



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

ALINE CAVALCANTI PEREIRA DA SILVA

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO REPARO ÓSSEO DE FRATURAS TIBIAIS
PROVOCADAS EM COELHOS E MANTIDAS COM FIXAÇÃO SEMI-RÍGIDA,
TRATADAS COM OU SEM FOTOTERAPIA LASER OU LED, E MTA**

Salvador

2015

ALINE CAVALCANTI PEREIRA DA SILVA

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO REPARO ÓSSEO DE FRATURAS TIBIAIS
PROVOCADAS EM COELHOS E MANTIDAS COM FIXAÇÃO SEMI-RÍGIDA,
TRATADAS COM OU SEM FOTOTERAPIA LASER OU LED, E MTA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Antônio Luiz Barbosa Pinheiro, PhD
Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz Guilherme P. Soares

Salvador

2015

S586 Silva, Aline Cavalcanti Pereira da

Avaliação histológica do reparo ósseo de fraturas tibiais provocadas em coelhos e mantidas com fixação semi-rígida, tratadas com ou sem fototerapia laser ou LED, e MTA / Aline Cavalcanti Pereira da Silva . – Salvador, 2015.

54 f.

Orientador: Prof. Antônio Luiz Barbosa Pinheiro, PhD

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Guilherme Pinheiro Soares

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.
Instituto de Ciências da Saúde, 2015.

1. Laser. 2. LED. 3. MTA. I. Pinheiro, Antônio Luiz Barbosa. II. Soares, Luiz Guilherme Pinheiro. III. Universidade Federal da Bahia. IV. Título.

CDU 616.314:621.375.826

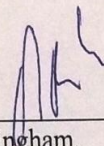
ALINE CAVALCANTI PEREIRA DA SILVA

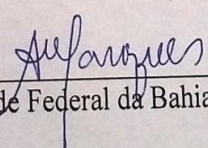
**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO REPARO ÓSSEO DE FRATURAS TIBIAIS
PROVOCADAS EM COELHOS E MANTIDAS COM FIXAÇÃO SEMI-
RÍGIDA, TRATADAS COM OU SEM FOTOTERAPIA LASER OU LED, E
MTA**

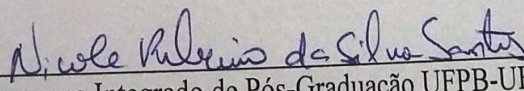
Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em
Biotecnologia pelo Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 16 de junho de 2015.

BANCA EXAMINADORA:

Antônio Luiz Barbosa Pinheiro – Orientador 
Doutor em Clinical Dentistry pela University of Birmingham,
Reino Unido.
Universidade Federal da Bahia.

Aparecida Maria Cordeiro Marques 
Doutora em Odontologia pela Universidade Federal da Bahia,
UFBA, Brasil.
Universidade Federal da Bahia.

Nicole Ribeiro da Silva Santos 
Doutora em Odontologia pelo Programa Integrado de Pós-Graduação UFPB-UFBA,
UFPB-UFBA, Brasil.
Universidade do Estado da Bahia.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha avó, **Nadege Cavalcanti Farias** (in memoriam) por todo o seu amor em todos os momentos de minha vida, sempre se fazendo presente, mesmo que ausente.

Aos meus pais, **Almir Pereira da Silva** e **Kátia Regina Cavalcanti Farias**, pelo apoio incondicional, incentivo constante e por serem exemplos de caráter e amor ao próximo, sempre mostrando que o estudo é o meio mais gratificante para vitória.

Aos meus irmãos e ídolos, **Silvia Cavalcanti Fleming** e **Alexandre Cavalcanti Pereira da Silva**, pelos conselhos e risadas nos momentos que mais precisei, pela oportunidade de convívio e amor nesta vida, que se repita eternamente.

Ao meu marido, **Rafael Oliveira**, por ser meu porto-seguro, meu companheiro, enxugando minhas lágrimas e vibrando com minhas vitórias, sempre ao meu lado.

Ao meu grande exemplo, Dr. **Luiz Guilherme Pinheiro**, que me acolheu como aprendiz e amiga, se tornando um parceiro e alicerce de todas as horas, conselheiro fiel, amigo para a vida toda.

Ao meu orientador, Prof. **Antônio Luiz Barbosa Pinheiro**, que confiou em mim como aluna e orientada, sempre disponível e com grandes soluções.

AGRADECIMENTOS

À Profa. **Aparecida Marques**, pelo apoio, por me acolher como aluna desde o primeiro dia que nos conhecemos.

Ao Prof. **Jean Nunes**, pela ajuda na construção e execução deste trabalho, sempre disponível e atencioso.

À Profa., **Nicole Ribeiro**, sempre disponível para acrescentar nas nossas pesquisas, com sua experiência e aconselhamento, nos momentos de maior necessidade.

Às minhas **colegas de Mestrado**, obrigada por todos os momentos vividos durante esses dois anos, em especial a **Maiana Mattos** e **Diana Matos**, pelo companheirismo e parceria, amigas que levo para toda a vida.

Aos **estagiários do Centro de Biofotônica da FOUFBA**, em especial **Anna Paula Lima** e **Bruno Luiz Ribeiro**, pela imensa colaboração e apoio, imprescindíveis à realização das atividades.

À Médica Veterinária, **Vanessa Macedo**, pela disponibilidade, parceria e apoio durante toda a pesquisa.

A todos os **professores do Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia**, que colaboraram para minha formação acadêmica e profissional.

Aos **funcionários da FOUFBA**, que de maneira direta ou indireta contribuíram para realização deste trabalho.

Ao **CNPq** pela colaboração científica e financeira, apoiando às atividades acadêmicas e o desenvolvimento de profissionais cada vez mais capacitados.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste trabalho. Muito Obrigado

DA SILVA, A. C. P. Avaliação histológica do reparo ósseo de fraturas tibiais provocadas em coelhos e mantidas com fixação semi-rígida, tratadas com ou sem fototerapia Laser ou LED, e MTA. 54f. 2015. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia.

RESUMO

Ao lado dos biomateriais, as fototerapias Laser e LED têm mostrado resultados positivos como terapias auxiliares no processo de reparo ósseo, especialmente quando envolvem grandes perdas de tecido. O objetivo deste estudo foi avaliar, através da análise histológica por microscopia de luz, a influência da fotobiomodulação Laser ou LED sobre o processo de reparação de fraturas completas em tíbias de coelhos, tratadas com fixação semi-rígida (fio de aço), com ou sem implante de MTA. 21 coelhos *Oryctolagus* foram aleatoriamente divididos em sete grupos de três animais. Após anestesia geral, fraturas completas foram criadas com disco carborundum. Os animais dos outros grupos (I -VI) a fratura completa foi criada e estabilizado com a fixação semi-rígida. Nos Grupos II, V e VI a fratura foi preenchida por coágulo sanguíneo e implante de MTA, antes da fixação semi-rígida. Nos Grupos III e V a fratura foi preenchida por coágulo sanguíneo e irradiada com Laser ($\lambda = 780 \text{ nm}$, $P = 70 \text{ mW}$, CW, $\Phi = 0,04 \text{ cm}^2$, $20,4 \text{ J/cm}^2$, dividida em 4 pontos de $5,1 \text{ J/cm}^2$ por sessão, $t = 300\text{s}$, $142,8 \text{ J/cm}^2$ por tratamento). Nos Grupos IV e VI a fratura foi preenchida por coágulo sanguíneo e irradiada com LED ($\lambda = 850 \pm 10 \text{ nm}$, $P = 150 \text{ mW}$, CW, $\Phi = 0,5 \text{ cm}^2$, $20,4 \text{ J/cm}^2$ por sessão, $t = 64 \text{ s}$, $142,8 \text{ J/cm}^2$ por tratamento). Os protocolos de irradiação Laser e LED foram aplicados imediatamente após a cirurgia e repetidos a cada 48 horas durante 15 dias. A morte dos animais ocorreu no 30º dia pós-operatório, através de overdose de anestesia geral. Após a remoção dos espécimes, as amostras foram rotineiramente processadas, coradas e avaliadas por microscopia de luz. Histologicamente, observou-se que nos grupos implantados com MTA e irradiados com Laser ou LED, as fraturas foram preenchidas por um osso trabecular mais maduro e organizado, quando comparados com outros grupos sem esta associação. Concluiu-se que a fotobiomodulação Laser ou LED foram eficazes na melhoria do processo de reparação óssea de fraturas completas na tíbia de coelhos, submetidos ou não a implante de MTA.

Palavras-chave: Reparo ósseo, Fototerapia Laser, Fototerapia LED, MTA

DA SILVA, A. C. P. Histological bone healing of tibial fractures caused in rabbits and maintained with semi- rigid fixation, treated with or without laser or LED phototherapy, and MTA. 54f. 2015. Master Dissertation – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia.

ABSTRACT

Beside the biomaterials, Laser and LED phototherapies has shown positive results as auxiliary therapies on bone repair process, especially when they involve large tissue losses. The aim of this study was to evaluate, through histological analysis using light microscopy, the influence of laser or LED photobiomodulation on the bone repair process of complete fractures in tibia of rabbits treated with semirigid fixation (steel wire), with or without MTA implant. 21 *Oryctolagus* rabbits were randomly divided into seven groups of three animals each. After general anesthesia, complete fractures were created with carborundum disc. In the animals of the groups (I -VI) complete fracture was created and stabilized with semirigid fixation. In Groups II, V and VI fracture was filled by blood clot and MTA implant before semirigid fixation. In Groups III and V the fracture was filled by blood clot and further irradiated with Laser ($\lambda=780\text{nm}$, $P=70\text{mW}$, CW, $\Phi = 0,04 \text{ cm}^2$, $20,4 \text{ J/cm}^2$ divided into 4 points of $5,1 \text{ j/cm}^2$ per session, $t=300\text{s}$, $142,8 \text{ J/cm}^2$ per treatment). In Groups IV and VI the fracture was filled by blood clot and further irradiated with LED ($\lambda=850 \pm 10\text{nm}$, $P=150\text{mW}$, CW, $\Phi= 0,5 \text{ cm}^2$, $20,4 \text{ J/cm}^2$ per session, $t =64 \text{ s}$, $142,8 \text{ J/cm}^2$ per treatment). The irradiation protocols of both Laser and LED were applied immediately after surgery and repeated every 48 hours for 15 days. Animals death occurred on the 30th postoperative day through general anesthesia overdose. After specimens removal, the samples were routinely processed and stained and evaluated by light microscopy. Histologically, was observed that on groups implanted with MTA and further irradiated with Laser or LED phototherapies, the fractures were filled by a most mature and organized trabecular bone when compared with other groups without this association. It was concluded that the laser or LED photobiomodulation were effective in improving the bone repair process of fractures on tibia of rabbits submitted or not to MTA implant.

Key-words: Bone repair , Phototherapy Laser, LED Phototherapy , MTA

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 -	Fratura óssea confeccionada, preenchida por MTA. (DA SILVA, 2015).	27
Figura 02 -	Fratura óssea, preenchida por MTA, fixada com fio de aço (FISR) (DA SILVA, 2015).	27
Figura 03 -	Aplicação do Laser, 2 regiões adjacentes a área de fratura - 20,4 J/cm ² por sessão (DA SILVA, 2015).	28
Figura 04 -	Aplicação do LED, no ponto da fratura - 20,4 J/cm ² por sessão (DA SILVA, 2015).	28
Figura 05 -	Aparelho utilizado no experimento para realização da fototerapia	29
Figura 06 -	Aparelho utilizado no experimento para realização da fototerapia	30
Figura 07 -	Aspecto macroscópico do defeito cirúrgico parcialmente preenchido por tecido branco leitoso que se projeta na superfície óssea (DA SILVA, 2015).	33
Figura 08 -	Aspecto macroscópico do defeito cirúrgico preenchido por tecido branco acinzentado (DA SILVA, 2015).	34
Figura 09 -	Fotomicrografia do grupo experimental FISR mostrando que a fratura encontrou-se parcialmente preenchida por um trabeculado ósseo interconectante com linhas basófilicas e osteoblastos em superfície, observou-se um tecido medular de permeio com discreta inflamação crônica. H&E (DA SILVA, 2015).	35
Figura 10 -	Fotomicrografia do grupo experimental FISR mostrando	36

que a fratura encontrou-se parcialmente preenchida, exibindo discreta formação colagênica madura no tecido ósseo neoformado. Picosírius (DA SILVA, 2015).

