

MARY ANNE MOREIRA BARBARA

**INFLUÊNCIA DA SUPERFÍCIE DO IMPLANTE E DA
LASERTERAPIA NA OSSEOINTEGRAÇÃO, EM RATAS
OSTEOPÊNICAS**



2009

MARY ANNE MOREIRA BARBARA

**INFLUÊNCIA DA SUPERFÍCIE DO IMPLANTE E DA LASERTERAPIA
NA OSSEOINTEGRAÇÃO, EM RATAS OSTEOPÊNICAS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Patologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Luana Marotta Reis de Vasconcellos

São José dos Campos

2009

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Luana Marotta Reis de Vasconcellos (Orientadora)

Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos

Universidade Estadual Paulista - UNESP

Profª Tit.. Yasmin Rodarte Carvalho

Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos

Universidade Estadual Paulista - UNESP

Prof. Dr. Carlos Eduardo Dias Colombo

Faculdade de Odontologia

Universidade do Vale do Paraíba - UNIVAP

São José dos Campos, 08 de julho de 2009.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a pessoas especiais que foram fontes de inspiração e força para a sua realização.

Ao meu esposo Roberto, luz na minha vida, obrigada pela confiança, compreensão e por todo seu amor mesmo à distância de dois continentes.

“Para estar junto não é preciso estar perto, mas sim do lado de dentro.” (Leonardo da Vinci)

Aos meus pais Pedro e Aparecida, pessoas maravilhosas e peças fundamentais para minha existência.

“Paz e harmonia - esta é a verdadeira riqueza de uma família.”

(Benjamin Franklin)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, nosso Criador, pela saúde proporcionada, pelos momentos de alegria e conforto nas horas de solidão, meu eterno agradecimento por essa conquista tão almejada.

Ao Programa de Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora Prof^a Dr^a **Cristiane Yumi Koga Ito** agradeço por todo apoio e compreensão demonstrados durante todo o mestrado.

Agradeço à minha orientadora Prof^a Dr^a **Luana Marotta Reis de Vasconcellos**, profissional dedicada, pessoa amiga, compreensiva, inteligente, sempre disposta em todos os momentos. Obrigada pela confiança, ensinamentos e amizade.

Agradeço à Prof^a Dr^a **Yasmin Rodarte Carvalho**, fonte de sabedoria, dedicação e inspiração para a busca de novos conhecimentos. Pessoa amiga, simples e com uma alegria sempre presente no sorriso e no olhar.

À Prof^a Adj^a **Rosilene Fernandes da Rocha** pela atenção, pelos conselhos e carinho que me recebeu nesta instituição. Pessoa sempre disposta a ajudar, lutadora e vencedora.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela bolsa de estudos concedida.

À Profª Adjª **Ana Sueli Rodrigues Cavalcante**, agradeço por toda atenção e ensinamentos transmitidos, pela oportunidade da realização do estágio de docência e principalmente pela amizade e carinho transmitidos pela sua simpatia contagiante.

À Profª Drª **Juliana Campos Junqueira**, exemplo de dedicação e competência, obrigada pelos conhecimentos transmitidos, pela convivência e amizade durante o trabalho realizado na Disciplina de Microbiologia e por todo seu apoio nesta pesquisa.

Aos funcionários do Biotério, **Antônio Domingos Sávio Barbosa Maia Vasconcelos, Lourival Jacob e Marco Antonio Corrêa Alfredo** pelo enorme auxílio durante a fase de cirurgias realizadas neste estudo.

A todos os **funcionários do CTA** (Centro Técnico Aero espacial) pelo apoio e atenção durante a confecção dos implantes utilizados nesta pesquisa.

Aos alunos de iniciação científica, **Mariana Oliveira França, Zahra Fernandes Ebrahim** e em especial ao aluno **Emanuel da Silva Rovai** por toda ajuda recebida na fase experimental deste trabalho.

Agradeço imensamente e de todo o coração a todas minhas amigas do curso de mestrado e doutorado pela participação na fase das cirurgias realizadas no Biotério, **Ana Paula de Lima, Adriana Marchini, Lilibeth Forte, Karina Bortolin Lodi e Ana Lourdes da Silva Machado, Cristiane Aparecida Pereira e Nívea Sena Costa** muito obrigada pela amizade e carinho.

À minha grande amiga **Camila Porto de Deco**, um verdadeiro anjo sempre presente, obrigada pela atenção, disposição e amizade em todos os momentos deste curso.

À **Titanium Fix** (São José dos Campos, Brasil) pela doação das brocas para a confecção dos preparos cirúrgicos realizados neste trabalho.

Aos **casais de amigos brasileiros residentes na Itália Alderlan e Rita Vitalino, Manuel e Karina Borges** obrigada pela atenção e carinho concedidos ao meu esposo em todos os períodos de minha ausência no decorrer desses dois anos.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação, **Rosemary da Fátima Salgado, Erena Michie Hasegawa, Maria Aparecida Consiglio de Souza e Lilian Faria das Graças**, pelo auxílio constante e à bibliotecária **Silvana Alvarez**, pela orientação na normalização deste estudo.

A todos **os animais experimentais** o meu mais profundo respeito e agradecimento.

“Há pessoas que nos falam e nem as escutamos, há pessoas que nos ferem e nem cicatrizes deixam, mas há pessoas que simplesmente aparecem em nossas vidas e nos marcam para sempre”.

(Cecília Meireles)

“Ensinar não é uma função vital, porque não tem o fim em si mesma; a função vital é aprender.”

Aristóteles

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	11
RESUMO	14
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Osseointegração	18
2.2 Superfície dos implantes.....	22
2.3 Osteoporose	28
2.4 Terapia com laser de baixa potência.....	32
3 PROPOSIÇÃO	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 Confeção dos implantes.....	41
4.2 Animais experimentais e procedimento cirúrgico	44
4.3 Análise metalográfica e de rugosidade.....	53
4.4 Preparo histológico	54
4.5 Análise histomorfométrica e histológica	56
4.6 Análise estatística.....	57
5 RESULTADOS	59
5.1 Caracterização dos implantes	59
5.1.1 Análise metalográfica.....	59
5.1.2 Análise de rugosidade.....	61
5.2 Análise histológica (qualitativa) da neoformação óssea.....	62
5.3 Análise histomorfométrica da neoformação óssea	69
6 DISCUSSÃO.....	77
7 CONCLUSÃO	85
REFERENCIAS*	86

APÊNDICE.....	97
ANEXO	103
ABSTRACT	104

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Procedimentos da confecção dos implantes: a) pó de uréia (↘), pó de titânio (⇔); b) matriz utilizada para a compactação uniaxial; c) forno a vácuo utilizado para a sinterização; d) visão aproximada do implante poroso ; e) visão aproximada do implante rugoso.....	44
Figura 2 -	Comprovação do efeito da ovariectomia, após um mês da sua realização. a) aspecto macroscópico do útero de uma rata do grupo SHAM. b) aspecto macroscópico do útero de uma rata do grupo OVZ.	49
Figura 3 -	Procedimentos da cirurgia dos implantes: a) Exposição do Fêmur; b) Perfuração com a primeira broca; c) Ajuste do preparo com a segunda broca; d) Loja cirúrgica preparada para colocação dos implantes; e) Implante rugoso posicionado; f) Implante poroso posicionado; g) Sutura do tecido muscular; h) Sutura do tecido cutâneo.....	50
Figura 4 -	a) Aparelho de laser utilizado, b) Parâmetros dosimétricos empregados; c) Aplicação do laser no interior da cavidade cirúrgica, d) Aplicação do laser no tecido cutâneo.....	51
Figura 5 -	Esquema de divisão dos animais por grupo	52
Figura 6 -	Fotomicrografia de MEV com aumento de 1500x: observar a interligação entre os poros (*), microporos (→).....	60
Figura 7 -	Metalografia da amostra usinada, exibindo poros (→) isolados.....	60
Figura 8 -	Grupo sem laser, sacrifício em 2 semanas: a) Aumento original 20X, cortical óssea (►), medular (▲), b) Aumento original 40X, osteoblastos e tecido osteóide (⇔) e delimitação entre osso neoformado(▽) e osso preexistente (↔),mastócito (↙)..	64

- Figura 9 - Cortes dos fêmures das ratas que receberam laserterapia, sacrificadas 4 e 6 semanas após a cirurgia, obtidos por desgaste e observados em MO: a),b) Aumento original 10X, visão geral do implante rugoso no interior do fêmur, observar formação de tecido ósseo na superfície externa do implante (⇔); c),d) Aumento original 40X, 20X respectivamente, visão em maior aumento da interface osso-implante, (▲) osso trabecular bem proliferado..... 65
- Figura 10 - Período de sacrifício de 2 semanas, aumento original 20X: a),b) interface osso- implante nos implantes rugosos; c),d) interface osso-implante nos implantes porosos;e) migração de tecido ósseo (trabecular e osteóide) para o interior dos poros, grupo laserterapia, implante poroso; f),g) intercomunicação dos poros; h) grupo sem laser, implante poroso, poros sem neoformação óssea. 66
- Figura 11 - Cortes dos fêmures das ratas, obtidos por desgaste e observados em MO, aumento original 20X: a) grupo laser 2 semanas, cortical óssea (▲) ,medular (△), ponte de neoformação óssea (⬇); b) grupo sem laser, implante poroso (◁), ponte de neoformação óssea (↙); c) grupo laser, 6 semanas período de sacrifício, ponte de neoformação óssea (⇔); d) grupo laser, 6 semanas, linha (↔) demarcando osso neoformado (▼) e osso preexistente (▽); e) grupo laser, sacrifício de 2 semanas, tecido ósseo bem celularizado (▲)..... 67
- Figura 12 - Lâminas dos cortes obtidos por desgaste dos fêmures das ratas, aumento original 40X: a) 4 semanas de sacrifício, implante poroso (*) poros preenchidos por tecido ósseo (#); b) 6 semanas de período de sacrifício, poros preenchidos por tecido ósseo (#); c) 2 semanas de sacrifício, grupo laser, poros parcialmente preenchidos por tecido ósseo (#); d) 2 semanas de sacrifício, sem laser, poros sem tecido ósseo em seu interior (#); e) interface osso (§) implante rugoso (*), f) interface osso-implante poroso, crescimento ósseo para dentro dos poros (#)..... 68

Figura 13 -	Gráfico de colunas (média±desvio padrão da neoformação óssea (%) dos dados obtidos nos grupos SHAM e OVZ, referentes aos dois tipos de implante e nos 3 tempos de sacrifício.....	72
Figura 14 -	Gráfico de colunas (média±desvio padrão da neoformação óssea (%) dos dados obtidos nos grupos SHAM, referentes aos dois tipos de implante e nos 3 tempos de sacrifício.....	73
Figura 15-	Gráfico de colunas (média±desvio padrão) da neoformação óssea (%) dos dados obtidos nos grupos sem laser, referentes aos dois tipos de implante e nos 3 tempos de sacrifício.....	74
Figura 16 -	Gráfico de colunas (média±desvio padrão) da neoformação óssea(%) dos dados obtidos nos grupos que receberam tratamento com laser, referentes aos dois tipos de implante e nos 3 tempos de sacrifício.....	75
Figura 17 -	Gráfico da neoformação óssea (%) dos dados obtidos nas interações dos fatores laser, osteoporose (ovariectomia), tempo de sacrifício e tipos de implantes.....	76

Barbara MAM. Influência da superfície do implante e da laserterapia na osseointegração, em ratas osteopênicas [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2009.

RESUMO

Com o aumento da expectativa de vida da população é importante o estudo de tratamentos alternativos e de biomateriais que visam auxiliar no processo de osseointegração em pessoas com osteoporose. O presente estudo avaliou e comparou a osseointegração de implantes cilíndricos de superfície porosa com implantes cilíndricos de superfície rugosa, ambos de titânio, em ratas osteopênicas e normais, por meio de análise histológica e histomorfométrica. Avaliou também a influência do tratamento com laser de baixa potência (Arseneto de Gálio Alumínio) sobre a osseointegração. Os implantes foram inseridos em 84 ratas, cada rata recebeu um implante poroso no fêmur esquerdo e um implante rugoso no direito. Quarenta e dois dos animais foram submetidos à cirurgia de ovariectomia (OVZ) e 42 foram falsamente operados (SHAM). Após um mês, as ratas foram divididas em 4 grupos, com 21 animais cada, de acordo com o tratamento recebido: a) grupo 1 (SHAM): cirurgia de colocação dos implantes (CI); b) grupo 2 (SHAM): CI e aplicação do laser de baixa potência (LLLT); c) grupo 3 (OVZ): CI; d) grupo 4 (OVZ): CI e LLLT. Sete animais de cada grupo, selecionados aleatoriamente, foram sacrificados 2, 4 e 6 semanas após a cirurgia, os fêmures contendo os implantes foram submetidos à análise histológica e histomorfométrica. Na análise histológica observou-se que houve osseointegração em ambos implantes nos diferentes grupos. Após avaliação da análise histomorfométrica verificou-se que o grupo 4, os implantes do tipo poroso, com animais sacrificados 4 semanas após a cirurgia de implante exibiu maior porcentagem de neoformação óssea, seguido do grupo 2, com implante poroso 4 e 6 semanas de período de sacrifício. Concluiu-se que a laserterapia melhora significativamente a neoformação óssea e que os implantes de superfície porosa apresentam maior área para contato na interface osso-implante.

Palavras-Chaves: Implante. Osseointegração. Interface. Fixação. Laser.

1 INTRODUÇÃO

A implantação de materiais metálicos no corpo humano é mais uma alternativa para restaurar partes danificadas, melhorando a qualidade de vida das vítimas de traumas ou de doenças degenerativas. Esses materiais são denominados biomateriais. Os biomateriais podem ser utilizados no interior do corpo humano durante um período determinado de tempo ou não (endopróteses ou implantes), sendo empregados para tratamento, ampliação ou substituição de quaisquer tecidos, órgãos ou funções corporais como um todo ou parte integrante de um sistema. A escolha de um biomaterial deve ser criteriosa e deve obedecer a um conjunto de requisitos: não interferir no mecanismo de defesa do organismo, exibir propriedades coerentes com a função específica do implante e apresentar resistência à corrosão (Fonseca et al., 2005).

A osseointegração pode ser definida como uma interdigitação estrutural e funcional entre o osso organizado e o implante, estabelecendo-se uma união estável entre os mesmos (Branemark, 1983).

Os implantes cirúrgicos apresentam uma grande diversidade de tamanhos e formatos, e os mais utilizados são os cilíndricos e os cônicos rosqueados. Independentemente do seu formato externo, os implantes podem ainda apresentar diferentes topografias de superfície, como lisa, rugosa ou porosa. A superfície porosa tem recebido destaque na implantodontia como uma alternativa de acabamento superficial, visando melhorar a resistência interfacial entre o material e o osso, através da interdigitação do tecido ósseo com o implante, proporcionando uma forte fixação osso-implante de titânio (Ozaki et al.,

2001; Scharweber et al., 2002; Vasconcellos et al., 2003; Vasconcellos, 2005; Vasconcellos et al., 2008).

A qualidade do osso do hospedeiro no qual o biomaterial/implante será inserido deve ser um dos principais fatores a ser considerado (Fini et al., 2001).

A osteoporose constitui umas das osteopatias mais comuns, sendo caracterizada pela redução da massa óssea, determinada pelo desequilíbrio existente entre reabsorção e neoformação óssea. Acredita-se que a diminuição do estrógeno é o fator determinante e responsável pela gênese da osteoporose após a menopausa (Bandeira et al., 2000), resultando em perda óssea mais intensa nos cinco anos que se seguem a ela (Genant et al., 1999). Essa condição é mais freqüente e mais dramática nas mulheres, que chegam a perder cerca de 40%-50% da massa óssea até o final da vida (Aires, 1999). Na presença de osteoporose, o biomaterial do implante deve compensar as limitações de osseointegração no osso osteopênico (Fini et al., 2001), induzindo a neoformação óssea por meio de modificações na sua microtopografia superficial, como a superfície porosa.

A laserterapia tem sido utilizada para estimular o crescimento ósseo em indivíduos que precisam receber implantes, mas que apresentam grande perda óssea ou alterações metabólicas que afetam o processo de remodelação óssea e osseointegração como a osteoporose (Artioli, 2005). O laser de baixa potência (terapêutico) tem sido empregado na cicatrização de tecidos duros e moles, visto que o laser acelera o processo de reparo do tecido, promove um efeito antiinflamatório, analgésico, estimula o sistema imunológico e participa da regeneração celular (Gutknecht et al., 2004).

Diante do exposto torna-se importante avaliar a osseointegração de implantes de titânio com diferentes superfícies (porosa e rugosa) em ratas osteopênicas e também a influência do tratamento com laser de baixa potência sobre a osseointegração.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O osso pode ser considerado como a maior conquista na evolução dos tecidos de suporte, apresentando um excelente comportamento mecânico. Além disso, dentre os tecidos altamente organizados, possui um raro potencial regenerador, reconstruindo sua estrutura original após um defeito ou fratura (Schenk, 1998). Em sua organização microscópica são encontrados dois tipos de tecido ósseo: osso lamelar e osso entrelaçado. As duas variedades podem estar mineralizadas ou não mineralizadas, sendo estas últimas denominadas de tecido osteóide. O osso lamelar é produzido lentamente e é muito organizado, já o osso entrelaçado é depositado mais rapidamente possuindo uma disposição irregular de fibras de colágeno tipo I apresentando muitos osteócitos em sua matriz. Macroscopicamente são reconhecidos dois tipos de osso: o osso cortical (denso e compacto) sendo suas funções principalmente biomecânicas, e o osso esponjoso (ou medular) o qual contém mais células ósseas que o osso cortical, apresentando muitas das alterações da renovação óssea (Rubin et al., 1990).

Os dois principais tipos celulares encontrados no tecido ósseo são os osteoclastos e os osteoblastos envolvidos no processo da remodelação óssea. A remodelação óssea corresponde a um processo complexo que envolve a reabsorção óssea em uma superfície óssea particular, seguida por uma fase de formação óssea. Em indivíduos sob condições normais, há um balanço entre a quantidade de osso reabsorvido pelos osteoclastos e a quantidade de osso formado pelos osteoblastos. A ativação da seqüência dos eventos celulares

responsáveis pela remodelação óssea é localmente controlada por fatores hormonais sistêmicos e por fatores locais (Hill, 1998).

O padrão do reparo ósseo assemelha-se rigorosamente aos eventos ocorridos no desenvolvimento e crescimento, sendo o crescimento aposicional. Em sua fase inicial, apresenta um modelo de osso trançado sendo gradualmente reforçado (substituído) por osso lamelar. Este osso primariamente formado é então transformado em osso cortical compacto ou osso trabecular. Na segunda fase, o reparo sofre profunda remodelação e substituição por unidades de remodelamento (BMUs). Em condições estáveis o osso é formado diretamente ou primariamente, propiciado por duas condições essenciais, amplo suprimento sangüíneo e uma base sólida para deposições ósseas, sendo essa base fornecida pela superfície da extremidade do fragmento ou pela margem óssea do defeito (Roberts, 1988).

A osteoporose atinge uma em cada quatro mulheres na menopausa e, após os 65 anos, uma em cada três. A redução da massa óssea após a menopausa apresenta relação primária com o funcionamento ovariano (Modesto-Filho et al., 1996).

A terapia com laser de baixa potência tem sido amplamente utilizada para tratar injúrias de tecido duro promovendo cura e reduzindo a dor (Nissan et al., 2006).

2.1 Osseointegração

A osseointegração pode ser definida como a interdigitação estrutural e funcional entre o osso organizado e o implante de titânio, estabelecendo-se uma união estável entre os mesmos (Branemark, 1983). Os fatores de importância primária para a osseointegração do implante dental estão correlacionados com as

características da sua superfície que incluem topografia e as propriedades químicas e elétricas do material (Roberts, 1988; Pilliar et al., 1998). Portanto, a interação tecido ósseo-implante está relacionada principalmente com as camadas mais externas dos implantes (Fini et al., 2003).

Os biomateriais podem ser conceituados como materiais sintéticos e naturais, os quais são utilizados em contato com sistemas biológicos. Estes materiais apresentam características especiais, que lhes permitem estar em contato com o sistema biológico sem que desencadeie uma reação de rejeição (Brandon et al., 1999). O biomaterial ideal deveria possuir as mesmas características de biocompatibilidade e taxa de osseointegração quando testado em condições normais e patológicas (Fini et al., 2001). Dentre os tipos de biomateriais encontram-se os metais, os polímeros, os cerâmicos e os compósitos. A biocompatibilidade é essencial para a implantação *in-vivo* dos biomateriais, de modo a minimizar quaisquer possíveis reações de rejeição. A esterilidade do biomaterial é uma propriedade extremamente importante na área dos biomateriais (Brandon et al., 1999).

Os biomateriais mais utilizados para a fabricação de próteses são o titânio (e suas ligas), o Vitalium e o aço Inoxidável 316L (Fonseca et al., 2005).

Os implantes de titânio e suas ligas são amplamente utilizados na área da cirurgia, sejam ortopédicos ou dentais, devido à excelente combinação de suas propriedades de resistência à corrosão, resistência mecânica e biocompatibilidade (Okazaki et al., 2001; Scharweber et al., 2002; Vasconcellos, 2005). Implantes de titânio são geralmente fabricados comercialmente por titânio puro ou ligas de titânio (Diniz et al., 2002; Zinger et al., 2005). A microfotografia das superfícies de implantes é considerada muito importante para o estudo da osseointegração, visto que os eventos que ocorrem na interface osso-

implante são de maior importância na osseointegração do material (Diniz et al., 2002).

A osseointegração ocorre após a inserção de um implante de titânio no osso, devido à migração de células ósseas para a superfície desse metal (Aires, 1999) resultante de uma seqüência programada de eventos que se inicia predominantemente pela remodelação do tecido ósseo na sua superfície periosteal e endosteal (Roberts, 1988).

A superfície do implante deve permitir crescimento prévio de fibras de adesão, vasos sanguíneos e eventualmente a formação de novo osso, auxiliado por uma estabilidade inicial obtida pela redução do micro movimento (Davies, 2007; Schenk e Buser, 2000). Quando o micro movimento não pode ser reduzido a um nível mínimo, resultará na formação de um tecido fibroso na superfície do implante ao invés de uma interface rígida (Branemark, 1983).

