MARCIA MARIA ALTAVISTA ROMÃO

**Efeito da laserfototerapia na reparação de osso alveolar humano:
análise microtomográfica e histomorfométrica**

São Paulo
2014

MARCIA MARIA ALTAVISTA ROMÃO

**Efeito da laserfototerapia na reparação de osso alveolar humano:
análise microtomográfica e histomorfométrica**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Diagnóstico Bucal

Orientador: Prof. Dr. Cesar Ângelo Lascalea

São Paulo

2014

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 da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Romão, Marcia Maria Altavista.

Efeito da laserfototerapia na reparação de osso alveolar humano: análise microtomográfica e histomorfométrica / Marcia Maria Altavista Romão; orientador César Angelo Lascale. -- São Paulo, 2014.

80 p. : il. : fig.; tab.; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Diagnóstico Bucal. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Regeneração óssea. 2. Microtomografia - Odontologia. 3. Enxerto ósseo. 4. Implante dentário. 5. Fototerapia - Laser. I. Lascale, César Angelo. II. Título.

Romão Altavista MM. Efeito da laserfototerapia na reparação de osso alveolar humano: análise microtomográfica e histomorfométrica. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em: 06 de fevereiro 2015

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho à minha querida mãe **Rafaela**, eterna em meu coração, e ao meu amado pai **Claudio**. Sempre serei grata por tudo que me ensinaram e fizeram por mim.

Ao meu marido **Waldyr**, por ter estado sempre ao meu lado. Sua cumplicidade, durante anos, incluiu mais esta tarefa.

Aos **meus filhos, Mariana Guilherme e Caio** que aprenderam e entenderam conviver com minha ausência, sempre que estou em busca de algum sonho. Amo amo, amo.....

A minha irmã **Olga**, minha irmã **Carla**, meus irmãos **Claudio e Renato**, **genro Gabriel, sobrinhos, cunhados**. Obrigada por estarem sempre comigo...

Ao Prof. **Dr. Francisco Eugênio Loducca**, mestre querido, um dos grandes responsáveis pela minha carreira acadêmica. Meu pai cirúrgico.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **César Ângelo Lascala**, por ter me concedido a oportunidade da realização deste trabalho, aceitando ser meu orientador.

À Prof.^a Dra. **Márcia Martins Marques**, pessoa fundamental para a concretização desse trabalho.

À Prof.^a Dra. **Maria Stella Moreira**, pela colaboração em relação às análises de histomorfometria. Sempre muito atenciosa.

À **Maria Aparecida Pinto**, secretária da disciplina de radiologia, por todo carinho e dedicação que teve comigo. Fez dias impossíveis tornarem-se possíveis para mim. Jamais esquecerei...

Ao Dr. **Arthur Rodriguez Gonzalez Cortes**, amigo de pós-graduação pelo seu desprendimento em ajudar-me sempre.

Ao amigo Prof. Dr. **Marcos Barbosa Salles**, pelo apoio durante a realização deste trabalho. Valeu!

Ao amigo Prof. Dr. **Marcelo Mendes Pinto**, pela disponibilidade em ajudar-me sempre.

À Prof.^a Dra **Anna Carolina Ratto Tempestine Horliana**, pela sua disponibilidade e amizade.

À Dra. **Simone Gomes Ferreira**, do Departamento de Genética e Biologia do Instituto de Biociências da USP, técnica responsável pelo micro CT. Sempre disposta, chegando muitas vezes antes do seu horário para ajudar-me.

Aos colegas do curso de pós-graduação, pela convivência agradável...

A amiga **Marina Gazzano Baladi**, pelo seu empenho em colaborar e convivência feliz durante a pós-graduação.

Aos professores do departamento de Radiologia, em especial à professora **Emiko Saito Arita**, sempre muito carinhosa e atenciosa comigo.

À minha aluna de graduação **Rita Donato** pela ajuda na realização deste trabalho especialmente na parte experimental. Obrigada menina.

As minhas colaboradoras **Ana, Denize e Neide**, vocês também fazem parte disso.

A todos os pacientes que participaram deste estudo.

À **Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo**, como instituição proponente na realização deste trabalho

À **Universidade Nove de Julho**, da qual tenha a honra de fazer parte, onde obtive apoio para a realização da pesquisa.

Lapsos podem nos tornar injustos. Se por ventura isso ocorreu, peço desculpas a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

"Nada lhe posso dar que já não exista em você mesmo. Não posso abrir-lhe outro mundo de imagens, além daquele que há em sua alma. Nada lhe posso dar a não ser a oportunidade, o impulso, a chave. Eu o ajudarei a tornar visível o seu próprio mundo, e isso é tudo."