- Figura 11 - Defeito cirúrgico cuja região central mostra ausência de osso neoformado e presença de material eosinofílico irregular e com partículas enegrecidas. Observar na parte inferior, osso neoformado aprisionando material anfófilo. H&E (DA SILVA, 2015). 37
- Figura 12 - Observar colágeno maduro preenchendo todo o osso neoformado na parte inferior do defeito cirúrgico. Picosírius (DA SILVA, 2015). 37
- Figura 13 - Fotomicrografia do grupo experimental FISR+LASER mostrando que a fratura encontrou-se parcialmente preenchida por um trabeculado ósseo interconectante espesso direcionando-se a medula óssea. H&E (DA SILVA, 2015). 38
- Figura 14 - Fotomicrografia do grupo experimental FISR+LASER mostrando que a fratura encontrou-se parcialmente preenchida por um trabeculado ósseo interconectante, exibindo moderada formação de colágeno. Picosírius (DA SILVA, 2015). 38
- Figura 15 - Defeito cirúrgico quase que completamente preenchido por osso neoformado representado por trabéculas ósseas interconectantes com osteoblastos em superfície. Notar tecido estromal com discreta inflamação crônica, bem como, à direita, osso remanescente do leito cirúrgico. H&E. (DA SILVA, 2015). 39
- Figura 16 - Osso neoformado maduro preenchendo todo o defeito ósseo. Observar similaridade com osso remanescente à direita. Picosírius. (DA SILVA, 2015). 40

- Figura 17 - Observar mais da metade do defeito cirúrgico preenchido por osso neoformado, composto por trabéculas ósseas espessas e interconectantes. Na parte superior observa-se material granular anfófilo permeado por partículas enegrecidas. H&E. (DA SILVA, 2015). 41
- Figura 18 - Osso neoformado preenchido por colágeno maduro, notar similaridade com colágeno remanescente do leito cirúrgico. Picosírius. (DA SILVA, 2015). 41
- Figura 19 - Defeito cirúrgico com terço inferior preenchido por osso neoformado trabecular, não espesso e interconectantes. Observar o terço superior preenchido por material granular eosinofílico, permeado por partículas enegrecidas e várias áreas osteóides H&E. (DA SILVA, 2015). 42
- Figura 20 - Colágeno maduro destacando o osso neoformado e áreas de osteóide e fibrose. Picosírius. (DA SILVA, 2015). 43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Tecido Ósseo	14
2.2 Fraturas Ósseas	16
2.3 Enxertos Ósseos	18
2.4 Fototerapia Laser/LED	20
3. PROPOSIÇÃO	23
3.1 Objetivo Geral	23
3.2 Objetivos Específicos	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 Respaldo Ético da Pesquisa	24
4.2 Delineamento da Pesquisa	24
4.3 Configuração da Amostra	24
4.4 Organização dos Grupos	25
4.5 Técnica Cirúrgica	25
4.6 Manipulação do Enxerto	26
4.7 Fototerapia	28
4.8 Pós-Operatório	30
4.9 Morte dos Animais e Processamento Histológico	31
4.10 Estudo Histomorfológico	31
5. RESULTADOS	33
5.1 Resultado do Exame Macroscópico	33
5.2 Resultado do Exame Microscópico	34
5.2.1 Aspectos Gerais	35

5.2.2 Grupo I (FISR)	35
5.2.3 Grupo II (FISR+Enxerto)	36
5.2.4 Grupo III (FISR+Laser)	38
5.2.6 Grupo IV (FISR+LED)	39
5.2.7 Grupo V (FISR + Enxerto + Laser)	40
5.2.8 Grupo VI (FISR+ Enxerto + LED)	42
6. DISCUSSÃO	44
7.CONCLUSÃO	49
8. REFERÊNCIAS	50
ANEXO	54

1. INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um tipo de tecido organizado, que exibe um potencial de regeneração surpreendente, capaz de restaurar perfeitamente sua estrutura original e suas propriedades mecânicas, quando agredido. Este tecido é uma forma especializada de tecido conjuntivo que, como outros tecidos deste tipo, é constituído por células e matriz extracelular (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2013; PINHEIRO *et al.*, 2012b).

As fraturas ósseas complexas, com perda de tecido, causadas principalmente por traumas, representam um grave problema de saúde pública, não só pela incapacitação das vítimas para as atividades de rotina, mas também pela dificuldade na estabilização e imobilização dos cotos ósseos, necessárias para regeneração completa. Nesse sentido, as técnicas utilizadas são as contenções com fios de aço (fixação semi-rígida) que são mais acessíveis e disponíveis, ou miniplacas de titânio (fixação rígida) que conferem maior estabilidade mas são menos acessíveis e muitas vezes indisponíveis nos hospitais públicos (LOPES *et al.*, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2012b).

Além disso, as perdas ósseas podem ocorrer devido a patologias ou como consequência de procedimentos cirúrgicos, representando um desafio para a área médica e odontológica. Pois, apesar de sua grande capacidade regenerativa, existem certas condições que impedem ou previnem o reparo ósseo, como falhas de vascularização, instabilidade mecânica, no caso de fraturas ósseas completas, e invasão de tecidos competidores com alta atividade proliferativa (KOURKOU MELIS *et al.*, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2011a).

Diante das dificuldades na recuperação do tecido ósseo lesionado, há necessidade de lançar mão de técnicas auxiliares para estimular o processo de reparação, dentre as quais, a mais eficaz é o enxerto ósseo autógeno. Essa técnica possui as propriedades desejadas de biocompatibilidade, osteoindução e osteocondução, porém, precisa de mais um tempo cirúrgico para retirar osso sadio do indivíduo. Por isso, têm sido propostas várias técnicas para o tratamento de defeitos ósseos e fraturas, incluindo a utilização de novos materiais para enxertos com propriedades similares ao osso, membranas e, mais recentemente, as fototerapias, que possuem como vantagem a possibilidade de associação às demais técnicas, potencializando seus efeitos benéficos. Estudos mostram que o MTA apresenta boa resposta biológica com resultados promissores, principalmente por não ser citotóxico e ser osteoindutor (CARVALHO *et al.*, 2011; SOUSA *et al.*, 2013).

O uso dos Laseres e dos LEDs, biomodulando o processo reparo ósseo, através de suas propriedades fotoquímicas e fotobiológicas, tem sido estudado por pesquisadores em todo o mundo. Sabe-se que as fototerapias Laser e LED estimulam a vasodilatação, diferenciação celular, resposta imunológica, secreção de fatores de crescimento, proliferação celular, entre muitos outros aspectos relacionados, com o objetivo de proporcionar ao paciente submetido à cirurgia, uma maior rapidez na cicatrização óssea, menor desconforto pós-operatório, menor quadro de edema pós-cirúrgico e melhor cicatrização tecidual com aceleração no tempo de recuperação (SOUSA *et al.* 2013; SOARES *et al.*, 2015).

O objetivo deste trabalho foi avaliar histologicamente, o reparo ósseo em fraturas completas em tíbia de coelhos da linhagem *Oryctolagus*, estabilizadas por fixação interna semi-rígida (FISR), irradiadas ou não com Laser ou LED infravermelhos, associados ou não ao uso de enxerto com MTA.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é um tecido mesenquimal constituído de 33% de matriz orgânica, que inclui 28% de colágeno tipo I e o restante da matriz orgânica formada por proteínas não colagênicas, que se dispõem de maneira a formar os ossos, as estruturas híbridas e resistentes que constituem o esqueleto. Apesar do aspecto aparentemente inerte, os ossos crescem, são remodelados, e se mantêm ativos durante toda a vida do organismo. Quando lesado, como em fraturas, é capaz de sofrer reparo, fenômeno que demonstra sua permanente vitalidade. A homeostase do tecido ósseo é controlada por fatores mecânicos e humorais, locais e gerais (FARLAY *et al.*, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2012b; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

O esqueleto suporta todo o arcabouço do corpo, desempenhando várias funções importantes ao nosso organismo, atuando como ponto de fixação para a maioria dos músculos, dando movimento e sustentação aos tecidos moles. O esqueleto também protege as vísceras vulneráveis como, por exemplo, o crânio para o cérebro; a coluna vertebral, para a medula espinhal, e a caixa torácica para o coração e os pulmões. O osso, na sua totalidade, serve também para duas funções adicionais que são a de tecido hematopoiético do tipo mielóide para a produção de eritrócitos, granulócitos e plaquetas e como estoque de reserva para o cálcio, fósforo, magnésio e sódio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

O osso é composto de células dispersas na matriz extracelular, a qual possui duas fases: orgânica e inorgânica. A orgânica ou osteóide é composta de colágeno e glicosaminoglicanos, e a inorgânica ou mineral que consiste primariamente de cristais de fosfato de cálcio. As células do osso incluem os osteoblastos ou células formadoras de osso, os osteoclastos ou células destruidoras de osso, e os osteócitos ou células de manutenção óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Os ossos são ricamente supridos por vasos sanguíneos. Basicamente dois grupos de artérias e arteríolas são responsáveis pela nutrição: as artérias periosteais e as medulares. As periosteais ramificam-se no perióstio, emitem inúmeros pequenos ramos, que penetram nos canais de Volkman superficiais e, por fim, atingem os canais de Havers. Outros ramos penetram nas extremidades dos ossos longos para suprir o osso esponjoso e sua medula óssea (KOURKOUVELIS *et al.* 2010; EINHORN *et al.* 2015).

O endósteo e o periósteo constituem, respectivamente, as superfícies internas e externas dos ossos, sendo recobertas por células osteogênicas e tecido conjuntivo. As principais funções do endósteo e do periósteo são a nutrição do tecido ósseo e o fornecimento de novos osteoblastos, para o crescimento e recuperação do osso (FARLAY *et al.*, 2010).

O processo de cicatrização óssea é caracterizado por três fases: inflamatória, reparadora e remodeladora. A inflamatória é caracterizada pela formação de um coágulo sanguíneo, que envolve as superfícies ósseas no local da lesão, estendendo-se pelo periósteo e cavidades medulares próximas, acompanhadas de edema de intensidade variada. Instala-se, assim, um processo inflamatório agudo com grande mobilização de neutrófilos e macrófagos, provocados pela liberação de substâncias quimiotáticas (histamina e serotonina, por exemplo) no local lesionado. A fagocitose tem como objetivo a remoção do coágulo e dos osteócitos mortos que surgem nas superfícies ósseas lesionadas (KOURKOU MELIS *et al.*, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2012a).

Imediatamente após a fase inflamatória, inicia-se a fase reparadora caracterizada pelo aparecimento de um grande número de fibroblastos, produtores de colágeno e responsáveis pela formação de um calo fibroso, no qual as fibras colágenas envolvem a região lesionada. À medida que a ação dos macrófagos prossegue, reabsorvendo o coágulo e o tecido ósseo lesionado, surge gradativamente uma nova rede capilar, oriunda das células endoteliais remanescentes dos vasos rompidos e das células mesenquimais indiferenciadas, que invade a região do coágulo juntamente com fibroblastos e osteoblastos, para formar rapidamente um novo tecido ósseo no local, por meio de um processo de ossificação intramembranosa ou endocondral, resultando em um osso imaturo. O calo ósseo tem uma textura própria, sendo mais celular e menos mineralizado, indicando a rapidez do processo de ossificação e justificando a denominação de osso imaturo (LOPES *et al* 2010; PINHEIRO *et al* 2013).

Na fase remodeladora, o calo ósseo passa por uma série de processos de reabsorção e neoformação até que a região lesionada retorne a morfologia que possuía antes da lesão. Os osteoclastos removem os excessos de material do calo ósseo, restabelecendo as cavidades ósseas que existiam e reconstróem os sistemas de Havers e o trabeculado de osso esponjoso na mesma disposição anterior à lesão (BURCHARDT, 1989; FARLAY *et al*, 2010).

Em humanos, com metabolismo ósseo normal, o período de remodelamento é de aproximadamente de 100 dias no osso cortical e 200 dias no osso trabecular. No osso cortical

o processo de reabsorção dura 30 dias (em humanos), formando-se um túnel criado por osteoclastos. Em seguida, chegam os pré-osteoblastos que, diferenciando-se em osteoblastos, sintetizam a matriz que, após 15 a 20 dias, sofre mineralização. O período de formação dura em média 90 dias, durante o qual o osso novo preenche o túnel. No osso trabecular humano, o processo de reabsorção dura ao redor de 43 dias. Durante um período de sete dias, os pré-osteoblastos migram para a cavidade de reabsorção e se diferenciam em osteoblastos. A formação de matriz então começa e dura 15 dias antes do início da mineralização. A cavidade de reabsorção é então preenchida com osso novo (PINHEIRO *et al.*, 2012a; SOARES *et al.*, 2013).

O remodelamento ósseo é um fenômeno que ocorre nas superfícies do periósteo, endósteo, canais de Havers e trabéculas. O crescimento do osso ocorre por aposição, o que implica na adição de camadas de matriz e células em superfícies livres do tecido mineralizado (KOURKOUHELIS *et al.*, 2010; EINHORN *et al.*, 2015).

2.2. FRATURAS ÓSSEAS

As fraturas ósseas são caracterizadas pela perda de continuidade de um segmento ósseo, contudo existe uma combinação entre a lesão óssea e a lesão das partes moles, por isso entende-se que a denominação mais adequada para este acontecimento deveria ser “complexo fraturário”. A lesão das partes moles é tão importante para o tratamento e prognóstico quanto à descontinuidade do osso, pois é ela que representa o importante fator da vascularização e, em última análise, o fator biológico da cura (HOLSTEIN *et al.*, 2013; EINHORN *et al.*, 2015).

A fratura pode ser completa (ambas as corticais rompidas) ou incompleta (apenas uma cortical rompida); favorável ou desfavorável; simples ou cominutiva (vários fragmentos); exposta (fratura se comunica com a superfície da pele) ou fechada (TAJALI *et al.*, 2010; EINHORN *et al.*, 2015).

A consolidação óssea pode ocorrer de duas formas: consolidação primária e secundária. A consolidação primária consiste na cura da fratura sem a formação de um calo ósseo, que é constituído por tecido ósseo imaturo que une provisoriamente às extremidades do osso fraturado. Enquanto que na consolidação secundária ocorre a união de um fragmento ósseo ao outro através de uma ponte de calo ósseo. Porém, devido à diversidade de fatores

envolvidos, tanto locais quanto sistêmicos, celulares e moleculares, esse processo pode ser dificultado pela diminuição do suprimento sanguíneo, instabilidade mecânica, alta proliferação de outros tecidos locais, condição sistêmica do indivíduo, etc. Essas características tornam o processo de consolidação óssea objeto de estudos contínuos, na tentativa de superar as dificuldades naturais e, ainda, melhorar a qualidade do osso neoformado e acelerar a finalização do processo de reparo ósseo de fraturas (HOLSTEIN *et al.*, 2013; EINHORN *et al.*, 2015).

O tratamento de fraturas ósseas baseia-se nos princípios que regem a traumatologia: redução, contenção, imobilização e controle da infecção. Para tanto, podemos utilizar meios cirúrgicos ou conservadores, dependendo do tipo de fratura a ser tratado. Para isso dispomos de métodos cruentos e incruentos, através de fixação interna ou fixação externa, sendo importante a escolha do método, já que o processo de consolidação das fraturas envolve contato ósseo entre os fragmentos, estabilidade e suprimento sanguíneo adequado para que não seja prejudicado (LOPES, 2010; HOLSTEIN *et al.*, 2013).

O método incruento é uma forma de tratamento conservador onde em casos de fraturas simples e favoráveis utiliza-se apenas a imobilização após a redução da fratura, já tratamento cruento possibilita a redução e contenção dos cotos de fratura em um só tempo cirúrgico, através da osteossíntese com fios de aço, miniplacas, dentre outros, independentemente do número de traços de fraturas, da localização e do deslocamento dos fragmentos (LOPES, 2010; PINHEIRO; GERBI, 2010b).

