FERNANDO AMORIM MENDONÇA ALVES

**Estudo imaginológico da regeneração óssea guiada associada ou não à terapia
de fotobiomodulação (PBMT) em ratas com osteoporose**

São Paulo

2018

FERNANDO AMORIM MENDONÇA ALVES

**Estudo imaginológico da regeneração óssea guiada associada ou não à terapia
de fotobiomodulação (PBMT) em ratas com osteoporose**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Diagnóstico Bucal), para obter o título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Radiologia

Orientador: Prof. Dr. Cesar Angelo Lascalea

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Alves, Fernando Amorim Mendonça.

Estudo imaginológico da regeneração óssea guiada associada ou não à terapia de fotobiomodulação (PBMT) em ratas com osteoporose / Fernando Amorim Mendonça Alves ; orientador Cesar Angelo Lascale. -- São Paulo, 2018.

91p. : fig., tab. graf.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Radiologia. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Microtomografia computadorizada. 2. Osteoporose. 3. Regeneração óssea. 4. Terapia de fotobiomodulação. I. Lascale, Cesar Angelo. II. Título.

Alves FAM. Estudo imaginológico da regeneração óssea guiada associada ou não à terapia de fotobiomodulação (PBMT) em ratas com osteoporose. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 14/09/2018

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Maria Cristina Zindel Deboni

Instituição: FOUSP Julgamento: Aprovado

Prof(a). Dr(a). Sueli Patricia Harumi Miyagi

Instituição: FMU Julgamento: Aprovado

Prof(a). Dr(a). Maria Stella Nunes Araujo Moreira

Instituição: UNIB Julgamento: Aprovado

A toda minha família.

À minha mãe Anadil, ao meu pai Sérgio e ao meu irmão Vitor.

Aos meus tios, tias, primos e primas.

Aos meus avôs e avós (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradecimento especial ao meu orientador Prof. Dr. Cesar Angelo Lascalea, que me recebeu desde a iniciação científica com dedicação e bom humor, pelos ensinamentos e inspirações.

Agradecimento especial à Prof^a. Dr^a. Márcia Martins Marques, pela paciência, dedicação e energia por orientar inúmeros trabalhos e manter o sorriso no rosto até em períodos difíceis.

Agradecimento especial à aluna Ana Clara Fagundes Pedroni, uma aluna com energia, paciência e dedicação inigualáveis.

Agradecimento especial à aluna Samantha Cavalcanti, cirurgiã-dentista exemplar que realizou as cirurgias com eficiência e rapidez.

Agradecimento especial à técnica Simone Gomes Ferreira do Instituto de Biologia, responsável pelo microtomógrafo utilizado nesta pesquisa, pela sua dedicação e paciência na aquisição das imagens e pela energia de gerir um equipamento altamente requisitado e ainda cuidar de três filhos. Uma guerreira.

À técnica da FORP Adriana Luisa Gonçalves de Almeida e Prof^a Dr^a Maria Cristina Delboni do Departamento de Cirurgia da FOU SP, pelo treinamento com os softwares de análise de imagens utilizados no projeto.

Agradecimento especial à secretária da Disciplina de Radiologia, Maria Aparecida Pinto (Cidinha), anjo da guarda de todos no departamento. Obrigado pela alegria e dedicação.

Aos colegas do Departamento de Dentística Prof^a Maria Stella Moreira e técnica do Laboratório de Pesquisa Básica Débora, pelo auxílio na utilização do laboratório.

Aos meus amigos e colegas da Pós-Graduação da Radiologia Jun Kim, Moses Park, Isabela Choi, Renan Berbel, Eduardo Aoki, Luciana Munhoz, Erika Santos, Jessica Zambrana, Daniela Richarte, Juliane Piragine, Denise Haddad, Eduardo Duailibi Neto e Reinaldo Abdalla, e da Estomatologia Giovanna Florezi e Thais Miniello.

Obrigado pelo apoio.

Aos meus professores da Disciplina de Radiologia Dr. Claudio Costa, Dr. Jefferson Silva, Dr^a. Emiko Saito Arita, Dr. Claudio Freitas, Dr. Marcelo Cavalcanti, Dr^a. Marlene Fenyo Pereira e Dr. Israel Chilvarquer. Obrigado pelos ensinamentos.

À Prof^a. Dr^a. Silvia Lourenço, coordenadora do Programa de Pós Graduação em Diagnóstico Bucal, por me aceitar em sua equipe.

Aos amigos e colegas do curso de Especialização da FUNDECTO Ivan Onone, Alessandra Vaccarini, Letícia Gasparoni, Marcelo Maia, Elza Kurimoto, Luciana Bogaz, Fernanda Salineiro, Larissa Rodrigues, Danniele Dourado, Ana Paula, Josivânia Rodrigues e Anna Carolina, por 18 meses de convivência.

Aos alunos de iniciação científica Thomais Jerônimo, Danilo Mendes, Thais Massaretto e Caroline Hirota, pelo auxílio com os animais.

À equipe do Laboratório de Caracterização Tecnológica da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, por ajudar nas imagens de meu projeto piloto.

À equipe do Biotério Central do ICB-USP, responsável pela distribuição dos animais.

Ao Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez, diretor chefe do Laboratório de Biologia Oral, por ceder espaço para os ratos e a utilização das instalações para a realização das cirurgias.

Aos responsáveis pelo Laboratório de Biologia Oral Elisângela e Douglas, pelo suporte no manejo com os animais.

À instituição CAPES pelo suporte financeiro fornecido.

"Não importa quanto a vida possa ser ruim, sempre existe algo que você pode fazer e triunfar. Enquanto há vida, há esperança."

Stephen Hawking

RESUMO

Alves FAM. Estudo imaginológico da regeneração óssea guiada associada ou não à terapia de fotobiomodulação (PBMT) em ratas com osteoporose [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão corrigida.

A osteoporose é uma doença sistêmica caracterizada pela perda de conteúdo mineral do osso propiciando fraturas críticas. A regeneração óssea guiada e a terapia de fotobiomodulação (PBMT do inglês *photobiomodulation therapy*) favorecem a regeneração óssea. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da PBMT na reparação óssea guiada de lesões críticas de 36 ratas com osteoporose induzida por ooforectomia. Foram realizadas lesões ósseas standardizadas nos ossos parietais e então tratadas de acordo com os seguintes grupos experimentais (n=12 lesões por grupo): Controle: sem tratamento adicional; Membrana - Colocação de uma membrana de colágeno suíno comercial (Bio-Gide®) dentro do leito cirúrgico; PBMT1- membrana e aplicação da PBMT1; PBMT2- membrana e aplicação da PBMT2. A PBMT foi realizada com laser de diodo infravermelho no modo contínuo, pontual e em contato (808nm, 40mW, 1,42W/cm²; PBMT1: 3s, 4J/cm², 0,12J por ponto e PBMT2: 10s, 14J/cm², 0,4J por ponto) imediatamente, 48 e 96 horas após a cirurgia. Quatro e oito semanas após a cirurgia os animais foram eutanasiados, a calota craniana dissecada, fixada e submetida à análise por microtomografia computadorizada. Foram coletados os seguintes dados: volume ósseo relativo (razão entre o volume ósseo e o volume total), número, espessura e separação de trabéculas, conectividade por densidade e índice de estrutura de modelo (SMI do inglês *structure model index*). Os dados de cada análise foram comparados pelo teste ANOVA dois critérios/Tukey ou Kruskal Wallis/Dunn e os dados de análises diferentes pelo teste de correlação de Spearman ($p < 0,05$). Diferenças significativas foram observadas em 8 semanas. A PBMT, em especial nos parâmetros de menor energia (0,12J), acelerou o reparo ósseo resultando na obtenção de maior volume ósseo, com grande número de trabéculas, de espessura média, próximas e interconectadas e com valores baixos de SMI. Dentro das limitações deste trabalho *in vivo*, concluímos que a PBMT acelera a formação e maturação do tecido ósseo neoformado em lesões ósseas críticas de ratas osteoporóticas.

Palavras-chave: Microtomografia computadorizada. Osteoporose. Regeneração óssea guiada. Terapia de fotobiomodulação.

ABSTRACT

Alves FAM. Imaging study of guided bone regeneration associated or not with photobiomodulation therapy (PBMT) in rats with osteoporosis [dissertation] São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão corrigida.

Osteoporosis is a systemic disease characterized by loss of bone mineral content leading to critical fractures. Guided bone regeneration and photobiomodulation therapy (PBMT) favor bone regeneration. The objective of the study was to evaluate the effect of PBMT on the guided bone repair of critical lesions of 36 rats with osteoporosis induced by oophorectomy. Standardized bone lesions were performed on the parietal bones and then treated according to the following experimental groups (n = 12 lesions per group): Control: no additional treatment; Membrane - Placement of a commercial swine collagen membrane (Bio-Gide®) within the surgical bed; PBMT1 membrane and PBMT1 application; PBMT2-membrane and PBMT2 application. PBMT was performed with continuous wave infrared diode lasers in punctual and contact mode (808nm, 40mW, 1.42W / cm², PBMT1: 3s, 4J / cm², 0.12J per point and PBMT2: 10s, 14J / cm², 0.4J per point) immediately, 48 and 96 hours after surgery. Four and eight weeks after surgery, the animals were euthanized, the skulls dissected, fixed and submitted to the analysis by computerized microtomography. The following data were collected: bone volume, relative bone volume (ratio of bone volume to total volume), number, thickness and separation of trabeculae, density connectivity and model structure index (SMI). The data from each analysis were compared using the ANOVA two criteria / Tukey or Kruskal Wallis / Dunn test and the different analysis data by the Spearman correlation test (p <0.05). Significant differences were observed at 8 weeks. PBMT, especially in the lower energy parameters (0.12J), accelerated bone repair resulting in higher bone volume, with a large number of trabeculae, medium thickness, close to each other and interconnected, and with low SMI values. Within the limitations of this in vivo study, we concluded that PBMT accelerates the formation and maturation of neoformed bone tissue in critical bone lesions of osteoporotic rats.

Keywords: Computerized microtomography. Osteoporosis. Guided bone regeneration. Photobiomodulation therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Imagem ilustrativa da remodelação óssea.....	28
Figura 4.1 - Diagrama da sequência dos procedimentos realizados.....	37
Figura 4.2 - Fotografias ilustrativas dos procedimentos de ooforectomia. Tricotomia da região ventral (A), incisão cutânea e muscular e acesso à cavidade peritoneal (B), localização do ovário e tuba uterina (C), ovário removido (D), sutura muscular (E) e sutura cutânea (F).	39
Figura 4.3 - Fotografias ilustrativas dos procedimentos para obtenção dos defeitos ósseos críticos não parietais dos animais. Incisão cutânea (A), descolamento do periósteo (B), divulsão do periósteo (C), trefinamento do osso parietal (D), remoção do osso (E) e repetição do procedimento no parietal contralateral (F).....	41
Figura 4.4 - Desenho esquemático das lesões e tratamentos realizados	42
Figura 4.5 - Fotografias ilustrativas dos tratamentos realizados. Colocação de membrana de colágeno (A), aplicação de laser nos grupos PBMT1 e PBMT2 (B) e sutura cutânea (C).....	42
Figura 4.6 - Fotografia do equipamento de microtomografia de alta resolução SkyScan 1172.....	45
Figura 4.7 - Fotografia das amostras envoltas em parafilme para evitar ressecamento e posicionadas para a obtenção das imagens micotomográficas.....	45
Figura 4.8 - Fotografia da tela do computador para ilustrar a amostra no <i>software</i> Dataviewer, para reorientação de eixos e obtenção do volume de interesse	46
Figura 4.9 - Imagem binarizada de amostra (Grupo Membrana) obtida no <i>software</i> CTAnalyzer.	47

- Figura 5.1 - Representação gráfica da média do volume ósseo (mm^3) das lesões de todos os grupos experimentais nos dois períodos de análise. Barras indicam desvio-padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$)..... 50
- Figura 5.2 - Representação gráfica da média das porcentagens (%) de volume ósseo relativo (VO/VT) das lesões de todos os grupos experimentais nos dois períodos de análise. Barras indicam desvio-padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$)..... 51
- Figura 5.3 - Representação gráfica da média do número de trabéculas (1/mm) das lesões de todos os grupos experimentais nos dois períodos de análise. Barras indicam desvio-padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$) 52
- Figura 5.4 - Representação gráfica da média das espessuras das trabéculas (mm) das lesões de todos os grupos experimentais nos dois períodos de análise. Barras indicam desvio-padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) 53
- Figura 5.5 - Representação gráfica da média das separações entre as trabéculas (mm) das lesões de todos os grupos experimentais nos dois períodos de análise. Barras indicam desvio-padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$) 54
- Figura 5.6 - Representação gráfica da média das conectividades (mm^{-3}) das lesões de todos os grupos experimentais nos dois períodos de análise. Barras indicam desvio-padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$)..... 55
- Figura 5.7 - Representação gráfica da média dos SMI das lesões de todos os grupos experimentais nos dois períodos de análise. Barras indicam desvio-padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$)..... 56
- Figura 5.8 - Reconstrução 3D representativas das lesões ósseas dos grupos experimentais nos dois tempos. Controle de 4 semanas (A), Membrana de 4 semanas (B), PBMT1 de 4 semanas (C), PBMT2 de 4 semanas (D), Controle de 8 semanas (E), Membrana de 8 semanas (F), PBMT1 de 8 semanas (G) e PBMT2 de 8 semanas (H) 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Descrição dos parâmetros de irradiação aplicados na PBMT	43
Tabela 4.2 - Parâmetros do escaneamento para MicroCT	45
Tabela 5.1 - Dados da média $\pm$ desvio padrão do volume ósseo (mm^3) das lesões de todos os grupos experimentais nos dois períodos de análise	49
Tabela 5.2 - Dados de média $\pm$ desvio padrão da média das porcentagens (%) de volume ósseo relativo (VO/VT) das lesões de todos os grupos experimentais nos dois períodos de análise	50
Tabela 5.3 - Dados da média $\pm$ desvio padrão da média do número de trabéculas (1/mm) das lesões de todos os grupos experimentais nos dois períodos de análise	51
Tabela 5.4 - Dados de média $\pm$ desvio padrão da média das espessuras das trabéculas (mm) das lesões de todos os grupos experimentais nos dois períodos de análise	52
Tabela 5.5 - Dados de média das separações entre as trabéculas (mm) $\pm$ desvio padrão da média das lesões de todos os grupos experimentais nos dois períodos de análise	53
Tabela 5.6 - Dados de média das conectividades (mm^{-3}) $\pm$ desvio padrão da média das lesões de todos os grupos experimentais nos dois períodos de análise	54
Tabela 5.7 - Dados de média $\pm$ desvio padrão da média dos SMI das lesões de todos os grupos experimentais nos dois períodos de análise	55
Tabela 5.8 - Estatística descritiva dos dados utilizados para a análise de correlação de Spearman	56
Tabela 5.9 - Dados da análise de correlação de Spearman entre o volume ósseo relativo e os dados das demais análises realizadas	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AlGaAs	laser de diodo de arseneto de gálio-alumínio
aPDT	terapia fotodinâmica antimicrobiana
BRONJ	osteonecrose dos maxilares associada a bifosfonatos
cm	centímetro
cm ²	centímetro quadrado
Conn.Dn	conectividade por densidade
DMO	densidade mineral óssea
J	joule
kg	quilograma
kV	kilovoltagem
mg	miligrama
MicroCT	microtomografia computadorizada
mm	milímetro
mm ³	milímetro cúbico
mW	miliwatt
nm	nanômetro
PBMT	terapia de fotobiomodulação
PBS	tampão fosfato salino
RANK	receptor ativador nuclear kappa
RANKL	ligante do receptor ativador nuclear kappa
ROG	regeneração óssea guiada
ROI	região de interesse
s	segundo
SMI	índice de estrutura de modelo
Tb.N	número de trabéculas
Tb.Th	espessura de trabéculas
Tb.Sp	separação de trabéculas
UI	unidade internacional
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular
VO	volume ósseo
VOI	volume de interesse

VT	volume total
W	watt
μA	microamperagem
μm	micrometro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	Osteoporose	27
2.2	Métodos de indução de osteoporose <i>in vivo</i>	29
2.3	Regeneração óssea guiada	30
2.4	Terapia de fotobiomodulação (PBMT)	31
2.5	Microtomografia computadorizada: MicroCT	33
3	PROPOSIÇÃO	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	Delimitação da amostra	37
4.2	Indução de osteoporose por ooforectomia.....	38
4.3	Defeito ósseo na calvária de ratos.....	39
4.4	Grupos experimentais.....	41
4.5	Terapia de fotobiomodulação (PBMT)	43
4.6	Coleta das amostras	44
4.7	Análise das amostras.....	44
4.8	Análise estatística	47
5	RESULTADOS	49
6	DISCUSSÃO	59
7	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS.....	69
	APÊNDICE	75
	ANEXO.....	91

1 INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma doença caracterizada por perda de conteúdo mineral dos ossos do corpo por um predomínio de atividade reabsortiva, decorrente de diversos fatores, dentre eles a idade e, no caso de mulheres, a menopausa. Com o avanço da doença, o osso torna-se mais frágil e consequentemente mais susceptível a fraturas, causa de alta morbidade e mortalidade na população, tornando a doença um problema de saúde pública mundial.

