x1920	100x	1500	1
2560x1920	200x	3000	1
2560x1920	400x	6000	1

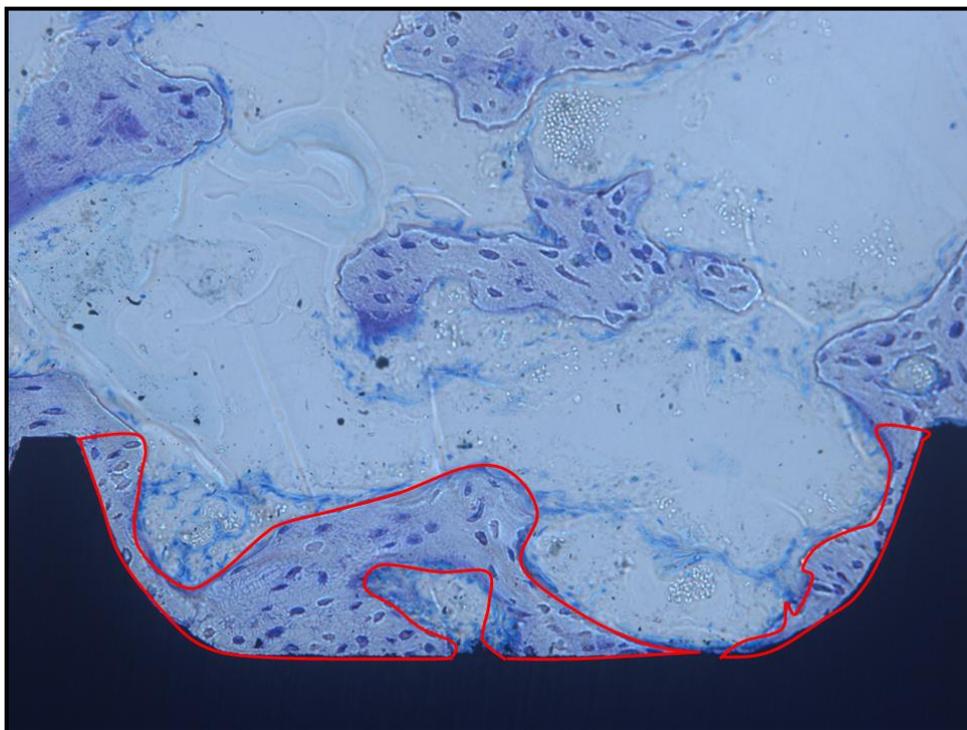
Fonte: Unidade de Patologia Experimental – UEA/HCPA UFRGS.

**Figura 29-** Mensuração de imagem em microscópio óptico – BIC: imagem em 200x, onde se avaliou a superfície de contato entre osso e Implante. Notar que a região onde não se observou contato do osso com o implante, não foi incluída.



Fonte: Dados da Pesquisa.

**Figura 30-** Mensuração de imagem em microscópio óptico – BA: imagem em 200x, onde se avaliou o volume de osso neoformado. Notar que fora incluído apenas a área entre as cristas das espiras.



Fonte: Dados da Pesquisa.

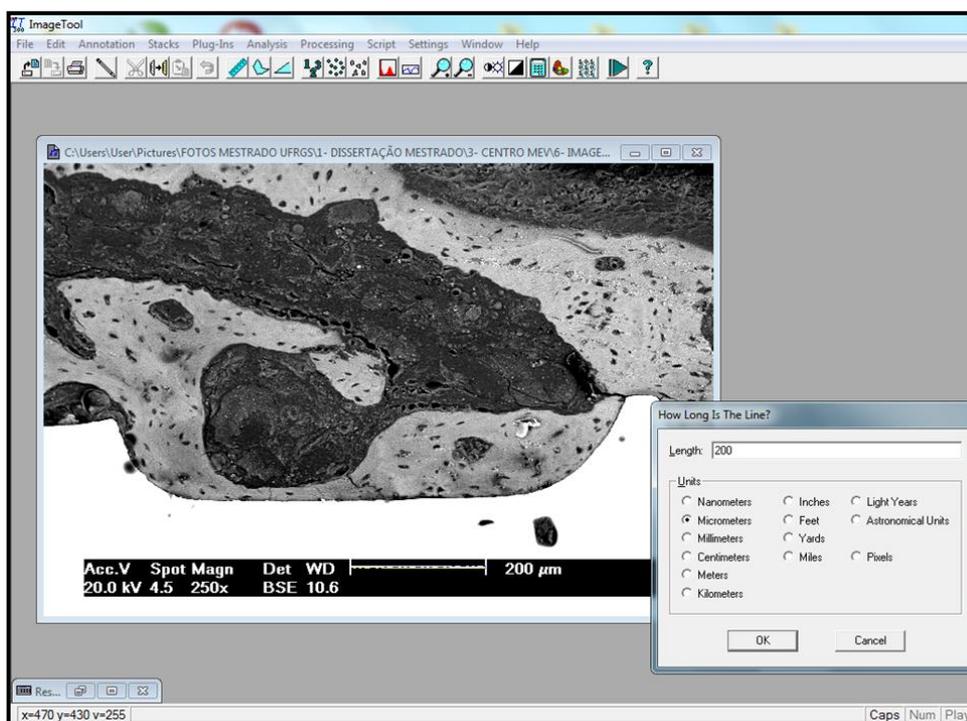
### 3.16 Análise das Imagens em MEV

Todas as imagens capturadas por meio das fotografias adquiridas diretamente das imagens observadas em microscopia eletrônica de varredura foram transferidas para o software *UTHSCSA Image Tool*® (versão 3.0) e, assim, mensuradas.

O primeiro passo foi realizar a calibração por meio da transformação de uma escala que o próprio microscópio eletrônico imprime nas imagens, em micrômetros. Através dessa manobra, obteve-se a relação de que, para o aumento de 250 x na observação do microscópio eletrônico, a escala 200 micrômetros equivaleria a proporção métrica da escala impressa na fotografia (Figura 31).

Optou-se por captura das imagens por meio da qualidade BSE (“*Backscattering Electrons*”) ou elétrons retroespalhados, pois este método permite o aumento de contraste das estruturas metálicas, facilitando a diferenciação entre tecido ósseo e implante, assim como, a medular da cortical ósseas.

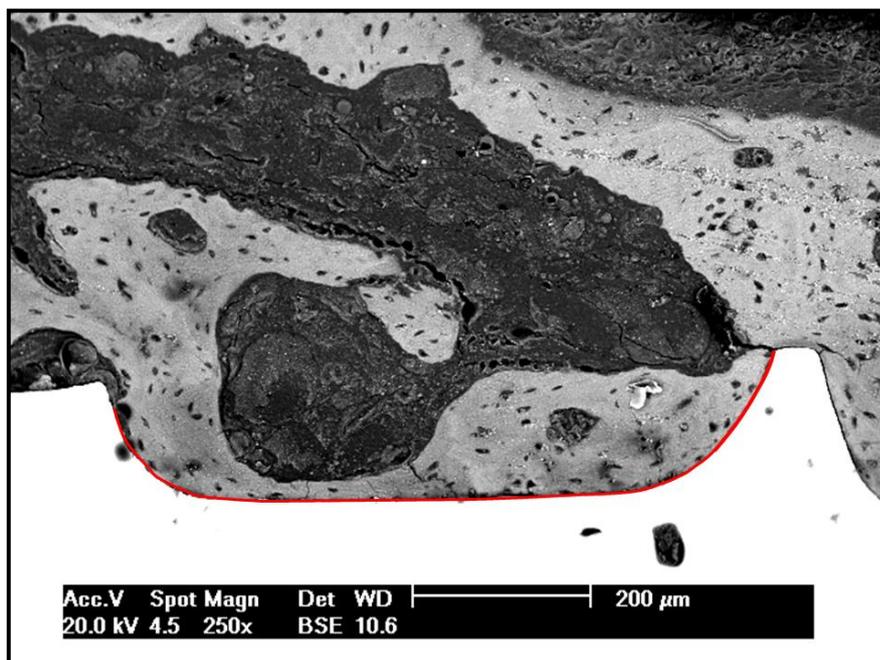
**Figura 31-** Calibração das imagens MEV. Notar que, para 200 $\mu\text{m}$  tem-se o valor milimétrico estipulado pelo tamanho da escala impressa na foto.



Fonte: Dados da Pesquisa.

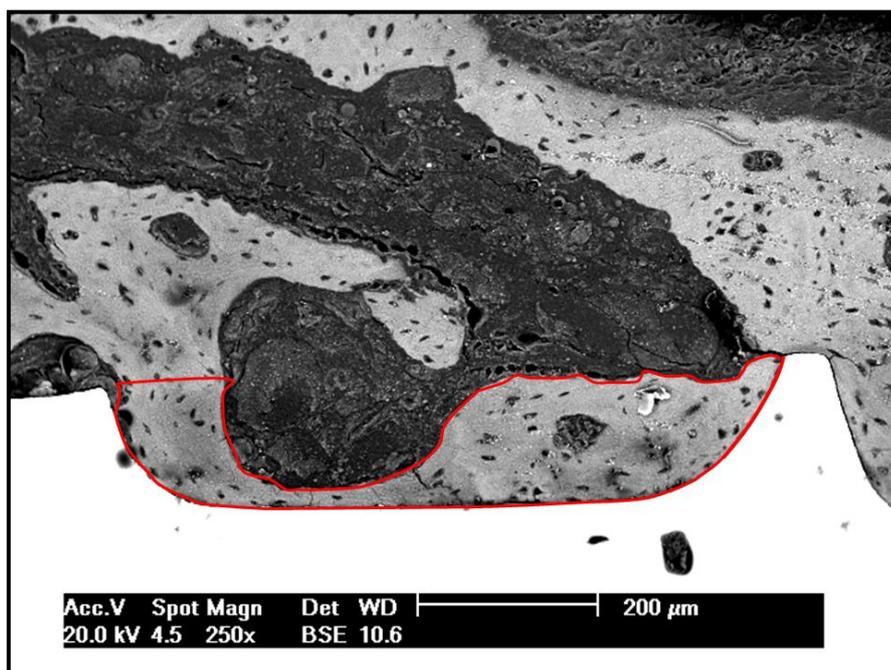
A seguir, realizou-se a mensuração tanto em BIC (contato entre osso-implante), como também, a avaliação em BA (área de osso neoformado) e a transcrição dos valores para uma tabela em Excel. Todos esses valores foram obtidos em micrômetros (BIC) e em micrômetros quadrados (BA) – Figuras 32, 33 e 34.

**Figura 32-** Mensuração de imagem MEV – BIC: buscou-se avaliar, em 250x, a superfície de contato entre osso e Implante. Notar que fora incluído apenas a área entre as cristas das espiras.



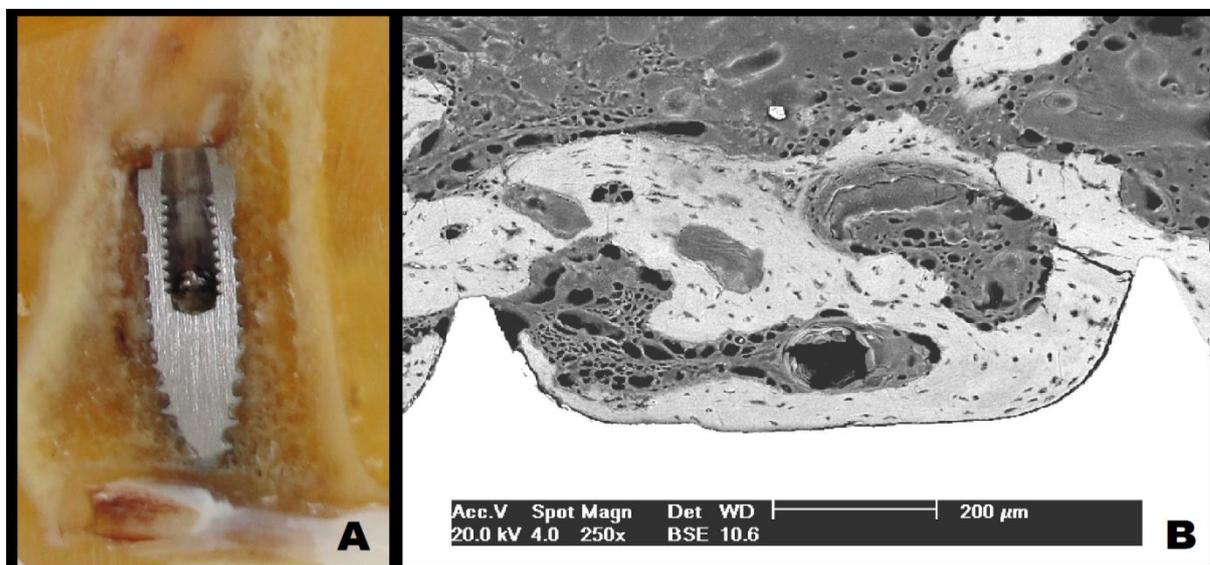
Fonte: Dados da Pesquisa.

**Figura 33-** Mensuração de imagem MEV – BA: buscou-se avaliar, em 250x, a área de osso neoformado entre a espira do implante, em 250x.



Fonte: Dados da Pesquisa.

**Figura 34-** Relação entre a avaliação macroscópica e em MEV: A) Porção anterior da mandíbula do coelho dissecada com a presença de implante osseointegrado após o corte em seu longo eixo. Notar a sua posição em relação às corticais ósseas, o corte exato expondo desde à cervical ao ápice do implante e a adequada cobertura óssea em todo o seu entorno; B) Avaliação por MEV (250x) demonstrando a íntima relação entre o implante e o tecido ósseo, como também, a diferenciação da cortical e medular ósseas.



Fonte: Dados da Pesquisa.

### 3.17 Análise Estatística

Os programas que foram utilizados são: *software* estatístico *Statistical Package for Social Sciences*® (SPSS) versão 17.0 e a planilha eletrônica do *Microsoft Excel*®, ambos para o sistema operacional *Windows*®.

Tanto para MEV quanto para a esteriologia, o teste de normalidade de *Shapiro-Wilk* fora utilizado, demonstrando que para este tipo amostral aceitou-se a hipótese nula de normalidade. Para tal, o teste estatístico utilizado para o número amostral de 32 animais e para um total de quatro grupos foi a análise de variância (ANOVA) e o Teste de *Tukey*, cujo  $p < 0,05$ . Obteve-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados.

O cálculo realizado em todas as amostras (MEV ou Esteriologia) constou sobre o valor efetivo de BIC ou BA dividido pelo valor total entre as espiras da área ou superfície linear (conforme equação abaixo).

$$x = \frac{\text{valor de BIC}}{\text{valor linear total entre espiras}} \quad x = \frac{\text{valor de BA}}{\text{valor de área total entre espiras}}$$

## 4 RESULTADOS

As medidas de BIC e BA dos grupos estão resumidas na tabela 5.

**Tabela 5:** Apresentação dos resultados para as análises BIC e BA, em MEV e em Esteriologia (média/desvio padrão; letras índice diferentes equivalem à diferença significativa,  $p < 0,05$ , para cada análise bivariada).

Análise/Grupo		BIC ( $\mu\text{m}$ )	BA ( $\mu\text{m}^2$ )
MEV	Controle	807,8 ( $\pm$ 174,9) <sup>a</sup>	91599,7 ( $\pm$ 45770,3) <sup>e</sup>
	EI	977,9 ( $\pm$ 67,4) <sup>b</sup>	129465,5 ( $\pm$ 33028,8) <sup>e</sup>
	EII	761,5 ( $\pm$ 56,1) <sup>a</sup>	96763,7 ( $\pm$ 33754,3) <sup>e</sup>
	EIII	1021,1 ( $\pm$ 110,6) <sup>b</sup>	122573,7 ( $\pm$ 57385,9) <sup>f</sup>
Esteriologia	Controle	757,9 ( $\pm$ 148,3) <sup>c</sup>	63740,3 ( $\pm$ 36828,3) <sup>g</sup>
	EI	902,4 ( $\pm$ 131,4) <sup>c</sup>	100068,4 ( $\pm$ 35443,3) <sup>h</sup>
	EII	884,7 ( $\pm$ 169,6) <sup>c</sup>	87428,3 ( $\pm$ 44328,5) <sup>h</sup>
	EIII	1045,3 ( $\pm$ 162,7) <sup>d</sup>	103934,5 ( $\pm$ 40229,7) <sup>h</sup>

Fonte: Dados da Pesquisa.

### 4.1 MEV

Para avaliação das amostras submetidas à análise por meio de microscopia eletrônica de varredura, observou-se para contato entre osso e implante (BIC), que houve diferença significativa entre os grupos experimentais quando comparados ao controle. Quando avaliado o BIC podem-se observar valores de média maiores para os grupos experimentais, onde o valor encontrado para o grupo EIII (1021,1  $\mu\text{m}$ ) fora semelhante ao EI (977,9  $\mu\text{m}$ ), ambos superior aos demais grupos, tanto para o experimental EII (761,5  $\mu\text{m}$ ), como para o grupo controle (807,8  $\mu\text{m}$ ). Os grupos EIII

(20 J/cm<sup>2</sup>) e EI (10 J/cm<sup>2</sup>) superaram os valores de BIC comparando-se aos EII (5 J/cm<sup>2</sup>) e controle (0 J/cm<sup>2</sup>).

