

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM PRÓTESE DENTÁRIA**

MARCO ANTÔNIO RAMBO OSÓRIO TORRES

**INFLUÊNCIA DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA (GaAIs - λ 830nm) NA
FORMAÇÃO ÓSSEA EM IMPLANTES LISOS E TEXTURIZADOS:
UMA ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração em Prótese Dentária.

LINHA DE PESQUISA: TÉCNICAS E APARELHOS EM ODONTOLOGIA

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Rolim Teixeira

Porto Alegre

2007

MARCO ANTÔNIO RAMBO OSÓRIO TORRES

**INFLUÊNCIA DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA (GaAIs - λ 830nm) NA
FORMAÇÃO ÓSSEA EM IMPLANTES LISOS E TEXTURIZADOS:
UMA ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração em Prótese Dentária.

LINHA DE PESQUISA: TÉCNICAS E APARELHOS EM ODONTOLOGIA

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Rolim Teixeira

Porto Alegre

2007

MARCO ANTÔNIO RAMBO OSÓRIO TORRES

**INFLUÊNCIA DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA (GaAIs - λ 830nm) NA
FORMAÇÃO ÓSSEA EM IMPLANTES LISOS E TEXTURIZADOS:
UMA ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração em Prótese Dentária.

Aprovada em de de .

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eduardo Rolim Teixeira - PUCRS

Prof. Dr. Alexandre Bahlis – PUCRS

Prof. Dr. João Batista Burzlaff – UFRGS

**Prof. Dr. Marcel Fasolo de Paris – UFRGS
Suplente**

DEDICATÓRIA

À Deus

... que incondicionalmente sempre está ao meu lado!

Aos meus pais José Gabriel (*in memoriam*) e
Cyria Leocádia, e ao meu irmão Tito José, que sempre foram meu esteio.

Exemplos de caráter, bondade, honestidade, perseverança

...sabedorias de vida!

À minha esposa Valentina, por seu amor, amizade e companheirismo,
que soube me apoiar nos meus momentos de dificuldades e incertezas
e cuidar de nossa família, de forma brilhante e abnegada, durante minha ausência!

Aos meus filhos Gabriel e Lucas, minhas fontes de alegria,
Inspiração e força de vontade, rejuvenescendo dia a dia o meu espírito

...de viver e lutar por um futuro melhor!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. Eduardo Rolim Teixeira, pela sua orientação nesta pesquisa e por todo o conhecimento propiciado nestes dois anos de convívio, sempre com muito desprendimento e amizade. Muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Kleber Ricardo Monteiro Meyer, doutorando do programa de pós-graduação em odontologia, por toda a parceria durante a execução desta pesquisa, principalmente da parte cirúrgica. Sou muito grato!

Aos(Às) Professores(as) Doutores(as) diretamente envolvidos nesta conquista, Nilza Pereira da Costa, Márcio Lima Grossi, Rosemary Shinkai, Hugo Mitsuo Silva Oshima, Eduardo Gonçalves Mota, Maria Antonieta L. Souza e Luciana Mayumi Hirakata. Cada um à sua maneira e ao seu tempo, foram grandes “mestres” e amigos, ajudando na resolução de problemas, tornando mais fácil nossa caminhada.

À Médica Veterinária da FEPPS Luiza de Macedo Braga, por toda a sua orientação especializada, sem a qual esta pesquisa não teria sido realizada, e por todo o seu desprendimento e amizade no convívio conosco.

Ao Mestre, colega e amigo Dr. José Américo Carvalho Maciel, e ao colega e amigo Dr. Paulo César da Silveira, renomados especialistas em Prótese Dentária. O exemplo de conhecimento e conduta clínica de ambos é um incentivo perene para minha busca por crescimento profissional como protesista.

AGRADECIMENTOS

Aos colegas de profissão e mestrado Aline, Diego, Evandro, Fernando, Josué, Luis Mariano e Vivian, que tornaram estes dois anos muito agradáveis. Sentirei saudade do convívio semanal, mas sei que a amizade formada não será esquecida jamais!

À PUCRS e todos os seus funcionários, em especial aos da secretaria da pós-graduação, da biblioteca e dos laboratórios de Materiais Dentários, de Microscopia e Micro Análises e de Biologia Tecidual, pela orientação diferenciada em suas respectivas áreas de atuação.

À Conexão Sistemas de Prótese pelo fornecimento dos implantes utilizados nesta pesquisa.

EPÍGRAFE

***“Esta é a maior sabedoria que possuo: ... a liberdade
e a vida são merecidas somente por aqueles
que as conquistam de novo a cada dia.”***

Goethe

***“Quando o homem tem disposição e vontade,
os deuses colaboram.”***

Ésquilo

RESUMO

Este trabalho *in vivo* controlado e com cegamento avaliou *post mortem*, através da análise histomorfométrica, a influência do laser de baixa potência na formação óssea em implantes lisos e texturizados inseridos em tíbias de coelhos, submetidos ou não à irradiação com laser de GaAIs com comprimento de onda de 830nm, de forma contínua por 10 segundos, com potência de 100mW. Para tanto foram utilizados seis coelhos da raça Nova Zelândia, distribuídos igualmente de forma aleatória em grupo irradiado e grupo controle, onde cada coelho recebeu quatro implantes, sendo dois lisos na tíbia direita e dois texturizados na tíbia esquerda. Os animais do grupo experimental receberam irradiação transcutaneamente em três pontos ao redor dos implantes, durante 15 dias a cada 48 horas, sendo a primeira aplicação no dia da cirurgia, com total de oito dias de irradiação e dose total de $24\text{J}/\text{cm}^2$ em cada tíbia (3 pontos x 1J x 8 aplicações = 24J). Os animais do grupo controle foram submetidos à mesma rotina dos animais irradiados, porém com equipamento laser desligado. Após 30 dias todos os animais sofreram eutanásia para obtenção de lâminas histológicas coradas com azul de toluidina a partir de cortes das tíbias com os implantes inseridos numa espessura final de 10 a $19\mu\text{m}$. Para avaliação do percentual de contato osso-implante os dois cortes mais centrais de cada amostra, de forma cegada, foram fotomicrografados em microscópio óptico e analisados através de um programa digital de processamento de imagens. As médias obtidas a partir dos dois cortes de cada implante, após desfeito o cegamento, foram comparadas de forma geral e dentro dos grupos utilizando-se o teste *t-student*. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) no percentual de contato osso-implante entre os grupos laser ($77,048\% \pm 10,173$) e controle ($69,516\% \pm 19,284$) de forma geral, nem entre os subgrupos texturizado com laser ($81,530\% \pm 10,155$), texturizado controle ($72,190\% \pm 16,778$), liso com laser ($72,565\% \pm 8,737$) e liso controle ($66,842\% \pm 22,791$). Estes resultados sugerem que o laser de baixa potência, com o protocolo de irradiação utilizado neste modelo animal, não contribuiu significativamente para o aumento do percentual de contato osso-implante. Não obstante, o osso novo formado submetido à irradiação com laser de GaAIs durante o período de ossoeintegração, parece apresentar uma maior vascularização e organização lamelar que o grupo controle,

sugerindo uma maior maturação. Porém, são necessárias novas pesquisas de modo a preencher as lacunas ainda existentes quanto ao entendimento dos mecanismos biológicos da ação do laser de baixa potência na mediação dos processos necessários à osseointegração de implantes de titânio, bem como dos parâmetros dosimétricos para obtenção da bioestimulação óssea.

Palavras chave: Laser. Implantes. Osseointegração. Análise Histomorfométrica.

ABSTRACT

This research *in vivo* blind-controlled was to investigate *post mortem*, through the histomorphometrical analysis, the influence of the low power laser in bone formation on machined and roughened titanium dental implants inserted in rabbits tibia-bones. The animals were subjected or not to the GaAIAs irradiation laser device, with a length of wave of 830nm, in a continuous form during 10 seconds, with a power output of 100mW. A total of six white New Zealand rabbits were equally and randomly divided into two groups, irradiated and controlled groups, where four implants were placed in each animal. Two machined were implanted in the right tibia and two roughened in the left tibia. The experimental group received irradiation through the skin in three points around the implants, during 15 days, every 48 hours. The first application was performed in the same day of the surgery, with a total of eight days of irradiation and total dose of 24J/cm² in each tibia (3 points x 1J x 8 applications = 24J). The control group were submitted to the same routine of the irradiated animals, however with the laser equipment turned off. After 30 days all animals suffered euthanasia, and histological sections were obtained. The sections were then stained with toluidine blue. Each section was reduced to a final thickness of about 10 to 19µm. The bone-to-implant contact measurements in percentage were performed by using two central sections from each sample, blinded form, were photomicrographed on optical microscope connected to an image analyzer digital program. The averages obtained from the two sections of each implant right after the blinding belittled were compared in general form between laser and control groups and among the four sub-groups were performed by using Student's *t*-test. There was no statistically significant difference ($p > 0,05$) in the percentage of bone-to-implant contact between the laser (77,048 % ± 10,173) and control groups (69,516 % ± 19,284) in a general form, not even between the sub-groups roughened with laser (81,530 % ± 10,155), roughened control (72,190 % ± 16,778), machined with laser (72,565 % ± 8,737) and machined control (66,842 % ± 22,791). In the present research, results suggest that the low power laser, with the irradiated protocol, did not significantly contribute for increasing the percentage of bone-to-implant contact. Nevertheless, new formed bone undergone to the with GaAIAs irradiation laser

device during the period of osseointegration, it seems to present a bigger vasculature and lamellar organization compared to the control group, suggesting bone maturation improvement. However, further research is necessary to better explain the biological mechanisms of low power laser action on the mediation of necessary process for titanium implants osseointegration as well as dosimetric parameters for getting bone biostimulation.

Key words: Laser. Implants. Osseointegration. Histomorphometrical Analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Alojamento dos animais durante o experimento.....	53
Figura 2 – Tricotomia da das tíbias dos animais.....	54
Figura 3 – Localização e distribuição das perfurações ósseas nas tíbias.....	55
Figuras 4A à 4H – Seqüência cirúrgica da colocação dos implantes.....	57
Figura 5 – Localização dos implantes com tatuagem cutânea.....	59
Figura 6 – Cuidado da sutura com Rifocina.....	59
Figuras 7A e 7B – Equipamento laser e seqüência de irradiação.....	60
Figura 8A e 8B – Tíbias dissecadas, numeradas e fixadas.....	61
Figura 9 – Checagem da espessura inicial do corte na Labcut 1010.....	64
Figura 10 – Corte em andamento na Labcut 1010.....	66
Figuras 11A e 11B – Armazenamento e secagem das amostras e lâminas.....	66
Figura 12 – Espessura final do corte para histomorfometria.....	67
Figura 13 – Rotina de aquisição das imagens do microscópio óptico.....	68
Figura 14 – Imagem obtida com lupa em 10X de magnificação.....	69
Figuras 15A à 15C – Seqüência de imagens obtidas no microscópio óptico.....	70
Figura 16 – Protocolo de mensuração no <i>Image Pro Plus</i> ®.....	71
Figuras 17A e 17B – Cortes histológicos dos dois implantes da mesma tíbia.....	78
Figuras 18A à 18D – Micrografias da tíbia do coelho número 06.....	79
Figuras 19A e 19B – Micrografias coradas com azul de toluidina com aumento original de 100X.....	81
Figuras 20A e 20B - Micrografias coradas com azul de toluidina com aumento original de 400X.....	83

Figuras 21A e 21B - Micrografias coradas com azul de toluidina com aumento original de 1000X.....	84
Figuras 22A e 22B - Micrografias coradas com azul de toluidina com aumento original de 1000X para avaliação.....	85
Figura 23 – Micrografia com MEV.....	86
Figura 24A e 24B – Micrografia com MEV no modo BSE.....	88
Figuras 25 – Micrografia com MEV no modo BSE.....	89
Figuras 26A à 26D – Relação da textura de superfície com a arquitetura óssea.....	91

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Divisão dos animais em grupos e cronograma de eutanásia.....	53
Quadro 2 – Protocolo de irradiação com laser de GaAIs.....	61
Quadro 3 – Classificação dos implantes para análise histomorfométrica.....	63
Quadro 5: Porcentagem de Cálcio (Ca) e Fosfato (P) das amostras no MEV com EDS.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análise estatística do grau de confiabilidade das medições do %COI....	73
Tabela 2 – Comparação geral do %COI entre os grupos laser e controle.....	74
Tabela 3 – Comparação do %COI entre os grupos laser e controle para cada tipo de implante.....	75
Tabela 4 – Comparação do %COI entre os tipos de implante para cada grupo.....	76
Tabela 5 – Comparação do %COI entre os grupos na dependência da localização tibial em relação ao joelho.....	77
Tabela 6: %COI de cada uma das amostras e comparação dentro das variáveis pesquisadas (Anexos).....	112

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Comparação geral do %COI entre os grupos laser e controle.....	75
Gráfico 2 – Comparação do %COI entre os grupos laser e controle para cada tipo de implante.....	76
Gráfico 3 – Comparação do %COI entre os tipos de implantes para cada grupo.....	77
Gráfico 4 – Comparação do %COI entre os grupos de implantes de final 1 e de final 2.....	78
Gráfico 5: Visualização gráfica da análise química de um ponto de uma das amostras; realizada no MEV, no modo EDS.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA - *Analysis Of Variance*

ATP – *Adenosine 5'-Triphosphate*

Al₂O₃ – Óxido de alumínio

BSE – *Bacscattered Emission Technology*

Ca - Cálcio

Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ – hidroxiapatita de cálcio

CEP – Comitê de Ética e Pesquisa

CO – Comprimento de Onda

COI - Contato osso-implante

λ – Comprimento de onda

CO₂ – Dióxido de Carbono

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

Col.s. – Colaborados

Cm – Centímetro

Cm² – Centímetro quadrado

D – Diâmetro da circunferência

DE – Densidade de Energia

DP – Densidade de Potência

DNA – *Deoxyribonucleic acid*

EDS – *Energy dispersive x-ray detector*

Elem – Elemento

Et Al. – e outros

FEPPS – Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde

FGF – *Fibroblast growth factor*

FO/PUCRS – Faculdade de Odontologia da PUCRS

GaAlAs – Arseteno de Gálio e Alumínio

GaAs – Arseneto de Gálio

° - Grau

h – hora

HA – *Hidroxiapatite*

HILT – *Hight Intensity Laser Treatment*

HLLT – *Hight reactive-Level Laser Treatment*

IGF-1 – *Insulin similar to the growth of factor*

IM – Intra Muscular

IL-1 – *Interleukin 1*

IL-6 – *Interleukin 6*

J – Joule

J/cm² – Joule por centímetro quadrado

KJ/cm² – Quilojoule por centímetro quadrado

Kg – Quilograma

LILT – *Low Intensity Laser Treatment*

LLLTL – *Low reactive-Level Laser Treatment*

Ltda – Limitada

LASER – *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*

MASER – *Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation*

± - mais ou menos

mm – milímetro

mW – miliwatt

MEV – Microscópio Eletrônico de Varredura

mg – miligrama

MO – Microscópio Óptico

µm – micrometro

n – número de amostras do grupo

N/cm – Newton por centímetro

nm – nanômetro

P – Potência/Fósforo

PFF – Pigmentos Fotocromáticos Reversíveis

PDGF – *platelets of the derived growth factor*

π - pi (3,1415)

PTFE – Politetrafluoretano Expandido

PUCRS – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

% - por cento

%COI – percentual de contato osso-implante

r – raio da circunferência

® - marca registrada

rpm – rotações por minuto

RNA – *Ribonucleic acid*

S – Área

SLA – *Sand-blasted Acid-etched Surfaces*

s – segundos

Ti - Titânio

TGF-β₁ – *transformer growth of the factor β₁*

TPS – *Titanium Plasma Spray*

TNT – Tecido Não-Tecido

UI – Unidades Internacionais

X – vezes

W – Watt

YAG – Ítrio-alumínio-granada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISTA DE LITERATURA	25
2.1 Bases Biológicas da Formação e Regeneração Óssea	25
2.2 Bases Biológicas da Osseointegração.....	30
2.3 Implantes Lisos e com Superfície Texturizada na Osseointegração.....	34
2.4 Bases Físicas e Biológicas da Terapia com Laser de Baixa Potência	36
2.5 Laser de Baixa Potência na Biomodulação do Tecido Mole e do Osso.....	43
3 HIPÓTESE	50
4 PROPOSIÇÃO.....	51
5 METODOLOGIA	52
5.1 Paradigma	52
5.2 Variáveis.....	52
5.3 Material e Coleta dos Dados.....	52
5.3.1 Modelo Animal	52
5.3.2 Cirurgia e Medicação	54
5.3.3 Terapia com Laser de Baixa Potência	59
5.3.4 Eutanásia dos Animais	59
5.3.5 Obtenção dos Blocos Ósseos com os Implantes.....	61
5.3.6 Preparação das Lâminas para Histomorfometria.....	63
5.3.7 Análise Histomorfométrica	67
5.3.7.1 Análise Quantitativa.....	69
5.3.7.2 Análise Qualitativa.....	71
6 RESULTADOS.....	73
6.1 Análise Quantitativa - Estatística dos Dados.....	73
6.1.1 Comparação Geral da %COI entre Grupos Laser e Controle.....	74
6.1.2 Comparação por Subgrupos da %COI entre Grupo Laser e Controle.....	75
6.1.3 Comparação Grupo a Grupo entre Implantes Texturizado e Liso.....	76
6.1.4 Comparação entre os Grupos Laser e Controle em Relação à Posição Tibial da Fixação do Implante.....	77

6.2 Análise Qualitativa dos Dados.....	79
7 DISCUSSÃO	92
8 CONCLUSÕES	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
ANEXOS	111

1 INTRODUÇÃO

O uso de implantes osseointegrados representou, para a odontologia, um grande avanço na perspectiva de reabilitação do edentulismo parcial e total. A reposição de peças dentárias perdidas por meio de próteses implanto-suportadas ou implanto-mucossuportadas gerou uma expectativa positiva de impacto psicossocial aos pacientes, que até então eram reabilitados com próteses removíveis (ADELL *et al.* 1981).

Isto foi possível porque Branemark *et al.*, em 1977, estabeleceram um protocolo previsível de cirurgia para a colocação de implantes osseointegrados, que está consagrado devido a resultados bem sucedidos obtidos ao longo de mais de quatro décadas de acompanhamento. Porém, apesar do aumento do conhecimento científico a respeito do assunto, ainda restam inúmeras dúvidas quanto à diversos aspectos como, por exemplo, a necessidade de espera de três a seis meses após a cirurgia de colocação do implante para a instalação da prótese propriamente dita e aplicação de carga funcional.

Com a consolidação do uso clínico dos implantes osseointegrados houve um direcionamento das pesquisas em Implantodontia para a melhora dos já expressivos índices de sucesso obtidos inicialmente com os mesmos. Assim, os sistemas de implantes comerciais buscam, atualmente, desenvolver tratamentos de superfícies que otimizem as reações entre implante-tecido, buscando reduzir o tempo da osseointegração e/ou favorecê-la em locais de comprovada baixa taxa de sucesso (COCHRAN *et al.* 1998).

Jafin e Berman (1991), afirmaram que superfícies de titânio com maior grau de rugosidade demonstraram, em observações *in vitro* e *in vivo*, a capacidade de induzir uma formação óssea em maior volume e velocidade quando comparadas a superfícies com menor grau de rugosidade.

Por outro lado, o reparo tecidual, é um processo complexo que envolve atividade local e sistêmica do organismo, envolvendo vários tipos de células, enzimas e fatores de regeneração tecidual e, desde a década de 60, o Laser de

Baixa Potência (Laser não-cirúrgico ou Terapêutico) tem sido utilizado em tratamentos médicos e odontológicos visando sua ação regenerativa, antiinflamatória e antiálgica sobre os diferentes tecidos biológicos (ALMEIDA LOPES, 1999).

Outros trabalhos recentes com a utilização do laser de baixa potência (GaAIs - λ 830nm) indicam que o efeito positivo na bioestimulação óssea, pode estar (1) no aumento da capacidade de adesão e proliferação de células osteoprogenitoras (KHADRA *et al.*, 2005) e (2) no aumento da velocidade de incorporação de hidroxapatita de cálcio no osso peri-implantar (LOPES *et al.*, 2005), onde sugere-se, no entanto, que pesquisas adicionais sejam feitas no sentido de ampliar os conhecimentos sobre o efeito do laser de baixa potência na bioestimulação da osseointegração de implantes dentais.

Dentro desse contexto a possibilidade de melhoria da interface osso-implante através da estimulação óssea com a irradiação laser e da modificação da superfície dos implantes, otimizando assim a osseointegração em sua fase inicial e mais crítica, intriga o autor e estimula este estudo.

2 REVISTA DE LITERATURA

2.1 Bases Biológicas da Formação e Regeneração Óssea

De acordo com Schenk (1996), o osso é uma forma rígida de tecido conjuntivo que exhibe propriedades mecânicas e biológicas singulares. Ao lado de seu excelente comportamento mecânico, o osso exhibe um potencial inigualável para regeneração. Ele é capaz de reparar fraturas ou defeitos ósseos com uma organização estrutural altamente semelhante ao osso “original”. Toda essa formação, porém, depende de dois pré-requisitos indispensáveis: suprimento vascular amplo e suporte mecânico; pois, os osteoblastos exercem suas atividades apenas nas proximidades de vasos sanguíneos, e a simples redução do oxigênio para essas células parece alterar o código genético em direção à formação de tecido fibroso ou fibrocartilagenoso.

Este tecido mineralizado especializado de natureza conjuntiva que é o osso, cuja matriz extracelular é calcificada e contém as células que a secretam, além de constituir o esqueleto, dando suporte e proteção aos órgãos e servir de apoio para os movimentos musculares, atua como reservatório de cálcio, fosfato e outros íons, sendo essencial para a manutenção dos níveis desses elementos no sangue. Além disso, é também o sítio onde se aloja o tecido hematopoiético (KATCHBURIAN; ARANA-CHAVES; 1999).

Durante o desenvolvimento embrionário, a forma do osso é elaborada, quer diretamente, por ossificação intramembranosa, ou indiretamente, via modelo cartilagenoso, chamado de ossificação endocondral. Após o crescimento fetal e pós-natal, os ossos passam por três alterações: crescimento em largura e diâmetro, refinamento da forma por meio da modelagem por periosteio e endosteio, e finalmente remodelagem com renovação constante e substituição do tecido ósseo velho por um arcabouço novo (SCHENK 1996).

Enquanto a ossificação endocondral é a principal responsável pela formação dos ossos longos das extremidades, bem como das vértebras, das costelas e da base do crânio, além do côndilo e sínfise mandibulares, é a ossificação

intramembranosa que responde pela formação da maioria dos ossos do esqueleto crânio-facial, incluindo-se maxila e mandíbula, além de contribuir para o crescimento dos ossos curtos e para o aumento em espessura dos ossos longos. Na ossificação endocondral o tecido ósseo se forma substituindo um modelo cartilaginoso pré-existente, não havendo a transformação direta da cartilagem em osso. Já na ossificação intramembranosa, no seio de uma membrana de natureza conjuntiva, células mesenquimais são ativadas, proliferam e se agrupam na presença de uma profusa rede de capilares, constituindo as chamadas “membranas ósseas” onde, posteriormente, essas células se diferenciam em várias etapas até se transformarem finalmente em osteoblastos, cujo citoplasma passa a conter todas as organelas características de uma célula secretora de proteínas. Uma vez diferenciados, os osteoblastos, que têm de 15 a 30µm de espessura no seu estado ativo, passam a sintetizar e secretar moléculas da matriz orgânica do futuro osso, principalmente o colágeno, bem como a dar origem às vesículas da matriz que subseqüentemente mineralizar-se-ão aprisionando essas células em seu interior, em lacunas, passando a serem chamadas de osteócitos (KATCHBURIAN; ARANA-CHAVES; 1999).

Segundo Roberts e Garetto (2000), o osso pode ser analisado e classificado de maneira diferente dos pontos de vista macroscópico e microscópico. Quanto à macro-geometria o que varia é a densidade podendo ser dividido em osso compacto ou cortical e em trabecular ou esponjoso. No entanto, a massa óssea na realidade é uma seqüência que inclui trabéculas finas e grossas e compactas porosas e densas, tornando difícil a classificação macroscópica precisa, pois as trabéculas muito grossas podem ser similares ao osso compacto nitidamente poroso. Já microscopicamente, o osso pode ser dividido, em razão da composição, em imaturo, lamelar, fibroso e composto. Essas várias configurações possíveis são dependentes da idade, da função e do histórico fisiológico.

Ainda, com base em observações microscópicas, o osso também pode ser classificado como primário (imaturo) ou secundário (maduro). O osso primário é imaturo, pouco organizado, irregular e é o primeiro osso a se formar durante o desenvolvimento fetal e durante a reparação óssea. Ele é rico em osteócitos e em feixes de colágeno não modelados que, mais tarde, são substituídos e organizados como osso secundário, exceto em algumas áreas como os alvéolos dentários, por

exemplo. Já o osso secundário é maduro, composto por lamelas paralelas ou concêntricas com 3 a 7 μm de espessura. Os osteócitos estão dispostos em intervalos regulares entre as lamelas ou, ocasionalmente, dentro das lamelas. Os canalículos que abrigam os prolongamentos dos osteócitos ligam lacunas vizinhas umas com as outras formando uma rede de intercomunicantes, que facilitam o fluxo de nutrientes, hormônios, íons e produtos do catabolismo entre si. A matriz do osso secundário é mais calcificada e forte do que o osteóide, e as fibras de colágeno estão dispostas paralelamente umas as outras dentro de cada lamela (GARTNER; HIATT; 2003).

No osso compacto então, as delgadas camadas chamadas lamelas, que se dispõem em sistemas lamelares, especialmente evidentes nas diáfises dos ossos longos, dividem-se em circunferenciais externos e internos, intersticiais e ósteons (sistemas de canais de Havers). As lamelas circunferenciais externas ficam logo abaixo do perióstio, formam a região mais externa da diáfise e contêm fibras de Sharpey, que ancoram o perióstio ao osso. As circunferenciais internas, análogas, mas menos desenvolvidas que as externas envolvem totalmente a cavidade da medula óssea, onde trabéculas de osso esponjoso projetam-se destas lamelas para a cavidade medular, interrompendo o revestimento pelo endóstio. Os ósteons, ou sistemas de canal de Havers, compõem a maior parte do osso compacto, onde cada sistema varia de 20 a cerca de 100 μm de diâmetro, e é composto por cilindros de lamelas dispostas concentricamente em torno de um espaço vascular denominado canal de Havers. A delimitação entre cada osteon é feita através de uma delgada linha cimentante, composta principalmente por substância fundamental calcificada e poucas fibras colágenas. Cada canal de Havers, forrado por uma camada de osteoblastos e células osteoprogenitoras, abriga um feixe de tecido conjuntivo associado. Canais paralelos adjacentes são unidos perpendicularmente por canais de Volkmann. Por fim as lamelas intersticiais são restos de ósteons, reabsorvidos durante a remodelação óssea feita por osteoclastos, com aspecto de arcos irregulares envolvidos por ósteons e, também, unidos por linhas cimentantes (GARTNER; HIATT; 2003).

Já o osso maduro trabecular ou esponjoso, também é composto de osso lamelar, onde as trabéculas são avasculares, sendo o suporte metabólico oriundo da

medula óssea adjacente. Possuem uma massa relativamente baixa e existe uma tendência relacionada à função de que a sua disposição se dê ao longo das linhas de tensão melhorando o seu desempenho frente às cargas compressivas. A força do osso trabecular depende da espessura (massa), orientação e conectividade entre si. A taxa aposicional de remodelação do osso trabecular é nitidamente constante em 0,6 $\mu\text{m}/\text{dia}$ (junto ao endóstio) e continua em ritmo rápido por toda a vida numa taxa de 20 a 30% por ano (ROBERTS E GARETTO, 2000).

Em termos de composição orgânica e mineral, o osso trabecular é constituído de 70% de tecido medular, enquanto o cortical é 95% mineralizado. O osso cortical é 10 a 20 vezes mais resistente que o trabecular, o que explica, segundo Sennerby (1998), porque o primeiro suporta melhor os implantes que o segundo.

Ainda quanto à composição do osso trabecular, Cowin (2001) relatou que este consiste em 65% de parte mineral seguida de 35% de matriz orgânica, células e água. A parte mineralizada, por sua vez, é constituída de pequenos cristais em forma de agulhas, placas ou hastes localizadas dentro e entre fibras colágenas; formada basicamente por uma hidroxiapatita – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ largamente impura com outros constituintes, como carbonato, citrato, magnésio, flúor e estrôncio, incorporados no seu interior, ou sobre a sua superfície. Substâncias estranhas tais como tetraciclinas, polifosfatos, bisfosfonatos, e marcadores ósseos radioisótopos podem também serem incorporados com elevada afinidade.

A matriz orgânica do osso é composta em 90% por proteínas colágenas (colágeno do tipo I e colágeno do tipo IV) e 10% por proteínas não colagênicas (osteocalcina, osteonectina, sialoproteínas ósseas, proteoglicanas, osteopontina, fibronectina, fatores de crescimento, proteínas ósseas morfogenéticas, entre outras). Todas essas proteínas são sintetizadas pelos osteoblastos e a maioria delas está envolvida no fenômeno da adesão celular, embora o papel preciso que desempenham neste processo complexo ainda não esteja totalmente claro. (COWIN, 2001)

De acordo com Jayaraman e Meyer (2004), a matriz extracelular exerce papel crucial na mediação da adesão celular aos biomateriais.