Os implantes podem apresentar diferentes tipos de superfície: lisa, rugosa ou porosa (interligada ou não) (Deporter et al., 1990). Os implantes porosos visam propiciar melhor osseointegração, uma vez que esta é obtida por meio do crescimento ósseo para o interior dos poros denominado *bone ingrowth* (Deporter et al., 1990; Deporter et al., 2002; Fini et al., 2003; Frosch et al., 2003; Zhu et al., 2004). Estes poros apresentam aspecto tridimensional interligado em toda a sua espessura, o qual permite o crescimento do tecido ósseo para o interior dos mesmos, promovendo forte adesão entre o osso e o implante (Deporter et al., 1990; Kim et al., 2000; Vasconcellos, 2005). Este crescimento ósseo para dentro dos poros da superfície metálica depende de vários fatores, tais como a porosidade da superfície, a estabilidade do implante, o grau de micro movimento entre o implante e o osso, o tipo de tecido ósseo do hospedeiro, se trabecular ou cortical e a presença de lacunas entre o implante e a superfície óssea (Tisdell et al., 1994).

Fini et al. (1997) implantaram cilindros de hidroxiapatita (HA) e titânio Ti6Al4V no interior do côndilo femoral de ratos normais e

osteopênicos. Após 2 meses, observaram que houve uma diminuição na taxa de osseointegração, em ambos materiais, nos animais osteopênicos, quando comparados aos animais saudáveis, sendo este valor mais significativo para HA.

Fini et al. (2001), avaliaram a osseointegração e a biocompatibilidade de dois vidros cerâmicos biológicos RKKP e AP40 no osso osteoporótico *in vivo* e *in vitro*, usando implantes de titânio Ti6Al4V como controle. Trinta e seis ratas, divididas em grupo controle e grupo osteopênico, foram utilizadas no estudo *in vivo*, e células derivadas de osso normal e células derivadas de ratas osteopênicas no estudo *in vitro*. Todos os animais receberam os implantes de Ti6Al4V, AP40 ou RKKP na região distal do fêmur esquerdo pelo período de 2 meses. No estudo *in vivo* o grupo com osteopenia apresentou uma diminuição na osseointegração em todos os materiais testados, confirmando a necessidade de um estudo preclínico *in vivo* dos biomateriais em animais patológicos. Com relação à pesquisa *in vitro*, verificou-se que não houve diferença entre o osso normal e o osso derivado de células osteopênicas quanto à osseointegração.

Oyonarte et al. em 2005 compararam os efeitos do formato dos implantes de titânio na ortodontia através de estudo com cinco cães, os quais receberam 3 implantes de superfície porosa no lado direito da mandíbula e 3 de superfície rugosa no lado esquerdo, imediatamente após as exodontias dos molares. Após 6 semanas foi realizada a reabertura e os implantes receberam carga ortodôntica por um período de 22 semanas. Depois do sacrifício dos animais, foi realizada análise histomorfométrica de uma secção da interface osso-implante por MO e MEV. Os resultados demonstraram que independentemente do formato, todos os implantes apresentaram-se osseointegrados, havendo menor perda óssea na região coronária do implante de superfície porosa. Os autores concluíram que tais implantes podem ser utilizados com sucesso na ancoragem ortodôntica. A técnica de fluorescência também foi

utilizada para a avaliação dos implantes. Foi observado que aqueles de superfície porosa apresentaram níveis mais altos de osso marginal e maior contato osso-implante. Os autores concluíram que diferentes formatos de implante interferem na remodelação e neoformação óssea e os implantes de superfície porosa podem ser mais efetivos para aplicações ortodônticas.

Brentel et al. em 2006 produziram implantes de titânio denso com superfície rugosa e implantes porosos, ambos produzidos pela técnica de metalurgia do pó. Neste estudo foram utilizados sete coelhos, que receberam 2 implantes porosos na tíbia esquerda e 2 implantes rugosos na direita. Após 4 semanas, os animais foram sacrificados e a reparação óssea foi comparada entre os dois tipos de implantes. Os autores concluíram que os implantes porosos apresentam maior área de contato com o tecido ósseo resultando em maior fixação do implante ao osso.

Sargeant et al. (2008) realizaram um estudo utilizando implantes ósseos porosos híbridos, contendo espumas de Ti-6Al-4V, com 52% de porosidade e medindo 3 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro. Foram utilizados 13 ratos, os quais receberam dois implantes em cada fêmur. Após 4 semanas os animais foram sacrificados. Os autores observaram neoformação óssea adjacente e no interior dos poros após 4 semanas, demonstrando forte evidência de osteocondução. Concluíram que implantes ósseos híbridos com espumas metálicas têm um potencial para induzir mineralização e direcionar uma resposta celular do tecido hospedeiro até a interface osso-implante.

2.2 Superfície dos implantes

Diversas geometrias têm sido desenvolvidas para a superfície do implante, visando melhorar a osseointegração e reduzir o micro movimento iniciais do implante (Chang et al., 1998). A geometria da superfície determina as interações de células e proteínas com a superfície do implante (Kasemo; Gold, 1999). O aumento da superfície áspera do implante está associado com melhor adesão celular, maior contato osso-implante e interação biomecânica aprimorada (Davies, 2007). Além disso, a interação osso-implante e as condições que favorecem a osseointegração dependem das propriedades físicas e químicas da superfície do implante (Diniz et al., 2002; Borsari et al., 2005). Muitos estudos têm demonstrado que superfícies rugosas, desenvolvidas por técnicas tais como corrosão ácida (Diniz et al., 2002; Zinger et al., 2005), oxidação anódica (Zhu et al., 2004), e jateamento de areia (Svehla et al., 2000; Diniz et al., 2002) parecem ter efeito direto na diferenciação e proliferação celular, visto que o comportamento dos osteoblastos é sensível às características bioquímicas e estruturais do material (Zhu et al., 2004; Zinger et al., 2005). Estudos também demonstram que o tratamento de superfície tais como revestimento biomimético, deposição de fosfato de cálcio (Nguyen et al., 2004) ou hidroxiapatita (Fini et al., 2003) promovem aumento da osseointegração (Nguyen et al., 2004; Fini et al., 2003). Assim, modificações na superfície do implante são confeccionadas com o propósito de permitir e aprimorar o crescimento ósseo, proporcionando melhor fixação do implante no osso (Kim et al., 2000; Vasconcellos, 2005; Vasconcellos et al., 2008), maior contato osso-implante na interface (Svehla et al., 2000; Vasconcellos, 2005; Vasconcellos et al., 2008) e iminente formação óssea (Deporter et al., 2001; Deporter et al., 2002).

Os implantes porosos necessitam apresentar poros interconectados, os quais fornecem espaço adequado para a neovascularização, primordial para o crescimento continuado de osso mineralizado (Itälä et al., 2001). A remodelação óssea no interior dos

poros é essencial para a estabilidade a longo prazo da interface osso-implante (Götz et al., 2004).

Os implantes de superfície porosa permitem a proliferação de tecido ósseo para o interior dos poros (Vasconcellos, 2005; Deporter et al., 2001; Deporter et al., 2002), resultando no aumento da área de superfície, a qual melhora a osseointegração do implante ao osso, devido a capacidade de interconexão mecânica entre o implante e o tecido. Adicionalmente ocorre uma osseointegração mais rápida e também há maior prevenção na perda do implante (Kim et al., 2000; Diniz et al., 2002; Liu et al., 2000; Takemoto et al., 2005). Os poros precisam ser interconectados para permitir o crescimento ósseo até o seu interior. Nos implantes de superfície porosa é evidente que o crescimento ósseo para dentro dos poros resulta em uma osseointegração aperfeiçoada e em uma estabilidade mecânica, devido a união do tecido ósseo circundante com o implante (Vasconcellos et al., 2008).

Implantes de superfície porosa e rugosa podem tornar-se osseointegrados dentro de condições apropriadas. Apesar de a osseointegração ocorrer através da integração mecânica do osso com o implante em ambos os casos, a extensão e a natureza desta integração mecânica é muito diferente. Os implantes porosos tornam-se integrados tridimensionalmente com o osso como resultado do crescimento ósseo para o interior dos poros nas três dimensões (Pilliar et al., 1998). Na osseointegração dos implantes rugosos e lisos ocorre somente a justaposição de osso com as suas superfícies (Deporter et al., 1990).

Os poros interconectados são importantes para a integração tridimensional com o osso, obtendo resistência máxima em curto espaço de tempo (Pilliar et al., 1998). A interconexão do poro aumenta o contato osso-implante e a proliferação óssea com o tempo. Assim, o desenvolvimento de implantes porosos visa providenciar implantes mais estáveis e fixação mais eficientes dos implantes de titânio,

como demonstrado em estudos anteriores (Kim et al., 2000; Liu et al. 2000; Deporter et al., 2002).

Kujala et al. em 2003 realizaram um estudo para avaliar o efeito da porosidade na osseointegração de implantes de níquel-titânio em fêmures de 35 ratos, por 30 semanas. As porosidades (média por volume não preenchido) e a média do tamanho dos poros foram 66,1% e $259 \pm 30 \mu\text{m}$ grupo 1, $n = 14$), 59,2 e $272 \pm 17 \mu\text{m}$ (grupo 2 $n = 4$) e 46,6% e $505 \pm 136 \mu\text{m}$ (grupo 3 $n = 15$), respectivamente. Os autores concluíram que a porosidade de 66,6% e tamanho médio dos poros de $259 \pm 30 \mu\text{m}$ demonstrou melhor contato ósseo (51%) dentre as outras porosidades testadas. No entanto na porosidade de 46,6% e $505 \pm 136 \mu\text{m}$ o contato ósseo não foi significativamente inferior (39%) e apresentou a menor incidência de tecido fibroso no interior dos poros.

Em 2004, Götz et al. estudaram o efeito do acabamento de superfície na osseointegração de implantes de liga de titânio (Ti6Al4V) tratados por laser com poros de tamanho 100, 200 e 300 μm e compararam especificamente com implantes de 200 μm com superfícies jateadas por óxido de alumínio. Foram utilizados neste estudo 45 coelhas, que receberam dois implantes em cada fêmur. A interface osso-implante e o tecido ósseo recém-formado dentro dos poros e o tecido ósseo peri-implante foram examinados 3, 6 e 12 semanas após a colocação dos implantes. Concluiu-se que superfícies jateadas e os implantes tratados por laser com poros de 200 μm melhoraram a osseointegração, 12 semanas pós-implantação. Ocorreu a formação de osso lamelar nos poros de todos os tamanhos (100, 200 e 300 μm), entretanto a quantidade de osso lamelar dentro dos poros foi linearmente relacionada com o tamanho dos poros. Nos poros de 100 μm , a taxa de formação óssea foi mais baixa quando comparado com os outros implantes nos dois tipos de superfícies (jateadas por óxido de alumínio ou tratadas por laser) no período de tempo de 30 e 40 dias do estudo. No tecido ósseo peri-implante não observaram diferença na taxa de formação óssea nas

diferentes superfícies nos grupos de 12 semanas. Implantes com poros de 300 μm com superfície texturizada por laser demonstraram inicialmente uma osseointegração mais lenta quando comparada com os poros de 200 μm de tamanho. Assim, os autores concluíram que 200 μm pode ser o tamanho ótimo dos poros para implantes de titânio (Ti6Al4V) texturizados por laser e o tratamento com laser em combinação com superfícies jateadas pode ser uma tecnologia muito interessante para a estruturação das superfícies de implante.

Xue W et al. em 2007, avaliaram os efeitos da estrutura porosa em células ósseas in vitro através de cultura de células osteoblásticas humanas (OPC1). Foram utilizadas estruturas de titânio poroso com porosidade controlada na faixa de 17 a 58% por volume, e tamanho dos poros 50, 100, 150, 200 e 300 μm produzidos por parâmetros controlados. Os resultados revelaram que as células se propagaram bem na superfície do titânio poroso criando forte adesão local. Foram encontradas maior quantidade de matriz extracelular e maior nível de expressão de fosfatase alcalina nas amostras de titânio poroso do que na placa de titânio. Isso pode ser benéfico para uma integração mais rápida nas superfícies de implante poroso com o tecido ósseo do hospedeiro. Os autores concluíram que é necessário um tamanho crítico do poro de 200 μm ou maior para o crescimento das células osteoblásticas para dentro dos poros.

Geralmente, a fabricação da superfície porosa de implantes de titânio é obtida por meio das seguintes técnicas: pulverização de plasma (Takemoto et al., 2005), dissolução anódica (Zinger et al. 2005), jateamento de areia (Diniz et al. 2002, Zinger et al. 2005), ou oxidação (Liu et al., 2000). Contudo, essas técnicas produzem poros sem interconectividade, somente cavidades. As técnicas estão continuamente sendo desenvolvidas e investigadas, produzindo assim modificações físico-químicas e morfológicas na superfície (Borsari et al. 2005).

Poucas técnicas metalúrgicas são capazes de fabricar estes poros interconectados, podem ser citadas as técnicas de metalurgia do pó, sinterização de pó de titânio esférico atomizado por meio elétrico, técnica de revestimento múltiplo, e sinterização do pó (Svehla et al., 2000; Itälä et al., 2001; Wen et al., 2002; Vasconcellos et al., 2003; Nguyen et al. 2004).

A técnica da metalurgia do pó representa um processamento adequado para a fabricação de componentes de forma complexa, sem a necessidade de usinagem da peça (Vasconcellos et al., 2008). Logo esta técnica permite a confecção de implantes com poros interconectados, tal como uma rede tridimensional (Vasconcellos et al., 2003; Takemoto et al., 2005). Este processo de fabricação tem vantagens sobre as técnicas metalúrgicas convencionais, tais como economia de matérias-primas, redução de custos de manufatura, e redução do número de fases complementares nas amostras (Pilliar et al., 1998). Além disso, esta técnica proporciona o controle da composição química e aperfeiçoa as propriedades mecânicas do material, por meio do controle do pó e processo de sinterização (Pilliar, 1983). O tamanho do poro e a forma do poro podem ser também alterados pela escolha dos espaçadores de partículas (Wen et al., 2002).

A estrutura porosa precisa também ter alta porosidade, a qual propicia espaço suficiente para a conexão e proliferação de novo tecido ósseo e facilita o transporte de fluidos corpóreos (Vasconcellos et al. 2008). Quanto à porosidade e diâmetro do poro, estudos mostraram que os diâmetros do poro devem situar-se de 100 a 500 μm para promover crescimento tecidual no seu interior (Pilliar et al., 1998, Svehla et al., 2000; Wen et al., 2002). Com relação a porosidade, alguns pesquisadores reportaram que a porcentagem adequada de poros para as amostras de titânio situa-se entre 25% e 66% (Liu et al., 2000; Kujala et al., 2003). Takemoto et al. em 2005, sugeriram que titânio poroso, com 40% de porosidade poderia ser uma alternativa para aplicação clínica.

Entretanto, amostras com 5% e 80% de porosidade apresentaram também proliferação óssea (Wen et al., 2002). A porosidade aumentada permite o crescimento de tecido para dentro dos poros e subsequente mineralização (Liu et al., 2000), mas é necessário manter as propriedades mecânicas do material do implante (Wen et al., 2002). Características como o diâmetro dos poros e porosidade precisam ainda ser pesquisadas, por causa da grande dificuldade de correlacionar propriedades de superfície com resultados clínicos. Logo, a microtopografia ideal para os implantes porosos comerciais ainda não é conhecida (Svehla et al., 2000).

2.3 Osteoporose

A remodelação óssea é a renovação contínua da matriz óssea e mineral, envolvendo tanto a reabsorção (atividade osteoclástica) como a formação óssea reativa (atividade osteoblástica) (Hill et al., 1998). Tal processo assegura a integridade mecânica do esqueleto, desempenhando importante papel na homeostasia do cálcio. Desequilíbrios nesse processo de remodelação óssea podem ser decorrentes de muitas doenças metabólicas como a osteoporose (Najjar; Kahn, 1977).

Osteoporose é definida mundialmente como uma doença sistêmica esquelética caracterizada por densidade óssea baixa e deteriorização micro arquitetural do tecido ósseo, o que conduz ao aumento da fragilidade óssea e ao risco à fratura (Genant et al., 1999). A doença é considerada um problema de saúde pública devido ao seu impacto social, físico e econômico. A maioria dos casos de osteoporose ocorre em mulheres pós-menopausa, quando essas apresentam uma

deficiência estrogênica e esta condição está associada a um rápido aumento de reabsorção óssea (Reddy et al., 1995).

Devem-se diferenciar adequadamente os termos osteoporose e osteopenia. Por osteoporose, considera-se uma perda de massa óssea acima de 2,5 desvios padrões de uma curva de normalidade, medida em estudo populacional aberto, através da densitometria óssea. Este estado implica alto risco de fratura, devendo ser mensurado a partir da instalação da menopausa ou, quando existirem outros fatores que o justifiquem. O termo osteopenia, é usado se referindo a qualquer condição que envolva uma redução fisiológica (em relação à idade) da quantidade total de osso mineralizado. A osteopenia é considerada como se situando em zero e até menos de 2,5 desvios padrões, medidos através da densitometria óssea (Marques Neto, 1995).

A deficiência de estrógeno após a diminuição da função ovariana aumenta o ritmo da remodelação óssea e conduz a um desequilíbrio entre a formação e a reabsorção, resultando na perda óssea e osteoporose, estando estes processos interligados através de fatores locais e hormonais (Genant et al., 1999). Adicionalmente, a deficiência de estrógeno parece ter influência negativa na qualidade óssea ao redor dos implantes de titânio, causando alterações no processo de remodelação e reparo ósseo. As modificações estruturais do novo osso formado afetam principalmente a porosidade óssea (Duarte et al., 2003).

No estudo das causas, mecanismos de ação e terapêuticas aplicáveis no tratamento da osteoporose têm sido utilizados o modelo de rata castrada para indução de quadro osteopênico. A rata ovariectomizada mostra-se como um modelo de grande utilidade, principalmente por apresentar mecanismos biológicos semelhantes àqueles ocorridos em mulheres osteoporóticas (Frost; Jee, 1992).

Wronski et al. (1988) analisaram a relação entre a perda óssea e o aumento da remodelação óssea em relação ao tempo. Os

autores realizaram um estudo, no qual 90 ratas sofreram remoção dos ovários bilateralmente, e 90 falsa-ovarectomia, sendo sacrificadas em diferentes tempos que variavam entre 14 e 180 dias. Os autores observaram a osteopenia e o aumento do índice de reabsorção óssea aos 14 dias após a cirurgia, que se tornou gradualmente mais pronunciada até se estabilizar por volta dos cem dias. Os resultados indicaram uma fase de perda óssea inicial rápida nas ratas ovariectomizadas, coincidente com o aumento máximo na remodelação.

Carvalho (2001) afirma que a indução de osteopenia em ratas maduras pela ovariectomia, necessita de um período mínimo de trinta dias. O autor relata que a ovariectomia exerce influência sobre o tecido cortical, porém de forma menos expressiva, especialmente em curtos períodos de tempo.

No entanto, lesões ósseas podem consolidar-se mesmo sob condições de baixa densidade mineral e baixos níveis de estrógeno. Porém, a deficiência desse hormônio atrasa o processo de acréscimo de minerais à matriz osteóide. Assim, o tecido ósseo neoformado nos animais osteopênicos pós-lesão óssea apresenta alterações osteoporóticas, como por exemplo, baixos valores para as propriedades mecânicas, menor quantidade de osso mineral e diminuição da densidade óssea, sugerindo uma qualidade óssea inferior (Kubo et al., 1999).

Em 1999, Kubo et al. (1999) não encontraram diferenças na reparação óssea entre o grupo ovariectomizado e o grupo controle até as primeiras seis semanas. Contudo, 12 semanas após a fratura, foram observadas alterações histológicas osteoporóticas e diminuição da densidade mineral óssea (DMO), sugerindo que a ovariectomia afeta a reparação óssea em seus períodos tardios e não interfere no processo em suas fases iniciais.

Lill et al. em 2003 realizaram um estudo para verificar a influência da osteoporose na reparação óssea de defeito não-crítico em tibia de ovelhas ovariectomizadas. A densidade do calo foi determinada

0, 4 e 8 semanas após a cirurgia de confecção da fratura óssea, por meio de tomografia computadorizada quantitativa periférica. Embora a densidade mineral óssea dos animais com osteoporose tenha aumentado com o tempo, foi observada diferença estatisticamente significativa entre este grupo e o de ovelhas normais. Assim os autores demonstraram um atraso na reparação de fratura em relação à formação, mineralização e propriedades mecânicas do calo ósseo.

Xu et al. (2003), verificaram que a osteoporose influencia a quantidade e a qualidade do calo ósseo, podendo ter relação com o decréscimo da expressão de TGF-beta-1 em osteoblastos.

Abrahão et al. (2006) avaliaram a ação da atividade física sobre as propriedades mecânicas dos fêmures e tíbias de ratas adultas, ovariectomizadas e submetidas à atividade física. Os autores concluíram que a atividade física aplicada por trinta minutos, cinco dias por semana durante 9 semanas a 0,31 m/s não foi suficiente para corrigir as alterações biomecânicas do tecido ósseo provocadas pela ovariectomia.

Em 2007, Anbinder et al. avaliaram a influência da deficiência estrogênica e dos tratamentos com sinvastatina ou alendronato sódico no osso alveolar em ratas. Foram utilizadas 54 ratas, divididas em grupo ovariectomizado e grupo "sham". Após um mês os animais foram divididos de acordo com o tratamento recebido, passaram a receber diariamente, via oral, 25 mg/kg de sinvastatina ou 2 mg/kg de alendronato ou água (grupo controle) e foram sacrificados 35 dias depois do início do tratamento. Os autores concluíram que as ratas ovariectomizadas ganharam mais peso que as demais, a ovariectomia reduziu a densidade óssea alveolar e o tratamento com alendronato sódico foi eficiente para o tratamento desta condição patológica.

A compreensão sobre o comportamento da reparação óssea em indivíduos com osteoporose é essencial para o estabelecimento de medidas terapêuticas mais objetivas resultando na redução do período

de tratamento, bem como melhores condições de reabilitação e qualidade de vida.

Objetivando reduzir a incapacidade substancial associada à fratura óssea em pessoas com osteoporose e os altos custos socioeconômicos, uma variedade de intervenções tem sido estudada incluindo a terapia com laser de baixa potência (Nicola et al., 2003).

2.4 Terapia com laser de baixa potência

A terapia com laser de baixa potência tem sido amplamente utilizada para tratar injúrias de tecido duro promovendo cura e reduzindo a dor (Nissan et al., 2006).

Os laseres de arsênio-gálio-alumínio e hélio-neônio têm sido utilizados no processo de cicatrização de tecidos ósseos, proporcionando aumento da atividade celular, com pouca alteração da estrutura óssea em defeitos ósseos em animais (Garavello-Freitas et al., 2003; Nicolau et al., 2003).

O efeito da irradiação do laser de baixa potência no crescimento ósseo e reparação têm sido pouco investigados. O laser de baixa potência induz a formação óssea e revascularização, aumentando a quantidade de cálcio, fósforo, colágeno e redes de trabeculados densos (Coombe et al., 2001). Takeda (1988) sugeriu que a irradiação por laser de baixa potência tem um efeito benéfico na cura inicial de fraturas ósseas.