Avaliando-se a área de osso neoformado entre as espiras do implante (BA), tanto intra quanto intergrupos, não se notou diferença significativa em ambas as análises. Para avaliação intergrupos, observou-se que o grupo EIII (122573,7 μm<sup>2</sup>) apresentou significativamente maior neoformação quando comparado com o grupo controle (91599,7 μm<sup>2</sup>). Não houve diferença significativa entre os demais grupos, apenas tendências breves de variação quando se compararam os grupos EIII, EII, e controle (Figura 35).

O percentual dos valores obtidos para cada tipo de análise pode ser observado na tabela 6.

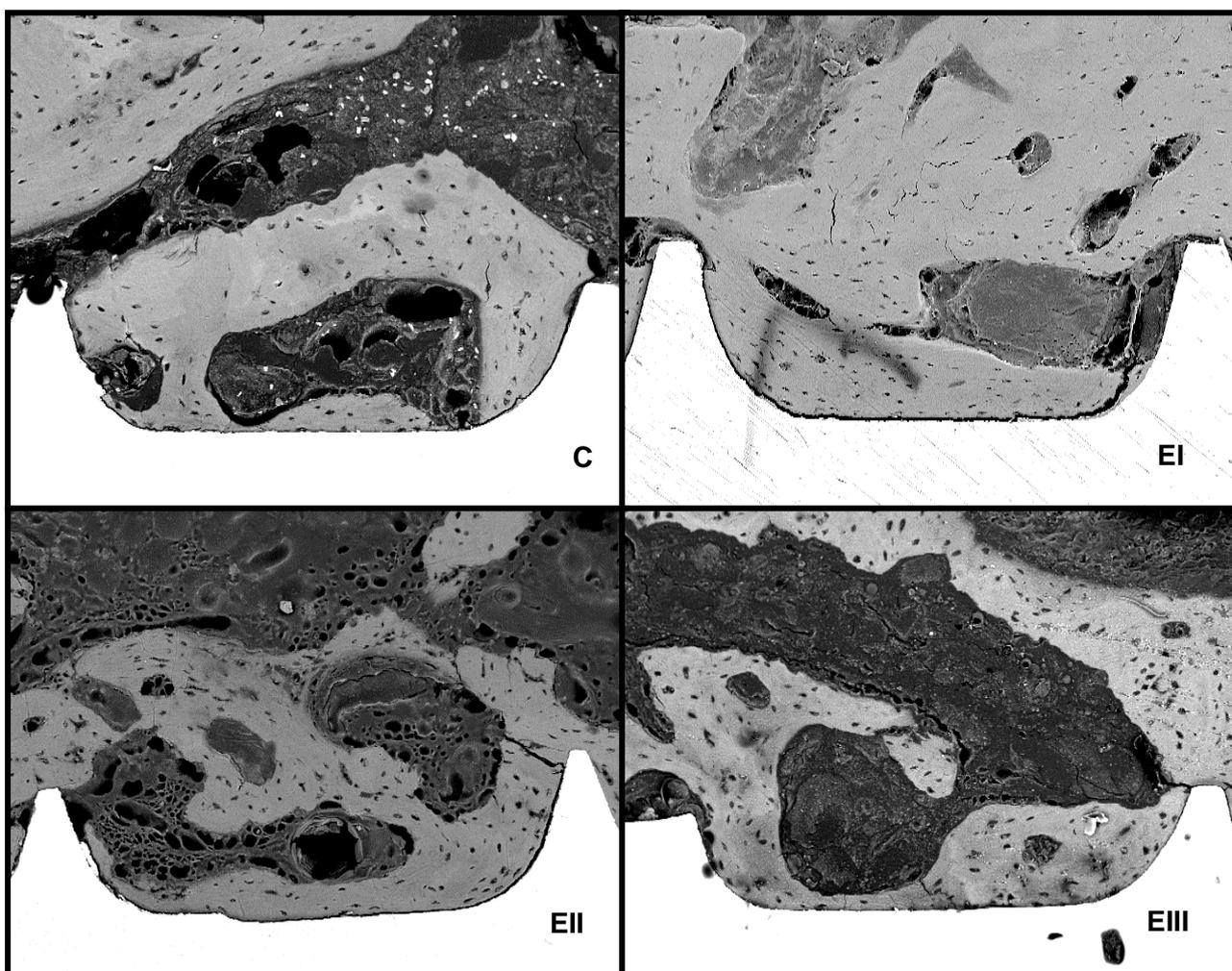
**Tabela 6:** Relação entre o grupo e o percentual de neoformação óssea tanto para BIC quanto para BA durante a análise por MEV

Grupo	Dose (J/cm <sup>2</sup> )	BIC	BA
C	0	73%	56%
EI	10	87%	77%
EII	5	69%	63%
EIII	20	93%	81%

Fonte: Dados da Pesquisa.

Os dados numéricos encontrados durante o EDS (Tabela 7) para concentração de Cálcio na região central de neoformação óssea entre as espiras dos implantes em três regiões distintas (cervical, média e apical), não apresentaram diferença significativa entre os grupos estudados (Figura 36).

**Figura 35-** Comparação dos resultados encontrados em MEV. As fotomicrografias foram realizadas em 200X, em modo BSE, da região entre espiras nos quatro diferentes grupos (C, EI, EII, EIII). Neste caso, encontrou-se diferença significativa para BIC, onde o grupo EIII apresentou melhores resultados. Em BA, o grupo EIII superou os valores do grupo controle, onde  $p=0,05$ .



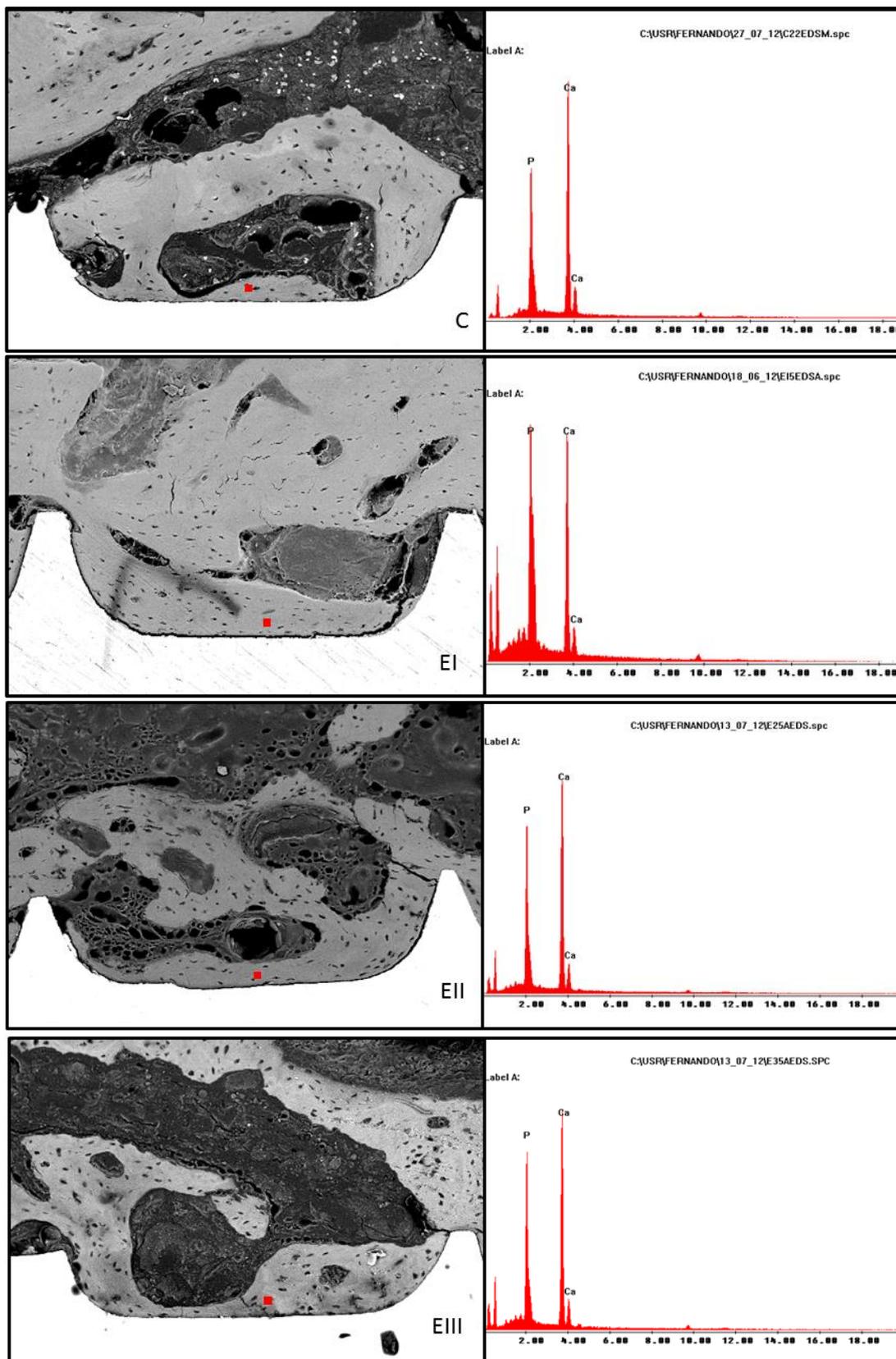
Fonte: Dados da Pesquisa.

**Tabela 7:** Apresentação dos resultados para as análises EDS para valores de cálcio (Média/Desvio Padrão).

Grupo	EDS (média/desvio padrão)	p valor
C	332,11 ( $\pm$ 23,65)	0,181
EI	235,25 ( $\pm$ 67,13)	0,164
EII	334,72 ( $\pm$ 137,57)	0,967
EIII	355,67 ( $\pm$ 32,41)	0,954

Fonte: Dados da Pesquisa.

**Figura 36-** Comparação MEV e EDS para cada um dos grupos, apresentados em foto e gráfico.



Fonte: Dados da Pesquisa.

## 4.2 Esteriologia

Verificou-se diferença significativa entre os grupos quando observado o contato entre o osso e implante – BIC. Os valores obtidos para os grupos experimentais foram maiores do que para o grupo controle. Assim sendo, o grupo controle apresentou valores de 758,0  $\mu\text{m}$ , EI= 902,4  $\mu\text{m}$ , EII=884,7  $\mu\text{m}$  e EIII= 1045,3  $\mu\text{m}$  (Figura 37). Dessa forma, o grupo EIII superou significativamente os valores de EII e EI, como também, a média do grupo controle. Avaliando-se as regiões (cervical, média e apical) dos implantes separadamente, notou-se diferença significativa entre os terços cervical (82% de contato) e apical (74% de contato), onde a região cervical apresentou maior superfície linear de contato que a região apical (Gráfico 1).

Por meio da avaliação de BA, foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos estudados. Os grupos experimentais EI (100068,3  $\mu\text{m}^2$ ) e EIII (103934,5  $\mu\text{m}^2$ ) apresentaram valores superiores aos dos grupos EII (87428,3  $\mu\text{m}^2$ ) e controle (63740,3  $\mu\text{m}^2$ ). Dessa forma, nota-se que a irradiação por LLLT possibilitou maiores valores de BA para o grupo experimental quando comparado ao controle. Avaliando separadamente os valores do grupo experimental, o efeito da LLLT fora positivo independentemente da dosagem utilizada (Gráfico 2).

O percentual dos valores obtidos para cada tipo de análise pode ser observado na tabela 8.

**Tabela 8:** Relação entre o grupo e o percentual de neoformação óssea tanto para BIC quanto para BA durante a análise por Esteriologia.

Grupo	Dose (J/cm <sup>2</sup> )	BIC (%)	BA (%)
C	0	66%	35%
EI	10	79%	57%
EII	5	78%	48%
EIII	20	92%	58%

Fonte: Dados da Pesquisa.

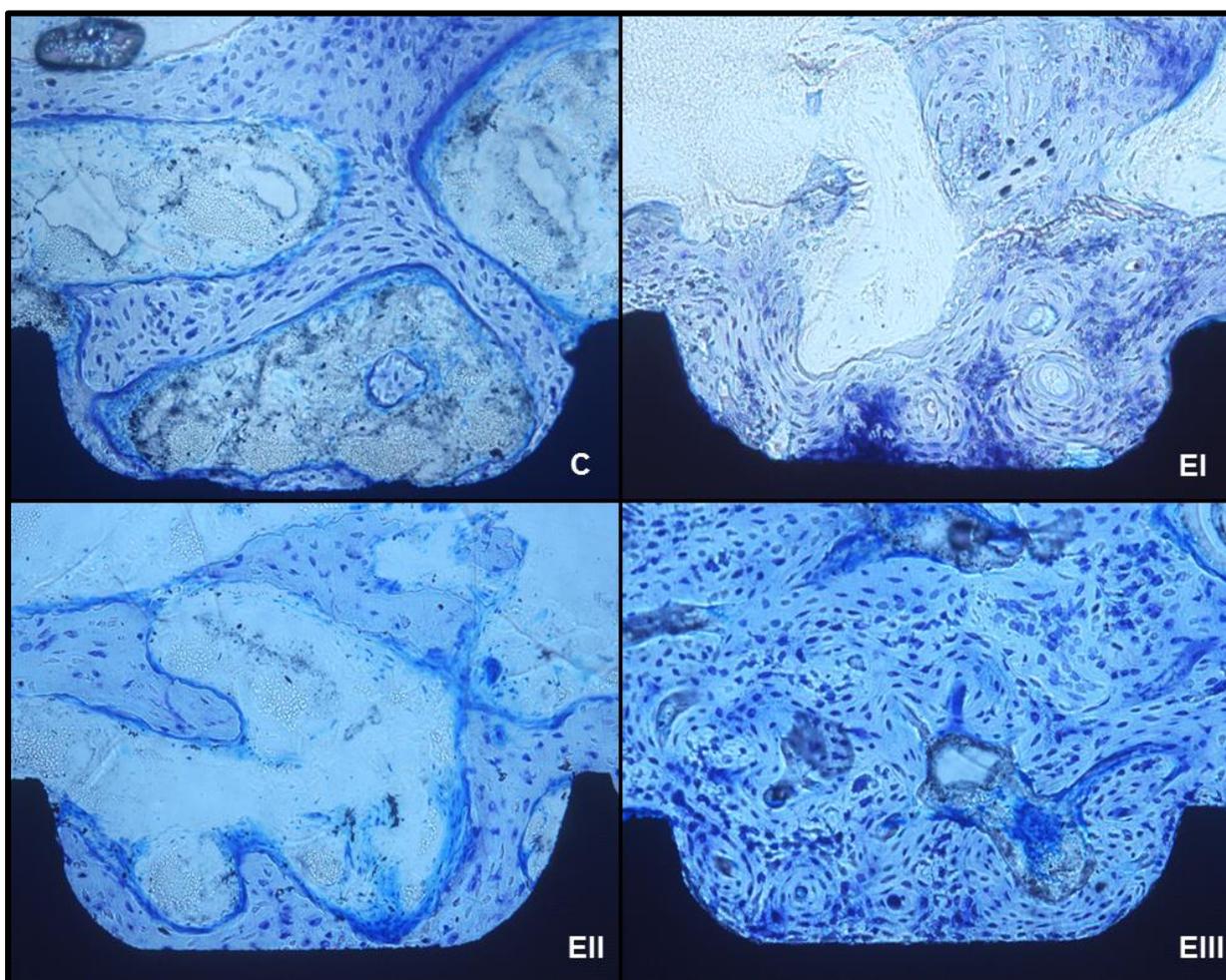
Comparando-se as regiões cervical, média e apical separadamente, observou-se diferença significativa entre elas. Assim, o percentual de BA para cada terço demonstra que na região cervical o percentual fora de 53% de neoformação óssea, para o médio 47% e para o apical 47%. Já, o percentual de BIC para cada terço foi de 82% para a cervical, 79% para o médio e 74% para o apical. Assim sendo, a região cervical foi a região onde houve o maior percentual de neoformação óssea e de contato entre osso e implante independentemente do grupo estudado (Tabela 9).