O impacto socioeconômico promovido pela osteoporose aumenta à medida que a população envelhece, em virtude das consequências maléficas desta doença e suas complicações. Estima-se que 6,7% das mulheres, após fraturas, ficam dependentes no desenvolvimento de suas atividades de rotina. Essa situação fica ainda mais grave quando observamos que projeções estimam que 200 milhões de pessoas em todo o mundo serão atingidos pela osteoporose, não só pelo aumento do número de idosos, mas também pelo aumento da expectativa de vida. No Brasil, 70 mil pessoas fraturam o colo do fêmur a cada ano sendo que 20% morrem de complicações nos primeiros seis meses do pós-operatório e metade nunca mais terá uma vida independente.

Um agravante da osteoporose está no tratamento para seu controle quando baseado em medicações antirreabsortivas, o que tem levado a aumento do aparecimento de lesões de necrose óssea dos maxilares relacionada a medicamentos (MRONJ, do inglês *medication-related osteonecrosis of the jaws*). A MRONJ é representada por necrose óssea que ocorre espontaneamente ou após algum trauma local. Esta condição, até o momento, não tem tratamento eficaz, o que torna importante o estudo de terapêuticas preventivas alternativas que favoreçam a resposta do osso em pacientes com osteoporose.

O reparo de lesões ósseas, em especial após cirurgias orais, pode ser melhorado com a regeneração óssea guiada (ROG), método utilizado rotineiramente na regeneração de defeitos ósseos. Esta técnica se baseia na colocação de uma barreira, em geral uma membrana, colocada sobre o defeito ósseo para criação de um espaço para ser repopulado por células osteogênicas, prevenindo a migração de células epiteliais ou fibroblastos para dentro do defeito, o que resulta numa melhora do processo de regeneração óssea.

A ROG foi amplamente descrita na literatura como tratamento na reparação de defeitos ósseos extensos em animais e humanos (Khojasteh et al., 2017; Abou Fadel et al., 2018, Willershausen et al., 2014). Mardas et al. (2017) avaliaram a reparação óssea em ratas saudáveis, ratas com osteoporose e ratas com osteoporose sob tratamento com ácido zoledrônico e comprovaram maior reparação no grupo com membrana associada à medicação antirreabsortiva.

Uma terapia que poderia ser aplicada em associação à técnica da ROG em indivíduos com osteoporose seria a terapia de fotobiomodulação (PBMT do inglês *photobiomodulation therapy*). A PBMT é definida como "Uma forma de terapia de luz que utiliza formas não-ionizantes de fontes de luz, incluindo lasers, LEDs e luz de banda larga, no espectro visível e infravermelho. Trata-se de um processo não térmico envolvendo cromóforos endógenos desencadeando eventos fotofísicos (isto é, lineares e não lineares) e fotoquímicos em várias escalas biológicas. Este processo resulta em resultados terapêuticos benéficos, incluindo mas não limitados ao alívio da dor ou inflamação, imunomodulação e promoção da cicatrização de feridas e regeneração de tecidos" (Anders et al., 2015).

Entre os efeitos da PBMT de importância para a regeneração óssea destacam-se a manutenção da viabilidade de células, indução de síntese de VEGF, o que promoveria condições de nutrição para as células envolvidas na reparação do osso, bem como poderia induzir a síntese ou mesmo ativar outros fatores de crescimento latentes (Moreira et al., 2017; Arany et al., 2014; Wagner et al., 2013; Sawasaki et al., 2009; Damante et al., 2008; Eduardo et al., 2007; Azevedo et al., 2006; Marques et al., 2004; Pereira et al., 2002; Almeida-Lopes et al., 2001). Além disso, é sabido que a PBMT pode potencializar os mecanismos de migração e de diferenciação de células (Moura-Netto et al., 2016; Arany, 2016; Marques et al., 2016; Arany et al., 2014; Pellicoli et al., 2014; Fujihara et al., 2006) que podem influenciar no sucesso do processo de regeneração, mesmo em casos complexos como os defeitos ósseos críticos em pacientes portadores de doenças que prejudicam a regeneração óssea como por exemplo a osteoporose.

Em estudos anteriores de reparo ósseo em pacientes normoreativos (Romão et al., 2015) ou com necrose dos maxilares relacionada a bisfosfonatos (Martins et al., 2012) já foi demonstrado o efeito benéfico da PBMT. Recentemente, Freitas et al. (2018) demonstraram efeitos positivos da ROG de defeitos ósseos críticos em grupos de ratos normoreativos tratados somente com uso de membrana e uma

reparação ainda superior quando associada à aplicação de PBMT, em comparação ao grupo controle.

Baseados na literatura, avaliamos como positiva a atuação da ROG e da PBMT na regeneração óssea. Assim sendo, esse estudo propôs avaliar por meio de microtomografia computadorizada (microCT do inglês *microcomputed tomography*) a o efeito da associação de PBMT e ROG no reparo ósseo de lesões em parietais de ratas com osteoporose induzida por ooforectomia.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Osteoporose

A osteoporose é uma doença sistêmica caracterizada pela perda de conteúdo mineral, com consequente aumento da fragilidade e susceptibilidade dos ossos a fraturas, decorrente do desequilíbrio no processo natural de remodelação óssea (predomínio da reabsorção e redução da deposição) por fatores de idade (osteoporose senil), hormonais (osteoporose pós-menopausa) ou secundários. (Faloni; Cerri, 2007; Muschitz et al., 2012; Khajuria et al 2011; Brown et al., 2009). O diagnóstico da osteoporose pode ser feito por meio da mensuração da densidade mineral óssea (DMO) (Rossini et al., 2016).

O sistema esquelético humano é um sistema altamente dinâmico, sujeito a um processo contínuo de remodelação de sua microarquitetura. Em condições normais, o osso sofre um processo constante de reabsorção mediada por osteoclastos (diferenciados pela ligação entre receptor RANK e seu ligante RANKL), liberando fatores de crescimento que estimulam a diferenciação de células precursoras de osteoblastos, responsáveis pela subsequente deposição de osso neoformado (Figura 2.1). Ambos os processos são regulados por diversos hormônios, como o paratormônio (PTH), e proteínas que mantêm esse processo em equilíbrio, como a osteoprotegerina que possui atuação competitiva com o receptor RANK, impedindo a diferenciação osteoclástica.

Figura 2.1 - Imagem ilustrativa da remodelação óssea

Fonte: Kumar et al. (2013)

Dois fatores importantes podem estar associados na patogênese da osteoporose senil: a diminuição na formação do osso pelos osteoblastos e um defeito primário na capacidade dos rins formarem 1,25-diidroxivitamina D juntamente com a diminuição da sensibilidade do intestino a essa vitamina, diminuindo a absorção de cálcio (Rossini et al., 2016). Por outro lado, na osteoporose pós-menopausa a etiopatogenia está mais relacionada ao estrogênio que desempenha um papel importante nesse fenômeno visto que a queda de suas taxas está relacionada à ocorrência de osteoporose (Faloni; Cerri, 2007). A deficiência estrogênica promove perda de massa óssea devido ao desequilíbrio da remodelação óssea onde ocorre maior reabsorção que neoformação óssea (Manolagas et al. 2000). Assim sendo, a reparação óssea em indivíduos com osteoporose é comprometida, gerando a necessidade de novas estratégias terapêuticas, especialmente naqueles casos de defeitos críticos do osso.

Williamson (2010) destaca o agravamento de saúde em pacientes que utilizam bisfosfonatos como terapia para a osteoporose. Quarenta pacientes que desenvolveram osteonecrose dos maxilares associada a bisfosfonatos (BRONJ) não responderam ao tratamento conservador e foram submetidos ao tratamento cirúrgico por debridamento, debilitando ainda mais o paciente já debilitado pela idade.

A reabilitação de pacientes com defeitos ósseos já logrou êxitos nas técnicas cirúrgicas e materiais desenvolvidos visando a neoformação tecidual. Apesar disso, o enxerto autógeno continua sendo o de escolha nos casos de defeitos ósseos onde há, por exemplo, a necessidade de grandes reconstruções de rebordo alveolar, tanto em altura quanto espessura. Esse tipo de enxerto contempla os pré-requisitos de osteogênese, osteoindução e osteocondução, além da biocompatibilidade. Ou seja, são capazes de formar novo tecido ósseo através das células do enxerto (osteogênese), induzir diferenciação das células-tronco *in loco* (osteoindução) e agir como arcabouço (*scaffold*) para neoformação óssea (osteocondução). Apesar de ser considerado como enxerto padrão ouro, possui como desvantagens absorção imprevisível em longo prazo, quantidade limitada de osso e demanda cirúrgica adicional em leito doador (Dimitriou et al., 2011). Portanto, as pesquisas cada vez mais avançam em busca de um material substituto ou associação com outras técnicas regenerativas que se aproxime das vantagens do osso autógeno, com melhor prognóstico tardio e menor morbidade ao paciente.

Diante deste quadro fica evidente a necessidade de se desenvolver terapias alternativas para o tratamento de lesões em indivíduos com osteoporose. Entre estas se destaca a terapia de fotobiomodulação (PBMT) que resulta em melhoria do metabolismo celular, além de induzir a síntese de fatores de crescimento, aumento de atividade migratória, da sobrevivência celular, entre outras atividades celulares de importância para a regeneração óssea.

2.2 Métodos de indução de osteoporose *in vivo*

A indução de osteoporose em animais pode ser obtida por diversos métodos relatados na literatura, como interrupção do fornecimento de hormônios, deficiência de cálcio na dieta, terapia com corticosteroides ou por imobilização, podendo ser aplicada em animais de pequeno, médio e grande porte. A escolha do modelo animal (raça, idade, sexo e peso), quantidade de animais e grupos experimentais necessários (Kilkenny et al., 2010; Fenwick et al., 2009), escolha do melhor procedimento cirúrgico, condições ambientais e o objetivo principal da pesquisa

devem ser levados em conta pois podem influenciar nos resultados (Sophocleous; Idris, 2014; Egermann et al., 2005; Turner, 2001; Hartke, 1999).

Para estudos pré-clínicos, o modelo animal de escolha para mimetizar a osteoporose pós-menopausa decorrente da deficiência de estrógenos em mulheres é o murino (ratos), por apresentar um padrão de perda óssea semelhante ao humano (Mosekilde, 1995). Com o objetivo de induzir osteoporose em fêmeas, a técnica da ooforectomia bilateral é o procedimento mais eficaz e seguro, realizado tanto por uma única incisão dorsal medial ou por duas incisões dorsolaterais acima dos ovários, facilitando assim a remoção dos mesmos. Esta técnica gera interrupção abrupta e permanente do fornecimento de estrógenos, sendo mais vantajosa por fácil execução, menor custo e por gerar efeitos tanto em curto como longo prazo no *turnover* ósseo. Resultados podem ser obtidos por exames de imagem como a microtomografia computadorizada para avaliação da perda óssea, que pode variar de 30-50% de conteúdo mineral de 3-5 semanas pós-operatória, dependente da linhagem do animal e condições do ambiente (Sophocleous; Idris, 2014).

2.3 Regeneração óssea guiada

A regeneração óssea guiada é um procedimento cirúrgico que consiste na aplicação de um material sintético, reabsorvível ou não, ou enxertos de origem autógena para preenchimento de defeitos ósseos extensos. O objetivo principal é permitir vascularização local, impedir invasão epitelial e/ou indução de células gigantes multinucleadas, permitindo assim a migração de células osteogênicas para a área do defeito e subsequente osteogênese. Outros requisitos envolvem biocompatibilidade, facilidade de manuseio, estabilidade e manutenção do espaço (Willershausen et al., 2014).

Dahlin et al. (1988) conduziram um experimento de ROG em lesões produzidas em ângulo de mandíbulas de ratos bilateralmente, um lado controle e um lado tratado preenchidas com uma membrana não-reabsorvível de politetrafluoretileno expandido (PTFE-e) e observaram histologicamente completo preenchimento ósseo em lesões tratadas após 6 semanas e nenhum preenchimento ósseo em lesões controle.

A ROG pode ser realizada tanto em animais quanto em humanos, sendo amplamente utilizada na reabilitação de implantes dentários e reparo de reabsorções ósseas alveolares por doenças periodontais ou exodontias múltiplas, sendo necessário considerar o tipo, local e extensão do defeito, material de escolha e técnica cirúrgica apropriada para aumentar as chances de sucesso (Khojasteh et al., 2017).

Duas pesquisas envolveram procedimentos de ROG em calvária de ratas com osteoporose por ooforectomia. Almeida et al. (2017) aplicaram membranas em conjunto com células-tronco mesenquimais e comprovaram que grupos controle não apresentavam reparo e grupos tratados apresentaram neoformação óssea. Mardas et al. (2017), por sua vez, comprovou a eficácia da técnica tanto com aplicação da membrana isolada, mas também em conjunto com injeção de bisfosfonatos intravenoso para controle da osteoporose.

Com o objetivo de aumentar a eficácia da ROG, autores sugeriram associá-la à terapia de fotobiomodulação. Almeida et al. (2014) e Freitas et al. (2018) demonstraram um efeito positivo no reparo ósseo, sendo a união dos dois mais vantajosa, por permitir indução de angiogênese local e recrutamento de células osteogênicas para o leito cirúrgico.

2.4 Terapia de fotobiomodulação (PBMT)

Uma terapia que poderia ser aplicada na regeneração óssea de indivíduos com osteoporose seria a terapia de fotobiomodulação (PBMT). A PBMT é definida como "Uma forma de terapia de luz que utiliza formas não-ionizantes de fontes de luz, incluindo lasers, LEDs e luz de banda larga, no espectro visível e infravermelho. Trata-se de um processo não térmico envolvendo cromóforos endógenos desencadeando eventos fotofísicos (isto é, lineares e não lineares) e fotoquímicos em várias escalas biológicas. Este processo resulta em resultados terapêuticos benéficos, incluindo mas não limitados ao alívio da dor ou inflamação, imunomodulação e promoção da cicatrização de feridas e regeneração de tecidos" (Anders et al., 2015).

Entre os efeitos da PBMT de importância para a regeneração óssea destacam-se a manutenção da viabilidade de células, indução de síntese de VEGF, o que promoveria condições de nutrição para as células envolvidas na reparação do osso, bem como poderia induzir a síntese ou mesmo ativar outros fatores de crescimento latentes (Moreira et al., 2017; Arany et al., 2014; Wagner et al., 2013; Sawasaki et al., 2009; Damante et al., 2008; Eduardo et al., 2007; Azevedo et al., 2006; Marques et al., 2004; Pereira et al., 2002; Almeida-Lopes et al., 2001). Além disso, é sabido que a PBMT pode potencializar os mecanismos de migração e de diferenciação de células (Moura-Netto et al., 2016; Arany, 2016; Marques et al., 2016; Arany et al., 2014; Pellicoli et al., 2014; Fujihara et al., 2006) que podem influenciar no sucesso do processo de regeneração, mesmo em casos complexos como os defeitos ósseos críticos em pacientes portadores de doenças que prejudicam a regeneração óssea como por exemplo a osteoporose (Zhu et al., 2017; Scalize et al., 2015).