A redução aberta, seguida de Fixação Interna Rígida (FIR) proporciona maior segurança, estabilidade, diminuindo o índice de complicações pós-operatórias e possibilitando o rápido retorno do paciente às suas funções, porém tem um custo elevado não atingindo a grande parte da população. Já a osteossíntese com fio de aço ou Fixação Interna Semi-Rígida (FISR), tem baixo custo, sendo indicada nos casos de fratura com pouco deslocamento, nem fragmentos intermediários interpostos a fragmentos maiores, além da ausência de grandes rotações, apresentando como desvantagem principal a possibilidade de instabilidade óssea (LOPES, 2010; CARVALHO *et al.*, 2011; PINHEIRO *et al.*, 2012b).

Assim, atualmente existe a necessidade de mais estudos com relação ao uso do fio de aço na FISR, devido ao seu maior alcance na população, buscando consequentemente a redução das suas desvantagens. A principal contra-indicação da FIR, além do seu alto custo é

segundo a literatura, com relação a larga incidência de infecções quando se utiliza as miniplacas, devido à maior quantidade de metal na sua constituição do que nos fios de aço. Ou seja, dificultando assim a cicatrização óssea e o retorno do paciente as atividades de rotina (LOPES, 2010; ACIOLE, 2010).

2.3. ENXERTOS ÓSSEOS

Atualmente a necessidade de recuperar falhas ou defeitos ósseos perdidos, é um dos problemas que mais preocupam os profissionais de saúde. O uso de substitutivos ósseos naturais ou sintéticos, têm-se tornado rotina, por ser uma outra opção de método para tratamentos de defeitos ósseos, principalmente por aqueles que atuam cirurgicamente ao nível do tecido ósseo, nas áreas de implantodontia, periodontia, cirurgia buco-maxilo-facial e cirurgia plástica corretiva (PINHEIRO *et al.*, 2012a).

A escolha de enxerto de osso é afetada por fatores anatômicos, histológicos, e bioquímicos. Além disso, várias propriedades fisiológicas de enxertos ósseos, como a osteogênese, osteoindução e osteocondução, afetam diretamente o sucesso ou o fracasso de incorporação do enxerto. O tratamento de defeitos ósseos usando biomateriais tem sido amplamente estudado na área odontológica. A perda óssea pode ser um resultado de várias patologias, traumatismo ou procedimentos cirúrgicos e estes aspectos conduziram a estudos extensivos em todo o mundo no processo de reparação óssea. Várias técnicas para a correção de defeitos ósseos têm sido propostos, incluindo o uso de vários tipos de enxertos, membranas e a combinação dos dois (PINHEIRO *et al.*, 2012a; PINHEIRO *et al.*, 2013).

Os enxertos podem ser classificados de acordo com sua origem e com base no seu aspecto morfológico. Com relação ao aspecto morfológico são nomeados: esponjoso, cortical e cortico-esponjoso. Com relação a sua origem, os biomateriais podem ser definidos em: de tecido ósseo humano, como o osso autógeno e o osso alógeno; os de origem animal, como o osso xenógeno como o osso bovino, coral, nacre e o pó de casca de *Gallus domesticus*. Dentre os produzidos e elaborados sinteticamente (aloplásticos), têm-se como mais utilizados a hidroxiapatita, o fosfato tricálcio, biovidros, poliméricos e segundo a classificação de membranas que podem ser: sintéticas e ou biológicas, reabsorvíveis e não reabsorvíveis (CARVALHO *et al.*, 2011; SOARES *et al.*, 2013).

Microscopicamente, a incorporação de um enxerto autógeno se refere ao processo de interação do tecido doador com o novo osso produzido pelo leito receptor. A incorporação do

enxerto autógeno é obtida por três distintos mecanismos biológicos de neoformação óssea, a osteogênese que consiste na capacidade das células ósseas do enxerto permanecerem vivas durante o transplante e com a capacidade de formar novo osso no leito receptor. A osteocondução que se refere à capacidade do enxerto ósseo autógeno em funcionar como arcabouço, facilitando a migração de capilares e células do leito receptor para se diferenciar dentro desta estrutura calcificada. Também a osteoindução com a liberação de fatores de crescimento da matriz do osso enxertado. As granulaturas e geometrias dos enxertos podem influenciar na osteogênese. Porém, a conservação, descalcificação e liofilização não interferem na osteoindução (CARVALHO *et al.*, 2011; PINHEIRO *et al.*, 2012a).

Assim, surge a necessidade de desenvolvimento de novos materiais que diminuam esses feitos negativos e facilitem a disponibilidade ao profissional. O biomaterial MTA tem grande potencial para este propósito, por ser um pó agregado que não possui nenhuma citotoxicidade e mostra boa resposta biológica. Ele estimula o reparo tecidual aumentando a adesão, crescimento e proliferação celular. Este material é um pó branco ou cinza, contendo 65% de óxido de cálcio, 21% de silicato de cálcio, 5% de óxido férrico, 4% de aluminato de cálcio, 2.5% de sulfato de cálcio, 2% de óxido de magnésio e 0.5% de óxido de sódio e potássio. Seu pH (12.5), biológica e histologicamente o torna semelhante ao hidróxido de cálcio (PINHEIRO *et al.*, 2011a; PINHEIRO *et al.*, 2011c).

A hidratação do pó resulta em um gel coloidal que se solidifica em uma estrutura rígida. Ao contrário de outros cimentos, que necessitam de um campo completamente seco, MTA é indicado quando o controle da umidade é inadequado, sem perda de suas propriedades e não é reabsorvível, além disso, é menos tóxico e possui um efeito bacteriostático potente, com baixa infiltração marginal. Devido as suas propriedades hidrofílicas e solidificação em ambiente úmido, o isolamento absoluto é contraindicado. Estudos histológicos anteriores indicaram que um novo osso ou cimento é formado adjacente ao MTA, quando ele é colocado em contato com o tecido periodontal ou em defeitos ósseos artificiais. Ele tem propriedades antibacterianas, dissolução tecidual aumentada e induz formação óssea. O MTA já é utilizado em tecido dentário, devido a essas propriedades, porém poucos estudos aprofundam a sua utilização em outros tecidos e o associam com outras técnicas (PINHEIRO *et al.*, 2011c; PINHEIRO *et al.*, 2012a).

Em estudos realizados tanto em 2011 quanto em 2012 por Pinheiro e colaboradores, mostraram que defeitos ósseos quando enxertados com MTA resultaram em boa resposta

biológica. Demonstrando satisfatório reparo tecidual, com bom crescimento e proliferação celular na sua superfície. Principalmente quando inserido algum tipo de irradiação Laser ou LED no estudo. Em outra pesquisa realizada pelo mesmo grupo em 2014, associou o MTA ao LED em ratos para análise de reparo ósseo e verificou-se que o MTA não precisa do LED para satisfatória resposta biológica, porém com inclusão desta irradiação no estudo, observou influencia positiva nos resultados, acelerando o reparo tecidual.

2.4. FOTOTERAPIA LASER/LED

Hoje em dia já se sabe que na prática, a fototerapia é usada clinicamente não só para tratar lesões locais, mas também enfermidades sistêmicas. O efeito causado por essa terapia é chamado de Fotobiomodulação (FBML). Esse efeito sistêmico, onde a resposta ao Laser é observada a distância do local da irradiação é frequentemente abordada e encontrada na rotina clínica. Em alguns estudos sobre neoformação óssea, existe a sugestão de que o efeito biomodulatório do Laser não seria apenas por suas propriedades específicas, mas também pela criação de uma série de condições locais que acelerariam a neoformação óssea (PINHEIRO *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2013).

O mecanismo de interação do Laser a nível molecular foi descrito primeiramente por KARU em 1982. O efeito fotofísico ou fotoelétrico são os processos que provocam modificações nos potenciais de membrana, promovendo os incrementos de ATP mitocondrial que se produzem após a irradiação com Laser, favorecendo um grande número de reações que interferem no metabolismo celular, entre elas, temos: aumento da síntese de DNA e RNA em células eucarióticas e procariotas; incrementos da formação de colágeno e precursores, aumento do nível de β -endorfinas no líquido cefalorraquidiano nos tratamentos de algias do nervo trigêmio; variações quantitativas de prostaglandinas; liberação do conteúdo dos grânulos citoplasmáticos da fagocitose; como também o efeito modulador na síntese protéica, na revascularização, na proliferação e diferenciação celular. Efeitos também foram relatados na capacidade imunossupressora. Em estados patológicos, o Laser interfere no processo de troca iônica, acelerando o incremento de ATP (KARU, 2015).

A luz Laser, absorvida pelos tecidos pode atuar de duas formas. Primeiro, através de efeitos bioquímicos, estimulando a liberação de substâncias, como por exemplo: histamina, serotonina, bradicinina e heparina. Segundo, modificando reações enzimáticas normais, tanto no sentido de excitação quanto de inibição (KARU, 2015; PINHEIRO *et al.*, 2012a,b,2013).

Em estudo realizado por Gerbi; Pinheiro; Ramalho em 2008 foi avaliado através da histomorfometria, o efeito da FBML no reparo de defeitos cirúrgicos em fêmur de ratos, preenchidas com osso bovino liofilizado. Os animais foram irradiados com Laser. Os autores verificaram que não houve melhoria na deposição de fibras colágenas nas fases iniciais da reparação, porém observaram que o aumento da quantidade de trabéculas ósseas bem organizadas no final do período experimental em animais irradiados.

Tajali et al. (2010) realizaram uma meta análise através de artigos publicados de 1996 a 2008, para investigar e definir os efeitos da irradiação Laser em baixa potência em animais através de indicadores biomecânicos da regeneração óssea e os efeitos da dose. Os autores observaram que estudos indicam que o uso do Laser pode melhorar as propriedades biomecânicas do osso durante a reparação óssea em modelos animais, devido a máxima tolerância óssea ser estatisticamente melhor após a irradiação Laser e que este aumenta a resistência do tecido ósseo durante o processo de reparação óssea em modelos animais.

Ultimamente, vários estudos utilizando terapias luminosas além do Laser, como por exemplo, utilizando o LED têm sido realizados, que é a sigla, em inglês, para Light Emitting Diode, que em português significa diodo emissor de luz. Este tipo de emissão é diferente dos Lasers, que produzem emissão estimulada e amplificada de radiação. Em um estudo comparativo de defeitos ósseos enxertados e tratados ou não com LED, realizado por Pinheiro et al em 2012, demonstraram que os tratados com LED tiveram uma resposta biológica mais satisfatória. Assim, tem sido evidenciado que a FBML com LED pode ser útil como auxiliar e complementar em terapias destinadas a otimização do processo de reparação óssea (PINHEIRO *et al.*, 2012a, SOUSA *et al.*, 2013; SOARES *et al.*, 2015).

Estudos recentes indicam a fotobiomodulação LED exerce efeito não-térmico sobre a pele humana, sendo muito provavelmente, mediada pela absorção da luz pelo citocromo mitocondrial. Ocorre o aumento da atividade metabólica da célula fotorreceptora, como o aumento da síntese de colágeno pelos fibroblastos (PINHEIRO *et al.*, 2012c; SOUSA *et al.*, 2013).

Dentre as características do LED constam longa durabilidade, baixo custo, circuitos eletrônicos mais simples e confiáveis, não geração de calor, dimensões reduzidas, temperatura de cor, alta eficiência energética, isto é, quase toda a energia fornecida para o LED é

transformada em luz e apenas uma pequena fração é perdida na forma de calor; o impacto ambiental é bastante reduzido (SOARES *et al.*, 2015).

A terapia com luz é um dos métodos terapêuticos mais antigos utilizados pelos humanos. O uso dos Laseres e LEDs como fontes de luz viria a ser o próximo passo no desenvolvimento tecnológico na terapia com luz. Segundo Smith (2005), em fototerapia o importante é o comprimento de onda da luz, não a coerência, ou a ausência da mesma. Entretanto, o significado clínico da coerência ainda é controverso. Inicialmente, se atribuía os efeitos do Laser à coerência, mas foi mostrado que fontes não coerentes tinham também bons resultados (KARU, 2015).

Estudos recentes mostram que a fototerapia LED acelerou o processo de reparo, com presença de osso neoformado maduro com a presença de trabeculado ósseo e intensa deposição colagênica. Essas características são observadas em diversos estudos onde foi utilizada fototerapia Laser com parâmetros semelhantes e métodos de avaliação que incluíram a análise histológica por microscopia de luz e espectroscopia Raman. Parece provável que os efeitos benéficos do LED são similares àqueles do Laser (SOARES *et al.*, 2011; PINHEIRO *et al.*, 2012a).

Há ainda a necessidade de mais estudos sobre o uso da fototerapia LED em associações com biomateriais e comparativas a fototerapia Laser. Experimentos ao nível celular evidenciaram que tanto a luz coerente como a não coerente, nos mesmos comprimentos de onda, intensidade e tempo de irradiação, promovem efeitos biológicos semelhantes. O sucesso do uso do LED em várias áreas confirma essa afirmação (LOPES *et al.*, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2012a; SOUSA *et al.*, 2013; SOARES *et al.*, 2015).

3. PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da fototerapia Laser (λ 780nm) ou LED (λ 850 \pm 10 nm) no reparo ósseo de fraturas cirúrgicas completas em tíbia de coelhos, estabilizadas com Fixação Interna Semi-Rígida (FISR), tratadas ou não com enxerto de MTA.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Avaliar histologicamente o efeito da Fotobiomodulação Laser ou LED no reparo ósseo de fraturas cirúrgicas em tíbia de coelhos, fixadas com FISR, tratadas ou não com enxerto de MTA.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. RESPALDO ÉTICO DA PESQUISA

Esta pesquisa seguirá as normas de conduta de experimentação animal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (FOUFBA), esta que já foi aprovada pela Comissão de Ética e Experimentação Animal (CEEA) desta Instituição (**ANEXO**), respeitando todos os princípios éticos de experimentação animal, bem como as normas didático científicas da vivisseção de animais, de acordo com a LEI Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008.

4.2. DELINEAMENTO DA PESQUISA

Este trabalho foi desenvolvido dentro do paradigma tradicional, no *design* estudo experimental.