**Tabela 9:** Relação entre o percentual de BIC e BA para cada região do implante observado nas lâminas esteriológica independente do grupo estudado

Região do implante	BIC	BA
Cervical	82%*	53%*
Médio	79%	47%
Apical	74%	47%

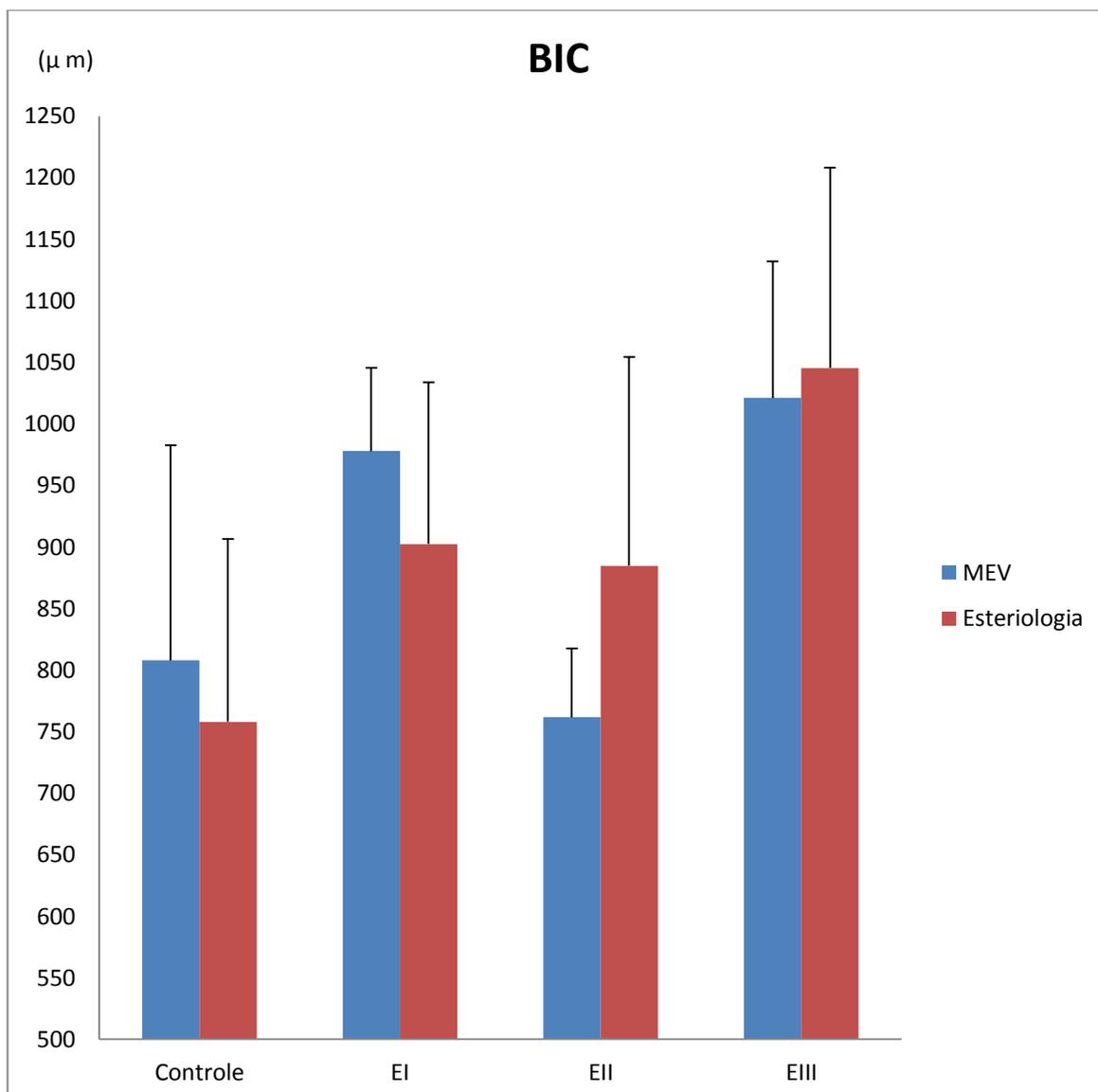
Fonte: Dados da Pesquisa. \* Diferença estatisticamente significativa

**Figura 37-** Avaliação topográfica realizadas em aumento de 200x: as imagens foram observadas por meio de microscopia óptica com lâminas coradas com Azul de Toluidina. Notar a diferença na ossificação com diferentes doses de LLLT aplicadas.



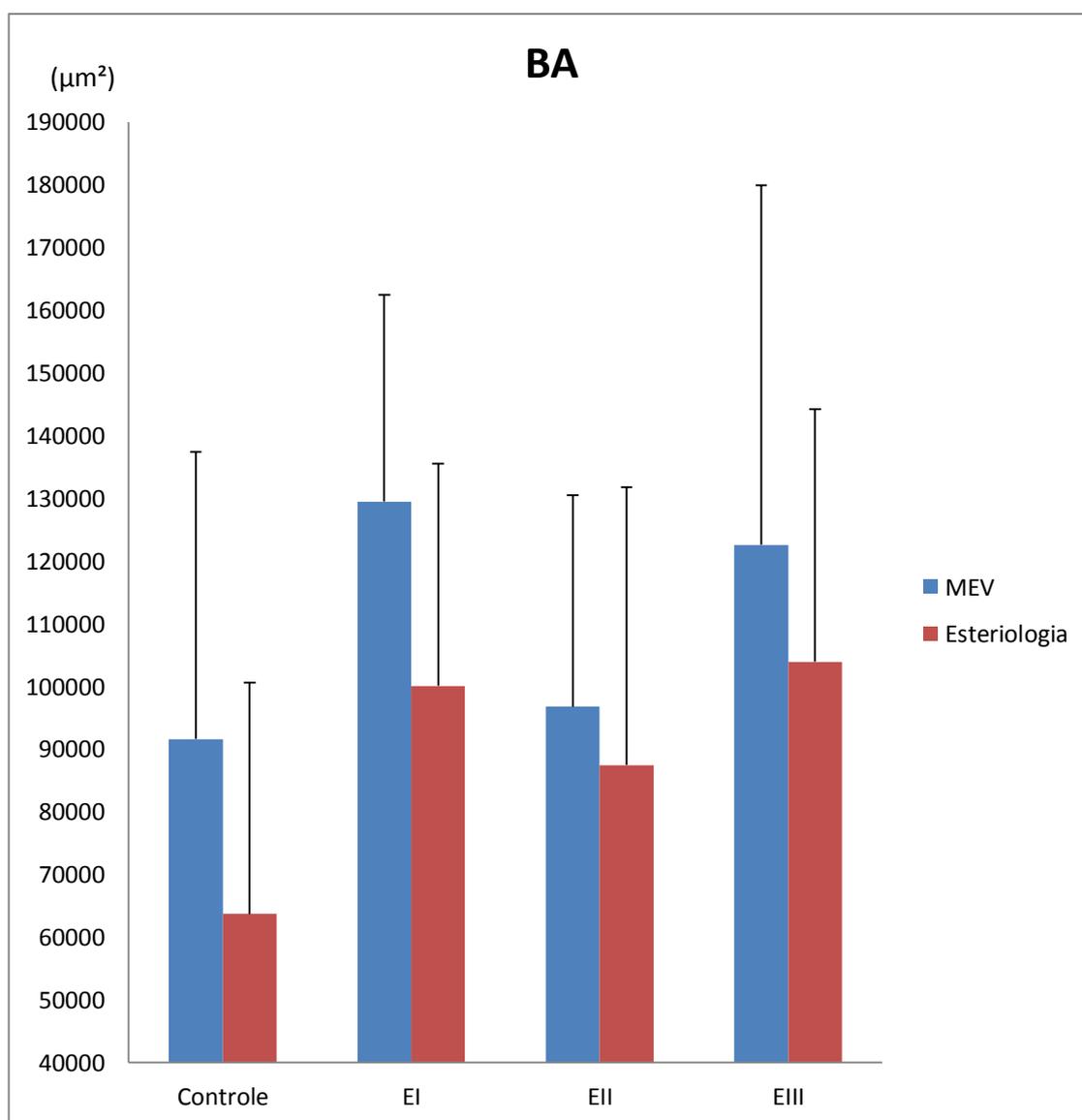
Fonte: Dados da Pesquisa.

**Gráfico 1:** Relação de contato entre osso e implante (BIC) para cada tipo de análise realizada (MEV e Esteriologia). Para MEV os valores obtidos foram C=807,8  $\mu\text{m}$  ( $\pm 174,9 \mu\text{m}$ ), EI=977,9  $\mu\text{m}$  ( $\pm 67,4 \mu\text{m}$ ), EII=761,5  $\mu\text{m}$  ( $\pm 56,1 \mu\text{m}$ ) e EIII= 1021,1  $\mu\text{m}$  ( $\pm 110,6 \mu\text{m}$ ) e para Esteriologia C=757,9  $\mu\text{m}$  ( $\pm 148,3 \mu\text{m}$ ), EI=902,4  $\mu\text{m}$  ( $\pm 131,4 \mu\text{m}$ ), EII=884,7  $\mu\text{m}$  ( $\pm 169,6 \mu\text{m}$ ) e EIII=1045,3  $\mu\text{m}$  ( $\pm 162,7 \mu\text{m}$ ).



Fonte: Dados da Pesquisa.

**Gráfico 2:** Relação de neoformação óssea perimplantar (BA) para cada tipo de análise realizada (MEV e Esteriologia). Para MEV os valores obtidos foram C=91599,7  $\mu\text{m}^2$  ( $\pm 45770,3 \mu\text{m}^2$ ), EI=129465,5  $\mu\text{m}^2$  ( $\pm 33028,8 \mu\text{m}^2$ ), EII=96763,7  $\mu\text{m}^2$  ( $\pm 33754,3 \mu\text{m}^2$ ) e EIII= 122573,7  $\mu\text{m}^2$  ( $\pm 57385,9 \mu\text{m}^2$ ) e para Esteriologia C=63740,3  $\mu\text{m}^2$  ( $\pm 36828,3 \mu\text{m}^2$ ), EI=100068,4  $\mu\text{m}^2$  ( $\pm 35443,3 \mu\text{m}^2$ ), EII=87428,3  $\mu\text{m}^2$  ( $\pm 44328,5 \mu\text{m}^2$ ) e EIII=103934,5  $\mu\text{m}^2$  ( $\pm 40229,7 \mu\text{m}^2$ ).



Fonte: Dados da Pesquisa.

## 5 DISCUSSÃO

---

O aproveitamento de material biológico, como se fez neste estudo, é de sublimar importância na atualidade, onde as questões éticas, tanto no experimento com humanos quanto em animais, estão cada vez mais aprimoradas e por consequência, limitando o número amostral ou impossibilitando, em alguns casos específicos, o seu uso em pesquisa. Dessa forma, este tipo de acordo entre pesquisadores, os quais, sem interferirem no trabalho proposto pelo colega, utilizam em conjunto as mesmas amostras viabilizando diversas pesquisas com um número de animais reduzido, levando-se em consideração, como aqui, o desenvolvimento de duas dissertações de mestrado e uma tese de doutorado. Em todos esses trabalhos citados, se fez um processamento amostral de elevada qualidade, com custos divididos e utilizando-se uma amostra de 32 animais. Acredita-se, pois, que apesar de um número amostral grande para pesquisa com coelhos observando-se a literatura universal (KHADRA e colaboradores, 2004; LOPES e colaboradores, 2005; JAKSE e colaboradores, 2007; KIM e colaboradores, 2007; LOPES e colaboradores, 2007; PEREIRA e colaboradores, 2009; CAMPANHA e colaboradores, 2010; MALUF e colaboradores, 2010; PETRI e colaboradores, 2010; PINHEIRO e colaboradores, 2012; GARCIA-MORALES e colaboradores, 2012), os mesmos foram utilizados por três pesquisadores em três trabalhos distintos (Quadro 1).

Este estudo utilizou o coelho como modelo animal, assim como observado em outros trabalhos (KHADRA e colaboradores, 2004; KHADRA, 2005; LOPES e colaboradores, 2007; PEREIRA e colaboradores, 2009; KAZEM SHAKOURI, 2010; KREISNER e colaboradores, 2010), pela facilidade do manuseio, do preparo cirúrgico, do controle pós-operatório e, principalmente, pelo tamanho adequado dos animais, o que possibilitou a inserção de implantes osseointegráveis convencionais na cavidade bucal. Quanto à colocação do implante na região do alvéolo do incisivo esquerdo mandibular logo após a extração, optou-se por essa região em detrimento à tibia para que tivéssemos o mais próximo possível de uma situação clínica real. Além disso, esse método possibilitou maior confiabilidade, pois o osso mandibular alveolar possui biologia peculiar, além de estar submetido a cargas diferentes da tibia no modelo experimental coelho (DE JONG e colaboradores, 2010).

Da mesma forma, em concordância com trabalhos já publicados (PINHEIRO e colaboradores, 2003; KHADRA e colaboradores, 2004; LOPES e colaboradores, 2005; LOPES e colaboradores, 2007; CAMPANHA e colaboradores, 2010), utilizamos a LLLT no espectro infravermelho, com comprimento de onda de 830nm, potência de 50 mW, com 2 pontos de aplicação da ponteira do laser próximo aos implantes dentários (sem sobreposição aos mesmos) inseridos na mandíbula desses animais. Foram realizados um total de 7 sessões de irradiação laser com intervalos a cada 48 horas e com diferentes doses para cada grupo experimental. A utilização de um grupo controle que não recebeu qualquer dose de LLLT, apenas a simulação desta, foi a forma escolhida para se evitar viés causado por potenciais efeitos sistêmicos do laser, anteriormente descritos (ROCHKIND e colaboradores, 1989; RODRIGO e colaboradores, 2009; FRONZA e colaboradores, 2013; MAYER, 2013). Este viés não pode ser excluído em estudos de boca dividida (GARCÍA-MORALES e colaboradores, 2012) ou lado controle e experimental no mesmo animal (PEREIRA e colaboradores, 2009).

A LLLT tem sido bastante pesquisada e indicada em odontologia muito em virtude de seu grande potencial biomodulador (KARU, 1989), com potencial efeito benéfico sobre o manejo de determinadas condições patológicas (LIRANI-GALVÃO e colaboradores, 2006; KAZEM SHAKOURI e colaboradores, 2010), na proliferação celular (KHADRA, 2005; GRASSI e colaboradores, 2011), como também, no reparo ósseo (KARU, 1989; GARCIA e colaboradores, 2001; SILVA JR e colaboradores, 2002; PINHEIRO e colaboradores, 2003; LIRANI-GALVÃO e colaboradores, 2006; WEBER e colaboradores, 2006; BLAYA e colaboradores, 2008; PINHEIRO e colaboradores, 2008; MATSUMOTO, 2009; SARACINO e colaboradores, 2009; BASHARDOOTS e colaboradores, 2010; KAZEN SHAKOURI e colaboradores, 2010; KREISNER e colaboradores, 2010; NASCIMENTO e colaboradores, 2010; GRASSI e colaboradores, 2011). Khadra (2005) realizou uma série de trabalhos buscando investigar, *in vivo* e *in vitro*, se após a aplicação da LLLT haveria maior interação celular aos tecidos adjacentes à superfície do implante. O autor concluiu que o uso de doses de LLLT entre 1 e 3 J/cm<sup>2</sup> pode modular a atividade celular quanto a interação com o implante, facilitando a sua osseointegração e aumentando as chances de sucesso do tratamento.

A fim de se obter uma condição clínica inicial para o uso do laser neste experimento, realizou-se a extração do incisivo inferior esquerdo e a inserção de um implante osseointegrável, respeitando-se as normas do fabricante tanto nos animais do grupo controle quanto nos dos grupos experimentais EI, EII e EIII, com a mesma técnica cirúrgica e pelo mesmo operador. Os cuidados sistêmicos dos animais foram monitorados por uma Médica-Veterinária responsável pelo biotério. Este procedimento visou evitar qualquer viés operacional, pois todos os animais foram submetidos à mesma rotina. A escolha de coelhos machos, também respeitou a uma padronização, evitando-se potenciais influências hormonais presentes nas fêmeas. O protocolo da LLLT foi rigidamente respeitado nos grupos experimentais e o grupo controle (C) foi submetido ao mesmo estresse de aplicação de laser, com posicionamento da ponteira, porém sem a ativação do aparelho. Esta aplicação foi realizada ao longo da basilar óssea mandibular, por lateral e medial do implante localizado através de uma marcação realizada na pele do animal. Ressalta-se, que a aplicação nunca ocorrera sobre a marcação da caneta, mas lateralmente à mesma.

Existem relatos na literatura sobre a possibilidade de efeitos sistêmicos da LLLT, em que a ação fotobiomoduladora no local de aplicação desta grandeza possa ocorrer à distância, tendo o seu efeito não só exatamente no local de sua aplicação, mas também, a nível sistêmico (ROCHKIND e colaboradores, 1989; RODRIGO e colaboradores, 2009; MAYER, 2013). Por esta razão, preconizou-se a divisão do número amostral em grupos controle e experimental distintos, entrando em discordância com alguns trabalhos que utilizaram no mesmo animal um lado como controle e o outro como experimental (JAKSE e colaboradores, 2007; PEREIRA e colaboradores, 2009) e em humanos, estudos com boca dividida (GARCÍA-MORALES e colaboradores, 2012). Verificou-se, pois, após a avaliação dos resultados destes trabalhos, a sugestão de que o lado experimental foi semelhante ao lado controle quando utilizado a LLLT, não podendo ser descartada a influência da ação sistêmica do laser sobre todos os tecidos estudados. Os resultados dessa dissertação divergem dos trabalhos previamente expostos, onde o grupo que utilizou a maior dose de LLLT (20 J/cm<sup>2</sup>) apresentara os melhores valores de BIC. Para BA, notou-se valores de neoformação óssea superiores para o grupo experimental na análise esteriológica e, em especial, para os grupos EI e EIII quando avaliado MEV.