O mecanismo exato da ação da terapia com laser de baixa potência (LLLT) não é ainda totalmente conhecido. Estudos científicos consideráveis, incluindo o uso de cultura de células, modelos animais e estudos clínicos, têm sido conduzidos para avaliar os efeitos da biomodulação celular da LLLT. É ainda incerto se essa biomodulação

sobre a formação óssea é uma consequência da estimulação de células mesenquimais ou da estimulação direta de osteoblastos. (Obradovic et al., 2008). Alguns autores têm salientado que a LLLT pode acelerar a formação óssea pelo aumento da atividade osteoblástica, vascularização e organização das fibras colágenas (Trelles et al., 1987; Baruska et al., 1995; Ozawa et al., 1998).

A utilização do laser diodo arseneto de gálio e alumínio (GaAlAs) tem crescido substantivamente nos últimos dez anos. Este tipo de laser possui alta profundidade de penetração nos tecidos em comparação com outros tipos, oferecendo assim uma grande efetividade clínica (Nissan et al., 2006).

Em tecidos duros, irradiações com laser de baixa potência, aumentam significativamente o número de osteócitos viáveis no osso irradiado, promovendo um efeito positivo na produção da matriz óssea (Dörtbudak et al., 2002). A utilização do laser pode diferir quanto ao tipo de meio ativador, quanto à potência e dose utilizada e, quanto ao modo e número de aplicações, não havendo ainda na literatura um protocolo padrão da irradiação. As feridas podem ser irradiadas de maneira pontual ou em varredura. O laser pode ser utilizado numa única aplicação (Garcia et al., 1995; Tartarunas et al., 1998) ou em várias aplicações no período pós-operatório (Tartarunas et al., 1998; Lucas et al., 2003; Bourguignon-Filho et al., 2005). Estudos demonstram que o aumento do número de aplicações promove aceleração do processo de cicatrização tecidual (Bourguignon-Filho et al., 2005).

Freitas et al. (2000) e Barushka et al. (1995) afirmaram que a terapia com laser de baixa potência pode acelerar a formação óssea, aumentando a atividade osteoblástica, vascularização (Trelles et al., 1987), organização de fibras colágenas (Garavello-Freitas et al., 2003) e níveis de ATP (Karu et al., 1995).

O laser de arsênio-gálio tem sido utilizado com diferentes doses: 0.36 J/cm^2 ; 1 J/cm^2 (Lucas et al., 2003); 2 e 4 J/cm^2 (Tartarunas et

al., 1998); 3 J/cm² (Garcia et al., 1995) e 3,4 e 5 J/cm² (Pereira et al., 2002). No estudo de Pereira et al. em 2002, somente doses de 3 e 4 J/cm² obtiveram efeito no crescimento celular em cultura de fibroblastos.

Dependendo da fase do reparo ósseo, a terapia com laser de baixa potência pode acelerar a reabsorção ou a atividade de formação óssea em fêmures fraturados de ratas (Coombe et al., 2001; Nicolau et al., 2003). Nicola et al. (2003) e Coombe et al. (2001) sugerem que a ação estimulatória da irradiação laser ocorre durante os estágios iniciais e proliferativos de diferenciação de precursores imaturos, mas não ocorre durante estágios tardios da reparação óssea.

Segundo Ozawa et al. (1998) o mecanismo estimulador da irradiação por laser na formação óssea pode alterar fatores de crescimento, citocinas ou prostaglandina com propriedades indutoras de diferenciação, produzidas por linhagem de células osteoblásticas.

Pinheiro et al. (2003), avaliaram histologicamente a influência da radiação laser não-cirúrgica, utilizando o laser GaAlAs (comprimento de onda = 830 nm) sobre o reparo ósseo de defeitos padronizados em fêmur de ratos Wistar albinus e submetidos a implante de osso bovino inorgânico. Os animais foram irradiados a cada 48 h, sendo a primeira irradiação realizada imediatamente após a cirurgia. Os animais foram irradiados transcutaneamente em 4 pontos em torno da ferida. Cada ponto recebeu uma dose de 4 J/cm² (40 mw de potência) e a dose total por sessão foi de 16 J/cm². Os sacrifícios foram realizados 15, 21 e 30 dias após a cirurgia. Os resultados encontrados pelos autores mostraram evidências de um reparo ósseo mais avançado nos espécimes irradiados em relação aos não-irradiados. O reparo nos espécimes irradiados foi caracterizado por uma maior neoformação óssea, bem como por uma maior proliferação de fibras colágenas no interior do defeito a partir de 15 dias após a cirurgia. Os autores concluíram que a laserterapia resultou num efeito de biomodulação positiva sobre o reparo do defeito ósseo submetido a implante de osso bovino inorgânico.

Khadra et al. (2004) investigaram o efeito da terapia com laser de baixa potência (LLLT) na junção, proliferação, diferenciação e produção de fator de crescimento $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) pelas células humanas semelhantes a osteoblastos (HBO). Células derivadas do osso mandibular humano foram expostas ao laser diodo GaAlAs à dosagem de 1,5 ou 3J/cm² e então semeadas no interior de discos de titânio. Os autores concluíram que a LLLT aumentou significativamente a junção e proliferação celular, diferenciação e produção de TGF- $\beta 1$ em relação ao grupo controle, indicando *in vitro* que a LLLT pode modular a atividade de células e tecidos ao redor do material do implante.

Gerbi et al. (2005) avaliaram histologicamente o efeito do tratamento com laser de baixa potência (GaAlAs, 830 nm, 40 mw) no reparo de defeitos cirúrgicos criados no fêmur de 42 ratos (fêmeas e machos) Wistar albinus. Os defeitos foram preenchidos por osso bovino liofilizado associado ou não a membrana biológica bovina GTR (Genderm^R). Os animais que foram submetidos ao tratamento com laser receberam 16 J/cm² por sessão, sendo essa energia distribuída em 4 pontos ao redor do defeito (4 J/cm²), a primeira irradiação era realizada imediatamente após a cirurgia e repetida sete vezes a cada 48 horas. Os animais foram sacrificados após 15, 21 e 30 dias. Os autores observaram na análise histológica dos animais irradiados quando comparado aos grupos não-irradiados, evidência de aumento da quantidade de fibras colágenas nos primeiros estágios do reparo ósseo (15 dias) e aumento da quantidade de osso trabecular organizado no final do período experimental (30 dias). Os autores concluíram que houve um efeito biomodulador positivo no processo de reparo do defeito associado ou não ao uso de osso bovino liofilizado e membrana biológica (GTR) em fêmur de ratos irradiados com o laser.

Khadra (2005) realizou trabalhos experimentais em séries *in vivo* e *in vitro*, investigando a efetividade da terapia com laser de baixa potência na melhora da interação implante-titânio. Análises

histomorfométrica e mineral mostraram que os implantes irradiados tiveram maior contato osso-implante que os controles, devido ao efeito da terapia com laser de baixa potência, a qual pode acelerar o metabolismo e/ou mineralização durante o reparo ósseo precoce. Doses múltiplas de terapia com laser de baixa potência (1,5 e 3 J/cm²) podem aperfeiçoar a eficiência dessa terapia acelerando a junção inicial e alterando o comportamento de fibroblastos gengivais humanos cultivados nas superfícies de titânio. O uso do laser de baixa potência nas variações de doses entre 1,5 e 3 J/cm² podem modular a atividade de células interagindo com o implante, aumentando a cura tecidual e o sucesso definitivo do implante.

Nissan et al. (2006) realizaram um estudo bioquímico avaliando os efeitos do laser de baixa intensidade (Arseneto de Gálio) utilizando 0,72 e 4,32 J/cm² de densidade de energia no processo de reparo ósseo em defeitos ósseos criados cirurgicamente nas mandíbulas de 24 ratos. Os defeitos ósseos foram criados em ambos os lados da mandíbula, sendo que o lado direito foi tratado com laser e o esquerdo não recebeu nenhum tratamento (controle). A laserterapia foi iniciada imediatamente após a confecção do defeito, seguida de doses diárias por 1, 2 ou 4 semanas. Os ratos foram sacrificados após 1, 2 ou 4 semanas após o tratamento. Os autores concluíram que a terapia com laser de baixa potência é efetiva no processo de reparo ósseo de cavidades ósseas criadas cirurgicamente afetando o transporte de cálcio durante a formação de novo osso.

Fukuhara et al. (2006) investigaram *in vitro* os efeitos do laser de baixa irradiação (LELI) Arseneto de Gálio Alumínio, em osteoblastos de ratos. Células osteoblásticas, de calota craniana de ratos Wistar, foram irradiadas a 3,75 J/cm² induzindo a um aumento no número destas células no 3º dia, o qual foi demonstrado através do aumento de colônias positivas de fosfatase alcalina. Assim, concluíram que LELI induz

a formação óssea, promovendo a cura de ferida, resultando em reparo tecidual.

Galvão et al. (2006) realizaram um trabalho através de um modelo experimental de osteotomia transversal parcial de tíbia de ratas, seguida por tratamento com laser de baixa potência (Ga Al As) e ultra-som de baixa intensidade de oscilação com níveis de energia similares. O tratamento foi iniciado no terceiro dia após a osteotomia com uma dose de $112,5 \text{ J/cm}^2$ cinco vezes por semana no total de 12 sessões. A porcentagem de osteoblastos na superfície foi estatisticamente mais alta no grupo com terapia com laser de baixa potência quando comparado ao ultra-som de baixa intensidade de oscilação. Os autores concluíram que ambos os agentes físicos promoveram mudanças na reparação óssea, mas em diferentes fases da reparação. Segundo Galvão et al. (2006): é necessário confirmar a fase exata do reparo ósseo durante a qual cada modalidade terapêutica pode ter efetividade máxima.

Pretel et al. (2007) pesquisaram o efeito da terapia com laser de baixa potência (LLLT), laser Ga Al As, sobre o reparo ósseo através de análise histológica em ratos Wistar albinus. Foram realizados defeitos ósseos na mandíbula de 30 ratos. Os animais foram divididos em 2 grupos (n=15) o qual foi dividido em três períodos de sacrifício (15, 45 e 60 dias). O grupo LLLT, recebeu dose única de irradiação (comprimento de onda= 780 nm, potência= 35 mw; densidade de energia= 1,4 J) diretamente sobre a área do defeito ósseo. Os resultados histológicos mostraram formação óssea em ambos os grupos. No entanto, o grupo laser exibiu uma resposta tecidual avançada em relação ao grupo controle. Observou-se também menor reação inflamatória inicial e acelerada formação de nova matriz óssea aos 15 e 45 dias. Os autores puderam concluir que o uso de LLLT diretamente sobre o tecido lesionado promove efeito bioestimulante na remodelação óssea através da estimulação da modulação da resposta inflamatória inicial promovendo reparo ósseo num menor espaço de tempo.

Jakse et al. (2007), avaliaram a influência do tratamento com laser de baixa potência (LLLT) na osseointegração de implantes dentais seguido de aumento de seio maxilar e enxerto ósseo em ovelhas. Os sítios da inserção do implante foram irradiados unilateralmente, antes da colocação do enxerto e durante o segundo estágio cirúrgico (inserção dos implantes) intraoperatoriamente e três vezes durante a primeira semana do pós operatório com laser diodo com 75 mw de potência, 680nm de comprimento de onda, densidade de energia de 3 a 4 J/cm². Os autores concluíram que esse estudo experimental em ovelhas não confirmou um efeito positivo da LLLT na regeneração óssea dentro do sítio do enxerto ósseo. No entanto, a LLLT possivelmente possui um efeito positivo na osseointegração de implantes dentais inseridos após aumento do seio.

Gerbi et al. (2008) avaliaram histologicamente o efeito da fotobiomodulação do laser no reparo de defeitos cirúrgicos criados em fêmures de 48 ratos Wistar albinus, tratados ou não com proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) e enxerto ósseo orgânico bovino. Os animais do grupo irradiado receberam 7 irradiações a cada 48 h, iniciando imediatamente após o procedimento cirúrgico. A terapia com laser (comprimento de onda = 830 nm, 40 mw de potência) consistiu de 16J/cm² por sessão dividida igualmente sobre 4 pontos (4 J/cm² cada) ao redor do defeito. Os animais foram sacrificados após 15, 21 e 30 dias. Os autores encontraram histologicamente evidência de aumento de deposição de fibras colágenas aos 15 e 21 dias, bem como um aumento na quantidade de osso trabecular bem organizado no final do período experimental (30 dias) no grupo irradiado versus o controle (não-irradiado). Os autores concluíram que a luz laser infravermelho foi efetiva para acelerar o reparo de defeitos ósseos preenchidos com enxerto ósseo bovino orgânico, evidenciado pelo aumento da deposição de fibras colágenas e um rápido reparo por tecido ósseo cortical.

Matsumoto et al. (2009) realizaram um estudo para analisar o papel da ciclooxygenase-2 durante o reparo ósseo em ratas submetidas à terapia com laser de baixa potência. Foram realizados defeitos ósseos na tíbia de 48 ratas, as quais foram distribuídas em grupo controle e grupo com laserterapia (laser Ga Al As, 735 nm de comprimento de onda, com densidade de energia de 16 J/cm²). A irradiação laser foi iniciada 24 h após a cirurgia e foi mantida, pontualmente a cada 48 h por 15 dias ou até o dia do sacrifício da rata. A irradiação foi executada transcutaneamente, em um ponto na área lesionada. Os animais foram sacrificados após 48 horas, 7 dias, 14 dias ou 21 dias. As tíbias foram então removidas para análise morfológica, morfológica e imunohistoquímica para análise da ciclooxygenase-2. Os autores observaram melhores resultados na qualidade do reparo ósseo e na quantidade de osso neoformado no grupo de 14 dias que recebeu terapia com laser de baixa potência.

É ainda difícil comparar estudos a respeito da ação da terapia com laser de baixa potência no reparo ósseo porque os parâmetros dosimétricos, modelos experimentais e duração dos tratamentos são muito distintos. Contudo, há algumas evidências que doses múltiplas de irradiação laser são mais efetivas na formação óssea e na interação implante-tecido (Ninomiya et al., 2003; Khadra, 2005).

É necessária a realização de mais estudos para esclarecer as alterações celulares e a formação óssea promovida pela laserterapia, a determinação de protocolos de aplicação mais eficazes para cicatrização de tecidos moles e reparo ósseo e ampliar os estudos envolvendo superfícies de implantes visando melhoria na osseointegração. Sendo assim, justifica-se a necessidade de expandirmos as pesquisas com diferentes superfícies de implantes de titânio associados a tratamentos com laser de baixa potência, na busca de melhores condições de osseointegração aos pacientes com osteoporose.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a bioestimulação do laser de baixa potência na osseointegração de implantes cilíndricos de titânio com superfície porosa e de implantes cilíndricos de titânio com superfície rugosa inseridos em ratas ovariectomizadas e em ratas normais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Confeção dos implantes

Os implantes cilíndricos com superfície porosa e com superfície rugosa foram confeccionados no Centro Técnico Aeroespacial (CTA) - Divisão de Materiais (AMR) do Instituto de Aeronáutica e Espaço (IAE), por meio da técnica de metalurgia do pó.

A técnica de metalurgia do pó em geral envolve três etapas: produção do pó, compactação deste em uma matriz para dar o formato e sinterização para produzir a peça sólida (Vasconcelos, 2005).

O pó foi produzido no IAE e fornecido para esta pesquisa. Para a compactação dos implantes porosos e rugosos foi idealizada no AMR/IAE uma matriz de aço ferramenta VND, para confecção de um cilindro de titânio, medindo 3 mm x 2,5 mm. Esta matriz era constituída de um punção superior e um inferior, uma camisa e um calço de camisa.

Os materiais utilizados para o processamento dos implantes porosos foram:

- a) pó de titânio puro: apresentando granulometria ao redor de 8 μm , proveniente do CTA;
- b) aditivo orgânico: o material utilizado foi a uréia em grânulos, que foi triturada e separada na faixa granulométrica de 177 a 250 μm pela técnica do peneiramento.

A função da uréia foi manter o espaço entre os grânulos do pó de titânio até o término do processamento do material, tornando a amostra porosa.

A escolha da uréia como material espaçador foi baseada nas suas propriedades químicas, como sua capacidade de se decompor completamente em temperaturas relativamente baixas. Segundo Vasconcellos et al. (2005), o diâmetro de 177 a 250 μm é adequado para a confecção de implantes porosos.

A fabricação dos implantes foi realizada da seguinte forma:

- a) mistura dos pós: o pó de titânio foi misturado com o aditivo orgânico a fim de obter uma mistura homogênea. A proporção do pó de titânio foi de 80% e do aditivo orgânico de 20%. Para a confecção dos implantes rugosos, apenas foi homogeneizado o pó de titânio em um misturador. As etapas seguintes foram iguais para os dois tipos de implantes;
- b) compactação: foi realizada a compactação uniaxial dos pós no interior da matriz. Esta compactação foi feita em prensa hidráulica com pressão de 100 MPa. Em seguida, as amostras foram submetidas a compactação isostática a frio com pressão de 200 MPa.
- c) sinterização: foi realizada em forno a vácuo, fabricado pela Thermal Technology, modelo ASTRO, com ciclo térmico pré-determinado. Este iniciava com 25 °C e aumentava 10 °C/min até 170 °C, onde permanecia em um patamar por 45 min. Em seguida, a temperatura voltava a aumentar 10 °C/min até chegar em 1200 °C, onde permanecia em um patamar por 60 min e posteriormente resfriava. No entanto, previamente a sinterização, foi realizada a fase

de remoção do aditivo orgânico no implante poroso. Esta fase consistia em deixar as amostras por 2 h em estufa com temperatura entre 170 °C a 200 °C;

- d) limpeza dos implantes: primeiro os implantes foram escovados com escova dental macia e detergente neutro e enxaguados em água destilada. Para uma limpeza mais criteriosa, os implantes foram colocados em um Becker contendo 20 mL de água destilada com 10% de detergente neutro e submetidos a ação de ultra-som por 10 min. Em seguida, os espécimes foram colocados em um novo Becker contendo 50ml de água destilada e ficaram sob a ação do ultra-som por 10 min, para remover os resíduos de detergente. Posteriormente, estes foram limpos em um banho com etanol a 99% em ultra-som por 10 min. Os implantes foram então embalados e submetidos à esterilização em autoclave a 121 °C por 15 min.

Após finalização do procedimento de confecção dos implantes cilíndricos rugosos e porosos (Figura 1), estes foram medidos com paquímetro digital (Mitutoyo) para a obtenção da sua medida final. Todos os implantes foram medidos em três pontos, obtendo-se em média 2,7mm de comprimento, por 2,5 mm de diâmetro.

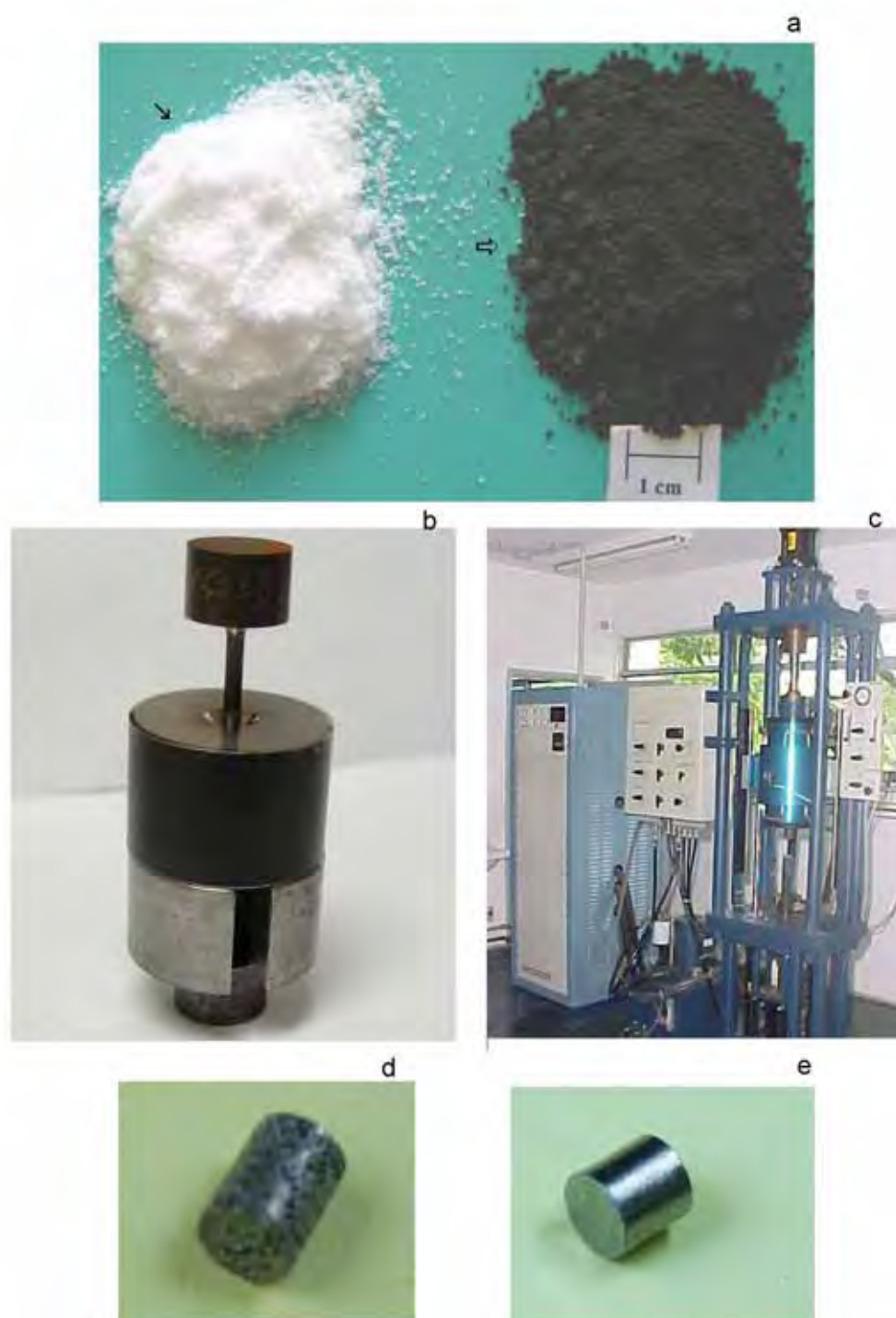


Figura 1 - Procedimentos da confecção dos implantes: a) pó de uréia (↘), pó de titânio (↗); b) matriz utilizada para a compactação uniaxial; c) forno a vácuo utilizado para a sinterização; d) visão aproximada do implante poroso, e) visão aproximada do implante rugoso.

4.2 Animais experimentais e procedimento cirúrgico

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, Protocolo nº 040/2007-PA/CEP.