4.3. CONFIGURAÇÃO DA AMOSTRA

Nesta pesquisa foram utilizados 21 (vinte e um) coelhos da ordem *Lagomorpha*, gênero *Oryctolagus*, espécie *Oryctolagus cuniculus*, raça Nova Zelândia, variedade branco, machos. Para a determinação do número de animais em cada grupo experimental foi utilizado o método proposto por Altman com uma probabilidade de erro amostral de 8% e um intervalo de confiança de 95%.

Os animais foram mantidos no Laboratório de Experimentação Animal (LEA) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia - FOUFBA, em microisoladores de policarbonato individuais, forrados com maravalha autoclavada, trocada diariamente com temperatura de 22°C e luminosidade ambiente, acomodados em estante ventilada (INSIGHT Equipamentos Ltda – Monte Alegre, Ribeirão Preto – São Paulo) com injeção direta de ar através de válvulas de aço inoxidável que possuem fechamento automático. Passaram por um período de adaptação de cinco dias. Os animais tiveram acesso a ração sólida específica (PURINA, Purina do Brasil, Paulina, São Paulo, Brasil) para coelhos durante todo o período experimental, exceto nas primeiras 24 horas após a intervenção, e ingerirem água *ad libitum*. Os animais foram mantidos com as condições de iluminação controlada em ciclos dia/noite de 12 horas.

4.4. ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS

Os animais foram selecionados aleatoriamente, pesados e divididos em 7 (sete) grupos de 3 (três) animais (**Quadro 1**).

Nos grupos I a VI, após a exposição do tecido ósseo, uma fratura cirúrgica completa foi confeccionada em tíbia, com auxílio de disco de carborundun diamantado, utilizando-se soro fisiológico em uma seringa descartável para a irrigação. Os cotos ósseos foram então imediatamente fixados com fio de aço 1-0, 0,30 mm ACIFLEX[®] em quatro pontos. Os grupos II, V e VI receberam o enxerto com MTA (Ângelus[®]), no local da fratura. Após os procedimentos específicos de cada grupo, o tecido muscular foi reposicionado e suturado com fio reabsorvível de poliglactina 4-0 estéril (TRUSINTH[®], Sutures India Pvt Ltda. Bangalore, Karnataka, India) e a pele suturada com fio de nylon preto 4-0 (TRUSINTH[®], Sutures India Pvt Ltda. Bangalore, Karnataka, India).

Quadro 1: Distribuição dos Grupos no estudo (UFBA, 2015).

Grupos	Procedimentos	Descrição
I	FISR	Fratura fixada com fio de aço
II	FISR + Enxerto	Fratura fixada com fio de aço + MTA
III	FISR + Laser	Fratura fixada com fio de aço + Laser
IV	FISR + LED	Fratura fixada com fio de aço + LED
V	FISR + Enxerto + Laser	Fratura fixada com fio de aço + MTA + Laser
VI	FISR + Enxerto + LED	Fratura fixada com fio de aço + MTA + LED

*FISR = Fixação Semi-Rígida

4.5. TÉCNICA CIRÚRGICA

Antes da cirurgia os animais receberam medicação pré-anestésica intramuscular Acepromazina (Acepran[®], 0,2% Univet S.A, Cambuci, SP, Brasil, 2mg/Kg). Em seguida, com um intervalo de 20 minutos, foi aplicado intraperitonealmente o anestésico geral Cloridrato de Ketamina (Ketalar[®], 50 mg/ml 0,4 ml/Kg Lab. Park Davis Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e Cloridrato de Xilazina a 2%, (Rompum[®] 20 mg/ml 0,2 ml/kg Lab. Bayer Health Care S.A, São Paulo, SP, Brasil.). Após cinco minutos, sob anestesia geral, foi feita a tricotomia no local da cirurgia com a utilização de uma tosquiadeira recarregável (Oster[®], São Paulo, SP, Brasil) e, em seguida, a antissepsia com solução tópica de digluconato de clorexidina a 2% (LM FARMA[®], Vila Guilherme, SP, Brasil) e como procedimento de biossegurança, foi utilizado

um campo estéril (Med Care[®], POA, RS, Brasil) de TNT com abertura apenas no local da cirurgia e também um campo cirúrgico para colocação dos instrumentais esterilizados.

Com um cabo de bisturi n° 3 (Golgran Indústria e Comércio de Instrumentos Odontológicos Ltda., São Caetano do Sul, SP, Brasil) montado com lâmina de bisturi n° 15 Med Blade[®] (Med Goldman Indústria e Comércio Ltda, São José, SC, Brasil), uma incisão contínua foi realizada na pele da região lateral da tíbia. O tecido subcutâneo e muscular foram divulsionados com o auxílio de uma tesoura romba Metzenbaum[®] (Erwin Guth, São Paulo, SP, Brasil), permitindo assim acesso ao periósteeo. O periósteeo foi deslocado e rebatido com descolador do tipo Molt[®] (Golgran Indústria e Comércio de Instrumentos Odontológicos Ltda., São Caetano do Sul, SP, Brasil), permitindo assim acesso à tíbia. Após os procedimentos específicos de cada grupo, o tecido muscular foi reposicionado e suturado com fio reabsorvível de poliglactina 4-0 estéril (TRUSINTH[®], Sutures India Pvt Ltda. Bangalore, Karnataka, India) e a pele suturada com fio de nylon preto 4-0 (TRUSINTH[®], Sutures India Pvt Ltda. Bangalore, Karnataka, India).

4.6.MANIPULAÇÃO DO ENXERTO

A manipulação foi de acordo com as instruções do fabricante, utilizando-se uma espátula de manipulação (Golgran Indústria e Comércio de Instrumentos Odontológicos Ltda., São Caetano do Sul, SP, Brasil) e em condições adequadas. O material foi posicionado em contato direto com o tecido ósseo viável, visando o preenchimento do espaço cirúrgico. Esta mistura será levada ao local da fratura com o auxílio de uma cureta cirúrgica (Golgran Indústria e Comércio de Instrumentos Odontológicos Ltda., São Caetano do Sul, SP, Brasil) e condensado levemente com um condensador.

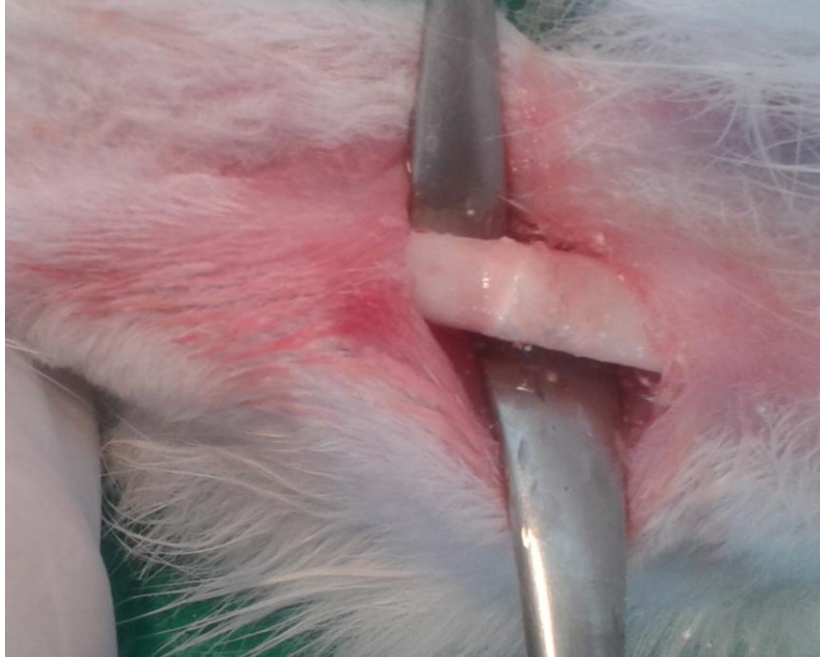


Figura 01 – Fratura óssea confeccionado, preenchida por MTA (DA SILVA, 2015).

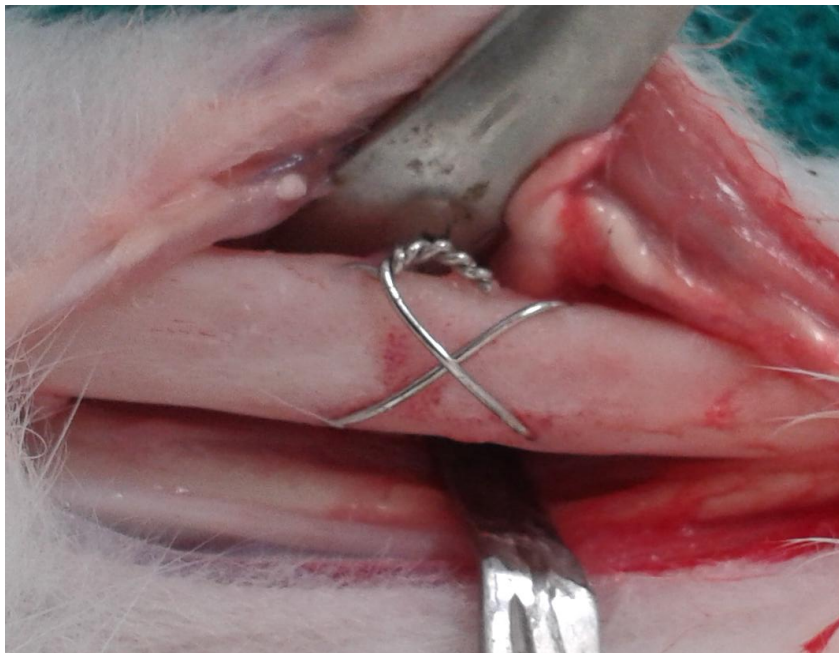


Figura 02 – Fratura óssea, preenchida por MTA, fixada com fio de aço (FISR) (DA SILVA, 2015).

4.7. FOTOTERAPIA

O aparelho de Laser utilizado foi o de diodo infravermelho, Evolution Twin Flex ($\lambda = 780 \text{ nm}$, $P = 70 \text{ mW}$, CW, $\Phi = 0,04 \text{ cm}^2$, $20,4 \text{ J/cm}^2$, dividida em 4 pontos de $5,1 \text{ J/cm}^2$ por sessão, $t = 300\text{s}$, $142,8 \text{ J/cm}^2$ por tratamento, um spot de $0,5 \text{ cm}^2$, com emissão contínua, MMOptics, São Carlos, SP, Brasil). O LED utilizado foi o FisiOLED ($850 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$, 150 mW , $\Phi = 0,5 \text{ cm}^2$, $20,4 \text{ J/cm}^2$ por sessão, $t = 64 \text{ s}$, $142,8 \text{ J/cm}^2$ por tratamento, MMOptics, São Carlos, SP, Brasil). Antes do início dos experimentos, os aparelhos tiveram as suas potências aferidas por um medidor de potência (Optical Power Meter System PM30, Thorlabs Instrumentation, Newton, NJ, USA).

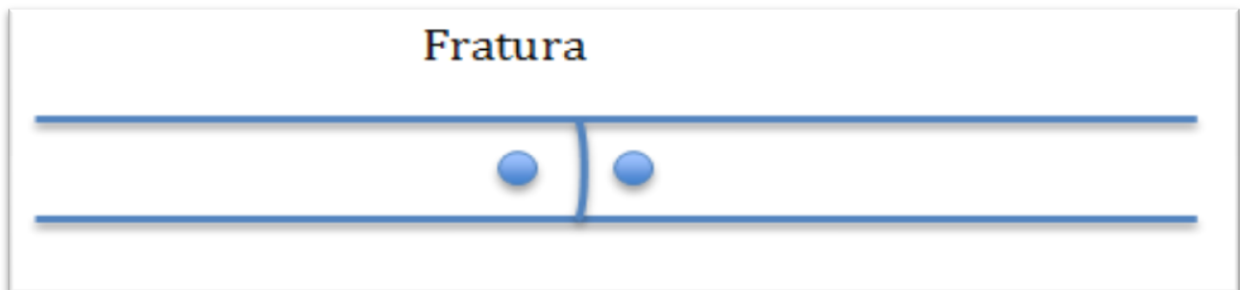


Figura 03 – Aplicação do Laser, 2 regiões adjacentes a área de fratura - $20,4 \text{ J/cm}^2$ por sessão (DA SILVA, 2015).

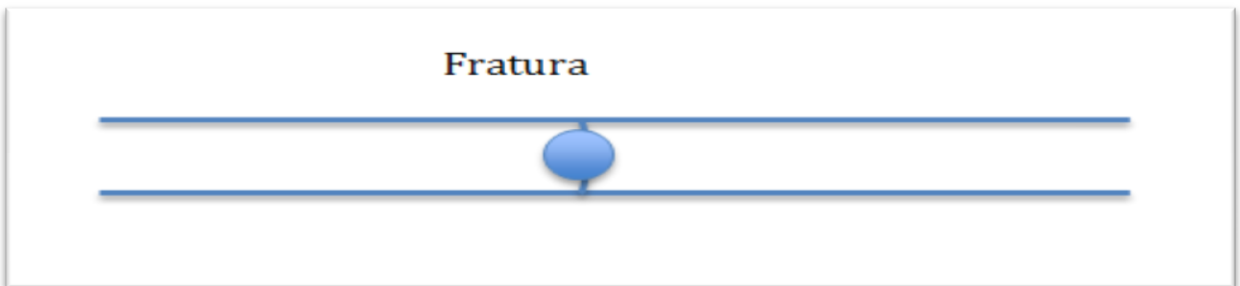


Figura 04 – Aplicação do LED, no ponto da fratura - $20,4 \text{ J/cm}^2$ por sessão (DA SILVA, 2015).

No pós-operatório imediato, os grupos III e V foram submetidos a Fototerapia Laser e os grupos IV e VI receberão Fototerapia LED durante 15 (quinze) dias, a cada 48 horas com uma dose total de $20,4 \text{ J/cm}^2$, de forma pontual em 2 (duas) regiões adjacentes a área da fratura óssea ($2 \times 10,2 \text{ J/cm}^2$) (**Figura 3**) quando o Laser foi utilizado ou em 1 (um) ponto ($1 \times 20,4 \text{ J/cm}^2$) quando o LED foi utilizado (**Figura 4**). As doses totais estão descritas na **Tabela 1**.

Tabela 1: Protocolo de irradiação com Laser ou LED (UFBA, 2015).