Um dos fatores determinantes durante a fase experimental desse trabalho foi o preparo das amostras. O objetivo desta etapa foi a aquisição de amostras que possibilitassem a análise da superfície do tecido ósseo e do implante, para o MEV, e a obtenção do conjunto osso-implante em uma espessura de 30  $\mu\text{m}$  para avaliação em microscopia óptica.

Quanto à metodologia de preparo das amostras para avaliação em MEV, diferentes modelos de preparo têm sido descritos na literatura, com diferenças nos resultados de imagem obtidos. A maior parte dos modelos permite apenas um corte superficial na amostra contendo osso e implante, sem que haja maiores refinamentos que possibilitem uma avaliação mais elaborada e que permita mensurações naquelas áreas (LOPES e colaboradores, 2007). Metodologia diferenciada foi utilizada no preparo de implantes e seus pilares por meio de uma limpeza delicada em cuba ultrassônica, posicionando-os a seguir em uma superfície inerte de vinil para visualização (DELLOW, DRIESSEN, NEL, 1997). Este preparo possibilitou avaliação adequada, porém em uma situação onde não há deposição de tecido orgânico. Outra proposta foi realizada aplicando-se forças sobre o implante até a fratura dos mesmos, tendo o cuidado da adequada fixação do conteúdo amostral na máquina de pressão e a posterior colocação direta no microscópio eletrônico. Da mesma forma, quando da associação a conteúdo orgânico, esse tipo de metodologia não seria aplicável (SHEMTOV-YONA e colaboradores, 2012). Esta dissertação utilizou, tanto para a metodologia de preparo das amostras em MEV quanto em esterilogia, a imersão em resina das amostras contendo implante e osso, já que se considera um fator fundamental para que se obtenha seu máximo aproveitamento. O posicionamento das peças dentro da resina é determinante para seu corte. Considerando isto, posicionaram-se as peças visando permitir, no formato cilíndrico dos frascos em que se depositou a resina, que a amostra pudesse ser seccionada no longo eixo do implante. Dessa forma, o corte foi realizado a fim de favorecer a máxima visualização da superfície de contato entre osso e implante. Tendo em vista que a implantação dentária do coelho se faz no sentido axial, diferente do ser humano que ocorre no sentido sagital, deve-se respeitar essa informação para que se tenha sucesso nesta fase. Assim, posicionou-se a amostra de tal sorte a permitir um corte no sentido longitudinal do longo eixo do implante, fazendo com que a serra realizasse a secção de oclusal para apical, no sentido

sagital da peça. Com isso, obteve-se uma amostra cujo componente superior era constituído por uma cortical óssea alveolar espessa e a porção basilar também apresentasse volume ósseo adequado. Se fosse realizado o corte no sentido axial, o tecido ósseo resultante seria o lateral e o medial, no qual possibilitaria uma boa quantidade de osso por medial, mas o volume lateral seria mínimo ou estaria reabsorvido, pois corresponde à parede vestibular do tecido ósseo do ser humano e a anatomia normal do coelho favorece a implantação dentária mais vestibular.

A diferença entre o MEV e a esterilogia convencional através da visualização em microscópio óptico não é apenas a visualização e a magnificação, mas também o preparo das amostras. A avaliação por MEV necessita de um preparo diferenciado, a partir do desgaste de superfície da amostra, associando-se seu polimento e metalização em ouro ou carbono. A secagem em dissecadora de sílica à vácuo permite a remoção total de resquícios de formol nos poros do tecido ósseo, assim como na estrutura do implante, possibilitando o escoamento da resina por toda a peça. Posteriormente, realizou-se a metalização em ouro, um metal comum neste tipo de preparo, possibilitando, em amostras com tecido orgânico biológico, recobrimento da superfície para condução de energia. Uma alternativa seria a metalização em carbono, onde as amostras são colocadas em uma câmara com pressão (0,1 a 0,05 mbar) e o alvo metálico é bombardeado com átomos de gás inerte como, por exemplo, o argônio, para que haja a deposição sobre a amostra. Para qualquer um dos metais, o objetivo deste tipo de recobrimento é tornar as amostras condutoras de modo a gerar imagens com boa resolução no MEV. Portanto, é preciso um controle da espessura depositada a fim de evitar artefatos na imagem que possam mascarar a superfície real da amostra (DEDAVID e colaboradores, 2007).

O tipo de análise quanto a interação entre osso e implante e a área de osso neoformado em torno à superfície de titânio foram realizados para mensurar a osseointegração nos grupos irradiados ou não com LLLT nesta pesquisa. Baseamos na literatura (PEREIRA e colaboradores, 2009; KOCH e colaboradores, 2010; DOI e colaboradores, 2012; SAULACIC e colaboradores, 2012) para escolha de BIC e BA, bem como da coloração de azul de toluidina para serem aplicadas estas técnicas. Os trabalhos utilizaram diversas localizações na superfície do implante para promoverem as mensurações, sendo na região cervical (PEREIRA e

colaboradores, 2009; SAULACIC e colaboradores, 2012), no terço médio (DOI e colaboradores, 2012) e na região apical do implante (KOCH e colaboradores, 2010). Observando-se a divergência na literatura quanto a região mais propícia a se investigar o contato entre osso e implante, assim como, o volume de osso neoformado, este trabalho buscou avaliar as três regiões (cervical, média e apical), permitindo-se investigar não só qual das regiões apresentaria maior ou menor grau de osseointegração, mas também, qual dos grupos se fez mais evidente. Os resultados obtidos nesta dissertação demonstram que a região cervical apresentou maiores índices de BIC (82%) quando comparado às demais regiões (terço médio=79% e apical=74%). Para BA, esta verdade se repete, onde os índices de neoformação óssea foram maiores na região cervical, com 53% (terço médio=47% e apical=47%).

Em trabalho recente de Pinheiro e colaboradores (2012), o BIC foi avaliado em implantes colocados em região de enxertia por bloco ósseo bovino enxertado em tíbias de coelhos. Os resultados apontaram que a LLLT possibilitou o aumento em BIC com maior contato entre osso e implante em região de enxertia óssea. O presente estudo realizou a inserção dos implantes osseointegráveis diretamente no osso mandibular de coelhos após a extração do incisivo inferior esquerdo e a LLLT subsequente. Obteve-se resultado semelhante a Pereira e colaboradores (2009), já que o BIC foi superior para o grupo experimental comparando-se ao grupo controle (sem LLLT), quando da avaliação esteriológica. Na análise em MEV houve resultado semelhante, com os grupos experimentais apresentando resultados superiores ao controle, mas com semelhança entre os valores dos grupos experimentais EI (10 J/cm<sup>2</sup>) e EIII (20 J/cm<sup>2</sup>). Tal semelhança pode ter sido em virtude do pequeno número amostral que se obteve para este tipo de análise (n=8). O motivo pelo qual o número amostral é reduzido em estudos com MEV deve-se a dificuldade imposta pelo preparo amostral, assim como, ao grande exercício de lixamento sobre estas peças. Assim, a exigência gerada sobre a superfície dos tecidos a serem estudados pelo protocolo metodológico, resulta em um período considerável de trabalho. Ainda é necessário o desgaste da amostra até a região onde se quer analisar, inviabilizando qualquer outro tipo de análise *a posteriori*.

Quando da avaliação de BA nesta dissertação, para análise em MEV (n=8), durante o Teste de *Tukey*, notou-se diferença significativa do grupo EIII quando

comparado ao grupo controle ( $p=0,05$ ). Comparando-se os resultados avaliados em MEV com os obtidos na esteriologia ( $n=24$ ), nota-se que para esta segunda análise, houve diferença estatística mais evidente entre os grupos estudados, muito provavelmente em decorrência do maior número amostral. Neste caso, os grupos experimentais EI ( $10 \text{ J/cm}^2$ ) e EIII ( $20 \text{ J/cm}^2$ ) apresentaram valores de área de neoformação óssea superiores ao do grupo controle e EII ( $5 \text{ J/cm}^2$ ).

Pereira e colaboradores (2009) publicaram um artigo onde buscaram investigar os efeitos da irradiação por LLLT sobre o processo de reparo ósseo perimplantar em tíbias de 12 coelhos, sendo que a metodologia constou da análise de BIC e BA em torno desses implantes. Através da avaliação das lâminas histológicas coradas com azul de toluidina, verificou-se que a laserterapia aumentou a superfície de contato entre osso e implante comparando-se ao grupo controle, porém a área total de osso obtido foi semelhante entre todos os grupos. O presente estudo utilizou amostra maior, com divisão em quatro grupos distintos, evitando-se o uso de lado experimental e controle no mesmo animal. Os resultados apresentados quando se observa em conjunto as análises esteriológicas de BIC, o grupo experimental superou o grupo controle nesta dissertação, como da mesma forma, no trabalho de Pereira e colaboradores (2009), onde o lado experimental superou o lado controle. Outra comparação a ser considerada, foi de que nesta dissertação os resultados de BA para esteriologia foram significativos, onde os grupos EI ( $10 \text{ J/cm}^2$ ) e EIII ( $20 \text{ J/cm}^2$ ) superaram os valores do grupo controle. Para o trabalho de Pereira e colaboradores (2009) este resultado não foi encontrado, apesar dos autores terem utilizado o controle no mesmo animal experimental. O que podemos notar de diferente, foi que os grupos teste e controle foram aplicados no mesmo animal, diferentemente desta dissertação, que preferiu a divisão amostral em grupos, separando o controle do experimental da mesma amostra.

## 6 CONCLUSÃO

---

Na amostra estudada:

- a) o uso da LLLT melhorou a interação osso-implante e a neoformação óssea perimplantar, sugerindo potencial efeito positivo sobre a osseointegração, especialmente na dose 20 J/cm<sup>2</sup> por sessão.
- b) na análise esteriológica, a LLLT na dose por sessão de 20 J/cm<sup>2</sup> apresentou os melhores resultados. Em BA, os grupos irradiados EI e EIII foram superiores ao controle.
- c) na análise por MEV, os grupos irradiados nas doses por sessão de 10 e 20 J/cm<sup>2</sup>, apresentaram os melhores resultados de BIC, enquanto 20 J/cm<sup>2</sup> por sessão foi superior para BA.
- d) não houve alteração da concentração de cálcio na zona de contato entre osso e implante.

## REFERÊNCIAS

---

ABOELSAAD, N. S.; SOORY, M.; GADALLA, L. M.; RAGAB, L. I.; DUNNE, S.; ZALATA, K. R.; LOUCA, C. Effect of soft laser and bioactive glass on bone regeneration in the treatment of infra-bony defects (a clinical study). **Lasers Med Sci.**, v. 24, no. 3, p. 387-395, May. 2009.

ADELL, R.; LEKHOLM, U.; ROCKLER, B.; BRÅNEMARK, P. I. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. **Int J Oral Surg.**, v. 10, no. 6, p. 387-416, Dec. 1981.

ARAUJO, C.R.P., STANCARI, F.H., ARAUJO, M.A.R. **Comunicação pessoal**, 2012.

BASHARDOUST TAJALI, S.; MACDERMID, J. C.; HOUGHTON, P.; GREWAL, R. Effects of low power laser irradiation on bone healing in animals: a meta-analysis. **J Orthop Surg Res.**, v. 4, no. 5, p. 1-10, Jan. 2010.

BLAYA, D. S.; GUIMARÃES, M. B.; POZZA, D. H.; WEBER, J. B.; DE OLIVEIRA, M. G. Histologic study of the effect of laser therapy on bone repair. **J Contemp Dent Pract.**, v. 9, no.6, p. 41-48, Sep. 2008.

BRÅNEMARK, P. I.; ADELL, R.; BREINE, U.; HANSSON, B. O.; LINDSTRÖM, J.; OHLSSON, A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. **Scand J Plast Reconstr Surg.**, v. 3, no. 2, p. 81-100, Feb. 1969.

BRÅNEMARK, P. I.; HANSSON, B. O.; ADELL, R.; BREINE, U.; LINDSTRÖM, J.; HALLÉN, O.; OHMAN, H. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaws. Experience from a 10-year period. **Scand J Plast Reconstr Surg.**, v.11, no.16, p. 1-32, Oct./Nov. 1977.

BRÅNEMARK, R.; OHRNELL, L. O.; SKALAK, R.; CARLSSON, L.; BRÅNEMARK, P. I. Biomechanical characterization of osseointegration: an experimental in vivo investigation in the beagle dog. **J Orthop Res.**, v. 16, no. 1, p. 61-69, Jan. 1998.

CAMPANHA, B. P.; GALLINA, C.; GEREMIA, T.; LORO, R. C.; VALIATI, R. ; HÜBLER, R.; DE OLIVEIRA, M. G. Low-level laser therapy for implants without initial stability. **Photomed Laser Surg.**, v. 28, no. 3, p. 365-369, Jun. 2010.

CARLSSON, L.; RÖSTLUND, T.; ALBREKTSSON, B.; ALBREKTSSON, T.; BRÅNEMARK, P. I. Osseointegration of titanium implants. **Acta Orthop Scand.**, v. 57, no. 4, p. 285-289, Aug. 1986.

DE JONG, W. C.; KORFAGE, J. A.; LANGENBACH, G. E. Variations in habitual bone strains in vivo: long bone versus mandible. **J Struct Biol.**, v. 172, no. 3, p. 311-318, Dec. 2010.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. Microscopia **eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras** – materiais poliméricos, metálicos e semicondutores. Porto Alegre: EDIPUCRS; 2007. 60p.

DELLOW, A. G.; DRIESSEN, C. H.; NEL, H. J. Scanning electron microscopy evaluation of the interfacial fit of interchanged components of four dental implant systems. **Int J Prosthodont.**, v. 10, no. 3, p. 216-221, May. 1997.

DOI, K.; OUE, H.; MORITA, K.; KAJIHARA, S.; KUBO, T.; KORETAKE, K.; PERROTTI, V.; IEZZI, G.; PIATTELLI, A.; AKAGAWA, Y. Development of implant/interconnected porous hydroxyapatite complex as new concept graft material. **PLoS One.**, v. 7, no. 11, p. e49051, Nov. 2012.

DÖRTBUDAK, O.; HAAS, R.; MAILATH-POKORNY, G. Effect of low-power laser irradiation on bony implant sites. **Clin Oral Implants Res.**, v. 13, no. 3, p. 288-92, Jun. 2002.

FRONZA, B.; SOMACAL, T.; MAYER, L.; DE MORAES, J. F.; DE OLIVEIRA, M. G.; WEBER, J. B. Assessment of the systemic effects of low-level laser therapy (LLLT) on thyroid hormone function in a rabbit model. **Int J Oral Maxillofac Surg.**, v. 42, no. 1, p. 26-30, Jan. 2013.

GALLI, C.; PIEMONTESE, M.; RAVANETTI, F.; LUMETTI, S.; PASSERI, G.; GANDOLFINI, M.; MACALUSO, G. M. Effect of surface treatment on cell responses to grades 4 and 5 titanium for orthodontic mini-implants. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.**, v. 141, no. 6, p. 705-714, Jun. 2012.

GARCIA, G. V. et al. Processo de reparo em feridas de extração dental tratadas com laser em baixa intensidade (904nm), com diferentes energias de irradiação: estudo histológico em ratos. **Rev. Fac. Odont. Lins.**, v. 14, n. 2, p. 27-35, jul. 2001.

GARCÍA-MORALES, J. M.; TORTAMANO-NETO, P.; TODESCAN, F. F.; DE ANDRADE JR, J. C.; MAROTTI, J.; ZECELL, D. M. Stability of dental implants after

irradiation with an 830-nm low-level laser: a double-blind randomized clinical study. **Lasers Med Sci.**, v.27, no.4, p. 703-711, Jul. 2012.

GERBI, M. E.; PINHEIRO, A. L.; MARZOLA, C.; LIMEIRA JR, F. A.; RAMALHO, L. M.; PONZI, E. A.; SOARES, A. O.; CARVALHO, L. C.; LIMA, H. V.; GONÇALVES, T. O. Assessment of bone repair associated with the use of organic bovine bone and membrane irradiated at 830 nm. **Photomed Laser Surg.**, v. 23, no. 4, p. 382-398, Aug. 2005.

GRASSI, F. R.; CICCOLELLA, F.; D'APOLITO, G.; PAPA, F.; IUSO, A.; SALZO, A. E.; TRENTADUE, R.; NARDI, G. M.; SCIVETTI, M.; DE MATTEO, M.; SILVESTRIS, F.; BALLINI, A.; INCHINGOLO, F.; DIPALMA, G.; SCACCO, S.; TETÈ, S. Effect of low-level laser irradiation on osteoblast proliferation and bone formation. **J Biol Regul Homeost Agents.**, v.25, no. 4, p. 603-14, Oct./Dec. 2011.

