



Curso de Mestrado em Ciências Odontológicas

CAROLINA BOLDRINI

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA
FORMAÇÃO ÓSSEA AO REDOR DE IMPLANTES OSSEOINTEGRÁVEIS.
ESTUDO BIOMECÂNICO EM RATOS**

BARRETOS

2010



Curso de Mestrado em Ciências Odontológicas

CAROLINA BOLDRINI

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA
FORMAÇÃO ÓSSEA AO REDOR DE IMPLANTES OSSEOINTEGRÁVEIS.
ESTUDO BIOMECÂNICO EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Odontológicas do Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos, para obtenção do título de Mestre em Implantodontia.

Orientadora: Profª. Dra. Ana Emília Farias Pontes
Co-orientadora: Profª. Dra. Leticia Helena Theodoro

BARRETOS

2010

Boldrini, Carolina.

Avaliação do efeito do laser de baixa intensidade na formação óssea ao redor de implantes osseointegráveis. Estudo biomecânico em ratos. / Carolina Boldrini. – Barretos: [s.n.], 2010
36 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos, Curso de Mestrado em Ciências Odontológicas

Orientadora: Profa. Dra. Ana Emília Farias Pontes

1. Implantes dentários 2. terapia a laser de baixa intensidade 3. torque 4. modelos animais 5. osseointegração I. Título

DADOS CURRICULARES

CAROLINA BOLDRINI

| | |
|------------|--|
| Nascimento | 23/02/1982 – BARRETOS/SP |
| Filiação | Domingos Boldrini Teresinha Campi Boldrini |
| 2003/2006 | Curso de Odontologia Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos. |
| 2007/2009 | Especialização em Implantodontia Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos. |
| 2008/2010 | Curso de Mestrado em Ciências Odontológicas Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos. |

DEDICATÓRIA

À minha mãe que com seu sorriso me trouxe de volta a primavera. Ao meu pai, a distância espacial entre nós é momentânea e serve de prelúdio à nossa história. A saudade existe, não porque nos separamos, mas sim porque um dia estivemos juntos, hoje aprendi que saudade é o amor que fica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar o meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente e me confortar nas horas difíceis.

Aos meus irmãos que com os pés na terra e a cabeça nas estrelas conseguiram apontar meus erros e aparar meus excessos.

À Livia Nazareth obrigada por me ensinar que o sorriso é a expressão máxima da felicidade. Minha grande parceira de cirurgia.

Ao Dr. Francisco Caparroz Lopes Neto pelos ensinamentos cirúrgicos com clareza e simplicidade.

À orientadora Dra. Ana Emília, que com sua notável contribuição calcada na experiência e exercida com grande entusiasmo meu muito obrigada por ter sido minha “mãe científica”. Os objetivos alcançados se refletem numa verdade.

À Dra. Leticia H. Theodoro, minha fonte prática de informações utilizada nos conceitos. Obrigada pela alegria da convivência nos dias laboratoriais.

Ao Dr. Valdir Gouveia Garcia por ter tornado possível o experimento prático deste trabalho.

Ao Dr. Juliano Milanezi de Almeida, que pra mim foi uma satisfação pessoal e profissional muito grande em trabalharmos juntos.

Ao Leandro Araújo Fernandes companheiro de laboratório que seu esforço e empenho foi de grande valia para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Élcio Marcantonio Jr. manifesto minha sincera gratidão pelo empréstimo do torquímetro, ferramenta esta de inestimável valor para a realização da avaliação.

Ao Dr. Rogério Margonar obrigada por ter me ensinado a ver o mapa da floresta inteira, ao invés de uma única árvore.

Ao professor Dr. Benedicto Egbert e todos os professores do mestrado, deixo claro que a ciência possui um dinamismo intenso e que estudar sempre se faz necessário para o nosso crescimento profissional. Obrigada pelos dois anos de aprendizado.

À Titaniumfix (São José dos Campos, SP, Brasil) pelo apoio financeiro, por meio da doação dos implantes utilizados neste estudo.

Aos meus amigos, obrigada pelas horas de lazer e

Agradeço a aceitação de pessoas que antes eu admirava, e hoje tornaram amigos.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| LISTA DE ABREVIATURAS | 6 |
| RESUMO | 7 |
| ABSTRACT | 9 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 10 |
| 2 PROPOSIÇÃO | 12 |
| 3 METODOLOGIA | 13 |
| Análise Biomecânica..... | 16 |
| Análise Estatística | 17 |
| 4 RESULTADO | 18 |
| 5 DISCUSSÃO..... | 20 |
| 6 CONCLUSÃO..... | 23 |
| 7 REFERÊNCIAS | 24 |
| 8 ANEXO | 25 |
| Anexo 1 – Revisão da literatura | 25 |
| Efeito do LBI em osteócitos..... | 25 |
| Efeito do LBI no tecido ósseo | 26 |
| Efeito do LBI no tecido ósseo periimplantar..... | 27 |
| Anexo 2 – Referências da Revisão da literatura..... | 32 |
| Anexo 3 – Aprovação do Comitê de Ética para realização do estudo..... | 35 |

LISTA DE ABREVIATURAS

AsGa – Arsênio-Gálio

AsGaAl – Arsênio-Gálio-Alumínio

ATP – Adenosina Trifosfato

Er:YAG – Érbio : Granada de ítrio alumínio (acrônimo)

g – grama

HeNe- Hélio-Neônio

InGaAlP- Índio-Gálio-Alumínio-Fósforo

J/cm² -Joule/centímetro quadrado

LBI- Laser de baixa intensidade

LLL- Low level laser

ml- mililitro

mm- milímetro

mW- miliwatt

N/cm – Newton/centímetro

Nd:YAG – Neodímio: Granada de ítrio alumínio (acrônimo)

nm – nanômetros

RESUMO

Boldrini C. Avaliação do efeito do laser de baixa intensidade na formação óssea ao redor de implantes osseointegráveis. Estudo biomecânico em ratos. [Dissertação de Mestrado]. Barretos: Curso de Mestrado em Ciências Odontológicas da UNIFEB; 2010.

O laser de baixa intensidade (LBI) tem sido utilizado em áreas de implantes dentários por acelerar o processo de osseointegração. O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o efeito da irradiação com LBI durante a cirurgia de preparo do leito de instalação do implante, comparativamente a sítios não-irradiados. Para isto, 64 ratos adultos Wistar foram utilizados. Metade dos animais foi aleatoriamente designado a fazer parte do grupo Teste (submetidos à irradiação com LBI), enquanto os demais foram incluídos no grupo Controle (não-submetidos à irradiação com LBI). Todos os animais tiveram a tíbia esquerda perfurada com fresa de 2 mm, e um implante (2,2 x 4 mm) foi inserido. Por sua vez, apenas nos animais do grupo Teste, após o preparo do leito cirúrgico foi realizada a irradiação com LBI (Arsênio-Gálio-Alumínio), com comprimento de onda de 808 nm, com potência de 50 mW, com feixe colimado (0,4 cm²), durante 1 minuto e 23 segundos, e com densidade de energia de 11 J/cm². Duas aplicações (22 J/cm²) foram realizadas imediatamente após o preparo do leito criado para instalação do implantes. Os animais de ambos os grupos foram então sacrificados 7, 15, 30 e, 45 dias após a instalação dos implantes, quando foi realizada a avaliação do torque de remoção. Nos períodos de 30 e 45 dias, os valores de torque foram estatisticamente maiores no grupo Teste em comparação com o Controle, e em ambos os grupos foram observados aumentos nos valores do torque com o decorrer do tempo (teste ANOVA, p<0,0001). Com base na amostra investigada, pode-se sugerir que a irradiação com LBI foi benéfica para aumentar o torque de remoção de implantes osseointegráveis.