Quanto a natureza celular do osso os responsáveis pela formação, destruição, remodelação e homeostase óssea são os osteoblastos, os osteoclastos e os osteócitos. Os osteoblastos, provenientes de células osteoprogenitoras, encarregam-se da síntese dos compostos orgânicos da matriz óssea, inclusive do colágeno, das proteoglicanas e glicoproteínas. Os osteócitos são células ósseas maduras, derivadas dos osteoblastos, que residem em lacunas dentro da matriz, chamadas osteoplastos, e secretam substâncias necessárias para a manutenção do osso. Já os osteoclastos são células derivadas de progenitores granulócitos-macrófagos e desempenham o seu papel na reabsorção óssea (KATCHBURIAN; ARANA-CHAVES; 1999; GARTNER; HIATT; 2003).

Os processos de geração e a estimulação dessas células são regulados por citocinas e fatores de crescimento, como o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento semelhante à insulina e o fator de crescimento transformador – β_1 (TGF- β_1). As células osteoprogenitoras são células-tronco mesenquimais pluripotenciais localizadas nas vizinhanças de todas as superfícies ósseas; quando apropriadamente estimuladas, elas têm a capacidade de sofrer divisão celular e produzir uma prole que se diferencia em osteoblastos. Esse processo é vital para o crescimento, remodelagem e reparo do osso. Os osteoblastos são capazes de secretar proteínas, dentre elas pode-se citar o colágeno tipo I, proteínas de aderência celular (osteopontina, fibronectina), de ligação ao cálcio (osteonectina), envolvidas na mineralização (osteocalcina), enzimas (fosfatase alcalina), fatores de crescimento (IGF-1, TGF- β , PDGF) e citocinas (prostaglandinas, IL-1 e IL-6) (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

A reparação óssea, segundo Pittenger *et al.* (1999), é possível, pois muitos tecidos adultos contêm populações de células tronco que têm a capacidade de reagir após um trauma ou uma doença. Essas células podem ser encontradas no próprio tecido injuriado ou em outros tecidos, que servem de reservatório de células tronco. A medula óssea adulta também contém células tronco que contribuem para a regeneração de tecidos de origem mesenquimais como o próprio osso, por exemplo, entre outros.

Para Cowin (2001) o processo da cicatrização óssea pode ser dividido em três eventos biológicos: a fase inflamatória, a fase reparativa e a fase remodeladora. A primeira etapa é caracterizada pela formação de coágulo, a segunda pela construção do calo ósseo e a terceira é a remodelação e a formação de um novo tecido ósseo de forma lamelar.

O reparo desse tecido quer seja por fratura, quer seja pela colocação de implantes osseointegrados, biologicamente é semelhantemente. Segundo Misch (2000) a modelagem anabólica da superfície óssea adjacente à superfície do implante é a primeira a acontecer, formando um calo em pontes nas superfícies endóssea e periosteia (como ocorre na cicatrização de fraturas), originando-se em alguns milímetros da margem do local da implantação.

Porém esta faculdade de restaurar perfeitamente a sua estrutura original e suas propriedades mecânicas não é ilimitada e também pode falhar se certas condições não forem atingidas. Alguns dos fatores que mais comumente afetam, impedindo ou prevenindo, o processo correto de reparo ósseo são: as (1) falhas de vascularização, (2) instabilidade mecânica, (3) defeitos sobreestendidos e, (4) tecidos competidores com alta atividade de proliferação (SCHENK, 1996).

2.2 Bases Biológicas da Osseointegração

Segundo Rossi, em 1990, a osseointegração é um conceito biológico, pois se refere à incorporação, dentro do osso vivo, de um componente (metálico) inanimado, cuja essência nada mais é do que um mecanismo de ancoragem baseado nos processos biológicos de reparo e cicatrização ósseos. Esta ancoragem do implante ao osso é que permite, então, a conexão dos componentes protéticos que reabilitam o(s) dente(s) dentro das suas funções no sistema estomatognático. Por essa razão, apesar de o sucesso da osseointegração não ser mais questionado, atingi-lo ainda depende de aspectos biológicos, de cuidadoso planejamento, meticulosa técnica cirúrgica, habilidade na confecção e elaboração da parte protética e, fundamentalmente, do correto entendimento do processo de cicatrização óssea ao redor do titânio em particular.

Nesse sentido, historicamente, os implantes justa-ósseos nem sempre foram sinônimos de sucesso. Parafusos, agulhas e lâminas foram alguns formatos de fixações feitas em ouro, vitálio, titânio, aço inoxidável, madeira, carbono vitrificado e porcelana que se apresentaram desde a idade média e que fracassaram em função de erros e confusões quanto à biologia óssea. O esperado era a formação de uma interface fibrosa, na tentativa de simular-se um ligamento periodontal, e a formação de uma anquilose óssea, quando ocorria, era encarada como um fator negativo (ROSSI, 1990).

Isso começou a mudar na odontologia contemporânea a partir dos estudos sobre microcirculação e cicatrização de feridas ósseas realizados pelo Prof. Per-Ingvar Branemark, pesquisador chefe do laboratório de Biologia Experimental da Universidade de Gothenburg e do Instituto de Biotecnologia Aplicada de Gothenburg, Suécia, que descobriu a relação de união direta entre titânio e tecido ósseo quando observava a medula óssea de coelhos. Para captar imagens *in loco* da reparação de defeitos ósseos cirurgicamente induzidos por sua equipe nestes animais, ele criara um dispositivo de titânio que fora instalado no tecido ósseo e permanecera imóvel durante o período de regeneração. No momento de sua remoção observou-se a adesão da estrutura de metal ao tecido ósseo. Desde então inúmeras pesquisas se sucederam e definiram esse processo biológico como osseointegração, sendo descrita inicialmente em 1969, por Brånemark e colaboradores.

Fruto dessas pesquisas, em Conferência realizada em Toronto (Canadá) em 1982, Branemark *et al.* apresentaram resultados de estudos longitudinais em humanos de próteses rigidamente fixadas ao osso através de implantes dentais de titânio, com 17 anos de duração. Consagrava-se, então, o termo osseointegração.

Para Kieswetter *et al.* (1996), a formação óssea sobre uma superfície de implante é um processo complexo, que requer o recrutamento de células precursoras de osteoblastos, sua diferenciação em osteoblastos secretores, produção de matriz extracelular não-mineralizada (osteóide) e calcificação da matriz extracelular. Esse processo é altamente regulado por hormônios sistêmicos e por fatores locais.

Albrektsson e Sennerby, em 1990, afirmaram que, quando um material de implante é inserido no organismo, torna-se rapidamente coberto por várias camadas de proteínas. As proteínas aderem-se à superfície do implante e, presumivelmente, controlam, através de processos enzimáticos, a adesão inicial de células, denominando, portanto, o tipo de interface a ser estabelecido com o implante.

Existem eventos essenciais que devem ser levados em conta se o objetivo é entender os mecanismos de integração endóssea. O primeiro, é que as células do tecido conjuntivo, incluindo as células osteogênicas, não entram diretamente em contato com a superfície do implante. Segundo Davies (1998), os lugares dos ferimentos são primeiramente ocupados por células de coagulação que se formam imediatamente ao redor do implante. Células de tecido conjuntivo migram através de remanescentes de coagulação, ainda aderidos à superfície dos implantes, os quais serão modificados por íons e proteínas, através de mecanismos de trocas, e por componentes celulares e humorais do sangue, como plaquetas e fibrina, que já irão interagir com os implantes de titânio, antes que células osteogênicas invadam os lugares do ferimento. Por isso, células osteogênicas, num primeiro momento, não irão interagir com as superfícies de titânio comercialmente puro propriamente, mas com uma superfície modificada por componentes sanguíneos, os quais interagiram anteriormente com a superfície do titânio, modificando a camada de óxidos deste. O processo total de osseointegração, em síntese, ocorre em três fases denominadas de osteocondução, formação de novo osso e remodelação óssea.

Ainda, dentro dos eventos essenciais ao correto entendimento da biologia da osseointegração é importante definir os fenômenos da osteoindução e da osteocondução, que são inter-relacionados, mas distintos. A osteoindução é caracterizada pelo processo de conversão fenotípica de células mesenquimais, pluripotentes, indiferenciadas ou primitivas - presentes no coágulo sanguíneo da interface do osso lesado com o implante, oriundas da medula óssea - que são estimuladas na presença do titânio a se desenvolverem em linhagens de células formadoras de osso, como osteoblastos e osteócitos. Fatores locais, tais como, a tensão de oxigênio na interface, aliada a energia de superfície, rugosidade e topografia do implante vão ajudar a determinar se estas células pluri-potenciais irão se diferenciar em fibroblastos, condroblastos ou osteoblastos. Por sua vez, a

osteocondução tem sido definida como o crescimento ósseo aposicional, permitindo a formação de matriz mineralizada sobre a superfície ou abaixo desta, dentro dos poros, canais ou tubos do implante. Assim o fenômeno da osteocondução consiste na migração de células osteogênicas já diferenciadas. (RAGHAVENDRA, WOOD E TAYLOR, 2005)

Quanto às fases de formação de novo osso e remodelação óssea após a colocação do implante, há uma coexistência dos dois processos. Nas regiões onde a superfície do titânio não obteve contato direto com o osso pré-existente no momento da fixação haverá o preenchimento pelo coágulo sanguíneo que gradativamente será substituído até a formação de um tecido ósseo novo. Paralelamente, sempre existe um dano causado pela cirurgia ao osso pré-existente que então desde o momento da implantação passará por um processo de reabsorção por osteoclastos e remodelação óssea. (BRÄNEMARK, 1983)

Portanto a osseointegração trata-se de um fenômeno biológico dinâmico onde, como em qualquer osso do corpo humano, existe sempre uma intensa e constante remodelação óssea ao redor do implante de titânio. Dessa forma, a taxa de osso com presença de cavidades de reabsorção por osteoclastos é de 30-40% do total da superfície do implante em qualquer momento. Porém, os 60-65% restantes estão direta e rigidamente ancorados no implante, ao passo que o resultado final é semelhante à anquilose. (ROBERTS, 1999)

Roberts e Garetto (2000) citam que modificações ósseas observadas na interface osso/implante podem ser comparadas, em humanos e coelhos. Caracterizam, então, os estágios iniciais da cicatrização periimplantar nestes últimos animais descrevendo que (1) com duas semanas de cicatrização, um retículo inicial de osso imaturo envolve a superfície do implante. Em seguida, (2) com seis semanas esse osso fica suficientemente compactado, estando apto a receber cargas. Com base na extrapolação da duração do ciclo de regeneração óssea em coelhos, esses estágios 1 e 2 são completados, em humanos, em seis e 18 semanas, respectivamente. O terceiro estágio, a (3) remodelação acontece nos coelhos de duas a seis semanas após a injúria, e o último estágio é a (4) maturação observada de seis a 18 semanas após o dano tecidual.

2.3 Implantes Lisos e Implantes com Superfície Texturizada

De acordo com Teixeira (2001), as superfícies dos implantes osseointegrados podem ser classificadas, conforme suas características topográficas, em dois grupos distintos, de acordo com a utilização ou não de processos específicos de texturização. Superfícies de implantes resultantes da usinagem simples de um bloco metálico são chamadas de lisas. Outras superfícies que além do corte ou usinagem do metal recebem texturização, dependendo da técnica ou processo aplicado, podem ser classificadas em porosas ou rugosas. Os processos de texturização de superfícies metálicas mais aplicados atualmente em metalurgia dividem-se em eletroquímicos, químicos e mecânicos, os dois últimos com maior utilização na Implantodontia.

De acordo com Misch (2000), as técnicas de texturização de superfície podem transformar a superfície lisa do implante em rugosa, pela adição de material, como é o caso do plasma *spray* de titânio, e do revestimento com hidroxiapatita; ou pela subtração de material, como por exemplo, o condicionamento com ácido, o jateamento e o tratamento com laser.

Segundo Martinez *et al.* (2001), uma superfície tratada com jateamento e ataque ácido foi proposta pelo Instituto Straumann no início dos anos 90. A superfície do titânio é primeiro jateada com partículas grossas causando uma superfície rugosa grosseira, a qual é, posteriormente, tratada com ataque ácido, formando a superfície rugosa final, chamada SLA.

Em um estudo em coelhos, Wennerberg, Albrektsson e Lausmaa, em 1996, realizaram a comparação entre implantes jateados com partículas de dióxido de alumínio de 25 μ m e 75 μ m, através de avaliação por torque e histomorfometria. Como resultado, encontraram valores mais altos para remoção por torque e maior contato-osso implante nos implantes jateados com partículas de 75 μ m, que tinham a superfície mais áspera.

Em outro estudo, também em coelhos, Wennerberg *et al.* (1997) compararam superfícies jateadas com Al_2O_3 com diferentes granulações ($25\mu m$ e $250\mu m$). Para tal, realizaram testes de torque de remoção e avaliação histomorfométrica, que revelaram valores significativamente mais elevados para ambas superfícies jateadas, comparadas às superfícies lisas.

Cordioli *et al.* (2000) realizaram um estudo onde avaliaram as diferenças entre quatro tipos de superfícies de implantes. Para tal, foram fabricados implantes de titânio comercialmente puro e as superfícies preparadas foram: lisas, jateadas com partículas de dióxido de titânio, recobertas com plasma *spray* (TPS) ou duplamente condicionadas com ácido (Osseotite). Os implantes foram inseridos cirurgicamente em 12 tíbias de coelhos, cada animal recebendo quatro implantes, um de cada superfície. Após cinco semanas, os animais foram sacrificados e testes de torque de remoção e análise histomorfométrica nos espécimes obtidos. Seus resultados indicaram que a superfície com duplo condicionamento ácido obteve um maior enbricamento com o osso e um maior contato osso-implante, chegando a ser superior em 33% em relação à superfície lisa.

Segundo Lumbikanonda e Sammons (2001), a textura superficial dos implantes pode influenciar a adesão celular e subseqüentemente a osseointegração *in vivo*. Em seu estudo, compararam as reações celulares em implantes de titânio lisos, tratados com jateamento de dióxido de titânio, com plasma *spray* de titânio (TPS) ou plasma *spray* de hidroxiapatita (HA). Isso foi realizado através da exposição dos implantes a osteoblastos de rato, durante 20 minutos e posterior análise à microscopia eletrônica de varredura. Seus resultados sugeriram que a superfície tratada com TPS promoveu uma mais rápida cobertura celular da superfície do implante.

Para Bastos, Vanzillota e Soares (2003) e Giavaresi (2003), tais tratamentos de superfície dos implantes, por alterarem a topografia, podem promover o aumento da área efetiva de contato do tecido com o implante, também aumentando a retenção mecânica.

Em contrapartida, Abrahamsson e colaboradores (2002), têm outra opinião. Ao realizar um estudo *in vivo*, utilizando 5 cães da raça *Beagle*, foi observado que a superfície dos abutments de titânio, tratadas ou não tratadas, não interferem na orientação e proliferação das células da mucosa periimplante. Segundo estes autores não há indícios de que essas modificações nos implantes possam ser relevantes clinicamente.

Nesse sentido, Jemt e colaboradores (2002) desenvolveram um estudo clínico durante cinco anos com 58 pacientes edêntulos maxilares, totalizando 349 implantes (sistema Branemark). Em 28 pacientes foram colocadas próteses sobre implantes de superfície tratada e 30 pacientes colocaram suas próteses sobre implantes lisos. Foi realizado um controle radiográfico na Clínica Branemark (Suécia), após cinco anos, onde não foi encontrada qualquer diferença estatisticamente significativa.

Porém, Cordioli *et al.* (2000) entendem que modificações no formato e na superfície dos implantes poderiam, hipoteticamente, compensar a deficiência óssea através do aumento da área de contato, diminuindo as forças de estresse sofridas principalmente por ossos de baixa qualidade, como os maxilares.

2.4 Bases Físicas e Biológicas da Terapia com Laser de Baixa Potência

Uma vez que a delicada interface formada por implante e osso, com perfeita integração é crucial ao sucesso do trabalho de reabilitação protética, não só o implante, mas também os ossos, a seu modo, poderiam ter suas características melhoradas. Nesse sentido, recentemente Silva Júnior (2000) e Pinheiro (2003) defenderam a utilização do laser de baixa potência na otimização da neoformação óssea como meio para a ocorrência de uma cicatrização mais rápida.

Dentro de um contexto histórico, retrocedendo alguns anos, tem-se que o primeiro maser (*microwave amplification by stimulated emission of radiation*) foi desenvolvido por Theodore Maiman, em 1960, há apenas quatro décadas atrás, baseado nos trabalhos de Einstein, publicados em 1916, responsável pela teoria de emissão estimulada de radiação. Entretanto, é atribuído ao físico norte-americano Gordon Gold o desenvolvimento de um sistema de seleção de ondas que permitiu a

obtenção de um feixe de luz altamente concentrado, ao qual chamou de laser, sigla de *Ligth Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, que viria a propiciar ao mundo a abertura de novas fronteiras, revolucionando a ciência em diversas áreas que vão da microcirurgia à exploração espacial. Na odontologia os primeiros estudos envolvendo o uso de laser foram desenvolvidos por Stern e Sogannaes, que trabalharam em esmalte e dentina com um laser de rubi como meio ativo, tendo como achados a redução da permeabilidade dentinária e desmineralização ácida do esmalte. Porém, Adrian e colaboradores, em 1971, comentaram que o calor gerado por esse tipo de laser seria nocivo para a polpa dental. Já Goldman e colaboradores, em 1968, publicaram os primeiros trabalhos na área da cirurgia buco-maxilo-facial. Particularmente no Brasil, a introdução do laser foi bastante tardia, remontando à segunda metade da década de 80, tendo como pioneiros Duarte, Brugnera, Aun, Watanabe e colaboradores (PINHEIRO, 1998).

Todo o equipamento laser possui três elementos essenciais: (1) o meio laser, que pode ser de Dióxido de Carbono, de Argônio, de Hélio-Neônio, de YAG, de Exímeros, de Corantes, de Rubi e de Diodos semi-condutores como o de Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAlAs), entre outros, (2) a fonte de excitação, que pode ser uma lâmpada de *flash* ou um arco elétrico, que elevará as moléculas ou átomos do meio de irradiação laser do estado de repouso até um estado de excitação, cujo retorno ao estado de repouso gera a emissão espontânea de um fóton e, por fim, (3) dois espelhos, situados nas extremidades de uma câmara ressonante que refletem a luz emitida de volta às moléculas ou átomos do meio laser. Dessa maneira o funcionamento destes três elementos gera uma emissão de luz que ao incidir sobre outras moléculas ou átomos do meio acaba por elevar ao estado de excitação novos elétrons que estavam em órbitas menores, que, por sua vez, ao voltarem ao estado de repouso, liberam novos fótons, ou seja, novas ondas de luz, que incidirão sobre outros átomos em repouso, formando uma reação em cadeia. Esta reação encadeada e cíclica é responsável pela amplificação do sinal, dando significado, então, ao acrônimo LASER (*Ligth Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) que se traduz como “amplificação de luz pela emissão estimulada de radiação”. Por fim, uma porção de toda luz amplificada é permitida que vaze para fora da cavidade ressonante fazendo-se um dos espelhos refletir parcialmente a luz, enquanto o

restante desta fica retido internamente para dar continuidade ao processo de irradiação (REINISCH, 1996)

Com as características peculiares como coerência, monocromaticidade e unidirecionalidade o laser se diferencia totalmente da luz natural. Além dessas propriedades ímpares, os lasers se caracterizam pela intensidade de energia do feixe, podendo esta ser alta – sendo chamados de ablativos ou *High Intensity Laser Treatment* (HILT) – ou baixa – denominados terapêuticos ou *Low Intensity Level Treatment* (LILT). O comprimento de onda do laser é determinado pelo meio ativo que normalmente o nomeia, podendo, por sua vez, variar no espectro do infravermelho ao ultravioleta. O tipo de meio ativo também determina a afinidade ou não com o tecido alvo. A absorção e a difusão do laser no tecido resultam numa resposta fotoreativa. Esta é consequência de uma fotodestruição ou uma fotoativação tecidual, determinadas pelo efeito fotoquímico, fotoelétrico, fototérmico ou fotomecânico do laser. De maneira complementar, de acordo com a reação celular, a terapia com laser é classificada em *High reactive-Level Laser Treatment* (HLLT), usado em procedimentos cirúrgicos, e *Low reactive-Level Laser Treatment* (LLLTT), usados em procedimentos terapêuticos clínicos. (BRUGNERA JR., 2003)

Existe em todo organismo animal uma função fotorreguladora a partir de certos fotorreceptores capazes de absorver um fóton de determinado comprimento de onda (CO), chegando a provocar uma transformação na atividade funcional e metabólica da célula. Existem fotorreceptores especializados ou pigmentos fotocromáticos reversíveis (PFF) – (1) clorofila, (2) rodopsina, (3) bacteriorrodopsina e (4) fitocromos (A, B, C, D), cuja função específica é enviar à célula informação do meio externo - especialmente a rodopsina que é comum a todos os animais mais organizados inclusive aos seres humanos, além de fotorreceptores não específicos – (1) flavoproteínas, (2) porfirinas, catalase, citocromos, citocromoxidase e (3) proteínas com Cu, tirosinas, superóxido dismutase, ceruloplasmina, asparginas, entre outras - que incluem moléculas de uma grande variedade morfológica, distribuídas em todas as células do organismo, sendo capazes de absorver fótons dentro de sua especificidade de CO provocando, então, uma variação no metabolismo celular. Toda esta interação dos tecidos com a luz monocromática do laser, na dependência do CO, da unidirecionalidade e coerência do feixe, variando,

então, a Densidade de Potência (DP) e a Densidade de energia (DE) incidente, é responsável por efeitos diferentes nestes tecidos irradiados: (a) eletromecânico, (b) fotoablativo, (c) térmico – (c.1) vaporização, (c.2) coagulação, (c.3) desnaturação de proteínas – e finalmente (d) efeitos não térmicos – (d.1) fotoquímicos e (d.2) fotofísicos. (RIGAU I MAS, 1998)

Justamente é a radiação laser de baixa intensidade que responde pela habilidade para induzir processos fotobiológicos atérmicos, não destrutivos, onde das quatro características citadas anteriormente da luz laser, então, somente duas são de comprovado interesse no LLLT: o paralelismo e a monocromaticidade, já que para se obter efeitos celulares fotofísicos e fotoquímicos não se utilizam altas potências e, além disso, nos CO entre 660 e 940nm (característicos dos lasers diodos) não há uma coerência absoluta, mas, sim uma coerência parcial. Este último fato, em adição, mostrou-se de pouca importância nos aparelhos de laser diodo mais modernos com a comprovação de que a luz laser perde a coerência ao penetrar nos tecidos subjacentes à epiderme e derme. (SCHINDL, 2000)

Entre os aparelhos de laser diodo relativamente novos os mais comuns são com meio ativo semiconductor de Arseneto de Gálio (GaAs) e Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAlAs). Trata-se de aparelhos portáteis, compactos que foram desenvolvidos com considerações econômicas e ergonômicas, o que reduziu muito seu custo em comparação a outros equipamentos de laser. Podem ser empregados em modo pulsátil (GaAs), para coagulação e corte de tecidos, ou em modo contínuo (GaAlAs), apenas para biomodulação (estimulação ou inibição de processos celulares), variando-se nestes casos somente a densidade de potência, usando, para tanto, fibras de vidro especiais para cirurgias ou sondas ópticas aplicadoras para efeitos terapêuticos. Assim, sua aplicação na cavidade bucal é ampla. (ROMANOS e NENTWIG, 1999)

É especificamente a potência destes aparelhos de diodo que justifica o fato de o laser não-ablativo ser chamado por muitos autores de “laser de baixa potência”, pois esta fica entre 1 e 100mW. Nesses níveis, o aparelho não causa significativa alteração de temperatura nos tecidos, diferentemente do ablativo ou cirúrgico com potência de 5 a 200W (HALL e colaboradores, 1994).

Dessa forma, pode-se entender que a determinação da potência (P) de saída é fundamental para a obtenção do efeito terapêutico esperado. A partir desta podemos calcular a DE irradiada aos tecidos, cujo conhecimento é imprescindível para a correta definição da dose de tratamento aplicada. O conceito de DE é a relação entre a energia administrada por um emissor laser e a superfície de irradiação do raio de luz laser, podendo ser expressa em joules por centímetro quadrado (J/cm^2). A fórmula que expressa o conceito de densidade de energia é:

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

A fotoativação do laser terapêutico não ocorre somente na área de incidência do feixe do raio ao longo do tempo de irradiação, mas numa área também distribuída ao seu redor, de forma tridimensional. Baseado nos princípios de difusão, transmissão e reflexão do feixe de laser que atinge o tecido, dependendo do CO, a região de eficiência do laser estende-se por cerca de 1cm de diâmetro, tendo como centro o ponto de incidência do feixe. Não se pode definir exatamente nem a profundidade alcançada nem a dose que atinge tecidos abaixo do ponto de incidência, o que dificulta o conhecimento da dosimetria exata. Supondo que toda a energia tenha sido absorvida e exista matéria sob a superfície, pela lógica tal energia foi transmitida para a camada abaixo da superficial, obtendo-se a zona de atuação em forma de um cubo com 1cm de profundidade. Por isso a atuação do laser não é restrita a área específica de aplicação, mas sim, estende-se numa ampla área de distribuição de energia. (BRUGNERA JR., 2003)

Segundo Reinisch (1996), os mecanismos pelos quais a energia, irradiada em determinada densidade, pode interagir com os tecidos vivos são bastante complexos: (1) transmissão, (2) reflexão, (3) absorção, e (4) dispersão. Primeiramente, a transmissão através das primeiras camadas da pele é muito importante pois há um efeito direto na vascularização abaixo. Além disso, há numa pequena quantidade de luz que é transmitida através de quase todos os tecidos, porém, ainda não há tecnologia precisa o suficiente para mensurar e rastrear sem distorções e interferências esta energia transmitida sem dispersão. O segundo método de interação com os tecidos é a reflexão, que é tanto maior para fora destes quanto mais angulada for a incidência do feixe irradiado sobre a superfície. Assim

uma aplicação perpendicular é recomendada para se minimizar a reflexão diminuindo os riscos de danos externos e potencializando o efeito sobre as células. Além desses dois modos, há também a absorção da luz que segue a Lei de Beer (a intensidade da luz decai exponencialmente com a profundidade) que pode se dar diretamente pelas células através de receptores especializados ou indiretamente por receptores não específicos. O quarto método é a dispersão que é o arremetimento da luz focada para todos os lados dentro dos tecidos levando a distribuição de energia numa área maior que a antecipada pelo diâmetro da sonda aplicadora e, além disso, limita a profundidade de penetração na direção do feixe por dispersar a luz para os lados.

Face a todo este complexo mecanismo de interação com os tecidos, há muito ceticismo em relação aos efeitos da terapia com lasers de baixa potência, com muitos argumentos contra o seu uso rotineiro na clínica odontológica. Instigado por estas controvérsias, Schindl (2000) realizou uma extensa revisão de mais de 30 anos de artigos publicados sobre o assunto e compilou algumas reflexões importantes sobre as dúvidas mais comuns. Primeiramente, conforme o autor, só é possível comparar pesquisas quando os parâmetros dosimétricos foram idênticos: comprimento de onda (λ), frequência (pulsado ou contínuo), saída de potência (P), diâmetro ($D = r \times 2$) do spot ou sonda aplicadora para cálculo da área ($S = \pi \times r^2$) de irradiação, tempo de irradiação, intensidade, dose e intervalos de aplicação no tratamento. Além disso, o autor organizou a revisão reunindo os trabalhos de forma a discutir e elucidar os pontos mais controversos do uso do LLLT, como segue abaixo:

- 1) As baixas potências dos LLLT são suficientes para induzir processos biológicos haja vista que apenas uma pequena quantidade de fótons é suficiente para, por exemplo, penetrar no globo ocular sensibilizando células da retina, que desencadeiam toda uma ativação de células e mecanismos cerebrais à distância. Além disso, comprovou-se que num $\lambda > 700\text{nm}$ as complexas propriedades ópticas internas de reflexão/difusão da pele aumentam a intensidade da luz em cerca de cinco vezes.
- 2) A radiação pode penetrar em camadas mais profundas dos tecidos, pois mostrou-se que existe uma “janela óptica” na pele onde entre

300 e 1300nm de CO a luz passa direto pela epiderme e pela derme. Além disso, em tecidos de granulação a penetração se mostrou 2,5X maior do que em tecidos saudáveis.