JAKSE, N.; PAYER, M.; TANGL, S.; BERGHOLD, A.; KIRMEIER, R.; LORENZONI, M. Influence of low-level laser treatment on bone regeneration and osseointegration of dental implants following sinus augmentation. An experimental study on sheep. **Clin Oral Implants Res.**, v. 18, no. 4, p. 517-524, Aug. 2007.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica – Texto e Atlas**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524 p.

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

KHADRA, M.; RONOLD, H. J.; LYGSTADAAS, S. P.; ELLINGSEN, J. E.; HAANAES, H. R. Low-level laser therapy stimulates bone-implant interaction: an experimental study in rabbits. **Clin Oral Implants Res.**, v. 15, no. 3, p. 325-32, Jun. 2004.

KHADRA M. The effect of low level laser irradiation on implant-tissue interaction. In vivo and in vitro studies. **Swed Dent J Suppl.**, v. 172, no. 1, p. 1-63, Jan. 2005.

KAZEM SHAKOURI, S.; SOLEIMANPOUR, J.; SALEKZAMANI, Y.; OSKUIE, M. R. Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process. **Lasers Med Sci.**, v. 25, no. 1, p. 73-77, Jan. 2010.

KIM, Y. D.; KIM, S. S.; HWANG, D. S.; KIM, S. G.; KWON, Y. H.; SHIN, S. H.; KIM, U. K.; KIM, J. R.; CHUNG, I. K. Effect of low-level laser treatment after installation of

dental titanium implant-immunohistochemical study of RANKL, RANK, OPG: an experimental study in rats. **Lasers Surg Med.**, v. 39, no. 5, p. 441-450, Jun. 2007.

KOCH, F. P.; WENG, D.; KRÄMER, S.; BIESTERFELD, S.; JAHN-EIMERMACHER, A.; WAGNER, W. Osseointegration of one-piece zirconia implants compared with a titanium implant of identical design: a histomorphometric study in the dog. **Clin Oral Implants Res.**, v. 21, no. 3, p. 350-356, Mar. 2010.

KREISNER, P. E.; BLAYA, D. S.; GAIÃO, L.; MACIEL-SANTOS, M. E.; ETGES, A.; SANTANA-FILHO, M.; DE OLIVEIRA, M. G. Histological evaluation of the effect of low-level laser on distraction osteogenesis in rabbit mandibles. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.**, v. 15, no.4, p. 616-618, Jul. 2010.

KUCEROVÁ, H.; DOSTÁLOVÁ, T.; HIMMLOVA, L.; BÁRTOVÁ, J.; MAZÁNEK, J. Low-level laser therapy after molar extraction. **J Clin Laser Med Surg.**, v. 18, no. 6, p. 309-315, Dec. 2000.

LIRANI-GALVÃO, A. P.; JORGETTI, V.; LOPES DA SILVA, O. Comparative study of how low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound affect bone repair in rats. **Photomed Laser Surg.**, v. 24, no. 6, p. 735-740, Dec. 2006.

LOPES, C. B.; PINHEIRO, A. L.; SATHAIAH, S.; DUARTE, J.; CRISTINAMARTINS, M. Infrared laser light reduces loading time of dental implants: a Raman spectroscopic study. **Photomed Laser Surg.**, v. 23, no. 1, p. 27-31, Feb. 2005.

LOPES, C. B.; PINHEIRO, A. L.; SATHAIAH, S.; DA SILVA, N. S.; SALGADO, M. A. 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.**, v. 25, no. 2, p. 96-101, Apr. 2007.

MALUF, A. P.; MALUF, R. P.; BRITO, C. D. A.; FRANÇA, F. M.; DE BRITO JR, R. B. Mechanical evaluation of the influence of low-level laser therapy in secondary stability of implants in mice shinbones. **Lasers Med Sci.**, v. 25, no. 5, p. 693-698, Sep. 2010.

MATSUMOTO, M. A.; FERINO, R. V.; MONTELEONE, G. F.; RIBEIRO, D. A. Low-level laser therapy modulates cyclo-oxygenase-2 expression during bone repair in rats. **Lasers Med Sci.**, v. 24, no. 2, p. 195-201, Mar. 2009.

MAYER, L. **Análise do efeito sistêmico da LLLT em região perimplantar: estudo em coelhos.** 2013. 146p. Tese (Doutorado em Cirurgia e Traumatologia Bucal)

Maxilo-Faciais) – Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MOZZATI, M.; MARTINASSO, G.; COCERO, N.; POL, R.; MAGGIORA, M.; MUZIO, G.; CANUTO, R. A. Influence of Superpulsed Laser Therapy on Healing Processes Following Tooth Extraction. **Photomed Laser Surg.**, v. 29, no. 8, p. 565-571, Aug. 2011.

NASCIMENTO, S. B.; CARDOSO, C. A.; RIBEIRO, T. P.; ALMEIDA, J. D.; ALBERTINI, R.; MUNIN, E.; ARISAWA, E. A. Effect of low-level laser therapy and calcitonin on bone repair in castrated rats: a densitometric study. **Photomed Laser Surg.**, v. 28, no. 1, p. 45-49, Feb. 2010.

OSTMAN, P. O.; WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T. Immediate occlusal loading of NanoTite PREVAIL implants: a prospective 1-year clinical and radiographic study. **Clin Implant Dent Relat Res.**, v. 12, no. 1, p. 39-47, Mar. 2010.

OTULAKOWSKA, J.; NICHOLSON, J. W. Scanning electron microscopy and energy dispersive X-ray study of a recovered dental implant. **J Mater Sci Mater Med.**, v. 17, n. 3, p. 277–279, Mar. 2006.

PEREIRA, C. L.; SALLUM, E. A.; NOCITI JR, F. H.; MOREIRA, R. W. The effect of low-intensity laser therapy on bone healing around titanium implants: a histometric study in rabbits. **Int J Oral Maxillofac Implants.**, v. 24, no. 1, p. 47-51, Jan/Feb. 2009.

PETRI, A. D.; TEIXEIRA, L. N.; CRIPPA, G. E.; BELOTI, M. M.; DE OLIVEIRA, P. T.; ROSA, A. L. Effects of low-level laser therapy on human osteoblastic cells grown on titanium. **Braz Dent J.**, v. 21, no.6, p. 491-498, Nov. 2010.

PINHEIRO, A. L. B., DE OLIVEIRA, M.; MARTINS, P. P. M.; RAMALHO, L. M. P.; OLIVEIRA, M. A. M.; NOVAES JR., A.; NICOLAU, R. A. Biomodulatory effects of LLLT on bone regeneration. **Laser Therapy J.**, v. 13, no. 1, p. 73-79, Jan. 2001.

PINHEIRO, A. L.; LIMEIRA JR., F. A.; GERBI, M. E.; RAMALHO, L. M.; MARZOLA, C.; PONZI, E. A.; SOARES, A. O.; DE CARVALHO, L. C.; LIMA, H. C.; GONÇALVES, T. O. 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.**, v. 21, no. 6, p. 301-306, Dec. 2003.

PINHEIRO, A. L.; GERBI, M. E. Photoengineering of bone repair processes. **Photomed Laser Surg.**, v. 24, no. 2, p. 169-178, Apr. 2006.

PINHEIRO, A. L.; GERBI, M. E.; PONZI, E. A.; RAMALHO, L. M.; MARQUES, A. M.; CARVALHO, C. M.; SANTOS, R. C.; OLIVEIRA, P. C.; NÓIA, M. Infrared laser light further improves bone healing when associated with bone morphogenetic proteins and guided bone regeneration: an in vivo study in a rodent model. **Photomed Laser Surg.**, v. 26, no.2, p. 167-174, Apr. 2008.

PINHEIRO, A. L. B. Advances and perspectives on tissue repair and healing. **Photomed Laser Surg.**, v. 27, no. 6, p. 833-836, Dec. 2009.

PINHEIRO, A. L.; MAGALHÃES JR., E. B.; MAGALHÃES, C. A. B.; FERREIRA, C. F.; FREITAS, A. C. Bone-implant contact around dental implants inserted in bovine block graft treated with low level laser therapy: an experimental study in rabbits. **Lasers Med Sci.**, v. 27, no. 6, p.; 1126, Nov. 2012.

PRETEL, H.; LIZARELLI, R. F. Z.; RAMALHO, L. T. O. Effect of low-level laser therapy on bone repair: histological study in rats. **Lasers Surg Med.**, v. 39, no. 10, p. 788-796, Dec. 2007.

PRETTO, J. L. B. **Avaliação por meio de MEV da região periimplantar após irradiação com laser diodo, infravermelho ( $\lambda = 830$  nm), em implantes de titânio situados em tíbia de ratos.** 2004. 133f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

ROCHKIND, S.; ROUSSO, M.; NISSAN, M.; VILLARREAL, M.; BARR-NEA, L.; REES, D. G. Systemic effects of low-power laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds, and burns. **Lasers Surg Med.**, v. 9, no. 2, p. 174-182, Feb. 1989.

RODRIGO, S. M.; CUNHA, A.; POZZA, D. H.; BLAYA, D. S.; MORAES, J. F.; WEBER, J. B.; DE OLIVEIRA, M. G. Analysis of the systemic effect of red and infrared laser therapy on wound repair. **Photomed Laser Surg.**, v. 27, no. 6, p. 929-935, Dec. 2009.

SARACINO, S.; MOZZATI, M.; MARTINASSO, G.; POL, R.; CANUTO, R. A.; MUZIO, G. Superpulsed laser irradiation increases osteoblast activity via modulation of bone morphogenetic factors. **Lasers Surg Med.**, v. 14, no. 4, p. 298-304, Apr. 2009.

SAULACIC, N.; BOSSHARDT, D. D.; BORNSTEIN, M. M.; BERNER, S.; BUSER, D. Bone apposition to a titanium-zirconium alloy implant, as compared to two other titanium-containing implants. **Eur Cell Mater.**, v. 23, no. 4, p. 273-286, Apr. 2012.

SHEMTOV-YONA, K.; RITTEL, D.; MACHTEI, E. E.; LEVIN, L. Effect of Dental Implant Diameter on Fatigue Performance. Part II: Failure Analysis. **Clin Implant Dent Relat Res.** 2012 [Epub ahead of print].

SHIBLI, J. A.; THEODORO, L. H.; HAYPEK, P.; GARCIA, V. G.; MARCANTONIO JR, E. The effect of CO<sub>2</sub> laser irradiation on failed implant surfaces. **Implant Dent.**, v. 13, no. 4, p. 342-351, Dec. 2004.

SILVA JR., A. N.; PINHEIRO, A. L.; OLIVEIRA, M. G.; WEISMANN, R.; RAMALHO, L. M.; NICOLAU, R.A. Computerized morphometric assessment of the effect of low-level laser therapy on bone repair: an experimental animal study. **J Clin Laser Med Surg.**, v. 20, no. 2 p. 83-87, Apr. 2002.

VAQUERO-AGUILAR, C.; JIMÉNEZ-MELENDO, M.; TORRES-LAGARES, D.; LLENA-BLASCO, O.; BRUGUERA, A.; LLENA-BLASCO, J.; GARCÍA-CALDERÓN, M.; VELÁZQUEZ-CAYÓN, R.; GUTIÉRREZ-PÉREZ, J. L. Zirconia implant abutments: microstructural analysis. **Int J Oral Maxillofac Implants.**, v. 27, no. 4, p. 785-791, Jul. 2012.

WEBER, J. B. B.; PINHEIRO, A. L. B.; GERHARDT DE OLIVEIRA, M.; OLIVEIRA, F. A. M.; RAMALHO, L. M. P. Laser therapy improves healing of bone defects submitted to autologous bone graft. **Photomed Laser Surg.**, v. 24, no. 1, p. 38-44, Feb. 2006.

## ANEXOS

### Anexo I – Aprovação no CEUA/HCPA: registro nº 110449.



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:** 110449

**Data da Versão do Projeto:** 14/10/2011

**Pesquisadores:**

EDELA PURICELLI

LUCIANO MAYER

MARÍLIA GERHARDT DE OLIVEIRA

JOÃO BATISTA BLESSMANN WEBER

FABRÍCIO POLETTI MASSOTTI

FERNANDO VACILOTTO GOMES

DEISE PONZONI

**Título:** ANÁLISE DO EFEITO LOCAL E SISTÊMICO DA LLLT EM REPARO TECIDUAL PERIMPLANTAR: 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 CEP/HCPA.

Porto Alegre, 21 de dezembro de 2011.

Dr. Alessandro Bersch Osvaldt  
Coordenador da CEUA/HCPA

**Anexo II – Aprovação no CEUA/HCPA: registro nº 120112.****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:** 120112

**Data da Versão do Projeto:** 09/05/2012

**Pesquisadores:**

CARLOS EDUARDO E BARALDI

DEISE PONZONI

LUCIANO MAYER

MARÍLIA GERHARDT DE OLIVEIRA

FERNANDO VACILOTTO GOMES

JOÃO BATISTA BLESSMANN WEBER

FABRÍCIO POLETTI MASSOTTI

**Título:** TERAPIA LASER DE BAIXA INTENSIDADE NO REPARO PERIMPLANTAR: 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, 24 de maio de 2012.

Dr. Alessandro Osvaldt  
Coordenador CEUA/HCPA

## Anexo III – Justificativa do cálculo do tamanho da amostra.

### Cálculo amostral

Durante o planejamento e a elaboração do projeto de pesquisa, uma das principais dúvidas é saber o valor do "n" (tamanho da amostra) necessário para o estudo. Apesar desta pergunta ser muito freqüente, as dificuldades em se obter um cálculo adequado são muitas e raramente encontra-se uma resposta precisa.

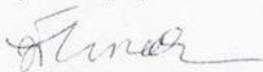
É preciso fornecer informações que dependam de estudos anteriores, dados de literatura e do conhecimento sobre o fenômeno que será estudado. Um bom pesquisador deve saber que um cálculo de amostra não depende apenas de "parâmetros estatísticos", tais como o nível de significância  $\alpha$  e o poder do teste  $(1 - \beta)$ . Mais importantes do que estes parâmetros são as informações que devem ser fornecidas com base no conhecimento clínico, como por exemplo, estimativas sobre a variabilidade da medida de interesse e a diferença considerada clinicamente relevante que se deseja detectar (muitas vezes chamada de "tamanho do efeito").

Convém refletir sobre a real necessidade de um cálculo que utiliza apenas teoria estatística sem levar em conta outras questões importantes, tais como dificuldades logísticas na obtenção dos dados. Nem sempre o cálculo baseado em alfas, betas, etc. é possível ou imprescindível.

O tamanho da amostra deve ser justificado com base em outros estudos, pois o cálculo por meio de fórmulas exige informações referentes à variabilidade da variável de interesse e sobre qual a diferença entre os parâmetros com relevância clínica.

Quando se utiliza testes não paramétricos, há uma dificuldade na determinação do tamanho das amostras, pois os mesmos são aplicados para distribuições livres (não normais), podendo ter alta variabilidade e amostras pequenas.

Portanto, para determinação do tamanho da amostra deste estudo com modelo experimental com coelho, optou-se por determinar o "n" em 06 para cada grupo, baseando-se nos estudos de Khadra et al. (2004), Lopes et al. (2005), Lopes et al. (2007), Li et al. (2009), Bae et al. (2009) e Pereira et al. (2009), nos quais o "n" dos grupos, seja teste ou controle, ficou sempre entre 05 e 08. Estas pesquisas foram realizadas para estudar a cicatrização do tecido ósseo em coelhos com a associação da LLLT (em sua maioria na região perimplantar) apresentando resultados estatisticamente significativos.



Prof. Dr. João Feliz Duarte de Moraes  
Coordenador do Deptº de Estatística  
da Faculdade de Matemática da PUCRS

Prof. Dr. João Feliz Duarte de Moraes  
Coordenador do Departamento de Estatística  
Faculdade de Matemática - PUCRS  
Av. Ipiranga, 6681 - Predio 30 - Bloco C - sala 104  
Tel.:(051)3320-3531 Ramal 4214 ou 33534214  
E-mail: jfmoraes@pucri.br

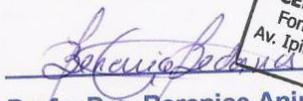
## Anexo IV – Autorização para uso do Centro de Microscopia e Microanálise da PUCRS.

Porto Alegre, agosto de 2011

À Comissão de Ética no Uso de Animais - UFRGS

Venho, pelo presente, informar que a utilização dos equipamentos do Centro de Microscopia e Microanálise para a preparação de amostras e obtenção de imagens via microscopia eletrônica de varredura e EDS que serão utilizadas no trabalho a ser realizado pela Profa. Dra. Deise Ponzoni e pela Profa. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira intitulado “ANÁLISE DO EFEITO LOCAL E SISTÊMICO DA LLLT EM REPARO TECIDUAL PERIMPLANTAR: ESTUDO EM COELHOS” está autorizada desde que sejam observadas as normas de utilização do CEMM.