Grupo	Dose Total do Tratamento
I, II, III	0 J/cm ²
IV, V, VI, VII	142.8 J/cm ²

As regiões de irradiação foram tatuadas com tinta nanquim preta na pele dos animais, nos pontos adjacentes à fratura óssea, permitindo assim uma padronização da região de aplicação do Laser ou do LED. Neste trabalho utilizou-se o SAEF (spatial average energy fluence) de 20,4 J/cm² no intuito de equalizar a densidade de energia das fototerapias laser e LED sobre a área de tecido irradiado, em observância as diferenças no modo de aplicação das duas fototerapias, pelo tamanho dos spots (SOUSA, 2009).

De acordo com as regulamentações brasileiras, o Laser ou LED foram aplicados em local isolado, com caracteres e simbologia internacional para área em uso ou presença de radiação e observando os procedimentos de segurança recomendados para tratamento com estas fontes de luz.



Figura 05 – Aparelho utilizado no experimento para realização da fototerapia laser (Twinflex Evolution®, MMOptics, São Carlos, SP, Brasil).



Figura 06 – Aparelho utilizado no experimento para realização da fototerapia LED (FizioLED®, MMOptics, São Carlos, SP, Brasil).

4.8.PÓS-OPERATÓRIO

Após os procedimentos, todos os animais receberam, em dose única, como terapia antimicrobiana, injeção intramuscular de Pentabiótico[®] (penicilina, streptomina, 20.000 UI 0,2 ml/Kg IM, Lab.Forte Dogde Saúde Animal Ltda, Campinas, SP, Brasil) e Banamine[®] (Flunixin meglumina 10 mg/ml, 0,1 ml/kg IM, Intervet Shering-Plough Animal Health, Cruzeiro, SP, Brasil), sendo este último um potente analgésico e antiinflamatório.

Os animais foram mantidos em gaiolas metálicas identificadas, medindo 60X60X60 cm com cobertura metálica e com assoalho forrado por maravalha. O período de observação foi de 30 dias. Para a identificação dos animais, foram feitas marcações com caneta de tinta permanente.

Os procedimentos de manipulação e alimentação foram realizados diariamente durante todo o período do experimento, trocando-se a maravalha e lavando-se as gaiolas com água e sabão a cada 24 horas.

4.9.MORTE DOS ANIMAIS E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

A morte dos animais ocorreu no 30° dia pós-operatório, através da administração de uma injeção intraperitoneal de Cloridrato de Ketamina (Ketalar[®], 50 mg/ml, 0,4ml/kg, Lab. Parke Davis Ltda., São Paulo, SP, Brasil) e Cloridrato de Xilazina a 2% intraperitoneal (Rompum[®] 20 mg/ml, 0,2 ml/kg, Lab. Bayer Health Care S.A., São Paulo, SP, Brasil) associados, provocando overdose medicamentosa. Após a constatação da morte dos animais, pelos sinais vitais, foi realizada a remoção dos espécimes de aproximadamente 1 cm de distância das bordas da fratura cirúrgica, com utilização de um disco de *carborundum* e peça reta (Kavo[®], Kavo do Brasil Ind. e Com. Ltda, Joinville, SC, Brasil) acoplada ao micromotor (Kavo[®], Kavo do Brasil Ind. e Com. Ltda, Joinville, SC, Brasil) com irrigação constante de soro fisiológico 0,9 % estéril (Labormédica[®], Labormédica Industrial Farmacêutica Ltda., São José do Rio Preto, SP, Brasil) a 10°C.

Os fios de aço foram cuidadosamente removidos. Todas as peças foram avaliadas macroscopicamente e fotografadas com uma câmara fotográfica digital (PoweShot SX10IS, Canon, Japão). A peça operatória foi fixada em formol a 10 % até o momento de sua preparação. Cada recipiente foi identificado com o número do animal e com o número do grupo.

Após o período de fixação (três dias), as amostras foram descalcificadas em solução de ácido nítrico 10 % por um período cinco dias. Em seguida as peças foram rotineiramente processadas e incluídas em parafina. Os cortes foram realizados em Micrótopo Rotativo Manual Ek Micro1(Eikonol do Brasil, São Paulo, SP, Brasil) com espessura de 5 µm, semi-seriados de 1/5, e corados pela técnica de Hematoxilina de Harris e Eosina Alcoólica (H/E) e Picrosírius, sendo esta última específica para melhor visualização das fibras colágenas.

4.10 ESTUDO HISTOMORFOLÓGICO

Os espécimes processados foram então avaliados através de análise descritiva comparativa por um patologista experiente e de modo cego, no Laboratório de Patologia Cirúrgica do Departamento de Propedêutica e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia – FOUFBA utilizando-se um microscópio óptico (AXIOSCOPE A1[®], Zeiss, Alemanha) e Câmera digital colorida AXIOCAM[®] (Zeiss,

Alemanha) e software Axiovision 4.6 (Zeiss, Alemanha), utilizando os critérios descritos na **Tabela 02**.

Tabela 02 – Critérios semi-quantitativos utilizados para análise através de microscopia de luz (UFBA, 2015).

Critérios	Discreto	Moderado	Intenso
Reabsorção óssea	Presença <25% de reabsorção de osso remanescente e/ou leito cirúrgico	25-50% de reabsorção de osso remanescente e/ou leito cirúrgico	>50% de reabsorção de osso remanescente e/ou leito cirúrgico
Neoformação óssea	<25% de neoformação de osso similar ao adjacente não tratado	25-50% de formação de osso similar ao adjacente não tratado	>50% de formação de osso similar ao adjacente não tratado
Infiltrado Inflamatório	<25% de linfócitos e/ou macrófagos	25-50% de linfócitos e/ou macrófagos	>50% de linfócitos e/ou macrófagos
Deposição Colagênica	<25% de deposição colagênica	25-50% de deposição colagênica	>50% de deposição colagênica

5. RESULTADOS:

Durante toda a pesquisa, os animais permaneceram saudáveis, com cicatrização normal na região operada, sem evidência de infecção ou deiscência de sutura.

5.1 RESULTADOS DO EXAME MACROSCÓPICO

Após a constatação da morte dos animais, as peças cirúrgicas foram removidas e avaliadas quanto ao aspecto macroscópico, tanto nos espécimes dos grupos controles quanto nos dos grupos experimentais.



Figura 07 – Aspecto macroscópico do defeito cirúrgico parcialmente preenchido por tecido branco leitoso que se projeta na superfície óssea (DA SILVA, 2015).



Figura 08 – Aspecto macroscópico do defeito cirúrgico preenchido por tecido branco acinzentado (DA SILVA, 2015).

5.2 RESULTADOS DO EXAME MICROSCÓPICO

Os resultados foram obtidos através da microscopia de luz, para os grupos experimentais e controles (**Quadro 2**).

Quadro 2: Sinopse descritiva da análise histológica qualitativa, no período de 30 dias.

Grupos / Critérios	Inflamação	Colágeno	Reabsorção Óssea	Neoformação óssea (preenchimento)
FISR	Discreta	Discreta	Discreta	Parcial (Moderado)
FISR + MTA	Ausente	Moderado	Ausente	Completo (intenso)
FISR + Laser	Ausente	Moderado	Ausente	Parcial (Moderado)
FISR + LED	Discreta	Intenso	Discreta	Parcial (Moderado)
FISR + MTA + Laser	Ausente	Intenso	Ausente	Completo (intenso)
FISR + MTA + LED	Ausente	Intenso	Ausente	Parcial (Moderado)

5.2.1 ASPECTOS GERAIS

De modo geral, todos os espécimes apresentavam-se com trabéculas ósseas maduras interconectantes ou não preenchendo a fratura óssea, exibindo também linhas basofílicas de aposição/reabsorção em meio à medula óssea vermelho-amarela. Além disso, tais trabéculas ósseas estavam ora mais ora menos colagênicas.

5.2.2 GRUPO I (FISR)

Observa-se sua estrutura parcialmente preenchida por um trabeculado ósseo interconectante com linhas basofílicas, osteócitos irregulares, osteoblastos em superfície e verificou sinais de reabsorção. Em meio houve poucos espaços medulares e um tecido conjuntivo ora frouxo ora fibroso, apresentando significativo infiltrado inflamatório crônico (Fig. 09 e 10).

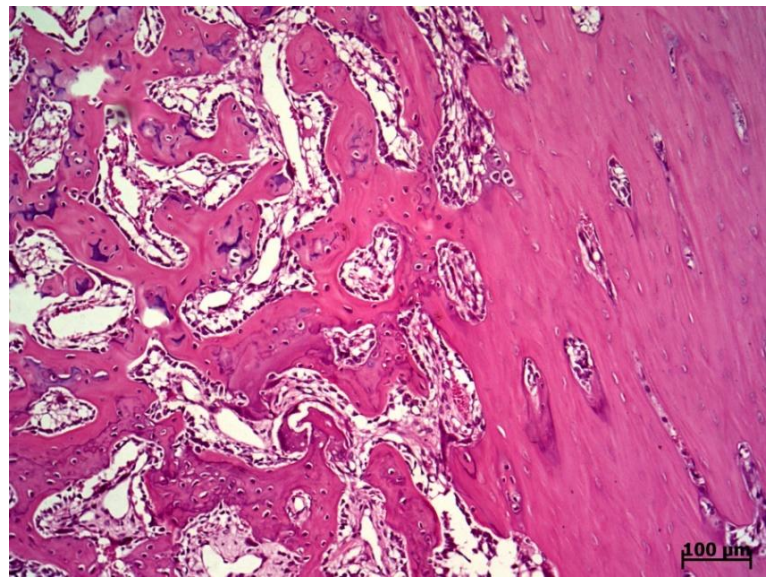


Figura 09 - Fotomicrografia do grupo experimental FISR mostrando que a fratura encontrou-se parcialmente preenchida por um trabeculado ósseo interconectante com linhas basófilicas e osteoblastos em superfície, observou-se um tecido medular de permeio com discreta inflamação crônica. H&E (DA SILVA, 2015).

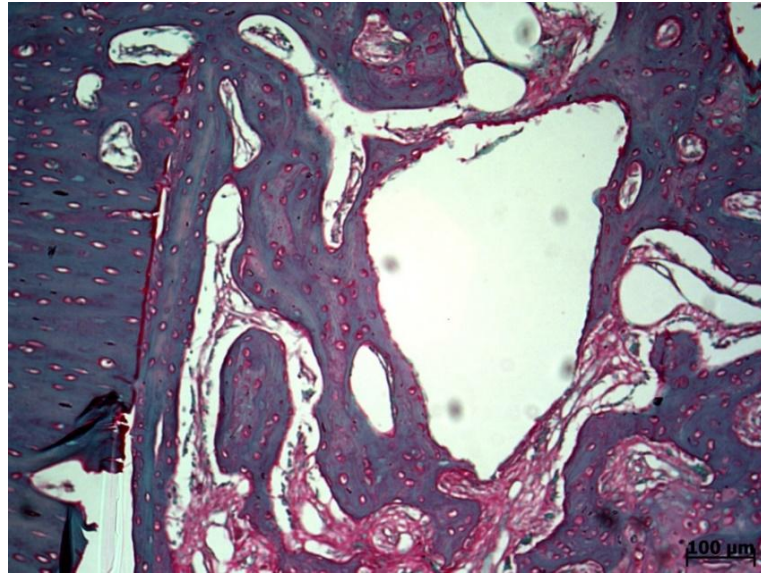


Figura 10 - Fotomicrografia do grupo experimental FISR mostrando que a fratura encontrou-se parcialmente preenchida, exibindo discreta formação colagênica madura no tecido ósseo neoformado. Picrosírius (DA SILVA, 2015).

5.2.3 GRUPO II (FISR + ENXERTO)

Dois espécimes desse grupo mostraram o defeito cirúrgico quase que completamente preenchido por osso neoformado maduro com osteócitos regulares e linhas basofílicas no interior, aprisionando material basofílico granular (Biomaterial). Osteoblastos em superfície foram vistos, e outras áreas mostraram-se com fibrose. Em um espécime foi observado o defeito ósseo parcialmente preenchido por osso neoformado com osteócitos regulares no interior aprisionando material anfófilico/basofílico, enquanto que a parte com ausência de osso neoformado mostrou-se preenchida por material eosinofílico por vezes cristalóide, por vezes irregular, permeado por partículas enegrecidas. O picrosírius mostrou colágeno maduro, mas não preenchendo todo o osso neoformado (**Fig 11 e 12**).

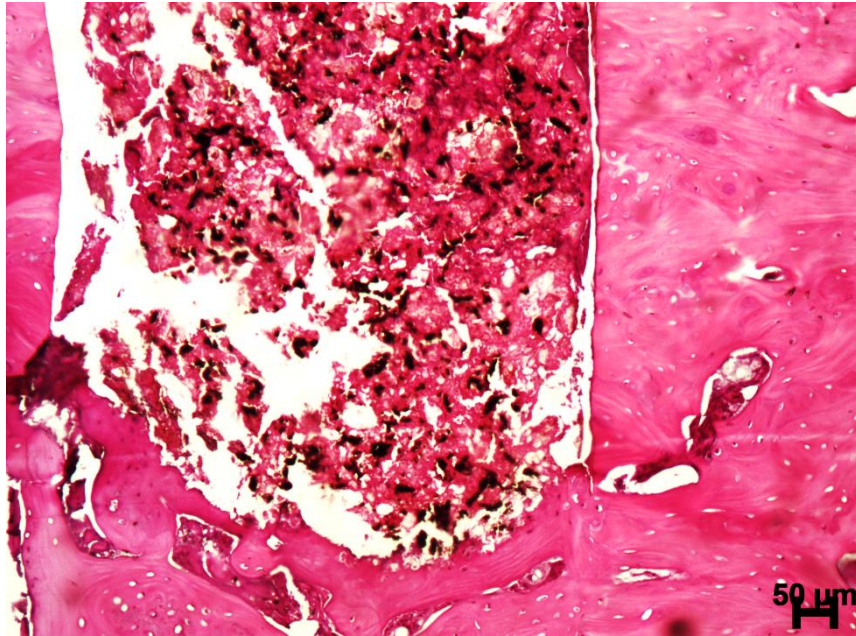


Figura 11 - Defeito cirúrgico cuja região central mostra ausência de osso neoformado e presença de material eosinofílico irregular e com partículas enegrecidas. Observar na parte inferior, osso neoformado aprisionando material anfofílico. H&E (DA SILVA, 2015).