Oitenta e quatro ratas adultas (*Rattus norvegicus*, variação albinus, Wistar), com 90 dias de idade, peso aproximado de 300g, foram utilizadas nesta pesquisa. Os animais foram mantidos em gaiolas à temperatura ambiente e alimentados com ração Nutrilabor (Guabi, Campinas-SP, Brasil) e água *ad libitum*, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos- UNESP.

Quarenta e dois animais foram submetidos à cirurgia de ovariectomia (OVZ) e 42 foram falsamente operados (SHAM). Após 1 mês, as ratas foram divididas em 4 grupos com 21 animais cada, de acordo com o tratamento recebido:

Grupo 1 (SHAM) – cirurgia de colocação dos implantes;

Grupo 2 (SHAM) – aplicação do laser de baixa potência após a cirurgia de implante;

Grupo 3 (OVZ) – cirurgia de colocação dos implantes;

Grupo 4 (OVZ) – aplicação do laser após a cirurgia de colocação dos implantes.

Para a realização das cirurgias foram utilizados materiais cirúrgicos esterilizados e descartáveis. A sala operatória foi, previamente, desinfetada borrifando-se álcool 70% sobre as superfícies e os operadores utilizaram paramentação estéril. Previamente à cirurgia os animais foram pesados individualmente. Em seguida foi realizada a anestesia geral com solução de 14,2 mg/kg de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidrorpropriedades sedativas e analgésicas, além de

relaxante muscular e 38,5 mg/kg de Ketamina base (Dopalen – Agribands do Brasil Ltda), anestésico geral, via intramuscular.

Nos animais do grupo ovariectomizado (OVZ), foi realizada a anestesia e depilação da região lateral do corpo, ao nível dos rins e abaixo da costela mais inferior. Foi realizada também a anti-sepsia do local, utilizando álcool iodado. Neste local foi realizada incisão longitudinal, na pele, com extensão de 1 cm em média, com lâmina de bisturi nº15 montada em cabo de bisturi BardParker. Em seguida fez-se a divulsão do tecido subcutâneo e posterior incisão da musculatura. O ovário foi exposto, realizou-se uma ligadura logo abaixo deste para a contenção da hemorragia e então o mesmo foi removido, juntamente com parte do útero e tecidos moles circundantes. Este procedimento foi realizado bilateralmente.

Nos animais do grupo SHAM, foi realizada a cirurgia simulada ou falsa ovariectomia (cirurgia SHAM), na qual foram realizados os mesmos procedimentos acima citados, excluindo a confecção da ligadura logo abaixo do ovário, após a sua exposição e a remoção dos mesmos.

Ao fim dos procedimentos, foram realizadas suturas da camada muscular dos animais de ambos os grupos, com fio reabsorvível Vicryls 3.0, (Ethicon, GmbH, Germany), e da pele com fio de seda 4.0 (Ethicon-Johnson & Johnson, São José-SP, Brasil). Por fim foi realizada nova anti-sepsia com álcool iodado na região operada.

Após 1 mês da ovariectomia ou da cirurgia SHAM (Figura 2a e Figura 2b), os animais foram submetidos à colocação dos implantes. Cada rata recebeu um implante cilíndrico de superfície porosa e um implante cilíndrico de superfície rugosa no fêmur esquerdo e direito, respectivamente.

Após a anestesia dos animais, os locais cirúrgicos dos fêmures direito e esquerdo foram submetidos à tricotomia e à anti-sepsia com solução de álcool iodado. A incisão era realizada com lâmina de

bisturi número 15 na região correspondente à face medial do fêmur. Após a exposição da cortical do fêmur (Figura 3a) foi realizada uma loja cirúrgica em cada fêmur, utilizando primeiramente uma broca em formato de lança (Titanium Fix®, São José dos Campos-SP, Brasil), com 1,8 mm de diâmetro acoplada em um motor portátil Driller (Dentscler MC 101, Ribeirão Preto, Brasil) (Figura 3b), esta broca teve a função de guia para as subseqüentes. As próximas brocas utilizadas foram cilíndricas e mediam 2,0 e 2,5 mm de diâmetro (Figura 3c). Os diâmetros progressivos visavam o mínimo trauma cirúrgico. Durante todo este procedimento foi mantida irrigação abundante com cloreto de sódio a 0,9%, visando evitar o aquecimento decorrente do atrito da broca com o osso.

Imediatamente após a confecção da loja cirúrgica (Figura 3d), foi realizada, no seu interior, a irradiação com laser GaAlAs (Clean Line®, Taubaté-SP, Brasil), 40 mw de potência contínua, 780 nm de comprimento de onda no vermelho invisível e 4 J/cm^2 de densidade de energia por ponto irradiado. (Figuras 4a e 4b).

Cada animal (grupos 2 e 4) recebeu 4 J/cm^2 durante 1 minuto e 40 segundos com aplicação de laser tipo contato perpendicularmente à cavidade cirúrgica (Figura 4c). Após essa irradiação, os implantes eram posicionados sob pressão apresentando estabilidade primária devido ao seu travamento na cortical oposta (Figura 3e e Figura 3f).

Os tecidos foram suturados com fio de seda (Ethicon/Johnson & Johnson nº4) e novamente foi realizada anti-sepsia com álcool iodado (Figura 3g e Figura 3h).

Após este procedimento, a terapia com laser foi realizada transcutaneamente, de forma pontual, diretamente sobre o tecido cutâneo (transcutâneo). A dose de 4 J foi aplicada nos 4 pontos ao redor da região operada, totalizando a 16 J/cm^2 por fêmur (Figura 4d).

As sessões de laserterapia transcutâneas foram repetidas a cada 48 horas durante 15 dias, num total de 8 sessões por animal.

Ao final da cirurgia os animais receberam uma dose única de antibiótico benzilpenicilina benzatina, benzilpenicilina procaína, benzilpenicilina potássica e diidroestreptomicina base sulfato em ampola de 6.000.000 UI (Pentabiótico – Fort Dodge®, Porto Alegre, Brasil), por via intramuscular na dose de 0,35 mL/kg.

Em seguida, as ratas foram colocadas em gaiolas, com 3 animais, onde receberam ração e água *ad libitum*, e foram monitoradas até o prazo de sacrifício.

Sete animais de cada grupo foram selecionados aleatoriamente para serem sacrificados em 2, 4 e 6 semanas após a cirurgia (Figura 5 - Esquema com a divisão dos animais).

Para o sacrifício, os animais receberam dose excessiva de anestésico e foram sacrificados na guilhotina. Os fêmures foram removidos, dissecados e fixados em solução de formol a 10% durante o tempo mínimo de 48 h.

a



b



Figura 2 – Comprovação do efeito da ovariectomia, após um mês da sua realização. a) aspecto macroscópico do útero de uma rata do grupo SHAM. b) aspecto macroscópico do útero de uma rata do grupo OVZ.

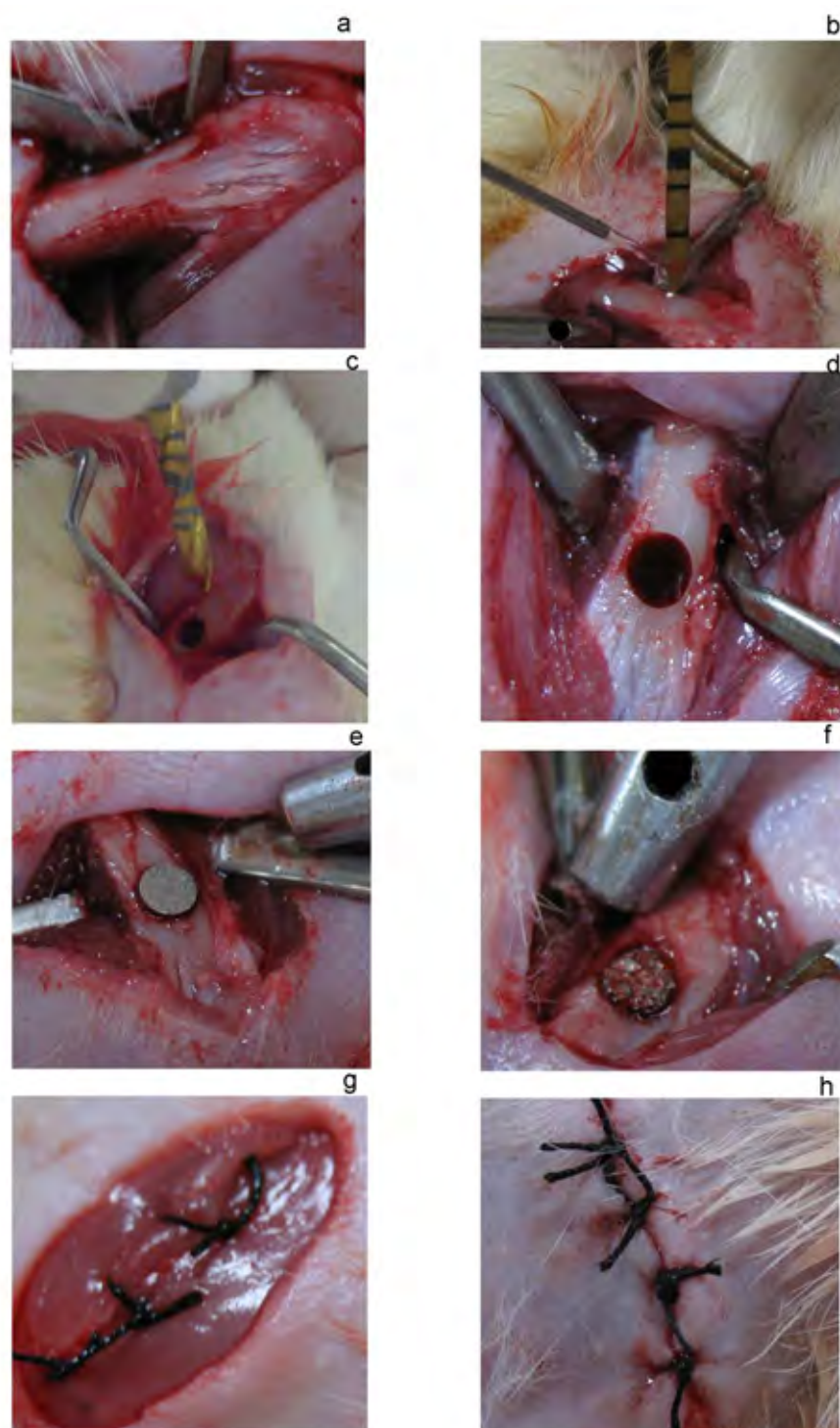


Figura 3 - Procedimento da cirurgia dos implantes: a) Exposição do Fêmur;b)Perfuração com a primeira broca; c) Ajuste do preparo com a segunda broca; d) Loja cirúrgica preparada para colocação dos implantes; f) Implante rugoso posicionado;f)Implante poroso posicionado;g)Sutura do tecido muscular;h) Sutura do tecido cutâneo.

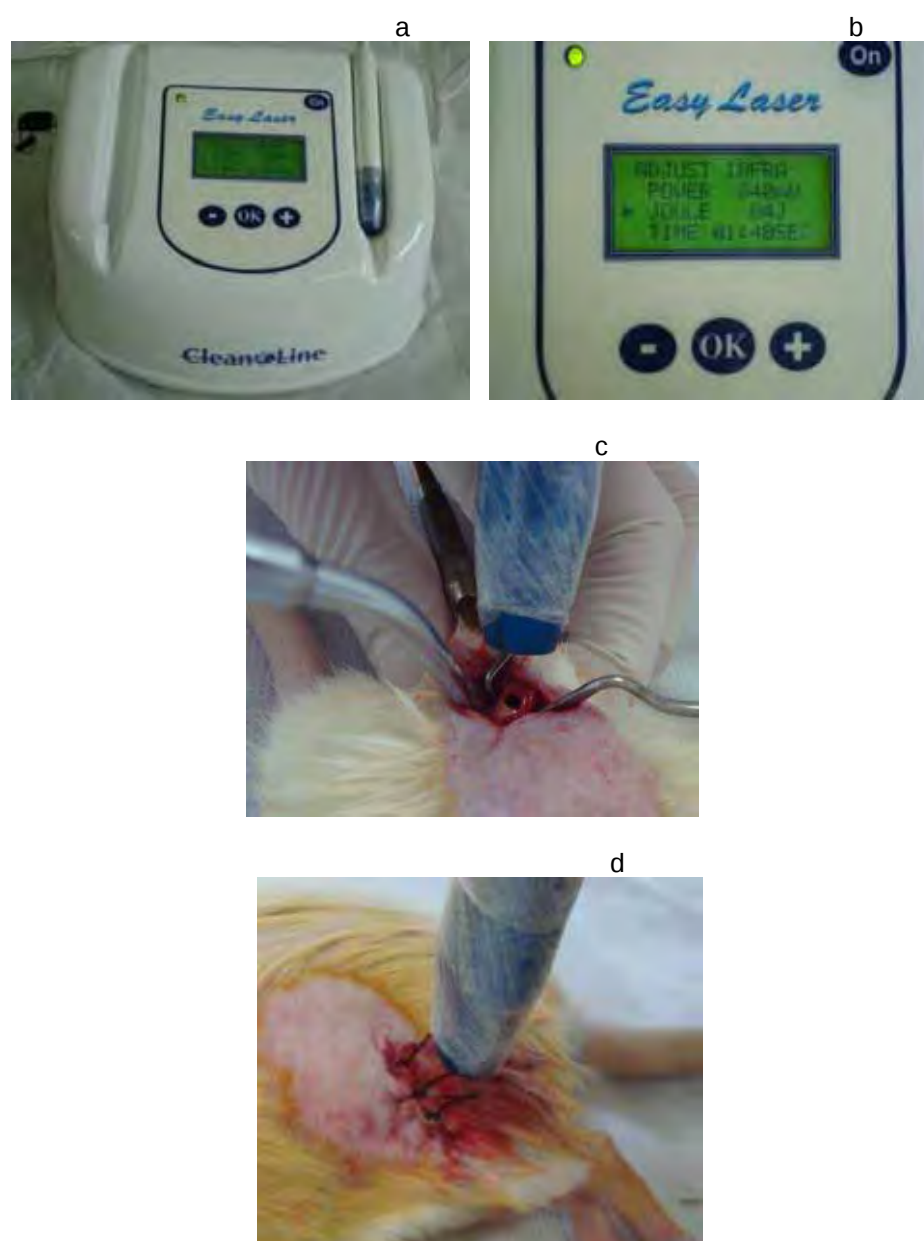


Figura 4 - a) Aparelho de laser utilizado , b) Parâmetros dosimétricos empregados c) Aplicação do laser no interior da cavidade cirúrgica, d) Aplicação do laser no tecido cutâneo.

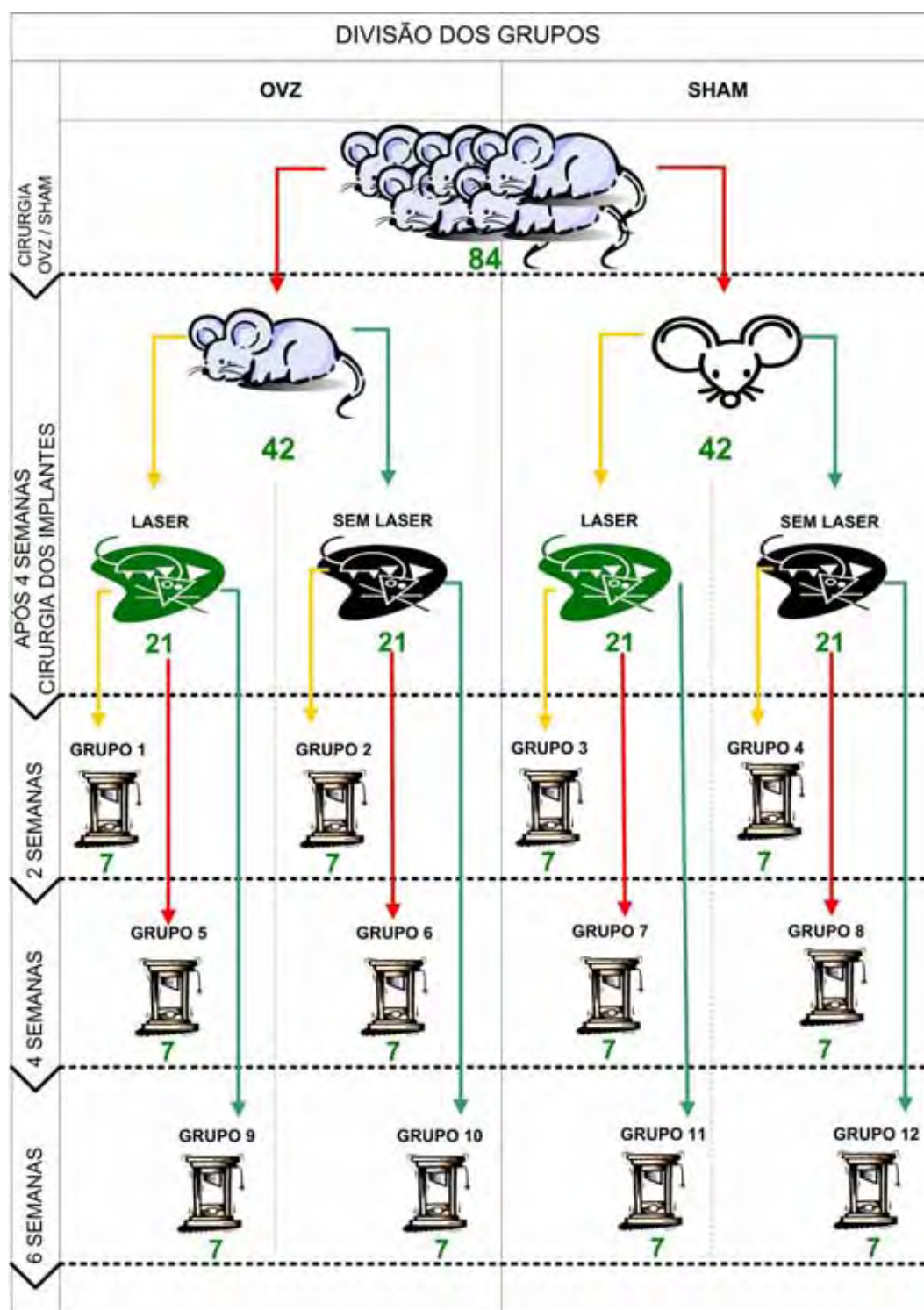


Figura 5 - Esquema de divisão dos animais por grupo

4.3 Análise metalográfica e de rugosidade

Seis implantes cilíndricos de titânio com superfície porosa foram avaliados quanto à quantidade, área, morfologia e interligação dos poros, por meio de análise metalográfica. Inicialmente, os implantes foram posicionados em molde retangular de silicona e incluídos com resina poliéster orto cristal T 208. Em seguida, foram hemisseccionados de maneira longitudinal na máquina de corte para tecido duro Labcut 1010 (EXTEC). Posteriormente, as amostras foram polidas com lixas d'água 600 e 1200. Após o preparo metalográfico foi realizada análise em MEV para a caracterização da microtopografia com aumento de 100x. O programa de imagem utilizado para a análise metalográfica da quantidade e área dos poros foi o Image Tool (versão Windows 3.0). Foram obtidas três imagens de cada implante, totalizando quinze imagens de cada implante. A morfologia e a interligação dos poros foram demonstradas nas imagens obtidas por meio do MEV.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste estatístico Mann Whitney, com nível de significância de $p < 0,05$.

Cinco implantes cilíndricos de superfície rugosa foram avaliados quanto a sua rugosidade média no rugosímetro S8P Perthen (Mahr), com apalpador mecânico de 10 μm , em três áreas diferentes. O teste foi realizado em cinco implantes cilíndricos de superfície rugosa, em três áreas diferentes, resultando no número de dados de $n=15$.

A R_a é o valor médio aritmético de todos os desvios do perfil de rugosidade da linha média dentro do comprimento de medição, sendo o valor considerado como a média de rugosidade da superfície presente nos implantes densos.

Os implantes porosos não foram submetidos ao teste de rugosidade de superfície, uma vez que o apalpador mecânico que afere o

nível de rugosidade ficaria preso nos poros e não conseguiria realizar a leitura da topografia da superfície.

4.4 Preparo histológico

Para o preparo histológico foi utilizada a técnica de desgaste para tecido ósseo não descalcificado. Após a fixação em formol a 10%, por 48 h, os fragmentos de fêmures contendo os implantes foram lavados em água corrente por 24 h e submetidos a concentrações crescentes de álcool de 60%, 70%, 80%, 90% e 100%, para desidratação.

Posteriormente, os fêmures foram mantidos em álcool absoluto por 24 h para finalizar a desidratação e a seguir imersos em xilol (P.A.) durante 3 dias, para diafanização. O fragmento de tecido ósseo contendo o implante foi embebido em solução resinosa gradativamente, para que a resina penetrasse de forma completa na peça. Esse procedimento foi dividido em 3 fases:

Fase 1: preparo da solução de metilmetacrilato (Fluka, Buchs, Suíça) adicionado em dibutilfitalato (Fluka) na proporção de 85% e 15%, respectivamente. A peça permaneceu nesta solução por 2 dias, em temperatura ambiente.

Fase 2: preparo da mesma solução da fase 1 acrescentando-se o peróxido de benzoila (Arkena Química Ltda, São Paulo, Brasil) na quantidade de 1g. A peça permaneceu nesta solução, em geladeira, durante 2 dias.

Fase 3: fase de inclusão final. Vidros âmbar com tampa foram preparados previamente para a inclusão das peças com uma camada de aproximadamente 2 mm da mesma solução da fase 1, acrescentada de 3 g peróxido de benzoila. Formou-se então, um fundo de resina, que evitava que a peça tocasse o fundo do recipiente, a qual serviu como base para apreensão do bloco na cortadeira Labcut. As peças foram colocadas no centro do vidro com resina e a solução da fase 1 + 3 g de peróxido de benzoila foi vertida vagarosamente até cobrir o fragmento do fêmur em aproximadamente 3 mm e levada para estufa a 37 °C. Esta etapa leva aproximadamente 3 dias ou ainda de 2 a 4 dias.

Todos os passos foram realizados em capela de exaustão de gases devido à alta toxicidade das substâncias utilizadas. O vidro âmbar foi utilizado para que não houvesse a passagem de luz para a resina, aspecto que impediria sua polimerização. Após a polimerização, o vidro foi envolvido em um jornal e quebrado com um martelo.