Palavras-chave: Implantes dentários; terapia a laser de baixa intensidade; osseointegração; torque; modelos animais (busca no DeCS: <http://decs.bvs.br/>).

ABSTRACT

Boldrini C. Evaluation the effect of low level laser in formation of bone around osseointegrated implants. Biomechanical study in rats. [Dissertação de Mestrado]. Barretos: Curso de Mestrado em Ciências Odontológicas da UNIFEB; 2010.

Low-level laser (LLL) has been used in sites with dental implants for accelerating osseointegration process. The present study aims to evaluate the effect of LLL irradiation during surgical preparation of dental implant bed, compared to non-irradiation. Sixty-four Wistar rats were used. Half of the animals were randomly assigned to be part of Test (submitted to radiation with LLL) while the remaining were assigned into Control group (non-submitted to irradiation with LLL). All animals had the left tibia drilled with a 2mm, and an implant (2.2 x 4 mm) was inserted. On its turn, only in animals from Test group, after surgical bone preparation, the site was irradiated with LLL (Gallium aluminium arsenide), with a wavelength of 808 nm, a measured power output of 50 mW, to emit radiation in collimated beams (0.4 cm²), for 1 minute and 23 seconds, and a energy density of 11 J/cm². Two applications (22 J/cm²) were performed immediatelly after bed preparation for implant installation. Animals from both groups were sacrificed 7, 15, 30, and 45 days after implant installation, when load necessary for removing implant from bone was evaluated by using a torquimeter. At 30 and 45 days periods, torque values were statistically higher for Test group in comparison to Control; and in both, a values tended to increase overtime (ANOVA test, p<0.0001). Based on the sample investigated, it could be suggested that irradiation with LLL was beneficial to improve removal torque of osseointegrated implants.

Keywords: Dental implants; laser therapy, low-level; osseointegration; torque; models, animal (busca no Mesh: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=mesh>).

1 INTRODUÇÃO

A laserterapia tornou-se muito e cada vez mais utilizada em Medicina e Odontologia desde o desenvolvimento do laser de rubi por Maiman em 1960 (Mester et al.,1973). Variados tipos de lasers de luz tem sido utilizados em diferentes doses e esquemas de tratamento, dentre os quais se destacam o Arsênio-Gálio (AsGA), Arsênio-Gálio-Alumínio (AsGaAl), Hélio-Neônio (HeNe), Índio-Gálio-Alumínio-Fósforo (InGaAlP), Érbio: Granada de Ítrio Alumínio (acrônimo em inglês Er:YAG), e Neodímio: Granada de Ítrio Alumínio (acrônimo em inglês Nd:YAG).

Dois diferentes grupos de lasers são empregados na Odontologia. Há os lasers de alta intensidade e os de baixa intensidade, que são classificados de acordo com a potência. *Os lasers de baixa intensidade* (LBI) atuam a nível celular, através de interação fotoquímica, podendo promover aumento do metabolismo celular e, conseqüentemente, induzir diferentes efeitos gerais como analgésico, antiinflamatório e bioestimulativo. Dentre estes equipamentos de lasers, os mais utilizados são os de AsGA, AsGaAl, HeNe, e InGaAlP (Theodoro et al., 2002).

Experiências demonstram que o osso irradiado apresenta um tecido periimplantar mais compacto, com maior arranjo de osso lamelar associado a uma maior vascularização. A manutenção da osseointegração é um aspecto importante na clínica, já que as taxas de sucesso da osseointegração a longo prazo são altas (Pereira et al., 2009).

Os LBIs tem as vantagens de promover biomodulação no tecido a ser reparado, aumentando o metabolismo mitocondrial e síntese de ATP favorecendo o processo de reparo, induzindo proliferação celular, e aumento da divisão celular (Theodoro et al., 2002).

Assim sendo, a aceleração da osseointegração junto à terapia com LBI permitiria instalar próteses sobre os implantes depois de um período mais curto, reduzindo o tempo de tratamento. A hipótese testada foi que a irradiação do

laser melhoraria o reparo ósseo em torno dos implantes de titânio neste modelo experimental.

2 PROPOSIÇÃO

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar, o efeito da irradiação com LBI durante a cirurgia de preparo do leito de instalação do implante, comparativamente a sítios não-irradiados.

3 METODOLOGIA

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética Experimental em Animais da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, campus Araçatuba (protocolo 2008-004251). Para a realização do estudo foram incluídos 64 ratos machos adultos Wistar com aproximadamente três meses de idade e pesando cerca de 300g. Os animais foram postos em gaiolas de propileno e alimentados com ração padrão laboratorial e água *ad libitum*. Os ratos foram mantidos em ambiente com temperatura de 25°C, umidade relativa de 55%, e foram expostos a 12,5 horas de luz alternando com 11,5 horas de escuridão.

Desenho experimental

Os animais foram aleatoriamente designados a fazer parte de um dos grupos experimentais.

No grupo Teste os animais foram divididos da seguinte forma:

- Oito animais foram sacrificados 7 dias após a instalação do implante;
- Oito animais foram sacrificados 15 dias após a instalação do implante;
- Oito animais foram sacrificados 30 dias após a instalação do implante; e
- Oito animais foram sacrificados 45 dias após a instalação do implante.

Os animais do Grupo Controle foram divididos como se segue:

- Oito animais foram sacrificados 7 dias após a instalação do implante;
- Oito animais foram sacrificados 15 dias após a instalação do implante;
- Oito animais foram sacrificados 30 dias após a instalação do implante; e
- Oito animais foram sacrificados 45 dias após a instalação do implante.