- 3) A explicação para efeitos da irradiação laser serem contraditórios, ora estimulantes, ora inibidores dos mecanismos celulares, é trazida em vários trabalhos *in vitro* e *in vivo*, onde observou-se que doses baixas são suficientes para ativar um gradiente de fóton eletroquímico transmembrana em mitocôndrias. Com essa ativação tem-se a liberação de cálcio, seguida de mitose e proliferação celular. Por outro lado, doses muito elevadas, apesar de levarem a uma alta liberação de cálcio, aumentam em demasia a atividade mitocondrial com conseqüente esgotamento dos recursos de ATP da célula, levando à inibição do metabolismo celular. Como conseqüência um dos trabalhos propõem a utilização do termo biomodulação em substituição ao bioestimulação, no tocante ao efeito do LLLT.
- 4) Para o fato indubitável de que muitos trabalhos não apresentam resultado algum, o revisor concluiu que a maioria destas pesquisas possuem erros dosimétricos levando a ausência verdadeira de resposta biológica no cenário pesquisado (maioria das reações biológicas ocorrem com doses entre 1 e 50J/cm²), condições de cultura inapropriadas e delineamento clínico não controlado adequadamente, deixando de levar em consideração os efeitos sistêmicos gerados pela liberação de fatores de crescimento e citocinas na circulação sanguínea, e sem duplo cegamento.
- 5) Os mecanismos de interação fotoquímicos diretos da luz na fase clara (primários) e indiretos de transdução e amplificação do sinal por quimiotaxia na fase escura são muito complexos, induzindo a erros dosimétricos e de interpretação.
- 6) Há comprovação do aumento na proliferação de várias células do organismo como fibroblastos, leucócitos, queratinócitos e células epiteliais, além de aumento na secreção de fatores de crescimento de macrófagos. Porém não há um perfeito entendimento da implicação disto nos processos metabólicos normais ou patológicos.

Também, sob a óptica das controvérsias, relacionando estas aos achados de pesquisas em animais e humanos, Basford (1989) resumiu os efeitos de bioestimulação com respaldo científico: síntese de proteínas e colágeno, síntese de RNA, proliferação celular, ação de células granuladas, motilidade celular, potencial de membrana, quimiotaxia celular, ação de neurotransmissores, dissociação do oxigênio das hemoglobinas, fagocitose, síntese de ATP, matrix intercelular e síntese de prostaglandinas. Além disso, reportou condições onde o laser se mostrou efetivo no tratamento: osteoartrite, nevralgia do trigêmio, dores de cabeça de origem vascular, artrite reumatóide, tendinites, doenças dentais, mal de Peyronie, síndrome de Sjogren, neuropatia causada pela diabete. Concluiu reforçando que as evidências mais importantes da terapia com LLLT são encontradas em trabalhos a nível celular, e sugeriu um número maior de pesquisas cuidadosas no delineamento e com registro fiel da dose de energia irradiada.

Assim, as indicações clínicas do LLLT estão diretamente relacionadas com a DE e a interação da luz com o tecido alvo. Nesse sentido, Lopes e Brugnera Jr. (1998), citando um trabalho de Josep e colaboradores de 1984, descrevem as dosimetrias convencionais recomendadas para uso clínico como sendo (1) de 1 a 3 J/cm² para um efeito antiinflamatório e circulatório, (2) de 2 a 4 J/cm² para um efeito antiálgico, (3) de 3 a 6 J/cm² para um efeito regenerativo. Além disso, em 2003, Pinheiro sugere que, especificamente em implantodontia, para se estimular a osseointegração pela otimização da reparação óssea, a dose ideal seja de 5 a 7 J/cm², em aplicações pontuais de 1 J/cm² através do osso e da gengiva, distribuídas ao redor do implante, começando imediatamente após a cirurgia, com intervalo de 48 a 72h durante 30 dias ou mais.

2.5 Laser de Baixa Potência na Biomodulação dos Tecidos Moles e do Osso

Loevschall e Arenholt-Bindslev (1994), demonstraram que a irradiação com laser num CO de 812nm, numa potência de 4,5 +/- 0,5 mW/cm², é capaz de induzir um aumento na síntese de DNA e proliferação celular de fibroblastos orais. Das diversas densidades de energia pesquisadas *in vitro* a que se mostrou com maior diferença, estatisticamente significativa, foi a de 0,45 W/cm².

Em outro estudo *in vitro*, de Khadra e colaboradores (2005), avaliou-se também diferentes dosimetrias na terapia com laser de baixa potência no efeito sobre a adesão e proliferação de culturas de fibroblastos orais em 90 discos de titânio grau quatro. As culturas foram distribuídas em cinco grupos: (I) controle, (II) dose única de 3 J/cm^2 , (III) doses múltiplas (24h, 48h, 72h) de $0,75 \text{ J/cm}^2$, (IV) doses múltiplas (24h, 48h, 72h) de $1,5 \text{ J/cm}^2$ e (V) doses múltiplas (24h, 48h, 72h) de 3 J/cm^2 . Além dos testes de adesão e da proliferação celulares foi avaliada a variação de temperatura causada pelo laser nos diferentes grupos. Os dados obtidos a partir de contagens em zero, 3h, 6h, 24h, 48h, 72h e 7 dias foram submetidos a análise estatística com ANOVA e correção com comparação múltipla (Bomferroni). Os resultados foram que (1) para a temperatura não houve qualquer variação, (2) para a adesão celular dos fibroblastos orais sobre os discos todos os grupos irradiados foram melhores que o controle, embora não tenha havido diferença estatística entre os protocolos de irradiação, (3) quanto à proliferação os grupos IV e V foram melhores que o grupo II, mas o grupo III não teve melhora estatística significativa em relação ao grupo controle. A conclusão dos autores é que os achados não respondem a questão dos parâmetros ideais de irradiação e que os dados não podem ser transportados para humanos, necessitando mais pesquisas na área.

Estudando, também, a proliferação de fibroblastos *in vitro*, especificamente os do ligamento periodontal humano, Kriesler e colaboradores (2003) obtiveram como resultado da irradiação com LLLT, para dados coletados com culturas de 24, 48 e 72hs, um aumento da atividade metabólica das células em todos os tempos de irradiação analisados e que sempre foram significativamente maiores que o grupo controle. O delineamento constituiu-se de 220 culturas (22 em cada grupo) onde se variou o tempo (75, 150 e 300s) e a frequência de exposição (150 uma vez, 150 duas vezes – 0 e 24h – e 150 três vezes (0, 24 e 48h de cultura), e de um laser de GaAIs com CO de 830nm, numa potência de 10mW, com angulação de 24° e afastamento de 9mm das placas de Petry. As doses finais em função da variação do tempo foram, respectivamente: 1.96, 3.92 e 7.84 J/cm^2 .

Com o intuito de se avaliar, também, o efeito de múltiplas exposições ao LLLT sobre as respostas celulares de reparo tecidual de fibroblastos humanos da pele,

Hawkins e Abrahamse (2006), trabalharam de maneira controlada com culturas irradiadas com CO de 632,8nm, usando uma, duas ou três exposições à doses diferentes de 2.5, 5.0 e 16J/cm² por dia, durante dois dias consecutivos. As culturas foram avaliadas através de medições e mudanças na morfologia, viabilidade, proliferação e dano causado por múltiplas exposições. Concluiu-se que uma dose de 5.0 J/cm² e duas ou três doses de 2.5 J/cm² foram bioestimulantes com aumento da migração e proliferação sem prejudicar a viabilidade celular. Múltiplas exposições a altas doses (16 J/cm²) causaram estresse adicional das células com redução dos parâmetros descritos anteriormente e inibindo a atividade do ATP, gerando dano celular.

Em contrapartida, na avaliação histológica mista (com diversas técnicas de coloração) da LLLT (670nm – contínuo – potência de 9mW) sobre fibras colágenas e elásticas em feridas padronizadas de 8mm de diâmetro de 72 ratos, distribuídas aleatoriamente em (1) controle sem irradiação, (2) aplicação pontual imediata no pós-operatório com 4 J/cm² e (3) 8 J/cm², concluiu-se que não houve diferença estatística entre os grupos. Os resultados mostraram que grupos com LLLT tiveram uma diminuição da inflamação em todas as fases, com aumento do número de fibras colágenas e elásticas e que o melhor resultado foi obtido com dose de 4 J/cm². (PUGLIESE *et al.*, 2003)

Com relação ao efeito do LLLT sobre a vascularização sanguínea, Rydén e colaboradores (1994) utilizaram um delineamento randomizado duplo-cego, com controle intra-indivíduo, para avaliar, através de fotografias com 10X de magnificação, a reação vascular de dez pacientes saudáveis com gengivite induzida nos dentes 33 a 43 frente à irradiação pulsada de laser de GaAl, num CO de 904nm com dose total de 1 J/cm² fracionada em duas aplicações iguais (21º e 24º dias). Um incisivo lateral inferior era irradiado com este protocolo e o contralateral com uma ponteira adaptada para emissão de luz natural. As imagens tomadas em 0, 21, 28 e 42 dias mostraram alterações semelhantes entre os grupos quanto ao aumento da vascularização, índices de placa e sangramento. Os autores concluíram que o laser não modificou as variáveis pesquisadas.

Por outro lado, Banzer e colaboradores (2006), num experimento randomizado, duplo-cego, placebo-controlado com 33 pacientes, mostraram através de espectroscopia Doppler em tempo real, que uma dose total de 18,4 kJ/cm² fracionada em oito aplicações de 2,3 kJ/cm² com laser diodo de CO 880nm no grupo teste (n=18) apresentou um aumento significativamente maior que o grupo controle (n=15) no fluxo sanguíneo periférico e, também, a 8mm de profundidade do ponto de irradiação, podendo ser de grande valia nos processos regenerativos de várias patologias.

Já Campanha (2002) e Nascimento (2002) salientam, em seus trabalhos, a melhoria no processo cicatricial em tecidos moles após irradiação com laser, quando comparados aos grupos não irradiados. Utilizaram em seus estudos o laser de Arseneto de Gálio e Alumínio - 685nm, na dose de 20 J/cm², num modelo animal composto de ratos albinos onde foram realizadas feridas padronizadas no dorso. Após as cirurgias os animais receberam irradiações no pós-cirúrgico imediato, sendo repetidas a cada 48 horas num intervalo de sete dias. Ao oitavo dia, os animais foram sacrificados e o que se observou nestes dois estudos, ao microscópio ótico, foi uma maior estimulação na cicatrização dos grupos onde se aplicou laser.

Similarmente, em 60 ratos com diabetes induzida, submetidos à irradiação com quatro comprimentos de onda diferentes (532, 633, 810 e 980nm) com doses variadas de densidade de energia (5, 10, 20 e 30 J/cm²), num esquema de três vezes por semana sobre feridas padronizadas no dorso, com controles positivo e negativo, Al-Watban, Zhang e Andrés (2007), concluíram que (1) a cicatrização no controle com diabetes foi mais lenta do que no controle sem diabetes, (2) o LLLT dentro dos parâmetros do trabalho pode melhorar a cicatrização de feridas cutâneas em ratos diabéticos e (3) o melhor protocolo foi com 633 nm, numa dose de 10 J/cm².

Com relação às células ósseas, Dörtbudak, Haas e Mailath-Pokorny (2000), através de três grupos de 10 culturas de osteoblastos para formação de tecido ósseo *in vitro*, oriundos de medula óssea de fêmur de ratos Wistar, cada um irradiado com 1,6 J/cm² (690nm – 21mW – 60s) nos dias 3, 5 e 7, e com avaliações após um período de 8, 12 e 16 dias, quando comparados com seus devidos

controles de igual número de culturas e tempos de avaliação, concluíram que o LLLT obteve um resultado fortemente significativo na bioestimulação do crescimento ósseo.

Paralelamente, Do Nascimento e Callera (2006), em um estudo controlado pioneiro com culturas de células progenitoras oriundas da medula óssea de cristas ilíacas biopsiadas, que foram criopreservadas por 3 e por 5 anos, concluíram que a irradiação de LLLT numa densidade de energia de 1 J/cm^2 é acompanhada de um efeito bioestimulante e com 2 J/cm^2 há inibição do crescimento celular, ambos resultados estatisticamente significativos em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

Especificamente em tecidos mineralizados, Silva Júnior (2000) demonstra a importância do laser ao trabalhar com Arseneto de Gálio e Alumínio (830nm) sobre feridas mecânicas, previamente criadas em fêmur de ratos. Seu estudo utilizou-se de 40 animais, com período de observação de sete dias (3 aplicações de $4,8 \text{ J/cm}^2$) e 28 dias (12 aplicações de $4,8 \text{ J/cm}^2$). Numa análise quantitativa, através do Imagilab, para contagem de trabéculas ósseas comparando grupos expostos e não expostos à irradiação, afirma que o laser foi capaz de aumentar quantitativamente o número de trabéculas, acelerando a maturação óssea.

Em adição, num experimento de LLLT randomizado, cego e placebo controlado de 4 semanas de acompanhamento da formação óssea em defeitos padronizados em calvária de ratos, Khadra e colaboradores (2004) concluíram que o tratamento com laser foi responsável por uma melhora significativa no reparo das cavidades. Os tecidos irradiados continham na análise histoquímica significativamente mais cálcio, fósforo e proteínas que os controles. Similarmente, a análise histológica mostrou uma mais pronunciada angiogênese e formação de tecidos conjuntivos, e uma formação óssea mais organizada nos grupos experimentais que nos controles. Utilizou-se um laser de GaAIs (830nm) com emissão contínua e potência de 75mW num total de 3 J/cm^2 por sessão de 40s distribuídas diariamente desde o pós-operatório imediata até o sexto dia, perfazendo uma densidade de energia de 23 J/cm^2 .

Recentemente, numa tentativa de “definir o estado da arte com respeito à fotoengenharia do reparo ósseo usando o LLLT”, Pinheiro e Gerbi (2006) realizaram uma revisão de literatura onde analisam 34 estudos *in vitro* e *in vivo* controlados, realizados de 1987 a 2005, concluindo que (1) o osso irradiado com comprimentos de onda dentro do infra-vermelho apresentam melhora da proliferação dos osteoblastos, deposição de colágeno e neoformação óssea quando comparado com controles não irradiados, (2) o resultado é mais efetivo nos estágios precoces de reparo quando as células estão em franco processo de proliferação, (3) a resposta vascular aumentada é apontada como um dos principais responsáveis pelos efeitos positivos da LLLT nos processos de reparo, (4) permanece a dúvida se a bioestimulação é um efeito sistêmico ou se há estimulação direta dos osteoblastos, (5) é possível que ,além da densidade de energia,seja importante o tempo e o modo de irradiação e ,finalmente, (6) os parâmetros de intensidade e densidade são biologicamente independentes um do outro.

Especificamente, no que diz respeito a implantodontia, inicialmente o laser foi utilizado em alguns trabalhos como o de Deppe, Greim e Brill (2002), apenas para promover a descontaminação em regiões peri-implante.

Atualmente, porém, tem-se pesquisado os efeitos do LLLT sobre a osseointegração e sobre as células e mediadores químicos que desempenham um papel direto neste processo. Através de culturas em discos de titânio, Khadra (2005) usando este tipo de modelo, de forma controlada, concluiu que células derivadas de osso mandibular humano, irradiadas em três dias consecutivos com GaAIs ($\lambda=830\text{nm}$; $P=84\text{mW}$; afastamento das amostras= 9cm ; $DE=3\text{J}/\text{cm}^2$) têm (1)melhoradas a adesão e proliferação sobre o titânio e (2) significativo aumento de produção de osteocalcina e $\text{TGF-}\beta_1$.

Nesse sentido, Lopes (2002), baseado em seu estudo onde utilizou o laser de Arseneto de Gálio e Alumínio (830 nm) e implantes de titânio, afirma que o laser de baixa potência pode ser uma excelente ferramenta para o implantodontista, melhorando a qualidade óssea na interface implante-osso. As irradiações foram feitas a cada 48 horas, iniciando no pós-cirúrgico imediato, seguindo até o décimo quinto dia de pós-operatório. Os coelhos foram então sacrificados nos dias 15, 30 e

45 e foi observado um aumento estatisticamente significativo das células no tecido ósseo que foi exposto ao laser, quando comparadas às não irradiadas.

Khadra e colaboradores (2004), realizaram um estudo de LLLT com oito semanas de duração e delineamento randomizado, cego e placebo-controlado, colocando dois implantes de titânio grau II, com 6,25mm de diâmetro por 1,95mm de altura, cobertos com membrana de politetrafluoretileno expandido (PTFE), em cada uma das tíbias de 22 coelhos da raça Nova Zelândia (n=48). Uma porção das amostras foram analisadas por teste de tração (n=44) para avaliar a adesão funcional, outra parte (n=4) por histomorfometria em microscópio óptico para ver o percentual de contato osso-implante e por meio de um microscópio eletrônico de varredura (MEV), no modo de micro-análise de raios-X por energia dispersa (EDS), para mensuração dos níveis de cálcio e fósforo no osso periimplantar. Apenas o percentual de contato osso implante não apresentou resultados estatisticamente significantes, em nível de 5%, na comparação com o grupo controle, embora com uma melhora média de 10%. A dosimetria para o grupo irradiado foi de 3J em cada um dos nove pontos focados ao redor do implante (GaAIAs 830nm, 150mW).

Analisando, também, a quantidade de cálcio incorporado no osso periimplantar de coelhos submetidos ou não a terapia com LLLT (GaAIAs 830nm, 10mW, DE=86J/cm² por sessão a cada 48h durante 15 dias) , mas, por meio de Spectroscopia Raman e por MEV, com inspeções em 15, 30 e 45 dias de osseointegração, Lopes (2007) concluiu que o osso irradiado apresentou significativamente maior quantidade deste elemento em 30 e 45 dias na comparação com o grupo controle.

Outros trabalhos recentes com a utilização do laser de baixa potência (GaAIAs - λ 830nm) indicam que o efeito positivo na bioestimulação óssea, pode estar (1) no aumento da capacidade de adesão e proliferação de células osteoprogenitoras (KHADRA *et al.*, 2005) e (2) no aumento da velocidade de incorporação de hidroxapatita de cálcio no osso peri-implantar (LOPES *et al.*, 2005), onde sugere-se, no entanto, que pesquisas adicionais sejam feitas no sentido de ampliar os conhecimentos sobre o efeito do laser de baixa potência na bioestimulação da osseointegração de implantes dentais.

3 HIPÓTESE

1. A aplicação de laser no pós-operatório de implantes dentários não tem efeito significativo sobre o percentual de contato osso-implante durante o período de osseointegração.
2. A aplicação de laser no pós-operatório de implantes dentários texturizados não tem efeito significativo sobre o percentual de contato osso-implante durante o período de osseointegração quando comparado com implantes lisos sem aplicação de laser, lisos com aplicação de laser ou texturizados sem aplicação de laser.

4 PROPOSIÇÃO

O objetivo desse trabalho foi avaliar através da análise histomorfométrica o percentual de contato osso-implante obtido durante o período de osseointegração de implantes dentários com superfícies lisas e texturizadas, inseridos em tíbias de coelhos, submetidos ou não à irradiação laser contínua gerada por um diodo semicondutor de Arseneto de Gálio e Alumínio, com comprimento de onda de 830nm, numa dose total de 24J/cm².

5 METODOLOGIA

5.1 Paradigma

Tradicional quantitativo, abordagem descritiva relacional comparativa.

5.2 Variáveis

Independentes - Aplicação de laser, implantes lisos, implantes texturizados.

Dependente – Porcentagem de contato osso-implante.

Controle – Padrão de formação e contato osso-implante no grupo controle.

5.3 Material e Coleta dos Dados

Neste estudo aplicaram-se os princípios éticos da experimentação animal em conformidade com o COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP do Hospital São Lucas da PUCRS. Este modelo de estudo foi delineado a partir das pesquisas já realizadas de Khadra (2004), Lopes (2005), Wennerberg, Albrektsson e Lausmaa (1996), Donath e Breumer (1982) e Rohrer e Schubert (1992).

5.3.1 Modelo Animal

O animal escolhido para este estudo foi o coelho da raça Nova Zelândia. Oito animais adultos jovens do sexo masculino, com idade média de 3 meses, pesando entre 3,0 e 4,0 kg, receberam alimentação sólida (Linha Natural, Purina®) e água *ad libidum*.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente e mantidos em gaiolas suspensas e individualizadas, alojados nas dependências do biotério da FEEPS, já previamente à cirurgia, por um período de cinco dias, para adequação ao ambiente e

às condições de alimentação e tratamento e, após os procedimentos cirúrgicos permaneceram no mesmo local por mais 30 dias até sofrerem eutanásia (Figura 1).



Figura 1: Alojamento com gaiolas individuais suspensas para permanência dos coelhos durante o período da pesquisa. Fonte: dados da pesquisa, 2007.

Para os procedimentos cirúrgicos os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos de quatro coelhos cada, conforme o Quadro 1.

Quadro 1: Divisão dos animais em grupos e cronograma de eutanásia. Fonte: dados da pesquisa, 2007.

Grupos		Aplicação do laser a cada 48 h por 15 dias	Nº. de animais	Eutanásia dos animais após a cirurgia
Controle	2 Implantes Lisos – D ¹ .	não	04	30 dias
	2 Implantes Texturizados - E ² .			
Teste	2 Implantes Lisos – D.	sim	04	30 dias
	2 Implantes Texturizados - E.			

¹ A letra “D” na tabela 1 refere-se à face interna da tibia direita dos coelhos.

² A letra “E” na tabela 1 refere-se à face interna da tibia esquerda dos coelhos.

5.3.2 Cirurgia e Medicação

No dia da cirurgia os animais receberam uma medicação anestésica através de injeção intramuscular (seringa e agulha estéril descartável - B.D[®]) de Zoletil[®] 50mg, 15mg/Kg IM (Zolazepan e Tiletamina, Lab.Virbac S.A). Após dez minutos, sob anestesia geral, foi realizada a tricotomia (figura 2) no local da cirurgia com a utilização de uma tosquiadeira recarregável (Oster[®]) e, em seguida, a antissepsia com solução tópica de álcool 70%; e como procedimento de biossegurança, foi utilizado um campo estéril (Med Care[®]) de TNT (tecido não tecido) com abertura apenas no local da cirurgia e também um campo cirúrgico para colocação dos instrumentais esterilizados.



Figura 2: Procedimento de tricotomia para remoção de pelos da face interna da tíbia.
Fonte: dados da pesquisa, 2007.

A anestesia foi complementada localmente com infiltração subcutânea de Lidocaína (2%) com Epinefrina (1:50.000). Com uma lâmina de bisturi estéril nº 15 (Paramount[®]) realizou-se uma incisão de 3cm nos membros posteriores, na região da face interna das tíbias em seus terços proximais, seccionando pele e tecido subcutâneo. O tecido muscular subjacente foi divulsionado e afastado com auxílio de uma tesoura romba (tipo *Metzemaum*) expondo então o perióstio que foi incisado com lâmina de bisturi estéril nº 15 (Paramount[®]) e descolado da superfície óssea através de uma espátula nº 7 estéril. Após a exposição óssea realizaram-se as perfurações para colocação dos implantes. As tíbias de cada coelho receberam, cada uma, dois implantes de titânio, de 3,75mm de diâmetro por 5,0 mm de

comprimento e 4,1 mm de plataforma, cilíndricos auto-rosqueáveis, feitos especialmente para esta pesquisa pela Conexão Sistema de Próteses Ltda (lote 6081986117), com superfície lisa (Master Screw) na pata direita, e com superfície texturizada por condicionamento ácido (Máster Porous) na pata esquerda conforme os grupos descritos na tabela 1.

Para realizar as perfurações, utilizou-se um motor elétrico (Modelo Driller Blm 600 Plus) com mostrador digital de torque e velocidade controlados, além de um contra-ângulo redutor 16:1 (Kavo) acoplado a esse motor. As perfurações ósseas para a implantação foram colocadas de 10 a 15mm abaixo da articulação tibio-femural, na diáfise do osso tibial, com uma distância de aproximadamente 10mm entre elas (Figura 3).

Em função do tipo morfológico de osso presente na diáfise tibial deste modelo animal, foi necessário fazer algumas modificações na técnica de inserção dos implantes visando garantir uma estabilidade primária destes a partir da porção óssea cortical. Isto porque a cortical externa superior da tíbia destes animais é muito friável com cerca de 1mm de espessura, seguida de uma porção medular com trabeculado ósseo praticamente inexistente, de consistência extremamente mole.

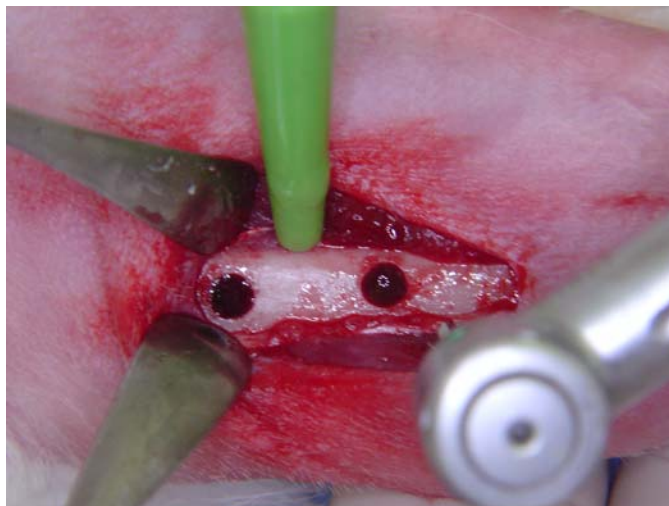


Figura 3: Localização e distribuição das perfurações ósseas nas tíbias dos coelhos. Fonte: dados da pesquisa, 2007.

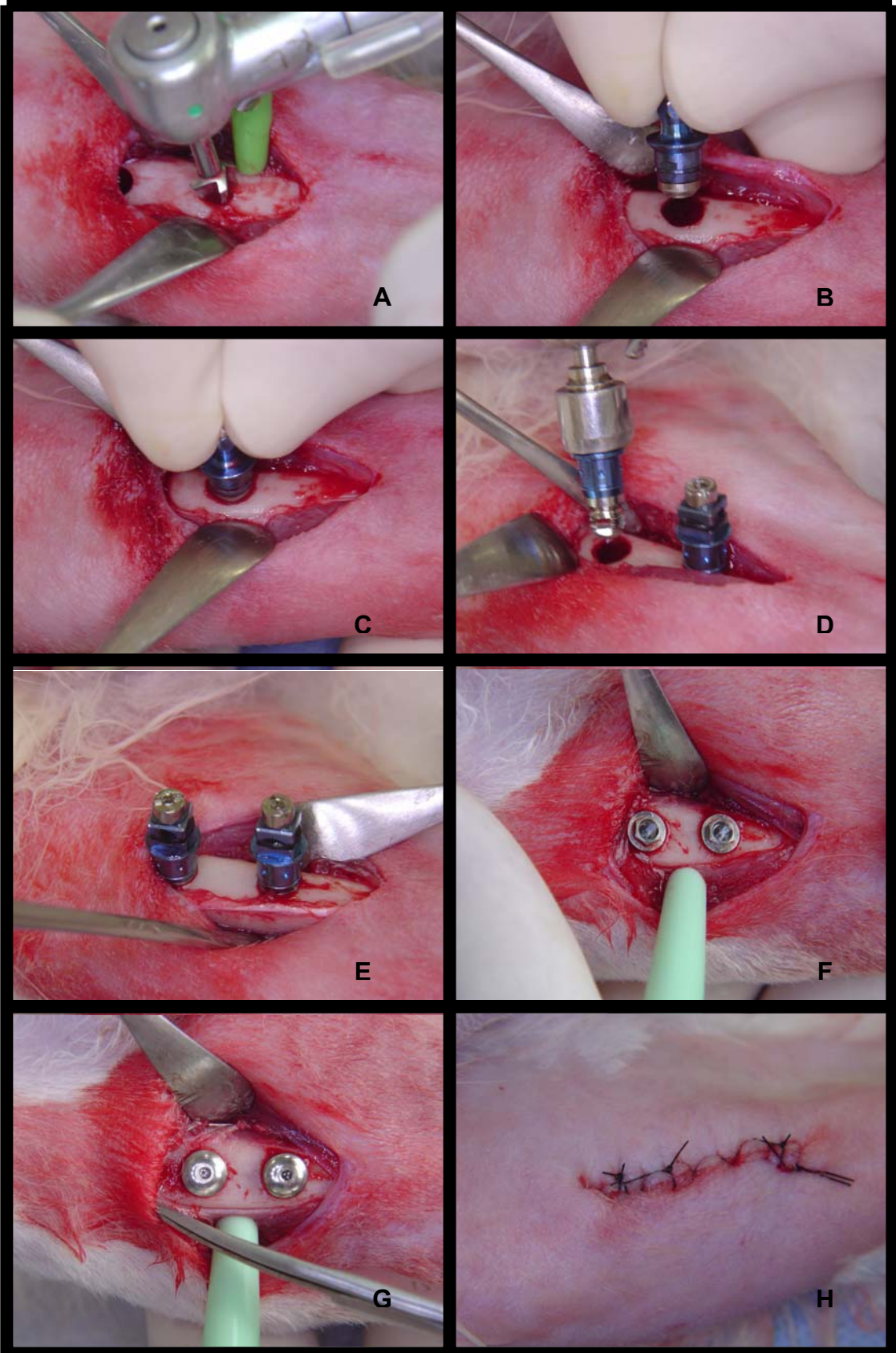
Todas estas modificações foram idealizadas a partir de procedimentos realizados em tíbias de coelhos refrigeradas, disponíveis no comércio local para

consumo humano, que foram adquiridas especificamente para a realização de um teste piloto, com o intuito de otimizar o desempenho da técnica cirúrgica no modelo animal vivo, reforçando a preocupação com os princípios bioéticos inerentes a este tipo de pesquisa.

