



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA



XXIV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS
SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2020

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE ASSOCIADO OU NÃO AO ENXERTO ÓSSEO DE ORIGEM BOVINA, NA REPARAÇÃO ÓSSEA EM CALVÁRIA DE RATOS: ESTUDO RADIOGRÁFICO E HISTOLÓGICO

Primeiro Autor¹; Segundo Autor²; Terceiro Autor³ e Quarto Autor⁴

1. Flávia Cruz Costa Lopes, graduanda em Odontologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: flavialopes11@hotmail.com
2. Dario Augusto Oliveira Miranda, Departamento de saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: drdariomiranda@icloud.com
3. Antonio Cesar Oliveira de Azevedo, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: antoniocesarazevedo@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: laser; osso bovino; ratos.

INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um dos mais resistentes e rígidos do corpo humano. Constituído de tecido conjuntivo especializado, formado por células e material intercelular calcificado que é a matriz óssea. Quando ocorre a perda de um tecido, o organismo reage no intuito de substituí-lo de forma a assemelhar-se ao máximo com o tecido original. O tecido ósseo apresenta grande potencial de regeneração, entretanto em casos de perdas extensas, isso pode não acontecer (OLIVEIRA, et al., 2003).

Os processos de neoformação decorrente dos defeitos ósseos podem apresentar dois tipos de resultados: reparo ou regeneração. O primeiro é caracterizado pelo preenchimento da ferida por um tipo de tecido diferente daquele originalmente perdido, no que diz respeito à morfologia e função, já na regeneração, a neoformação ocorre por um tecido idêntico ao tecido original preexistente. (CARVALHO et al., 2004; CONSOLARO, 2015)

Diversas terapias foram exploradas pela sua habilidade em aumentar a velocidade de regeneração óssea, como por exemplo a terapia com laser de baixa intensidade e a utilização de enxertos ósseos (BATISTA et al., 2015; ACAR et al., 2016; TEDESCO et al., 2017). Na utilização de enxertos com a finalidade de regeneração óssea, o enxerto autógeno, pelas suas propriedades osteogênicas, osteocondutoras e osteoindutoras tem sido utilizado como “padrão ouro” ao longo dos anos (TSONIS, 2002; SCHMITT et al., 2013). O uso deste material, no entanto, está associado a problemas no sítio doador, como dor, infecções e danos às estruturas, como também na área receptora, como a possibilidade de reabsorção do enxerto, além de ter seu uso limitado à possibilidade de existência de áreas doadoras (SCHIMMING, R.; SCHELZEISEN, 2004; L., 2011; ROGERS, G.F.; GREENE, 2012). Na Odontologia o osso bovino inorgânico é o material mais utilizado e pesquisado com a finalidade de fazer enxertos, devido principalmente à sua estrutura de tecido ósseo, diferente de materiais sintéticos, e à sua semelhança com o osso humano (HOEXTER, 2002; HALLMAN, 2008).

Já a utilização do laser se dá através de uma terapia não destrutiva e que induz respostas fotobiológicas. Quando a luz do laser é absorvida pelo tecido, muitas reações bioquímicas acontecem. Estudos in vitro demonstraram que a aplicação da terapia com laser de baixa intensidade aumenta a atividade mitocondrial, a síntese de DNA/RNA nos osteoblastos, a viabilidade celular, a fosfatase alcalina, a atividade osteoblástica, a vascularização e a organização das fibras colágenas (BATISTA et al., 2015; ACAR et al., 2016; ZEIN et al., 2017).

Essa pesquisa busca uma evidência científica acerca da utilização do laser de baixa intensidade para auxiliar o reparo ósseo associado ou não a enxertos ósseos exógenos de origem bovina - biomaterial Bio-oss® - através de uma avaliação radiográfica e histológica, verificando a eficácia do laser para reparação óssea em processos cirúrgicos.

MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA

Para este estudo foram selecionados 48 ratos *Rattus norvegicus*, machos, adultos de 3 meses de idade, da linhagem Wistar, variante albina, com peso aproximado de 250g, sem doenças clinicamente manifestadas, provenientes do Biotério da Universidade Estadual de Feira de Santana – Bahia. Os 48 ratos foram divididos em 4 grupos de 12 animais cada: grupo controle, grupo laser, grupo biomaterial e grupo laser/biomaterial, sendo que, dentro de cada grupo estudado, nova divisão foi realizada onde foram destinados 06 espécimes para cada um dos períodos experimentais que foram avaliados, 30 e 60 dias respectivamente.