O material obtido da inclusão foi um bloco de resina contendo o fragmento do fêmur com o implante. O bloco foi preso na morsa do aparelho de corte Labcut® 1010 (EXTEC) e de cada implante foram obtidas 2 secções de corte medindo cerca de 180microns. Para o corte dos blocos foi utilizado disco diamantado (EXTEC, Enfield, EUA) de 3 polegadas de diâmetro. Estes cortes foram examinados em microscópio de luz para escolha do lado a ser analisado e a superfície oposta àquela escolhida, foi delicadamente lixada em politriz Labpol® 8-12 (EXTEC)

com lixa d'água de granulação 1200 para polimento. A seguir, os cortes foram limpos, colados com éster de cianocrilato (Super Bonder®) sobre a lâmina de plexiglass. Visando obter maior paralelismo entre a lâmina e a superfície a ser desgastada, foi usada uma prensa para a colagem do corte sobre a lâmina de plexiglass, conseguindo-se, dessa maneira, uma fina e uniforme camada da cola.

Com a utilização de um suporte para a lâmina de plexiglass, o corte foi desgastado em politriz Labpol® 8-12 (EXTEC), usando seqüência crescente de lixas d'água (400, 600, 1200), sendo mantido sempre um plano uniforme. No decorrer do desgaste, os cortes foram observados em microscópio de luz para a verificação de uma mínima espessura com o máximo de detalhes. Por fim, o material foi corado com azul de toluidina e observado em microscópio de luz.

4.5 Análise histomorfométrica e histológica

Para a análise histomorfométrica (análise quantitativa) do tecido ósseo neoformado na interface do implante e no interior dos poros, as imagens de duas secções de cada implante, representando a interface medial e distal do mesmo foram selecionadas em microscópio de luz Zeiss Axiophot 2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) com ocular de aumento de 10x e objetivas planapo de 20x, sob um foco fixo. As imagens foram digitalizadas por câmera digital Sony (DSC-S85, Cyber-shot) acoplada ao microscópio e foram avaliadas em um monitor de televisão (Panasonic).

Para padronização das imagens, estas foram captadas na interface osso-implante, no lado medial e distal, sempre na mesma posição, com a interface osso-implante posicionada no centro do monitor

no sentido horizontal. Finalmente, o campo foi delimitado pela face interna da cortical óssea.

Posteriormente, as imagens foram transferidas para um microcomputador através da conexão USB, para análise morfométrica das estruturas selecionadas. O programa de imagem utilizado foi o NIH Image-J (versão Windows 1.4). A partir deste programa foi possível construir um retículo com 130 pontos de intersecção sendo 10 linhas transversais e 13 longitudinais, sobre a imagem obtida. Os pontos que caíam sobre as áreas de tecido ósseo eram contados.

Após a obtenção da quantidade de pontos de intersecção no tecido ósseo, a porcentagem de crescimento ósseo foi calculada conforme demonstrado na seguinte fórmula:

$$\% \text{ Neoformação óssea} = (\text{n}^\circ \text{ de intersecções}) \times 100 / 130$$

A análise histológica (qualitativa) do tecido ósseo neoformado foi realizada utilizando-se microscopia óptica. As observações foram realizadas na interface osso-implante, sobre a superfície dos implantes e no interior dos poros superficiais e centrais, visando verificar o preenchimento destes por tecido ósseo.

4.6 Análise estatística

Na análise estatística encontram-se neste experimento os seguintes fatores, variáveis independentes: o tipo do implante (2 níveis: poroso e rugoso), ovariectomia (2 níveis: OVZ ou SHAM), tratamento (2 níveis: com laser ou sem laser) e tempo de sacrifício (3 níveis: duas, quatro e seis semanas). A variável dependente foi a neoformação óssea dos fêmures das sete ratas em cada uma das condições experimentais. A

neoformação óssea foi medida através da porcentagem de crescimento ósseo na interface osso-implante. Todos os dados da neoformação óssea foram tabulados e submetidos à análise estatística descritiva e inferencial. Antes da análise, todas as imagens foram codificadas, não permitindo a identificação do grupo experimental ao qual pertenciam, possibilitando a obtenção cega dos dados.

Para a avaliação da análise estatística foi realizada análise descritiva (média e desvio padrão), por meio do modelo estatístico General Linear Models (GLM). Este modelo estatístico é uma análise similar ao modelo estatístico ANOVA, porém é mais abrangente e não tão restritivo por questões teóricas quanto ao ANOVA. O nível de significância definido neste trabalho foi de 0,05 (5%) com intervalo de confiança de 95%.

Para diagnosticar o efeito dos fatores de grupo ovariectomia, tipo de implante e uso ou não do laser e tempo de sacrifício, também foi utilizado o GLM através de análise paramétrica (análise inferencial).

Para comparar todos os tempos de sacrifício aos pares e a sua interação com os demais fatores foi utilizado o teste de Tukey (comparações múltiplas de Tukey).

Na análise estatística foram utilizados os softwares SPSS V16, Minitab 15 e Excel Office 2007.

Os dados obtidos na análise metalográfica e no rugosímetro foram submetidos ao teste estatístico de Kruskal Wallis e ao teste de Dunn ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização dos implantes

5.1.1 Análise metalográfica

Na análise metalográfica, realizada por meio do MEV com aumento de 100x, pôde-se observar que os implantes porosos apresentavam poros de diâmetro e formato variados. Nas amostras havia três tipos de poros: os nanoporos, os microporos e os macroporos. Os nano e microporos eram pequenos e isolados, enquanto que os macroporos eram abertos e interligados. Esta intercomunicação entre os poros foi a responsável pelo crescimento ósseo para o interior dos poros mais centrais (Figura 6).

Nos implantes rugosos também foram notados alguns poros, porém estes exibiam pequeno diâmetro e não estavam interligados, sendo considerados nano e microporos. Estes poros menores foram resultantes do processo de sinterização presente na técnica de metalurgia do pó (Figura 7).

Por meio do programa de computador Image Tool (versão Windows 3.0), foi calculada a porcentagem dos poros existente no implante poroso e rugoso. Os dados originais estão nos Apêndices C e D. A estatística descritiva dos mesmos é apresentada na Tabela 1.

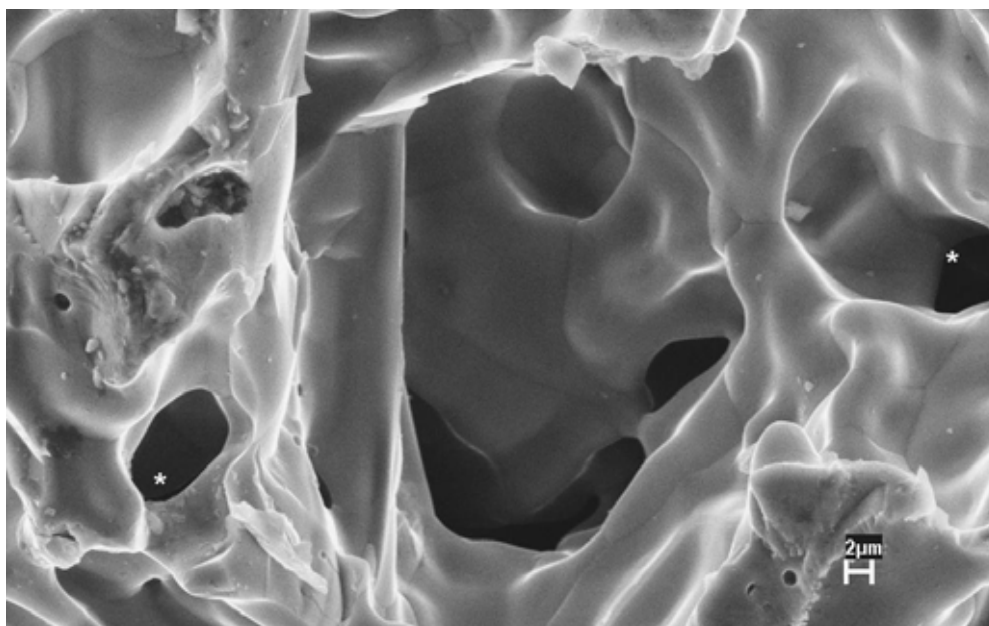


Figura 6 - Fotomicrografia de MEV com aumento de 1500x: observar a interligação entre os poros (*), implante poroso.



Figura 7 - Metalografia da amostra usinada, exibindo poros isolados, implante rugoso.

Tabela 1 – Média ($\pm$ desvio padrão) dos dados da quantidade de poros (valores em %) obtidos em seis implantes de cada tipo

IMPLANTE	Nº	MÉDIA	MEDIANA	Dp*
Rugoso	6	3,068	3,180	0,815
Poroso	6	36,896	37,168	2,432

*: desvio padrão; N º: número de implantes

O programa de computador Image Tool (versão Windows 3.0), também auxiliou no cálculo do diâmetro dos poros presentes nos implantes porosos e rugosos (Tabela 2).

Tabela 2 – Média ($\pm$ desvio padrão) dos dados do diâmetro dos poros (valores em μm) obtidos em seis implantes de cada tipo

IMPLANTE	Nº	MÉDIA	MEDIANA	Dp*
Rugoso	6	181,1	159,8	83,7
Poroso	6	483,2	417,7	212,4

*: desvio padrão; N º: número de implantes

Os dados originais da análise metalográfica do diâmetro dos poros estão nos Apêndices E e F.

Segundo o teste Mann Whitney, os valores da porcentagem e do diâmetro dos poros diferem estatisticamente, uma vez que $p = 0,0051$ e $p = 0,0082$, respectivamente.

5.1.2 Análise de rugosidade

Os implantes rugosos apresentaram valor médio de rugosidade de $5,35 \mu\text{m}$. A tabela 3 apresenta os valores de rugosidade máxima e mínima presentes na superfície dos implantes rugosos.

Tabela 3 – Valores (μm) dos dados da rugosidade nos implantes de superfície rugosa

IMPLANTE	Ra*	R [#] _{mín}	R [§] _{máx}
Rugoso	5,35	3,81	6,70

*: rugosidade média; #: rugosidade mínima; §: rugosidade máxima

5.2 Análise histológica (qualitativa) da neoformação óssea

Todos os animais apresentaram pós-operatório satisfatório sem evidência de infecção e inflamação no sítio cirúrgico. Nenhuma reação adversa foi observada durante e após o procedimento de inserção dos implantes. Os implantes apresentaram boa estabilidade, uma vez que não se deslocaram durante exame clínico realizado com uma pinça clínica.

Não foi observada diferença histológica significativa entre os grupos SHAM e OVZ.

No período inicial de 2 semanas observou-se tecido ósseo imaturo, o qual estava mais evidente nos grupos sem laser, com a presença de tecido osteóide, osteócitos, osteoblastos e também alguns mastócitos (Figura 8a e 8b). Nos grupos que receberam laser no tempo de sacrifício de 2 semanas foi observado tecido ósseo mais celularizado, provavelmente devido ao efeito do laser (Figura 11e). Nos implantes de superfície rugosa notou-se a presença de tecido osteóide e trabéculas ósseas na interface do implante (Figuras 10a e 10b). Neste mesmo período de 2 semanas, nos implantes com superfície porosa, nos grupos que receberam laser, notou-se a presença de lacunas com osteócitos e a migração de tecido osteóide para o interior dos poros, bem como a presença de trabéculas ósseas no interior dos poros (Figuras 10c e 10d).

A intercomunicação dos poros foi evidenciada pelo crescimento ósseo (trabecular) para o interior desses (Figuras 10e, 10f, 10g) o qual não foi notado nos grupos que não receberam tratamento de laser neste mesmo período de 2 semanas de sacrifício (Figura 10h).

Em alguns animais dos grupos com 6 e 4 semanas de sacrifício e que receberam a laserterapia, a formação de tecido ósseo neoformado na superfície externa do implante foi bem evidenciada, demonstrando íntimo contato entre trabécula óssea e superfície do implante (Figuras 9a, 9b, 9c e 9d), com a presença de osso trabecular bem proliferado.

Adicionalmente, nos animais do período de sacrifício de 6 semanas independente da aplicação ou não do laser, pôde ser observada uma linha distinta entre osso neoformado e osso preexistente e a presença de uma ponte óssea, enfatizando a biocompatibilidade do material e a superfície adequada para a proliferação de novo osso (Figuras 11a, 11b, 11c e 11d).

Em geral, nos períodos de sacrifício de 4 e 6 semanas, independente da aplicação ou não do laser, a maioria dos poros dos implantes de superfície porosa apresentavam-se preenchidos com tecido ósseo (Figuras 12a, 12b e 12c). Entretanto, no período de 2 semanas, apenas nos animais que receberam tratamento com laser os poros mostraram-se parcialmente preenchidos por osso. Nos grupos de 2 semanas sem o tratamento com laser, os poros não apresentaram novo osso em seu interior (Figura 10h e Figura 12d).

A osseointegração aprimorada nos implantes de superfície porosa em relação aos de superfície rugosa foi evidenciada nos períodos de 4 e 6 semanas através do crescimento ósseo para o interior dos poros (Figuras 12e e 12f).

Não foi observado tecido fibroso na interface de nenhum tipo de implante, em nenhum dos grupos experimentais.

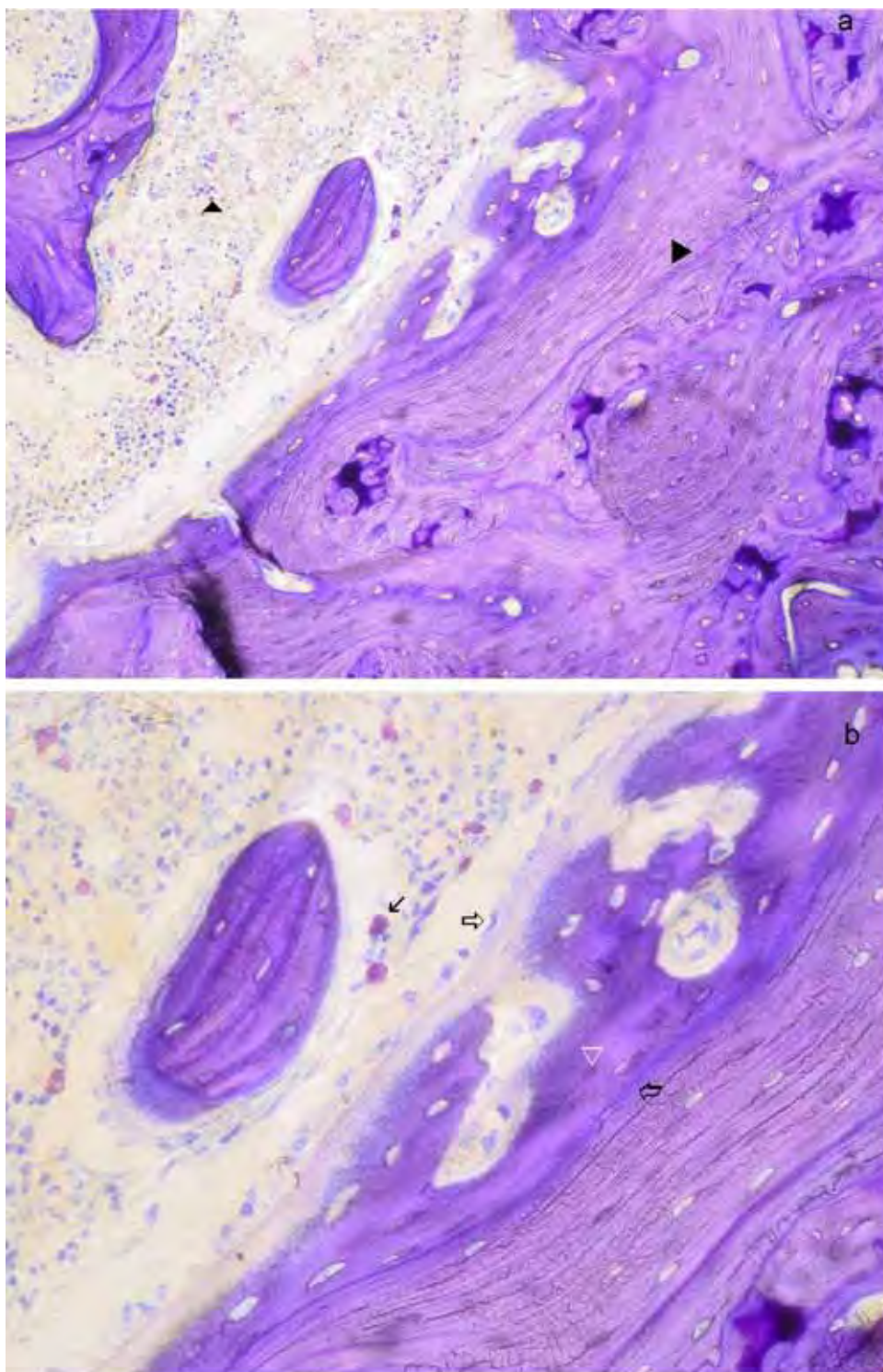


Figura 8 - Grupo sem laser, sacrifício em 2 semanas: a) Aumento original 20X, cortical óssea(►),medular (▲), b) Aumento original 40X, osteoblastos e tecido osteóide(⇌) e delimitação entre osso neoformado(▽) e osso preexistente(⇌), mastócito (↙).

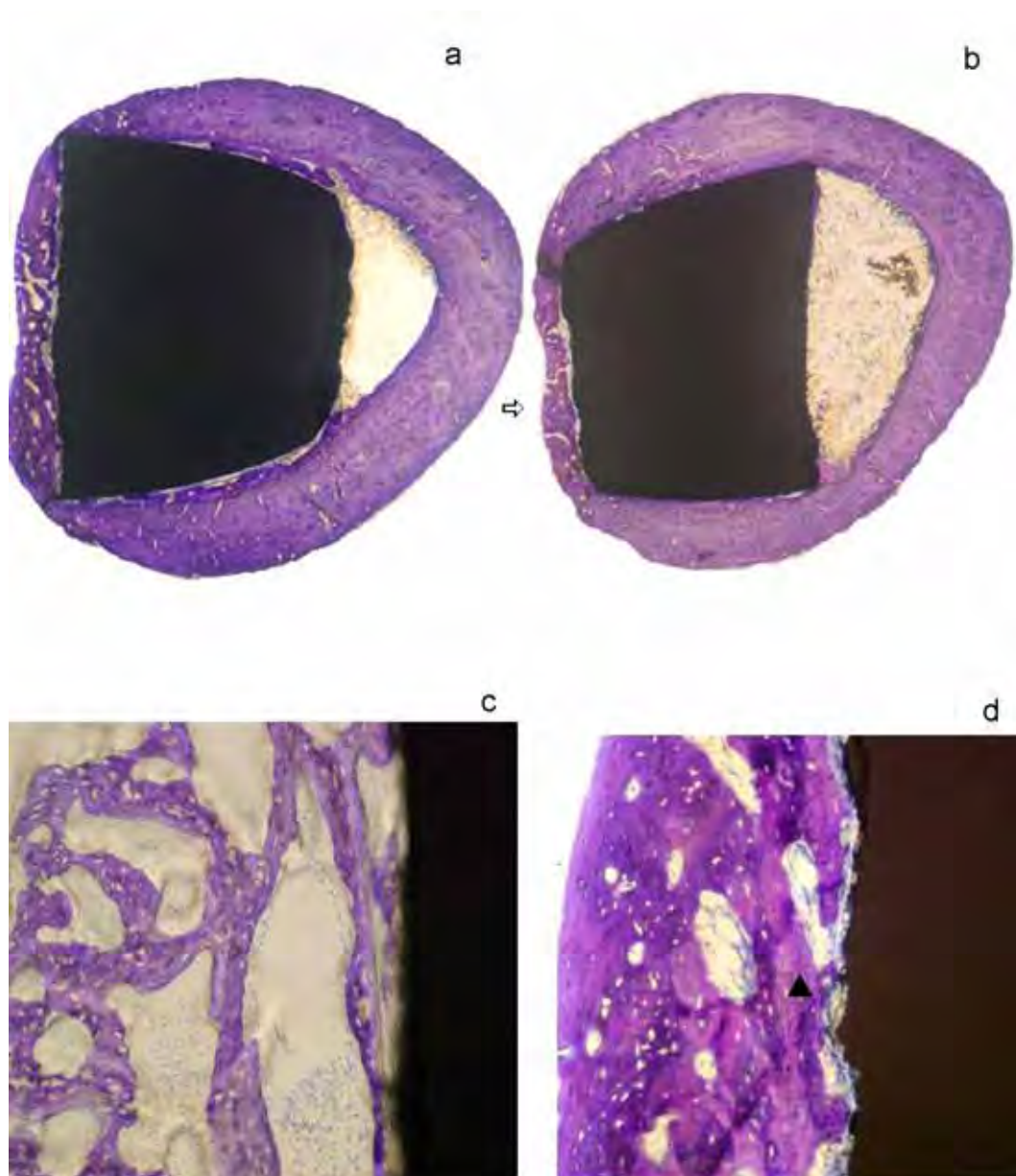


Figura 9 - Cortes dos fêmures das ratas que receberam laserterapia, sacrificadas 4 e 6 semanas após a cirurgia, obtidos por desgaste e observados em MO: a), b) Aumento original 10X visão geral do implante rugoso no interior do fêmur, observar formação de tecido ósseo na superfície externa do implante ($\Rightarrow$); c), d) Aumento original 40X e 20X respectivamente, visão em maior aumento da interface osso-implante, ($\blacktriangle$) osso trabecular bem proliferado.