Assim todos os sítios ósseos foram preparados obedecendo-se à seguinte seqüência:

- 1-** fresa com ponta em forma de lança para marcação inicial da perfuração;
- 2-** fresa de 2,0 mm de diâmetro com penetração intra-óssea apenas rompendo a cortical óssea superior;
- 3-** fresa piloto 2/3 (foi removida a porção inativa desta fresa para se evitar a desestruturação da parte trabecular/medular, mantendo-se apenas a porção cônica com poder de corte);
- 4-** fresa de 3,0 mm de diâmetro com penetração óssea apenas rompendo a cortical óssea superior;
- 5-** fresa de 3,25 mm de diâmetro com penetração óssea apenas rompendo a cortical óssea superior;
- 6-** fresa *countersink* 4.1 mm (modificada com a remoção da porção sem poder de corte, restando apenas a parte ativa que foi utilizada em alternância com um implante piloto – vide item 7 – até que se obtivesse um alargamento suficiente para permitir o assentamento da plataforma deste implante piloto com travamento primário) – (Figura 4A);
- 7-** teste de travamento cortical com inserção de implante piloto modificado (alguns implantes foram cortados logo abaixo da plataforma – onde todos tinham superfície lisa, mantendo-os unidos ao montador, para serem introduzidos em alternância com a fresa *countersink*) - (Figuras 4B e 4C);
- 8-** inserção do implante (Liso ou Texturizado) com 3,75 mm de diâmetro por 5mm de comprimento (Figura 4D).

Toda seqüência de fresagem foi realizada na velocidade de 1200rpm (rotações por minuto) e torque de 35N/cm, usando um contra-ângulo redutor de 16:1 através do osso cortical, com uma constante e intensa irrigação externa de soro fisiológico a 0,9 % (Labormédica[®]) evitando o superaquecimento ósseo.



Figuras 4A a 4H: Seqüência cirúrgica da colocação dos implantes nas tíbias.
Fonte: dados da pesquisa, 2007.

Os implantes foram inseridos com o contra-ângulo em velocidade reduzida de 14rpm através de conectores compatíveis com o diâmetro, sem contato manual direto com o mesmo (Figuras 4D e 4E). Estes foram inseridos até o limite da cortical óssea superior (Figura 4F) e, então, colocaram-se os parafusos de cobertura de modo a selar o interior do implante (Figura 4G) que ficaram posicionados acima da cortical superior, servindo posteriormente para localizar e guiar os pontos de irradiação do laser. Em seguida, o periósteo foi reposicionado e suturado o tecido muscular e tecido cutâneo, utilizando fio mononylon 3.0 montado em agulha de 1,7cm (TECH SYNT[®]) (Figura 4H). Após as suturas fez-se uma tatuagem com violeta genciana 1% (INDAFARMA[®]) na pele dos animais em cima de cada implante, com a finalidade de direcionar os três pontos de irradiação laser ao redor destes (Figura 5). A localização também foi possível através do tato em função dos parafusos de cobertura estarem acima do nível da cortical óssea. Em seguida, todos os animais receberam por cinco dias consecutivos, começando no pós-operatório imediato, como terapia antimicrobiana, injeção intramuscular (seringa e agulha estéril descartável - B.D[®]) de Pentabiótico (penicilina, streptomina, 20.000 UI IM - Lab. Forte Dogde Ltda). Além disso, também durante cinco dias após a cirurgia, como terapia para controle da dor, foram colocadas no recipiente de água dos animais 20 gotas/dia de Alívium (ibuprofeno, 50mg/ml – Mantecorp Indústria Química e Farmacêutica Ltda).

Foram realizados controles pós-operatórios diários pela veterinária responsável pelo biotério já mencionado com a aplicação de Rifocina *spray* em toda a extensão da sutura para evitar infecções locais no pós-operatório (Figura 6), devido ao fato destes animais – crocofágicos – freqüentemente lambem e/ou morderem a região operada. Porém, nos dias de aplicação do laser a Rifocina foi aplicada após o término do protocolo de irradiação com o objetivo de evitar que a coloração escura do medicamento interferisse na fotodinâmica da penetração/absorção pelos tecidos subcutâneos o que criaria uma variável de confundimento.



Figura 5: Localização dos implantes com tatuagem. Fonte: pesquisa, 2007.



Figura 6: Aplicação diária preventiva de Rifocina. Fonte: pesquisa, 2007.

5.3.3 Terapia com Laser de Baixa Potência

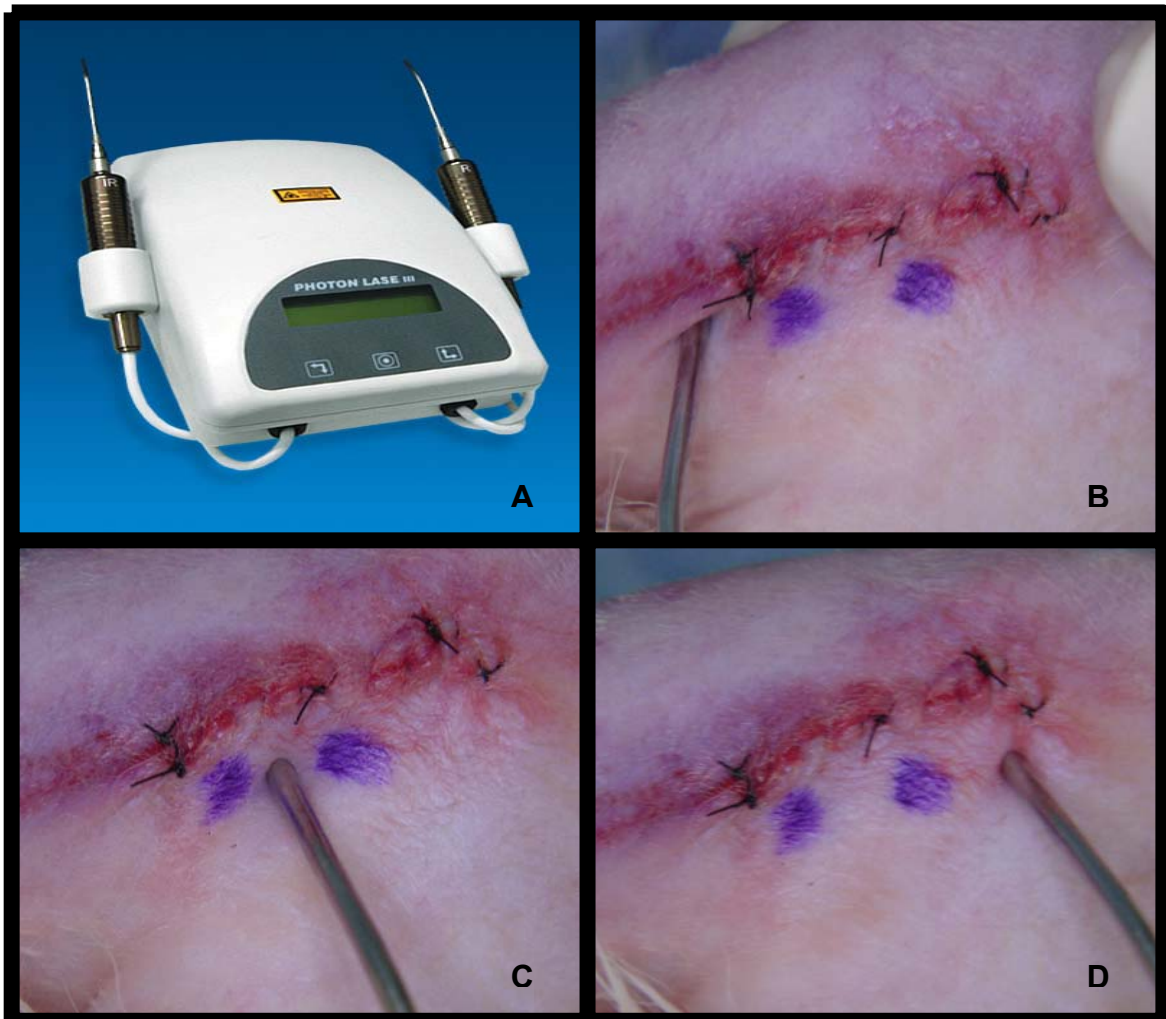
O laser utilizado (Figura 7A) foi um equipamento de diodo modelo Photon Lase III (DMC Equipamentos LTDA – São Carlos – SP – Brasil), que é um semiconductor com meio ativo de GaAlAs, infravermelho com comprimento de onda de 830nm, com emissão contínua, numa densidade de energia de $1\text{J}/\text{cm}^2$ (potência do feixe: 100mW, aplicação pontual, tempo de aplicação dez segundos, área de $0,007854\text{cm}^2$ da sonda aplicadora) como é possível observar na Quadro 2. O feixe foi conduzido através de uma sonda aplicadora, sendo esta uma fibra de excitação. Os animais irradiados receberam irradiação transcutaneamente em três pontos ao redor dos implantes por vez (Figuras 7B a 7D), durante 15 dias a cada 48 horas, sendo a primeira aplicação no dia da cirurgia, com total de oito dias de irradiação com dose total de $24\text{J}/\text{cm}^2$ em cada tibia (3 pontos x 1J x 8 aplicações = 24J). Os animais não irradiados foram submetidos a uma falsa irradiação com o aparelho desligado, passando pela mesma rotina dos animais irradiados.

5.3.4 Eutanásia dos Animais

Dos oito coelhos que iniciaram a pesquisa, dois tiveram de ser sacrificados antes dos 30 dias em função de fratura na tibia durante o período de pós-operatório. As fraturas ocorreram, provavelmente, pela agitação excessiva destes animais quando da retirada/recolocação nas suas gaiolas para a realização dos cuidados necessários das feridas e protocolos de irradiação e não-irradiação laser. As baixas

se distribuíram de maneira igual entre os grupos teste e controle, sendo um coelho de cada, e as suas eutanásias obedeceram ao mesmo protocolo descrito abaixo para o restante dos animais.

Dessa maneira, a eutanásia do restante dos animais foi realizada após 30 dias da colocação dos implantes, conforme o previsto no delineamento inicial da pesquisa. Para tanto, os seis coelhos que permaneceram foram colocados, dois a dois, em uma câmara transparente de CO₂ onde, face à inalação de uma mistura de ar gradativamente mais concentrada em dióxido de carbono, aos poucos perderam a consciência, de maneira que a morte por asfixia aconteceu sem sofrimento para os animais.



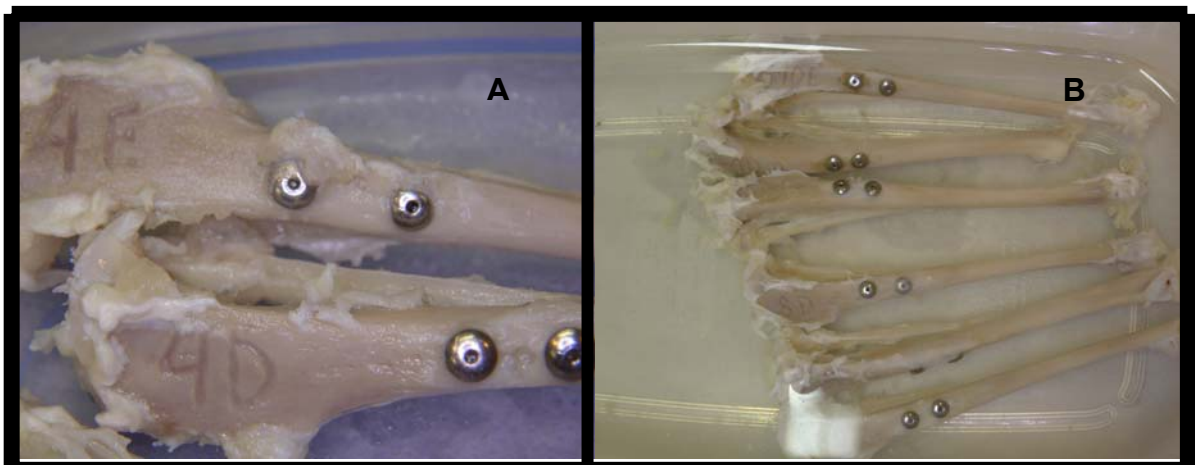
Figuras 7A a 7D: Sequência de Irradiação com Laser GaAlAs – 830 λ nm. Foram três aplicações por vez, em cada tibia, a cada 48 horas, durante 15 dias. Fonte: pesquisa, 2007.

Quadro 2: Protocolo de irradiação com laser de GaAlAs em cada ponto de aplicação. Cada tíbia recebeu três aplicações pontuais por vez. Fonte: dados da pesquisa, 2007.

Parâmetros de irradiação (por aplicação)	Valores (por aplicação)	
Densidade de Energia (DE)	1 J/ cm ²	
Potência	10 x 10 ⁻³ W	
Comprimento de Onda	830 nm	
Área do Feixe (sonda aplicadora)	0,0078 cm ²	
Modo de Aplicação	Pontual	
Tempo	10 Segundos	

5.3.5 Obtenção dos Blocos Ósseos com os Implantes

Tão logo constatado o óbito dos animais, as tíbias foram separadas do restante do corpo, dando seqüência aos procedimentos de dissecação e identificação dos espécimes quanto ao grupo e ao tipo de implante utilizado através do entalhe da numeração na epífise superior das peças, seguido de imersão em solução de formalina 10% para fixação (Figuras 8A e 8B).



Figuras 8A e 8B: tíbias dissecadas, numeradas e fixadas em Formalina 10%. Fonte: dados da pesquisa, 2007.

Após a fixação, as diáfises das tíbias foram seccionadas transversalmente à 1cm de distância dos parafusos de cobertura, lateralmente a cada implante. Para garantir que o trajeto deste corte ficasse paralelo ao longo eixo do implante – fator que seria importante na preparação das lâminas para a microscopia – no momento da secção, então, foi conectada no orifício do parafuso de cobertura uma chave hexagonal que serviu como guia de paralelismo. Quando conectada de maneira correta a chave do parafuso de cobertura adquire a direção precisa do longo eixo do implante.

Cada bloco de tíbia contendo um implante foi obtido com a utilização de uma broca diamantada cilíndrica montada em uma turbina de alta rotação (Kavo[®]), com irrigação tripla e constante de água destilada resfriada, para evitar o superaquecimento da peça que poderia prejudicar a histomorfometria.

Os implantes inseridos nos blocos ósseos foram armazenados novamente em formalina 10% de maneira individualizada, então, em pequenos potes plásticos com tampa, rotulados seguindo uma nova identificação que levou em consideração, também, a posição do implante em cada tíbia em relação à articulação do joelho (Quadro 3). Esta distinção foi realizada pois se observou, no momento da colocação dos implantes, que o diâmetro da diáfise das tíbias possuía uma progressiva diminuição no sentido da articulação do joelho para a articulação do pé, e que os implantes colocados nas porções mais estreitas (mais afastados do joelho) apresentavam uma melhor estabilidade primária em relação aos outros, podendo levar a um viés nos resultados.

Quadro 3: Classificação dos implantes para análise histomorfométrica. Fonte: dados da pesquisa, 2007.

Grupo Laser			Grupo Controle		
Coelho 1	Coelho 2	Coelho 3	Coelho 4	Coelho 5	Coelho 6
L1ET1	L2ET1	L3ET1	C4ET1	C5ET1	C6ET1
L1ET2	L2ET2	L3ET2	C4ET2	C5ET2	C6ET2
L1DL1	L2DL1	L3DL1	C4DL1	C5DL1	C6DL1
L1DL2	L2DL2	L3DL2	C4DL2	C5DL2	C6DL2

L1 a L3: coelhos 1, 2 e 3 do grupo laser.

C4 a C6: coelhos 4, 5 e 6 do grupo controle.

ET1: implante da tíbia esquerda, texturizado, situado mais próximo à articulação do joelho.

ET2: implante da tíbia esquerda, texturizado, situado mais distante à articulação do joelho.

DL1: implante da tíbia direita, liso, situado mais próximo à articulação do joelho.

DL2: implante da tíbia direita, liso, situado mais distante à articulação do joelho.

Observação: o conceito de direito e esquerdo adotado neste trabalho, desde a cirurgia para a colocação dos implantes, até a preparação das lâminas para análise histomorfométrica, que é fundamental para a correta análise das variáveis relacionadas à textura de superfície dos implantes, baseou-se na definição de que a tíbia situada no lado do coração do coelho é a esquerda.

5.3.6 Preparação das Lâminas para Histomorfometria

O trabalho de corte das peças e preparação das mesmas para análise histomorfométrica foi realizado numa máquina metalográfica de corte (Labcut 1010, Extec, Inglaterra) no Laboratório de Materiais Dentários da Faculdade de Odontologia da PUCRS, de acordo com os princípios da metodologia de Donath e Breuner (1982) e de Rohrer e Schubert (1992), com cortes iniciais com cerca de 120 µm (Figura 9), processados posteriormente por polimento até a obtenção da espessura final entre 10 µm e 20 µm (Figura 12), conforme a seqüência descrita abaixo:

- **Desidratação:** as peças foram desidratadas, utilizando uma série crescente de álcoois até 100%, de modo que as peças não ficassem embebidas com o fixador - formol 10% - o que prejudicaria a inclusão das mesmas na resina e os procedimentos de microscopia, após os cortes e montagem em lâminas;
- **Secagem:** as amostras ficaram 72 horas em um dessecador a base de sílica para remover toda a umidade otimizando os procedimentos de inclusão;

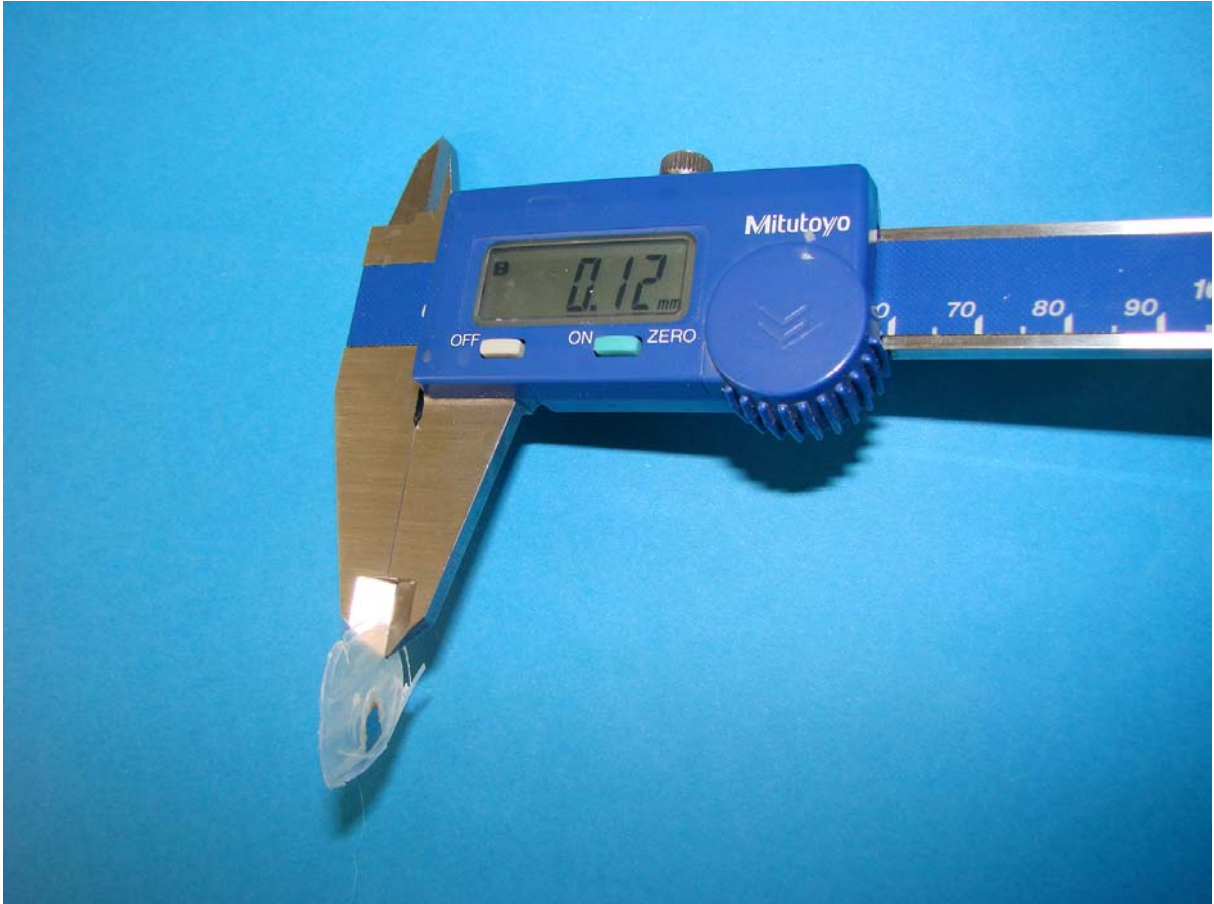


Figura 9: Espessura inicial de 120 μm obtida diretamente da Labcut 1010. Fonte: dados da pesquisa, 2007.

- **Inclusão:** os blocos ósseos foram novamente assentados no fundo dos potes plásticos transparentes descritos no item “3.4.5. Obtenção dos Blocos Ósseos com os Implantes” – em função destes possuírem diâmetro adequado para fixação no suporte da Labcut 1010 (Figuras 11A e 11B) – para, então, serem incluídos em Resina Kit EMBED 812 (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, USA), manipulada conforme recomendação do fabricante para consistência *soft*, com o intuito de facilitar o procedimento de corte na máquina metalográfica;
- **Cortes:** os blocos, incluídos em resina e fixados na Labcut 1010, foram seqüencialmente cortados com um disco diamantado série 15LC (102mm de diâmetro por 0,3mm de espessura) da marca BUEHLER (Lake Bluff, Illinois, USA), perfazendo todo o diâmetro do implante, numa espessura média de 120 μm por corte. Desta maneira

conseguiu-se de cinco a seis lâminas de cada implante, mantendo a arquitetura dos tecidos mineralizados em relação ao implante, inclusive com ótima preservação do tecido medular não-mineralizado (Figura 10);

- **Obtenção da espessura final:** os cortes foram cuidadosa e seqüencialmente lixados e polidos numa politriz horizontal (DPU-10, Panambra Industrial e Comércio AS, São Paulo, Brasil) com lixas d'água 500, 600 e 1200 (3M, São Paulo, Brasil) e refrigeração abundante com água até a espessura final entre 10 μ m e 19 μ m (Figura 12);
- **Limpeza:** lavagem em água corrente e imersão em água destilada para limpeza ultra-sônica durante 5 minutos, seguido de secagem com papéis absorventes.
- **Armazenamento:** em caixas de madeira, com subdivisões para cada peça, com controle de umidade através de dessecantes em forma de sache (Multisorb Technologies, Inc.) (Figura 11B).

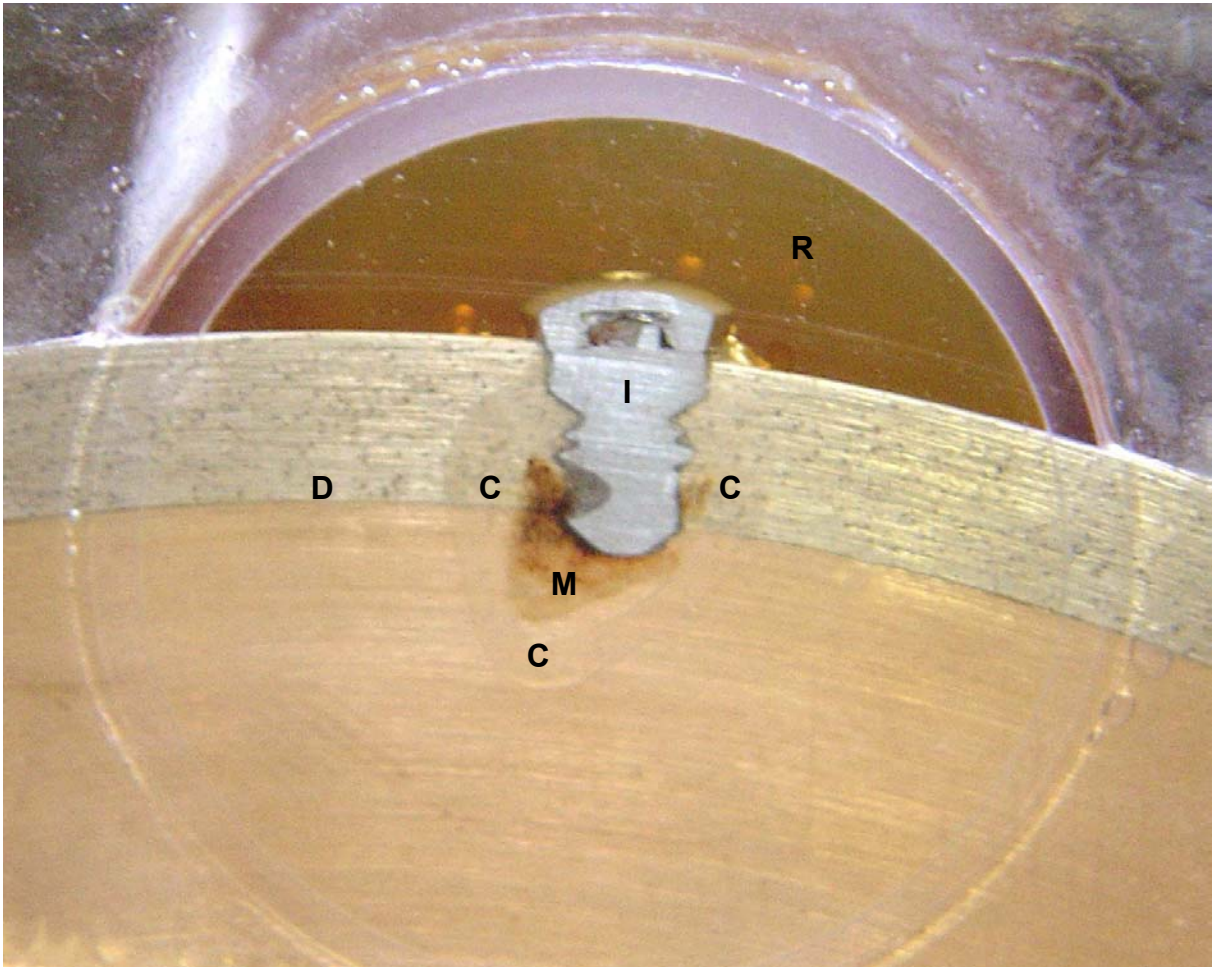


Figura 10: Imagem obtida de um corte em andamento. Em primeiro plano, à frente do disco de corte(D), a porção seccionada (parcialmente), onde se observa o aspecto translúcido do osso cortical (C) devido à pequena espessura do corte e o tecido medular (M). Em segundo plano, após o disco de corte (observar porção mais coronal do implante) o restante do implante (I) com o bloco ósseo incluídos no cilindro de resina (R). Fonte: dados da pesquisa, 2007.



Figuras 11A e 11B: Inclusão e armazenamento dos blocos e lâminas. Fonte: dados da pesquisa, 2007.

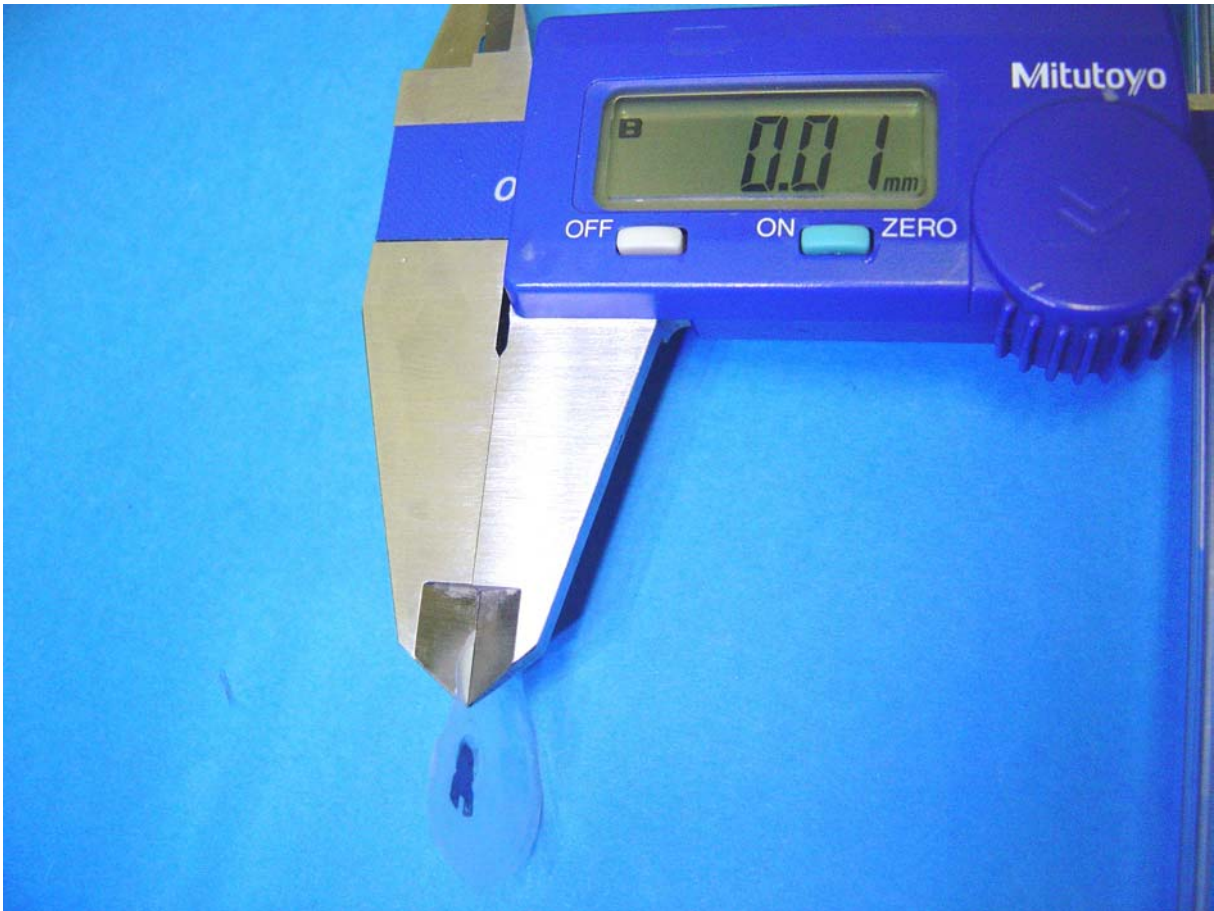


Figura 12: espessura final dos cortes a serem corados para histomorfometria. Fonte: dados da pesquisa, 2007.