Rochkind e colaboradores (1989) realizaram experimentos que comprovaram a existência de efeito sistêmico da aplicação do laser. Foram realizadas feridas cutâneas e queimaduras bilateralmente em ratos, sendo que um grupo recebeu aplicações de laser em apenas um lado e outro grupo controle não recebeu. Os autores comprovaram reparo cutâneo em ambos os lados de ratos tratados em comparação com o grupo controle sem tratamento e cicatrização acelerada das queimaduras do lado oposto ao lado irradiado do mesmo animal. Enquanto isso, todos os ratos do grupo controle não irradiado sofreram necrose avançada dos pés e gangrena bilateral.

Em estudos anteriores realizados com pacientes normoreativos ou com necrose dos maxilares relacionada a bisfosfonatos (Martins et al., 2012) já foi demonstrado o efeito benéfico da PBMT e também o seu benefício na regeneração de osso alveolar (Romão et al., 2015), a qual verificou que quarenta dias após a exodontia de terceiros molares, o osso alveolar de pacientes submetidos à PBMT apresentou volume ósseo relativo significativamente maior que aquele de pacientes-controle. Baseado nessas pesquisas, avaliamos como positiva a atuação da PBMT no metabolismo ósseo.

2.5 Microtomografia Computadorizada: MicroCT

A microtomografia é um método não invasivo de análise quantitativa e qualitativa da microarquitetura óssea e análise de resultado de terapias diversas na reparação do osso, através de parâmetros específicos. A microtomografia apresenta vantagens em relação a histomorfometria convencional por avaliar parâmetros não somente em 2D, mas também 3D, e por ausência de preparo prévio como emblocamento, inerente a histomorfometria (Vidal et al., 2012), além de alta reprodutibilidade e acurácia (Park et al., 2007).

O método físico de aquisição da imagem funciona como na tomografia computadorizada de feixe cônico, porém o foco do tubo de raios-X é menor e fornece imagens de alta resolução, dependendo do equipamento utilizado. Sendo assim, o método permite análise de microestrutura óssea, com a desvantagem de tempos de aquisição prolongados e uma grande quantidade de dados a serem armazenados (Rüegsegger et al., 1996).

Vários relatos na literatura utilizam imagens por microtomografia para análise de microarquitetura óssea em pequenos animais (Faot et al., 2015, Gomes et al., 2011). A técnica também pode ser utilizada para avaliação de reparo ósseo em osso humano, porém em pequenas amostras, devido à área de escaneamento limitada somado aos altos níveis de exposição a radiação, impossibilitando o uso *in vivo* (Li et al., 2008).

Dentre as diversas variáveis histomorfométricas fornecidas pelo equipamento para análise, estão: volume total (VT), volume ósseo (VO), volume ósseo relativo (VO/VT), número de trabéculas (Tb.N), espessura de trabéculas (Tb.Th), separação de trabéculas (Tb.Sp), (Romão et al., 2015); conectividade por densidade (Conn.Dn) e índice de estrutura de modelo (SMI) (Christiansen, 2016; Bouxsein et al., 2010).

3 PROPOSIÇÃO

Investigar o efeito da associação da terapia de fotobiomodulação (PBMT) e reparação óssea guiada (ROG) no tratamento de lesões críticas do osso parietal em ratas com osteoporose induzida por ooforectomia.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esse projeto foi submetido à apreciação e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (nº 003/2017) (Anexo A).

Os animais utilizados nesse estudo foram aclimatados e mantidos no biotério do Laboratório de Biologia Oral do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Figura 4.1 Diagrama da sequência dos experimentos realizados

Fonte: O autor

4.1 Delimitação da amostra

Trinta e seis ratos fêmeas da linhagem Wistar, com média de 150g de peso, provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB – USP) foram selecionados para o estudo e mantidos em gaiolas de polipropileno ventiladas, com ciclos de 12 horas claro e 12 horas escuro, com alimentação baseada no suplemento alimentar (Purina®) e água *ad libitum*.

4.2 Indução da osteoporose pelo método da ooforectomia

Tanto para a cirurgia de ooforectomia como a cirurgia do defeito na calvária, todos os animais seguiram a mesma sequência operatória: após a pesagem, os animais foram submetidos à anestesia geral, por via intramuscular (pata traseira direita), com cloridrato de Ketamina (50mg/kg, i.p Ketalar, Cristália®), associado ao relaxante muscular Diazepan (5mg/kg, i.p; Valium, Cristália®), além da profilaxia antibiótica, também por via intramuscular, com benzilpenicilina benzatina (Roche®) na dose de 150.000 UI/kg. (Sophocleous; Idris, 2014).

Logo após a tricotomia da região abdominal (Figura 4.2 A), a ooforectomia foi realizada através de uma incisão de aproximadamente 3cm na região ventral, seguida de divulsão muscular (Figura 4.2B) e de tecido adiposo de quantidade variável para localização do ovário da tuba uterina (Figura 4.2C). Em seguida, é realizada uma ligadura da extremidade com fio de sutura reabsorvível e uma secção entre a ligadura e o ovário, sendo este último removido (Figura 4.2D. O procedimento é repetido do lado oposto e realizada a sutura muscular (Figura 4.2 E) e cutânea (Figura 4.2 F) com fio reabsorvível. A analgesia foi realizada com aplicação de cloridrato de tramadol (Tramal®).

Figura 4.2 - Fotografias ilustrativas dos procedimentos de ooforectomia. Tricotomia da região ventral (A), incisão cutânea e muscular e acesso à cavidade peritoneal (B), localização do ovário e tuba uterina (C), ovário removido (D), sutura muscular (E) e sutura cutânea (F)

Fonte: O autor

O defeito ósseo na calvária de ratos foi realizado após o tempo pós-operatório de 42 dias (6 semanas).

4.3 Defeito ósseo na calvária de ratos

Defeito crítico é a ferida de menor tamanho possível que não possui capacidade natural de reparo durante o tempo de vida normal de um animal

(Schmitz; Hollinger, 1996), não possuindo capacidade de regeneração espontânea e necessitando de intervenção terapêutica (Spicer et al., 2012).

A calvária do rato permite a realização de um defeito padronizado, reprodutível e que pode ser avaliado facilmente por meio de exames de imagens e análises histológicas. Sua localização anatômica oferece um campo visual satisfatório para acesso cirúrgico e manejo operatório. A duramáter e a camada subcutânea fornecem suporte mecânico adequado para os materiais ali implantados, dispensando a necessidade de fixações. A calvária da rata permite a comparação entre as diversas substâncias que podem ser enxertadas em um modelo de defeito ósseo crítico, com o objetivo de avaliar o reparo de lesões extensas. (Gomes; Fernandes, 2011). Mais ainda, é um osso similar à mandíbula, já que ambos possuem um tecido medular esponjoso entre duas finas camadas ósseas corticais (Schmitz; Hollinger, 1996). O diâmetro ideal para ser considerado defeito ósseo crítico em calvária de ratas é ainda discutido, divergindo entre 5, 6 ou 8 mm de diâmetro sendo que os defeitos ósseos de 5 e 6 podem ser considerados semicríticos e os de 8 mm são críticos (Schmitz; Hollinger, 1996; Gomes; Fernandes, 2011; Spicer et al., 2012). Nesse estudo, os procedimentos cirúrgicos seguiram as recomendações de Moreira et al. (2011) e Sendyk (2014), com pequenas modificações.

Em todos os animais a mesma sequência operatória da cirurgia de ooforectomia foi seguida. Logo após a anestesia geral, os animais foram submetidos à tricotomia e à antissepsia do sítio cirúrgico com digluconato de clorexidina a 2%, seguindo o protocolo proposto por Moreira et al. (2009; 2011).

O procedimento cirúrgico foi feito através de retalho na pele do animal sobre o crânio no lado oposto de onde será realizada a lesão do osso. A pele, o tecido subcutâneo, o músculo temporal e o periósteo foram divulsionados até a completa exposição dos ossos parietais. Em seguida, o defeito ósseo foi realizado com uma broca trefina em aço de 5mm de diâmetro, adaptada a um contra-ângulo em motor cirúrgico de baixa rotação (Driller®) e irrigação constante com soro fisiológico a 0,9 %, realizadas com cautela para não lesionar a dura-máter.

Figura 4.3 - Fotografias ilustrativas dos procedimentos para obtenção dos defeitos ósseos críticos não parietais dos animais. Incisão cutânea (A), descolamento do periósteo (B), divulsão do periósteo (C), trefinamento do osso parietal (D), remoção do osso (E) e repetição do procedimento no parietal contralateral (F)

Fonte: O autor

4.4 Grupos experimentais

Após a execução das cirurgias para criar os defeitos ósseos, os animais foram divididos de forma randomizada para receber um dos 4 tratamentos, de acordo com os grupos experimentais abaixo descritos.

Grupo Controle: lesão óssea sem tratamento adicional;

Grupo Membrana: Colocação de uma membrana de colágeno suíno comercial Bio-Gide® (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suíça) sob o leito cirúrgico;

Grupo PBMT1: Colocação da Bio-Gide® sob o leito cirúrgico seguida da aplicação da PBMT 1;

Grupo PBMT2: Colocação da Bio-Gide® sob o leito cirúrgico seguida da aplicação da PBMT 2.

Figura 4.4 - Desenho esquemático das lesões e tratamentos realizados

Fonte: O autor

Figura 4.5 - Fotografias ilustrativas dos tratamentos realizados. Colocação de membrana de colágeno (A), aplicação de laser nos grupos PBMT1 e PBMT2 (B) e sutura cutânea (C)

Fonte: O autor

Vale ressaltar que os animais dos grupos controle e membrana foram os mesmos, ou seja, na lesão do parietal direito foi feito o tratamento com membrana e no esquerdo o controle sem tratamento adicional. Para os grupos PBMT, o lado direito recebeu o tratamento e o esquerdo recebeu a lesão sem tratamento, no entanto, estas não puderam ser computadas como controle, uma vez que a PBMT tem efeito sistêmico (Rochkind et al., 1989).

Após os tratamentos, foi efetuada a síntese da pele com fio de sutura de seda 3-0 (Ethicon®). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais por um período de 1 semana.

Seis animais de cada grupo foram eutanasiados em 4 semanas e os demais em 8 semanas para as análises de MicroCT.

4.5 Terapia de Fotobiomodulação (PBMT)

No tocante à PBMT, foi utilizado um equipamento laser de diodo de arseneto de gálio-alumínio (AlGaAs) (DMC, Ltda, São Carlos, SP, Brasil), em baixa intensidade e modo de operação contínuo, pontual e em contato. Os parâmetros de irradiação se basearam em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa que apresentaram resultados clínicos positivos (Moreira et al., 2009; 2011; Romão et al., 2015).

Tabela 4.1 - Descrição dos parâmetros de irradiação aplicados na PBMT

Grupo experimental	Comprimento de onda (nm)	Potência (mW)	Área do feixe (cm ²)	Densidade de Potência (W/cm ²)	Tempo (s)	Densidade de energia (J/cm ²)	Energia por ponto (J)
PBMT1	808	40	0,028	1,42	3	4	0,12
PBMT2	808	40	0,028	1,42	10	14	0,40

Fonte: O autor

Foram realizadas 4 irradiações com intervalos de 48 horas, iniciando-se imediatamente, e em 48 e 96 horas após o ato cirúrgico. As irradiações foram feitas em contato com a pele do animal no local da lesão de forma pontual, em 4 pontos por lesão (um central e os demais equidistantemente ao redor da lesão). Para as irradiações em 48 e 96 horas os animais foram levemente sedados por inalação de isofluorano.

A potência do equipamento foi aferida antes e após todas as sessões de irradiação, com auxílio de medidor de potência (Laser Check, MM Optics Ltda, São Carlos, SP, Brasil). O valor da emissão fora programado para o parâmetro do estudo através desse medidor, e não pelo valor no painel de controle do equipamento.

Os grupos que não receberam PBMT foram submetidos às mesmas condições experimentais daqueles irradiados, porém com o equipamento de laser mantido desligado.

Todos os procedimentos com o laser foram realizados seguindo todas as normas de segurança NBR/IEC 601.2.22 e IEC 60825-1/2001-8 (Cordon et al., 2007).

4.6 Coleta das amostras

Os animais foram anestesiados e eutanasiados por guilhotina, as calotas cranianas imediatamente removidas com tesouras cirúrgicas e seu tecido mole cuidadosamente dissecado com o cuidado de não manipular a região do defeito ósseo. Na sequência, as peças foram fixadas em solução de formaldeído a 10% tamponado por um período de 48. Após esse processo, os espécimes foram lavados em PBS e mantidos nesta solução tampão até serem encaminhados para análise em MicroCT.

4.7 Análise das amostras

O método do MicroCT é capaz de fornecer informações adicionais sobre a variação na radiopacidade dos tecidos duros, além de ser um método não invasivo que possibilita análises em 3D de densidade e volume tecidual. Os tempos experimentais para esta análise foram de 4 e 8 semanas.

As calotas dissecadas e mantidas em solução tampão foram levadas para o microtomógrafo de alta resolução Skyscan 1172 (Bruker MicroCT, Kontich, Bélgica) localizado no Instituto de Biologia da Universidade de São Paulo (Figura 4.4). A digitalização seguiu os parâmetros descritos na tabela 4.2.

Figura 4.6 - Fotografia do equipamento de microtomografia de alta resolução SkyScan 1172

Fonte: O autor

Figura 4.7 - Fotografia das amostras envoltas em parafilme para evitar ressecamento e posicionadas para a obtenção das imagens micotomográficas

Fonte: O autor

Tabela 4.2 - Parâmetros do escaneamento para MicroCT

Parâmetros	Skyscan 1172
Filtro - Al	0,2mm
Resolução	9 μm
Voltagem	40 kV
Amperagem	398 μA
Ângulo de rotação	180°
Passo da rotação	0,6°
Quadros	4

Fonte: O autor

Após a digitalização, as imagens foram reconstruídas no software NRecom, inseridas no software DataViewer (Figura 4.5) para reorientação dos eixos, seleção do eixo de interesse (axial), obtenção de um volume de interesse (VOI) e os dados avaliados no software CTAnalyser® (SkyScan, Antuérpia, Bélgica) para análise de microestrutura de trabéculas a partir da região de interesse (ROI) nas imagens binárias.

A região de interesse utilizada foi a mesma para todas as amostras de todos os grupos (5mm de diâmetro e 80 cortes). O limiar mínimo e o limiar máximo na escala de cinza foram respectivamente de 120 e 255 para lesões do grupo controle e 140 e 255 para lesões dos demais grupos, definido quanto à densidade trabecular, com base em radiografias não-binárias de cada amostra. Com este limiar estabelecido, o programa analisou os seguintes dados morfométricos ósseos: formação óssea relativa utilizando a razão entre o volume ósseo (VO) e o volume total de tecido (VT) (VO/VT), número de trabéculas (Tb.N), espessura de trabéculas (Tb.Th), separação de trabéculas (Tb.Sp), conectividade por densidade (Conn.Dn) e índice de estrutura de modelo (SMI). Esses dados também foram usados para construir imagens 3D, através do software CTVox.

Figura 4.8 – Fotografia da tela do computador para ilustrar a amostra no *software* Dataviewer, para reorientação de eixos e obtenção do volume de interesse

Fonte: O autor

Figura 4.9 - Imagem binarizada de amostra (Grupo Membrana) obtida no *software* CTAnalyzer

Fonte: O autor

4.8 Análise estatística

Foi aplicado o teste de normalidade de Lilliefors para determinar se o conjunto dos dados obtidos das MicroCTs apresentou distribuição normal ou não. Para os dados de microCT paramétricos, foi aplicada a análise de variância ANOVA dois critérios complementada pelo teste de Tukey. Para os dados de microCT com padrões não paramétricos, os testes de escolha foram Kruskal-Wallis complementados pelo teste de Dunn. O teste de correlação de Spearman foi utilizado para comparar todos os dados de volume ósseo negativo com os das demais análises obtidas (e.g. número de trabéculas, espessura das trabéculas, separação das trabéculas, conectividade e SMI). Para todas as análises estatísticas, o nível de significância adotado foi de 5 % ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

Os dados de volume ósseo, volume ósseo relativo, número, espessura e separação entre trabéculas e SMI apresentaram distribuição normal e a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste ANOVA - dois critérios complementado pelo teste de Tukey. Os dados de conectividade apresentaram distribuição não normal e as comparações entre grupos foi realizada com o teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dunn (Apêndice A).