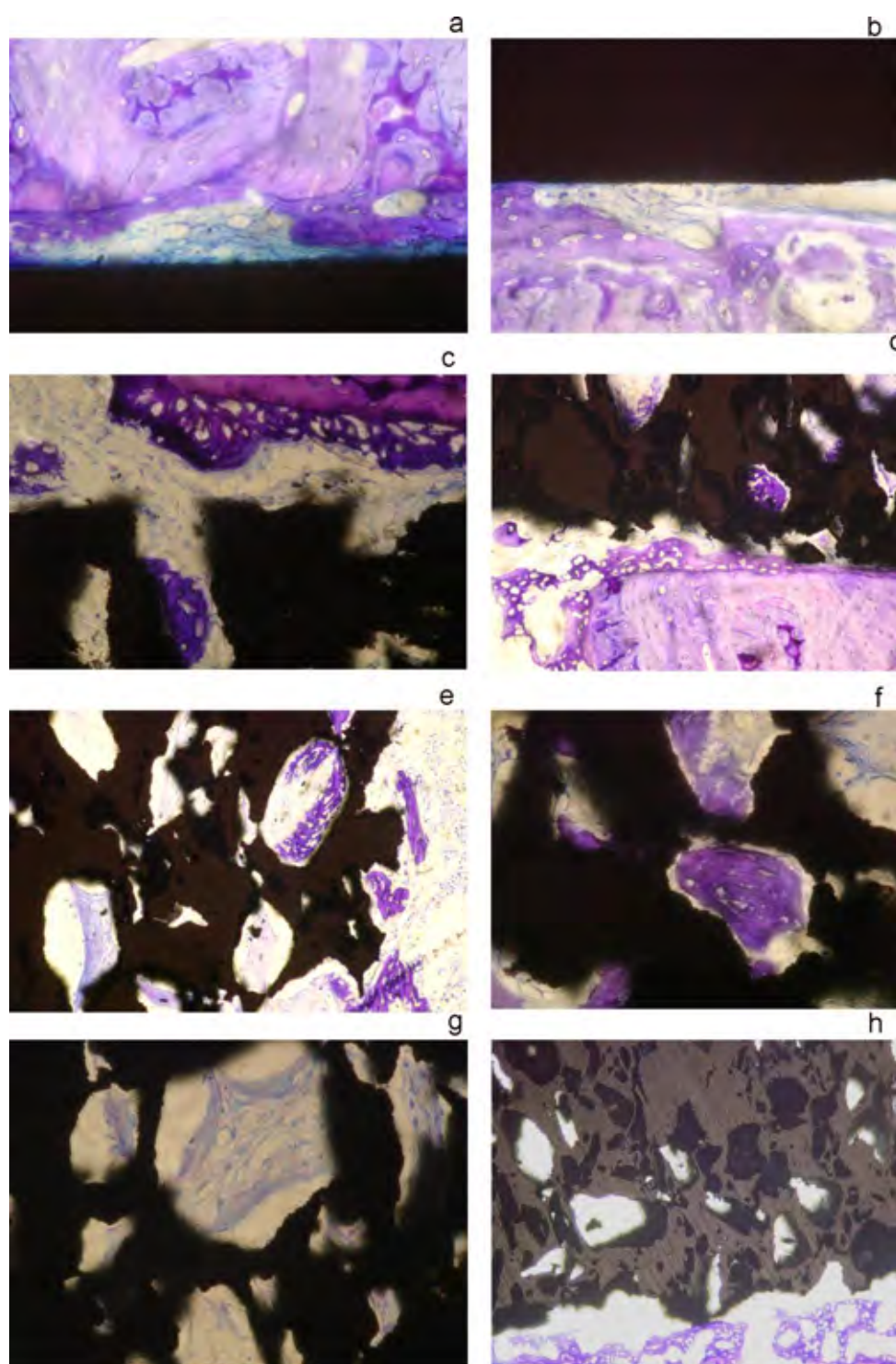


Figura 10 - Período de sacrifício de 2 semanas; aumento original 20X: a), b) interface osso-implante nos implantes rugosos; c) d) interface osso-implante nos implantes porosos; e) tecido ósseo (trabecular e osteóide) no interior dos poros, grupo laserterapia, implante poroso; f), g) intercomunicação dos poros; h) grupo sem laser, implante poroso, poros sem neorformação óssea.

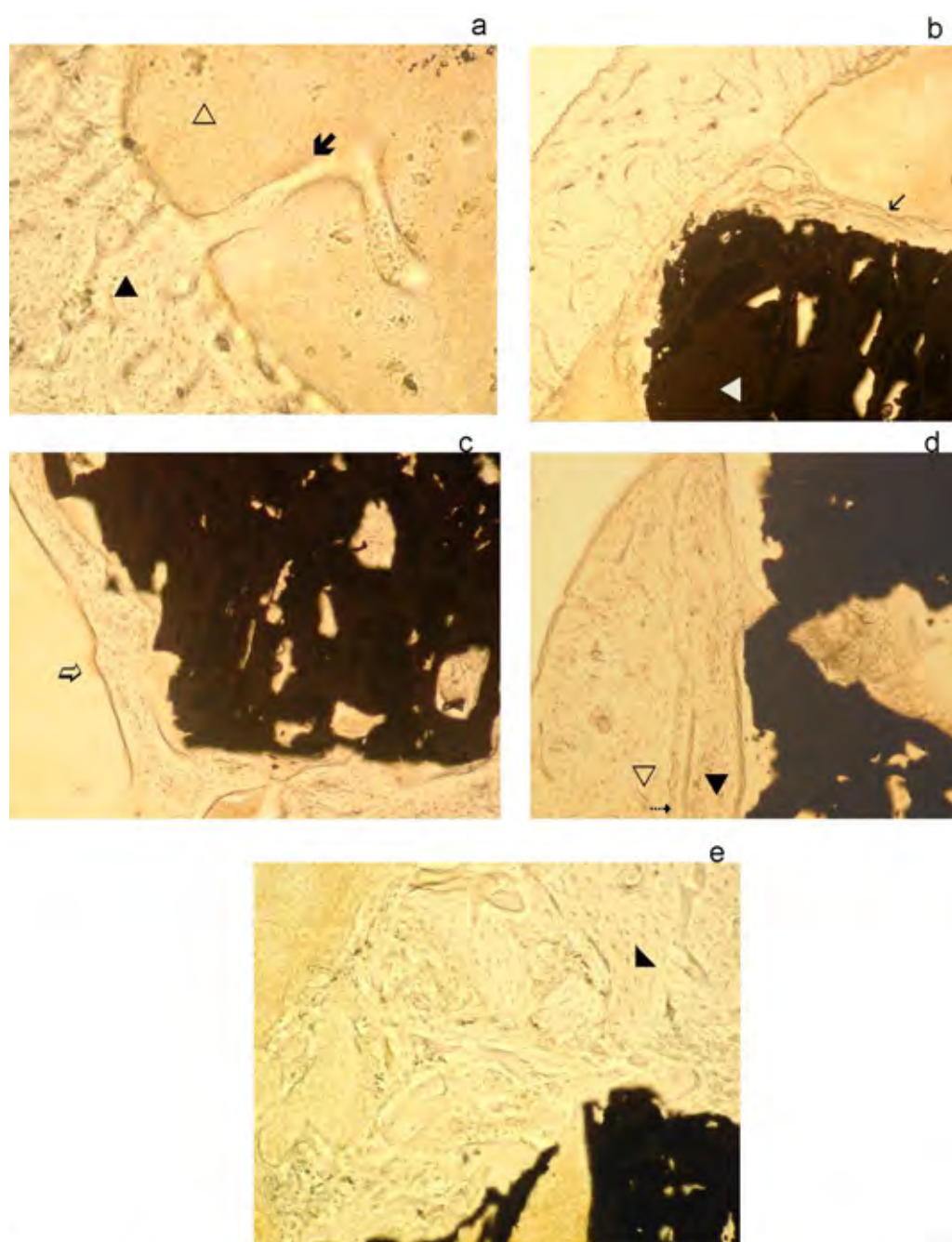


Figura 11- Cortes dos fêmures das ratas, obtidos por desgaste e observados em MO, aumento original 20X: a) grupo laser 6 semanas, cortical óssea (▲) medular (△), ponte de neoformação óssea (↔); b) grupo sem laser, implante poroso (◁), ponte de neoformação óssea (↖); c) grupo laser 6 semanas período de sacrifício, ponte de neoformação óssea (↗); d) grupo laser, 6 semanas, linha (→) demarcando osso neoformado (▼) e osso preexistente (▽); e) grupo laser, sacrifício de 2 semanas, tecido ósseo bem celula rizado (▲).

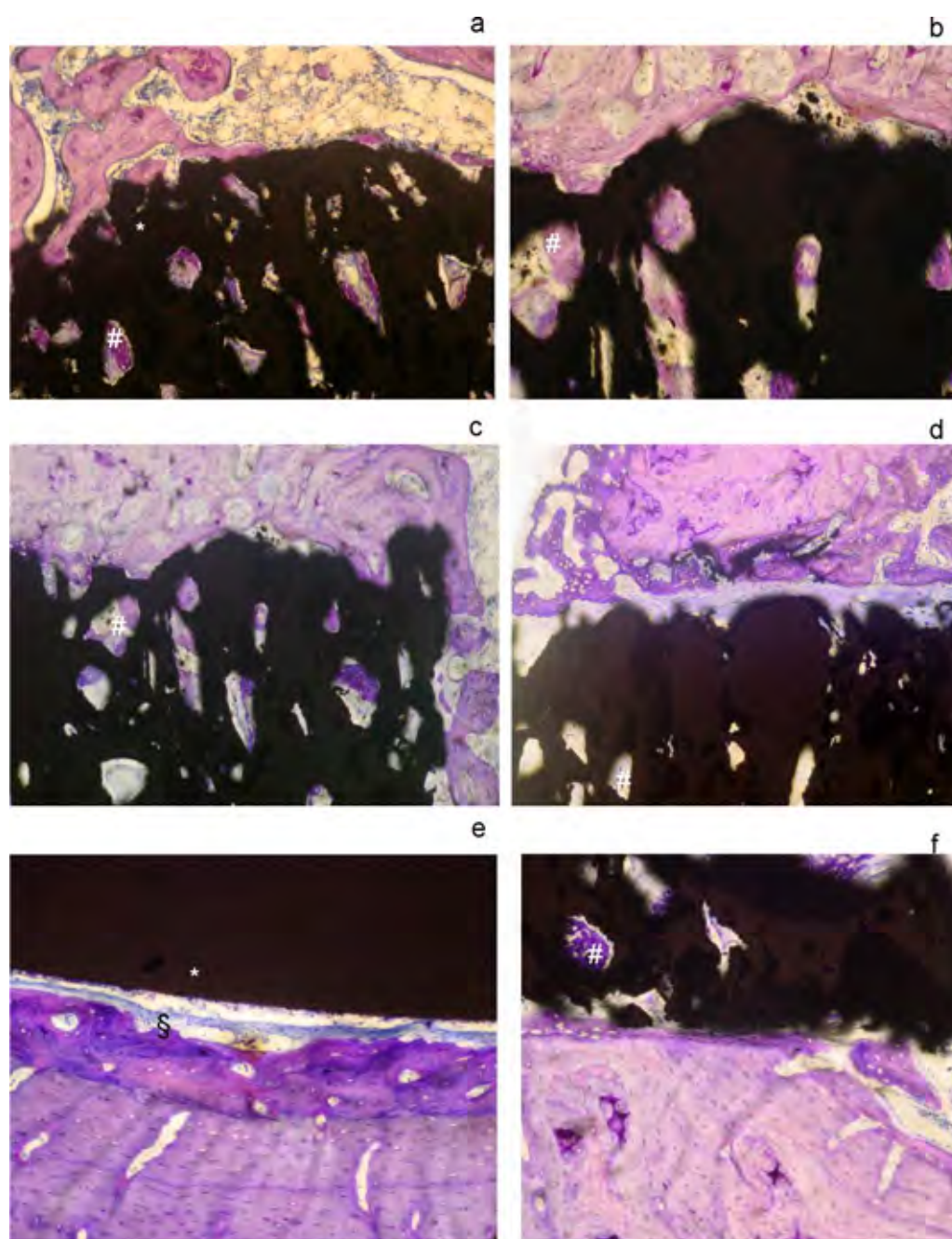


Figura 12 - Lâminas dos cortes obtidos por desgaste dos fêmures das ratas, aumento original 40X: a) 4 semanas de sacrifício, implante poroso(*) poros preenchidos por tecido ósseo(#); b) 6 semanas de período de sacrifício, poros preenchidos por tecido ósseo(#); c) 2 semanas de sacrifício, grupo laser: poros parcialmente preenchidos por tecido ósseo (#); d) 2 semanas de sacrifício, sem laser, poros sem tecido ósseo em seu interior (#); e) interface osso (§) implante rugoso (*), f) interface osso-implante poroso, crescimento ósseo para dentro dos poros (#).

5.3 Análise histomorfométrica da neoformação óssea

O efeito dos fatores principais laser, ovariectomia, tipo de implante e tempo sobre o percentual de neoformação óssea, bem como as interações entre os fatores dois a dois e entre os quatro simultaneamente são aqui demonstrados através de tabelas e gráficos.

A análise descritiva do emprego ou não do laser sobre a neoformação óssea pode ser observada na tabela 4.

Tabela 4 - Descritiva dos dados do fator laser para neoformação óssea (valores em %) obtidos da análise geral de todos os animais experimentais

Neoformação óssea	Laser	
	Não	Sim
Média	37,20	41,40
Mediana	36,9	40,8
Desvio Padrão	7,2	6,2

Nesta tabela nota-se que existe efeito do laser sobre a neoformação óssea. Os animais que receberam laser, na tabela representada pelo grupo sim, possuem média de neoformação óssea maior quando comparados aos animais que não receberam aplicação de laser, ou seja, $41,40\% \pm 6,2\%$ contra $37,20\% \pm 7,2\%$ respectivamente.

A seguir tem-se representado na tabela 5 os resultados descritivos para o fator tempo de sacrifício e neoformação óssea.

Tabela 5 - Descritiva dos dados do fator tempo de sacrifício para neoformação óssea (valores em %) obtidos da análise geral de todos os animais experimentais

Neoformação óssea	Tempo de sacrifício		
	2 sem*	4 sem	6 sem
Média	36,14	41,37	40,39
Mediana	36,2	40,8	40,0
Desvio Padrão	7,1	6,0	6,9

*: Semanas

Notou-se que houve diferença entre o tempo de 2 semanas e os demais grupos, o qual apresentou o menor percentual de neoformação óssea com média de 36,14 % $\pm$ 7,1 %.

Na análise do efeito do fator implante (poroso ou rugoso) tem-se a análise descritiva representada na tabela 6 abaixo.

Tabela 6 - Descritiva do fator implante para neoformação óssea (valores em %) obtidos da análise geral de todos os animais experimentais

Neoformação óssea	Implante	
	Rugoso	Poroso
Média	35,65	42,95
Mediana	36,2	43,1
Desvio Padrão	6,1	6,0

Verifica-se que os resultados de neoformação óssea foram maiores para os implantes do tipo poroso (superfície porosa), com média de 42,95 % $\pm$ 6,0 %.

A interação entre os fatores laser e tempo foi analisada encontrando-se os resultados mostrados na tabela 7 e representado na figura 13.

Tabela 7 - Descritiva da interação de laser e tempo para neoformação óssea (valores em %) obtidos da análise geral de todos grupos experimentais

Tempo de sacrifício	Não Laser			Sim Laser		
	2 sem*	4 sem	6 sem	2 sem	4 sem	6 sem
Média	31,99	40,92	38,68	40,29	41,82	42,10
Mediana	33,8	40,4	36,9	40,0	41,5	43,1
Desvio Padrão	6,0	6,0	6,4	5,5	6,0%	7,1

*: Semanas

O grupo que foi sacrificado em 2 semanas e não recebeu tratamento com laser foi o que obteve o menor percentual médio de neoformação óssea, com média de 31,99 % $\pm$ 6,0 %. Ao passo que o grupo que recebeu laser e foi sacrificado depois de 6 semanas foi o de maior percentual de neoformação óssea de 42,10 % $\pm$ 7,1 %.

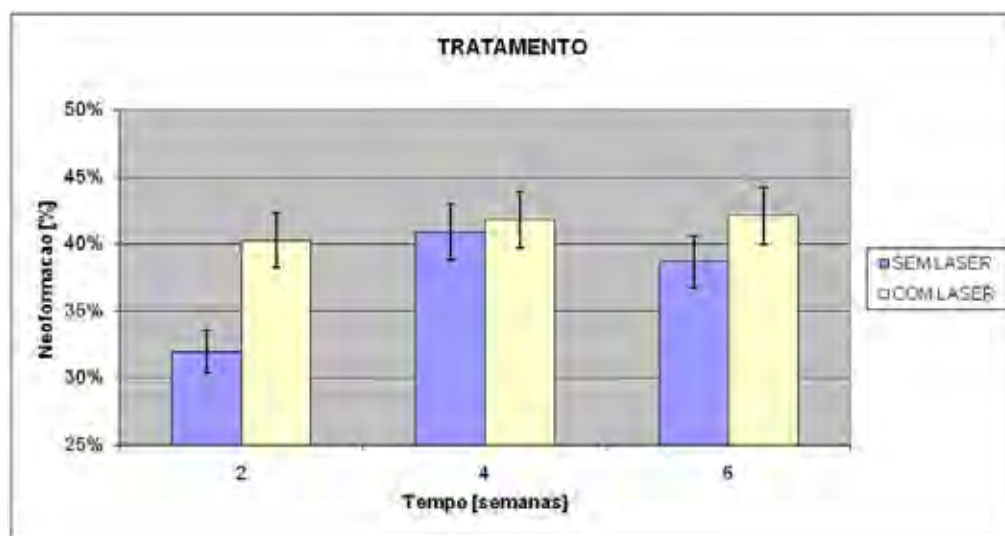


Figura 13 - Gráfico de colunas (média $\pm$ desvio padrão) da neoformação óssea(%) dos dados obtidos quanto ao tratamento utilizado em cada um dos diferentes grupos, nos 3 tempos de sacrifício.

Na análise da interação entre ovariectomia e tempo de sacrifício sobre a neoformação óssea encontram-se descritos os valores na tabela 8 e representados na figura 14.

Tabela 8 - Descritiva dos dados da interação de ovariectomia e tempo para neoformação óssea (valores em %) obtidos da análise geral de todos os grupos experimentais

Ovariectomia Tempo	OVZ			SHAM		
	2 sem*	4 sem	6 sem	2 sem	4 sem	6 sem
Média	36,22	42,11	39,86	36,06	40,63	40,93
Mediana	36,2	41,9	38,8	36,2	40,0	40,4
Desvio Padrão	7,0	5,8	7,2	7,3	6,1	6,7

*: Semanas

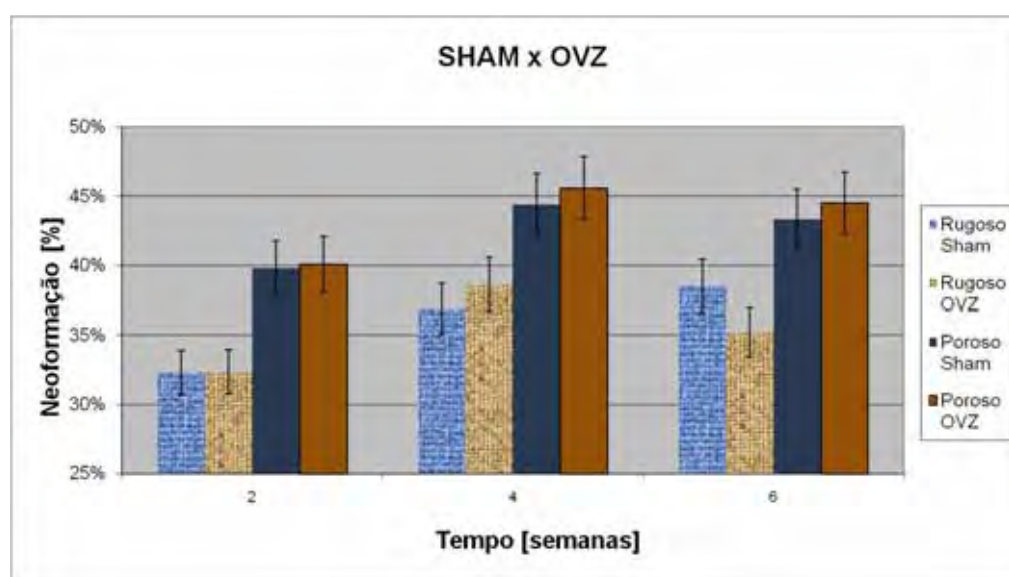


Figura 14 - Gráfico de colunas (média±desvio padrão) da neoformação óssea(%) dos dados obtidos nos grupos SHAM e OVZ, referentes aos dois tipos de implante e nos 3 tempos de sacrifício.

Verifica-se que o resultado com maior percentagem média de neoformação óssea foi do grupo OVZ em 4 semanas com $42,11 \% \pm 5,8 \%$. No entanto, não houve diferença estatística relativa aos tempos de 4 e 6 semanas do grupo SHAM, o qual apresentou respectivamente os valores de $40,63\% \pm 6,1 \%$ e $40,93\% \pm 6,7 \%$.

Na análise das interações para laser, ovariectomia e implante os valores estão representados na tabela 9.

Tabela 9 - Descritiva dos dados da interação de laser, ovariectomia e implante para neoformação óssea (%) obtidos da análise geral de todos os animais experimentais

Laser	Não				Sim			
Ovariectomia	OVZ		SHAM		OVZ		SHAM	
Implante	R*	P'	R*	P'	R*	P'	R*	P'
Média	33,82	41,05	32,94	40,98	36,98	45,73	38,86	44,05
Mediana	34,6	40,8	33,5%	40,0	36,9	45,45	38,1	44,6
Desvio Padrão	5,8	6,0	6,2	6,6	5,5	4,7	5,1	5,2

*: Rugoso, ': Poroso.

Na análise dos resultados acima se conclui que o maior valor médio de neoformação óssea foi encontrado nos animais do grupo que recebeu a laserterapia, foi submetido à ovariectomia (OVZ), e receberam implantes porosos, a média foi de $45,73\% \pm 4,7 \%$. No entanto este resultado não foi considerado estatisticamente diferente do encontrado no grupo que recebeu a laserterapia, foi submetido à cirurgia simulada de ovariectomia (SHAM), e recebeu implantes porosos, média de $44,05\% \pm 5,2 \%$.

As figuras 15 e 16 demonstram respectivamente a interação do implante e tempo de sacrifício sobre a neoformação óssea e implante, tratamento com laser e tempo de sacrifício.