5.3.7 Análise Histomorfométrica

A análise histomorfométrica foi realizada através de um microscópio óptico de transmissão de luz Olympus BX 50 (Olympus Optical Co. Ltda., Japan) com aumentos de 40 a 1000 vezes (X), e de uma lupa Estereomicroscópica Zeiss Stemi SV6 (Germany) com aumento de 10 a 32X, disponíveis no Laboratório de Biologia Tecidual da Faculdade de Biociências da PUCRS. A aquisição das imagens foi realizada, diretamente da ocular dos microscópios, através de uma câmera digital (Sony DSC P-92) montada em um tripé e conectada por um cabo a um computador portátil Toshiba Satellite A-75 S229 (Processador Pentium IV) utilizando um programa específico para imagens digitais Image Pro Plus, versão 4.0 para Windows (Média Cybernetics, Silver Spring, MD) segundo metodologia descrita por London *et al.* (2002). (Figura 13).



Figura 13: Rotina de aquisição das imagens do microscópio óptico com cegamento.
Fonte: dados da pesquisa, 2007.

Primeiramente, as lâminas foram coradas com Azul de Toluidina com a finalidade de facilitar a distinção entre os tecidos periimplantares, já que esse tipo de coloração tem maior afinidade por tecidos não mineralizados.

Posteriormente, as lâminas foram analisadas e fotografadas na lupa estereoscópica com aumento de 10X para avaliação da relação da área de secção transversal do implante com a área de secção transversal da tíbia dos coelhos. (Figura 14)

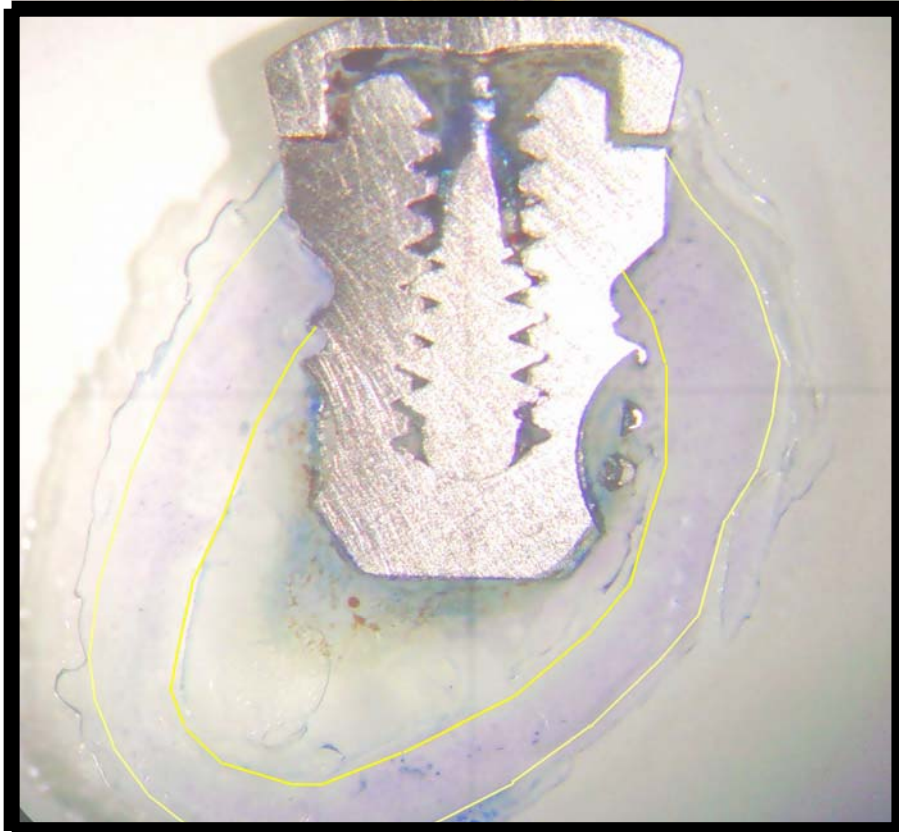


Figura 14: Imagem obtida da lupa com 10X de magnificação. Fotografia realizada diretamente da ocular do equipamento por meio de câmera digital (traçado em amarelo evidencia a forma cortical original da diáfise tibial em relação ao implante). Fonte: dados da pesquisa, 2007.

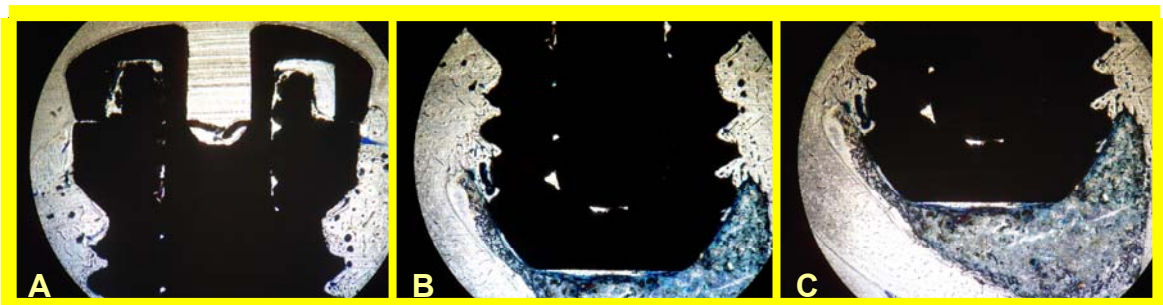
5.3.7.1 Análise Quantitativa

Para a determinação quantitativa do percentual de contato osso-implante (%COI), de todas as lâminas obtidas, apenas os dois cortes mais centrais de cada implante foram utilizados, em concordância com Brito e colaboradores (2004). Após a escolha, então, os cortes foram renumerados aleatoriamente de 1 a 48, promovendo então um cegamento total das amostras. Todas as amostras foram fotomicrografadas num aumento de 40X vezes (objetiva com 4X de aumento e ocular com 10X de aumento) numa seqüência de três imagens focando, respectivamente, (1) a plataforma onde, todos os implantes eram lisos, (2) o corpo, da região logo abaixo da plataforma até o final do implante, onde, ou eram lisos, ou eram texturizados e (3) o ápice do implante, onde em sua maior parte não

apresentava contato com tecido mineralizado. Somente as fotomicrografias onde se focou todo o corpo do implante foram submetidas ao programa para mensuração do contato osso-implante. Desse modo, em nenhuma das mensurações foi computada a região da plataforma dos implantes, em função de todas serem lisas, evitando-se a criação de um viés na comparação do efeito da variável de textura superficial no percentual de contato osso-implante. No entanto, as imagens obtidas da plataforma e do ápice com aumento de 40X, junto com imagens de 100X, 200X, 400X e 1000X de aumento de pontos específicos de interesse, foram analisadas com o intuito de se ratificar a presença/ausência de osseointegração na periferia do implante. (Figuras 15A, 15B e 15C).

Especificamente para a marcação do percentual de contato osso-implante todas as fotomicrografias do corpo dos implantes, e somente estas, foram submetidas ao programa Image Pró-Plus. Primeiramente, mensurou-se o perímetro total do corpo do implante e, posteriormente, mediu-se linearmente toda(s) a(s) parte(s) da periferia do implante sem contato ósseo (Figura 16). Os dados dessas mensurações foram distribuídos numa planilha do Excel® e o cálculo do %COI obedeceu a formula:

$$\%COI = \frac{\text{perímetro total do implante} - \text{perímetro sem osseointegração} \times 100}{\text{perímetro total do implante}}$$



Figuras 15A, 15B e 15C: Seqüência de imagens feitas da lâmina 38 (L38 A, L38 B e L38 C no microscópio óptico com aumento de 40X para análise do percentual de COI. A) plataforma do implante; B) corpo do implante; C) ápice do implante. Fonte: dados da pesquisa, 2007.

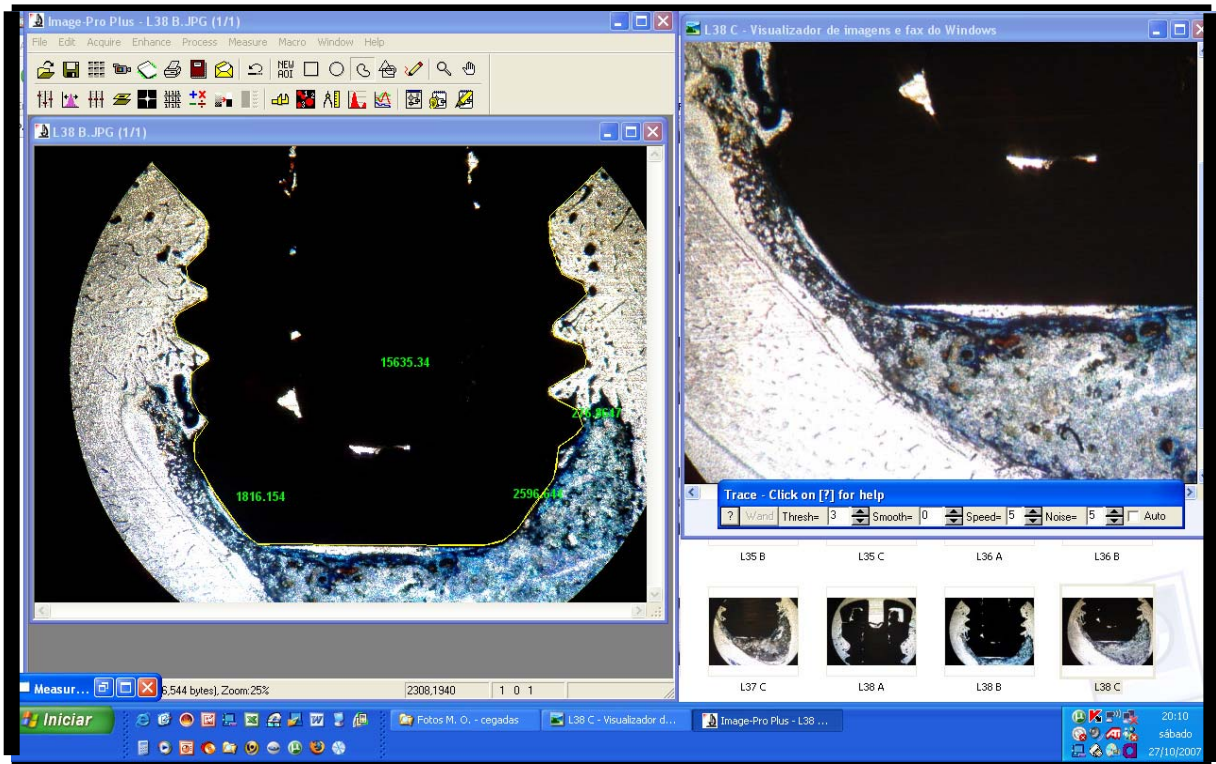


Figura 16: Programas Image Pro Plus® e Visualizador de Imagens e Fax do Windows® sendo utilizados de forma simultânea para, respectivamente, mensurar o %COI através dos traçados lineares (Imagem L38B-Fotomicrografia corpo do implante da lâmina 38) e, também, detalhar as imagens nas zonas de transição das porções osseointegradas para as sem COI (imagem L38 C-Fotomicrografia do ápice do implante com aproximação digital do programa). Fonte: dados da pesquisa, 2007.

Após as medidas do %COI de cada uma das 48 lâminas estarem dispostas numa tabela, o cegamento foi desfeito, permitindo, então, que se calculasse a média aritmética entre os valores obtidos dos dois cortes analisados por implante chegando-se aos resultados finais (vide tabela 6 em anexos).

5.3.7.2 Análise Qualitativa

Para análise qualitativa do efeito na morfologia óssea da irradiação laser durante o período de osseointegração foi utilizado o microscópio óptico com aumentos de 100, 200, 400 e 1000X (ocular de 10X com objetivas de respectivamente 10, 20, 40 e 100X - esta última com a técnica de imersão em óleo) de modo a visualizar o efeito das variáveis estudadas na arquitetura óssea

em nível de sistemas lamelares, ósteons, canais de Havers, canais de Volkmann e lacunas dos osteócitos (osteoplastos).

De maneira complementar, para avaliar a possibilidade de mensuração da composição química do osso estudado histomorfometricamente, quanto aos efeitos do laser e da textura de superfície durante a osseointegração, algumas amostras foram removidas das lâminas histológicas, coladas em suportes metálicos com fita autocolante a base de carbono, metalizadas por recobrimento com uma fina camada de ouro, e analisadas no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) XL30 (Philips, Holanda), disponível no Centro de Microscopia e Microanálises da PUCRS. As análises foram realizadas nos modos de detecção por elétrons retro espalhados (BSE) e de espectro característico de emissão de Rx (EDS), utilizando aumentos de 10 a 7000X. As imagens obtidas a partir do próprio sistema do MEV foram salvas em um computador portátil.

6 RESULTADOS

Antes de se partir para a análise dos resultados obtidos, realizou-se um estudo para avaliação do grau de confiabilidade das medições do %COI. Dessa forma, para cada dez amostras medidas, uma micrografia de lâmina foi escolhida aleatoriamente e submetida a uma nova mensuração do %COI. No final teve-se, então, um levantamento repetido em 12,5% das amostras. Para se calcular o grau de erro entre as duas medições, ou seja, estabelecer se estas eram confiáveis ou não, realizou-se uma análise estatística comparando a primeira medição com a segunda (tabela 1).

Assim, através do resultado do teste *t-student* para amostras pareadas verificou-se que não existe diferença significativa entre as duas medições realizadas, ou seja, que os %COI obtidos são confiáveis.

Tabela 1. Análise estatística do grau de confiabilidade das medições do %COI.
Fonte: dados da pesquisa, 2007.

Medição	Média (%COI)	Desvio-padrão	Diferença Média (%COI)	p
1ª Medição	73,13	25,14	0,14	0,71
2ª Medição	73,27	25,21		

6.1 Análise Quantitativa - Estatística dos Dados

Os resultados obtidos, então, a partir dos materiais e métodos descritos anteriormente, foram agrupados de acordo com as variáveis da pesquisa de modo a facilitar o entendimento da análise estatística e posterior discussão.

A análise estatística destes dados foi realizada através de tabelas, gráficos, estatísticas descritivas (média, desvio-padrão) e alguns testes estatísticos destacados a seguir.

Para a verificação da normalidade dos dados foi utilizado o teste não-paramétrico *Kolmogorov-Smirnov*. Este teste é considerado uma prova de aderência e diz respeito ao grau de concordância entre a distribuição de um conjunto de valores amostrais e determinada distribuição teórica específica, neste caso, a distribuição normal (SIEGEL, 1975). Para este trabalho as variáveis estudadas apresentaram distribuição normal, por isso o teste utilizado para a comparação entre os grupos foi o teste paramétrico *t-student*.

Para a comparação entre os grupos de tratamento (laser e controle) e entre tipo de implante (texturizado ou liso) foi utilizado o teste de comparações de médias *t-student* (ARANGO, 2001).

Para o processamento e análise destes dados foi utilizado o software estatístico SPSS versão 10.0

6.1.1 Comparação Geral da %COI entre Grupos Laser e Controle

Através dos resultados do teste para comparações de médias *t-student* verifica-se que não existe diferença significativa entre as médias para os grupos estudados (tabela 2; gráfico 1). ($t=1,197$; $p=0,244$)

Tabela 2. Comparação geral do %COI entre os grupos Laser e Controle. Fonte: dados da pesquisa, 2007.

Grupo	<i>n</i>	Média (%COI)	Desvio-padrão (<i>s</i>)	<i>t</i>	<i>p</i>
Grupo Laser	12	77,048	10,173	1,197	0,244
Grupo Controle	12	69,516	19,284		

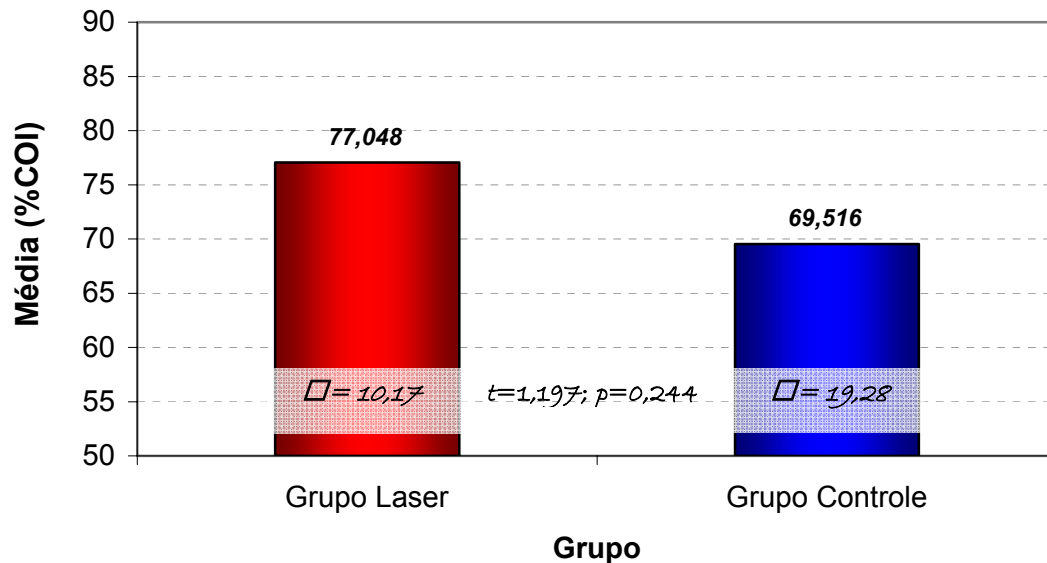


Gráfico 1. Comparação do %COI entre os grupos laser e controle de forma geral, sem levar em consideração o tipo de superfície, não apresentou diferença estatística num nível de significância de 5% (*t-student*). Fonte: dados da pesquisa, 2007.

6.1.2 Comparação por Subgrupos da %COI entre Grupos Laser e Controle

Através dos resultados do teste para comparações de médias *t-student* verifica-se que não existe diferença significativa entre as médias para os grupos estudados para nenhum dos tipos de implantes (tabela 3; gráfico 2).

Tabela 3. Comparação do %COI entre os grupos Laser e Controle para cada tipo de implante (*t-student*). Fonte: dados da pesquisa, 2007.

Grupo	n	Média (%COI)	Desvio-padrão (δ)	t	p
Texturizado					
Grupo Laser	6	81,530	10,155	1,167	0,270
Grupo Controle	6	72,190	16,778		
Liso					
Grupo Laser	6	72,565	8,737	0,574	0,578
Grupo Controle	6	66,842	22,791		

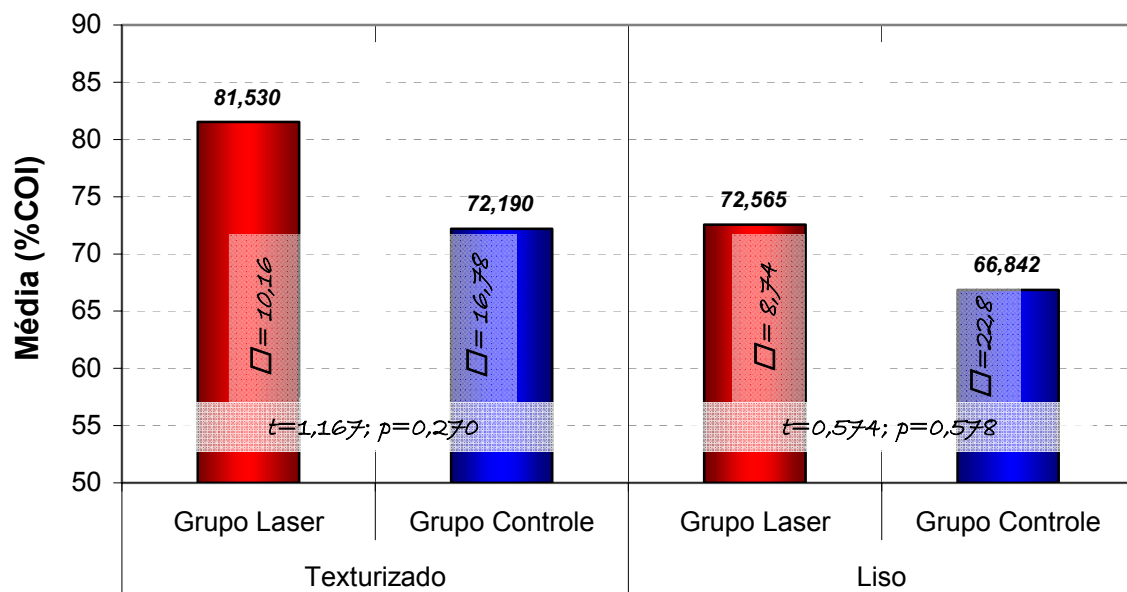


Gráfico 2. Comparação do %COI entre os grupos laser e controle para cada tipo de implante sem diferença estatística num nível de significância de 5% (*t-student*). Fonte: dados da pesquisa, 2007.

6.1.3 Comparação Grupo a Grupo entre Implantes Texturizado e Liso

Através dos resultados do teste para comparações de médias *t-student* verifica-se que não existe diferença significativa entre as médias para os implantes acima comparados para nenhum dos grupos (tabela 4; gráfico 3).

Tabela 4. Comparação do %COI entre os tipos de implantes para cada grupo (*t-student*). Fonte: dados da pesquisa, 2007.

Implante	n	Média (%COI)	Desvio-padrão (σ)	t	p
Grupo Laser					
Texturizado	6	81,530	10,155	1,639	0,132
Liso	6	72,565	8,737		
Grupo Controle					
Texturizado	6	72,190	16,778	0,463	0,653
Liso	6	66,842	22,791		

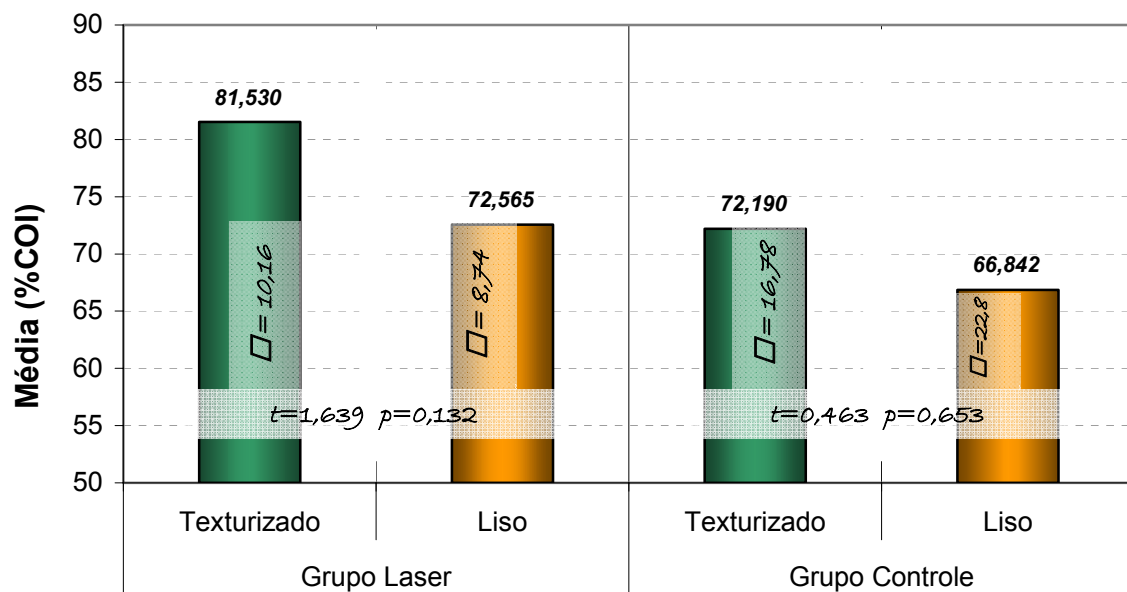


Gráfico 3. Comparação do %COI entre os tipos de implantes para cada grupo sem diferença estatística num nível de significância de 5% (*t-student*). Fonte: dados da pesquisa, 2007.

6.1.4 Comparação entre os Grupos Laser e Controle em Relação à Posição Tibial da Fixação do Implante

Através dos resultados do teste *t-student* verifica-se que não existe diferença significativa entre os grupos Laser e Controle quanto à posição tibial em relação ao joelho (tabela 5), a despeito da existência de um maior contato inicial osso-implante com o distanciamento da articulação tíbio-femural, com maior estabilidade primária e travamento cirúrgico devido à redução do diâmetro tibial (figuras 17A e 17B - lupa 10X de magnificação; gráfico 4).

Tabela 5. Comparação do %COI entre os grupos na dependência da localização tibial em relação ao joelho (*t-student*). Fonte: dados da pesquisa, 2007.