Previamente ao procedimento cirúrgico, cada animal foi anestesiado com administração intramuscular de uma combinação de cloridrato de ketamina (Ketamina Ager, Agener União, São Paulo, SP, Brasil) a uma concentração de 0,04 mL / 100g e xilazina a 2% (Rompum, Bayer, São Paulo, SP, Brasil) na concentração de 0,08 mL / 100g de massa corporal. A seguir, a tíbia esquerda foi tricotomizada e realizada a antisepsia com auxílio de solução tópica de iodopovidona a 10 %. Na sequência, uma incisão de aproximadamente 30 mm foi realizada com lâmina de bisturi 15 C, pelo lado medial na tíbia esquerda (Fig. 1a). Após a dissecação, feita com auxílio de um descolador de periósteo, o tecido ósseo foi exposto (Fig. 1b) e um leito bicortical foi preparado na metáfise proximal (Fig. 1c), usando uma fresa de 2,0 mm de diâmetro (Titanium Fix A.S Technology, São José dos Campos, São Paulo, Brasil) montada em motor cirúrgico com 900 rpm (Ômega, Dentscler Indústria de aparelhos Odontológicos Ltda, Ribeirão Preto, Brasil) acompanhado por irrigação constante com solução salina e o líquido aspirado com sugador de alta potência.

Nos animais do grupo Teste, imediatamente após o preparo o leito, foi realizada a irradiação (Fig. 1d) por duas vezes com LBI de AsGaAl (Thera laser, DMC, São Carlos, SP, Brasil). O feixe laser foi posicionado perpendicularmente em contato com o leito preparado, com comprimento de onda de 808 nm, com potência de 50 mW, com feixe colimado de 0,4 cm² (0,125 W/cm²) durante 1 minuto e 23 segundos, e com densidade de energia de 11 J/cm² em modo contínuo, perfazendo 22 J/cm². Nos animais do grupo Controle não foi realizada irradiação.

Então, no leito preparado foi inserido um implante (Titanium Fix A.S Technology, São José dos Campos, São Paulo, Brasil) com superfície tratada por meio de jateamento e ataque ácido e 4,0 mm de comprimento e 2,2 mm de diâmetro (Fig. 2a). A instalação foi realizada com auxílio de uma chave digital (1,2 mm) acoplada ao hexágono do implante (Fig. 2b) até que o mesmo fosse inserido no nível da crista óssea (Fig. 2c). Em seguida, o tecido mole foi suturado internamente com fio 4.0 de poliglactina 910 (Johnson & Johnson do Brasil Ind. Com. Prod. Para Saúde Ltda, São Bernardo do Campo, Brasil), e externamente

com fio de seda 4.0 (Johnson & Johnson) (Fig. 2d). Por fim, os animais receberam uma injeção intramuscular de penicilina e estreptomicina (Pentabiótico Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, SP, Brasil).

Aos sete, quinze, trinta e quarenta e cinco dias após a instalação dos implantes, os animais foram sacrificados com uma dose letal intraperitoneal de hidrato de cloral a 20%.

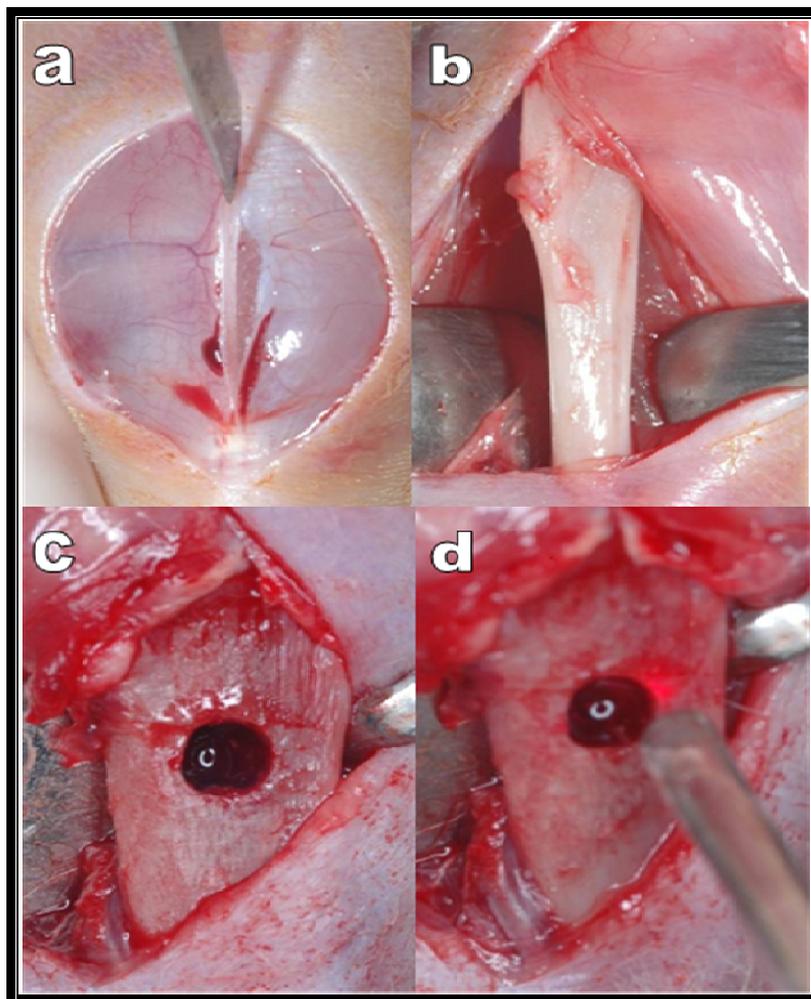


Figura 1- Cirurgia de preparo do leito. Nos animais de ambos os grupos foi realizada uma (a) incisão na tíbia com lâmina de bisturi, seguida da (b) exposição do osso, e (c) preparo do leito para instalação do implante com fresa em baixa

rotação. (d) Apenas nos animais do grupo Teste o alvéolo foi exposto a irradiação laser.