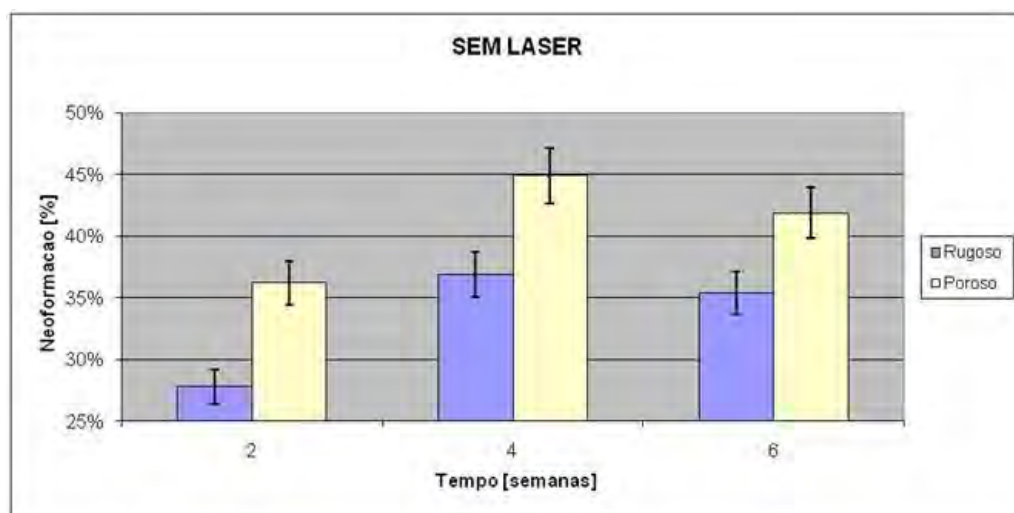


Figura 15 - Gráfico de colunas (média±desvio padrão) da neoformação óssea (%) dos dados obtidos nos grupos sem laser, referentes aos dois tipos de implante e nos 3 tempos de sacrifício

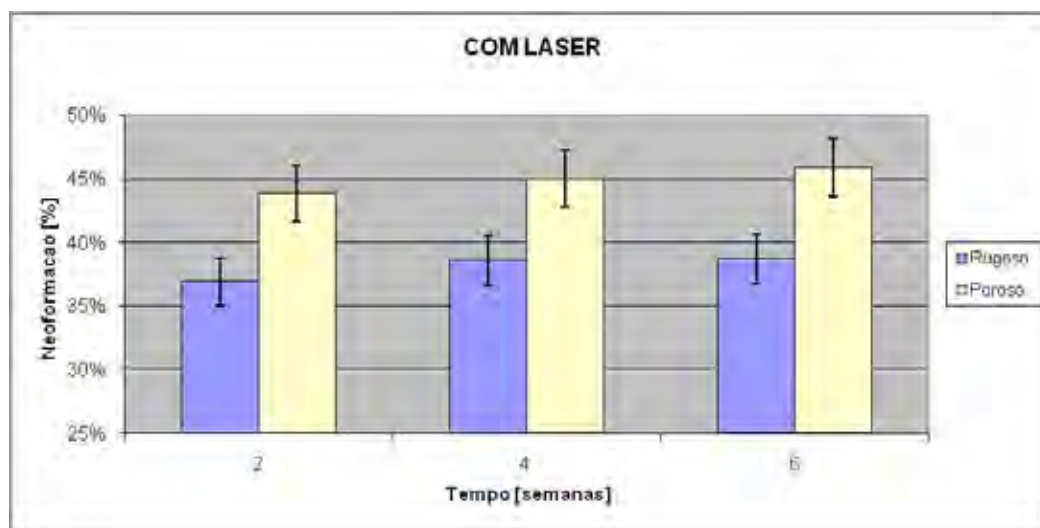


Figura 16 - Gráfico de colunas (média±desvio padrão) da neoformação óssea(%) dos dados obtidos nos grupos que receberam tratamento com laser, referentes aos dois tipos de implante e nos 3 tempos de sacrifício

Finalmente, foram analisados os dados da interação dos fatores ovariectomia, tempo e implante para neoformação óssea representados na tabela 10.

Tabela 10 - Descritiva dos dados da interação de ovariectomia, tempo e implante para neoformação óssea (valores em %) obtidos da análise geral de todos os grupos experimentais

Ovariec*	Tempo	Implante	Média	Mediana	Desvio Padrão
OVZ	2 sem	Rugoso	32,36	33,1	6,0
		Poroso	40,08	38,8	5,7
	4 sem	Rugoso	38,64	38,1	5,0
		Poroso	45,58	45,4	4,3
	6 sem	Rugoso	35,19	35,4	4,8
		Poroso	44,52	44,6	6,1
SHAM	2 sem	Rugoso	32,31	33,8	6,9
		Poroso	39,81	39,2	5,5
	4 sem	Rugoso	36,87	36,2	4,6
		Poroso	44,40	44,6	5,0
	6 sem	Rugoso	38,52	36,9	5,8
		Poroso	43,34	43,8	6,7

*:Ovariectomia

Nota-se que a interação que produziu o melhor resultado para neoformação óssea foi o grupo OVZ, dos animais sacrificados com 4 semanas, que receberam implante poroso, representado pela média de 45,58% $\pm$ 4,3 %. Contudo, este resultado não foi considerado estatisticamente diferente dos grupos que receberam implante poroso e foram sacrificados em 4 e 6 semanas pertencentes ao grupo SHAM e OVZ.

A seguir temos os gráficos dos efeitos principais na neoformação óssea.

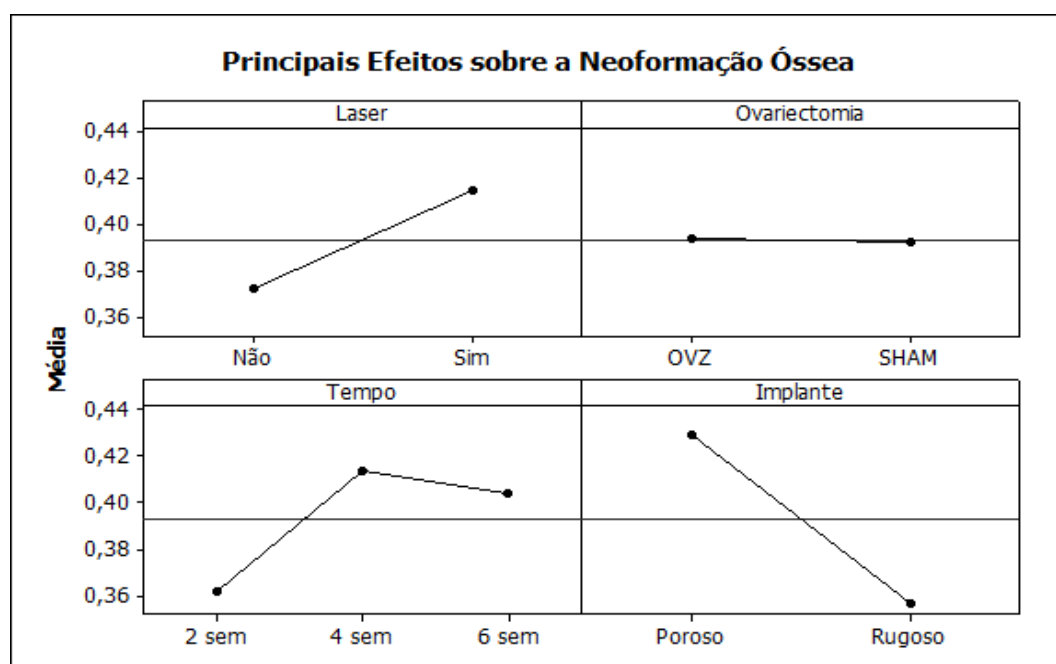


Figura 17 - Gráficos da neoformação óssea(%) dos dados obtidos nas interações dos fatores laser, osteoporose(ovariectomia), tempo de sacrifício e tipos de implantes

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, implantes cilíndricos porosos foram comparados a implantes cilíndricos rugosos quanto à quantidade e qualidade do tecido ósseo neoformado na interface osso-implante, por meio de análise histológica e histomorfométrica. Os resultados mostraram que, com relação à qualidade deste tecido, não houve diferença significativa entre os tipos de implante. Contudo, nos implantes porosos foi observada maior quantidade de tecido ósseo na interface do que nos implantes rugosos, sendo esta diferença estatisticamente significativa. Além disso, independente do tipo de implante avaliado, no período de sacrifício de quatro e seis semanas foi verificado aumento da proliferação do tecido ósseo com relação ao período de duas semanas, observando diferença estatística significativa. Previamente, os animais que receberam os implantes foram divididos em dois grupos: animais ovariectomizados (grupo OVZ) e animais com cirurgia simulada de ovariectomia (grupo SHAM). Entre estes grupos não foi encontrada diferença estatística notável na avaliação histológica de neoformação óssea desses animais, bem como na análise histomorfométrica. Simultaneamente foi analisada também a influência da laserterapia na osseointegração desses diferentes tipos de implantes, sendo observada maior neoformação óssea na avaliação histológica e histomorfométrica nos grupos submetidos ao tratamento com laser em comparação aos grupos que não foram submetidos a esse tratamento.

A osseointegração é definida como a conexão direta do implante ao osso, promovendo remodelação óssea sem a presença de componente de tecido fibroso na interface osso-implante que possa ser visível à microscopia de luz (Branemark, 1983). Com o objetivo de alcançar a osseointegração, muitas variantes da geometria da superfície

do implante têm sido desenvolvidas (Chang et al., 1998; Kasemo et al., 1999). Inicialmente observou-se que o aumento da rugosidade da superfície estava associado com melhor aderência celular, maior contato osso-implante e interação biomecânica aprimorada (Davies, 2007).

Atualmente, dentre as superfícies desenvolvidas, a superfície porosa parece ser benéfica para uma integração mais rápida e efetiva entre a superfície de implante poroso com o tecido ósseo do hospedeiro (Xue et al., 2007). A presença de poros interconectados é essencial para que ocorra a interligação entre a estrutura porosa do implante e o tecido ósseo, atingindo uma eficiente resistência interfacial em um menor período de tempo (Pilliar et al., 1998; Deporter et al., 2002). Dessa forma, o emprego, neste estudo, dos implantes de superfície porosa visou melhorar e promover uma eficiente osseointegração dos implantes de titânio como demonstrado em estudos anteriores (Kim et al., 2000; Liu et al., 2000; Vasconcellos et al., 2003; Vasconcellos et al., 2008).

Os implantes utilizados neste estudo foram confeccionados pela técnica de metalurgia do pó. Esta técnica possibilita a confecção de implantes com poros interconectados tal como uma rede tridimensional (Vasconcellos et al., 2003; Takemoto et al., 2005; Vasconcellos et al., 2008). Essa interconexão dos poros proporciona aumento do contato osso-implante bem como da proliferação óssea (Pilliar et al., 1998; Vasconcellos et al., 2003). Neste estudo houve maior porcentagem de neoformação óssea nos implantes porosos, em todos os grupos experimentais, quando comparado com implantes rugosos. Adicionalmente, o crescimento ósseo para o interior dos poros promove uma fixação mais efetiva do implante poroso ao osso, devido ao desenvolvimento de áreas mais resistentes resultantes dessa interconexão dos poros da superfície do implante (Vasconcellos et al., 2003).

Estudos demonstraram que o diâmetro dos poros deve situar-se na faixa de 100 a 500 μm para promover crescimento ósseo para o seu interior (Liu et al., 2000; Svehla et al., 2000; Vasconcellos et al., 2003; Vasconcellos et al., 2008). No presente trabalho após análise metalográfica dos dois tipos de implantes, observou-se a presença de pequenos poros nos implantes rugosos, os quais não estavam interligados e apresentavam-se em pouca quantidade. Por outro lado, nos implantes de superfície porosa notou-se a presença de poros que se apresentavam em maior número quando comparado ao implante rugoso e encontravam-se interconectados. Esta intercomunicação entre os poros é a responsável pelo crescimento ósseo para o interior dos poros nas áreas mais centrais, achados similares também foram relatados em trabalhos anteriores (Liu et al., 2000; Svehla et al., 2000; Kim et al., 2000; Vasconcellos et al., 2003; Vasconcellos, 2005; Vasconcellos et al., 2008).

Com relação à porcentagem de poros presente na amostra de titânio, pesquisadores reportaram que a porosidade adequada para essas amostras encontra-se na faixa de 25 % a 66 % (Liu et al., 2000; Kujala et al., 2003). Neste estudo, a quantidade de poros nos implantes de superfície porosa, variou entre 30 % a 40 %, estando de acordo com os estudos prévios. No entanto, trabalhos mostraram que pouca quantidade de porosidade como 5 % e alta porcentagem como 80 %, também podem promover bons resultados, como observados por Wen et al. em 2002 e Kim et al. em 2000, respectivamente.

A maior porcentagem de neoformação óssea encontrada neste estudo foi de 45,58 % nos implantes porosos, animais do grupo OVZ, e de 38,64 % nos implantes rugosos, animais do grupo OVZ, ambos sacrificados em 4 semanas. Vasconcellos et al. (2008) apresentou uma média similar de neoformação óssea no período de sacrifício de 4 semanas, sendo 57 % nos implantes porosos e 46 % para os implantes rugosos. Adicionalmente, o tempo de sacrifício dos animais produziu um efeito positivo no contato osso-implante principalmente nos grupos com 4

e 6 semanas de sacrifício, uma vez que o grupo OVZ apresentou 42,11 % e 39,86 % de neoformação óssea e o grupo SHAM exibiu 40,63 % e 40,93 %, respectivamente valores maiores em relação aos grupos com 2 semanas de sacrifício que foram de 36,22 % para o grupo OVZ e de 36,06 % para o grupo SHAM.

A osteoporose é definida mundialmente como uma doença sistêmica esquelética caracterizada por redução de massa e deterioração microarquitetural do tecido ósseo. A rata ovariectomizada mostra-se como um modelo de grande aplicabilidade para indução de quadro osteopênico (Frost; Jee, 1992).

A compreensão sobre o mecanismo da reparação óssea em indivíduos osteoporóticos é essencial para o estabelecimento de medidas terapêuticas mais objetivas, resultando na redução do período de tratamento, bem como em melhores condições de reabilitação (Carvalho, 2001).

A rata ovariectomizada mostra-se como um modelo de grande aplicabilidade para indução de quadro osteopênico, visando estudar esta condição para seu melhor entendimento (Frost; Jee, 1992). Neste estudo foi realizada a ovariectomia (OVZ) em 42 ratas, objetivando promover a osteopenia. Para o grupo controle, 42 ratas foram submetidas à falsa ovariectomia (SHAM), procedimento também adotado por outros autores (Frost et al., 1992; Carvalho, 2001; Silveira, 2004; Anbinder et al., 2007; Prado, 2008). Trinta dias após a realização das cirurgias de OVZ e SHAM foi realizada a cirurgia de colocação dos implantes, este período foi adotado neste trabalho baseado na literatura (Frost et al., 1992; Carvalho, 2001; Abinder et al., 2007). Carvalho (2001) afirma que a indução de osteopenia em rata madura pela ovariectomia necessita de um período mínimo de 30 dias.

Os resultados encontrados na análise histológica desta pesquisa não demonstraram diferença estatística significativa no tecido ósseo das ratas ovariectomizadas em relação ao grupo controle (SHAM),

resultado semelhante foi observado por Kubo et al., 1999; Silveira, 2004; Prado, 2008) os quais também não encontraram diferença estatística entre os grupos SHAM e OVZ em relação ao reparo ósseo. Segundo Carvalho DCL (2001) a ovariectomia exerce influência sobre o tecido ósseo cortical, porém de forma pouco expressiva especialmente em períodos curtos de tempo. Diferentes regiões ósseas respondem a ovariectomia de formas distintas, sendo que regiões com predominância de osso cortical não sofrem alterações significativas por serem menos sensíveis à queda do hormônio ovariano (Mosekilde et al., 1998).

Por outro lado, no trabalho de Fini et al., em 2001 os animais com osteopenia apresentaram uma diminuição na osseointegração em todos os materiais de implante testados. Fini M et al. (1997) também observaram diferença nas taxas de osseointegração para implantes com hidroxiapatita (HA) e implantes de titânio, quando inseridos em ratas osteopênicas, sendo que essa taxa apresentou-se menor em comparação às ratas normais. Wronski et al., em 1988 encontraram diferenças na remodelação óssea, revelando um retardo, em reparo ósseo nos animais ovariectomizados.

Para o tratamento de injúrias no tecido ósseo, o laser de baixa potência (LLLT) tem sido utilizado visando promover a cura da ferida e reduzir a dor (Nissan et al., 2006).

É ainda difícil para se comparar estudos sobre a ação da LLLT sobre a osseointegração de biomateriais, devido aos modelos experimentais e à duração do tratamento ser muito distintos.

Na literatura ainda não se encontra um protocolo de irradiação, havendo muita variação quanto à potência e dose utilizada, além do modo e número de aplicações (Coombe et al., 2001; Nicola et al., 2003; Garavello-Freitas et al., 2003; Pinheiro et al., 2003; Khadra, 2005; Bourguignon-Filho et al., 2005; Nissan et al., 2006). Alguns autores sugerem que a frequência e o número de sessões influenciam no resultado final da laserterapia (Ozawa et al., 1998; Khadra, 2005). A dose

de irradiação utilizada neste estudo foi de 4 J/cm^2 por ponto irradiado e está de acordo com vários trabalhos que sugerem que uma dose de energia na faixa de 1 a 5 J/cm^2 , induz a efeitos positivos no tecido ósseo e tecido cutâneo (Pinheiro et al 2003; Gerbi et al., 2005; Khadra, 2005; Gerbi et al., 2008). Foram utilizados 4 pontos para irradiação visando fracionar a dose total por sessão que foi de 16 J/cm^2 . O intervalo entre as aplicações foi de 48 horas. Todos estes parâmetros estão de acordo com o protocolo recomendado por Pinheiro et al. (2003) e Gerbi et al. (2008). No entanto, na literatura, alguns autores encontraram resultados positivos com a laserterapia, com laser Ga Al As, utilizando diferentes doses de energia e períodos de tratamento. Galvão et al. (2006) utilizou $112,5 \text{ J/cm}^2$ e 30 mw de potência iniciando o tratamento 3 dias após a confecção do defeito cirúrgico total de 12 sessões de aplicação. Pretel et al. (2007) utilizaram dose única de $1,4 \text{ J/cm}^2$ de densidade de energia com 35 mw de potência sobre a área do defeito ósseo. Matsumoto et al. (2009) utilizaram 16 J/cm^2 , irradiação iniciada 24h após a cirurgia mantida a cada 48 h por 15 dias ou até o dia do sacrifício.

De acordo com Dörtbudak et al. (2002), as irradiações com laser de baixa potência em tecidos duros aumentam significativamente o número de osteócitos viáveis no osso irradiado, pelo seu efeito positivo sobre a produção da matriz óssea, provocando alta vitalidade e reatividade no tecido ósseo peri-implantar. Resultados encontrados neste estudo revelaram maior porcentagem de neoformação óssea nos grupos que receberam laser, sendo que os maiores valores foram observados nos períodos de sacrifício de 4 e 6 semanas, independente dos animais pertencerem ao grupo OVZ ou SHAM. Na análise histológica os resultados demonstraram neoformação óssea mais efetiva nos grupos que receberam laser em relação aos grupos que não foram submetidos a aplicações de laser, demonstrando um efeito positivo da LLLT, conforme descrito previamente por outros autores (Garavelllo-Freitas et al., 2003; Pinheiro et al., 2003; Pretel et al., 2007; Gerbi et al.,

2008). Estes achados foram similares a outros estudos que também notaram aumento da área de neoformação óssea com a utilização da LLLT, sendo este fator dose dependente (Ozawa et al., 1998; Dörtbudak et al., 2002; Nissan et al., 2006; Pretel et al., 2007). No entanto, o uso de doses muito baixas de irradiação e comprimento de onda inapropriado pode ocasionar resultados negativos. Jakse et al. (2007) não encontraram efeito positivo da LLLT na regeneração óssea após a cirurgia de aumento do seio maxilar seguida da colocação de enxerto ósseo.

O desenvolvimento laserterapia representa talvez uma das mais promissoras modalidades de tratamento para aperfeiçoar a osseointegração de biomateriais e para preparar um sítio adequado para a inserção do implante (Obradovic et al., 2008)

Os resultados obtidos neste trabalho revelaram que em decorrência da maior superfície de contato dos implantes porosos com o tecido ósseo, promovida pela presença de poros interconectados, ocorreu maior crescimento ósseo na interface osso-implante. Os tempos de sacrifício mais longos contribuíram para uma maior proliferação do tecido ósseo para o interior dos poros, provavelmente proporcionando melhor osseointegração e adesão dos implantes. Esses resultados estão de acordo com diversos estudos prévios, os quais também observaram maior efetividade dos implantes de superfície porosa quando comparados a outros tipos de superfície (Pilliar, 1983; Chang et al., 1998; Pilliar et al., 1998; Deporter et al., 1990; Svehla et al., 2000; Deporter et al., 2002; Frosch et al., 2003; Kim et al., 2000; Zhu et al., 2004; Zinger et al., 2005; Vasconcellos, 2005; Vasconcellos et al., 2008). Contudo a osteopenia não promoveu diferença estatística significativa entre os grupos SHAM e OVZ com relação à neoformação óssea na interface osso-implante. Finalmente, os resultados demonstraram que a laserterapia, nos padrões dosimétricos e metodologia utilizados neste estudo, promoveu melhora no reparo ósseo após a cirurgia de inserção dos implantes. Este resultado positivo foi observado especialmente nos implantes de superfície porosa,

demonstrado pela maior neoformação óssea nos grupos que receberam laserterapia e implantes porosos.

São necessários mais estudos envolvendo superfícies de implantes e aplicação do laser de baixa potência, para determinar os protocolos de aplicação da laserterapia, mostrando a eficiência deste método terapêutico na cicatrização de tecidos moles, tecido ósseo, bem como melhorando a osseointegração.

7 CONCLUSÃO

Nas condições experimentais analisadas podem-se concluir que:

a) os implantes cilíndricos de superfície porosa propiciam uma aprimorada superfície de contato osso-implante, a qual permite o crescimento ósseo para o interior dos poros, devido à interconexão existente entre os mesmos. Por outro lado, os implantes cilíndricos de superfície rugosa não exibem tal geometria de superfície, resultando em menor proliferação óssea.

b) a osteopenia não interferiu na neoformação óssea em ratas ovariectomizadas, nas condições experimentais analisadas.

c) a laserterapia, dentro dos parâmetros utilizados neste estudo, teve um efeito biomodulador positivo na neoformação óssea e na osseointegração, em todos os grupos analisados.

8 REFERENCIAS*

Anbinder AL, Prado FA, Prado MA, Balducci I, Rocha RF. Influência da ovariectomia, da simvastatina e do alendronato sódico no osso alveolar em ratas. Braz Oral Res. 2007; 21(3): 247-52.

Abraão GS, Shimano AC, Picado CHF. Ação da atividade física sobre as propriedades mecânicas dos fêmures e tíbias de ratas osteopênicas. Acta Ortop Bras. 2006; 14(5): 242-5.

Aires MM. Fisiologia. Rio de Janeiro: Guanabara koogan; 1999.

Artioli L. Uma luz poderosa. Rev Assoc Paul Cir Dent. 2005;59(6):407-14.

Bandeira F, Macedo G, Caldas G, Griz L, Faria M. Osteoporose. Rio de Janeiro: Medsi; 2000.

Barushka O, Yaakobi T, Oron U. Effect of low-energy laser (He-Ne) irradiation on the process of bone repair in the rat tibia. Bone. 1995;16:47-55.

Borsari V, Giavaresi G, Fini M, Torricelli P, Tschon M, Chiesa R, et al. Comparative in vitro study on a ultra-high roughness and dense titanium coating. Biomaterials. 2005 Aug;26(24):4948-55.

*Baseado em:

Internacional Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM: c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Bourguignon-Filho AM, Feitosa ACR, Beltrão GC, Pagnoncelli RM. Utilização do laser de baixa intensidade no processo de cicatrização tecidual. Revisão da literatura. Ver Port Estomatol Cir Maxilofac. 2005;46:37-43.

Brandon D, Kaplan WD. Microstructural Characterization of Material. New York: John Wiley & Sons; 1999.