Os dados obtidos referentes a volume ósseo estão apresentados na tabela 5.1. Para as amostras de 4 semanas, não houve diferenças significativas no volume entre os grupos. Nas amostras de 8 semanas, o controle foi significativamente menor que os grupos PBMT ($p < 0,01$) e igual ao grupo membrana. O grupo membrana, por sua vez, foi menor que o grupo PBMT1 ($p < 0,05$) e igual ao PBMT2, e os grupos lasers foram similares. Na comparação dos dois tempos experimentais, o grupo controle não apresentou aumento significativo de volume, porém todos os outros grupos apresentaram aumento significativo de volume ósseo. No grupo membrana, o valor de $p < 0,05$ e os grupos PBMT, o $p < 0,01$.

Tabela 5.1 - Dados da média $\pm$ desvio padrão do volume ósseo (mm^3) das lesões de todos os grupos experimentais nos dois períodos de análise

Grupos	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2	p
4 semanas	1.04 $\pm$ 0.78	1.01 $\pm$ 0.64	1.31 $\pm$ 0.24	1.16 $\pm$ 0.29	ns
8 semanas	2.11 $\pm$ 0.94a	3.44 $\pm$ 1.52*,a,c	5.70 $\pm$ 1.09*,b	4.88 $\pm$ 1.54*,b,c	<0,01

Fonte: O autor

Figura 5.1 - Representação gráfica da média do volume ósseo (mm^3) das lesões de todos os grupos experimentais nos dois períodos de análise. Barras indicam desvio-padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$)

Fonte: O autor

Em relação aos dados de volume ósseo relativo (Tabela 5.3), em 4 semanas, não houve diferenças significativas entre os grupos. Em 8 semanas, o controle foi significativamente menor que os grupos PBMT ($p < 0,01$) e igual ao grupo membrana. O grupo membrana foi menor que o PBMT1 ($p < 0,05$) e igual ao PBMT2, e os grupos PBMT foram similares. Comparando os dois tempos experimentais, o grupo controle não apresentou aumento significativo de volume relativo, porém todos os outros grupos apresentaram aumento significativo. O grupo membrana apresentou $p < 0,05$ e os grupos PBMT, $p < 0,01$.

Tabela 5.2 - Dados de média $\pm$ desvio padrão da média das porcentagens (%) de volume ósseo relativo (VO/VT) das lesões de todos os grupos experimentais nos dois períodos de análise

Grupos	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2	p
4 semanas	7.53 $\pm$ 5.71	7.32 $\pm$ 4.66	9.47 $\pm$ 1.78	8.41 $\pm$ 2.11	ns
8 semanas	15.31 $\pm$ 6.87a	24.71 $\pm$ 11.08*,a,c	41.30 $\pm$ 7.91*,b	35.36 $\pm$ 11.17*,b,c	<0,01

Fonte: O autor

Figura 5.2 - Representação gráfica da média das porcentagens (%) de volume ósseo relativo (VO/VT) das lesões de todos os grupos experimentais nos dois períodos de análise. Barras indicam desvio-padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$)

Fonte: O autor

Em relação ao número de trabéculas (Tabela 5.3), não houve diferenças significativas entre os grupos nas amostras de 4 semanas. No entanto, em 8 semanas, o controle apresentou número de trabéculas significativamente menor que os grupos PBMT ($p < 0,01$) e igual ao grupo membrana. O grupo membrana apresentou número de trabéculas similar ao dos grupos PBMT ($p < 0,01$ para PBMT1 e $p < 0,05$ para PBMT2). Os grupos PBMT foram similares entre si. Entre tempos experimentais, ambos os grupos PBMT apresentaram aumento significativo de trabéculas.

Tabela 5.3 - Dados da média $\pm$ desvio padrão da média do número de trabéculas (1/mm) das lesões de todos os grupos experimentais nos dois períodos de análise

Grupos	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2	p
4 semanas	0.43 $\pm$ 0.29	0.64 $\pm$ 0.37	0.92 $\pm$ 0.15	0.88 $\pm$ 0.19	ns
8 semanas	0.65 $\pm$ 0.33a	1.57 $\pm$ 0.81*,a,b	2.49 $\pm$ 0.66*,b	2.13 $\pm$ 0.75*,b	<0,01

Fonte: O autor

Figura 5.3 - Representação gráfica da média do número de trabéculas (1/mm) das lesões de todos os grupos experimentais nos dois períodos de análise. Barras indicam desvio-padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p<0,01$)

Fonte: O autor

Referente à espessura de trabéculas (Tabela 5.4), para amostras de 4 semanas, não houve diferenças significativas entre os grupos. Em 8 semanas, o controle apresentou trabéculas com espessuras significativamente maiores que a dos demais grupos ($p<0,05$). O grupo membrana apresentou espessura de trabéculas similar a dos grupos PBMT. Os grupos PBMT foram similares entre si. Os grupos controle e PBMT1 foram os que apresentaram aumento significativo da espessura das trabéculas em 8 semanas em relação a 4 semanas, os demais grupos não alteraram a espessura das trabéculas em ambos os tempos experimentais.

Tabela 5.4 - Dados de média $\pm$ desvio padrão da média das espessuras das trabéculas (mm) das lesões de todos os grupos experimentais nos dois períodos de análise

Grupos	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2	p
4 semanas	0.15 $\pm$ 0.05	0.10 $\pm$ 0.02	0.10 $\pm$ 0.04	0.09 $\pm$ 0.01	ns
8 semanas	0.24 $\pm$ 0.03a	0.16 $\pm$ 0.03*,b	0.17 $\pm$ 0.03*,b	0.17 $\pm$ 0.02*,b	p<0,05

Fonte: O autor

Figura 5.4 - Representação gráfica da média das espessuras das trabéculas (mm) das lesões de todos os grupos experimentais nos dois períodos de análise. Barras indicam desvio-padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$)

Fonte: O autor

Para a separação entre trabéculas (Tabela 5.5), em 4 semanas, o grupo PBMT1 foi significativamente menor que o grupo controle ($p < 0,05$). Para 8 semanas, o controle apresentou separação entre trabéculas significativamente maiores que a dos grupos PBMT ($p < 0,01$). O grupo membrana apresentou separação similar a dos grupos PBMT. Os grupos PBMT foram similares entre si. Não houve alteração significativa em nenhum dos grupos experimentais, comparando os dados de 4 e 8 semanas.

Tabela 5.5 - Dados de média das separações entre as trabéculas (mm) $\pm$ desvio padrão da média das lesões de todos os grupos experimentais nos dois períodos de análise

Grupos	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2	p
4 semanas	0.63 $\pm$ 0.04A	0.50 $\pm$ 0.11*,A,B	0.43 $\pm$ 0.09*,B	0.42 $\pm$ 0.06*,B	ns
8 semanas	0.58 $\pm$ 0.07a	0.41 $\pm$ 0.13*,a,b	0.29 $\pm$ 0.06*,b	0.35 $\pm$ 0.11*,b	<0,01

Fonte: O autor

Figura 5.5 - Representação gráfica da média das separações entre as trabéculas (mm) das lesões de todos os grupos experimentais nos dois períodos de análise. Barras indicam desvio-padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$)

Fonte: O autor

Os dados conectividade do grupo controle em 8 semanas foi significativamente menor que a dos demais grupos (Tabela 5.6). Em 4 semanas não houve diferenças entre os grupos e em oito semanas a conectividade dos grupos membrana e os dois de PBMT foram similares entre si.

Tabela 5.6 - Dados de média das conectividades (mm^{-3}) $\pm$ desvio padrão da média das lesões de todos os grupos experimentais nos dois períodos de análise

Grupos	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2	p
4 semanas	6.19 $\pm$ 5.59	58.44 $\pm$ 35.77	84.65 $\pm$ 38.58	86.90 $\pm$ 26.71	ns
8 semanas	2.97 $\pm$ 3.18a	90.40 $\pm$ 79.80*,b	84.76 $\pm$ 99.43*,b	82.27 $\pm$ 71.42*,b	<0,05

Fonte: O autor

Figura 5.6 - Representação gráfica da média das conectividades (mm^{-3}) das lesões de todos os grupos experimentais nos dois períodos de análise. Barras indicam desvio-padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$)

Fonte: O autor

Em relação ao SMI (Tabela 5.7), em 4 semanas, o SMI de todos os grupos foi similar. Em 8 semanas, o SMI do grupo controle foi similar ao do grupo membrana e significativamente menor que o dos grupos PBMT. O grupo membrana e os grupos PBMT apresentaram SMI similares em 8 semanas. Durante o experimento, o SMI do controle não sofreu alteração. O SMI do grupo membrana diminuiu significativamente ($p < 0,05$) e a dos grupos PBMT também ($p < 0,01$).

Tabela 5.7 - Dados de média $\pm$ desvio padrão da média dos SMI das lesões de todos os grupos experimentais nos dois períodos de análise

Grupos	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2	p
4 semanas	0.78 $\pm$ 1.0	2.05 $\pm$ 0.52	1.99 $\pm$ 0.44	2.21 $\pm$ 0.36	ns
8 semanas	0.69 $\pm$ 1.31a	-0.32 $\pm$ 1.55*,a,b	-2.27 $\pm$ 0.99*,b	-1.63 $\pm$ 1.51*,b	<0,01

Fonte: O autor

Figura 5.7 - Representação gráfica da média dos SMI das lesões de todos os grupos experimentais nos dois períodos de análise. Barras indicam desvio-padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$)

Fonte: O autor

Foi realizado o teste de correlação entre todos os dados de volume ósseo relativo a os das demais análises realizadas. Os dados de volume ósseo relativo de todos os grupos e tempos agrupados não apresentou distribuição normal e, portanto, foi feito o teste de correlação de Spearman.

A correlação de Spearman demonstrou uma correlação positiva e significativa entre o volume ósseo relativo versus número, espessura de trabéculas, e uma correlação e significativa negativa entre os valores de separação trabecular e SMI. Não houve correlação significativa entre Volume ósseo relativo e conectividade.

Tabela 5.8 - Estatística descritiva dos dados utilizados para a análise de correlação de Spearman

	Volume ósseo relativo	Número de trabéculas	Espessura das trabéculas	Separação das trabéculas	Conectividade	SMI
Tamanho da amostra	48	48	48	42	48	48
Média Aritmética	18.67	1.21	0.15	0.44	60.98	0.46
Variância	208.19	0.73	0.01	0.019	3928.81	3.55
Desvio Padrão	14.42	0.85	0.05	0.14	62.68	1.88
Erro Padrão	2.08	0.12	0.01	0.02	9.04	0.27

Fonte: O autor

Tabela 5.9 - Dados da análise de correlação de Spearman entre o volume ósseo relativo e os dados das demais análises realizadas

	Volume ósseo relativo X Número de Trabéculas	Volume ósseo relativo X Espessura de Trabéculas	Volume ósseo relativo X Separação entre as de Trabéculas	Volume ósseo relativo X Conectividade entre trabéculas	Volume ósseo relativo X SMI
Coeficiente de Spearman (rs)	0.8555	0.5121	-0.5532	0.2525	-0.7472
t	11.2040	4.0436	-4.5037	1.7697	-7.6243
(p)	< 0.0001	0.0002	< 0.0001	0.0833	< 0.0001
Número de pares	48	48	48	48	48

Fonte: O autor

Imagens microtomográficas em 3D representativas das lesões ósseas dos 4 grupos experimentais nos dois tempos estão apresentadas na Figura 5.8.

Figura 5.8 - Reconstrução 3D representativas das lesões ósseas dos grupos experimentais nos dois tempos. Controle de 4 semanas (A), Membrana de 4 semanas (B), PBMT1 de 4 semanas (C), PBMT2 de 4 semanas (D), Controle de 8 semanas (E), Membrana de 8 semanas (F), PBMT1 de 8 semanas (G) e PBMT2 de 8 semanas (H).

Fonte: O autor

6 DISCUSSÃO

A severidade da doença osteoporose, caracterizada por altas taxas de morbidade e mortalidade, alta incidência, altos custos de tratamento, e redução da qualidade de vida, revela necessidade de busca de tratamentos e estratégias que favoreçam a regeneração óssea no caso de cirurgia nestes pacientes. A terapia de fotobiomodulação (PBMT do inglês *photobiomodulation therapy*) tem mostrado efeitos benéficos quando aplicada como terapia coadjuvante com o intuito de melhorar a regeneração óssea. Neste sentido, a hipótese do presente trabalho foi a de que a PBMT teria efeitos benéficos quando aplicada como tratamento coadjuvante da regeneração óssea guiada de lesões ósseas críticas em animais osteoporóticos. Na verdade, as lesões tratadas com a PBMT, independentemente dos parâmetros aplicados, o tratamento acelerou a formação e maturação do tecido ósseo neoformado.

Foram utilizadas no presente estudo apenas ratas fêmeas, porque o método escolhido para indução da osteoporose foi a ooforectomia bilateral que é uma cirurgia de fácil execução. Este é um método clássico e bastante utilizado na literatura para induzir osteoporose em ratos (Sophocleous; Idris, 2014). Optamos por utilizar este modelo animal no presente trabalho porque este tipo de modelo fornece material experimental uniforme, e minimiza o alto custo e os longos acompanhamentos necessários para os testes clínicos. De fato, o objetivo principal destes testes pré-clínicos, ou translacionais é o estabelecimento da eficácia dos tratamentos oferecendo justificativa para a progressão para os testes clínicos com pacientes (Hartke, 1999). Neste aspecto, os modelos animais apresentam papel essencial na busca de terapias alternativas para pacientes com osteoporose que necessitem tratamento de lesões ósseas críticas.

A técnica de regeneração óssea guiada (ROG) foi amplamente descrita na literatura como tratamento na reparação de defeitos ósseos extensos em animais e humanos (Khojasteh et al., 2017; Abou Fadel et al., 2018). O Bio-Gide® é uma membrana bilaminar de colágenos tipos I e III utilizada rotineiramente para a ROG uma vez que propicia, entre outros, proteção mecânica do coágulo dentro do defeito ósseo, favorecendo neovascularização e impedindo invasão epitelial, o que em torno favorece a regeneração óssea (Willershausen et al., 2014). Estudo histomorfológico

realizado por Freitas et al. (2018) demonstrou efeitos positivos na reparação de defeitos ósseos críticos em grupos de ratos normoreativos tratados somente com a membrana e uma reparação ainda superior quando associada à PBMT, em comparação ao grupo controle. Baseados nestes resultados, o presente estudo utilizou a mesma membrana para verificar se os resultados obtidos em animais normoreativos também ocorreriam em animais osteoporóticos.

Os efeitos da PBMT em células e em tecidos vem sendo estudado há muito tempo. Pesquisadores da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo tiveram a oportunidade de verificar os efeitos desta terapia na proliferação, adesão, migração e diferenciação de diversos tipos celulares envolvidos na regeneração de tecidos, bem como na produção de citocinas e fatores de crescimento (Moreira et al., 2017; Wagner et al., 2013; Sawasaki et al., 2009; Eduardo et al., 2007; Azevedo et al., 2006; Marques et al., 2004; Pereira et al., 2002; Almeida-Lopes et al., 2001). Especificamente no que diz respeito às células envolvidas na regeneração de tecido ósseo (e.g. osteoblastos e células-tronco mesenquimais-CTM), reportaram que a PBMT estimula a proliferação de células osteoblasto-símile em cultura, mesmo quando estas estavam inibidas por dexametasona (Fujihara et al., 2006). Este grupo também demonstrou que a PBMT é capaz de aumentar o crescimento de células-tronco de polpas de dentes decíduos humanos (SHEDs do inglês *stem cells from human exfoliated deciduous*) cultivadas em deficiência nutricional (Moura-Netto et al., 2016). Mais recentemente, foi reportado que a PBMT melhora a autorrenovação e a sobrevivência das CTMs e na presença de fatores de crescimento ósseo (rhBMP4), a diferenciação celular osteogênica ocorreu precocemente e foi notadamente melhorada *in vitro*. Neste mesmo estudo, os autores observaram aumento significativo na formação óssea após tratamento de lesões ósseas críticas na calvária de ratos tipo *nude* com o transplante de CTMs associado à PBMT quando comparado com animais que não foram submetidos à PBMT (Diniz et al., 2018). Todos esses achados *in vitro* e *in vivo*, nos levaram a hipotetizar que a PBMT poderia melhorar ainda mais os resultados da RGO em animais osteoporóticos

Outros estudos já demonstraram o efeito benéfico da PBMT na regeneração óssea. Zhu et al. (2017) observaram aumento de densidade mineral, propriedades mecânicas e estrutura trabecular em colo de fêmur de ratos com osteoporose senil, comparado com ratos jovens. Pires-Oliveira et al. (2010),

utilizando laser infravermelho (904nm), também mostraram aceleração da regeneração óssea de reparo de fraturas em animais osteoporóticos, já observada em 3 semanas no processo de reparo ósseo. Scalize et al. (2015), por sua vez, comprovaram, através de PBMT em defeitos ósseos em calvária de ratas ooforectomizadas, maior neoformação óssea em grupos que receberam irradiação com laser quando comparado com grupos controle. Vale ressaltar que na grande maioria dos estudos que utilizam a PBMT de tecido ósseo, os comprimentos de onda no espectro do infravermelho são os de escolha. No presente estudo, o laser utilizado foi o de 808nm, e os parâmetros foram aqueles previamente utilizados em estudos de regeneração tecidual (Moreira et al., 2009; 2011).