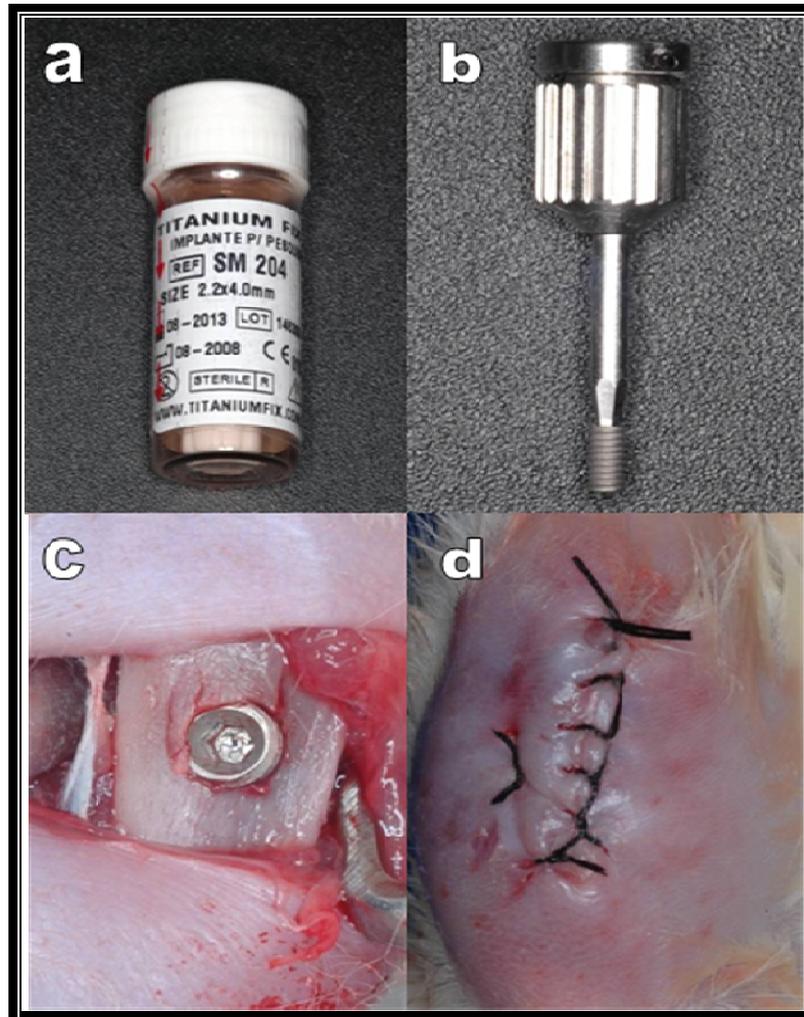


Figura 2- Instalação do implante. (a) O implante de titânio utilizado tinha 2,2 x 4,0 mm, e (b) foi montado em uma chave digital 1,2 mm, (c) para instalação. Em seguida, (d) os tecidos foram suturados.

Análise Biomecânica

Após o sacrifício, a perna do animal foi removida e destinada ao teste de torque de remoção. Para tal, a tíbia foi estabilizada em uma morsa e incisionada para acesso ao implante. Em seguida, uma chave hexagonal de 1,2 mm foi conectada ao implante e ao torquímetro (Tohnishi MFG, Tokyo, Japão). Por meio de um movimento anti-horário, o torquímetro registrou a força necessária para romper a osseointegração do implante e seu valor em N/cm foi anotado para posterior análise estatística.

Análise Estatística

A análise estatística foi desenvolvida por meio de um programa específico (BioEstat 5.0, Sociedade Civil Mamirauá / MCT – CNPq, Belém, Brasil), considerando a hipótese nula baseada na ausência de diferença entre as modalidades de tratamento ($\alpha = 5\%$). A unidade de análise foi o animal.

Os dados experimentais foram submetidos a teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, e como apresentaram distribuição normal, foram analisados pelo teste ANOVA.

4 RESULTADO

Todos os animais responderam bem ao procedimento cirúrgico e as aplicações de laser. A distribuição dos valores de cada grupo e período está representada em Box-Plot na Fig. 3. Nos períodos de 30 e 45 dias, os valores de torque foram estatisticamente maiores no grupo Teste em comparação com o Controle, e em ambos os grupos foram observados aumentos nos valores do torque com o decorrer do tempo (Tabelas 1 e 2) (teste ANOVA, $p < 0,0001$).

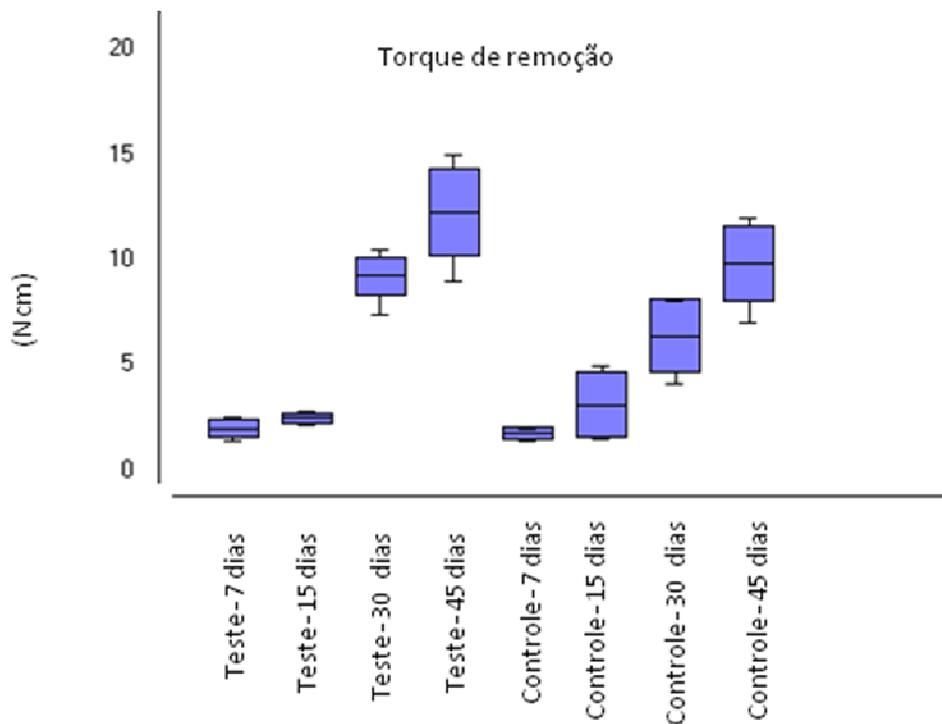


Figura 3- Gráfico do tipo Box-plot (média, desvio-padrão, valor mínimo e máximo) dos grupos Teste e Controle, nos períodos de 7, 15, 30 e 45 dias após a instalação dos implantes (n=8).

Tabela 1- Média e desvio-padrão do torque de remoção nos diferentes períodos para os grupos Teste e Controle (n=8).

| | Teste | | | | Controle | | | |
|------------------------------|--------------|---------|---------|---------|-----------------|---------|---------|---------|
| | 7 dias | 15 dias | 30 dias | 45 dias | 7 dias | 15 dias | 30 dias | 45 dias |
| Média | 1,98 | 2,50 | 9,25 | 12,25 | 1,75 | 3,14 | 6,40 | 9,86 |
| ± desvio-padrão (Ncm) | ± 0,43 | ± 0,22 | ± 0,89 | ± 2,05 | ± 0,27 | ± 1,51 | ± 1,71 | ± 1,81 |

Tabela 2- Resultado da análise estatística inter-grupos e intra-grupo (n=8). Letras idênticas representam diferença estatisticamente significante.

| | Teste | | | | Controle | | | |
|-----------------------------|--------------|---------|---------|---------|-----------------|---------|---------|---------|
| | 7 dias | 15 dias | 30 dias | 45 dias | 7 dias | 15 dias | 30 dias | 45 dias |
| Análise inter-grupos | | | a | b | | | a | B |
| Análise intra-grupo | c,d,e | c,f,g | d,f,h | e,g,h | i,j | k,l | i,k,m | j,l,m |

5 DISCUSSÃO

Este estudo foi desenvolvido para avaliar a influência da LBI na dinâmica do reparo ósseo ao redor de implantes de titânio por meio da avaliação do torque de remoção, que testa em três dimensões que refletem a resistência ao cisalhamento entre tecido ósseo e o implante (Johansson et al., 1998).