Branemark PI. Osseointegration and its experimental back-ground. J Prosthet Dent. 1983 Sep;50(3):399-440.

Brentel AS, Vasconcellos LMR, Oliveira MV, Graça MLA, Vasconcellos LGO, Cairo CAA, et al. Histomorphometric analysis of pure titanium implants with porous surfaces versus rough surface. J Appl Oral Sci. 2006; 14:213-8.

Brugnera AJr., Santos AECG, Bologna ED, Ladalardo TCCG. Atlas de Laserterapia aplicada à Clínica Odontológica. São Paulo: Santos; 2004.

Carvalho DCL. Ação do ultra-som de baixa intensidade em ossos de ratas osteopênicas [tese]. São Carlos: Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia EESC/FMRP/IQSC, Bioengenharia/USP, São Carlos(SP): Universidade de São Paulo- USP; 2001.

Chang YS, Gu HO, Kobayashi M, Oka M. Influence of various structure treatments on histological fixation of titanium implants. J Arthroplasty. 1998 Oct; 13(7): 816-25.

Coombe AR, Ho CTG, Philips J, Darendeliler MA, Hunter N, Chapple CC, et al. The effects of low-level laser irradiation on osteoblastic cells. Clin Orthop Res. 2001; 4: 3-14.

Davies JE. Bone bonding at natural and biomaterial surfaces. Biomater. 2007 Dec; 28(34):5058-67.

Deporter DA, Watson PA, Pilliar RM, Chipman ML, Valiquette N. A histological comparison in the dog of porous coated vs. threaded dental implants. *J Dent Res.* 1990 May; 69(5):1138-45.

Deporter D, Pilliar R, Todeskian R, Watson P, Pharoah M. Managing the posterior mandible of partially edentulous patients with short, porous-surfaced dental implants: early data from a clinical trial. *Int J Oral Maxillofac Implant.* 2001; 16(5): 653-8.

Deporter DA, Todeskian R, Riley N. Porous-surfaced dental implants in the partially edentulous maxilla: assessment for subclinical mobility. *Int J Period Restor Dent.* 2002; 22(2): 184-92.

Diniz MG, Soares GA, Coelho MJ, Fernandes MH. Surface topography modulates the osteogenesis in human bone marrow cell cultures grown on titanium samples prepared by a combination of mechanical and acid treatments. *J Mater Sci Mater Med.* 2002 Apr; 3(4):421-32.

Dörtbudak O, Haas R, Mailath-Pokorny G. Effect of low-power laser irradiation on bony implant sites. *Clin Oral Implants Res.* 2002; 13: 288-92.

Duarte PM, César JB Neto, Gonçalves PF, Sallum EA, Nociti FH. Estrogen deficiency affects bone healing around titanium implants: a histometric study in rats. *Implant Dent.* 2003;12(4):340-6.

Fini M, Giavaresi G, Greggi T, Martini L, Aldini NN, Parisini P, et al. Biological assessment of the bone-screw interface after insertion of uncoated and hydroxyapatite-coated pedicular screws in the osteopenic-sheep. *J Biomed Mater Res A.* 2003 Jul; 66(1): 176-83.

Fini M, Giavaresi G, Torricelli P, Krajewski A, Ravaglioli A, Belmonte MM, et al. Biocompatibility and osseointegration in osteoporotic bone. *J Bone Joint Surg Br.* 2001 Jan; 83(1):139-43.

Fini M, Nicoli AN, Gandolfi MG, Mattioli BM, Giavaresi G, Zucchini C et al. Biomaterials of orthopedic surgery in osteopenic rats comparative study in osteopenic rats. *Int J Artif Organs.* 1997 May; 20(5):291-97.

Fini M, Savarino L, Nicoli Aldini N, Martini L, Giavaresi G, Rizzi G, et al. Biomechanical and histomorphometric investigations on two morphologically differing titanium surfaces with and without fluorhydroxyapatite coating: an experimental study in sheep tibia. *Biomaterials*. 2003 Aug; 24(19): 3183-92.

Fonseca KB, Pereira HH, Silva SN. Avaliação de falhas em implantes metálicos coxo-femoral e joelho retirados de pacientes. *Rev Matéria*. 2005;10(3):472-80.

Freitas IGF, Baranauskas V, Cruz-Hofling MA. Laser effects on osteogenesis. *J Appl. Surface Sci*. 2000; 154: 548-54.

Frosch KH, Sondergeld I, Dresing K, Rudy T, Loochman CH, Rabba J, et al. Autologous osteoblasts enhance osseointegration of porous titanium implants. *J Orthop Res*. 2003; 21(2): 213-23.

Frost HM, Jee WS. On the rat model of human osteopenics and osteoporoses, Review. *Bone Miner*. 1992 Sep; 18(3) 227-36.

Fukuhara E, Goto T, Matayoshi T, Kobayashi S, Takahashi T. Optimal Low-energy laser irradiation causes temporal G2/M arrest on rat calvarial. *J Calcified Tissue Int*, 2006 Dec; 79(6): 443-50.

Galvão APL, Jorgetti V, Silva OL. Comparative study of how low level laser therapy and low- intensity pulsed ultrasound affect bone repair in rats *Photo Med and Laser Surg*. 2006; 24(6): 735-40.

Garavello-Freitas I, Baranauskas V, Joazeiro P, Padovani CR, Dal Pai-Silva M, Cruz-Hofling MA. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. *J. Photochemical Photobiol*. 2003; 70: 81-9.

Garcia VG, Okamoto T, Kina JR. Reparação de feridas cutâneas submetidas ao tratamento com raio laser. Estudo clínico em ratos. *Rev Faculd Odontol Lins* 1995; 8: 9-15.

Genant HK, Cooper C, Poor R, Reid I, Ehrlich G, Kanis J, et al. Interim report and recommendations of the world Health Organization task-force for osteoporosis. *Osteoporos Int.* 1999; 10(4): 259-64.

Gerbi MEMM, Marques AMC, Ramalho LMP, Ponzi EAC, Carvalho CM, Santos RC, et al. Infrared laser light further improves bone healing when associated with bone morphogenic proteins: An in vivo study in a rodent model. *Photomed and Laser Surg.* 2008; 26(1): 55-60.

Gerbi MEMM, Pinheiro ALB, Marzola C, Limeira Júnior FA, Soares AO, Carvalho LCB, et al. Assessment of bone repair associated with the use of organic bovine bone and membrane irradiated at 830 nm. *Photomed. Laser Surg.* 2005; 23: 382-88.

Götz HE, Müller M, Emmel A, Holzwarth U, Erben RG, Stangl R. Effect of surface finish on the osseointegration of laser-treated titanium alloy implants. *Biomaterials.* 2004 Aug; 25(18): 4057-64.

Gutknecht N, Eduardo CP. A odontologia e o laser: atuação do laser na especialidade odontológica. São Paulo: Quintessence; 2004.

Hill PA. Bone Remodeling. *Br J Orthod.* 1998; 25(2):101-7.

Itälä AI, Ylänen HO, Ekholm C, Karlsson KH, Aro HT. Pore diameter of more than 100 microm is not requisite for bone ingrowth in rabbits. *J Biomed Mater Res.* 2001; 58(6): 679-83.

Jakse N, Payer M, Tangl S, Berghold A, Kirmeier R, Lorenzoni M. Influence of low-level laser treatment on bone regeneration and osseointegration of dental implants following sinus augmentation: An experimental study on sheep. *Clin Oral Impl Res.* 2007 Aug; 18(4):517-24.

Khadra M, Lyngstadaas SP, Haanaes HR, Mustafa K. Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. *Biomaterials.* 2004; 26: 3503-9.

Khadra M. The effect of low level laser irradiation on implant-tissue interaction. In vivo and in vitro studies. *Swed Dent J Suppl.* 2005; (172):1-63.

Karu T, Pyatibrat L, Kalendo G. Irradiation with He-Ne laser increase ATP level in cells cultivated in vitro. *J Photochem Photobiol.* 1995; 27:219-23.

Kasemo B, Gold J. Implant surfaces and interface processes, Review. *Adv Dent Res.* 1999 Jun; 13: 8-20.

Kim HM, Kokubo T, Fujibayashi S, Nischiguchi, Nakamura T. Bioactive macrosporous titanium surface layer on titanium substrate. *J Biomed Mater Res.* 2000 Dec 5; 52(3): 553-7.

Kubo T, Shiga T, Hashimoto J, Yoshioka M, Honjo H, Urabe H. Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1999; 68(5-6): 197-202.

Kujala S, Ryhänen J, Danilov A, Tuukkanen J. Effect of porosity on the osteointegration and bone ingrowth of a weight-bearing nickel-titanium bone graft substitute. *Biomaterials.* 2003 Nov; 24(25): 4691-7.

Lill CA, Hessein J, Schlegel U, Eckhardt C, Goldhahn J, Schneider E. Biomechanical evaluation of healing in a non-critical defect in a large animal model of osteoporosis. *J Orthop Res.* 2003; 21(5): 836-42.

Liu YL, Schoenaers J, Groot K, Wijn JR, Schepers E. Bone healing in porous implants: a histological and histometrical comparative study on sheep. *J Mater Sci Mater Med.* 2000 Nov; 11(11): 711-7.

Marques Neto JF, Lederaman R. Osteoporose Brasil: ano 2000. São Paulo: Limay, 1995.

Matsumoto MA, Ferino RV, Monteleone GF, Ribeiro DA. Low-level therapy modulates cyclo-oxygenase-2 expression during bone repair n rats. *Lasers Med Sci.* 2009 Mar; 24(2): 195-201.

Modesto-Filho J, Azevedo LCP, Azevedo LAP. Tratamento da osteoporose. J Bras Med. 1996; 71: 77-84.

Mosekilde L, Thomsen JS, Orhii PB, Kalu DN. Growth hormone increases vertebral and femoral bone strength in osteopenic, ovariectomized, aged rats in a dose- dependent and site- specific manner. Bone. 1998; 23:343-52.

Najjar T, Kahn D. Comparative study of healing and remodeling in various bones. J Oral Surg. 1977; 35(5): 375-9.

Nguyen HQ, Deporter DA, Pilliar RM, Valiquette N, Yakubovich R. The effect of sol-gel-formed calcium phosphate coatings on bone ingrowth and osteoconductivity. Biomaterials. 2004 Feb; 25(5): 865-76.

Nicola RA, Jorgetti V, Rigau J, Pacheco MTT, Reis LM, Zângaro RA. Effect of low-power GaAlAs laser (660nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. Lasers Med Sci. 2003; 18: 89-94.

Ninomiya T, Miyamoto Y, Ito T, Yamashita A, Wakita M, Nishisaka T. High-intensity pulsed laser irradiation accelerates bone formation in metaphysical trabecular bone in rat femur. J Bone Miner Metab. 2003; 21(2): 67-73.

Nissan J, Assif D, Gross MD, Yaffe A, Binderman I. Effect of low intensity laser irradiation on surgically created bony defects in rats. J Oral Rehabil. 2006; 33:619-24.

Obradovic RR, Kesic LG, Pesevska S. Influence of low-level laser therapy on biomaterial osseointegration: a mini-review. Lasers Med Sci. 2009 May; 24(3): 447-51.

Okazaki Y, Nishimura E, Nakada H, Kobayashi K. Surface analysis of Ti-15Nb-4 Ta alloy after implantation in rat tibia. Biomaterials. 2001 Mar; 22(6): 599-607.

Oyonarte R, Pilliar R, Deporter D, Woodside D. Peri – Implant bone response to orthodontic loading: Part 1. A histomorphometric study of the effects of implant surface design. *Am J Orthod Dentofac Orthop*. 2005; 128(2): 173-81.

Ozawa Y, Shimizu N, Kariya G, Abiko Y. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *Bone*. 1998; 22: 347-54.

Pereira AN, Eduardo CP, Matson E, Marques MM. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultered fibroblasts. *Lasers Surg Med*. 2002; 31: 263-7.

Pilliar RM, Deporter D, Watson PA, Todescan R. The endopore implant-enhanced osseointegration with a sintered porous-surface design. *Oral Health*. 1998 Jul; 61-4.

Pilliar RM. Powder metal-made orthopedic implants with porous surface for fixation by tissue ingrowth. *Clin Orth Rel Res*. 1983; 176:42-51.

Pinheiro ALB, Limeira FAJr, Gerbi MEMM, Ramalho LMP, Marzola C, Ponzi EAC. Effect of low-level therapy on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone. *Braz Dent J*. 2003; 14: 177-81.

Prado RF. Efeitos da osteopenia no reparo ósseo alveolar de ratas [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (SP), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP; 2008.

Pretel H, Lizarelli RFZ, Ramalho LTO. Effect of low-level laser therapy on bone repair: histological study in rats. *Lasers Surg Med*. 2007; 39: 788-96.

Reddy MS, Weatherford TW 3rd, Smith CA, West BD, Jeffcoar MK, Jacks TM. Alendronate treatment of naturally-occurring periodontitis in beagle dogs. *J Periodont*. 1995; 66(3): 211-7.

Roberts WE. Bone tissue interface. *J Dent Educ.*, 1988; 52(12): 804-9.

Rubin E, Farber JL. Tecido ósseo. In: Patologia. Rio de Janeiro: Interlivros; 1990.

Sargeant TD, Guler MO, Oppenheimer SM, Mata A, Satcher RL, Dunand DC, et al. Hybrid bone implants: Self-assembly of peptide amphiphile nanofibers within porous titanium. J Biomater. 2008; 29: 161-71.

Scharweber D, Beutner R, Robler S, Worch H. Electrochemical behavior of titanium-based materials- are there relations to biocompatibility? J Mater Sci Mater Med. 2002; 13: 1215-20.

Schenk RK. Bone regeneration: biologic basis. In: Buser D, Dahlin C, Schenk RK. Guided bone regeneration in implant dentistry. Chicago: Quintessence Books; 1998. cap.3, p.49-100.

Schenk RK, Buser D. Osseointegration: a reality. Periodontol. 2000; 17: 22-35.

Silveira VAS. Efeito das isoflavonas, da terapia de reposição hormonal com estrógeno e da associação de ambos na reparação de defeitos em ratas ovariectomizadas [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (SP), Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP; 2004.

Svehla M, Morberg P, Zicat B, Bruce W, Sonnabend D, Walsh WR. Morphometric and mechanical evaluation of titanium implant integration: comparison of five surface structures. J Biomed Mater Res. 2000 Jul; 51(1): 15-22.

Takeda Y. Irradiation effect of low-energy laser on alveolar bone after tooth extraction. Experimental study in rats. Int J Oral Maxillofac Surg. 1988, 17: 388-91.

Takemoto M, Fujibayashi S, Neo M, Susuki J, Kokubo T, Nakamura T. Mechanical properties and osteoconductivity of porous bioactive titanium. Biomaterials. 2005 Oct; 26(30): 6014-23.

Tartarunas AC, Matera JM, Dagli MLZ. Estudo clínico e anatomopatológico da cicatrização cutânea no gato doméstico. Utilização do laser de baixa potência GAAS (904nm). Acta Cirurg Bras. 1998; 13.

Tisdell CL, Goldberg VM, Parr JA, Bensusan JS, Staikoff LS, Stevenson S. The influence of a hydroxyapatite and tricalcium-phosphate coating on bone growth into titanium fiber-metal implants. J Bone Joint Surg Am. 1994 Feb;76(2):159-71.

Trelles MA, Mayayo E. Bone fracture consolidates faster with low-power laser. Lasers Surg Med. 1987; 7: 36-45.

Vasconcellos, LMR. Implantes porosos de titânio puro grau 2: osseointegração em tíbias de coelhos [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP; 2005.

Vasconcellos LMR, Momose DR, Brentel AS, Oliveira MV, CAIRO CA, Carvalho YR. Surgical Technique to place porous surface dental implants. Acta Microscop. 2003;12: 265-6.

Vasconcellos LMR, Oliveira MV, Graça MLA, Vasconcellos LGO, Cairo CAA, Carvalho YR. Design of dental implants, influence on the osteogenesis and fixation. J Mater Sci.: Mater Med 2008; 19: 2851-57.

Xue W, Krishna BV, Bandyopadhyay A, Bose S. Processing and biocompatibility evaluation of laser processed porous titanium. Acta Biomater. 2007 Nov; 3(6): 1007-18.

Xu SW, Yu R, Zhao GF, Wang JW. Early period of fracture healing in ovariectomized rats. Chin J Traumatol. 2003 Jun; 6(3): 160-6.

Zhu X, Chen J, Scheideler L, Altebaeumer T, Geisgerstorfer J, Kern D. Cellular reaction of osteoblasts to micron-and-submicron-scale porous structures of titanium surfaces. Cells Tissues organs. 2004; 178(1): 13-22.

Zinger O, Zhao G, Schwartz Z, Simpson J, Wieland M, Landolt D et al. Differential regulation of osteoblasts by substrate microstructural features. *Biomater* 2005 May; 26(14):1837-47.

Wen CE, Yamada Y, Shimojima K, Chino Y, Asahina T, Mabuchi M. Processing and mechanical properties of autogenous titanium implant materials. *J Mater Sci Mater Med*. 2002 Apr; 13(4) 397-401.

Wronski TJ, Cintrón M, Dann LM. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int*. 1988 Sep; 43(3): 179-83.

APÊNDICE A - Dados originais da neoformação óssea nos grupos com laserterapia

Tabela 10 –Valores médio de neoformação óssea (%) em 21 ratas, para cada tipo de implante e período de sacrifício

TS* (semanas)	IMPLANTE	
	rugoso	poroso
2	40,25	41,25
2	39,00	37,75
2	38,00	45,25
2	34,50	40,75
2	38,25	44,25
2	36,75	46,50
2	38,75	46,00
4	40,25	43,00
4	35,50	42,25
4	36,25	41,00
4	38,75	51,00
4	35,75	43,75
4	38,00	47,00
4	35,50	45,50
6	43,50	45,00
6	36,75	40,75
6	35,75	39,00
6	42,25	44,00
6	44,25	47,00
6	44,00	49,50
6	42,75	45,25

*: tempo de sacrifício

APÊNDICE B – Dados da neoformação óssea dos grupos sem laser

Tabela 11 –Valores médio de neoformação óssea (%) em 21 ratas, para cada tipo de implante e período de sacrifício

TS* (semanas)	IMPLANTE	
	rugoso	poroso
2	27,00	38,75
2	28,50	34,25
2	23,50	36,00
2	25,50	36,50
2	24,75	36,52
2	25,00	38,00
2	32,00	36,25
4	37,25	40,75
4	35,25	43,50
4	36,50	41,25
4	38,25	41,25
4	32,25	48,75
4	38,75	44,50
4	37,75	41,00
6	35,00	44,00
6	36,75	48,50
6	35,75	43,75
6	34,75	42,25
6	41,25	39,50
6	33,25	45,75
6	34,00	33,50

*: tempo de sacrifício

APÊNDICE C - Dados da análise metalográfica da porcentagem de poros nos implantes porosos

Tabela 12 - Valores médio da porcentagem de poros e titânio (%) em 06 implantes do tipo poroso

IMPLANTE	POROS (%)	Ti* (%)	AMOSTRA
Poroso	35,11	64,89	1
Poroso	36,35	63,65	2
Poroso	36,00	64,00	3
Poroso	35,99	64,01	4
Poroso	40,24	59,76	5
Poroso	38,59	61,41	6

*: titânio

APÊNDICE D - Dados da análise metalográfica de porcentagem de poros nos implantes rugosos

Tabela 13 - Valores médio da porcentagem de poros e titânio (%) em 06 implantes do tipo rugoso

IMPLANTE	POROS (%)	Ti* (%)	Amostra
rugoso	3,59	96,41	1
rugoso	2,11	97,89	2
rugoso	2,17	97,83	3
rugoso	4,18	95,82	4
rugoso	3,00	97,00	5
rugoso	3,36	96,64	6

*: titânio

APÊNDICE E - Dados da análise metalográfica do diâmetro dos poros
nos implantes porosos

Tabela 14 - Valores médio do diâmetro dos poros (μm) presentes em 06
implantes do tipo poroso

IMPLANTE	POROS (μm)	AMOSTRA
Poroso	519,93	1
Poroso	356,00	2
Poroso	308,55	3
Poroso	883,39	4
Poroso	351,71	5
Poroso	479,42	6

APÊNDICE F - Dados da análise metalográfica do diâmetro dos poros nos implantes rugosos

Tabela 15 - Valores médio do diâmetro dos poros (μm) presentes em 06 implantes do tipo rugoso

IMPLANTE	POROS (μm)	AMOSTRA
Rugoso	111,85	1
Rugoso	120,50	2
Rugoso	124,53	3
Rugoso	202,82	4
Rugoso	195,07	5
Rugoso	331,86	6

ANEXO – Certificado do comitê de ética em pesquisa**CERTIFICADO**
Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **040/2007-PA/CEP**, sobre **“Influência da superfície do implante e da laserterapia na osseointegração, em ratas osteopênicas”** sob responsabilidade de **MARY ANNE MOREIRA BÁRBARA**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 18 de outubro de 2007.

Prof. Dra. ADRIANA AIGOTTI HABERBECK BRANDÃO
Coordenadora do CEP/ANIMAIS/FOSJC

Barbara MAM. Influence of the implant surface influence and laser therapy on osseointegration in osteopenic rats [dissertation]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP- São Paulo State University; 2009.

ABSTRACT

With increasing life expectancy of the population is important to the study of alternative treatments and biomaterials which aim to assist in the process of osseointegration in people with osteoporosis. .This study involved an assessment and comparison of the osseointegration of cylindrical titanium implants with porous surfaces and with rough surfaces in osteopenic rats, based histological and histomorphometric analyses. An evaluation was also made of the influence of low level laser therapy (LLLT) with gallium-aluminum arsenate (Ga-Al-As) on osseointegration. The implants were placed in 84 rats, two per rat, i.e., a porous implant in the left femur and a rough implant in the right femur Forty-two of the animals were then ovariectomized (OVZ) while the other 42 were subjected to a sham ovariectomy (SHAM). After one month the rats were divided randomly into four groups of 21 animals each, according to treatment received: a) group 1 (SHAM) implant surgery (IS); b) group 2 (SHAM) IS and low-level laser therapy (LLLT); c) group 3 (OVZ): IS; d) group 4 (OVZ) IS and LLLT. Seven animals from each group were selected randomly and killed 2, 4 and 6 weeks after surgery and the histomorphometric analyses. The histological analysis revealed that osseointegration occurred in both types of implants in all the groups. The histomorphometric analysis indicated that the porous implants in the group 4, killed 4 weeks after implantation, showed the highest percentage of new bone formation, followed by the porous implants in group 2, killed 4 and 6 weeks after implantation. It was concluded that laser therapy significantly improves new bone formation and that implants with porous surfaces have a larger contact area at the bone-implant interface.

KEYWORDS: Implant. Osseointegration. Interface. Fixation. Laser