Atenciosamente,

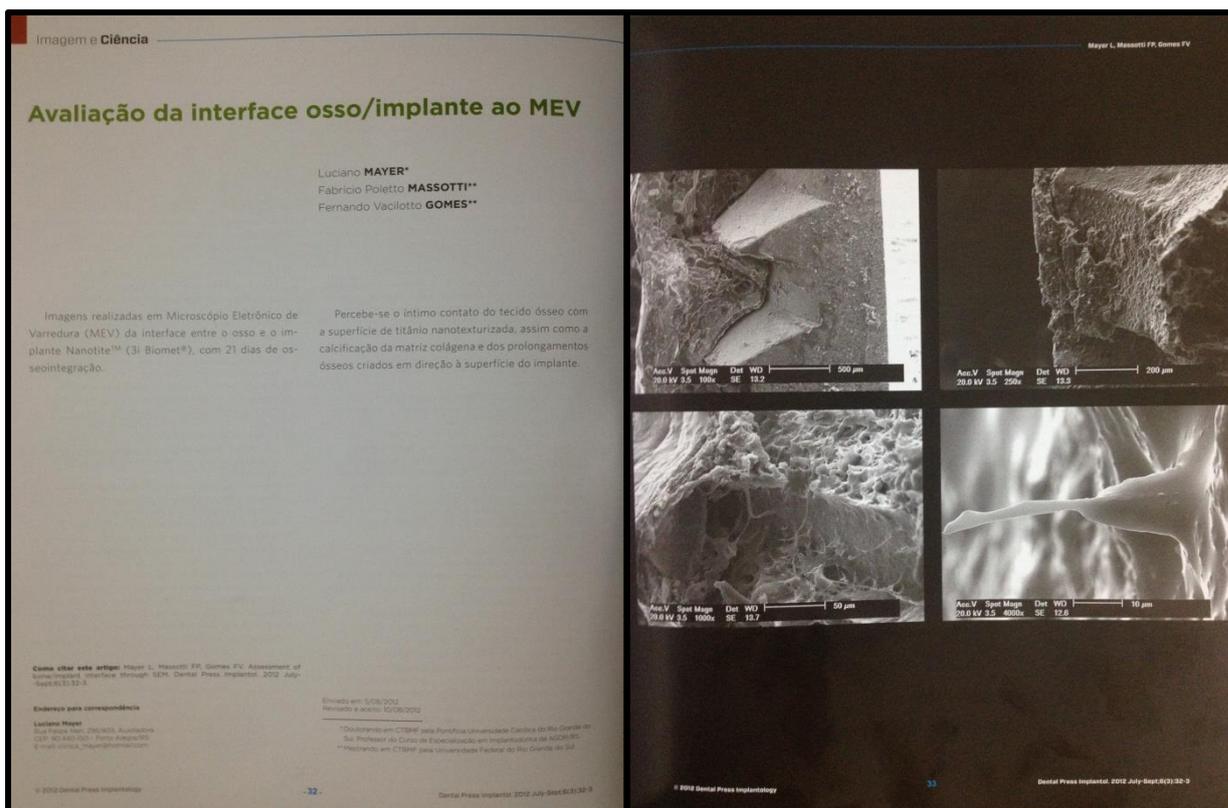
  
Prof. Dra. Berenice Anina Deza  
Coordenadora do Centro de Microscopia e Microanálise (CEMM)  
PUCRS

**IDÉIA** - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento  
**CEMM** - Centro de Microscopia e Microanálise  
Fone: (51) 3353-4490 - Fax: (51) 3320-3904  
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 30 - Bloco B - Sala 501  
CEP 90619-900 - Porto Alegre - RS

## APÊNCIDE

### Apêndice I – Publicações realizadas no CEUA/HCPA: registro nº 120112.

a) **Publicação de imagens MEV do piloto realizados na Revista Dental Press Implantology em 2012.** [Mayer L, Massotti FP, Gomes FV. Assessment of bone/implant interface through SEM. Dent Press Implantol. 2012 Jul-Sep; 6(3):32-33].



**Apêndice II – Artigos submetidos a periódicos nacionais e internacionais realizadas com o registro nº 120112 (CEUA/HCPA).**

- a) Artigo intitulado **“Improvement on Bone Implant Contact (BIC) and Bone Area (BA) after LLLT: Analysis by Resonance Frequency (ISQ - Osstell®) and Scanning Electron Microscopy (SEM)”** será submetido à apreciação no periódico internacional **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery (IJOMS)**.
  
- b) Artigo intitulado **“Effect of low-level laser therapy on peri-implant bone healing: a systematic review of the literature”** submetido à apreciação no periódico internacional **The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants (IJOMI)**.
  
- c) Artigo intitulado **“Preparation of biological samples containing both metallic and organic structures for SEM”** submetido à apreciação no periódico nacional **Revista de Ciências Médicas e Biológicas (UFBA)**.
  
- d) Artigo intitulado **“Imagem histomorfométrica de 40x realizada na interface entre osso e implante Nanotite™ (3i Biomet®), em mandíbula de coelhos, após 21 dias de osseointegração, sendo que a coloração utilizada foi a de azul de toluidina”** submetido à apreciação no periódico nacional **Revista Dental Press Implantology, sessão Imagem e Ciência**.

**Apêndice III – Artigo da dissertação que será submetido à avaliação de periódico internacional.**

**Reparo ósseo perimplantar após terapia laser de baixa intensidade em coelhos: esterilogia e MEV**

**Revistas Alvo:**

IJOMS (A1)  
Lasers in Medical Science (A2)  
Clin Oral Imp Res (A2)  
Photomedicine (B1)

**Correspondência:**

***Fernando V Gomes***

Avenida Independência 1087/303  
90035-077 - Independência  
Porto Alegre, RS, Brasil  
+55 (51) 3377-8103  
fernandovg2005@yahoo.com.br

## Resumo

**Contexto:** A laserterapia de baixa potência (LLLT) possui efeito favorável sobre o reparo ósseo perimplantar, facilitando e acelerando esta fase pós-cirúrgica.

**Objetivo:** avaliar se a LLLT modifica o padrão de reparo ósseo perimplantar em mandíbula de coelhos através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e esteriodologia.

**Materiais and Métodos:** Realizou-se a exodontia do incisivo inferior esquerdo seguido da inserção imediata de um implante osseointegrável em 32 coelhos da raça Nova Zelândia, machos. Foi aplicado a LLLT (GaAAs infravermelho,  $\lambda=830$  nm, 50mW, 7 sessões, 13 dias), conforme cada grupo, com 8 animais cada: grupo C (placebo), EI (10 J/cm<sup>2</sup>), EII (5 J/cm<sup>2</sup>) e EIII (20J/cm<sup>2</sup>). Os resultados foram avaliados estatisticamente (ANOVA e Teste de *Tukey*,  $p<0,05$ ).

**Resultados:** Para MEV, o BIC demonstrou médias maiores para os grupos experimentais, em que EIII (1021,1  $\mu\text{m}$ ) e EI (977,9  $\mu\text{m}$ ) superaram os valores e EII (761,5  $\mu\text{m}$ ) e controle (807,8  $\mu\text{m}$ ). Em BA, EIII (122573,7  $\mu\text{m}^2$ ) apresentou média superior comparando-se a C (91599,72  $\mu\text{m}^2$ ) onde  $p=0,05$ . Na Esteriodologia, BIC mostrou que C= 758,0  $\mu\text{m}$ , EI= 902,4  $\mu\text{m}$ , EII= 884,7  $\mu\text{m}$  e EIII= 1045,3  $\mu\text{m}$ , sendo que EIII superou os demais grupos. Da mesma forma, para BA o grupo EIII apresentou valores semelhantes aos grupos (EI = 100068,3  $\mu\text{m}^2$ ; EIII = 103934,5  $\mu\text{m}^2$ ), todos superiores ao grupo controle (63740,3  $\mu\text{m}^2$ ).

**Conclusão:** Nas condições experimentais descritas, o uso da LLLT (dose de 20 J/cm<sup>2</sup>) aumentou o contato entre osso e implante, sugerindo efeito positivo sobre a osseointegração dos implantes. A neoformação óssea entre as espiras dos implantes independe da dose, sendo sempre superior ao grupo controle.

**Palavras-chave:** Implantes Dentários. Terapia a Laser de Baixa Intensidade. Coelhos.

## Abstract

**Background:** It is suggested that the low level laser therapy (LLLT) has a favorable effect on perimplant bone healing, facilitating and accelerating the post-operative's phase.

**Objective:** Evaluate if LLLT modifies the perimplant bone healing pattern in rabbits mandible by Scanning Electron Microscopy (SEM) and Stereology.

**Materials and Methods:** 32 New Zealand male rabbits were submitted to a lower incisor extraction followed by an osseointegrated implant immediate insertion. The LLLT irradiation was promoted by seven sessions of Gallium Aluminum Arsenide Laser (GaAlAs infrared,  $\lambda=830$  nm, 50 mW, CW, 7 sessions, 13 days) into four groups of eight animals each: Control group (placebo) and three experimental groups, EI (10 J/cm<sup>2</sup>), EII (5 J/cm<sup>2</sup>) and EIII (20 J/cm<sup>2</sup>). The results were statistically analyzed (ANOVA and Tukey test,  $p=0,05$ ).

**Results:** For SEM, the BIC's means were significantly higher for the irradiated group (EIII=1021,1  $\mu\text{m}$  and EI=977,9  $\mu\text{m}$ ) compared to EII (761,5  $\mu\text{m}$ ) and control (807,8  $\mu\text{m}$ ). For BA, EIII (122573,7  $\mu\text{m}^2$ ) showed better values for bone neoformation compared to control (91599,7  $\mu\text{m}^2$ ) where  $p=0,05$ . The stereology BIC showed C= 758,0  $\mu\text{m}$ , EI= 902,4  $\mu\text{m}$ , EII= 884,7  $\mu\text{m}$  e EIII= 1045,3  $\mu\text{m}$ , where EIII had the better results than the other groups. As the same, in BA EIII group had the best results than the other groups (C= 63740,3  $\mu\text{m}^2$ ; EI = 100068,3  $\mu\text{m}^2$ ; EIII = 103934,5  $\mu\text{m}^2$ ).

**Conclusion:** In the experimental conditions described, the use of LLLT (20 J/cm<sup>2</sup> dose) may improve bone implant contact, suggesting positive effects on implant's osseointegration. The new bone formation within threads does not depend on the LLLT dose, being always better than the control group.

**Keywords:** Dental Implants; Low-Level Laser Therapy; Rabbits.

## Introdução

O uso dos implantes na cavidade bucal representou um grande avanço na perspectiva de reabilitação do edentulismo tanto parcial quanto total. A reposição dos elementos dentários perdidos por próteses implanto-suportadas possibilitou melhor reabilitação física e maior expectativa psicossocial aos pacientes que até então eram reabilitados com próteses removíveis (ADELL e colaboradores, 1981).

Os efeitos da laserterapia no processo de reparo ósseo, assim como do reparo ósseo perimplantar tem sido pesquisados contemporaneamente. Busca-se com a terapia laser de baixa intensidade (LLLT – “*Low Level Laser Therapy*”) reduzir o desconforto pós-operatório, acelerar o processo de reparo ósseo perimplantar e ainda, obter algum potencial bactericida (SHIBLI e colaboradores, 2004; PEREIRA e colaboradores, 2009).

Estudos sugerem que a LLLT tem efeito favorável sobre o reparo ósseo em estudos pré-clínicos (KARU, 1989; GARCIA e colaboradores, 2001; SILVA JR e colaboradores, 2002; PINHEIRO e colaboradores, 2003; LIRANI-GALVÃO e colaboradores, 2006; WEBER e colaboradores, 2006; BLAYA e colaboradores, 2008; PINHEIRO e colaboradores, 2008; MATSUMOTO, 2009; SARCINO e colaboradores, 2009; BASHARDOUTS e colaboradores, 2010; KAZEN SHAKOURI e colaboradores, 2010; KREISNER e colaboradores, 2010; NASCIMENTO e colaboradores, 2010; GRASSI e colaboradores, 2011) e clínicos (ABOELSAAD e colaboradores, 2009; MOZZATI e colaboradores, 2011).

Especificamente sobre o processo de osseointegração quando da instalação de implantes de titânio, os achados pré-clínicos tem a mesma direção (SHIBLI e colaboradores; LOPES e colaboradores, 2005; JAKSE e colaboradores, 2007; LOPES e colaboradores, 2007; CAMPANHA e colaboradores, 2010; MALUF e colaboradores, 2010; PETRI e colaboradores, 2010), porém, em um estudo clínico não houve diferença estatisticamente significativa para a aplicação de laser sobre o tecido ósseo perimplantar (GARCÍA-MORALES e colaboradores, 2012). Na investigação do efeito da laserterapia sobre o processo de reparo ósseo perimplantar observa-se a maturação óssea mais evidentemente no osso irradiado com laser (SHIBLI e colaboradores, 2004; JAKSE e colaboradores, 2007; CAMPANHA e colaboradores 2010; MALUF e colaboradores, 2010). Já, em estudo

realizado por Khadra e colaboradores (2004), verificou-se através da avaliação esteriológica que nas amostras irradiadas com laser de baixa intensidade obteve-se maior contato osso-implante do que quando o osso não irradiado.

Dessa forma, o objetivo desse artigo foi avaliar se os efeitos da LLLT em diferentes doses pode melhorar o processo de reparo ósseo perimplantar em mandíbulas de coelhos através de análises por MEV e esterilogia em azul de toluidina.

## **Materiais e Métodos**

### Ética

Respeitaram-se os princípios éticos para experimentação em animais, que constam na Lei Arouca (Lei 11.794/2008) que regulamenta e estabelece procedimentos para o uso científico de animais, como também, os Princípios Éticos na Pesquisa Experimental, determinados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Da mesma forma, o projeto foi aprovado conforme o CEUA do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA (protocolo nº 120112).

### Desenho do Estudo

Utilizaram-se 32 coelhos, da ordem *Lagomorpha*, gênero *Oryctolagus*, espécie *Oryctolagus cuniculus*, raça Nova Zelândia, brancos, machos, pesando em média 3 kg, sadios, selecionados aleatoriamente, provenientes da Unidade de Experimental Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (UEA/HCPA) – Figura 1.

A amostra foi dividida em quatro grupos com oito animais cada, sendo um grupo controle e três grupos experimentais (EI, EII e EIII). Todos os animais passaram, previamente à cirurgia, por um período de cinco dias para ambientação na UEA. Os coelhos permaneceram em gaiolas individuais suspensas, evitando o contato direto com fezes e urina, durante todo o período do experimento. A alimentação foi realizada com dieta sólida e a água fornecida *ad libitum*.

A intervenção cirúrgica foi sempre realizada pelo mesmo pesquisador, calibrado antecipadamente. Os animais foram anestesiados por meio de injeção intramuscular com 40 mg/kg de Cloridrato de Ketamina e 3 mg/kg de Cloridrato de Xilasina. Após, procedeu-se a infiltração de 0,5ml de lidocaína 2% (com epinefrina 1:100.000) visando a vasoconstrição local. Assim, fez-se a sindesmotomia, a luxação e a exodontia do incisivo esquerdo com o auxílio de um fórceps infantil nº 5. Dessa forma, realizou-se a inserção de um implante osseointegrado de 3,25mm de diâmetro por 11,5 mm de comprimento, cônicos, auto-rosqueáveis (Implante Nanotite®, BIOMET3i™, Riverside Drive, Palm Beach Gardens, FL, EUA) conforme as orientações de velocidade e torque de inserção do fabricante. O leito cirúrgico foi suturado com um fio agulhado mononylon 4-0.

#### Protocolo LLLT

Os animais não irradiados (grupo controle) foram submetidos a uma simulação da irradiação com o aparelho desligado, passando pela mesma rotina dos animais irradiados. O grupo experimental foi irradiado com laser GaAIs (830nm, infravermelho), de forma pontual, com potência de 50mW, no modo de emissão contínua, a cada 48 horas, num total de sete sessões de aplicação, cuja área da ponteira é de 0.002827 cm<sup>2</sup> (Thera Lase™, DMC®, São Carlos, SP, Brasil). O LLLT foi posicionado sobre a basilar da mandíbula, por via extra-oral, perpendicular ao implante, a mesial e a distal deste. As doses foram diferentes para os grupos experimentais, sendo oferecidos para EI 10 J/cm<sup>2</sup> por sessão (101 segundos por ponto), EII 5 J/cm<sup>2</sup> por sessão (51 segundos por ponto) e EIII 20 J/cm<sup>2</sup> por sessão (201 segundos por ponto).

#### Morte

A morte dos animais foi realizada 30 dias após a última aplicação de laser e 45 dias após a inserção do implante. O procedimento foi realizado por meio de injeção intravenosa de Propofol (1mg/kg) e a posterior parada cardíaca provocada por Cloreto de Potássio 10% (1ml/kg). A mandíbula dos 32 coelhos foi ressecada completamente e imersa em solução de formol 10% neutro e tamponado por um

período de 48 horas. Através de uma osteotomia, removeu-se a porção da sínfise mandibular esquerda de cada coelho, onde continha o implante osseointegrável completamente recoberto por osso. Posteriormente, banhos sucessivos de diversas concentrações de álcool (70%, 80%, 90% e 100%) foram realizados em um período de 30 dias.