Sendo assim, no presente estudo foi possível constatar que 30 e 45 dias após a implantação, foi necessário maior torque para remoção dos implantes nos sítios irradiados em comparação aos não-irradiados. Estes resultados sugerem que a irradiação com LBI nos parâmetros empregados, durante a cirurgia de instalação do implante, pode resultar em maior formação óssea ao redor de implantes, devido ao aquecimento do laser aumentando a irrigação sanguínea local, imediataO que nos leva a constatar que o laser tenha influenciado positivamente o processo de remodelação óssea, nos períodos de tempo maiores devido a reorganização óssea ser mais demorada . Desta forma, sugere-se que a terapia com LBI pode ser uma opção como método não-invasivo para o reforço do reparo ósseo após a instalação de implantes. Além disto, sendo AsGaAl um laser de diodo, um dos semicondutores de custo mais baixo, sua aplicação torna-se cada vez mais acessível para uso na prática diária

Os resultados benéficos com aplicação de laser AsGaAl foram previamente destacados por Guzzardella et al. (2003), Khadra et al. (2004), e Pereira et al. (2009). Nos estudos de Guzzardella et al. (2003) e Pereira et al. (2009) foram instalados em coelhos, respectivamente, implantes de hidroxiapatita em fêmur, e implantes de titânio em tíbia. No primeiro estudo os animais foram irradiados por 5 dias consecutivos, enquanto que no segundo, o foram durante 14 dias com intervalos de 48 horas entre cada aplicação. Em ambos os casos, os animais foram sacrificados três e seis semanas após a implantação.

Por sua vez, no estudo de Khadra et al. (2004) a instalação de implante de titânio foi feita em tíbia de coelho, no qual foi realizada aplicações de laser AsGaAl (23 J/cm^2 por sessão, com 830 nm) durante dez dias após a

implantação. Com isto, ao final de um período de oito semanas de acompanhamento, constatou-se maiores valores de torque no grupo submetido a irradiação. Em tal estudo, os valores de torque foram de $14,35 \pm 4,98$ Ncm e $10,27 \pm 4,38$ Ncm, respectivamente nos grupos Teste e Controle. Estes resultados corroboram as grandezas detectadas no presente estudo em ratos, aos 45 dias de acompanhamento ($12,25 \pm 2,05$ Ncm e $9,86 \pm 1,81$ Ncm, respectivamente nos grupos Teste e Controle). Sendo importante salientar que os benefícios detectados foram decorrentes da aplicação de laser em uma única sessão (22 J/cm^2 em sessão única, com 808 nm), o que facilitaria o emprego clínico do uso do laser.

Outra constatação do estudo foi a dinâmica proposta, que mostrou ao longo dos períodos de observação, que os valores de torque aumentaram, em ambos os grupos.

No delineamento da metodologia, optou-se pelo emprego do laser AsGaAl por seu alto poder de penetração em profundidade em comparação com outros tipos de laser, e portanto, oferece ao clínico uma ferramenta de grande eficiência. Em um estudo *in vitro*, com LBI, a penetração no osso compacto, com um laser com comprimento de onda no infravermelho de 850nm e potência 10mW pode penetrar cerca de 18 mm na direção do eixo do osso e cerca de 6 mm na direção corticomedular, de acordo com a reflexão da superfície *versus* a direção do feixe de luz (Bossy et al., 1985). Considerando a aplicação clínica em odontologia, estas taxas permitiria a irradiação da interface osso-implante, mesmo na cortical óssea mandibular.

Além disto, foi analisado o torque de remoção, que testa em três dimensões que refletem a resistência ao cisalhamento entre tecido ósseo e o implante (Johansson et al., 1998). Paralelamente à análise histométrica, a avaliação do torque por Klokkevold et al. (1997) avaliou superfície tratada (Osseotite) *versus* superfície maquinada pelo uso de um torquímetro digital. Foram analisados 10 coelhos com implantes inseridos nas tíbias direita e esquerda, sendo um implante de cada, em cada tíbia. Após 60 dias, os animais foram sacrificados, e foi realizada leitura com o torquímetro em ambas as tíbias de todos os animais. Os implantes com superfície tratada foi 4 vezes mais

resistente ao torque em comparação com a superfície maquinada (20.50 ± 6.59 N 4.95 ± 1.61 N respectivamente) , comprovando-se pelo estudo histológico também. Giro et al. (2007) realizou um estudo em ratos Wistar fêmeas e verificou pelo uso do torquímetro maior torque de remoção no grupo tratado com alendronato (bisfosfonatos utilizados no tratamento da osteoporose). Um experimento utilizando 58 animais, nos quais 10 foram tratados como controle, 12 foram tratados com sham, 12 foram ovariectomizados, 12 tratados com estrógeno e 12 tratado com alendronato. Todos animais receberam um implante na tíbia e após 60 dias foram sacrificados e foi utilizado o torquímetro para a avaliação da osseointegração entre grupos. Este estudo foi realizado para avaliar se bisfosfonatos altera a formação e composição óssea, junto ao seu remodelamento e onde foi observado também que o estrogênio causa deficiência no tecido ósseo.

Como sugestão para estudos futuros, pode-se considerar a continuação desta mesma metodologia em períodos além dos 45 dias. Assim seria possível detectar a estabilização do valor do torque, e constatar se a irradiação acelerou o processo de osseointegração.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados deste estudo, pode-se sugerir que o laser acelere o reparo ósseo ao redor de implantes osseointegráveis, o que foi verificado por meio da análise da resistência ao torque reverso nos períodos mais tardios de observação.

7 REFERÊNCIAS

- Bossy J, Chevalier JM, Sambuc P, Quatrefages R. In vitro survey of low energy laser beam penetration in compact bone. *Acupunct Electrother Res* 1985 (10) 35-39.
- Giro G, Sakakura CE, Gonçalves D, Pereira RMR, Marcantonio EJ, Orrico SRP. Effect of 17 β - Estradiol and Alendronate on the removal torque of osseointegrated titanium implants in ovariectomized rats. *J Periodontol* 2007 (78) 1316-1321.
- Guzzardella GA, Toricelli P, Nicoli-Aldini N, Giardino R. Osseointegration of endosseous ceramic implants after postoperative low-power laser stimulation: an in vivo comparative study. *Clin Oral Impl Res* 2003 (14) 226-232.
- Johansson CB, Han CH, Wennerberg A, Albrektsson T. A quantitative comparison of machined commercially pure titanium and titanium-aluminum-vanadium implants in rabbit bone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998 (13) 315-321.
- Khadra M, Ronold HJ, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE, Haanaes HR. Low-level laser therapy stimulates bone-implant interaction: an experimental study in rabbits. *Clin Oral Implants Res.* 2004 (3) 325-32.
- Klokkevold PR, Nishimura RD, Adachi M, Caputo A. Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface. *Clin Oral Implants Res.* 1997 (8) 442-447.
- Mester E, Jaszgagi-Nagy E, The effect of laser radiation on wound healing and collagen synthesis. *Studia Biophysica* 1973 (35) 227-230.
- Pereira CL, Sallum EA, Nociti Junior FH, Moreira RWF. The effect of low-intensity laser therapy on bone healing around titanium implants: A histometric study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009 (24) 47-51
- Theodoro LH; Garcia VG, Marcantonio Jr E. Lasers em Implantodontia. *BCI* 2002 (33) 74-78.