Implante	n	Média (%COI)	Desvio-padrão (σ)	t	p
Implante = Final 1					
Laser	6	72,94	9,17	1,51	0,16
Controle	6	61,91	15,40		
Implante = Final 2					
Laser	6	81,16	10,15	0,42	0,68
Controle	6	77,12	21,03		

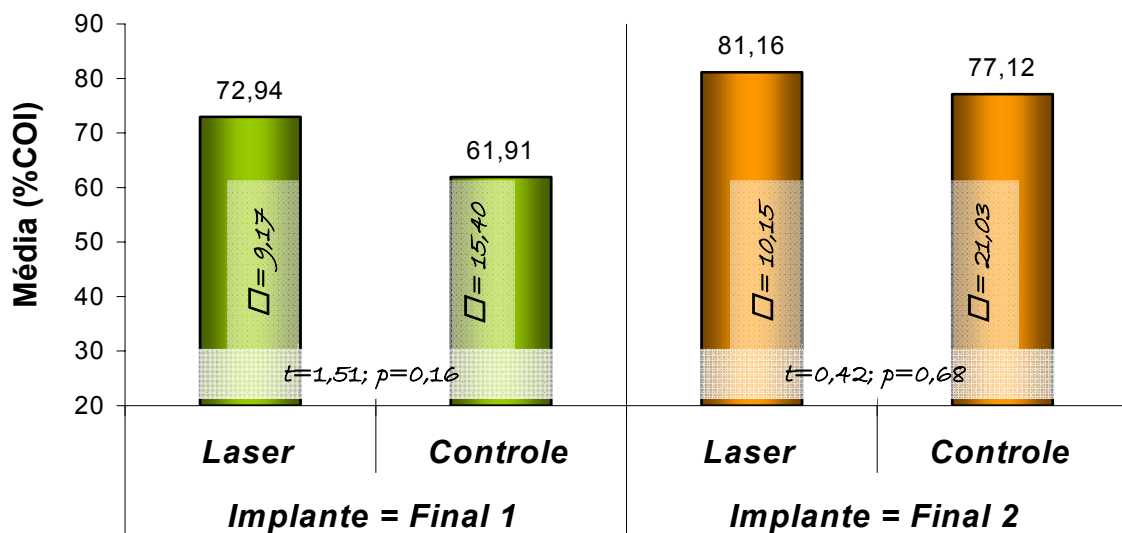
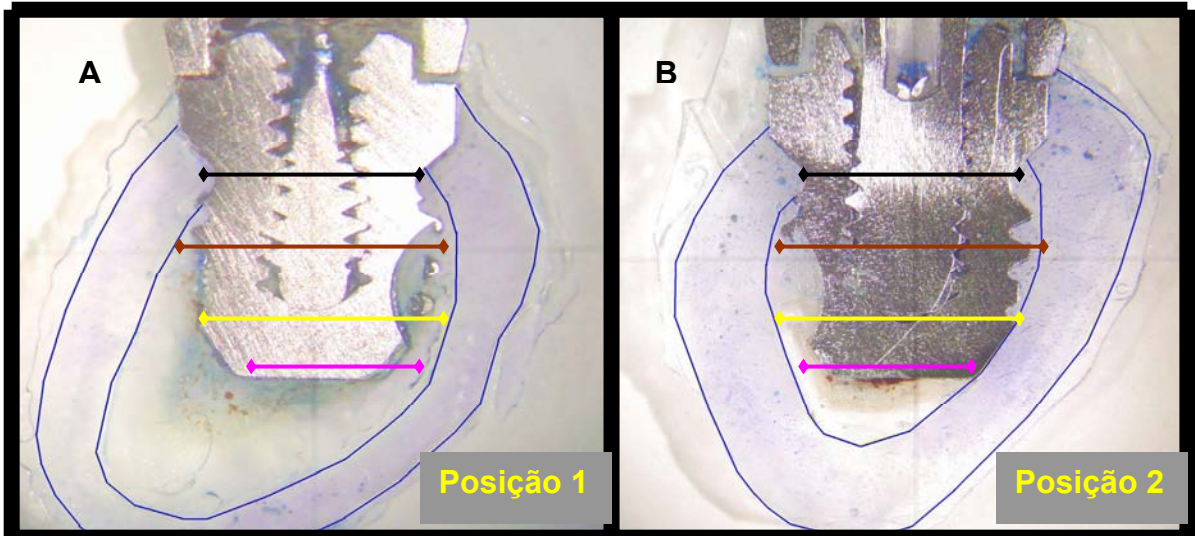
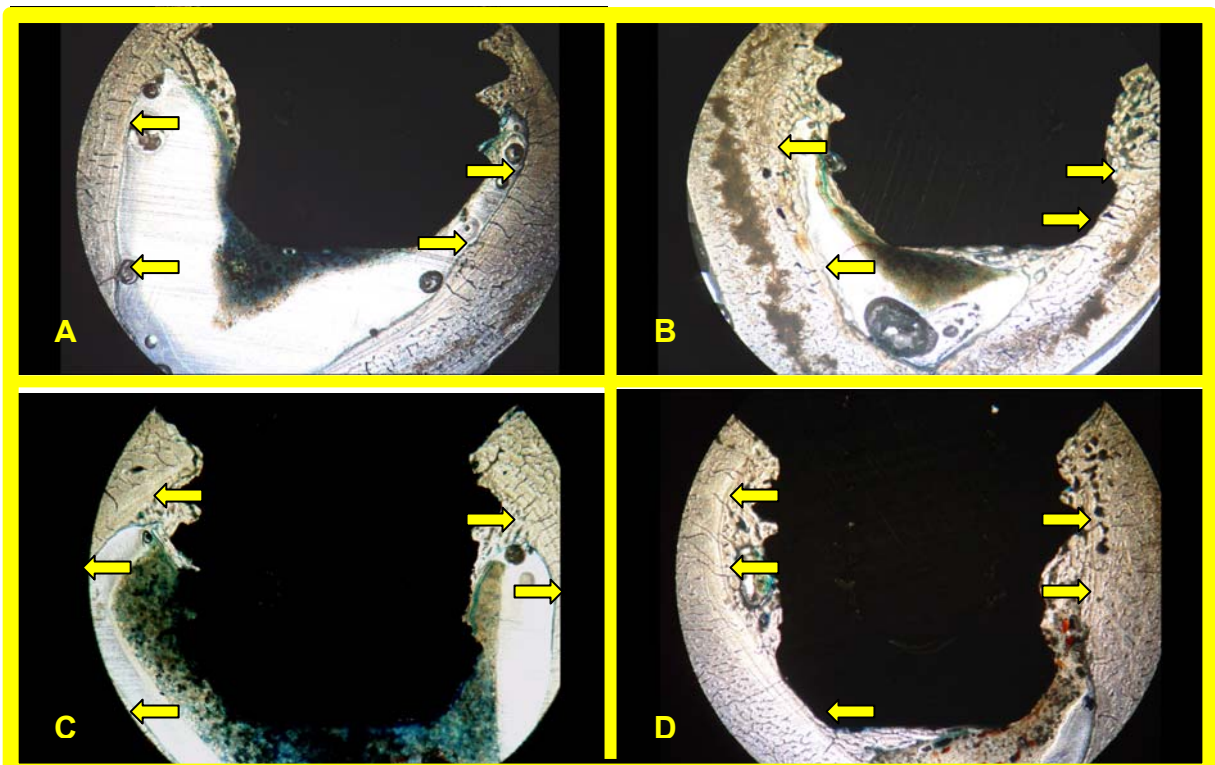


Gráfico 4. Comparação do %COI entre os grupos de implante de final 1 e de final 2 sem diferença estatística num nível de significância de 5% (*t-student*). Fonte: dados da pesquisa, 2007.

Este decréscimo no diâmetro da diáfise tibial em relação à posição 1 e 2 dos implantes trata-se de uma característica anatômica observada em todos os coelhos. Todavia, isto foi particularmente exacerbado no coelho número seis do grupo controle, resultando na grande diferença do %COI observado entre estes, tanto na tibia direita entre os implantes lisos C6DL1 (65,09%) e C6DL2 (98,64%) – diferença de 33,55%, quanto na tibia esquerda com os implantes texturizados C6ET1 (41,77%) e C6ET2 (86,63%) - diferença de 44,86%. O impacto destas diferenças na média final do grupo controle foi de 6,54% positivo. As fotomicrografias destes implantes ilustram a acentuada diminuição do diâmetro da tibia. (Figuras 18A à 18D)

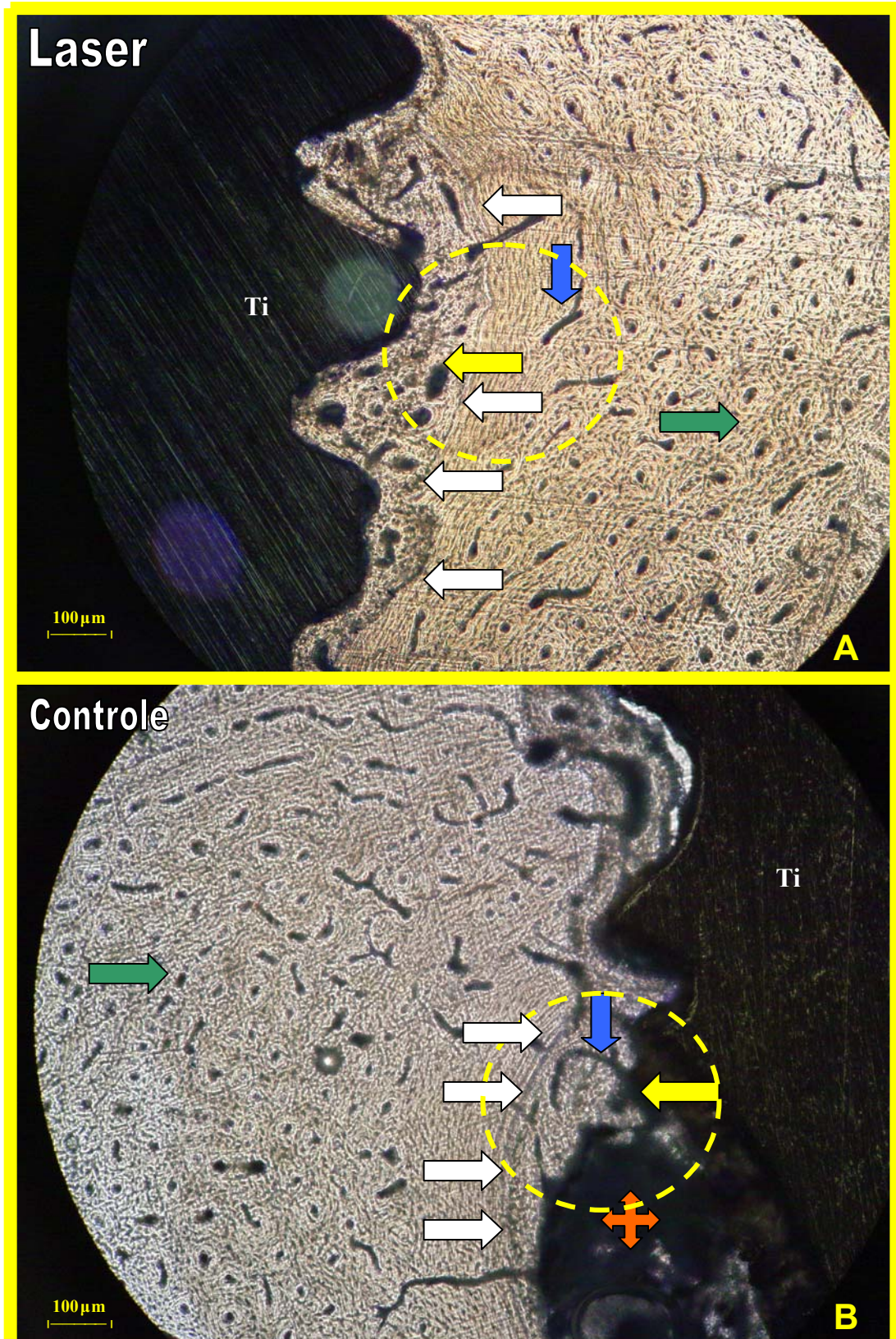


Figuras 18A a 18D: A) e B) são respectivamente os implantes 1 (C6DL1) e 2 (C6DL2) da tibia direita do coelho número seis (GRUPO CONTROLE); C) e D) são respectivamente os implantes 1 (C6ET1) e 2 (C6ET2) da tibia esquerda do coelho número seis (GRUPO CONTROLE). As setas nas figuras delimitam a porção interna da cortical nas diáfases tibiais. Pode-se visualizar nas figuras B) e D) o travamento cortical na região lateral do ápice do implante favorecendo a proliferação óssea por quase toda a zona apical em franco contraste com os implantes das figuras A) e C) cujo travamento ocorreu apenas na região coronal logo abaixo da plataforma. Fonte: dados da pesquisa, 2007.

6.2 Análise Qualitativa dos Dados

A partir do exame das lâminas no microscópio óptico (MO) evidenciou-se uma diferença marcante em nível estrutural do osso formado a partir da colocação do implante na diáfise tibial dos coelhos durante o período de 30 dias de osseointegração.

No estudo com aumento de 100X observa-se que há similaridade na estruturação do osso compacto original da diáfise entre os grupos laser e controle, onde é possível identificar claramente todos os sistemas lamelares. Nas figuras 19A e 19B tem-se a visualização do sistema de ósteons – maior parte dos ossos compactos, onde as lamelas são concêntricas aos espaços vasculares ou canais de Havers, e do sistema circunferencial interno – formado de poucas camadas de lamelas paralelas que envolvem totalmente a cavidade da medula óssea. Ainda, nestas figuras vê-se, a partir do sistema circunferencial interno, a formação de um novo arcabouço ósseo composto de ósteons menos organizados que os da porção original da diáfise, que se projeta da cortical em direção à superfície do implante.



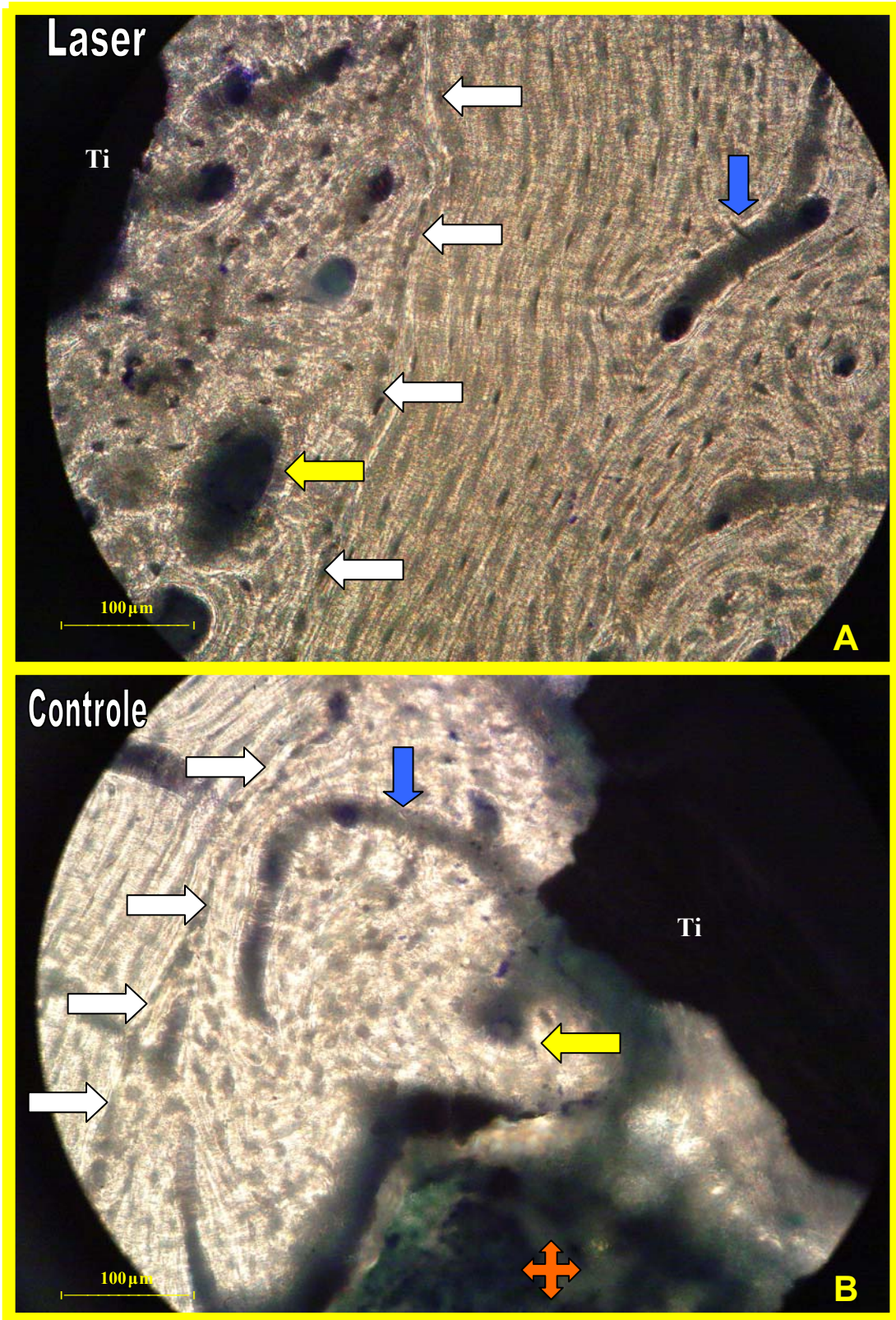
Figuras 19A e 19B: Micrografias de lâminas coradas com Azul de Toluidina mostrando as áreas de osso novo formado em aposição ao sistema lamelar circunferencial interno (setas brancas) em direção ao implante (Ti) nos grupos laser (A) e controle (B). Osteons do osso original (setas verdes). Canais de Haver's do osso novo (setas amarelas). Canais de Volkmann (setas azuis). Tecido medular não mineralizado (setas laranjas). Aumento original de 100X. Fonte: dados da pesquisa, 2007.

Com um aumento de 400X visto nas figuras 20A e 20B (focado na área circular amarela demarcada nas figuras 19A e 19B), é possível perceber que, de maneira geral, o diâmetro dos canais de Havers do osso novo é maior no grupo do laser do que no grupo controle.

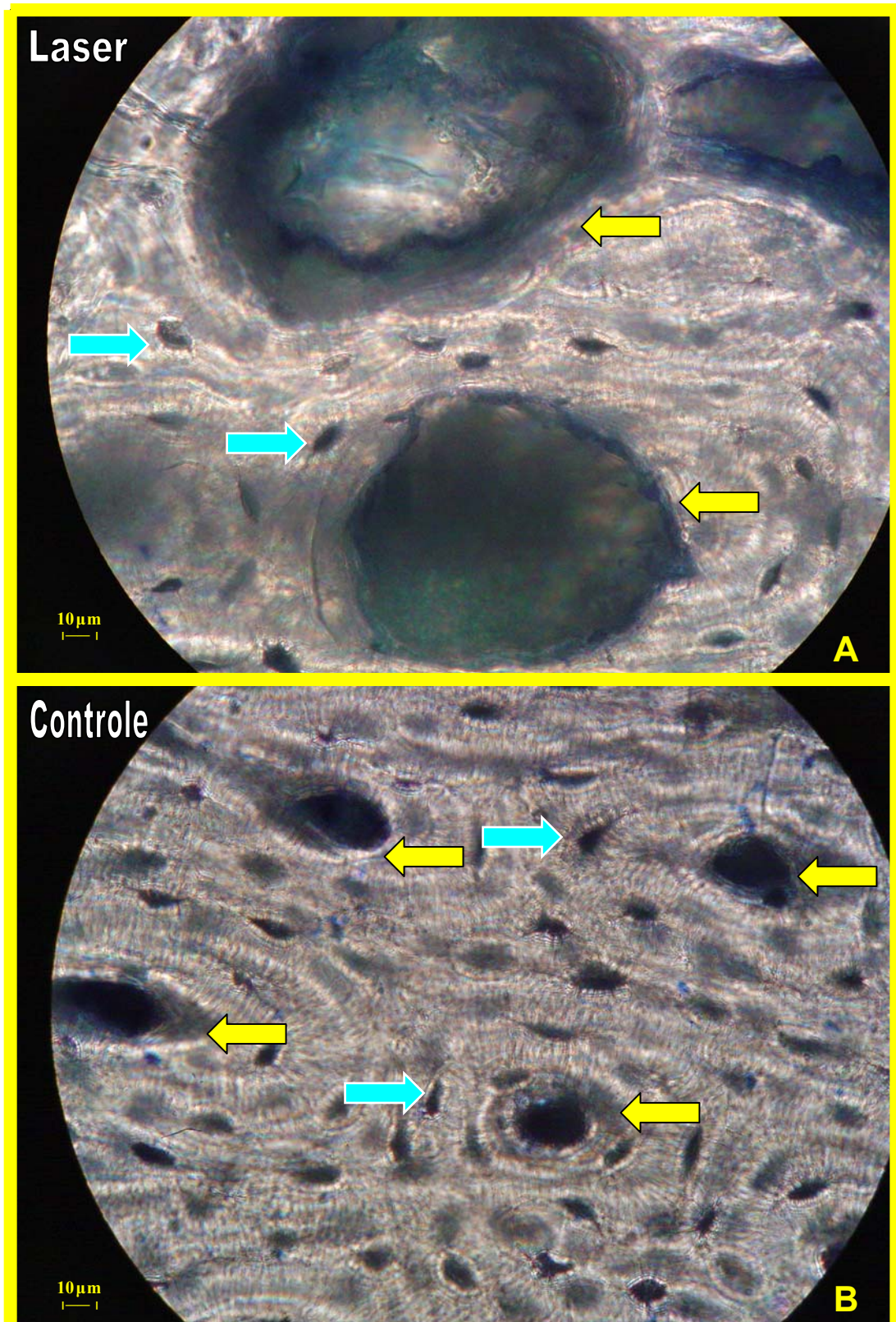
Numa visão com aumento de 1000X tem-se como resultado que o osso irradiado apresenta canais de Havers com diâmetros 3 a 4 vezes maiores que o grupo controle (Figuras 21A e 21B).

Observou-se, também, num aumento de 1000X, que a irradiação laser resultou em uma maior organização do novo osso nas regiões onde houve osseointegração com a superfície do titânio (Figuras 22A e 22B). Dessa forma, percebe-se na fotomicrografia do grupo laser que a disposição do novo osso é paralela à superfície do titânio com a qual está em íntimo contato, assim como os osteócitos (osteoplastos) e os canais de Havers. No grupo controle, apesar de os osteócitos (osteoplastos) e a matriz mineralizada também estarem relacionadas muito próximas à superfície do titânio vê-se que os osteoplastos estão dispostos de forma mais aleatória assim com os canais de Havers.

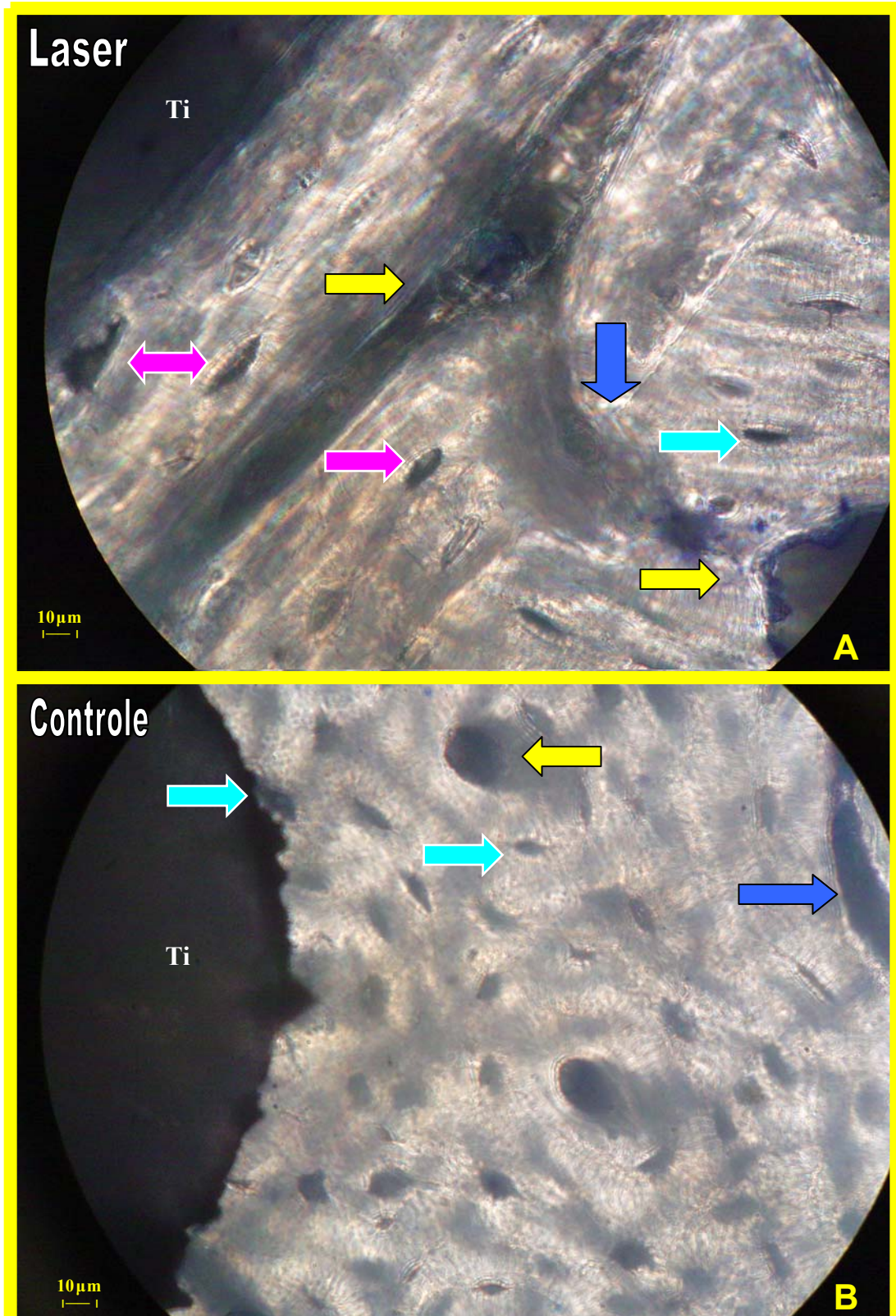
Quanto ao efeito do tratamento superficial adicional do grupo texturizado, em relação ao controle liso, não se observou diferença em nível estrutural da anatomia óssea em nenhum tipo de aumento estudado com lupa ou microscópio óptico.



Figuras 20A e 20B: Micrografias de lâminas coradas com Azul de Toluidina mostrando em maior aumento a região circular delimitada nas figuras 19A e 19 B. Osso neoformado (setas brancas) em direção ao implante (Ti) nos grupos laser (A) e controle (B). Canais de Havers do osso novo (setas amarelas). Canais de Volkmann (setas azuis). Tecido medular não mineralizado (setas laranjas). Aumento original de 400X. Fonte: dados da pesquisa, 2007.



Figuras 21A e 21B: Micrografias de lâminas coradas com Azul de Toluidina mostrando a diferença no calibre dos Canais de Havers no osso neoformado dentro dos grupos laser (A) e controle (B). Canais de Haver's do osso novo (setas amarelas). Osteócitos distribuídos circunferencialmente aos Canais de Havers (setas turquesa). Aumento original de 1000X. Fonte: dados da pesquisa, 2007.



Figuras 22A e 22B: Micrografias de lâminas coradas com Azul de Toluidina mostrando a diferença no padrão de mineralização do osso neoformado na superfície do implante (Ti). No grupo laser (A) o osso novo apresenta lamelas dispostas paralelamente à superfície do implante. Canais de Havers do osso novo (setas amarelas). Osteócitos distribuídos paralelamente ao implante (setas rosa). Osteócitos distribuídos circunferencialmente aos Canais de Havers (setas turquesa). Canais de Volkmann (setas azuis). Aumento original de 1000X. Fonte: dados da pesquisa, 2007.

Paralelamente, com o resultado da análise complementar de algumas amostras através do MEV, no modo BSE, ratificaram-se as diferenças morfológicas do osso já descritas ao estudo no MO e se possibilitou uma nova visão da topografia óssea e dos implantes. (Figura 23)

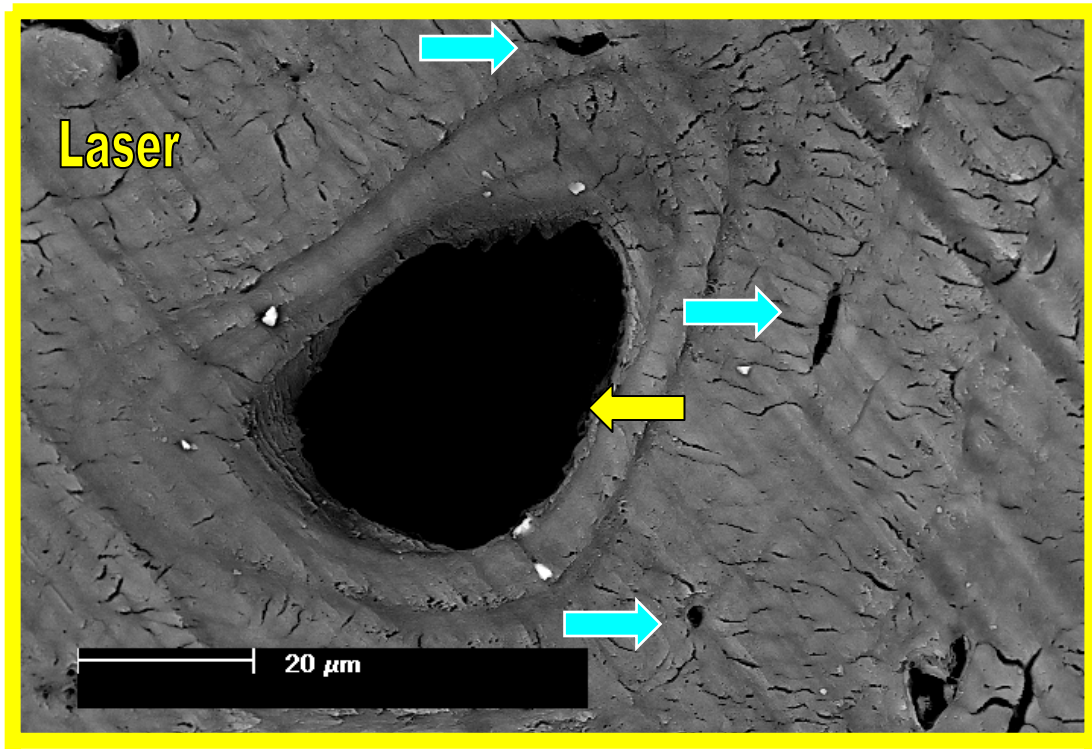


Figura 23: Micrografia de MEV mostrando o calibre dos Canais de Havers no osso neoformado dentro dos grupos laser (A). Canal de Havers do osso novo (seta amarela). Osteoplastos (osteócitos) distribuídos circunferencialmente ao Canal de Havers (setas turquesas). Aumento original de 1000X. Fonte: dados da pesquisa, 2007.

O grupo analisado no MEV foi constituído através de uma seleção aleatória, com as amostras ainda cegadas, de uma lâmina (L35) do grupo laser com implante liso de final 1, uma lâmina (L36) do grupo laser com implante liso final 2, uma lâmina (L4) do grupo laser com implante texturizado final 1 e, finalmente, uma lâmina (L24) do grupo controle com implante liso final 1.

As imagens do MEV no modo BSE, então, corroboram o resultado obtido na análise qualitativa feita à luz do MO, onde o grupo irradiado com laser de baixa potência apresenta uma matriz de osso novo - formado a partir da cortical original

em direção ao implante - com uma maior organização dos osteoplastos e canais de Havers mais amplos. (Figuras 24, 25A e 25B)

Além disso, com o MEV no modo EDS, analisou-se comparativamente a composição química do osso entre os sistemas lamelares da estrutura original da diáfise das tíbias e do osso novo formado a partir da colocação dos implantes.

Para isto, foram escolhidas visualmente áreas de osso cortical original da diáfise tibial, áreas de osso novo formado a partir do sistema lamelar circunferencial interno em direção ao implante, além de áreas de tecido medular adjacentes à superfície do implante. Estas zonas examinadas no MEV, nos modos BSE e EDS, foram marcadas e numeradas em fotografias impressas instantaneamente no local com o intuito de se garantir a correta localização, comparação e transferência das posições escolhidas para as figuras 24, 25A e 25B.