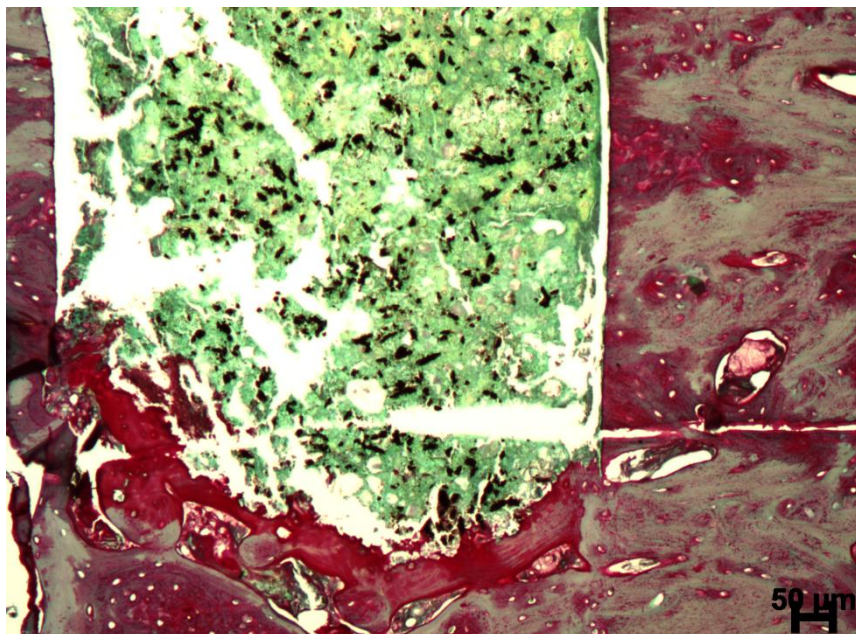


Figura 12 - Observar colágeno maduro preenchendo todo o osso neoformado na parte inferior do defeito cirúrgico. Picrosirius (DA SILVA, 2015).

5.2.4 GRUPO III (FISR + LASER)

Foi observado sua estrutura parcialmente preenchida por um trabeculado ósseo interconectante espesso direcionando-se à cavidade medular com linhas basofílicas e osteoblastos em superfície (Fig. 13 e 14).

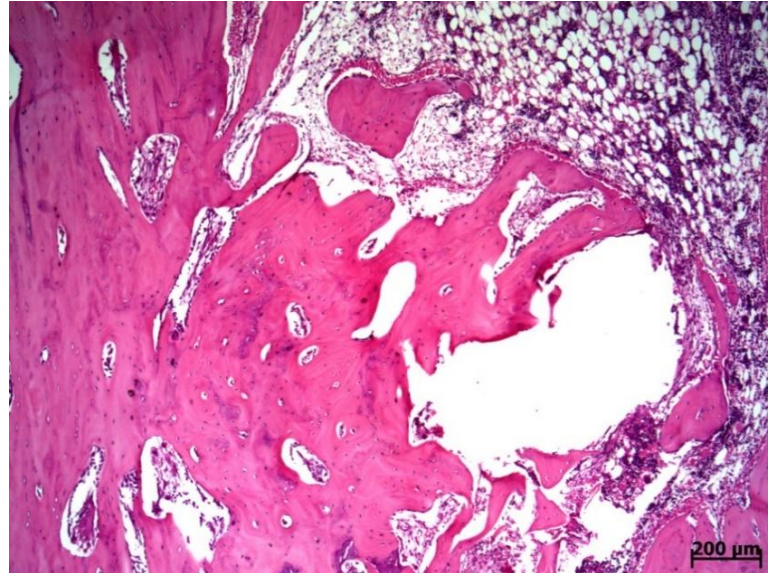


Figura 13: Fotomicrografia do grupo experimental FISR+LASER mostrando que a fratura encontrou-se parcialmente preenchida por um trabeculado ósseo interconectante espesso direcionando-se a medula óssea. H&E (DA SILVA, 2015).

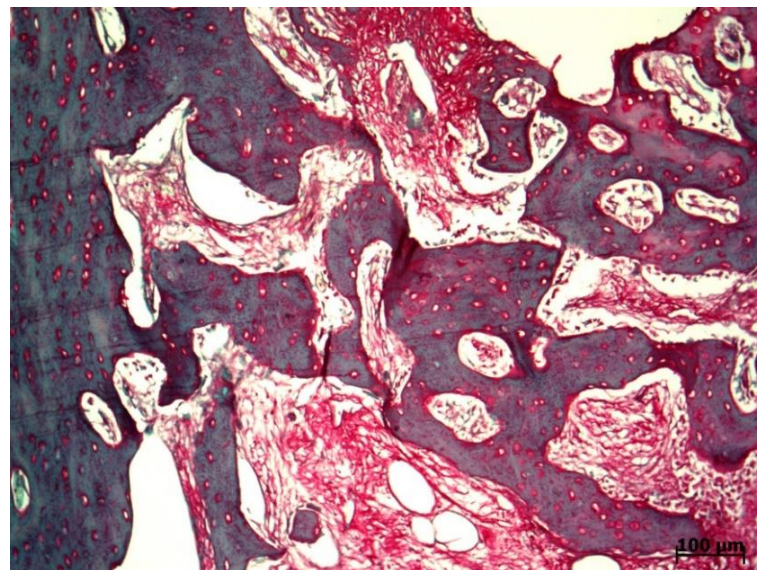


Figura 14: Fotomicrografia do grupo experimental FISR+LASER mostrando que a fratura encontrou-se parcialmente preenchida por um trabeculado ósseo interconectante, exibindo moderada formação de colágeno. Picrosírius (DA SILVA, 2015).

5.2.5 GRUPO IV (FISR + LED)

Dois espécimes desse grupo mostraram o defeito cirúrgico parcialmente preenchido por osso neoformado, caracterizado por trabéculas ósseas maduras não espessas, interconectantes ou não. De permeio havia tecido medular e discreta inflamação crônica. Osteoblastos em superfície foi um achado frequente, enquanto área focal de reabsorção óssea foi observada discretamente. O outro espécime mostrou o defeito cirúrgico apresentando mais de 2/3 preenchidos por osso neoformado maduro, lamelar, com osteócitos regulares. Foi observado também, material eosinofílico, granular e amorfo, ao lado de discreto tecido de granulação com macrófagos e linfócitos, com ausência de osso neoformado. O picrosírius mostrou colágeno maduro preenchendo quase que completamente todo o osso neoformado (Fig 15 e 16).

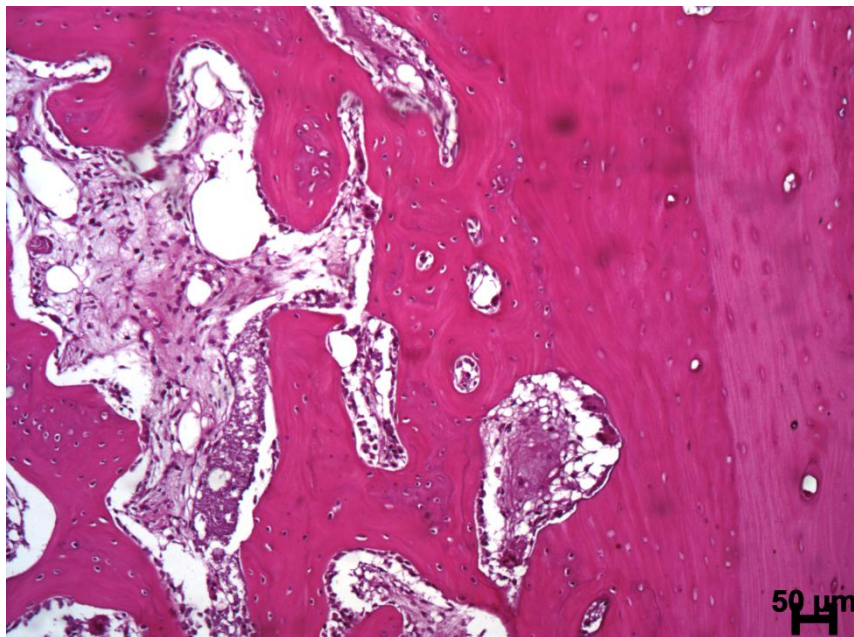


Figura 15: Defeito cirúrgico quase que completamente preenchido por osso neoformado representado por trabéculas ósseas interconectantes com osteoblastos em superfície. Notar tecido estromal com discreta inflamação crônica, bem como, à direita, osso remanescente do leito cirúrgico. H&E. (DA SILVA, 2015).

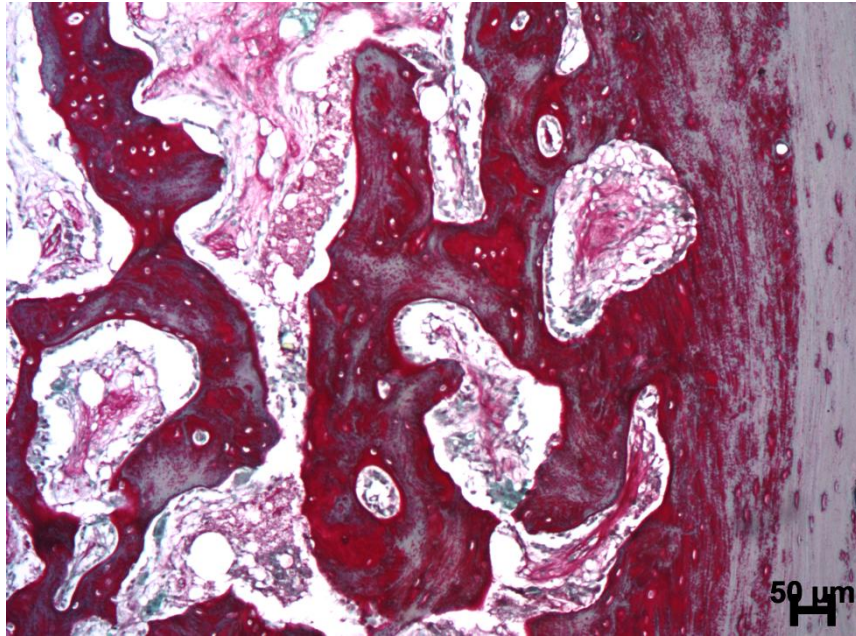


Figura 16: Osso neoformado maduro preenchendo todo o defeito ósseo. Observar similaridade com osso remanescente à direita. Picrosirius. (DA SILVA, 2015).

5.2.6 GRUPO V (FISR + ENXERTO + LASER)

Dois espécimes desse grupo mostraram o defeito cirúrgico quase que completamente preenchido por osso neoformado, caracterizado por trabéculas ósseas maduras, de um modo geral, espessas e interconectantes, muitas vezes lamelares e com osteócitos regulares no interior. Esse osso neoformado envolvia com frequência material anfófilo (biomaterial) que apresentava em um dos espécimes pontos de calcificação. Em dois espécimes desse grupo o tecido estromal que permeia o osso neoformado era frouxo e com discreta inflamação crônica. Já o outro espécime mostrou similaridade com o que foi visto em um dos espécimes do grupo VII, onde se observou material granular, ora basofílico ora eosinofílico, ao lado de partículas enegrecidas, no entanto, neste espécime o osso neoformado preenchia quase todo o defeito e era espesso e maduro. Osteoblastos em superfície. O picrosirius mostrou colágeno maduro preenchendo quase que completamente todo o osso neoformado. **(Fig 17 e 18).**

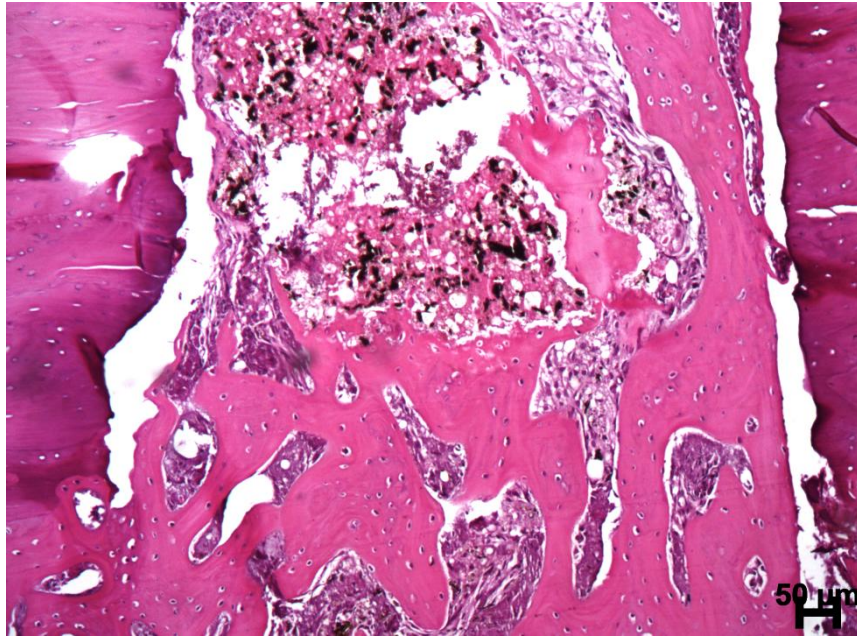


Figura 17: Observar mais da metade do defeito cirúrgico preenchido por osso neoformado, composto por trabéculas ósseas espessas e interconectantes. Na parte superior observa-se material granular anfófilo permeado por partículas enegrecidas. H&E. (DA SILVA, 2015).