O estudo foi realizado de acordo com as diretrizes ARRIVE (Kilkenny et al., 2010). Seguindo o princípio dos três “R”s (do inglês *Replacement, Reduction and Refinement*) o menor número possível de animais foi utilizado (Fenwick et al., 2009). Por esta razão o número de lesões estudadas foram 48, porém somente 36 animais foram utilizados. Em 6 animais as duas lesões foram utilizadas como lesões do grupo controle. Nos grupos PBMT, infelizmente o mesmo não pode ser feito, uma vez que é sabido que esta terapia pode ter efeitos sistêmicos. De fato, Rochkind et al. (1989) demonstraram que a irradiação a laser de apenas uma de duas feridas cutâneas bilaterais melhorou a recuperação em ambos os lados em comparação com o grupo controle não irradiado. Mais ainda, obtiveram resultados semelhantes em queimaduras bilaterais, onde a irradiação de um dos locais queimados também causou cicatrização acelerada no local não irradiado do mesmo animal. No entanto, no grupo controle não irradiado, todos os ratos sofreram necrose avançada dos pés e gangrena bilateral.

No presente estudo, esse possível efeito colateral poderia influenciar a regeneração das lesões dos grupos PBMT. Isso poderia ocorrer não só devido ao somatório dos efeitos locais e sistêmicos da PBMT, mas também pelo fato das duas lesões serem muito próximas. A irradiação de uma lesão poderia ser absorvida na área da lesão, mas também poderia ser espalhada causando efeito na lesão contralateral. Por esses motivos, as lesões do lado esquerdo dos animais dos grupos PBMT não foram incluídas como grupos controles. Na verdade, elas foram somente realizadas para que todos os animais tivessem recebido o mesmo tipo de trauma. Vale ressaltar que os dados relativos à regeneração destas lesões não

serão desperdiçadas. Esses estão sendo analisados com vistas ao estudo dos possíveis efeitos sistêmicos da PBMT.

O exame de microtomografia computadorizada (microCT do inglês *micro computerized tomography*), foi o método escolhido de análise da microarquitetura óssea, que é baseado na quantificação de reparo ósseo em três dimensões que apresentar vantagens em relação a outros métodos. Esse método físico de aquisição da imagem funciona como na tomografia computadorizada de feixe cônico, porém o foco do tubo de raios-X é menor e fornece imagens de alta resolução, dependendo do equipamento utilizado. A microCT dispensa preparo prévio ou desgaste da amostra, possui grande acurácia e reprodutibilidade, fornece imagens com altas resoluções e, portanto, mais detalhadas do que a tomografia computadorizada por feixe cônico. Dentre as desvantagens do método, temos a área de escaneamento limitada e altas doses de radiação emitida que restringem o uso do equipamento em humanos (apenas em amostras extraídas do paciente), longos tempos necessários para escaneamento, grande armazenamento de dados e o alto custo (Rüegsegger et al., 1996). No entanto, para a análise de material obtido de pequenos animais e, em especial de suas peças cirúrgicas, como as estudadas neste trabalho, estas desvantagens não são relevantes, e o microCT se torna de extrema valia pela qualidade das imagens obtidas com este escaneamento. Mais ainda, o microCT apresenta vantagens em relação à histomorfometria convencional por avaliar parâmetros não somente em 2D, mas também 3D, e por ausência de preparo prévio como emblocamento, inerente a histomorfometria (Vidal et al., 2012), além de alta reprodutibilidade e acurácia (Park et al., 2007).

Quando do uso da técnica do microCT devem ser observados diversos fatores durante a aquisição, processamento, análise e armazenamento das imagens. O principal fator influenciador é a resolução espacial selecionada na aquisição dessas imagens. Além de permitir imagens mais detalhadas e com menos interferência por artefatos, imagens em resoluções altas permitem maior precisão na quantificação de índices radiomorfométricos, tendo maior influência em espessura de trabéculas (Tb.Th) e conectividade por densidade (Conn.Dn) e menor influência em outros fatores como número de trabéculas (Tb.N) e separação de trabéculas (Tb.Sp) (Christiansen, 2016). Sendo assim, a resolução apropriada deve ser a menor possível, suficiente para abranger a área da amostra a ser avaliada.

No presente estudo, foi utilizada a resolução de 9 μm que foi a mesma utilizada por Romão e colaboradores em 2015. Os períodos de análise foram de 4 e 8 semanas, baseados nos achados de Diniz et al. (2018), que estudaram a regeneração de lesões ósseas de calvária de camundongos *nude* submetidos à engenharia tecidual associada ou não à PBMT. Os achados do presente estudo, de forma geral mostraram que todos os grupos se comportaram similarmente nas primeiras 4 semanas e, somente em 8 semanas foi possível se detectar diferenças no tecido ósseo neoformado no interior das lesões.

O tratamento das lesões ósseas na calvária das ratas osteoporóticas com somente a RGO, ao menos durante os períodos de análise que foram de 4 e 8 semanas, não ocasionou efeito positivo na formação de tecido ósseo dentro da lesão. Na verdade, o volume ósseo relativo dos grupos tratados somente com a membrana foi similar àquele do grupo controle sem tratamento adicional nos dois períodos estudados. O achado mais importante do estudo diz respeito ao volume ósseo relativo das lesões do grupo tratado com a membrana e submetido à PBMT no parâmetro de menor energia (PBMT1-0,12J). Este grupo apresentou volume ósseo relativo significativamente maior que aquele das lesões sem tratamento adicional e daquelas somente tratadas com a membrana. Este achado era esperado, uma vez que é sabido que energias menores são mais bioestimulativas e, portanto, isso explicaria este efeito no preenchimento da lesão óssea. Por outro lado, o volume ósseo relativo das lesões tratadas com membrana e a PBMT no parâmetro de maior energia (PBMT2- 0,40J) foi similar ao do grupo PBMT1 e também foi significativamente maior que o controle não tratado. No entanto, este volume foi similar àquele do grupo tratado somente com a membrana, ou seja, este resultado foi intermediário entre somente membrana e membrana mais PBMT1.

Com relação aos demais resultados, destacamos aqueles obtidos através da análise de correlação de Spearman. Esta análise foi escolhida porque os dados de volume ósseo relativo de todas as amostras avaliadas apresentaram distribuição não normal, portanto um teste não paramétrico é o mais apropriado. Estes resultados explicaram a participação dos resultados de cada análise na neoformação de tecido no interior das lesões nos diferentes grupos experimentais. De fato, correlação positiva com volume ósseo relativo foi observada nas comparações com número e espessura das trabéculas e negativa entre a separação das trabéculas e SMI. Os únicos resultados que não apresentaram correlação com o volume ósseo relativo foi

conectividade. Assim sendo, os maiores volumes ósseos relativos estariam baseados na presença de maior número de trabéculas, mais espessas e próximas e com menor SMI. Estes foram os achados do grupo tratado com a membrana e a PBMT1.

Em todas as análises os achados dos grupos tratados com PBMT foram similares entre si e significativamente melhores que aqueles do grupo controle sem tratamento adicional. De uma maneira geral, o grupo tratado somente com a membrana, apesar de algumas vezes ter resultados semelhantes a um ou aos dois grupos PBMT, apresentou em algumas das análises resultados similares àqueles do grupo controle, a saber: volume ósseo relativo, número e separação entre as trabéculas e SMI. Portanto, isso demonstra que a RGO pode ser melhorada pela PBMT.

Os grupos PBMT mostraram ter uma formação óssea mais rápida quando comparada aos grupos controle e somente membrana uma vez que apresentou não só maior volume ósseo relativo, mas também maior número de trabéculas que apresentaram uma espessura média e estavam mais próximas. Resultados similares foram obtidos por Romão e colaboradores em 2015 em estudo clínico onde foi relatado que a PBMT foi capaz de acelerar a reparação óssea alveolar após a extração do molar, levando a uma configuração trabecular mais homogênea representada por trabéculas finas e próximas (Romão et al., 2015).

Uma das análises realizadas no presente estudo, e que, apesar de ser de relevância para a avaliação do osso osteoporótico, não tem sido comumente utilizada nos estudos de regeneração óssea é a do índice de estrutura de modelo (SMI do inglês *Structure Model Index*). O SMI se refere à presença de placas e bastonetes em uma estrutura tridimensional como o osso trabecular. Esse índice é de suma importância para avaliação da degradação do osso osteoporótico, caracterizada por uma transição de uma estrutura trabecular de placas para bastonetes. Estruturas convexas em forma de placa, bastonete e esfera possuem respectivamente valores de SMI 0, 3 e 4, enquanto estruturas côncavas apresentam valores de SMI negativos (Hildebrand; Rüegsegger, 1997). Estudos utilizaram esse índice e revelaram uma correlação negativa dos valores de SMI com o volume ósseo relativo, condizente com os resultados dessa pesquisa (Almeida et al., 2017). Isto significa que nos grupos tratados a quantidade de estruturas côncavas foi maior que no grupo controle. No entanto, análises histológicas podem ser importantes para se

confirmar este achado e, mais ainda, relacionar este achado com a maturidade das trabéculas ósseas. Em estudo futuro, o material desta pesquisa será preparado para análise histológica no sentido de obter estas respostas.

Baseados nos dados obtidos no presente estudo *in vivo* podemos concluir que a PBMT, em especial em menor energia, favorece a regeneração do osso de ratas osteoporóticas. Assim sendo, confirmamos nossa hipótese inicial. No entanto, apesar dos dados obtidos por microCT serem precisos e objetivos apontando para uma regeneração óssea mais rápida nos animais irradiados, há que se fazer novos estudos histológicos e imunoistoquímicos para se complementar a análise do tecido neoformado.

7 CONCLUSÃO

A associação da terapia de fotobiomodulação (PBMT) e reparação óssea guiada (ROG) exerceu efeitos positivos na reparação de lesões críticas do osso parietal em ratas com osteoporose induzida por ooforectomia. A PBMT, em especial quando aplicada em baixa energia, levou à neoformação de maior volume de osso no interior das lesões, osso este com maior quantidade de trabéculas ósseas, próximas e de espessuras médias.

REFERÊNCIAS¹

Abou Fadel R, Samarani R, Chakar C. Guided bone regeneration in calvarial critical size bony defect using a double-layer resorbable collagen membrane covering a xenograft: a histological and histomorphometric study in rats. *Oral Maxillofac Surg*. 2018; Jun;22(2):203-13.

de Almeida AL, Medeiros IL, Cunha MJ, Sbrana MC, de Oliveira PG, Esper LA. The effect of low-level laser on bone healing in critical size defects treated with or without autogenous bone graft: an experimental study in rat calvaria. *Clin Oral Implants Res*. 2014 Oct;25(10):1131-6.

Almeida-Lopes L, Rigau J, Zângaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med*. 2001;29(2):179-84.

Almeida ALG. Efeito de células-tronco mesenquimais associadas a biomateriais no reparo ósseo em ratas osteoporóticas [dissertação]. Ribeirão Preto; Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2017.

Azevedo LH, de Paula Eduardo F, Moreira MS, de Paula Eduardo C, Marques MM. Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth: a pilot study. *Lasers Med Sci*. 2006 Jul;21(2):86-9.

Anders JJ, Lanza fame RJ, Arany PR. Low-level light/laser therapy versus photobiomodulation therapy. *Photomed Laser Surg*. 2015;33(4):183-4.

Arany PR. Photobiomodulation Therapy: Communicating with Stem Cells for Regeneration? *Photomed Laser Surg*. 2016;34(11):497-99.

Arany PR, Cho A, Hunt TD, Sidhu G, Shin K, Hahm E, et al. Photoactivation of endogenous latent transforming growth factor- β 1 directs dental stem cell differentiation for regeneration. *Sci Transl Med*. 2014;6(238):238-69.

Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*. 2010;25(7):1468-86.

¹De acordo com estilo Vancouver

Brown JP, Prince RL, Deal C, Recker RR, Kiel DP, de Gregorio LH, et al. Comparison of the effect of denosumab and alendronate on BMD and biochemical markers of bone turnover in postmenopausal women with low bone mass: a randomized, blinded, phase 3 trial. *J Bone Miner Res*. 2009;24(1):153-61.

Christiansen BA. Effect of micro-computed tomography voxel size and segmentation method on trabecular bone microstructure measures in mice. *Bone Rep*. 2016;5:136-40.

Cordon, R, Nogueira GEC, Eduardo CP. Avaliação da proteção ocular para lasers terapêuticos em baixa intensidade. *Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo*. 2007;9(2): 122-30.

Damante CA, De Micheli G, Miyagi SPH, Feist IS, Marques MM. Effect of laser phototherapy on the release of fibroblast growth factors by human gingival fibroblasts. *Laser Med Sci*, 2008; 24 (6) 885-91.

Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg*. 1988 May;81(5):672-6.

Dimitriou R, Mataliotakis GI, Angoules AG, Kanakaris NK, Giannoudis PV. Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: a systematic review. *Injury*. 2011;42 Suppl 2: S3-15.

Diniz IMA, Carreira ACO, Sipert CR, Uehara CM, Moreira MSN, Freire L, Pelissari C, Kossugue PM, de Araújo DR, Sogayar MC, Marques MM. Photobiomodulation of mesenchymal stem cells encapsulated in an injectable rhBMP4-loaded hydrogel directs hard tissue bioengineering. *J Cell Physiol*. 2018 Jun;233(6):4907-4918.

Eduardo FP, Mehnert DU, Monezi TA, Zezell DM, Schubert MM, Eduardo CP, Marques MM. Cultured epithelial cells response to phototherapy with low intensity laser. *Lasers Surg Med*. 2007 Apr;39(4):365-72.

Egermann M, Goldhahn J, Schneider E. Animal models for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2005 Mar;16 Suppl 2:S129-38.

Faloni A, Cerri P. Cellular and molecular mechanisms of the estrogen in the bone resorption. *Rev Odontol UNESP*. 2007;36 (2):181-8.

Faot F, Chatterjee M, de Camargos GV, Duyck J, Vandamme K. Micro-CT analysis of the rodent jaw bone micro-architecture: A systematic review. *Bone Rep.* 2015; 21;2:14-24.

Fenwick N, Griffin G, Gauthier C. The welfare of animals used in science: how the "Three Rs" ethic guides improvements. *Can Vet J.* 2009 May;50(5):523-30.

Freitas NR, Guerrini LB, Esper LA, Sbrana MC, Dalben GDS, Soares S, et al. Evaluation of photobiomodulation therapy associated with guided bone regeneration in critical size defects. In vivo study. *J Appl Oral Sci.* 2018;26:e20170244.

Fujihara NA, Hiraki KR, Marques MM. Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. *Lasers Surg Med.* 2006 Apr;38(4):332-6.

Gomes PS, Fernandes MH. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Lab Anim.* 2011;45(1):14-24.

Hartke JR. Preclinical development of agents for the treatment of osteoporosis. *Toxicol Pathol.* 1999 Jan-Feb;27(1):143-7.

Hildebrand T, Rüegsegger P. Quantification of Bone Microarchitecture with the Structure Model Index. *Comput Methods Biomech Biomed Engin.* 1997;1(1):15-23.

Khajuria DK, Razdan R, Mahapatra DR. Drugs for the treatment of osteoporosis: Review. *Rev Bras Reumatol.* 2011;51 (4):365-82.