### Esteriologia

Das 32 peças, apenas 24 foram destinadas para esta análise. As peças ósseas foram submersas em resina acrílica termopolimerizável LR White Embedding Resin (Kit Medium Grad, EMScience<sup>®</sup>, Filadélfia, EUA) na seguinte sequência: 1ª semana 50% de álcool absoluto e 50% de resina, 2ª semana 30% de álcool absoluto e 70% de resina, 3ª semana 10% de álcool absoluto e 90% de resina e na 4ª semana 100% de resina. A polimerização foi realizada em forno convencional a 64° C durante 24 horas. Assim, realizaram-se as lâminas em 200 µm através de um micrótomo específico para cortes de metal associado a tecido orgânico EXAKT (Exakt<sup>®</sup>, Schleswing-Holstein, Alemanha) e, posteriormente, o refinamento a 30 µm com uma politriz metalográfica EXAKT (Exakt<sup>®</sup>, Schleswing-Holstein, Alemanha). Finalmente, as lâminas foram coradas em azul de toluidina conforme protocolo realizado na Unidade de Patologia Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura)

Oito amostras foram destinadas para este tipo de análise, onde foram embutidas em resina acrílica EMBed-812 Embedding (Kit Electron Microscopy Sciences, EMSdium<sup>®</sup>, Filadélfia, EUA), específica para preparo em MEV e polimerizadas em um forno convencional a 60° C por 48 horas. As peças foram seccionadas no sentido do longo eixo do implante usando uma serra diamantada com 0.3 mm de espessura (Logitech AXL1 Precision Annular Saw. Logitech<sup>®</sup> Materials Technologists & Engineers. Glasgow, Escócia, Reino Unido). Posteriormente, receberam polimento com diversas granulações de lixa d'água (600-4000). Finalmente, procedeu-se a metalização (BAL-TEC SCD 050 Sputter Coater.

Capovani Brothers Inc., Nova Iorque, EUA) das oito peças, passo fundamental antes da MEV.

#### Análise de Contato entre Osso e Implante (BIC) e Área de osso neoformado (BA)

Tanto para MEV quanto para Esteriologia BIC e BA foram os tipos de avaliações realizados. Após as realizações das imagens em MEV e em microscópio óptico, as mesmas foram carregadas no software livre *software UTHSCSA Image Tool*® 3.0 (UTHSCSA ImageTool for Windows, Texas, EUA) onde as medidas foram realizadas. Após a calibração do programa, foram tomadas medidas de contato entre osso implante que constava da distância de uma crista a outra da espira do implante (em  $\mu\text{m}$ ), como também, da área de osso neoformado dentro desta espira (em  $\mu\text{m}^2$ ) – Figura 2 e 3.

#### Análise Estatística

Os programas que foram utilizados são o software estatístico *Statistical Package for Social Sciences*® (SPSS) versão 17.0 e a planilha eletrônica do *Microsoft Excel*®, ambos para o sistema operacional Windows®.

Tanto para MEV quanto para a esteriológica, o teste de normalidade de *Shapiro-Wilk* foi utilizado, demonstrando que para este tipo amostral aceitou-se a hipótese nula de normalidade. Para tal, o teste estatístico utilizado para o 'n' de 32 animais e para um total de quatro grupos utilizou-se a análise de variância (ANOVA) e o Teste de *Tukey*, cujo *p valor* foi  $<0,05$ . Obteve-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados.

## **Resultados**

### MEV (n=8)

Para BIC notou-se diferença significativa entre os grupos experimentais quando comparados ao controle, onde as maiores médias foram encontradas nos grupos

experimentais sendo que os grupos EIII (1021,1  $\mu\text{m}$ ) e EI (977,9  $\mu\text{m}$ ) foram superiores aos demais grupos (C=807,8  $\mu\text{m}$ , EII=761,5  $\mu\text{m}$ ) – Gráfico 1. Avaliando-se BA, notou diferença significativa entre os grupos C=91599,7  $\mu\text{m}^2$  grupo EIII=122573,7  $\mu\text{m}^2$ , onde  $p=0,05$  – Gráfico 2.

#### Esteriologia (n=24)

Em BIC, o grupo Controle apresentou valores de 758,0  $\mu\text{m}$ , EI= 902,4  $\mu\text{m}$ , EII=884,7  $\mu\text{m}$  e EIII= 1045,3  $\mu\text{m}$ , sendo que EIII superou os demais grupos. Quando estudado o BA, diferenças estatísticas foram encontradas entre os grupos controle, EI (100068,3  $\mu\text{m}^2$ ) e EIII (103934,5  $\mu\text{m}^2$ ), onde foi verificado que a dose de LLLT não foi um fator determinante. Assim, independentemente da dose de laser utilizada, obtiveram-se melhores resultados quando da irradiação comparando-se ao grupo controle.

### **Discussão**

Este artigo buscou investigar se a ação da LLLT sobre o reparo ósseo perimplantar realmente é efetivo, como também, se diferentes doses de laser apresentam comportamento diferente sobre este reparo. Outro fator importante é a inserção do implante na mandíbula dos animais, simulando a real aplicação deste material em humanos.

A LLLT está sendo muito utilizada na área odontológica em virtude de seu grande potencial biomodulador (KARU, 1989), onde se sugere um efeito benéfico sobre o manejo de determinadas condições patológicas (LIRANI-GALVÃO e colaboradores, 2006; KAZEM-SHAKOURI e colaboradores, 2010), na proliferação celular (KHADRA, 2005; GRASSI e colaboradores, 2011), como também, no reparo ósseo (KARU, 1989; GARCIA e colaboradores, 2001; SILVA JR e colaboradores, 2002; PINHEIRO e colaboradores, 2003; LIRANI-GALVÃO e colaboradores, 2006; WEBER e colaboradores, 2006; BLAYA e colaboradores, 2008; PINHEIRO e colaboradores, 2008; MATSUMOTO, 2009; SARCINO e colaboradores, 2009; BASHARDOOTS e colaboradores, 2010; KAZEN SHAKOURI e colaboradores, 2010; KREISNER e colaboradores, 2010; NASCIMENTO e colaboradores, 2010; GRASSI e colaboradores, 2011). Khadra (2005) realizou um trabalho baseado em uma série

de investigações trazendo com resultados que a LLLT acelera o metabolismo e a fase de mineralização durante o reparo ósseo, aumenta a interação entre o implante e o osso após um período de oito semanas de osseointegração, aumenta a atividade celular e a sua proliferação e adesão celular sobre implantes dentários.

Da mesma forma, em concordância com alguns trabalhos mais recentes (PINHEIRO e colaboradores, 2003; KHADRA e colaboradores, 2004; LOPES e colaboradores, 2005; LOPES e colaboradores, 2007; CAMPANHA e colaboradores, 2010), utilizamos a LLLT no espectro infravermelho, com comprimento de onda de 830nm, potência de 50 mW, com 2 pontos de aplicação da ponteira do laser próximo aos implantes dentários (sem sobreposição aos mesmos) inseridos na mandíbula desses animais. Foram realizados um total de 7 sessões de irradiação laser com intervalos a cada 48 horas e com diferentes doses para cada grupo experimental. O grupo controle não recebeu qualquer dose de LLLT, apenas a simulação desta.

O tipo de análise quanto a interação entre osso e implante e a área de osso neoformado em torno à superfície de titânio foram realizados para mensurar a osseointegração nos grupos irradiados ou não com LLLT. Baseou-se na literatura (PEREIRA e colaboradores, 2009; KOCH e colaboradores, 2010; DOI e colaboradores, 2012; SAULACIC e colaboradores, 2012) para avaliar o BIC e BA, assim como, na utilização da coloração de azul de toluidina para serem aplicadas estas técnicas. Os trabalhos utilizaram diversas localizações na superfície do implante para promoverem as mensurações, sendo na região cervical (PEREIRA e colaboradores, 2009; SAULACIC e colaboradores, 2012), no terço médio (DOI e colaboradores, 2012) e na região apical do implante (KOCH e colaboradores, 2010). Observando-se a divergência na literatura quanto a região mais propícia a se investigar o contato entre osso e implante, assim como, o volume de osso neoformado, este trabalho buscou avaliar as três regiões (cervical, média e apical), permitindo-se investigar não só qual das regiões apresentaria maior ou menor grau de osseointegração, mas também, qual dos grupos se fez mais evidente.

Pereira e colaboradores (2009) publicaram um artigo onde buscaram investigar os efeitos da irradiação por LLLT sobre o processo de reparo ósseo perimplantar em tíbias de 12 coelhos, sendo que a metodologia constou da análise de BIC e BA em torno desses implantes. Através da avaliação das lâminas histológicas coradas com azul de toluidina, verificou-se que a laserterapia aumentou

a superfície de contato entre osso e implante comparando-se ao grupo controle, porém a área total de osso obtido foi semelhante entre todos os grupos. Nosso artigo, porém, mostrou resultados positivos tanto em BIC quanto em BA dos grupos experimentais comparando-se ao grupo controle frente ao uso do LLLT após a inserção de implantes osseointegráveis realizados em mandíbula de coelhos. Outro fator a se destacar, é que no trabalho citado, utilizou-se, no mesmo animal, lado controle e experimentais com a concomitante aplicação de LLLT, indo em discordância com trabalhos realizados por alguns pesquisadores (ROCHKIND e colaboradores, 1989; RODRIGO e colaboradores, 2009; FRONZA e colaboradores, 2013; MAYER, 2013). Eles defendem a ação sistêmica dos lasers, onde aplicando-se a luz em um determinado local, possa haver sua ação a distância, em tecidos vizinhos. Nosso artigo respeitou esta possibilidade, separando o grupo controle em um grupo único com o “n” igual ao dos grupos experimentais.

## **Conclusão**

Verificou-se neste estudo que o uso da LLLT facilita o processo de osseointegração em implantes inseridos mediatamente após a extração dentária em coelhos. Notou-se que o grupo que utilizou a maior dose de LLLT (20J/sessão) apresentou melhores resultados em BIC. Para BA, a dose não foi um fator determinante, sendo que os grupos irradiados apresentaram maior neoformação óssea.

**Agradecimentos:** Prof. Dr. Carlos dos Reis Pereira Araújo e Profa Fernanda Stancari (USP/Bauru), Drs Fabrício Massotti (UFRGS) and Fabíola Schons Meyer (UEA/HCPA-UFRGS), Enfermeira Marta Justina Giotti Cioato (UEA/HCPA-UFRGS) e Profa Dra Berenice Dedavid (CEMM/PUCRS). Este projeto de pesquisa foi realizado por meio de verbas do Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE-HCPA).

**Conflito de interesse:** “Nós certificamos que não possuímos quaisquer afiliações com ou sem envolvimento financeiros em qualquer tipo de organização ou entidade com direto interesse financeiro no assunto ou nos materiais abordados neste manuscrito.”

## Referências

ABOELSAAD, N. S.; SOORY, M.; GADALLA, L. M.; RAGAB, L. I.; DUNNE, S.; ZALATA, K. R.; LOUCA, C. Effect of soft laser and bioactive glass on bone regeneration in the treatment of infra-bony defects (a clinical study). **Lasers Med Sci.**, v. 24, no. 3, p. 387-395, May. 2009.

ADELL, R.; LEKHOLM, U.; ROCKLER, B.; BRÅNEMARK, P. I. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. **Int J Oral Surg.**, v. 10, no. 6, p. 387-416, Dec. 1981.

BASHARDOUST TAJALI, S.; MACDERMID, J. C.; HOUGHTON, P.; GREWAL, R. Effects of low power laser irradiation on bone healing in animals: a meta-analysis. **J Orthop Surg Res.**, v. 4, no. 5, p. 1-10, Jan. 2010.

BLAYA, D. S.; GUIMARÃES, M. B.; POZZA, D. H.; WEBER, J. B.; DE OLIVEIRA, M. G. Histologic study of the effect of laser therapy on bone repair. **J Contemp Dent Pract.**, v. 9, no.6, p. 41-48, Sep. 2008.

CAMPANHA, B. P.; GALLINA, C.; GEREMIA, T.; LORO, R. C.; VALIATI, R.; HÜBLER, R.; DE OLIVEIRA, M. G. Low-level laser therapy for implants without initial stability. **Photomed Laser Surg.**, v. 28, no. 3, p. 365-369, Jun. 2010.

DOI, K.; OUE, H.; MORITA, K.; KAJIHARA, S.; KUBO, T.; KORETAKE, K.; PERROTTI, V.; IEZZI, G.; PIATTELLI, A.; AKAGAWA, Y. Development of implant/interconnected porous hydroxyapatite complex as new concept graft material. **PLoS One.**, v. 7, no. 11, p. e49051, Nov. 2012.

FRONZA, B.; SOMACAL, T.; MAYER, L.; DE MORAES, J. F.; DE OLIVEIRA, M. G.; WEBER, J. B. Assessment of the systemic effects of low-level laser therapy (LLLT) on thyroid hormone function in a rabbit model. **Int J Oral Maxillofac Surg.**, v. 42, no. 1, p. 26-30, Jan. 2013.

GARCIA, G. V. et al. Processo de reparo em feridas de extração dental tratadas com laser em baixa intensidade (904nm), com diferentes energias de irradiação: estudo histológico em ratos. **Rev. Fac. Odont. Lins.**, v. 14, n. 2, p. 27-35, jul. 2001.

GARCÍA-MORALES, J. M.; TORTAMANO-NETO, P.; TODESCAN, F. F.; DE ANDRADE JR, J. C.; MAROTTI, J.; ZEZZEL, D. M. Stability of dental implants after irradiation with an 830-nm low-level laser: a double-blind randomized clinical study. **Lasers Med Sci.**, v.27, no.4, p. 703-711, Jul. 2012.

GRASSI, F. R.; CICOLELLA, F.; D'APOLITO, G.; PAPA, F.; IUSO, A.; SALZO, A. E.; TRENTADUE, R.; NARDI, G. M.; SCIVETTI, M.; DE MATTEO, M.; SILVESTRIS, F.; BALLINI, A.; INCHINGOLO, F.; DIPALMA, G.; SCACCO, S.; TETÈ, S. Effect of low-level laser irradiation on osteoblast proliferation and bone formation. **J Biol Regul Homeost Agents.**, v.25, no. 4, p. 603-14, Oct./Dec. 2011.

JAKSE, N.; PAYER, M.; TANGL, S.; BERGHOLD, A.; KIRMEIER, R.; LORENZONI, M. Influence of low-level laser treatment on bone regeneration and osseointegration of dental implants following sinus augmentation. An experimental study on sheep. **Clin Oral Implants Res.**, v. 18, no. 4, p. 517-524, Aug. 2007.

KHADRA, M.; RONOLD, H. J.; LYNGSTADAAS, S. P.; ELLINGSEN, J. E.; HAANAES, H. R. Low-level laser therapy stimulates bone-implant interaction: an experimental study in rabbits. **Clin Oral Implants Res.**, v. 15, no. 3, p. 325-32, Jun. 2004.

KHADRA M. The effect of low level laser irradiation on implant-tissue interaction. In vivo and in vitro studies. **Swed Dent J Suppl.**, v. 172, no. 1, p. 1-63, Jan. 2005.

KAZEM SHAKOURI, S.; SOLEIMANPOUR, J.; SALEKZAMANI, Y.; OSKUIE, M. R. Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process. **Lasers Med Sci.**, v. 25, no. 1, p. 73-77, Jan. 2010.

KREISNER, P. E.; BLAYA, D. S.; GAIÃO, L.; MACIEL-SANTOS, M. E.; ETGES, A.; SANTANA-FILHO, M.; DE OLIVEIRA, M. G. Histological evaluation of the effect of low-level laser on distraction osteogenesis in rabbit mandibles. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.**, v. 15, no.4, p. 616-618, Jul. 2010.

KOCH, F. P.; WENG, D.; KRÄMER, S.; BIESTERFELD, S.; JAHN-EIMERMACHER, A.; WAGNER, W. Osseointegration of one-piece zirconia implants compared with a titanium implant of identical design: a histomorphometric study in the dog. **Clin Oral Implants Res.**, v. 21, no. 3, p. 350-356, Mar. 2010.

LIRANI-GALVÃO, A. P.; JORGETTI, V.; LOPES DA SILVA, O. Comparative study of how low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound affect bone repair in rats. **Photomed Laser Surg.**, v. 24, no. 6, p. 735-740, Dec. 2006.

LOPES, C. B.; PINHEIRO, A. L.; SATHAIAH, S.; DUARTE, J.; CRISTINAMARTINS, M. Infrared laser light reduces loading time of dental implants: a Raman spectroscopic study. **Photomed Laser Surg.**, v. 23, no. 1, p. 27-31, Feb. 2005.

LOPES, C. B.; PINHEIRO, A. L.; SATHAIAH, S.; DA SILVA, N. S.; SALGADO, M. A. 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.**, v. 25, no. 2, p. 96-101, Apr. 2007.

MALUF, A. P.; MALUF, R. P.; BRITO, C. D. A.; FRANÇA, F. M.; DE BRITO JR, R. B. Mechanical evaluation of the influence of low-level laser therapy in secondary stability of implants in mice shinbones. **Lasers Med Sci.**, v. 25, no. 5, p. 693-698, Sep. 2010.