Todos os 48 espécimes foram operados. No grupo controle foi feito apenas o defeito ósseo. No grupo laser, após o procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos ao laser de baixa intensidade. Após a calibragem do aparelho, foram emitidas cinco radiações de sessenta segundos cada, em cada ponto cardeal e na região central do defeito ósseo. No grupo biomaterial, após a cirurgia, foi colocado o produto na calvária, devidamente pesado, para que não houvesse diferenças de quantidade. Por fim, no grupo biomaterial/laser, foram utilizados o produto e a incidência com o laser da mesma maneira dos outros grupos (PINHEIRO, et al, 2012).

Cada grupo experimental foi avaliado em dois tempos diferentes: 30 e 60 dias após a implantação dos materiais nos defeitos cirurgicamente induzidos. Transcorridos estes períodos, os animais foram eutanasiados. Todos os procedimentos operatórios, incluindo materiais utilizados, períodos de avaliação e eutanásia, tempos cirúrgicos, dentre outros, foram realizados de acordo com o protocolo específico para avaliação de processos de reparo ósseo em defeitos críticos na calvária de ratos, publicado na Revista Nature, em 2012, que padronizou este método de pesquisa (SPICER et al, 2012).

Resumo do protocolo de trabalho:

1ª sessão: vacinação utilizando ivermectina; divisão aleatória dos grupos; alocação dos animais;

2ª sessão: pré-medicação com sulfato de atropina 0,44mg/100g por via subcutânea e anestesia com uma mistura de Xilazina 2% e ketamina 5% na proporção de 1:1, na dose de 0,2 ml para cada 100g de peso por via intramuscular; cirurgia de incisão de pele semicircular compreendido entre o olho e orelha de um lado, passando pela protuberância occipital e estendendo-se a mesma altura do outro lado, seguida de remoção circular de 8 mm de diâmetro e 1mm de profundidade na região de calota craniana, utilizando uma broca trefina de 7mm de diâmetro da marca 3i-Implants; implantação dos biomateriais; aplicação do laser de baixa intensidade.

3ª sessão: eutanásia (após 30 dias); avaliação macroscópica; preparo para processamento histológico.

4ª sessão: eutanásia (após 60 dias); avaliação macroscópica; preparo e processamento histológico.

5ª sessão: preparo das lâminas

6ª sessão: avaliação histológica descritiva e análise histomorfométrica

7ª sessão: análise dos resultados.

O procedimento com o Laser foi realizado nos grupos “laser” e biomaterial/laser. O aparelho utilizado foi o “Quantum”, fabricado pela Ecco Fibras Ópticas e Dispositivos Ltda. Trata-se de um laser de diodo infravermelho (GaAlAs –com 808 nm, 120 mW), com registro na ANVISA no 80323310001. Segundo o fabricante, não seria necessária calibragem pela fábrica, pois o aparelho tinha menos de um ano de vida útil. A dose aplicada foi de 100 J/cm², em cinco pontos a cada 24 horas (GERBI et al., 2008; GARCEZ, RIBEIRO, NUÑES, 2012), perfazendo um total de cinco aplicações, que ocorreram sempre no mesmo horário do dia, iniciando a primeira aplicação logo após o procedimento cirúrgico. A caneta Laser foi recoberta por filme PVC, bem justaposto à sua superfície, sem formar rugosidades, evitando assim a difusão do Laser, além disso, foi aplicado de forma perpendicular e em contato com a superfície a ser irradiada.

As peças cirúrgicas foram enviadas para preparação histológica, fixadas em solução de formol a 10%, por aproximadamente sete dias. Após a fixação, foram descalcificadas, com ácido nítrico 5%, por dois dias. Os cortes macroscópicos para obtenção das lâminas foram realizados por um mesmo pesquisador por meio de cortes na região anterior aos olhos (focinho) e lateralmente às orelhas; além desses cortes, também foi realizado um corte frontal – no sentido de preservar apenas a região superior do cérebro e o crânio –, e um corte axial perpassando o meio do defeito. Após isso, as peças foram desidratadas e incluídas em parafina para posteriores cortes histológicos de 5µm. Os cortes foram corados por Hematoxilina-Eosina (HE). Todas as análises morfológicas desse estudo foram feitas por três examinadores, previamente calibrados, em fotomicroscópio Eclipse 80i (Nikon Instruments INC - Melville, NY, EUA), com lentes 2x, 4x, 10x, 20x, 40x

e câmera fotográfica acoplada (QImaging MicroPublisher 3.3 Cooled, RTV, Canadá), para o registro das imagens dos cortes teciduais.