Nesse sentido, o gráfico número 5 ilustra a análise do MEV, no modo EDS, onde através da altura dos picos e do ordenamento destes, visualiza-se a composição química da amostra em função do peso atômico dos elementos e do espectro característico de emissão de Rx. Este gráfico é útil no momento da análise, para se minimizar fatores confundentes, como a metalização com ouro, por exemplo, aumentando a precisão quantitativa relativa que pode chegar a 1% apenas de erro.

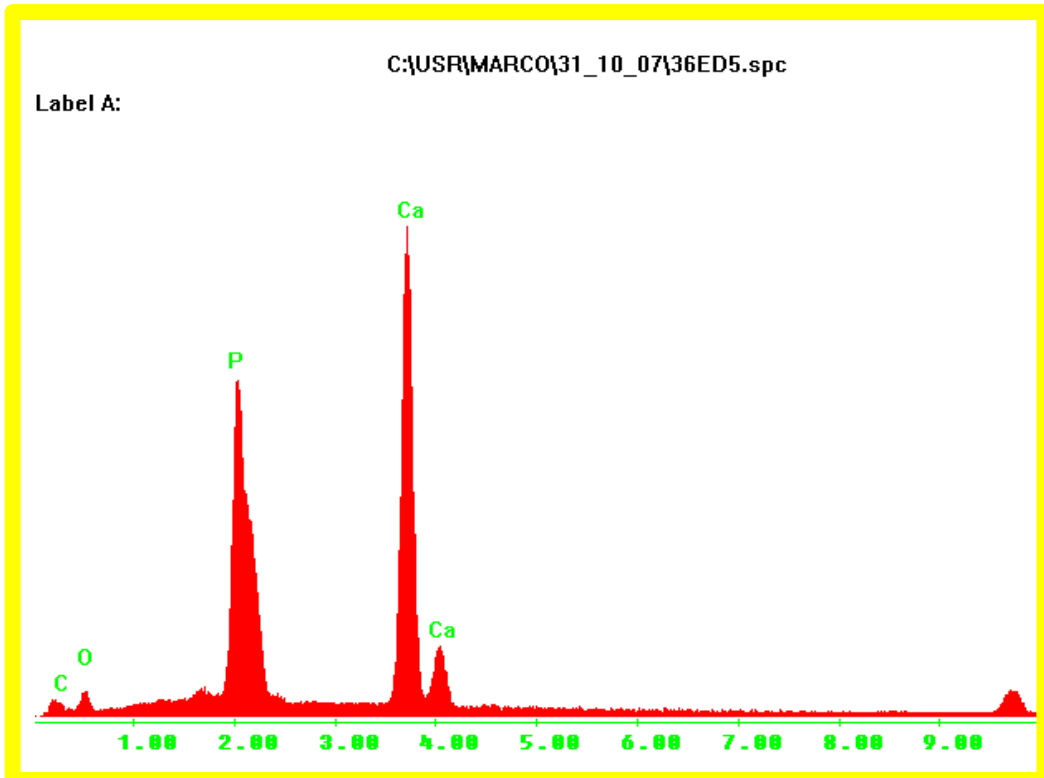


Gráfico 5: Visualização gráfica da análise química de um ponto de uma das amostras. Realizada no MEV, no modo EDS. Fonte: dados da pesquisa, 2007.

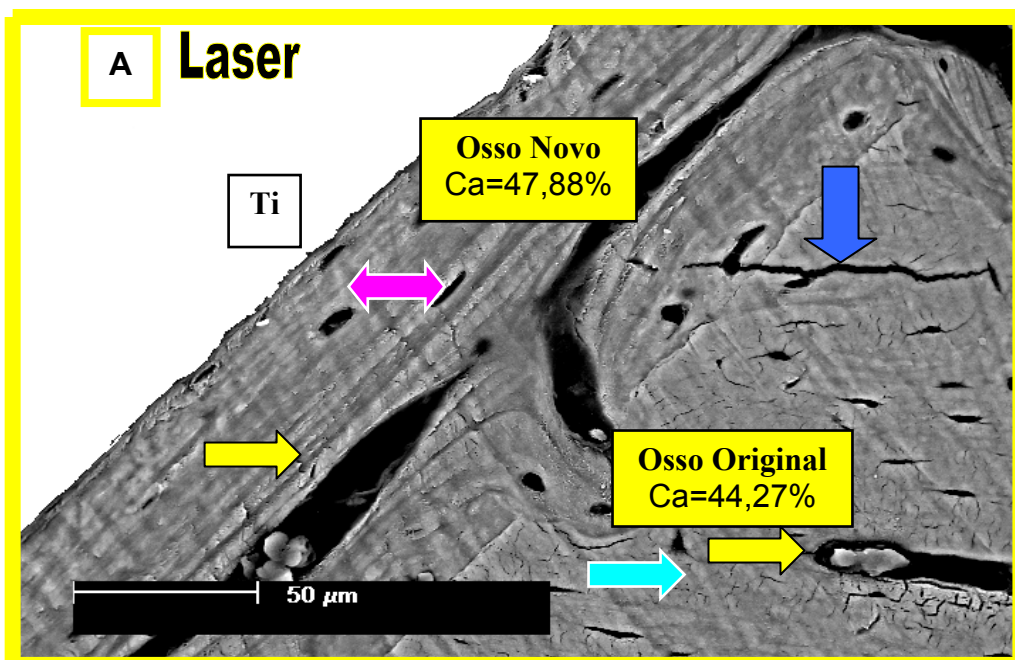
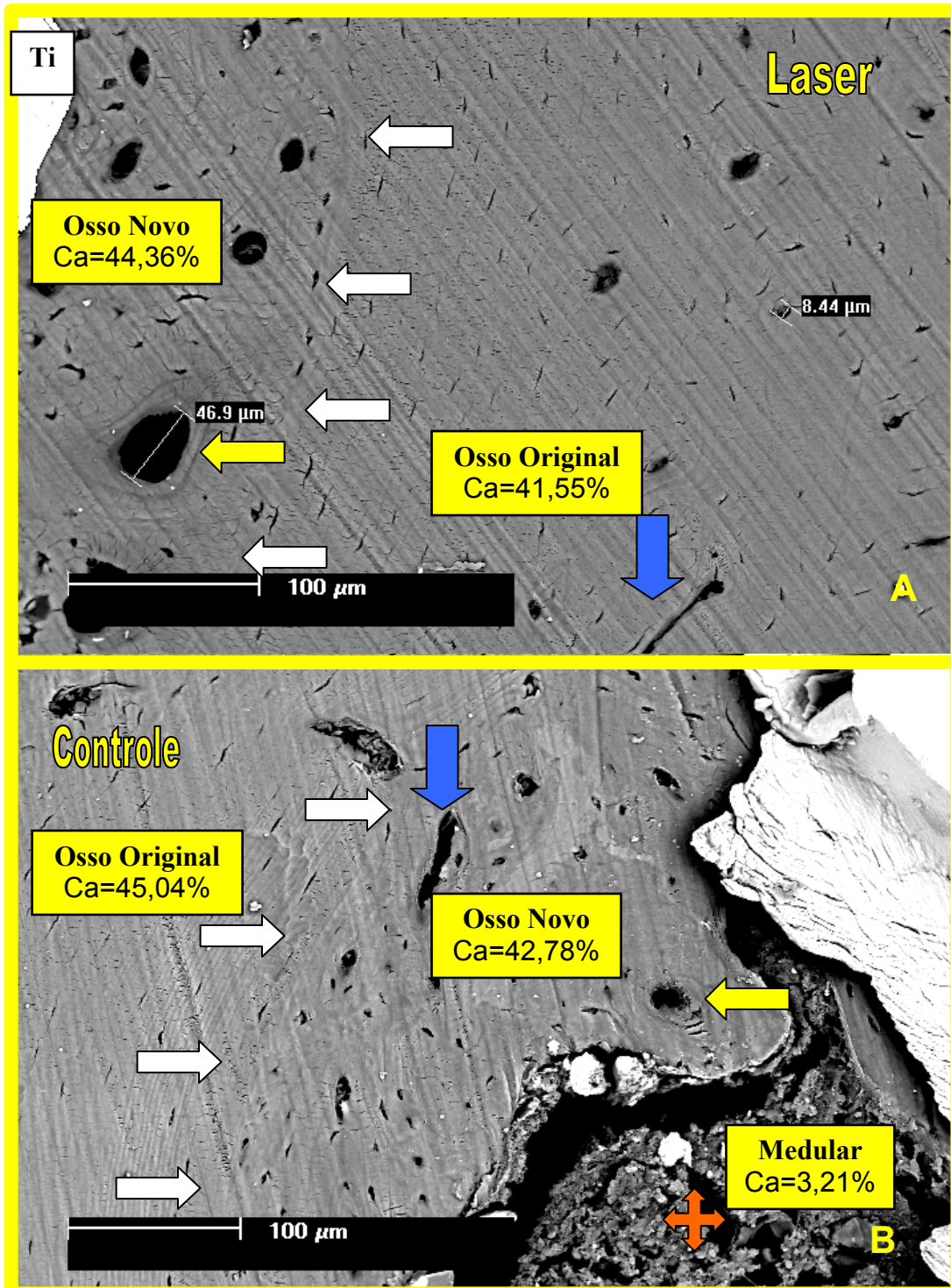


Figura 24: Micrografia de MEV. Padrão de mineralização do osso neoformado na superfície do implante (Ti) no grupo laser. Aumento Original de 400X. Canais de Havers do osso novo (setas amarelas). Osteócitos distribuídos paralelamente ao implante (setas rosa). Osteócitos distribuídos circunferencialmente aos Canais de Havers (setas turquesa). Canais de Volkmann (setas azuis). Espaços demarcados: análise com EDS (vide quadro 4). Fonte: dados da pesquisa, 2007.



Figuras 25A e 25B: Micrografias de amostras metalizadas no MEV mostrando em maior aumento a região circular delimitada nas figuras 19A e 19B (MO). Osso neoformado (setas brancas) em direção ao implante (Ti) nos grupos laser (A) e controle (B). Canais de Haver's do osso novo (setas amarelas). Canais de Volkmann (setas azuis). Tecido medular não mineralizado (cruz laranja). Aumento original de 350X. Os espaços demarcados correspondem às áreas analisadas como o modo EDS para composição química das amostras (vide quadro 4). Fonte: dados da pesquisa, 2007.

Dessa forma, os resultados obtidos no modo EDS (quadro 4) mostram ser possível avaliar as diferenças entre o osso irradiado e o controle quanto aos percentuais, principalmente, dos elementos cálcio e fósforo. Nas amostras irradiadas, os níveis de cálcio foram, em média, 7,16% maiores no osso novo do que no osso original, o mesmo acontecendo com o fósforo, respectivamente, 3,41% a mais. Já na amostra do grupo controle os percentuais, em média, tiveram uma relação inversa com os níveis de cálcio e fosfato, respectivamente, 2,26% e 1,33% menores no osso formado em direção ao implante a partir da cortical original, do que nesta última.

Adicionalmente, estas amostras foram analisadas quanto à composição química, de modo a comparar qualitativamente o efeito do laser e/ou da textura superficial dos implantes.

Assim, para os percentuais dos elementos químicos analisados no modo EDS, a textura de superfície maior ou menor não resultou em alterações qualitativas na osseointegração em relação ao grupo de implantes lisos.

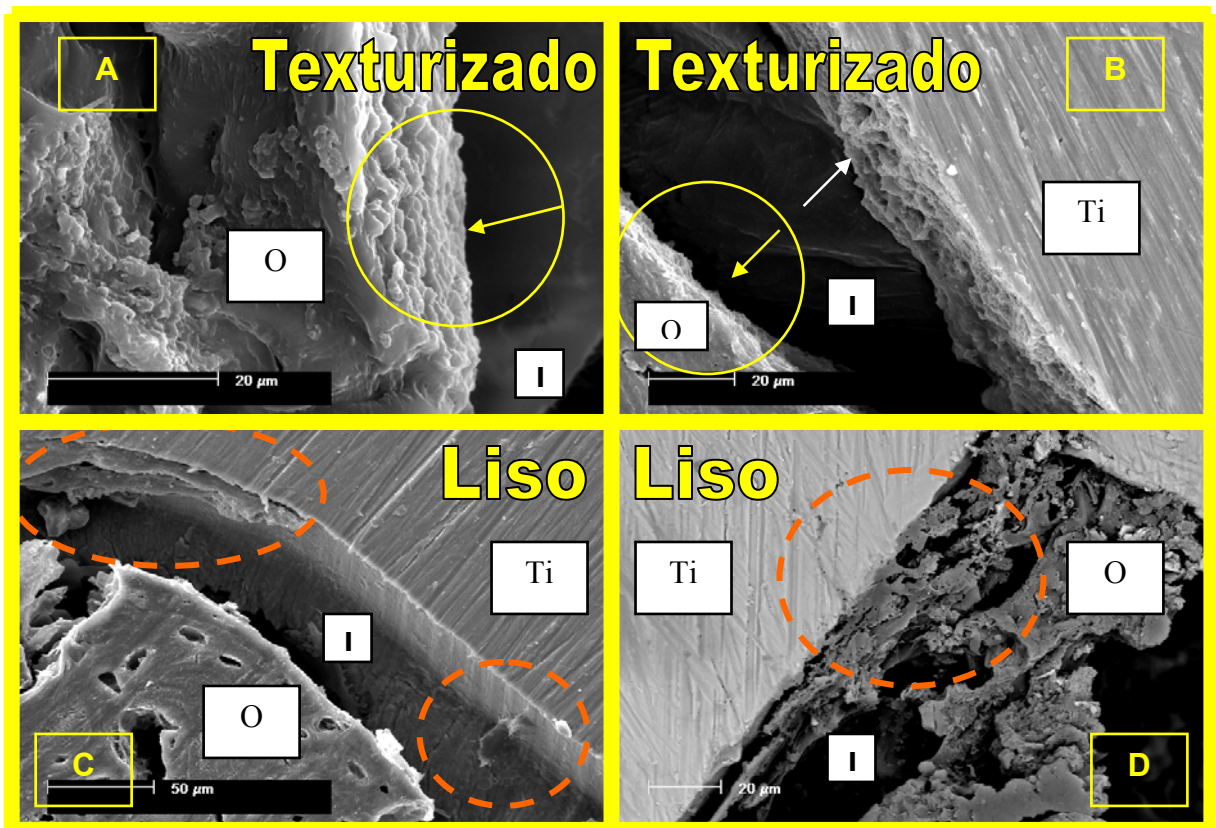
Quadro 4: Porcentagem de Cálcio (Ca) e Fosfato (P) das amostras no MEV com EDS. Os valores sublinhados foram os maiores dentro dos seus grupos. Fonte: dados da pesquisa, 2007.

Definição da Amostra (por grupo - com cegamento – sem cegamento)	Cortical Original		Osso Novo	
	Ca(%)	P(%)	Ca(%)	P(%)
Laser Texturizado - Lâmina 4 – L2ET1	34,22	16,51	<u>36,24</u>	<u>18,02</u>
Laser Liso - Lâmina 35 – L1DL1	40,41	23,54	<u>55,26</u>	<u>31,12</u>
Laser Liso - Lâmina 36 – L1DL2	44,27	24,85	<u>47,88</u>	<u>26,02</u>
Controle Liso - Lâmina 24 – C5DL2	<u>45,04</u>	<u>25,56</u>	42,78	24,23

Ainda, com relação a texturização, utilizando-se o modo BSE, que é mais preciso na definição do contraste da imagem, comparou-se o efeito da maior ou menor porosidade da superfície do implante sobre a adesão e microembricamento mecânico do osso e, também, sobre a topografia do osso na interface com o titânio.

Para isto uma amostra texturizada e uma amostra lisa foram submetidas a um tracionamento manual de modo a separar o substrato ósseo da superfície do implante, a fim de se visualizar a interface osso-implante.

O resultado da análise visual desta interface (figuras 26A a 26D) indica que as micro-porosidades da superfície do implante permitem um íntimo contato entre esta e a superfície óssea, cuja topografia assume uma aspecto de micro-saliências (figuras 26A e 26B). Já, nas amostras lisas (figuras 26C e 26D), é possível se visualizar a permanência de fragmentos de tamanhos variáveis de osso mineralizado, aderidos à superfície do implante, que resistiram à força de tração, suficiente para romper a osseointegração na maior parte da interface.



Figuras 26A a 26D: Seqüência de micrografias do MEV no modo BSE, comparando os grupos de implantes texturizados e lisos, onde a porção óssea (O) foi tracionada e separada da superfície do implante (Ti) para análise da interface (I). As figuras (A) e (B) possuem a mesma localização na linha de interface e a região demarcada pelos círculos amarelos apresenta dois ângulos distintos de visão do mesmo osso. Observa-se que a área óssea demarcada em (A) possui uma topografia de superfície (seta amarela) idêntica à superfície texturizada do implante (seta branca) visível na interface em (B), sugerindo que a osseointegração existente (antes do tracionamento) deu-se através de uma penetração da matriz óssea nos micropóros do implante. Não é possível perceber fragmentos ósseos na superfície do implante na interface. Em (C) e (D) as imagens são de um implante liso, mas obtidas de regiões diferentes da interface; os círculos pontilhados em laranja ressaltam fragmentos ósseos aderidos à superfície lisa do implante após o tracionamento, sugerindo uma osseointegração bastante eficiente. Aumento original de 7000X. Fonte: dados da pesquisa, 2007.

7 DISCUSSÃO

Neste experimento comparativo *in vivo*, cego e controlado, nós investigamos *post mortem* o efeito da terapia de laser de baixa potência com um dispositivo laser diodo de GaAlAs na melhora ou aceleração da adesão a implantes com tratamento de superfície e sem tratamento de superfície, através da avaliação quantitativa do percentual de contato osso-implante por meio de histomorfometria com microscópio óptico num aumento de 40X.

Adicionalmente, com o intuito de se buscar um enriquecimento das informações e fomentar novas perspectivas de investigação do efeito do LLLT sobre a osseointegração, realizamos algumas análises complementares - no microscópio óptico com aumento de 100 a 1000X e no MEV com aumentos de 10 a 7000X - de forma a avaliar-se a qualidade do substrato ósseo neoformado dentro das condições experimentais propostas nos objetivos deste ensaio *in vivo*.

Primeiramente, então, através da análise histomorfométrica quantitativa realizada neste estudo, constatou-se que o laser, de forma geral, sem levar em conta o tipo de textura de superfície dos implantes, apesar da diferença positiva de 7,53% na média dos percentuais de contato osso-implante para as amostras do grupo irradiado não teve contribuição estatisticamente significativa ($p=0,244$) em relação ao grupo controle num nível de 5% de significância.

De maneira similar, na análise do efeito do laser no percentual de COI, porém, levando-se em consideração também o grau de textura superficial, constatou-se uma diferença positiva de 9,34% na média dos %COI dos implantes texturizados ($p=0,270$) e de 5,32% na média dos %COI dos implantes lisos ($p=0,578$). Esta diferença, entretanto, também não foi estatisticamente significativa num nível de 5%.

Ainda fruto da análise quantitativa das amostras, porém agora analisando-se o efeito das diferenças de textura na superfície dos implantes, tem-se que no grupo irradiado a diferença entre a média dos percentuais de COI dos implantes texturizados e a média dos implantes lisos foi 8,97%, ao passo que dentro do grupo

controle esta diferença ficou em 5,35%. Todavia, o LLLT teve um efeito estatisticamente não significativo ($p>0,05$) nos implantes texturizados ($p=0,132$) e nos lisos ($p=0,653$).

Levado-se em consideração a posição dos implantes em relação à articulação tíbio-femural, para os implantes mais proximais, de final 1 – com ancoragem monocortical - o tratamento com laser obteve uma diferença na média dos percentuais de COI de 11,03% em relação ao controle ($p=0,16$), enquanto que nos de final 2 – com ancoragem bi ou tri-cortical, a diferença foi de apenas 4,04% ($p=0,68$). Estas diferenças, contudo, também não foram significativas estatisticamente ($p>0,05$).

A avaliação histomorfométrica é considerada, atualmente, uma análise padrão na pesquisa com implantes, sendo utilizada amplamente em trabalhos *in vivo* com diversos modelos animais, inclusive o coelho, associada ou não a outros testes, como torque de remoção, por exemplo, de maneira a permitir um entendimento dos efeitos das variáveis pesquisadas em nível celular. Entretanto, os dados obtidos a partir de experimentos em modelos animais não podem simplesmente ser extrapolados para humanos, servindo, isto sim, como uma forma objetiva de se comparar o efeito de diferentes tratamentos gerando novas perspectivas de investigações. (Brannemark e cols., 1969; Wennerberg e cols., 1997; Cochran e cols., 1998; Khadra e cols., 2004)

Todavia, há que se ter cautela na comparação dos dados entre pesquisas com laser, mesmo daquelas onde, a exemplo de nosso trabalho, os resultados foram obtidos através de avaliações objetivas e reproduzíveis da osseointegração. Basford (1989), Schindl (2000) e Pinheiro e Gerbi (2006) realizaram extensas revisões de literatura sobre os efeitos do LLLT na odontologia, tendo ficado marcante, em primeiro lugar, a falta de padronização quanto à metodologia de irradiação nas pesquisas com laser, tornando a comparação dos resultados, senão impossível, muito difícil. Além disso, resultados obtidos de estudos *in vitro* não podem ser extrapolados para estudos *in vivo* (ratos, coelhos, porcos e ovelhas) e nem estes últimos extrapolados para humanos. Em terceiro, fica evidente a grande lacuna ainda existente de trabalhos avaliando especificamente a osseointegração *in vivo*

com delineamento randomizado, cego e placebo-controlado. Adicionalmente, até onde temos conhecimento, nosso trabalho é pioneiro na comparação *in vivo* do efeito do LLLT sobre a osseointegração de implantes dentais lisos e texturizados o que torna ainda mais complexa a comparação dos resultados obtidos.

Não obstante, nossos achados aparentemente estão em concordância com os resultados obtidos por Khadra e cols (2004), que relataram uma diferença na média do laser no percentual de COI de aproximadamente 10% em relação ao controle não irradiado. Porém, os autores nada falam sobre a significância estatística dos resultados obtidos com a análise histomorfométrica do COI. Citam apenas ter sido fracamente significativa a diferença com análise do teste de tração e com análise qualitativa do padrão de mineralização (percentual de cálcio e fósforo) através do MEV no modo EDS. Neste último teste, todavia, a análise da qualidade do osso foi realizada nas porções mineralizadas aderidas na superfície dos implantes após sua remoção pelo teste de tração, divergindo de nossa análise complementar que comparou os percentuais de cálcio e fósforo entre o osso cortical original da diáfise tibial e osso novo formado em direção à interface de osseointegração, sem remover o implante de sua posição no corte histológico. Ainda no que concerne ao trabalho de Khadra e cols (2004), cabe ressaltar que os seus implantes eram em forma de discos com roscas, colocados apenas na porção cortical em cavidades especificamente preparadas para não penetrar na porção medular, e foram cobertos com um membrana de PTFE, de forma a maximizar o potencial de osseointegração.

Paralelamente, o aumento percentual da quantidade de cálcio e fósforo na composição do osso irradiado, está de acordo com as pesquisas de Lopes (2002), Lopes e cols (2005) e Lopes e cols. (2007). Estes autores, através da espectroscopia Raman, analisaram a capacidade de incorporação de cálcio aos cristais de hidroxiapatita em coelhos e concluíram que o laser de GaAIs foi capaz de aumentar significativamente a mineralização da nova matriz óssea formada durante o processo de osseointegração nas análises feitas em 30 e 45 dias na comparação com o grupo controle.

Uma das explicações para estes achados pode estar no trabalho *in vitro* controlado, realizado por Khadra e cols. (2005). As culturas de osteoblastos de mandíbula humana em condições ideais, feitas sobre discos de titânio onde as amostras foram irradiadas com laser de GaAIs por três dias consecutivos (CO=830nm; P=84mW; afastamento das amostras=9cm;DE=3J/cm²), tiveram melhoradas as capacidades de adesão e proliferação e um significativo aumento de produção de osteocalcina e TGF- β_1 .

De modo similar em nosso trabalho, encontramos no osso novo formado com irradiação laser, um maior percentual de COI, uma maior organização dos sistemas lamelares e presença de canais de Havers com diâmetro de três a quatro vezes maiores do que os encontrados no grupo controle. Embora não tenha havido diferença estatisticamente significativa nas comparações com o grupo controle, estes achados histológicos podem ser devidos a um aumento na velocidade do metabolismo ósseo. Nesse sentido, Pinheiro e Gerbi (2006) na sua revisão de 34 artigos de 1987 a 2005 citam que a resposta vascular aumentada é apontada pela maioria dos autores pesquisados como um dos principais responsáveis pelos efeitos positivos do laser apresentando uma melhora na proliferação dos osteoblastos, deposição de colágeno e neoformação óssea, sendo um achado freqüente em trabalhos *in vitro* e *in vivo*.

Exemplo disso é a pesquisa de quatro semanas de acompanhamento da neoformação óssea em defeitos padronizados em calvária de ratos realizada por Khadra e cols. (2004). Estes utilizaram um laser de GaAIs (830nm) com emissão contínua e potência de 75mW, num total de 3 J/cm² por sessão de 40s, distribuídas diariamente desde o pós-operatório imediato até o sexto dia, perfazendo uma densidade de energia de 23J/cm², onde a análise histológica mostrou uma mais pronunciada angiogênese e formação de tecidos conjuntivos, e uma formação óssea mais organizada nos grupos experimentais comparadas aos grupos controles. Os tecidos irradiados continham, também, na análise histoquímica, significativamente mais cálcio, fósforo e proteínas que os controles.

A maior organização lamelar na interface periimplantar do osso novo do grupo teste observado em nossa pesquisa, sugere que o laser de baixa potência possa ter

um efeito positivo na maturação do osso irradiado durante o período de osseointegração. Uma possível explicação para isto poderia estar em outro achado em nossas lâminas onde o laser aparentemente contribuiu para um aumento no diâmetro dos canais de Havers do osso novo. Nesse sentido, Shenk(1996) cita que o potencial ósseo para regeneração depende de dois pré-requisitos indispensáveis onde o primeiro destes é o suprimento vascular amplo. Isto pois, os osteoblastos exercem suas atividades apenas nas proximidades de vasos sanguíneos, e a simples redução do oxigênio para essas células pode direcionar fenotípicamente à formação de tecido fibroso ou fibrocartilagenoso. Assim, se tivermos num osso em formação canais de Havers maiores, que permitam uma maior vascularização sanguínea, estaremos contribuindo para melhorar o potencial de regeneração e maturação óssea.

Este aumento do suprimento vascular causado pela irradiação laser foi confirmado em tempo real no trabalho de Banzer e cols (2006) realizado com humanos num delineamento randomizado, duplo-cego, placebo-controlado, onde autores utilizaram a espectroscopia Doppler para mensurar o fluxo sanguíneo periférico e numa profundidade de 8mm do ponto de irradiação. Os resultados mostraram um aumento significativamente maior do fluxo sanguíneo no grupo irradiado em comparação ao grupo controle, com uma dosimetria total de 18,4 kJ/cm² distribuídas em oito aplicações com laser de diodo de CO 880nm.

Por outro lado, em nossa revisão da literatura, Rydén e colaboradores(1994) concluíram - também num trabalho randomizado, duplo-cego, porém com controle intra-indivíduo, realizado com gengivite induzida em humanos nos dentes de 33 a 43 - que uma dose de 1J/cm² de um laser de GaAl com CO de 904nm mostrou um aumento na vascularização semelhante ao aumento obtido no grupo controle.

Entretanto, conforme Schindl (2000), estes resultados não podem ser considerados em desacordo quanto ao efeito do laser no aumento da vascularização sanguínea, pois Rydén e seus colaboradores utilizaram o paciente como controle dele mesmo, com irradiação laser em um dos incisivos laterais inferiores e aplicação de luz convencional no outro contra-lateral. Tal forma de controle não leva em consideração os efeitos sistêmicos gerados pela liberação de fatores de crescimento

e citocinas na circulação sanguínea, criando uma variável de confundimento na pesquisa.

A correta dimensão destes efeitos sistêmicos como variável de confundimento é revelada por Cotran, Kumar e Collins (2000) na descrição do processo de geração e estímulo das células como sendo regulados por citocinas e fatores de crescimento (de fibroblastos - FGF, derivados de plaquetas – PDGF, semelhante à insulina, de crescimento transformador β_1 - TGF β_1) que, na presença de células mesenquimais pluripotenciais induzem estas células a se diferenciarem. Por isso, em nossa pesquisa tivemos o cuidado de dividir aleatoriamente os coelhos em irradiados e não irradiados com ausência de controles intra-animais para o laser. Permitimos o controle intra-animal somente para a variável de texturização superficial dos implantes que, segundo Jayaraman e Meyer (2004), possui um efeito apenas local na mediação da adesão e diferenciação celular aos biomateriais a base de titânio.

Paralelamente, a importância do efeito do laser sobre as células progenitoras pluripotenciais ou células tronco, em nosso experimento, reside no trabalho de Pittenger e colaboradores (1999), que mostram somente ser possível a reparação óssea, pois muitos tecidos adultos, a exemplo da medula óssea, contêm populações de células tronco que têm a capacidade de reagir após um trauma ou uma doença, diferenciando-se nas células necessárias a essa reparação.