MATSUMOTO, M. A.; FERINO, R. V.; MONTELEONE, G. F.; RIBEIRO, D. A. Low-level laser therapy modulates cyclo-oxygenase-2 expression during bone repair in rats. **Lasers Med Sci.**, v. 24, no. 2, p. 195-201, Mar. 2009.

MOZZATI, M.; MARTINASSO, G.; COCERO, N.; POL, R.; MAGGIORA, M.; MUZIO, G.; CANUTO, R. A. Influence of Superpulsed Laser Therapy on Healing Processes Following Tooth Extraction. **Photomed Laser Surg.**, v. 29, no. 8, p. 565-571, Aug. 2011.

NASCIMENTO, S. B.; CARDOSO, C. A.; RIBEIRO, T. P.; ALMEIDA, J. D.; ALBERTINI, R.; MUNIN, E.; ARISAWA, E. A. Effect of low-level laser therapy and calcitonin on bone repair in castrated rats: a densitometric study. **Photomed Laser Surg.**, v. 28, no. 1, p. 45-49, Feb. 2010.

PEREIRA, C. L.; SALLUM, E. A.; NOCITI JR, F. H.; MOREIRA, R. W. The effect of low-intensity laser therapy on bone healing around titanium implants: a histometric study in rabbits. **Int J Oral Maxillofac Implants.**, v. 24, no. 1, p. 47-51, Jan/Feb. 2009.

PETRI, A. D.; TEIXEIRA, L. N.; CRIPPA, G. E.; BELOTI, M. M.; DE OLIVEIRA, P. T.; ROSA, A. L. Effects of low-level laser therapy on human osteoblastic cells grown on titanium. **Braz Dent J**, v. 21, no.6, p. 491-498, Nov. 2010.

PINHEIRO, A. L.; LIMEIRA JR., F. A.; GERBI, M. E.; RAMALHO, L. M.; MARZOLA, C.; PONZI, E. A.; SOARES, A. O.; DE CARVALHO, L. C.; LIMA, H. C.; GONÇALVES, T. O. 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.**, v. 21, no. 6, p. 301-306, Dec. 2003.

PINHEIRO, A. L.; GERBI, M. E.; PONZI, E. A.; RAMALHO, L. M.; MARQUES, A. M.; CARVALHO, C. M.; SANTOS, R. C.; OLIVEIRA, P. C.; NÓIA, M. Infrared laser light further improves bone healing when associated with bone morphogenetic proteins and guided bone regeneration: an in vivo study in a rodent model. **Photomed Laser Surg.**, v. 26, no.2, p. 167-174, Apr. 2008.

PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA. CASA CIVIL. Subchefia para Assuntos Jurídicos. **Lei nº11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca)**. Inciso VII § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. República Federativa do Brasil. Acesso em 17 de junho de 2013 – disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm)>.

ROCHKIND, S.; ROUSSO, M.; NISSAN, M.; VILLARREAL, M.; BARR-NEA, L.; REES, D. G. Systemic effects of low-power laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds, and burns. **Lasers Surg Med.**, v. 9, no. 2, p. 174-182, Feb. 1989.

RODRIGO, S. M.; CUNHA, A.; POZZA, D. H.; BLAYA, D. S.; MORAES, J. F.; WEBER, J. B.; DE OLIVEIRA, M. G. Analysis of the systemic effect of red and infrared laser therapy on wound repair. **Photomed Laser Surg.**, v. 27, no. 6, p. 929-935, Dec. 2009.

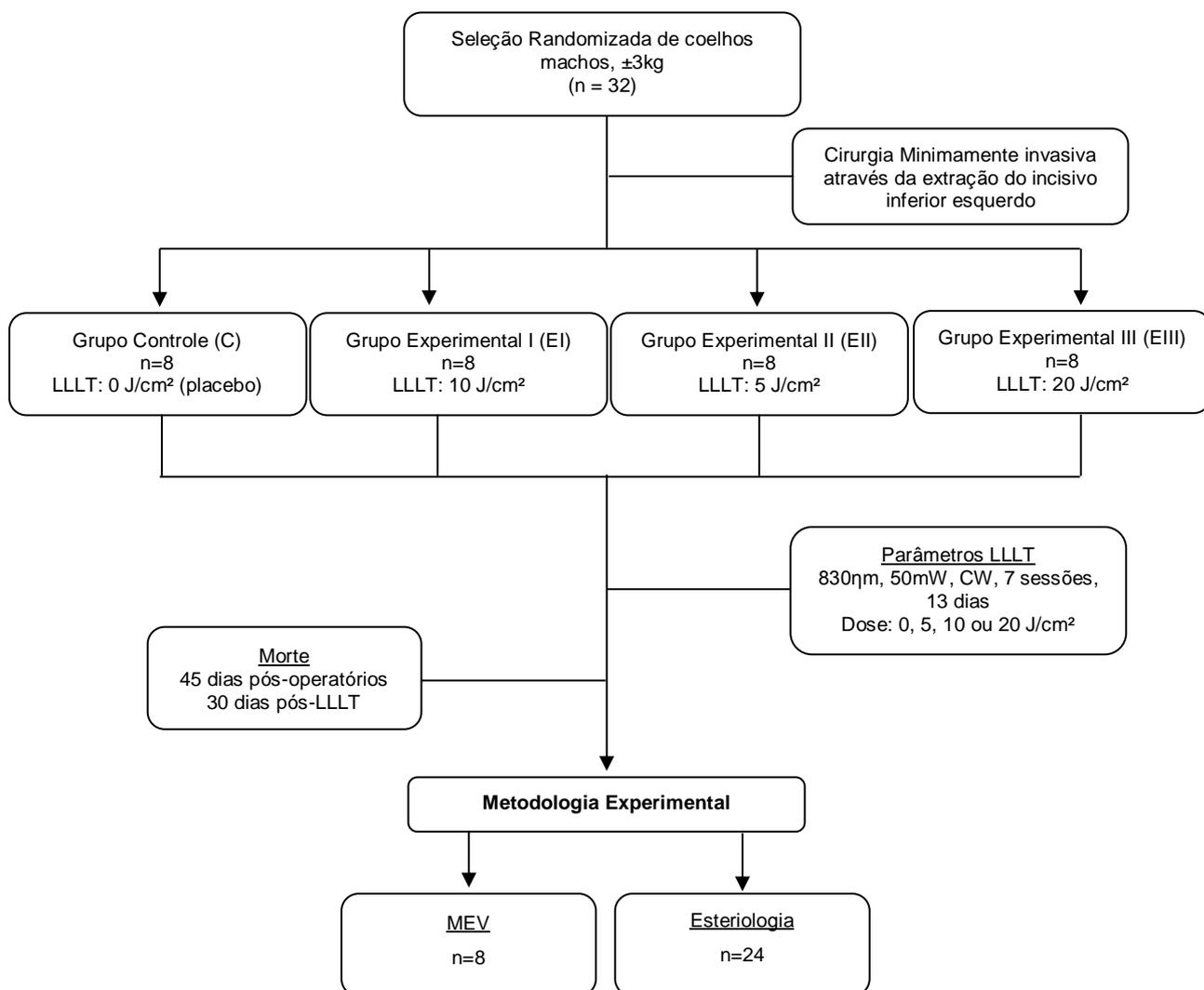
SARACINO, S.; MOZZATI, M.; MARTINASSO, G.; POL, R.; CANUTO, R. A.; MUZIO, G. Superpulsed laser irradiation increases osteoblast activity via modulation of bone morphogenetic factors. **Lasers Surg Med.**, v. 14, no. 4, p. 298-304, Apr. 2009.

SAULACIC, N.; BOSSHARDT, D. D.; BORNSTEIN, M. M.; BERNER, S.; BUSER, D. Bone apposition to a titanium-zirconium alloy implant, as compared to two other titanium-containing implants. **Eur Cell Mater.**, v. 23, no. 4, p. 273-286, Apr. 2012.

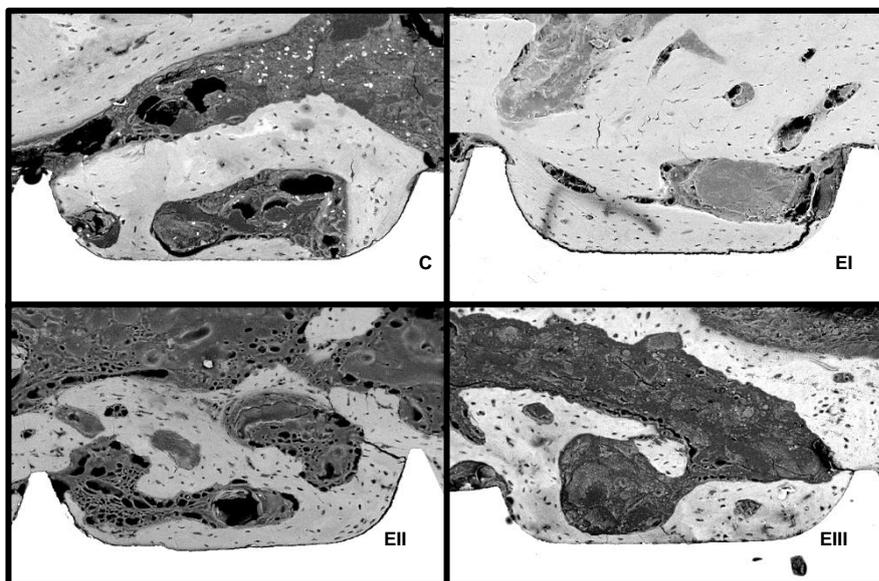
SHIBLI, J. A.; THEODORO, L. H.; HAYPEK, P.; GARCIA, V. G.; MARCANTONIO JR, E. The effect of CO<sub>2</sub> laser irradiation on failed implant surfaces. **Implant Dent.**, v. 13, no. 4, p. 342-351, Dec. 2004.

SILVA JR., A. N.; PINHEIRO, A. L.; OLIVEIRA, M. G.; WEISMANN, R.; RAMALHO, L. M.; NICOLAU, R.A. Computerized morphometric assessment of the effect of low-level laser therapy on bone repair: an experimental animal study. **J Clin Laser Med Surg.**, v. 20, no. 2 p. 83-87, Apr. 2002.

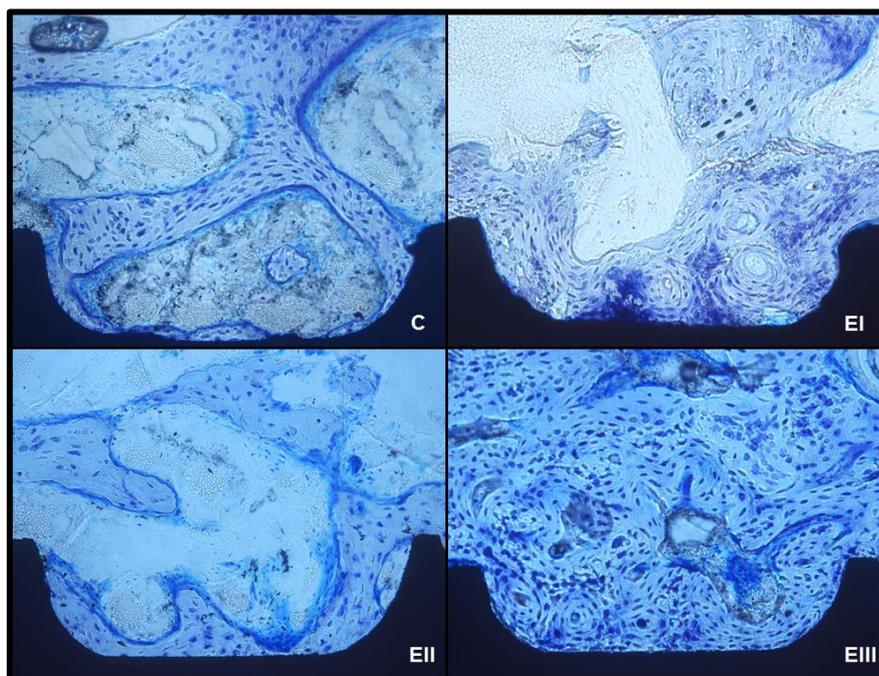
WEBER, J. B. B.; PINHEIRO, A. L. B.; GERHARDT DE OLIVEIRA, M.; OLIVEIRA, F. A. M.; RAMALHO, L. M. P. Laser therapy improves healing of bone defects submitted to autologous bone graft. **Photomed Laser Surg.**, v. 24, no. 1, p. 38-44, Feb. 2006.

**Figura 1:** Fluxograma referente a distribuição demográfica da população estudada.

**Figura 2:** Comparação dos resultados encontrados em MEV. As fotomicrografias foram realizadas em 200X, em modo BSE, da região entre espiras nos quatro diferentes grupos (C, EI, EII, EIII). Neste caso, encontrou-se diferença significativa para BIC, onde o grupo EIII apresentou melhores resultados. Em BA, não houve diferença significativa entre os grupos, apenas tendência de diferenciação entre C e EIII onde  $p=0,051$ .



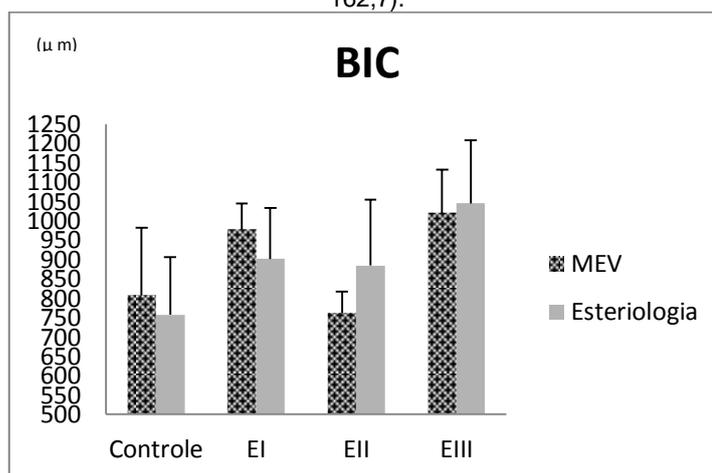
**Figura 3:** Avaliação topográfica realizadas em aumento de 200x: as imagens foram observadas por meio de microscopia óptica com lâminas coradas com Azul de Toluidina. Notar a diferença na ossificação com diferentes doses de LLLT aplicadas.



**Tabela 1:** Apresentação dos resultados para as análises BIC ( $\mu\text{m}$ ) e BA ( $\mu\text{m}^2$ ) tanto em MEV quanto em Esteriologia (Média/Desvio Padrão).

Análise/Grupo		MEV	Esteriologia
Contato (BIC) $\mu\text{m}$	Controle		
	EI	807,8 ( $\pm 174,9$ ) <sup>a</sup>	91599,7 ( $\pm 45770,3$ ) <sup>e</sup>
	EII	977,9 ( $\pm 67,4$ ) <sup>b</sup>	129465,5 ( $\pm 33028,8$ ) <sup>e</sup>
	EIII	761,5 ( $\pm 56,1$ ) <sup>a</sup>	96763,7 ( $\pm 33754,3$ ) <sup>e</sup>
Área (BA) $\mu\text{m}^2$	Controle		
	EI	757,9 ( $\pm 148,3$ ) <sup>c</sup>	63740,3 ( $\pm 36828,3$ ) <sup>g</sup>
	EII	902,4 ( $\pm 131,4$ ) <sup>c</sup>	100068,4 ( $\pm 35443,3$ ) <sup>h</sup>
	EIII	884,7 ( $\pm 169,6$ ) <sup>c</sup>	87428,3 ( $\pm 44328,5$ ) <sup>h</sup>
		1045,3 ( $\pm 162,7$ ) <sup>d</sup>	103934,5 ( $\pm 40229,7$ ) <sup>h</sup>

**Gráfico 1:** Relação de contato entre osso e implante (BIC) para cada tipo de análise realizada (MEV e Esteriologia). Para MEV os valores obtidos foram C=807,8 ( $\pm 174,9$ ), EI=977,9 ( $\pm 67,4$ ), EII=761,5 ( $\pm 56,1$ ) e EIII=1021,1 ( $\pm 110,6$ ) e para Esteriologia C=757,9 ( $\pm 148,3$ ), EI=902,4 ( $\pm 131,4$ ), EII=884,7 ( $\pm 169,6$ ) e EIII=1045,3 ( $\pm 162,7$ ).



**Gráfico 2:** Relação de neoformação óssea perimplantar (BA) para cada tipo de análise realizada (MEV e Esteriologia). Para MEV os valores obtidos foram C=91599,7 ( $\pm 45770,3$ ), EI=129465,5 ( $\pm 33028,8$ ), EII=96763,7 ( $\pm 33754,3$ ) e EIII=122573,7 ( $\pm 57385,9$ ) e para Esteriologia C=63740,3 ( $\pm 36828,3$ ), EI=100068,4 ( $\pm 35443,3$ ), EII=87428,3 ( $\pm 44328,5$ ) e EIII=103934,5 ( $\pm 40229,7$ ).