O presente projeto de pesquisa foi desenvolvido em ratos referidos do Biotério da Universidade Estadual de Feira de Santana. Os animais foram sacrificados dentro do protocolo internacional explicitado na Revista Nature (SPICER et al, 2012). Todas as áreas defeito/enxerto foram removidas e submetidas a análises histológicas, bem como as submetidas ao laser e também o grupo controle.

Este projeto foi submetido à apreciação do Comitê de Ética para Experimentação em Animais da UEFS, seguindo as normas do referido Comitê, criado pela PORTARIA nº 631/2003, tendo o “parecer favorável” à sua execução, conforme ofício 035/2015, de 21 de dezembro de 2015, no anexo. O projeto de pesquisa foi aprovado pela Resolução CONSEPE 047/2016, em 15 de julho de 2016, da Universidade estadual de Feira de Santana.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados histológicos foram apresentados de forma descritiva, com relação à presença ou ausência de estruturas e componentes teciduais reacionais na interface ou ao redor das partículas do material implantado nos defeitos ósseos produzidos na calvária dos ratos, além da análise histomorfométrica. Ao redor das partículas e na interface dos materiais com o tecido reacional neoformado, analisou-se a presença ou ausência dos seguintes elementos celulares, teciduais e reacionais: a) tecido de granulação / tecido conjuntivo fibroso jovem (TCFJ); b) vasos sanguíneos neoformados; c) fibroblastos; d) osteoblastos e matriz óssea mineralizada (MOM); e) granuloma do tipo corpo estranho (CE); f) macrófagos; g) células gigantes multinucleadas inflamatórias (CGMI).

Um dos pontos mais importantes está em descobrir quais as características físicas e químicas de um biomaterial que determinam se esse, quando implantado em lojas ósseas cirúrgicas, induz a formação de granulomas, tecido de granulação, tecido conjuntivo e/ou tecido ósseo na sua superfície. Quais seriam as razões para alguns materiais permitirem colonização de suas superfícies por fibroblastos, mas não por osteoblastos. As explicações devem passar pelas características físicas e químicas desses produtos (CONSOLARO, 2015).

Além da análise histológica descritiva, foi realizada a análise histomorfométrica dos dados utilizando-se o programa estatístico SAS (SAS Institute, Cary, NC, EUA), com nível de significância fixado em 5%. Foram observados a neoformação óssea, a presença de tecido fibroso e a região da área remanescente. Os dados foram submetidos à ANOVA de 2 fatores, seguida do teste Tukey. Todos os dados apresentaram distribuição normal. Os resultados obtidos a partir desta análise histomorfométrica foram tabulados e tratados estatisticamente pelo Teste de Tukey, que se baseia na amplitude total estudentizada (studentized range), podendo ser utilizado para comparar todo e qualquer contraste entre duas médias de tratamentos. O teste é exato e de uso muito simples quando o número de repetições é o mesmo para todos os tratamentos. Delimitou-se em todos os cortes teciduais microscópicos utilizados, área retangular de 9mm² com a finalidade de analisar e mensurar a quantidade neoformada de osso a partir do preenchimento do defeito ósseo induzido na calvária, sob a objetiva de 4X para todas as medidas.

Por cada espécime eutanasiado no experimento, três lâminas contendo cortes teciduais microscópicos foram preparadas. Três aspectos básicos foram considerados para a elaboração do estudo histomorfométrico de área: 1) a área sem qualquer tecido ou material (área remanescente); 2) a área ocupada pelo osso neoformado (osso); 3) a área ocupada pelos tecidos moles reacionais nas superfícies e intermeios das partículas (tecido fibroso).

Tabela 1 - Médias e desvios-padrão da neoformação óssea, tecido fibroso e área remanescente, aos 30 e 60 dias.