Seguindo nesse raciocínio, Misch (2000) afirma que a colocação de um implante intra-osseo é um trauma, e que seu reparo se dá inicialmente pela modelagem anabólica da superfície óssea adjacente à superfície do implante. Essa modelagem, segundo Kieswetter e cols. (1996), requer um recrutamento de células precursoras de osteoblastos, sua diferenciação em osteoblastos secretores, produção de colágeno para formação da matriz extracelular não mineralizada (osteóide) e sua posterior calcificação, num processo que é altamente regulado por hormônios sistêmicos e por fatores locais. Dentre estes fatores locais, Raghavendra, Wood e Taylor (2005) citam que a tensão de oxigênio na interface, aliada às características de energia de superfície do implante (rugosidade e topografia) ajuda a determinar se estas células pluri-potenciais irão se diferenciar em fibroblastos,

condroblastos ou, então, em osteoblastos, ratificando a importância do suprimento vascular amplo como um dos pré-requisitos para o reparo ósseo.

Voltando a afirmação feita por Schenk (1996), de que o potencial ósseo para regeneração depende de dois pré-requisitos indispensáveis, tem-se como segundo fator o suporte mecânico, que também suscita algumas discussões no tocante aos resultados obtidos em nosso trabalho. Porém, no caso da osseointegração este fator pode ser melhor entendido dicotomizando-se a sua discussão em instabilidade mecânica e defeitos sobrestendidos.

No que concerne, então, à instabilidade mecânica, Jafim e Bermann (1991), num estudo onde analisaram cinco anos de resultados das aplicações clínicas e previsibilidade de sucesso de implantes lisos colocados conforme estudos de Branemark (1977), Adell (1981) e seus colaboradores, concluíram que nos ossos onde a cortical era muito fina e o osso trabecular era de baixa densidade e pobre resistência (osso tipo IV) a taxa de perda do implantes fora de 35% de todos os casos.

Pois em nosso modelo animal, a qualidade óssea da diáfise tibial foi comparável ao osso tipo IV em humanos, porém, dentro das limitações inerentes à análise histomorfométrica, 100% dos implantes foram considerados osseointegrados ao final dos trinta dias do experimento, num percentual variável de 38,18% e 98,64% de contato osso-implante. Segundo Roberts e Garetto (2000), as modificações ósseas observadas na interface osso-implante podem ser comparadas temporalmente em humanos e coelhos, onde o processo de reparação nestes animais é cerca de três vezes mais rápido que nos homens. Baseado nisto, os percentuais obtidos em nosso experimento seriam equivalentes, em humanos, a um período de osseointegração de três meses.

Esses percentuais, assumidos então os implantes como osseointegrados somente para efeitos de discussão - haja vista que Rossi (1990), entre outros, definem a osseointegração como um conceito biológico dinâmico indissociável da função – e admitindo-se que o percentual de COI obtido de uma lâmina pode ser extrapolado para o implante como um todo – conforme Brito, Vidigal Júnior e

Almeida (2004) – estes percentuais, então, coadunam parcialmente com Roberts (1999), pois este afirmou que a taxa de osso sem contato com o implante é de 30 a 40% do total da superfície em qualquer tempo. De maneira complementar, os 60 a 65% restantes estão direta e rigidamente ancorados no implante, dando uma estabilidade similar à anquilose.

De outra forma, no tocante aos defeitos ósseos sobre-estendidos, Schenk (1996) coloca que as células ósseas facilmente ficam em desvantagens frente a tecidos competidores cujas células possuem alta atividade de proliferação, como os tecidos moles das mucosas de revestimento bucal, por exemplo, e outros epitélios.

Novamente na comparação com o nosso modelo animal, o que observamos da análise das lâminas histológicas foi que o percentual de COI obtido no estudo deu-se as expensas da proliferação e neoformação de tecido ósseo, da plataforma do implante em direção ao seu ápice, proveniente do sistema lamelar circunferencial interno na competição direta com as células do tecido hematopoiético. E, de modo geral, as lâminas, após a eliminação do cegamento, sugeriram no grupo laser uma proliferação aparentemente mais exuberante e uma maior organização dos sistemas lamelares – baseado na morfologia descrita por Gartner e Hiatt (2003) para os ossos longos – onde a ossificação intramembranosa, descrita por Katchburiam e Arana-chaves (1999), deu-se em substituição do tecido medular por uma matriz óssea mineralizada.

Com relação à dosimetria do LLLT adotada em nosso estudo, utilizamos a densidade de energia de 1 J/cm^2 por ponto, sendo três pontos por tíbia, ou seja, 3 J/cm^2 ao redor dos implantes de cada tíbia, a intervalos de 48 horas. Dörtbudak, Haas e Mailath-Pokorny (2000) e Do Nascimento e Callera (2006) em trabalhos *in vitro* com culturas de células de rato e células humanas, respectivamente, concluíram que na densidade de energia de 1 J/cm^2 houve em suas amostras um efeito bioestimulante do crescimento das células osteoprogenitoras. Na pesquisa de 2006, os autores ainda concluíram que doses acima de 2 J/cm^2 provocaram a inibição do crescimento celular. Todavia, os trabalhos destes autores foram com culturas celulares e nesse caso a otimização da dose é superior, já que não há interação da irradiação com outros tecidos orgânicos.

Mas, com base nos trabalhos de Pinheiro (2003), Silva Júnior (2000), Khadra e colaboradores (2005) e Lopes e colaboradores (2005), podemos observar que não há um consenso a respeito da dosimetria ideal para se obter uma otimização do crescimento e da maturação óssea, visando uma melhor e mais rápida osseointegração. Isto é corroborado por Schindl (2000), acrescentando que a maioria dos efeitos bioestimulantes do laser se dão com doses entre 1 e 50 J/cm² por aplicação.

O mesmo se pode observar com relação ao efeito do LLLT sobre a cicatrização e reparo dos tecidos moles. Parece existir uma janela dosimétrica ampla dentro da qual tem-se um efeito bioestimulante do laser sobre a diferenciação e proliferação de fibroblastos, com aumento da síntese de DNA e RNA, da produção de colágeno, aumento da angiogênese, diminuição da inflamação e benefícios antiálgicos. Dessa forma, conforme Loevschall e Arenholt-Bindslev (1994), Lopes e Brugnera Jr. (1998), Almeida Lopes (1999), Campanha (2002), Nascimento (2002), Kriesler e colaboradores (2003), Pugliese e colaboradores (2003), Khadra e colaboradores (2005), Hawkins e Abrahamse (2006) e Al-Watban, Zhang e Andrés (2007), fica evidente a falta de consenso na escolha e indicação de uma dosimetria que tenha um efeito previsível.

Dentro de inúmeras possibilidades, a escolha de um emissor laser de diodo de GaAlAs com um comprimento de onda de 830 nm em nossa pesquisa deu-se pela praticidade de manuseio, disponibilidade no mercado e baixo custo em relação a outros tipos de lasers de baixa potência, em concordância com Romanos e Nentwig (1999), e pela baixa potência dos meios ativos de diodos semi-condutores que fica entre 1 e 100mW, faixa na qual o aparelho não causa alteração significativa na temperatura dos tecidos, segundo Hall e colaboradores (1994). Além disso, segundo Schindl (2000) a janela óptica da pele permite que a radiação emitida sobre si entre comprimentos de onda de 300 e 1300nm, penetre livremente em camadas mais profundas dos tecidos subcutâneos. Adicionalmente, em tecidos de granulação essa penetração é 2,5X maior, potencializando o efeito do LLLT.

A explicação para o efeito positivo do laser no metabolismo celular e na dinâmica de reparação dos tecidos observados nas amostras irradiadas é citada por

Rigau I Mas (1998) como fruto da atividade fotoreguladora de fotoreceptores específicos – principalmente a rodopsina - e não específicos – especialmente as flavoproteínas, porfirinas, citocromoxidases e superóxido-dismutases - capazes de absorver fótons. Estes fótons atuam aumentando a energia das células que produzem proteínas e mediadores químicos que modularão alterações no metabolismo de células vizinhas não irradiadas, num efeito cascata, atingindo tecidos mais profundos.

No entanto, outro tipo de ação, citada por Schindl (2000) é a fornecida por Friedmann e colaboradores (1991) onde doses baixas de luz, como a utilizada em nossa pesquisa, intensificam a formação de um gradiente de fóton eletroquímico transmembrana nas mitocôndrias, gerando a liberação de cálcio no citoplasma por um processo antiporto que dispara a mitose e proliferação da célula.

Já a opção por apenas dois pontos de irradiação por implante, um de cada lado encontra guarida nos trabalhos de Reinish (1996) e Brugnera Jr. (2003), onde a energia aplicada pontualmente sobre a pele dispersa-se e penetra num raio de ação de cerca de 1cm^2 . Como as dimensões do implante utilizado são 3,75mm de diâmetro por 5mm de comprimento, em tese com nosso protocolo de irradiação tem-se uma abrangência da energia emitida ao redor de todo o implante e sem duplicação de dose.

Com relação a avaliação do efeito da textura superficial modificada no percentual de COI, na comparação com o controle não irradiado liso, nossos resultados apontam para uma melhora de 14,69% no grupo de implantes texturizados com laser seguido de uma melhora de 5,35% no grupo de implante texturizados não irradiados. O efeito do laser sobre os implantes lisos obteve resultados similares na média de percentual de COI em relação ao controle texturizado, melhora de apenas 0,38%. Entretanto, estas diferenças não apresentaram significância estatística em nível de 5%.

Esses resultados estão em concordância com o trabalho de Wennerberg, Albrektsson e Lausmaa (1996) em coelhos onde, apesar da maior textura de superfície ter evidenciado um maior crescimento ósseo e um maior percentual de

COI na análise histomorfométrica, os resultados não foram estatisticamente significantes, nem mesmo quando os autores consideraram apenas os resultados das três melhores roscas em seqüência.

Adicionalmente, Jemt e colaboradores (2002), relataram não haver diferença estatística após cinco anos na comparação dos níveis ósseos ao redor de 349 implantes lisos e texturizados colocados em 58 pacientes. Esses dados, todavia, não permitem uma generalização a respeito do efeito clínico e funcional dos implantes. Primeiro porque as incidências radiográficas convencionais extra e intra-bucais apresentam muitas distorções e magnificações variáveis, servindo como um possível viés. Em segundo lugar, o fato de não termos perdas ósseas visíveis ao raio-X não assegura que o conteúdo mineral tenha ficado estável.

Por outro lado, em um trabalho de revisão de literatura, Martinez (2001) cita que um aumento na textura superficial dos implantes é defendida não somente para aumentar a estabilidade primária, mas muitas vezes para melhorar a cicatrização óssea. Isto pode ser de grande valia em pacientes com algum comprometimento local ou sistêmico que tenham um potencial de atraso na resposta reparadora.

Pois este é o entendimento de Bastos, Vanzillota e Soares (2003) onde os tratamentos de superfície dos implantes são responsáveis por mudanças topográficas significativas capazes de melhorar a capacidade de adesão das células ósseas, o que foi confirmado por Lumbikanonda e Sammons (2001) num estudo *in vitro* com osteoblastos de ratos.

Nesse sentido Wennerbeg e colaboradores (1997), num estudo *in vivo* em coelhos e Giavaresi e colaboradores (2003), num estudo *in vivo* em ovelhas obtiveram resultados estatisticamente melhores e significativos no percentual de COI sobre aquelas superfícies que apresentam maior texturização.

Por fim, a análise histomorfométrica mostrou-se uma importante ferramenta na busca de um maior entendimento dos mecanismos biológicos do LLLT, face a sua habilidade para caracterizar a interação dos tecidos orgânicos com a superfície do titânio em nível celular. Esta caracterização é muito importante cientificamente,

porquanto, no caso específico do laser, embora os resultados do %COI estatisticamente não tenham sido significativos, percebe-se uma alteração morfológica sugestiva de uma maior maturação óssea. Isto pode ser altamente benéfico para a osseointegração, principalmente em ossos de baixa qualidade e pouca possibilidade de ancoragem primária.

Entretanto, são necessárias novas pesquisas sobre o LLLT para preencher as lacunas ainda existentes quanto ao entendimento da amplitude dos mecanismos biológicos da ação do laser de baixa potência na mediação dos processos necessários à osseointegração de implantes de titânio, bem como dos parâmetros dosimétricos para obtenção da bioestimulação óssea.

8 CONCLUSÕES

1. O laser de baixa potência, no âmbito desta pesquisa, não mostrou diferenças estatisticamente significativas em relação à formação óssea sobre implantes, embora, na comparação geral das médias das amostras, o grupo irradiado tenha obtido um maior percentual de contato osso-implante em relação ao grupo controle.
2. Em relação à formação óssea sobre implantes texturizados ou lisos, o laser de baixa potência, no âmbito desta pesquisa, não mostrou diferenças estatisticamente significativas, embora, na comparação entre as médias das amostras de ambos os tipos de superfície, o grupo texturizado tenha obtido um maior percentual de contato osso-implante.
3. O osso novo formado durante o período de ossoeintegração, submetido à irradiação com laser de GaAIs, apresenta uma maior vascularização e organização lamelar que o grupo controle, sugerindo uma maior maturação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- ABRAHAMSSON, I. *et al.* The mucosal attachment to titanium implants with different surface characteristics: na experimental study in dogs. **J. Clin. Periodontol**, v. 29, n. 5, p. 448- 455, May. 2002.
- ADELL, R. *et al.* A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. **Int J Oral Surg**, Copenhagen, v.10, n.6, p.387-416, Dec, 1981.
- ALBREKTSSON, T.; SENNERBY, L. Direct bone anchorage of oral implants: clinical and experimental considerations of the concept of osseointegration. **Int J Prosthodont**, v.3, n.1, p.30-41, 1990.
- ALMEIDA-LOPES, L. Análise *in vitro* da Proliferação Celular de Fibroblastos da Gengiva Humana Tratados com Laser de baixa Potência. **Dissertação de Mestrado em Ciências**, São José dos Campos, São Paulo, 1999. Disponível em < <http://www.forp.usp.br/restauradora/laser/Luciana/fibroblasto.html> > Acessado em: 07 Ago. 2006.
- AL-WATBAN, F. A. H., ZHANG, X. Y., ANDRÉS, B. N. Low-level laser therapy enhances wound healing in diabetic rats: a comparison of different lasers. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.25, n.2, p.72-77, 2007.
- ANSELME, K. The relative influence of the topography and chemistry of TiAl₆V₄ Surfaces on osteoblastic cell behavior. **Biomaterials**, n.21, p.1567-1577, 2000.
- ARANGO, H. **Bioestatística teórica e computacional**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 2001.
- BASFORD, J. R. Low-energy Laser Therapy: controversies and New Research Findings. **Laser in Surgery and Medicine**, 9:1-5, 1989.
- BASTOS, I.; VANZILLOTTA, P.; SOARES, G. Caracterização morfológica e topográfica da superfície de implantes dentários. **Rev Bras Odont**, v.60, n.1, p.47-50, 2003.

* Referências Conforme ABNT – NBR 6023: ago. 2002.

BRANEMARK, P-I. Osseointegration and its experimental background. **J Prostet Dent**, v.50, n.3, p.399-410, 1983.

BRANEMARK, P-I. *et al.* Intraosseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental Studies **Scand J Plast Reconstr Surg**, Stockolm, v.3, p.81-93, 1969.

BRANEMARK, P-I. *et al.* Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. **Scand J Plast Reconstr Surg**, Stockolm, v.11, supl. 16, 1977.

BRUGNERA JR, A.; LADALARDO, T. C. C. G. P.; DA CRUZ, F. M. Introdução à Laserterapia Aplicada a Clínica Odontológica. In : BRUGNERA, A JR *et al.* **Laserterapia aplicada à clínica odontológica**. São Paulo: Santos, 2003. p.1-7.

BANZER, W. *et al.* Short-time effects of laser needle stimulation on the peripheral microcirculation assessed by laser doppler spectroscopy and near-infrared spectroscopy. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.24, n.5, p.575-580, 2006.

BRITO, O. F. G., VIDIGAL JÚNIOR, G. M., ALMEIDA, G. M. S. Análise da interface osso-implantes instalados em tíbias de coelhos: uma comparação entre 1 e 7 secções. **Braz Oral Res**, v.18, Supplement (Proceedings of the 21^o Annual SBPqO Meeting), 2004.

CAMPANHA, B.P. **Luz polarizada (λ 400 - 2000nm) e laser não-ablativo (λ 685nm): descrição do processo de reparo em feridas, através de avaliação morfológica e imunohistoquímica**. Dissertação (Mestrado em odontologia, área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucocomaxilofacial) - Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2002.

COCHRAN, D.L. *et al.* Bone response to unloaded and loaded titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a histometric study in the canine mandible. **J Biomed Mater Res**, New York, v.40, n.1, p.1-11. Apr, 1998.

CORDIOLI, G. *et al.* Removal torque and histomorfometric investigation of 4 different titanium surface: an experimental study in the rabbit tibia. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.15, n.5, p.668-674, Sep-Oct 2000.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins: Patologia Estrutural e Funcional**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2000.

COWIN, S.C. **Bone mechanics handbook**. Boca Raton, Flórida: CRC Press, 2001.

DAVIES, J.E. Mechanics of endosseous integration. **The International J Prosthodontics**, Lombard, Ill, v.11, p.391-401, 1998.

DEPPE, H.; GREIM, H.; BRILL, T. Titanium deposition after peri-implant care with the carbon dioxide laser. **Int. J Oral Maxillofac. Implants**, v. 17, n. 5, p. 707-714, Sep-Oct. 2002.

DONATH, K.; BREUNER, C.A. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissue. **J Oral Pathol**, v.11, p.318-325, 1982.

DÖRTBUDAK, O., HAAS, R., MAILATH-POKORNY, G. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. **Clin Oral Impl Res**, v.11, p.540-545, 2000.

GARTNER, L. P., HIATT, L.J. **Tratado de Histologia em Cores**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

GIAVARESI, G. *et al.* Mechanical and histomorphometric evaluations of titanium implants with different surface treatments inserted in sheep cortical bone. **Biomaterials**, v.24, p.1583-1584, 2003.

HALL, G. *et al.* Effect of low level energy laser irradiation on wound healing. An experimental study in rats. **Swed. Dent. J.**, Jönköping, v.18, n. 1-3, p.29-34, 1994.

HAWKINS, D., ABRAHAMSE, H. Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on cellular responses of wounded human skin fibroblasts. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.24, n.6, p.705-714, 2006.

JAFFIN, R.A.; BERMAN, C.L. The excessive loss of Branemark fixture in type IV bone: A 5 year analysis. **J Periodontol**, Chicago, v.62, n.1, p.2-4, Jan, 1991.

JAVARAMAN, M.; MEYER, U. Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells *in Vitro*. **Biomaterials**, v.25, n.4, p.625-631, Feb 2004.

JEMT, T. *et al.* Implant- supported welded titanium frameworks in the edentulous maxilla: a 5- yearprospective multicenter study. **Int. J. Prosthodont.**, v. 15, n. 6, p. 544- 548, Nov- Dec. 2002.

KATCHBURIAN, E.; ARANA-CHAVES, V.E. **Histologia e Embriologia Oral: texto atlas correlações clínicas**. São Paulo: Panamericana, 1999.

KHADRA, M. *et al.* Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v.97, p.693-700, 2004.

KHADRA, M. *et al.* Low-level laser therapy stimulates bone-implant interaction: an experimental study in rabbits. **Clin Oral Impl Res**. v.15, p.325- 332, 2004.

KHADRA, M. *et al.* Determining optimal dose of laser therapy for attachment and proliferation of human oral fibroblasts cultured on titanium implant material. **J Biomed Mater Res**, v.73A, p.55-62, 2005.

KHADRA, M. *et al.* Effect of laser therapy on attachment, proliferation e differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. **Biomaterials**, v.26, p.3503-3509, 2005.

KHADRA, M. *et al.* Laser therapy accelerates initial attachment and subsequent behavior of human oral fibroblasts cultured on titanium implant material. A scanning electron microscopic and histomorfometric analisys. **Clin Oral Impl Res**. v.16, p.168-175, 2005.

KIESWETTER, K. *et al.* The role of implant surface characteristics in the healing of bone. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.7, n.4, p.329-345, 1996.

KRIESLER, M. *et al.* Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. **J clin Periodontol**, v.30, p.353-358, 2003.

LONDON, R.M. *et al.* Histologic Comparison of a thermal dual-etched implant surface to machined, TPS, and HA surfaces: bone contact *in vivo* in rabbits. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.17, n.3, p.369-379, 2002.

LOPES, C.B. **Biomodulação laser em implantes ósseos: um estudo com Espectroscopia Raman**. Dissertação (Mestrado em odontologia, área de concentração em Engenharia Biomédica) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2002).

LOPES, C.B. *et al.* Infrared laser light reduces loading time of dental implants: a ramam spectroscopic study. **Photomedicine and Laser Surgery**. v.23, n.1, p.27-31, 2005.

LOPES, C.B. *et al.* Infrared laser photobiomodulation (λ 830 nm) on bone tissue around dental implants: a ramam spectroscopic and scanning electronic microscopy study in rabbits. **Photomedicine and Laser Surgery**. v.25, n.2, p.96-101, 2007.

LOPES, L. A.; BRUGNERA JR., A. Aplicações clínicas do laser não-cirúrgico. In: PINHEIRO, A. L. B; BRUGNERA, A JR. **Lasers na odontologia Moderna**, São Paulo: Pancast, 1998.

LOEVSCHALL, H., ARENHOLT-BINDSLEV, D. Effect of low level diode laser irradiation of human oral mucosa fibroblasts *in vitro*. **Lasers in surgery and medicine**. V.14, p.347-354, 1994.

LUMBIKANONDA, N.; SAMMONS, R. Bone cell attachment to dental implants of different surface characteristics. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.16, p.627-636, 2001.

MARTINEZ *et al.* Optimal implant stabilization in low density boné. **Clin Oral Impl Res**, n.12, p.423-432, 2001.

MISCH, C.E. Densidade Óssea: um determinante significativo para o sucesso clínico. In: **MISCH, C.E.** Implantes Dentários contemporâneos. 2d. São Paulo, Livraria Santos, 2000. P.109-118

NASCIMENTO, P.M. **Efeitos da variação da intensidade do raio laser na cicatrização de feridas cutâneas**. Dissertação (Mestrado em odontologia, área de concentração em Engenharia Biomédica) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2002).

DO NASCIMENTO, R. X., CALLERA, F. Low-level laser therapy at different energy densities (0,1 – 2,0 J/cm²) and its effects on capacity of human long-term cryopreserved peripheral blood progenitor cells for the growth of colony-forming units. **Photomedicine and Laser Surgery**. v.24, n.5, p.601-604, 2006.

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

PINHEIRO, A. L. B. Bioestimulação com LLLT e a reparação óssea. In : BRUGNERA, A JR *et al.* **Laserterapia aplicada à clínica odontológica**. São Paulo: Santos, 2003. p.102-106.

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

PITTENGER, M. *et al.* Multilineage Potencial of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. **Science**, v.284, n.o2, p.143-146, 1999.

PUGLIESE *et al.*, The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. **Pesqui Odontol Bras**, v.17, n.4, p.307-313, 2003.

RAGHAVENDRA, S., WOOD, M. C., TAYLOR, T. D. Early wound healing around endosseous implants: a review of the literature. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.20, p.425-431, 2005.

REINISCH, L. *et al.* Laser Physics and tissue interactions. **Laser applications ui otolaryngology**, v.29, n.6, 1996.

RIGAU I MAS, J. Bioenergia e Propriedades Ópticas dos Tecidos. In: PINHEIRO, A. L. B; BRUGNERA, A JR. **Lasers na odontologia Moderna**, São Paulo: Pancast, 1998.

RYDÉN, H. *et al.* Effect of low level energy laser irradiation on gingival inflammation. **Swed Dent J**, v.18, p.35-41, 1994.

ROBERTS, W.E.; GARETTO, L.P. In: MISCH, C.E. **Implantes Dentários Contemporâneos**. 2. ed. São Paulo: Livraria Santos, 2000. p. 225-237.

ROMANOS, G.; NENTWIG, G. Diode Laser (980 nm) in Oral and Maxillofacial Surgical Procedures: Clinical Observations Based on Clinical Applications. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, New York, v. 17, n. 5, p. 193-197, Oct. 1999.

ROHRER, M. D., SCHUBERT, C. C. The cutting-grinding technique for histologic preparation of undecalcified bone and bone-anchored implants – improvements in instrumentation and procedures. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.74, p.73-78, 1992.

ROSSI, R. Jr. **Bases Biológicas da Implantodontia**. Ed. Pancast, 1990.

SCHENK, R.K. Regeneração Óssea: Bases Biológicas. In: BUSER, D.; DAHLIN, C.;

SCHENK, R.K. Regeneração Óssea Guiada na Implantodontia. São Paulo: Quintessence Books. 1996.

SCHINDL, A. *et al.* Low-intensity Laser Therapy: A Review. **Journal of Investigative Medicine**, v.48, n.5, p.312-326, 2000.

SENNERBY, L.; ROOS, J. Surgical determinants of Clinical Success of Osseointegrated Oral Implants: A Review of the Literature. **Int J Prosthodont**, v.11, n.5, p.408-420, 1998.

SIEGEL, S. **Estatística Não-paramétrica.** São Paulo: Ed. McGraw-Hill, 1975.

SILVA JÚNIOR, A. N. **Avaliação do Efeito do Laser Diodo (GaAlAs) Infravermelho de 830 nm na Biomodulação da cicatrização óssea.** Dissertação (Mestrado em odontologia, área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial) - Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2000.

TEIXEIRA, E.R. Superfícies dos implantes: O estágio atual. In: DINATO, J.C.; POLIDO, W.D. **Implantes Osseointegrados: Cirurgia e Prótese**, São Paulo, ed. Santos: Artes Médicas, 2001, p.63-80.

WENNERBERG, A. *et al.* A 1-year follow-up of implants of differing surface roughness placed in rabbit bone. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Carol Stream, v.12, n.4, p.486-494, Jul-Aug, 1997.

WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T.; LAUSMAA, J. Torque and histomorphometric evaluation of c. p. titanium screws blasted with 25- and - 75µm sized particles of Al₂O₃. **J Biomed Mater Res**, New York, v.30, n.2, p.251-260, Feb, 1996.

ANEXOS

Tabela 6: %COI de cada uma das amostras e comparação dentro das variáveis pesquisadas.

LASER	COI(%)	CONTROLE	COI(%)
L1ET1	87,22	C4ET1	68,79
L1ET2	97,71	C4ET2	88,09
L1DL1	64,23	C4DL1	76,77
L1DL2	80,47	C4DL2	78,49
L2ET1	80,91	C5ET1	75,18
L2ET2	77,89	C5ET2	72,68
L2DL1	71,56	C5DL1	43,88
L2DL2	85,89	C5DL2	38,18
L3ET1	67,59	C6ET1	41,77
L3ET2	77,86	C6ET2	86,63
L3DL1	66,12	C6DL1	65,09
L3DL2	67,12	C6DL2	98,64
MÉDIA	77,05	MÉDIA	69,52

LASER TEXTURIZADO	COI(%)	LASER LISO	COI(%)
L1ET1	87,22	L1DL1	64,23
L1ET2	97,71	L1DL2	80,47
L2ET1	80,91	L2DL1	71,56
L2ET2	77,89	L2DL2	85,89
L3ET1	67,59	L3DL1	66,12
L3ET2	77,86	L3DL2	67,12
MÉDIA	81,53	MÉDIA	72,57

CONTROLE TEXTURIZADO	COI(%)	CONTROLE LISO	COI(%)
C4ET1	68,79	C4DL1	76,77
C4ET2	88,09	C4DL2	78,49
C5ET1	75,18	C5DL1	43,88
C5ET2	72,68	C5DL2	38,18
C6ET1	41,77	C6DL1	65,09
C6ET2	86,63	C6DL2	98,64
MÉDIA	72,19	MÉDIA	66,84

L1 a L3: coelhos 1, 2 e 3 do grupo laser.

C4 a C6: coelhos 4, 5 e 6 do grupo controle.

ET1: implante da tíbia esquerda, texturizado, situado mais próximo ao joelho.

ET2: implante da tíbia esquerda, texturizado, situado mais distante ao joelho.

DL1: implante da tíbia direita, liso, situado mais próximo à articulação do joelho.

DL2: implante da tíbia direita, liso, situado mais distante à articulação do joelho.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Ofício 0533/07-CEP

Porto Alegre, 21 de maio de 2007.

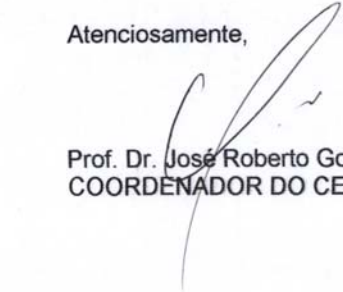
Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 07/033691, intitulado: **"Influência do laser de baixa potência (GaAIs - λ 830nm) NO processo de osseointegração de implantes lisos e texturizados: uma análise histomorfométrica in vivo"**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

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

Atenciosamente,


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

Ilmo(a) Sr(a)
Prof. Dr. Eduardo Rolim Teixeira
N/Universidade


PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 - 3º andar - CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: cep@pucrs.br
www.pucrs.br/prppg/cep