8 ANEXO

Anexo 1 – Revisão da literatura

Uma busca na literatura foi realizada utilizando o site do PubMed cruzando os termos “laser” e “dental implants”. Desta forma foram encontrados 242 resumos, dos quais 24 foram selecionados para esta revisão de literatura, que foi desenvolvida separando os artigos dentro dos tópicos “Efeito do LBI em osteócitos”, “Efeito do LBI no tecido ósseo”, e “Efeito do LBI no tecido ósseo periimplantar”. Não foram aplicados limites à pesquisa.

Efeito do LBI em osteócitos

A angiogênese, síntese de colágeno e osteogênese são considerados como processos essenciais durante a cicatrização óssea precoce. Estudos demonstraram uma significativa e positiva influência da terapia com LBI sobre a angiogênese (Bibikova et al., 1994), vascularização (Maier et al., 1990), e nos processos de regeneração do sistema linfático (Lievens, 1991), e reparo de cartilagem (Palmgren et al., 1989). O mecanismo da terapia com LBI sobre a formação óssea não é totalmente compreendido. No entanto, as possíveis interações fotoquímicas ou fotodinâmicas de radicais livres e oxidantes tem sido sugerida como a causa da terapia em funções celulares (Karu et al., 1993; Freidmann et al., 1991; Parshad et al., 1980).

Foi sugerido, em 1987, por Trelles & Mayayo, que o efeito da terapia com LBI pode modular a função de osteócitos e promover o metabolismo e a função do calo ósseo.

Em particular, de acordo com Osawa et al. (1998), numa experiência *in vitro*, a irradiação com laser em culturas de osteoblastos aumenta a proliferação celular, a proliferação de formação de células da linhagem

osteoblástica, e diferenciação celular, resultando em um aumento de células osteoblásticas diferenciadas e, finalmente, um aumento na formação de matriz óssea.

Em 2000, Dörtbudak et al. realizaram uma avaliação *in vitro*, usando células de medula óssea do fêmur de ratos, para analisar o efeito do LBI nos osteoblastos. Foram formados três grupos experimentais com 10 culturas cada grupo. As culturas de células foram irradiadas nos dias três, cinco e sete, com uma dose de 2,4 J, 690nm por 60s. Além disto, foram formados mais três grupos controle com 10 culturas cada, que foram mantidos sem irradiação. Os períodos de observação foram de oito, 12 e 16 dias, quando se observou uma maior deposição de matriz osteóide nos sítios irradiados em comparação com os não-irradiados. A diferença foi estatisticamente significativa nos sítios de 16 dias. Os autores concluíram que a irradiação teve um efeito bioestimulador sobre os osteoblastos *in vitro*. Além disso, os autores enfatizam que os efeitos relacionados ao LBI, ou seja, a estimulação do fluxo sanguíneo, recrutamento e ativação de osteoblastos e osteossíntese, diminuição da atividade osteoclástica, ação antiinflamatória podem também ser considerados como fatores que estimulam a osseointegração e promovem proliferação e maturação dos osteoblastos humanos também.

Efeito do LBI no tecido ósseo

Em 1987, Trelles & Mayoyo avaliaram a formação óssea após a irradiação com LBI em um estudo experimental em fratura de tíbia de rato. Uma formação óssea mais acelerada, e maior vascularização com denso trabeculado, foram observadas em comparação com o controle. Os autores sugeriram que o laser pode modular a função de osteócitos e acelerar o metabolismo. Diante destes resultados a influência do LBI na regeneração de tecido duro tornou-se um foco de interesse científico.

Davies (1998) investigou o efeito do LBI no osso alveolar após a extração do dente por meio de exame radiográfico. O autor mostrou que o uso da terapia aumentou a deposição de osso, sugerindo estimulação óssea, o que sugere que o LBI pode ativar a reparação do tecido ósseo danificado em pacientes.

Gerbi et al. (2005) avaliaram histologicamente o efeito do laser (AsGaAl, com 830 nm, 40 mW e 16 J/cm² por sessão), no reparo de defeitos cirúrgicos criados em fêmur de 42 ratos. Os defeitos foram preenchidos com osso bovino liofilizado (Gen-Ox, matriz orgânica), isoladamente ou em associação com regeneração tecidual guiada (Gen-derm). Cinco grupos foram formados: Grupo 1, sem tratamento (6 animais); Grupo 2, Gen-Ox (9 animais); Grupo 3, Gen-Ox + laser (9 animais); Grupo 4, Gen-Ox + Gen-Derm (9 animais); e Grupo 5 Gen-Ox + Gen-Derm + laser (9 animais). Os animais dos grupos irradiados receberam 16 J/cm² por sessão em quatro pontos ao redor do defeito (4 J/cm² por ponto). A primeira irradiação foi administrada imediatamente após a cirurgia e a irradiação foi repetida sete vezes a cada 48 horas. Os animais foram sacrificados após 15, 21 e 30 dias. Os resultados mostraram evidências histológicas de um aumento de fibras colágenas nos estágios iniciais do reparo ósseo (15 dias) e aumento na quantidade de trabéculas ósseas bem organizadas no final do período experimental (30 dias) nos irradiados, em comparação com os não irradiados.

Efeito do LBI no tecido ósseo periimplantar

O uso do laser de diodo AsGaAl, tem crescido cada vez mais durante os últimos 10 anos. Este tipo de laser é conhecido por ter uma profundidade elevada de penetração em comparação a outros tipos, portanto, oferece ao clínico, uma penetração de grande eficiência (Theodoro et al., 2002).

Em 2002, Dörtbudak et al. avaliaram o efeito do LBI *in vivo*. Cinco babuínos machos, com idade média de 6,5 anos foram utilizados, em cujas cristas ilíacas foram feitas quatro perfurações de ambos os lados, inseridos implantes de superfície jateada e submetida a ataque ácido. Os sítios foram irradiados com 690

nm, 100 mW por 1 minuto (6J) imediatamente após o preparo do leito ósseo com fresa e inserção dos implantes. Cinco dias após, a amostra foi removida para contagem dos osteócitos e quantificação da reabsorção óssea. Nas amostras, os osteócitos viáveis foram encontrados em 41,7% das lacunas no grupo submetido à irradiação, enquanto que no grupo não-irradiado foram encontrados em 34,4% das lacunas. A diferença foi estatisticamente significativa. Além disto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com relação à área total de reabsorção óssea. Os autores concluíram que a irradiação teve efeito positivo na integração dos implantes *in vivo*, enquanto que a taxa de reabsorção não foi influenciada pela irradiação.