Grupos	30 dias			60 dias		
	Neoformação Óssea (µm ²)	Tecido Fibroso (µm ²)	Área remanescente (µm ²)	Neoformação Óssea (µm ²)	Tecido Fibroso (µm ²)	Área remanescente (µm ²)
A	0,40±0,27 ^{B,C,D}	2,62±0,19 ^{C,D}	16,64±0,24 ^{C,D}	1,00±0,08 ^{C,D}	2,49±0,61 ^C	16,73±0,56 ^{C,D}
B	0,82±0,34 ^{A,C,D}	2,14±0,34 ^{C,D}	16,22±0,56 ^{C,D}	1,10±0,19 ^D	1,87±0,24 ^C	16,71±0,52 ^{C,D}
C	1,30±0,15 ^{A,B}	3,56±0,4 ^{A,B}	7,15±0,43 ^{A,B}	1,86±0,20 ^A	3,23±0,26 ^{A,B}	7,32±0,45 ^{A,B}
D	1,33±0,22 ^{A,B}	3,12±0,27 ^{A,B}	7,13±0,30 ^{A,B}	2,40±0,18 ^{A,B}	2,72±1,05	7,23±0,23 ^{A,B}

Letras diferentes dentro da mesma coluna significam diferença estatística entre os grupos avaliados

Aos 30 dias, observou-se maior neoformação óssea para os grupos C ($1,30 \pm 0,15 \mu\text{m}^2$) e D ($1,33 \pm 0,22 \mu\text{m}^2$), os quais não apresentaram diferença estatística entre si ($p=0,99$). O grupo A foi o que apresentou menor neoformação óssea ($0,40 \pm 0,27 \mu\text{m}^2$), apresentando diferença estatística para o grupo B ($p=0,001$), grupo C ($p=0,001$), e grupo D ($p=0,001$). Aos 60 dias de neoformação óssea, os dois fatores de estudo, laser ($p=0,001$) e biomaterial ($p=0,001$) não apresentaram diferenças estatísticas. A interação entre estes dois fatores também não apresentou diferença estatística ($p=0,02$).

Na avaliação aos 30 dias, o tecido fibroso não apresentou diferença estatística para o tratamento entre os grupos A e B e os grupos C e D ($p \leq 0,05$). Para o tecido fibroso, aos 60 dias, os dois fatores de estudo, laser ($p=0,0013$) e o biomaterial ($p=0,017$) não apresentaram diferenças estatísticas. A interação entre os fatores (laser X biomaterial) também não apresentou diferença estatística ($p=0,008$).

A avaliação da área remanescente, aos 30 dias, apresentou diferença estatística para o tratamento entre os grupos A e B com os grupos C e D ($p \geq 0,05\%$). Entretanto não houve interação significativa entre os fatores de estudo laser X biomaterial ($p=0,053$). Observa-se maior área remanescente para o grupo A ($16,64 \pm 0,24 \mu\text{m}^2$) e B ($16,22 \pm 0,56 \mu\text{m}^2$) os quais não apresentam diferenças estatísticas entre si. Assim como os grupos C ($7,15 \pm 0,43 \mu\text{m}^2$) e D ($7,13 \pm 0,30 \mu\text{m}^2$). Aos 60 dias, os grupos A e B apresentaram maior área remanescente ($16,73 \pm 0,56 \mu\text{m}^2$ e $16,71 \pm 0,52 \mu\text{m}^2$, respectivamente), sendo estatisticamente diferente entre os demais grupos.

Neste presente estudo, observou-se que o grupo controle, onde apenas foi feito o defeito ósseo, apresentou-se, após 30 dias, ao longo das margens do corte, uma discreta área em forma de lingueta com neoformação óssea. A maior parte da ferida estava coberta de periósteo. Comparando com o grupo B, onde foi feito o defeito associado à aplicação do laser, a neoformação óssea foi, aos 30 dias, mais que o dobro em relação ao grupo controle. Isto demonstra uma real efetividade do Laser de baixa potência na aceleração da neoformação óssea. Ademais, nos grupos onde houve a colocação do Bio-oss®, após a análise histológica, havia a presença das partículas, de granulomas de corpo estranho e não havia neoformação óssea entre as partículas. Apenas sobre a superfície e em torno do defeito cirúrgico, próximo às linguetas.

Se o uso do laser somente aplicado ao defeito cirúrgico aumentou de maneira exponencial a neoformação óssea, com relação ao grupo controle, ao compararmos esta neoformação óssea com os grupos que foram associados às partículas de biomaterial, não houve diferença estatisticamente significativa. Neste estudo, o uso do laser associado ao biomaterial só apresentou um ligeiro aumento da neoformação óssea em relação ao grupo em que foi utilizado somente o biomaterial.

CONSIDERAÇÕES FINAIS (ou Conclusão)

Dentro dos limites deste estudo, conclui-se que o laser acelerou o processo de neoformação óssea podendo ser considerado uma modalidade terapêutica a ser utilizada em cirurgias ósseas reconstrutivas e, ao ser associada ao biomaterial, promove melhora na neoformação óssea.