Khojasteh A, Kheiri L, Motamedian SR, Khoshkam V. Guided Bone Regeneration for the Reconstruction of Alveolar Bone Defects. *Ann Maxillofac Surg.* 2017;7(2):263-77.

Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG; NC3Rs Reporting Guidelines Working Group. Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol.* 2010 Aug;160(7):1577-9.

Kumar, Vinay. Abbas, Abul K. Aster, Jon C. Robbins, *Patologia Básica*. 9. ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2013. 910 p.

Li H, Zhang H, Tang Z, Hu G. Micro-computed tomography for small animal imaging: technological details. *Progress in Natural Science* 2008; 18(5): 513–21.

Mardas N, Buseti J, de Figueiredo JA, Mezzomo LA, Scarparo RK, Donos N. Guided bone regeneration in osteoporotic conditions following treatment with zoledronic acid. *Clin Oral Implants Res.* 2017;28(3):362-71.

Marques MM, Diniz IM, de Cara SP, Pedroni AC, Abe GL, D'Almeida-Couto RS, et al. Photobiomodulation of Dental Derived Mesenchymal Stem Cells: A Systematic Review. *Photomed Laser Surg.* 2016;34(11):500-8.

Marques MM, Pereira AN, Fujihara NA, Nogueira FN, Eduardo CP. Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2004;34(3):260-5

Martins MA, Martins MD, Lascale CA, Curi MM, Migliorati CA, Tenis CA, et al. Association of laser phototherapy with PRP improves healing of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in cancer patients: a preliminary study. *Oral Oncol.* 2012;48(1):79-84.

Moreira MS, Diniz IM, Rodrigues MF, de Carvalho RA, de Almeida Carrer FC, Neves II, Gavini G, Marques MM. In vivo experimental model of orthotopic dental pulp regeneration under the influence of photobiomodulation therapy. *J Photochem Photobiol B.* 2017 Jan;166:180-6.

Moreira MS, Velasco IT, Ferreira LS, Ariga SK, Abatepaulo F, Marques MM, et al. Effect of laser phototherapy on wound healing following cerebral ischemia by cryogenic injury. *J Photochem Photobiol B.* 2011;105(3):207-15.

Moreira MS, Velasco IT, Ferreira LS, Ariga SK, Barbeiro DF, Meneguzzo DT, Abatepaulo F, Marques MM. Effect of phototherapy with low intensity laser on local and systemic immunomodulation following focal brain damage in rat. *J Photochem Photobiol B.* 2009 Dec 2;97(3):145-51. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2009.09.002.

Mosekilde L. Assessing bone quality--animal models in preclinical osteoporosis research. *Bone.* 1995;17(4 Suppl):343S-352S.

Moura-Netto C, Ferreira LS, Maranduba CM, Mello-Moura ACV, Marques MM. Low-intensity laser phototherapy enhances the proliferation of dental pulp stem cells under nutritional deficiency. *Braz Oral Res.* 2016 May 31;30(1).

Muschitz C, Fahrleitner-Pammer A, Huber J, Preisinger E, Kudlacek S, Resch H. Update on denosumab in postmenopausal osteoporosis--recent clinical data. *Wien Med Wochenschr.* 2012;162(17-18):374-9.

Park CH, Abramson ZR, Taba M, Jin Q, Chang J, Kreider JM, et al. Three dimensional micro-computed tomographic imaging of alveolar bone in experimental bone loss or repair. *J Periodontol* 2007; 78:273–81.

Pelliccioli AC, Martins MD, Dillenburg CS, Marques MM, Squarize CH, Castilho RM. Laser phototherapy accelerates oral keratinocyte migration through the modulation of the mammalian target of rapamycin signaling pathway. *J Biomed Opt.* 2014;19(2):028002.

Pereira AN, Eduardo Cde P, Matson E, Marques MM. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2002;31(4):263-7

Pires-Oliveira DA, Oliveira RF, Amadei SU, Pacheco-Soares C, Rocha RF. Laser 904 nm action on bone repair in rats with osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2010 Dec;21(12):2109-14.

Rochkind S, Rousso M, Nissan M, Villarreal M, Barr-Nea L, Rees DG. Systemic effects of low-power laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds, and burns. *Lasers Surg Med.* 1989;9(2):174-82.

Romão MM, Marques MM, Cortes AR, Horliana AC, Moreira MS, Lascale CA. Micro-computed tomography and histomorphometric analysis of human alveolar bone repair induced by laser phototherapy: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015;44(12):1521-8.

Rossini M, Adami S, Bertoldo F, Diacinti D, Gatti D, Giannini S, et al. Guidelines for the diagnosis, prevention and management of osteoporosis. *Reumatismo.* 2016;68(1):1-39

Rüegsegger P, Koller B, Müller R. A microtomographic system for the nondestructive evaluation of bone architecture. *Calcif Tissue Int.* 1996;58(1):24-9.

Sawasaki I, Geraldo-Martins VR, Ribeiro MS, Marques MM. Effect of low-intensity laser therapy on mast cell degranulation in human oral mucosa. *Lasers Med Sci.* 2009 Jan;24(1):113-6

Scalizi PH, de Sousa LG, Regalo SC, Semprini M, Pitol DL, da Silva GA, et al. Low-level laser therapy improves bone formation: stereology findings for osteoporosis in rat model. *Lasers Med Sci.* 2015;30(5):1599-607.

Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibularfacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*. 1996;(2015):299-308.

Sendyk DI. Avaliação radiográfica e histológica comparativa entre uma nova membrana eletrofiada de PCL/poli(rotaxona) e uma membrana de colágeno suíno na regeneração óssea guiada de defeito crítico em calvária de ratos Wistar [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014.

Sophocleous A, Idris AI. Rodent models of osteoporosis. *Bonekey Rep*. 2014 Dec 10;3:614.

Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc*. 2012;7(10):1918-2.

Turner AS. Animal models of osteoporosis--necessity and limitations. *Eur Cell Mater*. 2001 Jun 22; 1:66-81.

Vidal B, Pinto A, Galvão MJ, Santos AR, Rodrigues A, Cascão R, et al. Bone histomorphometry revisited. *Acta Reumatol Port*. 2012;37(4):294-300.

Wagner VP, Meurer L, Martins MA, Danilevicz CK, Magnusson AS, Marques MM, Filho MS, Squarize CH, Martins MD. Influence of different energy densities of laser phototherapy on oral wound healing. *J Biomed Opt*. 2013 Dec;18(12):128002

Willershausen I, Barbeck M, Boehm N, Sader R, Willershausen B, Kirkpatrick CJ, et al. Non-cross-linked collagen type I/III materials enhance cell proliferation: in vitro and in vivo evidence. *J Appl Oral Sci*. 2014;22(1):29-37.

Williamson RA. Surgical management of bisphosphonate induced osteonecrosis of the jaws. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2010;39(3):251-5.

Zhu CT, Li T, Zhang P, Zou M, Guo Q, Qu XW. Beneficial effects of low-level laser irradiation on senile osteoporosis in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017;21(22):5230-8.

APÊNDICE A - Tabelas de estatística

Tabela A1 - Dados originais de volume ósseo (mm³)

4 SEMANAS				8 SEMANAS			
Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2
1.88E+00	8.76E-01	1.58E+00	8.06E-01	3.16E+00	2.68E+00	5.18E+00	2.06E+00
2.48E-01	2.05E+00	1.03E+00	9.21E-01	3.34E+00	5.23E+00	4.59E+00	6.38E+00
1.94E+00	6.38E-02	1.57E+00	1.57E+00	1.11E+00	3.37E+00	4.82E+00	5.04E+00
8.81E-02	9.63E-01	1.03E+00	1.03E+00	2.02E+00	5.12E+00	5.73E+00	6.12E+00
8.68E-01	1.22E+00	1.29E+00	1.29E+00	1.22E+00	3.01E+00	7.50E+00	4.53E+00
1.22E+00	8.84E-01	1.36E+00	1.36E+00	1.83E+00	1.23E+00	6.39E+00	5.16E+00

Fonte: O autor

Tabela A2 - Dados da estatística descritiva de volume ósseo

	4 SEMANAS				8 SEMANAS			
	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2
Tamanho da amostra =	6	6	6	6	6	6	6	6
Mínimo	0.0881	0.0638	1.0300	0.8060	1.1100	1.2300	4.5900	2.0600
Máximo	1.9400	2.0500	1.5800	1.5700	3.3400	5.2300	7.5000	6.3800
Mediana	1.0440	0.9235	1.3250	1.1600	1.9250	3.1900	5.4550	5.1000
Média Aritmética	1.0407	1.0095	1.3100	1.1628	2.1133	3.4400	5.7017	4.8817
Variância	0.6222	0.4114	0.0600	0.0849	0.8988	2.3356	1.1988	2.3933
Desvio Padrão	0.7888	0.6414	0.2450	0.2913	0.9480	1.5283	1.0949	1.5470
Erro Padrão	0.3220	0.2619	0.1000	0.1189	0.3870	0.6239	0.4470	0.6316

Fonte: O autor

Tabela A3 - Análise de normalidade dos valores de volume ósseo (teste de Lilliefors)

	4 SEMANAS				8 SEMANAS			
	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2
Tamanho da amostra =	6	6	6	6	6	6	6	6
Desvio máximo =	0.1897	0.2509	0.2068	0.1758	0.2059	0.1975	0.1831	0.2434
Valor crítico (0.05) =	0.3190	0.3190	0.3190	0.3190	0.3190	0.3190	0.3190	0.3190
Valor crítico (0.01) =	0.3640	0.3640	0.3640	0.3640	0.3640	0.3640	0.3640	0.3640
p(valor)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Fonte: O autor

Tabela A4 - Análise de variância (ANOVA dois critérios) complementado pelo teste de Tukey dos dados de volume ósseo.

FONTES VARIAÇÃO	DE	GL	SQ	QM
Tratamentos		7	146.7428	20.963

Blocos	5	2.596	0.519
Erro	35	37.429	1.069
F (tratamentos) =	19.6030		
p (tratamentos) =	< 0.0001		
F (blocos) =	0.4855		
p (blocos) =	0.7863		
Médias (tratamentos):			
Média (Coluna 1) =	1.0407	Controle	4 SEMANAS
Média (Coluna 2) =	1.0095	Membrana	
Média (Coluna 3) =	1.3100	PBMT1	
Média (Coluna 4) =	1.1628	PBMT2	
Média (Coluna 5) =	2.1133	Controle	8 SEMANAS
Média (Coluna 6) =	3.4400	Membrana	
Média (Coluna 7) =	5.7017	PBMT1	
Média (Coluna 8) =	4.8817	PBMT2	
Tukey	Q	(p)	
Médias (1 a 2) =	0.0739	ns	
Médias (1 a 3) =	0.6379	ns	
Médias (1 a 4) =	0.2893	ns	
Médias (1 a 5) =	2.5408	ns	
Médias (1 a 6) =	5.6832	< 0.01	
Médias (1 a 7) =	11.0404	< 0.01	
Médias (1 a 8) =	9.0981	< 0.01	
Médias (2 a 3) =	0.7119	ns	
Médias (2 a 4) =	0.3633	ns	
Médias (2 a 5) =	2.6147	ns	
Médias (2 a 6) =	5.7572	< 0.01	
Médias (2 a 7) =	11.1144	< 0.01	
Médias (2 a 8) =	9.1720	< 0.01	
Médias (3 a 4) =	0.3486	ns	
Médias (3 a 5) =	1.9028	ns	
Médias (3 a 6) =	5.0453	< 0.05	
Médias (3 a 7) =	10.4025	< 0.01	
Médias (3 a 8) =	8.4602	< 0.01	
Médias (4 a 5) =	2.2514	ns	
Médias (4 a 6) =	5.3939	< 0.05	
Médias (4 a 7) =	10.7511	< 0.01	
Médias (4 a 8) =	8.8088	< 0.01	
Médias (5 a 6) =	3.1425	ns	
Médias (5 a 7) =	8.4996	< 0.01	
Médias (5 a 8) =	6.5573	< 0.01	
Médias (6 a 7) =	5.3572	< 0.05	
Médias (6 a 8) =	3.4149	ns	
Médias (7 a 8) =	1.9423	ns	

Fonte: O autor

Tabela A5 - Dados originais de volume ósseo relativo (%)

4 SEMANAS				8 SEMANAS			
Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2
1.36E+01	6.35E+00	1.14E+01	5.84E+00	2.29E+01	1.94E+01	3.75E+01	1.50E+01
1.80E+00	1.49E+01	7.43E+00	6.67E+00	2.42E+01	3.78E+01	3.33E+01	4.62E+01
1.41E+01	4.62E-01	1.14E+01	1.14E+01	8.03E+00	2.33E+01	3.49E+01	3.65E+01

6.38E-01	6.97E+00	7.45E+00	7.45E+00	1.46E+01	3.71E+01	4.15E+01	4.43E+01
6.28E+00	8.85E+00	9.31E+00	9.31E+00	8.84E+00	2.18E+01	5.43E+01	3.28E+01
8.81E+00	6.40E+00	9.83E+00	9.83E+00	1.33E+01	8.88E+00	4.63E+01	3.74E+01

Fonte: O autor

Tabela A6 - Dados da estatística descritiva de volume ósseo relativo

	4 semanas				8 semanas			
	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2
Tamanho da amostra =	6	6	6	6	6	6	6	6
Mínimo	0.6380	0.4620	7.4300	5.8400	8.0300	8.8800	33.3000	15.0000
Máximo	14.1000	14.9000	11.4000	11.4000	24.2000	37.8000	54.3000	46.2000
Mediana	7.5450	6.6850	9.5700	8.3800	13.9500	22.5500	39.5000	36.9500
Média Aritmética	7.5380	7.3220	9.4700	8.4167	15.3117	24.7133	41.3000	35.3667
Variância	32.7086	21.7478	3.1694	4.4641	47.2087	122.8203	62.6880	124.7947
Desvio Padrão	5.7191	4.6635	1.7803	2.1128	6.8709	11.0824	7.9176	11.1712
Erro Padrão	2.3348	1.9038	0.7268	0.8626	2.8050	4.5244	3.2323	4.5606

Fonte: O autor

Tabela A7 - Análise de normalidade dos valores de volume ósseo relativo (teste de Lilliefors)

	4 semanas				8 semanas			
	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2
Tamanho da amostra =	6	6	6	6	6	6	6	6
Desvio máximo =	0.1887	0.2508	0.2051	0.1764	0.2079	0.2174	0.1844	0.2425
Valor crítico (0.05) =	0.3190	0.3190	0.3190	0.3190	0.3190	0.3190	0.3190	0.3190
Valor crítico (0.01) =	0.3640	0.3640	0.3640	0.3640	0.3640	0.3640	0.3640	0.3640
p(valor)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Fonte: O autor

Tabela A8 - Análise de variância (ANOVA dois critérios) complementado pelo teste de Tukey dos dados de volume ósseo.