Guzzardella et al. (2003) confirmaram, por meio da análise histométrica, que o uso do laser de AsGaAl, a 780 nm, aumenta a osseointegração do ponto de vista do contato osso-implante. Para isto, foram realizadas perfurações em ambos os fêmures dos coelhos, pelo lado distal, onde foram inseridos os implantes de hidroxiapatita. Por cinco dias consecutivos, o lado esquerdo foi submetido à terapia com LBI, utilizando 300 J/cm^2 , 1W, por 10 minutos, enquanto que o lado direito foi mantido como controle. Os períodos de observação foram de três e seis semanas após a inserção desses implantes. Nos animais irradiados foi observada uma maior formação de matriz osteóide em comparação aos não irradiados. Nas amostras do período de três semanas foi observado maior porcentagem de contato osso-implante.

Khadra et al. (2004) demonstraram que a terapia de LBI resulta em um aumento funcional e estrutural na fixação dos implantes de titânio no osso e promove a cicatrização óssea e a mineralização. Para isto, os autores inseriram discos de titânio na tíbia de coelhos e fizeram aplicações de laser de AsGaAl por 10 dias consecutivos com 830 nm, 150 mW, 23 J/cm^2 (9 aplicações de 3 J). Os animais foram sacrificados oito semanas após a instalação dos implantes. As análises incluíram avaliação do torque de remoção, histomorfometria, e microanálise por energia dispersiva de raios X. Os autores observaram maior torque de remoção nos sítios submetidos à irradiação (14,35 N) em comparação com o controle (10,27 N), e a porcentagem de cálcio e fósforo foi maior no grupo

irradiado. Estas diferenças foram estatisticamente significantes. Além disto, considerando especificamente o contato osso-implante, apenas quatro implantes foram utilizados nesta análise, sendo que os autores não apresentaram resultados numéricos, tendo apenas estimado que o aumento nos sítios irradiados foi de 10%. Os autores concluíram que a irradiação teve um efeito favorável no processo de cicatrização de implantes de titânio.

Lopes et al. (2005) avaliaram se era possível reduzir o tempo para colocação de carga, durante o processo de reparação óssea ao redor de implantes submetidos ou não a radiação com laser de AsGaAl 830 nm, 21,5 J/cm² por sessão, 10 mW (totalizando 85 J/cm², 7 sessões com intervalos de 48 horas). Quatorze coelhos foram usados. Os implantes foram inseridos na tíbia, tendo sido oito irradiados com laser e seis utilizados como controle. Os animais foram sacrificados 15, 30, e 45 dias após. Doze leituras foram tomadas por análise com infravermelho através da espectroscopia Raman, sobre o osso ao redor do implante. Os resultados mostraram diferenças significativas em concentração de hidroxiapatita de cálcio nos sítios irradiados em comparação com o controle em 30 e 45 dias após a implantação.

LBI tem sido utilizados por clínicos para melhorar a cicatrização e reduzir a dor em humanos. Seu uso também resulta na neoformação óssea ao redor de implantes de hidroxiapatita com um aumento significativo no total do contato osso-implante. No estudo de Nissan et al (2006) foram avaliados bioquimicamente os efeitos do laser de AsGa com 4mW/cm² e 22,4 mW/cm² de densidade de potência, respectivamente nos grupos, sobre o processo de cicatrização óssea depois de cirurgia criando cavidades ósseas em mandíbula de ratos. Foram utilizados 24 animais divididos em dois grupos. Cada grupo usou energia diferente para o tratamento como descrito acima, por três minutos após a cirurgia. Foram usados ambos os lados da mandíbula, o direito como controle e o esquerdo tratado a laser. Os ratos foram sacrificados após um, duas, e quatro semanas. No calo recém-formado, houve acúmulo de radiocalcium e fosfatase alcalina, a atividade foi medida para indicar osteogênese. Uma análise de variância com medidas repetidas mostrou que o LBI com potência de 4 mW/cm²

aumentou significativamente o acúmulo de radiocalcium no grupo de duas semanas, enquanto o laser, numa densidade de potência de $22,4 \text{ mW/cm}^2$ não teve efeito. Nenhuma alteração foi observada na atividade de fosfatase alcalina com o tratamento do laser.

Por sua vez, Kim et al. (2007) avaliaram a expressão de mediadores do metabolismo ósseo durante o processo de osseointegração em sítios submetidos ou não a radiação com laser de baixa potência. Foram avaliados, por imunohistoquímica o ativador do receptor do fator nuclear K β (com sigla em inglês RANK), seu ligante (com sigla em inglês RANKL), e osteoprotegerina. Dois ratos de cada grupo foram sacrificados em cada período: um, três, sete, 14 e 21 dias após a implantação. Os autores observaram um aumento da expressão em todos os mediadores e concluíram que a radiação promoveu um aumento da atividade metabólica e aumento da atividade das células ósseas.

Jakse et al. (2007) estudaram o efeito do LBI no tratamento da regeneração em sítio com enxerto ósseo no seio maxilar, em 12 ovinos. Um processo de elevação bilateral do seio maxilar juntamente com enxertia de osso da crista ilíaca foi realizado em primeira fase cirúrgica. Implantes foram inseridos nos enxertos num segundo estágio. Um grupo após quatro semanas de enxertia e o outro grupo após 12 semanas. Dezesesseis semanas após a inserção dos implantes, os animais foram sacrificados. O laser de diodo (75 mW, 680 nm) foi utilizado unilateralmente durante o segundo estágio cirúrgico, na fase intra-operatória e três vezes durante a primeira semana pós operatória num total de 3 a 4 J/cm^2 . Quando foi realizar a colocação dos implantes, foi trefinada parte do enxerto para avaliação. A análise histomorfométrica e regeneração óssea diferiram pouco entre o controle e o teste em ambos os lados quatro e 12 semanas após o enxerto, mas observou-se um aumento no contato osso-implante no grupo irradiado.

Lopes et al. (2007) avaliaram 14 coelhos que receberam implantes de titânio na tíbia, sendo que oito foram irradiados com laser de AsGaAl (830 nm, sete sessões em intervalos de 48 horas, $21,5 \text{ J/cm}^2$ por ponto, 10 mW, 86 J por sessão) e seis não receberam nenhum tratamento (controle). Os animais foram sacrificados 15, 30 e 45 dias após a cirurgia. Oito leituras foram realizadas ao

redor do implante e 112 espectros no total pela espectroscopia Raman. Os resultados mostraram significativa diferença na concentração de hidroxiapatita nos irradiados e nas amostras de controle em ambos os grupos (30 e 45 dias). Isto indica a maturação óssea precoce nos irradiados devido ao aumento da deposição de hidroxiapatita em 30 dias após fotobiomodulação laser. Os resultados dos autores indicam que na maior parte do osso irradiado com infravermelho mostram aumento da proliferação osteoblástica, deposição de colágeno e neoformação óssea quando comparados aos não irradiados. Enquanto que até 15 dias após a cirurgia, não houve diferenças significativas entre os irradiados e os sem tratamento sobre a concentração de hidroxiapatita. Além disso, os autores sugerem que efeito da terapia laser foi mais eficaz quando o tratamento foi realizado no início do ciclo, que é quando ocorre alta proliferação celular.