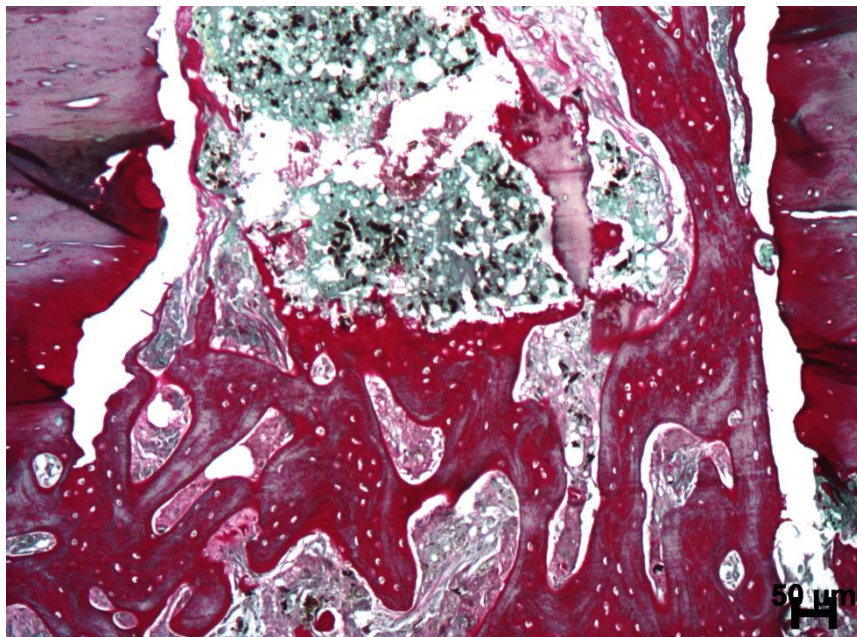


Figura 18: Osso neoformado preenchido por colágeno maduro, notar similaridade com colágeno remanescente do leito cirúrgico. Picrosírius. (DA SILVA, 2015).

5.2.7 GRUPO VI (FISR + ENXERTO + LED)

Os espécimes mostraram ferida cirúrgica parcialmente preenchida (ou preenchida até a metade do defeito) por osso neoformado osteóide ou não de formato trabecular envolvendo material ora basofílico ora eosinofílico granular amorfo, que mostrava poucos osteócitos irregulares no interior e poucos, ou nenhum, osteoblastos em superfície. A outra metade do defeito não mostrava osso neoformado, mas estava preenchida pelo material granular, eosinofílico permeado por partículas enegrecidas (biomaterial), vasos neoformados, macrófagos, linfócitos e fibras colágenas hialinas. O picrossírius mostrou colágeno maduro no tecido ósseo neoformado e, em áreas, de fibras colágenas presentes na parte superior do defeito (**Fig 19 e 20**).

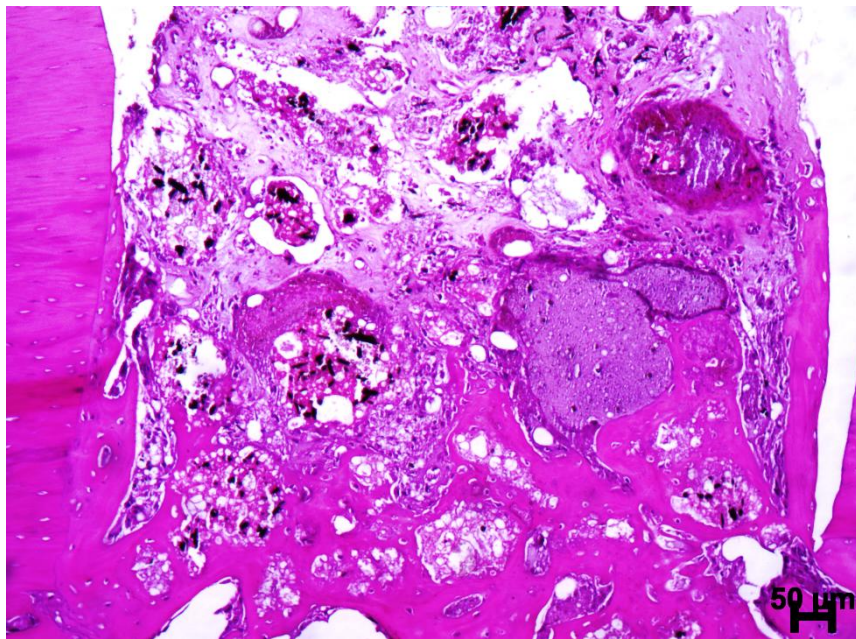


Figura 19: Defeito cirúrgico com terço inferior preenchido por osso neoformado trabecular, não espesso e interconectantes. Observar o terço superior preenchido por material granular eosinofílico, permeado por partículas enegrecidas e várias áreas osteóides H&E. (DA SILVA, 2015).

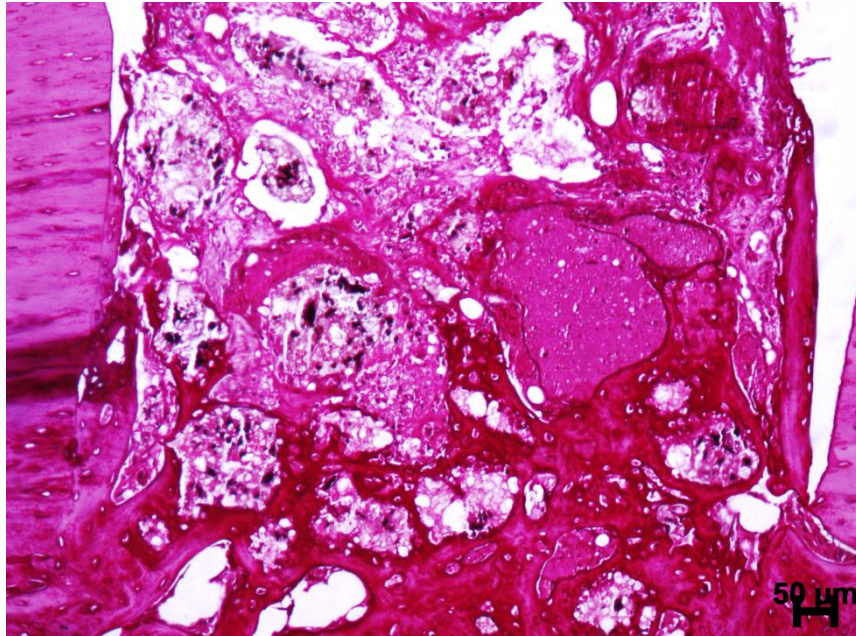


Figura 20: Colágeno maduro destacando o osso neoformado e áreas de osteóide e fibrose. Picrosírius. (DA SILVA, 2015).

6. DISCUSSÃO

A cirurgia moderna tem recorrido a enxertos para substituição de perdas de substância no corpo humano. O progresso das técnicas cirúrgicas e os avanços científicos estenderam as indicações dos enxertos a várias áreas da Medicina e da Odontologia. Com isso, muitos pesquisadores trabalham com o propósito de encontrar meios e ou um material de aporte ósseo ideal que venha contribuir positivamente para a reparação óssea. Nos dias atuais, persiste a discussão sobre como obter uma recuperação adequada, que tipo de biomaterial seria ideal para ser utilizado como enxerto, substituindo o enxerto autógeno, e, qual tipo de técnica mais adequada realizá-lo (PINHEIRO *et al.*, 2011a,c,2012b; SOARES *et al.*, 2015).

Apesar de ter um grande potencial de recuperação, a regeneração do tecido ósseo pode falhar. Os fatores que impedem ou previnem o reparo ósseo são, entre outros, falhas de vascularização, instabilidade mecânica, defeitos sobre estendidos, e tecidos competidores com alta atividade de proliferação. A perda de fragmentos ou a remoção cirúrgica de fragmentos necróticos criam defeitos, em geral muitos amplos para serem preenchidos de forma espontânea por osso. Finalmente, as células dos tecidos moles podem proliferar mais rapidamente e ocupar o local do defeito primeiro do que as células do tecido ósseo. Diante desse problema de difícil solução, há necessidade de lançar mão dos enxertos ósseos para estimular, principalmente o autógeno, a formação óssea, bem como técnicas de estabilização dos cotos ósseos e assim conseguir a cicatrização adequada (KOURKOUDELIS *et al.*, 2013; SOARES *et al.*, 2011,2015).

Para experimentação das técnicas e materiais propostos, foram utilizados coelhos machos adultos jovens, para evitar a interferência de fatores como climatério e idade. A utilização de coelhos para estudo da remodelação óssea também é frequente, uma vez que as respostas do tecido ósseo destes mamíferos às injúrias se assemelham às encontradas em humanos (ACIOLE, 2010; LOPES *et al.*,2010; PINHEIRO *et al.*, 2011a,c; 2012c).

Nas fraturas completas, com separação de cotos ósseos ou perda de substância, devem ser utilizadas técnicas cirúrgicas para estabilização das partes ósseas, procedimento conhecido como osteossíntese, evitando as complicações que podem ocorrer caso os remanescentes ósseos não permaneçam em contato. Para este fim, as duas principais técnicas utilizadas são a fixação interna rígida (FIR), utilizando miniplacas e parafusos de titânio, ou a fixação interna semi-rígida (FISR), utilizando fios de aço. Nesta pesquisa optou-se pela utilização da fixação

interna semi-rígida (FISR), como material de osteossíntese, pois, este sistema de fixação é utilizado usualmente no tratamento das fraturas ósseas do complexo maxilofacial, possuindo maior disponibilidade e facilidade de acesso em locais com poucos recursos ou em situações de urgência (ACIOLI, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2011b; CARVALHO *et al.*, 2011).

O biomaterial de enxerto utilizado neste estudo foi o MTA, devido a sua biocompatibilidade, não toxicidade, propriedades antibacterianas, dissolução tecidual aumentada e indução da formação óssea. Vários estudos histológicos anteriores indicaram que um novo osso é formado adjacente ao MTA, quando ele é colocado em contato com defeitos ósseos artificiais. O MTA é um pó com propriedades semelhantes ao hidróxido de cálcio, sendo assim muito eficaz na formação de um novo tecido ósseo e bastante estudado atualmente por linhas de pesquisas semelhantes, porém nenhum estudo associa este biomaterial a fototerapia Lase/LED para reparo ósseo (OLIVEIRA *et al.*, 2008; PINHEIRO *et al.*, 2009, 2011a,c, 2012a,c).

O protocolo de fototerapia Laser/LED utilizado neste estudo é semelhante aos utilizados em estudos anteriores e, em todos os protocolos, modelos e parâmetros utilizados anteriormente, ficou demonstrado que o uso das fototerapias no defeito ósseo, causa respostas teciduais importantes durante o reparo e que estas causam um processo de reparação mais rápido, bem como ocasiona uma melhoria da qualidade do osso recém-formado. É possível que o efeito de diferentes fontes de luz sobre a regeneração óssea dependa não só do comprimento de onda e da dose total de irradiação, mas também sobre o tempo de irradiação e o modo de irradiação e mais importante ainda da fonte de luz utilizada. Esse protocolo foi realizado imediatamente ao procedimento cirúrgico e a cada 48 horas durante 15 dias, pois baseia-se no fato de que durante as fases iniciais do reparo ósseo, o componente celular (principalmente fibroblastos e osteoblastos) é mais proeminente e mais propenso a ser afetado pela luz. Por isso, o período observacional utilizado foi de 30 dias pós-operatório, onde o processo de reparo encontra-se em um estágio mais avançado, e pôde se influenciado após o estímulo inicial proporcionado pelas fototerapias, sendo bastante utilizado para avaliação do reparo ósseo em diversos estudos já publicados (GERBI *et al.*, 2008; CARVALHO *et al.*, 2011; PINHEIRO *et al.*, 2009, 2011, 2012a,b, 2013; SOARES *et al.*, 2015).

A irradiação ocorreu de forma pontual, onde as canetas Laser/LED foram posicionadas numa angulação de 90° em relação ao longo eixo do osso em contato com a pele do animal (transcutaneamente). Estes cuidados permitem que a energia depositada penetre no tecido

com menos perda por reflexão especular. Os aparelhos Laser/LED utilizados neste estudo foram escolhidos em função de sua qualidade de aparelho portátil, por serem clinicamente utilizados e por possuírem liberação da ANVISA (ACIOLE, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2011a,b,c,2012a; SOARES *et al.*, 2013).

Como foi dito anteriormente, osso maduro é um tecido altamente celular e de formação rápida, porém é relativamente pouco mineralizado, com fibras orientadas ao acaso e pouca resistência. Em seguida, é substituído por osso maduro ou lamelar, capaz de suportar cargas. Nos resultados obtidos, mostrou-se um aumento significativo na deposição de fibras colágenas, orientadas de forma bem organizada nos grupos irradiados, e conseqüentemente, o que faz com que a reparação se finalize com um arranjo de osso lamelar mais organizado, compacto, com maior vascularização, alcançando um padrão de tecido ósseo de melhor qualidade (PINHEIRO *et al.*, 2012a; JUNQUEIRA;CARNEIRO, 2013).

A combinação do enxerto de MTA com as fototerapias Laser/LED neste estudo, foi baseada no fato da substância enxertada possuir propriedades osteocondutoras e a fototerapias utilizadas possuem efeitos positivos, já descritos na literatura, sobre a função e a proliferação de células. Esses fatores utilizados isoladamente foram eficazes na aceleração do processo de reparo em vários modelos experimentais. Essa associação pode modular a reparação de defeitos ósseos de uma forma semelhante ao que ocorre após enxerto de osso autógeno, evitando apenas suas complicações e limitações (PINHEIRO *et al.*, 2012a,b, 2013).

De maneira geral, os resultados obtidos no presente estudo em relação à neoformação óssea, reabsorção óssea, resposta inflamatória e deposição de colágeno, evidenciou-se que o grupo tratado tanto com FISR + Enxerto + Laser como com FISR + Enxerto + LED, demonstraram resultados satisfatórios, visto que o grupo que só utilizou o biomaterial também apresentou satisfatório reparo tecidual, porém sua neoformação óssea foi acelerada quando associada às Fototerapias Laser/LED, corroborando com os resultados obtidos por Soares e colaboradores em 2011 . Estes dados corroboram com a literatura no que se refere à qualidade da reparação óssea, pois segundo autores a fototerapia Laser/LED associado ao uso de MTA gera aumento da proliferação e da atividade fibroblástica (deposição de colágeno) e osteoblástica e neoformação óssea (SANTOS *et al.*, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2011c; PINHEIRO *et al.*, 2012a).