FONTES VARIACÃO	DE	GL	SQ	QM
Tratamentos		7	7686.9868	1098.141
Blocos		5	138.234	27.647
Erro		35	1959.774	55.994
F (tratamentos) =		19.6119		
p (tratamentos) =		< 0.0001		
F (blocos) =		0.4937		
p (blocos) =		0.7804		

Médias (tratamentos):			
Média (Coluna 1) =	7.5380	Controle	4 semanas
Média (Coluna 2) =	7.3220	Membrana	
Média (Coluna 3) =	9.4700	PBMT1	
Média (Coluna 4) =	8.4167	PBMT2	
Média (Coluna 5) =	15.3117	Controle	8 semanas
Média (Coluna 6) =	24.7133	Membrana	
Média (Coluna 7) =	41.3000	PBMT1	
Média (Coluna 8) =	35.3667	PBMT2	
Tukey	Q	(p)	
Médias (1 a 2) =	0.0707	ns	
Médias (1 a 3) =	0.6324	ns	
Médias (1 a 4) =	0.2876	ns	
Médias (1 a 5) =	2.5447	ns	
Médias (1 a 6) =	5.6223	< 0.01	
Médias (1 a 7) =	11.0518	< 0.01	
Médias (1 a 8) =	9.1096	< 0.01	
Médias (2 a 3) =	0.7031	ns	
Médias (2 a 4) =	0.3583	ns	
Médias (2 a 5) =	2.6154	ns	
Médias (2 a 6) =	5.6930	< 0.01	
Médias (2 a 7) =	11.1226	< 0.01	
Médias (2 a 8) =	9.1803	< 0.01	
Médias (3 a 4) =	0.3448	ns	
Médias (3 a 5) =	1.9122	ns	
Médias (3 a 6) =	4.9898	< 0.05	
Médias (3 a 7) =	10.4194	< 0.01	
Médias (3 a 8) =	8.4772	< 0.01	
Médias (4 a 5) =	2.2570	ns	
Médias (4 a 6) =	5.3346	< 0.05	
Médias (4 a 7) =	10.7642	< 0.01	
Médias (4 a 8) =	8.8220	< 0.01	
Médias (5 a 6) =	3.0776	ns	
Médias (5 a 7) =	8.5072	< 0.01	
Médias (5 a 8) =	6.5649	< 0.01	
Médias (6 a 7) =	5.4296	< 0.05	
Médias (6 a 8) =	3.4873	ns	
Médias (7 a 8) =	1.9423	ns	

Fonte: O autor

Tabela A9 - Dados originais de número de trabéculas (1/mm)

4 SEMANAS				8 SEMANAS			
Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2
5.90E-01	5.14E-01	6.11E-01	5.07E-01	1.00E+00	9.35E-01	3.18E+00	7.49E-01
1.70E-01	1.15E+00	9.73E-01	8.23E-01	1.10E+00	2.50E+00	1.99E+00	2.74E+00
8.86E-01	7.31E-02	1.01E+00	1.01E+00	3.37E-01	1.89E+00	1.83E+00	2.66E+00
7.76E-02	5.32E-01	1.01E+00	1.01E+00	6.44E-01	2.46E+00	1.84E+00	2.62E+00
4.56E-01	9.56E-01	9.12E-01	9.12E-01	2.90E-01	1.05E+00	3.10E+00	1.91E+00

4.52E-01	6.33E-01	1.02E+00	1.02E+00	5.67E-01	6.26E-01	3.00E+00	2.14E+00
----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------

Fonte: O autor

Tabela A10 - Dados da estatística descritiva de número de trabéculas

	4 semanas				8 semanas			
	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2
Tamanho da amostra =	6	6	6	6	6	6	6	6
Mínimo	0.0776	0.0731	0.6110	0.5070	0.2900	0.6260	1.8300	0.7490
Máximo	0.8860	1.1500	1.0200	1.0200	1.1000	2.5000	3.1800	2.7400
Mediana	0.4540	0.5825	0.9915	0.9610	0.6055	1.4700	2.4950	2.3800
Média Aritmética	0.4386	0.6430	0.9227	0.8803	0.6563	1.5768	2.4900	2.1365
Variância	0.0852	0.1418	0.0249	0.0394	0.1119	0.6648	0.4433	0.5697
Desvio Padrão	0.2919	0.3765	0.1578	0.1984	0.3344	0.8153	0.6658	0.7548
Erro Padrão	0.1192	0.1537	0.0644	0.0810	0.1365	0.3329	0.2718	0.3081

Fonte: O autor

Tabela A11 - Análise de normalidade dos valores de número de trabéculas (teste de Lilliefors)

	4 semanas				8 semanas			
	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2
Tamanho da amostra =	6	6	6	6	6	6	6	6
Desvio máximo =	0.1850	0.1993	0.3064	0.2433	0.1814	0.2409	0.2782	0.2391
Valor crítico (0.05) =	0.3190	0.3190	0.3190	0.3190	0.3190	0.3190	0.3190	0.3190
Valor crítico (0.01) =	0.3640	0.3640	0.3640	0.3640	0.3640	0.3640	0.3640	0.3640
p(valor)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Fonte: O autor

Tabela A12 - Análise de variância (ANOVA dois critérios) complementado pelo teste de Tukey dos dados de número de trabéculas.

FONTES VARIACÃO	DE	GL	SQ	QM
Tratamentos		7	24.2710	3.467
Blocos		5	0.745	0.149
Erro		35	9.660	0.276
F (tratamentos) =		12.5631		
p (tratamentos) =		< 0.0001		
F (blocos) =		0.5396		
p (blocos) =		0.7470		
Médias (tratamentos):				

Média (Coluna 1) =	0.4386	Controle	4 semanas
Média (Coluna 2) =	0.6430	Membrana	
Média (Coluna 3) =	0.9227	PBMT1	
Média (Coluna 4) =	0.8803	PBMT2	
Média (Coluna 5) =	0.6563	Controle	8 semanas
Média (Coluna 6) =	1.5768	Membrana	
Média (Coluna 7) =	2.4900	PBMT1	
Média (Coluna 8) =	2.1365	PBMT2	
Tukey	Q	(p)	
Médias (1 a 2) =	0.9531	ns	
Médias (1 a 3) =	2.2570	ns	
Médias (1 a 4) =	2.0596	ns	
Médias (1 a 5) =	1.0152	ns	
Médias (1 a 6) =	5.3071	< 0.05	
Médias (1 a 7) =	9.5649	< 0.01	
Médias (1 a 8) =	7.9166	< 0.01	
Médias (2 a 3) =	1.3039	ns	
Médias (2 a 4) =	1.1065	ns	
Médias (2 a 5) =	0.0621	ns	
Médias (2 a 6) =	4.3540	ns	
Médias (2 a 7) =	8.6118	< 0.01	
Médias (2 a 8) =	6.9635	< 0.01	
Médias (3 a 4) =	0.1974	ns	
Médias (3 a 5) =	1.2418	ns	
Médias (3 a 6) =	3.0501	ns	
Médias (3 a 7) =	7.3079	< 0.01	
Médias (3 a 8) =	5.6596	< 0.01	
Médias (4 a 5) =	1.0444	ns	
Médias (4 a 6) =	3.2475	ns	
Médias (4 a 7) =	7.5053	< 0.01	
Médias (4 a 8) =	5.8570	< 0.01	
Médias (5 a 6) =	4.2919	ns	
Médias (5 a 7) =	8.5497	< 0.01	
Médias (5 a 8) =	6.9014	< 0.01	
Médias (6 a 7) =	4.2577	ns	
Médias (6 a 8) =	2.6095	ns	
Médias (7 a 8) =	1.6482	ns	

Fonte: O autor

Tabela A13 - Dados originais de espessura de trabéculas (mm)

4 SEMANAS				8 SEMANAS			
Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2
2.31E-01	1.24E-01	1.87E-01	1.15E-01	2.28E-01	2.08E-01	1.18E-01	2.00E-01
1.06E-01	1.29E-01	7.64E-02	8.11E-02	2.20E-01	1.57E-01	1.67E-01	1.69E-01
1.59E-01	6.32E-02	1.12E-01	1.12E-01	2.38E-01	1.29E-01	1.91E-01	1.37E-01
8.22E-02	1.31E-01	7.36E-02	7.36E-02	2.27E-01	1.51E-01	2.25E-01	1.69E-01
1.38E-01	9.27E-02	1.02E-01	1.02E-01	3.05E-01	2.08E-01	1.75E-01	1.72E-01
1.95E-01	1.01E-01	9.65E-02	9.65E-02	2.34E-01	1.42E-01	1.54E-01	1.75E-01

Fonte: O autor

Tabela A14 - Dados da estatística descritiva de espessura de trabéculas

4 semanas				8 semanas			
Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2

Tamanho da amostra =	6	6	6	6	6	6	6	6
Mínimo	0.0822	0.0632	0.0736	0.0736	0.2200	0.1290	0.1180	0.1370
Máximo	0.2310	0.1310	0.1870	0.1150	0.3050	0.2080	0.2250	0.2000
Mediana	0.1485	0.1125	0.0993	0.0993	0.2310	0.1540	0.1710	0.1705
Média Aritmética	0.1519	0.1068	0.1079	0.0967	0.2420	0.1658	0.1717	0.1703
Variância	0.0031	0.0007	0.0017	0.0003	0.0010	0.0012	0.0013	0.0004
Desvio Padrão	0.0554	0.0265	0.0415	0.0166	0.0315	0.0340	0.0359	0.0201
Erro Padrão	0.0226	0.0108	0.0169	0.0068	0.0129	0.0139	0.0147	0.0082

Fonte: O autor

Tabela A15 - Análise de normalidade dos valores de espessura de trabéculas (teste de Lilliefors)

	4 semanas				8 semanas			
	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2
Tamanho da amostra =	6	6	6	6	6	6	6	6
Desvio máximo =	0.1296	0.2418	0.2941	0.1619	0.3839	0.2692	0.1446	0.3069
Valor crítico (0.05) =	0.3190	0.3190	0.3190	0.3190	0.3190	0.3190	0.3190	0.3190
Valor crítico (0.01) =	0.3640	0.3640	0.3640	0.3640	0.3640	0.3640	0.3640	0.3640
p(valor)	ns	ns	ns	ns	< 0.01	ns	ns	ns

Fonte: O autor

Tabela A16 - Análise de variância (ANOVA dois critérios) complementado pelo teste de Tukey dos dados de espessura de trabéculas.

FONTES VARIAÇÃO	DE	GL	SQ	QM
Tratamentos		7	0.0963	0.014
Blocos		5	0.009	0.002
Erro		35	0.039	0.001
F (tratamentos) =		12.2484		
p (tratamentos) =		< 0.0001		
F (blocos) =		1.5452		
p (blocos) =		0.2006		
Médias (tratamentos):				
Média (Coluna 1) =		0.1519	Controle	4 semanas
Média (Coluna 2) =		0.1068	Membrana	
Média (Coluna 3) =		0.1079	PBMT1	
Média (Coluna 4) =		0.0967	PBMT2	
Média (Coluna 5) =		0.2420	Controle	8 semanas
Média (Coluna 6) =		0.1658	Membrana	
Média (Coluna 7) =		0.1717	PBMT1	
Média (Coluna 8) =		0.1703	PBMT2	

Tukey	Q	(p)	
Médias (1 a 2) =	3.2920	ns	
Médias (1 a 3) =	3.2116	ns	
Médias (1 a 4) =	4.0313	ns	
Médias (1 a 5) =	6.5865	< 0.01	
Médias (1 a 6) =	1.0206	ns	
Médias (1 a 7) =	1.4469	ns	
Médias (1 a 8) =	1.3494	ns	
Médias (2 a 3) =	0.0804	ns	
Médias (2 a 4) =	0.7393	ns	
Médias (2 a 5) =	9.8785	< 0.01	
Médias (2 a 6) =	4.3126	ns	
Médias (2 a 7) =	4.7389	< 0.05	
Médias (2 a 8) =	4.6415	< 0.05	
Médias (3 a 4) =	0.8197	ns	
Médias (3 a 5) =	9.7981	< 0.01	
Médias (3 a 6) =	4.2322	ns	
Médias (3 a 7) =	4.6585	< 0.05	
Médias (3 a 8) =	4.5611	ns	
Médias (4 a 5) =	10.6178	< 0.01	
Médias (4 a 6) =	5.0519	< 0.05	
Médias (4 a 7) =	5.4782	< 0.01	
Médias (4 a 8) =	5.3807	< 0.05	
Médias (5 a 6) =	5.5659	< 0.01	
Médias (5 a 7) =	5.1396	< 0.05	
Médias (5 a 8) =	5.2370	< 0.05	
Médias (6 a 7) =	0.4263	ns	
Médias (6 a 8) =	0.3288	ns	
Médias (7 a 8) =	0.0974	ns	

Fonte: O autor

Tabela A17 - Dados originais de separação entre trabéculas (mm)

4 SEMANAS				8 SEMANAS			
Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2
5.84E-01	5.20E-01	5.97E-01	5.04E-01	5.33E-01	5.43E-01	2.82E-01	5.51E-01
6.79E-01	3.74E-01	3.99E-01	4.04E-01	4.68E-01	2.70E-01	3.54E-01	3.31E-01
5.90E-01	6.98E-01	3.35E-01	3.35E-01	6.58E-01	2.87E-01	3.11E-01	2.77E-01
6.93E-01	5.17E-01	3.50E-01	3.50E-01	5.57E-01	3.37E-01	3.77E-01	2.16E-01
6.37E-01	4.20E-01	4.63E-01	4.63E-01	6.71E-01	4.79E-01	1.98E-01	3.89E-01
6.33E-01	4.92E-01	4.68E-01	4.68E-01	6.05E-01	5.66E-01	2.58E-01	3.48E-01

Fonte: O autor

Tabela A18 - Dados da estatística descritiva de separação entre trabéculas

	4 semanas				8 semanas			
	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2
Tamanho da amostra =	6	6	6	6	6	6	6	6
Mínimo	0.5840	0.3740	0.3350	0.3350	0.4680	0.2700	0.1980	0.2160
Máximo	0.6930	0.6980	0.5970	0.5040	0.6710	0.5660	0.3770	0.5510
Mediana	0.6350	0.5045	0.4310	0.4335	0.5810	0.4080	0.2965	0.3395
Média Aritmética	0.6360	0.5035	0.4353	0.4207	0.5820	0.4137	0.2967	0.3520
Variância	0.0020	0.0124	0.0093	0.0047	0.0060	0.0174	0.0043	0.0131
Desvio	0.0446	0.1115	0.0966	0.0687	0.0778	0.1317	0.0654	0.1145

Padrão								
Erro	0.0182	0.0455	0.0394	0.0280	0.0318	0.0538	0.0267	0.0467
Padrão								

Fonte: O autor

Tabela A19 - Análise de normalidade dos valores de separação entre trabéculas (teste de Lilliefors)

	4 semanas				8 semanas			
	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2
Tamanho da amostra =	6	6	6	6	6	6	6	6
Desvio máximo =	0.1824	0.2745	0.2009	0.2312	0.1691	0.2197	0.1430	0.2066
Valor crítico (0.05) =	0.3190	0.3190	0.3190	0.3190	0.3190	0.3190	0.3190	0.3190
Valor crítico (0.01) =	0.3640	0.3640	0.3640	0.3640	0.3640	0.3640	0.3640	0.3640
p(valor)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Fonte: O autor

Tabela A20 - Análise de variância (ANOVA dois critérios) complementado pelo teste de Tukey dos dados de separação entre trabéculas.