Pereira et al. (2009) analisaram o processo de reparo ósseo em um experimento realizado com 12 coelhos. Para isto, foi inserido na tíbia direita um implante, que foi irradiado com AsGaAl (780nm, 7,5 J/cm² por 10s em cada ponto, sendo quatro pontos ao redor de cada implante a cada 48 horas durante 14 dias), enquanto na tíbia da esquerda não foi aplicado LBI. Os animais foram divididos em dois grupos, com dois subgrupos cada, para irradiados e não-irradiados, com seis animais em cada grupo. Um grupo foi sacrificado três semanas após a cirurgia, enquanto o outro grupo foi sacrificado após seis semanas. Com relação à porcentagem de contato osso-implante, esta foi significativamente maior no grupo irradiado, tanto três semanas quanto seis semanas em comparação com o controle. Adicionalmente, quando os valores obtidos no período de três semanas foram comparados aos de seis semanas, diferenças estatisticamente significantes não foram detectadas. Considerando a área do osso dentro das espiras do implante, nenhuma diferença significativa foi encontrada para o tratamento, com ou sem laser.

Anexo 2 – Referências da Revisão da literatura

- Bibikova A, Belkin V, Oron U. Enhancement of angiogenesis in regeneration gastrocnemius muscle of the toad (*Bufo viridis*) by low-energy laser irradiation. *Anatomy and Embryology* 1994 (190) 597–602.
- Davies JE. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont*. 1998 (5) 391-401.
- Dortbudak O, Haas R, Mallath-Pokorny G. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. *Clin Oral Implants Res*. 2000 (6) 540-545.
- Dortbudak O, Haas R, Mailath-Pokorny G. Effect of low-power laser irradiation on bony implant sites. *Clin Oral Implants Res*. 2002 (3) 288-92.
- Freidmann H, Lubart R, Laulicht I, Rochkind SA possible explanation of laser-induced stimulation and damage of cell cultures. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 1991 (11) 87–95.
- Gerbi MEM, Pinheiro ALB, Marzola C, et al. Assessment of bone repair associated with the use of organic bovine bone and membrane irradiated at 830 nm. *Photomed Laser Surg* 2005 (23) 382-388.
- Guzzardella GA, Toricelli P, Nicoli-Aldini N, Giardino R. Osseointegration of endosseous ceramic implants after postoperative low-power laser stimulation: an in vivo comparative study. *Clin Oral Impl Res* 2003 (14) 226-232.
- Jakse N, Payer M, Tangi S, Berghold A, Kirmeier R, Lorenzoni M. Influence on bone regeneration and osseointegration of dental implant following sinus augmentation: An experimental study on sheep. *Clin Oral Implants Res* 2007 (18) 517-524.
- Karu T, Andreichuck T, Ryabykh T. Suppression of human blood chemiluminescence by diode laser irradiation at wavelengths 660, 820, 880 or 950 nm. *Laser Therapy* 1993 (5) 103–109.
- Khadra M, Ronold HJ, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE, Haanaes HR. Low-level laser therapy stimulates bone-implant interaction: an experimental study in rabbits. *Clin Oral Implants Res*. 2004 (3) 325-32.

- Khadra M, Lyngstadaas SP, Haanaes HR, Mustafa K, Kasen N. Laser therapy accelerates initial attachment and subsequent behaviour of human oral fibroblasts cultured on titanium implant material. *Clin Oral Impl Res* 2005 (16) 168-175.
- Kim YD, Kim SS, Hwang DS, Kim SG, Kwon YH, Shin SH, Kim UK, Kim JR, Chung IK. Effect of low-level laser treatment after installation of dental titanium implant-immunohistochemical study of RANKL, RANK, OPG: an experimental study in rats. *Lasers Surg Med*. 2007 (5) 441-450.
- Lievens PC. The effect of combined He-Ne and I.R. laser treatment on the regeneration of the lymphatic system during the process of wound healing. *Lasers in Medical Science* 1991 (6) 193-199.
- Lopes CB, Pinheiro AL, Sathaiah S, Duarte J, Cristinamartins M. Infrared laser light reduces loading time of dental implants: a Raman spectroscopic study. *Photomed Laser Surg*. 2005 (1) 27-31.
- Lopes CB, Pinheiro AL, Sathaiah S, Silva NS, Salgado MAC. Infrared laser photobiomodulation (830 nm) tissue around dental implants: a Raman spectroscopic study and scanning electronic microscopy study in rabbits. *Photomed Laser Surg*. 2007 (2) 96-101
- Mester E, Jaszszagi-Nagy E, The effect of laser radiation on wound healing and collagen synthesis. *Studia Biophysica* 1973 (35) 227-230.
- Nissan J, Assif D, Gross MD, Yaffe A, Binderman I. Effect of low intensity laser irradiation on surgically created bony defects in rats. *J Oral Rehabil* 2006 (33) 619-624.
- Ozawa Y, Shimizu N, Kariya G, Abiko Y. Low energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *Lasers Surg Med*. 1998 (22) 347-354.
- Palmgren N, Jensen GF, Kaae K, Windelin M, Colov H.C. Low-power laser therapy in rheumatoid arthritis. *Lasers in Medical Science* 1989 (4) 193-196.
- Parshad R, Taylor WG, Sanford KK, Camalier RF, Gantt R, Tarone R.E. Fluorescent light-induced chromosome damage in human IMR-90 fibroblasts:

role of hydrogen peroxide and related free radicals. *Mutation Research* 1980 (73) 115–124.

Pereira CL, Sallum EA, Nociti Junior FH, Moreira RWF. The effect of low-intensity laser therapy on bone healing around titanium implants: A histometric study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009 (24) 47-51

Shibli JA, Grassi S, De Figueiredo LC, Feres M, Marcantonio Jr E, Iezzi G et al. Influence of implant surface topography on early osseointegration: a histological study in human jaws. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007 (2) 377-388.

Theodoro LH; Garcia VG, Marcantonio Jr E. Lasers em Implantodontia. *BCI* 2002 (33) 74-78.

Trelles MA, Mayoyo E. Bone fracture consolidates faster with low-power laser. *Lasers Surg Med*. 1987 (1)36-45.

Anexo 3 – Aprovação do Comitê de Ética para realização do estudo



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Avaliação do efeito do Laser na formação óssea ao redor do implante. Estudo biomecânico e histológico em ratos" sob responsabilidade do Prof. Titular Valdir Gouveia Garcia está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA de acordo com o protocolo no. 2008-004251.

Araçatuba, 05 de agosto de 2008.

Profª Drª CRISTINA ANTONIALI SILVA
Presidente da CEEA - FOA/UNESP

Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Barretos, 08 de Fevereiro de 2010,
Carolina Boldrini.