Assim, como dito anteriormente, estes aspectos têm sido descritos em estudos anteriores nos quais a utilização de luz Laser/LED, estaria associada a um aumento da proliferação de fibroblastos, condroblastos e osteoblastos, e conseqüente aumento da deposição de colágeno, importante precursor da deposição da matriz mineral. Dessa forma, o aumento da neoformação óssea está intimamente relacionado, com ambos, aumento do número de osteoblastos e de sua atividade secretora. A presença de um tecido fibroso foi observada apenas, nos grupos FISR e FISR + Enxerto, o que justificaria o processo reparativo em um estágio menos avançado que nos demais grupos que tiveram irradiação (ACIOLE, 2010; SOARES, 2013).

Os fenômenos observados nos grupos não submetidos ao uso do enxerto foram similares a relatados anteriores conforme a metodologia utilizada, com a fratura parcialmente preenchida por um trabeculado ósseo interconectante com linhas basofílicas, osteócitos irregulares e osteoblastos em superfície. Assim sendo, diferenças maiores não foram observadas histologicamente no processo de reparo dos grupos, Laser e LED após 30 dias de observação. Portanto, entende-se desses achados que, os grupos irradiados, apresentaram um processo de reparo mais avançado e de qualidade que o grupo não irradiado (Grupos FISR e FISR + Enxerto) (ACIOLE, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2009, 2011, 2012a; SOARES *et al.*, 2015).

O aspecto trabecular variou entre os grupos estudados, foi mais espessa nos grupos FISR + Enxerto + Laser e FISR + Laser, do que nos demais grupos. Ressalta-se que no grupo FISR + Enxerto + Laser as trabéculas além de espessas eram de certa forma mais organizadas no tecido. Interessante foi a observação da atividade remodelativa ainda presente, evidenciada pela presença das linhas basofílicas, principalmente no grupo FISR + Enxerto + Laser.

Em relação às linhas basofílicas presentes no tecido ósseo, foram observadas em quase todos os grupos, porém no grupo FISR+ Enxerto foi visto linhas basofílicas apenas no interior, aprisionando o biomaterial. Já no grupo FISR + Enxerto + LED observou-se linhas basofílicas mais regulares, apresentando o processo de reparação mais avançado do que no grupo FISR+ enxerto e do grupo FISR+ LED. Corroborando com o estudo realizado por Soares em 2015, em que observa-se maior reparação óssea no grupo FISR + Enxerto + LED do que isolados. Comparando com o grupo FISR + Enxerto + Laser, este último apresenta sinais de reparação óssea similares ao grupo FISR + Enxerto + LED, observado também em outros estudos do grupo.

O fato de que no grupo FISR+ enxerto as linhas basofílicas foram pouco detectadas pode ser indicativo de um processo de remodelação mais lento ou até mesmo mais tardio, devido a presença de tecido fibroso em algumas áreas. Ressalta-se também que não foi observada uma resposta inflamatória intensa em nenhum grupo, somente uma discreta inflamação nos grupos com o enxerto (MTA), fato considerado um achado esperado. Não importa quão biocompatível seja o biomaterial, este continuará sendo um agente ou material estranho. É interessante se observar que, em estudo anterior usando este enxerto (MTA), esta reação também foi detectada (SOARES *et al.*, 2011; PINHEIRO *et al.*, 2012a; SOARES, 2013).

A motivação principal deste estudo é em relação ao tempo e a qualidade da reparação óssea, visto que estudos anteriores demonstraram sucesso do uso da fototerapia Laser e LED em lesões ósseas. Porém, esta área ainda é controversa devido ao relato de resultados conflitantes. Portanto, é necessário identificar os melhores parâmetros a serem utilizados na prática clínica com uma maior acessibilidade à população (GERBI *et al.*, 2008; SOUSA, 2009; LOPES *et al.*, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2012a,c; SOARES *et al.*, 2015).

7. CONCLUSÃO:

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, baseado na metodologia utilizada parece-nos lícito concluir que:

- A fototerapia Laser ($\lambda 780\text{nm}$) ou LED ($\lambda 850 \pm 10\text{nm}$) foram eficazes na modulação do processo de reparo ósseo de fraturas ósseas confeccionadas em tíbia de coelhos, submetidos ou não, ao biomaterial de MTA.
- A análise histológica evidenciou que, a associação da FBML + Biomaterial, em fraturas tratadas com FISR, resultou no reparo do tecido ósseo com uma maior quantidade de trabeculado ósseo, presença de um maior número de osteoblastos, fibroblastos e aumento na deposição de colágeno.

8. REFERENCIAS:

ACIOLE, G. T. S. **Avaliação da cicatrização óssea em fraturas cirúrgicas, provocadas em tíbia de coelhos e mantidas com fixação rígida ou semi-rígida tratadas com ou sem Laser e enxerto ósseo cerâmico bifásico.** Tese (Doutorado em Odontologia - Área de concentração: Laser em Odontologia Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia – UFBA, Salvador, 2010.

BURCHARDT, H. The biology of bone graft repair. **Clinical Orthopaedics and Related Research** v. 174, p. 28-42, 1989.

CARVALHO, F. B.; ACIOLE, G. T. S.; ACIOLE, J. M. S.: *et al.* Assessment of bone healing on tibial fractures treated with wire osteosynthesis associated or not with infrared laser light and biphasic ceramic bone graft (HATCP) and guided bone regeneration (GBR): Raman spectroscopy study. **Proceedings — SPIE**, v. 7887, p. 7887OT-1-7887OT-6, 2011.

EINHORN, T.A.; GERSTENFELD, L. C. Fracture healing: mechanisms and interventions. **Nature Reviews Rheumatology**, n.11, p.45–54, 2015.

FARLAY, D.; PANCZER, G.; REY, C. Mineral maturity and crystallinity index are distinct characteristics of bone mineral. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 28, n. 4, p. 433-45, 2010.

GERBI, M.E.M.M.; PINHEIRO, A.L.P.; RAMALHO, L.P. Effect of IR laser photobiomodulation on the repair of bone defects grafted with organic bovine bone. **Lasers Medical Science**, v.23, p.313-317, 2008.

HOLSTEIN, J. H. et al. Endostatin inhibits callus remodeling during fracture healing in mice. **J. Orthop. Res.** N. 31, p.1579–1584, 2013.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**, 12. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 542, 2013.

KARU, T. I.; KALENDU, G. S.; LETOKHOV, V. S.; *et al.* Biostimulation of HeLa cells by low intensity visible light. **Nuovo Cim D**, v. 1, n. 6, p. 828, 1982.

KARU, T. I. Cellular mechanisms of photobiomodulation, in *Lasers in Dentistry: Guide for Clinical Practice* (eds P. M. de Freitas and A. Simões), John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ. doi: 10.1002/9781118987742.ch4, 2015.

KOURKOUMELIS, N.; TZAPHLIDOU, M. Spectroscopic Assessment of Normal Cortical Bone: Differences in Relation to Bone Site and Sex. **The Scientific World Journal**, v. 10, p. 402–412, 2010.

LOPES, C.B. ; PACHECO, M. T. T. ; SILVEIRA, L.; *et al.* The effect of the association of near infrared laser therapy, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration on tibial fractures treated with internal rigid fixation: A Raman spectroscopic study. **Journal of Biomedical Materials Research. Part A**, v. 4, n. 4, p. 1257-63, 2010.

OLIVEIRA, E. A.; OLIVEIRA, V. G. M. ; PIRES, J. A.; *et al.* Effect of Low-Level Laser Therapy and Mineral Trioxide Aggregate on Alveolar bone repair. **Brazilian Journal of Oral Sciences** , v. 7, p. 1657-1661, 2008.

PINHEIRO, A. L. B. ; GERBI, M. E. M. M. ; LIMEIRA JUNIOR, F. A. ; *et al.* Bone repair following bone grafting hydroxyapatite guided bone regeneration and infra-red laser photobiomodulation: a histological study in a rodent model. **Lasers in Medical Science**, v. 24, p. 234-240, 2009.

PINHEIRO, A. L. B. ; ACIOLE, G. T. S. ; CANGUSSÚ, M. C. T. ; *et al.* Effects of laser phototherapy on bone defects grafted with mineral trioxide aggregate, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration: A Raman spectroscopic study. **Journal of Biomedical Materials Research. Part A**, v. 95, n. 4, p. 1041-1047. 2010a.

PINHEIRO, A. L. B. ; GERBI, M. E. M. M. . A Fotobiomodulação Laser Aplicada a Cirurgias Ósseas e à Implantodontia. In: Antonio Luiz Barbosa Pinheiro; Aldo Brugnera Junior; Fatima Antonia Aparecida Zanin. (Org.). **Aplicação do Laser na Odontologia**. 1ed.Santos: Livraria Santos Editora, v. 1, p. 351-379. 2010b.

PINHEIRO, A. L. B. ; SOARES, L. G. P. ; ACIOLE, G. T. S. ; *et al.* Light microscopic description of the effects of laser phototherapy on bone defects grafted with mineral trioxide aggregate, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration in a rodent model. **Journal of Biomedical Materials Research. Part A**, v. 98, n. 2, p. 212-21, 2011a.

PINHEIRO, A. L. B. ; SOARES, L. G. P. ; SANTOS, N. R. S. . Avanços e perspectivas na cicatrização e no reparo tecidual. **Implant News**, São Paulo, p. 29 - 36, 01 jul. 2011b.

PINHEIRO, A. L. B. ; SOARES, L. G. P. ; ACIOLE, G. T. S.; *et al.* Light microscopic description of the effects of laser phototherapy on bone defects grafted with mineral trioxide aggregate, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration in a rodent model. **Journal of Biomedical Materials Research**. Part A, v. 98, n. 2, p. 212-21, 2011c.

PINHEIRO A.L; SOARES, L.G; CANGUSSU, M.C; *et al.* Effects of LED phototherapy on bone defects grafted with MTA, bone morphogenetic proteins and guided bone regeneration: a Raman spectroscopic study. **Lasers Med Sci.** v.27, p.903-16. 2012a.

PINHEIRO, A. L. B.; The efficacy of the use of IR laser phototherapy associated to biphasic ceramic graft and guided bone regeneration on surgical fractures treated with miniplates: a Raman spectral study on rabbits. **Lasers in Medical Science**, 2012b.

PINHEIRO, A. L. B.; SANTOS, N. R. S.; OLIVEIRA, P. C.; *et al.* The efficacy of the use of IR laser phototherapy associated to biphasic ceramic graft and guided bone regeneration on surgical fractures treated with miniplates: a Raman spectral study on rabbits. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 2, p. 513–518, 2013.

SANTOS, N. R. S. ; DE M, J.B.S. ; ALMEIDA, P. F.; *et al.* Influence of the Combination of Infrared and Red Laser Light on the Healing of Cutaneous Wounds Infected by. **Photomedicine and Laser Surgery**, p. 110108083137087-6, 2011.

SOARES, L. G. P; ACIOLE, G. T.; DOS SANTOS, J. N.; *et al.* Effects of LED Phototherapy on Bone Defects Grafted with MTA in a Rodent Model: A Description of the Bone Repair by Light Microscopy. **J Biomed Mater.**, V.98(2), p. 212-21, 2011.

SOARES,L. G. P. **Avaliação da Fotobiomodulação LASER/LED em enxerto de Fosfocerâmica Bifásica de Hidroxiapatita e β -Fosfato tricálcico em defeitos ósseos: estudo histológico e por espectroscopia Raman em modelo animal.** Tese (Doutorado em Odontologia - Área de concentração: Laser em Odontologia). Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia – UFBA, Salvador, 2013.

SOARES, L. G. P. ; MAGALHAES Jr, E. B. ; MAGALHAES, C. A. B. ; *et al.* New Bone Formation around Implants Inserted on Autologous and Xenografts Irradiated or not with IR

Laser Light: A Histomorphometric Study in Rabbits. **Brazilian Dental Journal**, v. 24, p. 218-223, 2013.

SOARES, L. G. P.; MARQUES, A. M. C.; GUARDA, M. G.; *et al.* Repair of Surgical Bone Defects Grafted with Hydroxylapatite + β -TCP and Irradiated with $\lambda=850$ nm LED Light. **Brazilian Dental Journal**, v. 26, p. 19-25, 2015.

SOUSA, A. P. C.; **Efeitos das radiações Laser e LED associadas ou não no reparo de feridas cutâneas em dorso de ratos: Estudo histológico.** Tese (Doutorado em Odontologia – Área de Concentração: Laser em Odontologia) Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia – UFBA, Salvador, 2009.

SOUSA, A. P. C.; PARAGUASSÚ, G. M.; SILVEIRA, N. T. T.; *et al.* Laser and LED phototherapies on angiogenesis. **Lasers in Medical Science**, v. 28, p. 981-987, 2013.

TAJALI, S. B.; MACDERMID, J. C.; HOUGHTON, P.; *et al.* Effects of low power laser irradiation on bone healing in animals: a meta-analysis. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v.5, p.1-10, 2010.

THANOON, M. G.; IBRAHIM, S. M. Effect of bone marrow and low power lasers on fracture healing with destruction of periosteum and endosteum in rabbits. **Iraqi Journal of Veterinary Sciences**, v.24, p.5-9, 2010.

TORRES, C. S. ; SANTOS, J. N. ; MONTEIRO, J. S. C. ; *et al.* Does the Use of Laser Photobiomodulation, Bone Morphogenetic Proteins, and Guided Bone Regeneration Improve the Outcome of Autologous Bone Grafts? An in Vivo Study in a Rodent Model. **Photomedicine & Laser Surgery**, v. 26, p. 371-377, 2008.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comissão de Ética na Experimentação Animal

UFBA - Faculdade de Odontologia - Av. Araújo Pinho, 62 - Camela

CEP: 40.140-110 - Salvador - BA - Tel: (71) 3283-8966

Home-page: www.ufba.br

CERTIFICADO

ANEXO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa “Avaliação da cicatrização óssea em fraturas sem perda de substância, provocadas em tibia de coelhos e mantidas com fixação rígida ou semirrígida tratadas com ou sem fototerapia LASER OU LED, e MTA” de autoria de Antonio Luiz Barbosa Pinheiro, foi analisado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal e considerado **APPROVADO**.

Salvador, 17 de outubro de 2012


Prof. Antonio Luiz B. Pinheiro
Presidente