FONTES VARIACÃO	DE	GL	SQ	QM
Tratamentos		7	0.5412	0.077
Blocos		5	0.060	0.012
Erro		35	0.286	0.008
F (tratamentos) =		9.4599		
p (tratamentos) =		< 0.0001		
F (blocos) =		1.4740		
p (blocos) =		0.2225		
Médias (tratamentos):				
Média (Coluna 1) =		0.6360	Controle	4 semanas
Média (Coluna 2) =		0.5035	Membrana	
Média (Coluna 3) =		0.4353	PBMT1	
Média (Coluna 4) =		0.4207	PBMT2	
Média (Coluna 5) =		0.5820	Controle	8 semanas
Média (Coluna 6) =		0.4137	Membrana	
Média (Coluna 7) =		0.2967	PBMT1	
Média (Coluna 8) =		0.3520	PBMT2	
Tukey		Q	(p)	
Médias (1 a 2) =		3.5902	ns	
Médias (1 a 3) =		5.4372	< 0.05	
Médias (1 a 4) =		5.8346	< 0.01	
Médias (1 a 5) =		1.4632	ns	
Médias (1 a 6) =		6.0243	< 0.01	
Médias (1 a 7) =		9.1945	< 0.01	
Médias (1 a 8) =		7.6952	< 0.01	
Médias (2 a 3) =		1.8470	ns	
Médias (2 a 4) =		2.2444	ns	

Médias (2 a 5) =	2.1270	ns	
Médias (2 a 6) =	2.4341	ns	
Médias (2 a 7) =	5.6043	< 0.01	
Médias (2 a 8) =	4.1050	ns	
Médias (3 a 4) =	0.3974	ns	
Médias (3 a 5) =	3.9741	ns	
Médias (3 a 6) =	0.5871	ns	
Médias (3 a 7) =	3.7573	ns	
Médias (3 a 8) =	2.2580	ns	
Médias (4 a 5) =	4.3715	ns	
Médias (4 a 6) =	0.1897	ns	
Médias (4 a 7) =	3.3599	ns	
Médias (4 a 8) =	1.8606	ns	
Médias (5 a 6) =	4.5611	ns	
Médias (5 a 7) =	7.7313	< 0.01	
Médias (5 a 8) =	6.2320	< 0.01	
Médias (6 a 7) =	3.1702	ns	
Médias (6 a 8) =	1.6709	ns	
Médias (7 a 8) =	1.4993	ns	

Fonte: O autor

Tabela A21 - Dados originais de conectividade (mm⁻³)

4 SEMANAS				8 SEMANAS			
Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2
3.19E+00	5.56E+01	2.88E+01	6.61E+01	1.52E+00	1.05E+01	2.75E+02	4.27E+00
3.84E+00	1.19E+02	1.19E+02	9.52E+01	9.20E+00	1.93E+02	3.62E+01	3.02E+01
1.73E+01	8.76E+00	1.24E+02	1.24E+02	1.38E+00	1.88E+02	3.53E+01	1.94E+02
3.48E+00	4.37E+01	9.75E+01	9.75E+01	1.67E+00	7.00E+01	1.38E+01	1.39E+02
6.45E+00	5.89E+01	4.74E+01	4.74E+01	3.40E+00	4.11E+01	3.43E+01	7.48E+01
2.89E+00	6.47E+01	9.12E+01	9.12E+01	6.52E-01	3.98E+01	1.14E+02	5.14E+01

Fonte: O autor

Tabela A22 - Dados da estatística descritiva de conectividade

	4 semanas				8 semanas			
	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2
Tamanho da amostra =	6	6	6	6	6	6	6	6
Mínimo	2.8900	8.7600	28.8000	47.4000	0.6520	10.5000	13.8000	4.2700
Máximo	17.3000	119.0000	124.0000	124.0000	9.2000	193.0000	275.0000	194.0000
Mediana	3.6600	57.2500	94.3500	93.2000	1.5950	55.5500	35.7500	63.1000
Média Aritmética	6.1917	58.4433	84.6500	86.9000	2.9703	90.4000	84.7667	82.2783
Variância	31.2513	1280.0697	1488.6310	713.8080	10.1383	6368.7080	9886.4267	5101.1856
Desvio Padrão	5.5903	35.7781	38.5828	26.7172	3.1841	79.8042	99.4305	71.4226
Erro Padrão	2.2822	14.6063	15.7514	10.9072	1.2999	32.5799	40.5923	29.1581

Fonte: O autor

Tabela A23 - Análise de normalidade dos valores de conectividade (teste de Lilliefors)

	4 semanas	8 semanas
--	-----------	-----------

	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2
Tamanho da amostra =	6	6	6	6	6	6	6	6
Desvio máximo =	0.3297	0.2639	0.2341	0.2306	0.3252	0.2675	0.3541	0.2084
Valor crítico (0.05) =	0.3190	0.3190	0.3190	0.3190	0.3190	0.3190	0.3190	0.3190
Valor crítico (0.01) =	0.3640	0.3640	0.3640	0.3640	0.3640	0.3640	0.3640	0.3640
p(valor)	< 0.05	ns	ns	ns	< 0.05	ns	< 0.05	ns

Fonte: O autor

Tabela A24 - Análise de variância Kruskal-Wallis complementada pelo teste de Dunn dos valores de conectividade.

	Resultados			
H =	26.4098			
Graus de liberdade =	7			
(p) Kruskal-Wallis =	0.0004			
R 1 =	55.0000			
R 2 =	163.5000			
R 3 =	197.5000			
R 4 =	207.0000			
R 5 =	30.0000			
R 6 =	182.0000			
R 7 =	162.0000			
R 8 =	179.0000			
R 1 (posto médio) =	9.1667			
R 2 (posto médio) =	27.2500			
R 3 (posto médio) =	32.9167			
R 4 (posto médio) =	34.5000			
R 5 (posto médio) =	5.0000			
R 6 (posto médio) =	30.3333			
R 7 (posto médio) =	27.0000			
R 8 (posto médio) =	29.8333			
Comparações (método de Dunn)	Dif. Postos	z calculado	z crítico	p
Postos médios 1 e 2	18.7500	2.3197	3.125	ns
Postos médios 1 e 3	23.4167	2.8971	3.125	ns
Postos médios 1 e 4	23.6667	2.9280	3.125	ns

Postos 1 e 5	médios	4.6667	0.5774	3.125	ns
Postos 1 e 6	médios	21.5000	2.6599	3.125	ns
Postos 1 e 7	médios	21.6667	2.6806	3.125	ns
Postos 1 e 8	médios	21.0000	2.5981	3.125	ns
Postos 2 e 3	médios	4.6667	0.5774	3.125	ns
Postos 2 e 4	médios	4.9167	0.6083	3.125	ns
Postos 2 e 5	médios	23.4167	2.8971	3.125	ns
Postos 2 e 6	médios	2.7500	0.3402	3.125	ns
Postos 2 e 7	médios	2.9167	0.3608	3.125	ns
Postos 2 e 8	médios	2.2500	0.2784	3.125	ns
Postos 3 e 4	médios	0.2500	0.0309	3.125	ns
Postos 3 e 5	médios	28.0833	3.4744	3.125	< 0.05
Postos 3 e 6	médios	1.9167	0.2371	3.125	ns
Postos 3 e 7	médios	1.7500	0.2165	3.125	ns
Postos 3 e 8	médios	2.4167	0.2990	3.125	ns
Postos 4 e 5	médios	28.3333	3.5053	3.125	< 0.05
Postos 4 e 6	médios	2.1667	0.2681	3.125	ns
Postos 4 e 7	médios	2.0000	0.2474	3.125	ns
Postos 4 e 8	médios	2.6667	0.3299	3.125	ns
Postos 5 e 6	médios	26.1667	3.2373	3.125	< 0.05
Postos 5 e 7	médios	26.3333	3.2579	3.125	< 0.05
Postos 5 e 8	médios	25.6667	3.1754	3.125	< 0.05
Postos 6 e 7	médios	0.1667	0.0206	3.125	ns
Postos 6 e 8	médios	0.5000	0.0619	3.125	ns
Postos 7 e 8	médios	0.6667	0.0825	3.125	ns

Fonte: O autor

Tabela A25 - Dados originais de SMI

4 SEMANAS				8 SEMANAS			
Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2
6.15E-01	2.49E+00	1.29E+00	2.80E+00	-9.08E-01	-7.85E-01	-8.51E-01	1.73E-01

8.39E-01	1.52E+00	2.55E+00	2.34E+00	-7.20E-01	-1.45E+00	-2.38E+00	-3.98E+00
-7.95E-01	2.21E+00	2.28E+00	2.28E+00	1.39E+00	6.04E-01	-2.34E+00	-4.25E-01
2.41E+00	2.41E+00	1.97E+00	1.97E+00	1.22E+00	-2.34E+00	-3.52E+00	-2.52E+00
8.18E-01	1.27E+00	1.73E+00	1.73E+00	2.53E+00	-8.67E-03	-3.09E+00	-1.06E+00
8.36E-01	2.40E+00	2.16E+00	2.16E+00	6.60E-01	2.03E+00	-1.45E+00	-1.98E+00

Fonte: O autor

Tabela A26 - Dados da estatística descritiva de SMI

	4 semanas				8 semanas			
	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2
Tamanho da amostra =	6	6	6	6	6	6	6	6
Mínimo	-0.7950	1.2700	1.2900	1.7300	-0.9080	-2.3400	-3.5200	-3.9800
Máximo	2.4100	2.4900	2.5500	2.8000	2.5300	2.0300	-0.8510	0.1730
Mediana	0.8270	2.3050	2.0650	2.2200	0.9400	-0.3968	-2.3600	-1.5200
Média Aritmética	0.7872	2.0500	1.9967	2.2133	0.6953	-0.3249	-2.2718	-1.6320
Variância	1.0345	0.2721	0.1969	0.1321	1.7398	2.4093	0.9876	2.2930
Desvio Padrão	1.0171	0.5217	0.4437	0.3634	1.3190	1.5522	0.9938	1.5143
Erro Padrão	0.4152	0.2130	0.1811	0.1484	0.5385	0.6337	0.4057	0.6182

Fonte: O autor

Tabela A27 - Análise de normalidade dos valores de volume ósseo (teste de Lilliefors)

	4 semanas				8 semanas			
	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2	Controle	Membrana	PBMT1	PBMT2
Tamanho da amostra =	6	6	6	6	6	6	6	6
Desvio máximo =	0.3130	0.2871	0.1436	0.1970	0.1917	0.1165	0.1940	0.1472
Valor crítico (0.05) =	0.3190	0.3190	0.3190	0.3190	0.3190	0.3190	0.3190	0.3190
Valor crítico (0.01) =	0.3640	0.3640	0.3640	0.3640	0.3640	0.3640	0.3640	0.3640
p(valor)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Fonte: O autor

Tabela A28 - Análise de variância (ANOVA dois critérios) complementado pelo teste de Tukey dos dados de SMI.

FONTES VARIAÇÃO	DE	GL	SQ	QM
Tratamentos		7	123.4686	17.638
Blocos		5	5.287	1.057
Erro		35	40.039	1.144

F (tratamentos) =	15.4185		
p (tratamentos) =	< 0.0001		
F (blocos) =	0.9243		
p (blocos) =	0.5218		
Médias (tratamentos):			
Média (Coluna 1) =	0.7872	Controle	4 semanas
Média (Coluna 2) =	2.0500	Membrana	
Média (Coluna 3) =	1.9967	PBMT1	
Média (Coluna 4) =	2.2133	PBMT2	
Média (Coluna 5) =	0.6953	Controle	8 semanas
Média (Coluna 6) =	-0.3249	Membrana	
Média (Coluna 7) =	-2.2718	PBMT1	
Média (Coluna 8) =	-1.6320	PBMT2	
Tukey	Q	(p)	
Médias (1 a 2) =	2.8921	ns	
Médias (1 a 3) =	2.7700	ns	
Médias (1 a 4) =	3.2662	ns	
Médias (1 a 5) =	0.2103	ns	
Médias (1 a 6) =	2.5469	ns	
Médias (1 a 7) =	7.0056	< 0.01	
Médias (1 a 8) =	5.5403	< 0.01	
Médias (2 a 3) =	0.1221	ns	
Médias (2 a 4) =	0.3741	ns	
Médias (2 a 5) =	3.1024	ns	
Médias (2 a 6) =	5.4390	< 0.05	
Médias (2 a 7) =	9.8977	< 0.01	
Médias (2 a 8) =	8.4324	< 0.01	
Médias (3 a 4) =	0.4962	ns	
Médias (3 a 5) =	2.9803	ns	
Médias (3 a 6) =	5.3169	< 0.05	
Médias (3 a 7) =	9.7756	< 0.01	
Médias (3 a 8) =	8.3103	< 0.01	
Médias (4 a 5) =	3.4765	ns	
Médias (4 a 6) =	5.8131	< 0.01	
Médias (4 a 7) =	10.2718	< 0.01	
Médias (4 a 8) =	8.8065	< 0.01	
Médias (5 a 6) =	2.3366	ns	
Médias (5 a 7) =	6.7953	< 0.01	
Médias (5 a 8) =	5.3300	< 0.05	
Médias (6 a 7) =	4.4587	ns	
Médias (6 a 8) =	2.9934	ns	
Médias (7 a 8) =	1.4653	ns	

Fonte: O autor

Tabela A29 – Dados originais da correlação de Spearman

VO/VT	Tb.N	Tb.Th	Tb.Sp	Conn.Dn	SMI
2.42E+01	1.10E+00	2.20E-01	2.70E-01	9.20E+00	-7.20E-01
8.03E+00	3.37E-01	2.38E-01	2.87E-01	1.38E+00	1.39E+00
1.46E+01	6.44E-01	2.27E-01	3.37E-01	1.67E+00	1.22E+00
8.84E+00	2.90E-01	3.05E-01	4.79E-01	3.40E+00	2.53E+00
1.33E+01	5.67E-01	2.34E-01	5.66E-01	6.52E-01	6.60E-01
1.94E+01	9.35E-01	2.08E-01	2.82E-01	1.05E+01	-9.08E-01
3.78E+01	2.50E+00	1.57E-01	3.54E-01	1.93E+02	-1.45E+00

2.33E+01	1.89E+00	1.29E-01	3.11E-01	1.88E+02	6.04E-01
3.71E+01	2.46E+00	1.51E-01	3.77E-01	7.00E+01	-2.34E+00
2.18E+01	1.05E+00	2.08E-01	1.98E-01	4.11E+01	-8.67E-03
8.88E+00	6.26E-01	1.42E-01	2.58E-01	3.98E+01	2.03E+00
3.75E+01	3.18E+00	1.18E-01	5.51E-01	2.75E+02	-7.85E-01
3.33E+01	1.99E+00	1.67E-01	3.31E-01	3.62E+01	-2.38E+00
3.49E+01	1.83E+00	1.91E-01	2.77E-01	3.53E+01	-2.34E+00
4.15E+01	1.84E+00	2.25E-01	2.16E-01	1.38E+01	-3.52E+00
5.43E+01	3.10E+00	1.75E-01	3.89E-01	3.43E+01	-3.09E+00
4.63E+01	3.00E+00	1.54E-01	3.48E-01	1.14E+02	-1.45E+00
1.50E+01	7.49E-01	2.00E-01	5.20E-01	4.27E+00	1.73E-01
4.62E+01	2.74E+00	1.69E-01	3.74E-01	3.02E+01	-3.98E+00
3.65E+01	2.66E+00	1.37E-01	6.98E-01	1.94E+02	-4.25E-01
4.43E+01	2.62E+00	1.69E-01	5.17E-01	1.39E+02	-2.52E+00
3.28E+01	1.91E+00	1.72E-01	4.20E-01	7.48E+01	-1.06E+00
3.74E+01	2.14E+00	1.75E-01	4.92E-01	5.14E+01	-1.98E+00

Fonte: O autor

Tabela A30 - Análise descritiva da correlação de Spearman

	VO/VT	Tb.N	Tb.Th	Tb.Sp	Conn.Dn	SMI
Tamanho da amostra =	48	48	48	48	48	48
Mínimo	0.4620	0.0731	0.0632	0.1980	0.6520	-3.9800
Máximo	54.3000	3.1800	0.3050	0.6980	275.0000	2.8000
Mediana	12.3500	0.9865	0.1465	0.4655	42.4000	0.8375
Média Aritmética	18.6798	1.2180	0.1516	0.4547	60.9832	0.4698
Variância	208.1914	0.7378	0.0031	0.0188	3928.8126	3.5557
Desvio Padrão	14.4288	0.8589	0.0554	0.1371	62.6802	1.8856
Erro Padrão	2.0826	0.1240	0.0080	0.0198	9.0471	0.2722
Variância (geom.) =	1.5475	1.3698	1.0644	1.0462	3.0053	1.1896
Desvio Padrão (geom.) =	2.7256	2.3425	1.4610	1.3805	4.9124	1.8819

Fonte: O autor

Tabela A31 – Análise de normalidade da correlação de Spearman (teste de Lilliefors)

	VO/VT	Tb.N	Tb.Th	Tb.Sp	Conn.Dn	SMI
Tamanho da amostra =	48	48	48	48	48	48
Desvio máximo =	0.2256	0.2442	0.0827	0.1020	0.1679	0.1534
Valor crítico (0.05) =	0.1279	0.1279	0.1279	0.1279	0.1279	0.1279
Valor crítico (0.01) =	0.1488	0.1488	0.1488	0.1488	0.1488	0.1488
p(valor)	< 0.01	< 0.01	ns	ns	< 0.01	< 0.01

Fonte: O autor

ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/FOUSP)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comissão de Ética no Uso de Animais
Tel. (11) 3091-7842
ceufa@usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo imagiológico e histológico da reparação de lesões críticas do osso em ratas com osteoporose submetidas à terapia de fotobiomodulação (PBMT)", registrada com o nº 003/2017, sob a responsabilidade de Cesar Angelo Lascaia, Thais Gimenez Miniello, Ana Clara Fagundes Pedroni, Maria Stella Moreira, Natácha Kalline de Oliveira, Natália Caroline Aguiar Tartaroti, Marcia Martins Marques, Giovanna Sarra, Giovanna Lopes, Pamela Kulicz Rolling Gonçalves e Fernando Amorim Mendonça Alves, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Odontologia da USP, em reunião de 13/03/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	13/03/2017 A 13/03/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico Wistar
Nº de animais	48
Peso/dade	250-300g / 6 semanas
Sexo	Feminino
Origem	Botário do ICB-USP

São Paulo, 14 de março de 2017.

Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez
Coordenador do CEUA-FOUSP