REFERÊNCIAS

OLIVEIRA, R.C.; SICCA, C.M.; SILVA, T.L. et al. 2003. Avaliação histológica e bioquímica da resposta celular ao enxerto de osso cortical bovino previamente submetido a altas temperaturas. Efeito da temperatura no preparo de enxerto xenógeno. Rev. Bras. Ortoped, v. 38, n. 9, p. 551-560.

CARVALHO, P.S.P.; BASSIA, A.P.F.; VIOLIN, L.A. 2004. Revisão e Proposta de nomenclatura para os biomateriais". Implant News. v.1, n. 3, p.255-259.

CONSOLARO, A. 2015. Inflamação e reparo; um sílabo para a compreensão clínica e implicações terapêuticas. 2ed. Maringá, Dental Press.

BATISTA, J. D.; SARGENTI-NETO, S.; DECHICHI, P.; ROCHA, F. S.; PAGNONCELLI, R. M. 2015. Low-level laser therapy on bone repair: is there any effect outside the irradiated field? Lasers in Medical Science, v. 30, n. 5, p. 1569–1574.

ACAR, A. H.; YOLCU, Ü.; ALTINDIŞ, S.; et al. 2016. Bone regeneration by low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound therapy in the rabbit calvarium. *Archives of Oral Biology*, v. 61, p.60–65.

TEDESCO, T. K.; NOBA, C.; MOURA-NETTO, C.; MELLO-MOURA, A. C. V.; GIMENEZ, T. 2017. Laser for bone healing after oral surgery: systematic review. *Lasers in Medical Science*, v. 33, n. 3, p. 667–674. *Lasers in Medical Science*.

TSONIS, P.A. 2002. Regenerative Biology: The emerging field of tissue repair and restoration. *Differentiations*, v. 70, n. 8, p.397-409.

SCHMITT, C. M.; DOERING, H.; SCHMIDT, T.; et al. 2013. Histological results after maxillary sinus augmentation with Straumann® BoneCeramic, Bio-Oss®, Puros®, and autologous bone. A randomized controlled clinical trial. *Clinical Oral Implants Research*, v. 24, n. 5, p. 576–585.

SCHIMMING, R.; SCHELZEISEN, R. 2004. Tissue engineered bone for maxillary sinus augmentation. *J Oral Maxillofac Surg.*, v.62, n.6, p.724-729, June.

ROGERS, G.F.; GREENE, A.K. 2012. Autogenous Bone Graft: Basic Science and Clinical Implications. *The Journal of Craniofacial Surgery*. Jan; 23(1): 323-7

HOEXTER, D.L. 2002. Bone Regeneration Graft Materials. *The Journal of Oral Implantology*. 28(6):401-411

HALLMAN, M. 2008. Thor a Bone Substitutes and Growth Factors as na Alternative/Complement to Autogenous Bone for Grafting in Implant Dentistry. *Periodontology 2000*. 47 (172-192)

ZEIN, R.; SELTING, W.; BENEDICENTI, S. 2017. Effect of Low-Level Laser Therapy on Bone Regeneration During Osseointegration and Bone Graft. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 35, n. 12, p. 649–658.

PINHEIRO, A.L.B.; SOARES, L.G.B., BARBOSA, A.F.S. RAMALHO, L.M.P. DOS SANTOS, J.N. 2012. Does Led Phototherapy Influencethe Repair of Bone Defects Grafted with Mta Bone Morphogenetic Proteins, and Guided Bone Regeneration? A Description of the Repair Process on Rodents. *Lasers in Medical Science*. (1-12)

SPICER PP, KRETLOW JD, YOUNG S, JANSEN JÁ, KASPER, FK, MIKOS, AG. 2012. Evaluation of Regeneration Using the Rat Critical Size Calvarial Defect. *Nature protocols*, 7(10): 1918-29.

GERBI, M.E.M.M.; PINHEIRO A.L.B.; RAMALHO,L.M.P. 2008. Efect of IR Laser Photobiomodulation on the Repair of Bone Defects Grafted with Organic Bovine Bone. *Lasers in Medical Science*, v 23, n.3,p 313-317.

GARCEZ, A.S.; RIBEIRO,M.S.;NÚÑEZ,S.C. 2012. *Laser de Baixa Potência: Princípios Básicos e Aplicações Clínicas na Odontologia*. 1ªEd. São Paulo:editora Elsevier,259p