Hermann Hesse

RESUMO

Romão Altavista MM Efeito da laserfototerapia na reparação de osso alveolar humano: análise microtomográfica e histomorfométrica. [Tese] São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida

A instalação imediata de implante dental na região de molares é crítica, devido a grande perda óssea e da discrepância entre a espessura da crista alveolar e a plataforma do implante. Laserfototerapia (LFT) auxilia na reparação óssea, portanto pode acelerar a instalação do implante. Vinte pacientes foram selecionados para o estudo. Dez pacientes foram submetidos à LFT com laser de diodo de GaAlAs (808nm) no transcirúrgico de exodontia de molares, imediatamente após, e em 24h, 48h, 72h, 96h, 7 e 15 dias. As irradiações foram aplicadas no modo contínuo, em contato e pontual (100mW, 0,04cm², 075,0J/cm², 30s por ponto, 3J por ponto, em 5 pontos). O grupo controle (n=10) recebeu o mesmo tratamento, no entanto, o equipamento estava desligado. Quarenta dias depois, espécimes do tecido formado no interior dos alvéolos foram coletados para posterior análise por microtomografia (microCT) e histomorfometria. Dados de ambos os grupos foram comparados pelo test t de Student, enquanto aqueles das diferentes avaliações microtomográficas foram comparados pelo teste de correlação de Pearson ($p<0.05$). O volume relativo do osso, bem como a área relativa do osso foram significativamente maiores ($p<0.001$) no grupo laser do que no controle. No grupo controle houve correlação negativa significativa entre número e espessura de trabéculas, e entre número e separação entre trabéculas ($p<0.01$); entre espessura e separação das trabéculas a correlação foi positiva ($p<0.01$). O grupo laser mostrou correlação negativa significativa entre número e espessura de trabéculas ($p<0.01$). A Laserfototerapia acelerou o reparo ósseo. Baseado na correlação de Pearson foi possível inferir que o grupo laser apresentou uma distribuição trabecular mais homogênea, com trabéculas menos espessas e mais numerosas, o que pode propiciar a redução do tempo para a instalação do implante.

Palavras-chaves: Microtomografia. Bioestimulação. Laser. Enxerto-laser. Regeneração óssea. Implante imediato.

ABSTRACT

Romão Altavista MM. Effect of laserphototherapy on human alveolar bone repair: microtomographic and histomorphometrical analysis. [Thesis] São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia 2014. Versão Corrigida.

The immediate dental implant placement in the molars region is critical, because of the high amount of bone loss and the discrepancy between the alveolar crest thickness and the dental implant platform. Laserphototherapy (LPT) improves bone repair thus could accelerate the implant placement. Twenty patients were selected for the study. Ten patients were submitted to LPT with GaAlAs diode laser (808nm) during molar extraction, immediately after, 24h, 48h, 72h, 96h, 7 and 15 days. The irradiations were applied in continuous wave, in contact and punctual mode (100mW, 0.04cm^2 , 0.075J/cm^2 , 30s per point, 3J per point, in 5 points). The control group (n=10) received the same treatment; however with the power of the laser off. Forty days later samples of the tissue formed inside the sockets were obtained for further microtomography (microCT) and histomorphometry analyses. Data of both groups were compared by the Student t test, whereas those from the different microCT parameters were compared by the Pearson correlation test ($p<0.05$). The relative bone volume, as well as the relative area were significantly higher ($p<0.001$) in the lased than the control group. In the control group there were negative correlations between number and thickness, and between number and separation of trabecula ($p<0.01$); between thickness and separation of trabecula the correlation was positive ($p<0.01$). The laser group showed significant negative correlation between the number and the thickness of trabecula ($p<0.01$). Laserphototherapy accelerated bone repair. By the Pearson correlation test it was possible to infer that the lased group presented a more homogeneous trabecula configuration, with thin and numerous trabecula, which would facilitate the reduction of time for the installation of the implant.

Keywords: Microtomography. Bioestimulation. – Laser. Bone graft. Regeneration, Immediate implant.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 4.1 - Radiografias periapicais A dente 46 com lesão de furca e periapical, B dente comprometido por lesão de cárie	36
Figura 4.2 - Fotografia da representação da aplicação na área vestibular do laser	38
Figura 4.3 - Fotografia do Microtomógrafo SKYSCAN 1176 HIGH RESOLUTION X-RAY MICROTOMOGRAPH <i>in vivo</i>	39
Figura 4.4 - Fotografia da amostra acondicionada dentro de um tubo em tubo Eppendorf	40
Figura 4.5 - Fotografia das amostras em berço de isopor no microtomógrafo.	40
Figura 4.6 - Imagem binária de uma das amostras do grupo laser	42
Figura 4.7 - Imagem de uma amostra em 3D do grupo laser	42
Figura 5.1 - Ilustração gráfica da quantidade relativa de osso (VO; volume ósseo) em função do volume do tecido total (VT; volume total). Barras indicam erro padrão da média. *Significativamente maior que o Controle ($p<0001$).....	45
Figura 5.2 - Fotomicrografias de cortes histológicos de espécimes do grupo Laser (A) e Controle(B)	49
Figura. 5.3- Ilustração gráfica da porcentagem de trabéculas ósseas nos cortes histológicos de espécimes dos grupos controle (não irradiado) e laser (irradiado). Barras indicam erro padrão da média. * Significativamente maior que o Controle ($p<0.001$)	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Parâmetros de escaneamentos.....	41
Tabela 5.1 - Dados obtidos das peças cirúrgicas analisadas por microCT.	44
Tabela 5.2 - Estatística descritiva dos dados de volume relativo de osso em relação ao volume total nas imagens de microCT.	45
Tabela 5.3 - Teste de Normalidade- Lilliefors (k amostras)	46
Tabela 5.4 - Resultado da análise estatística comparativa pelo Teste t de amostras independentes.....	46
Tabela 5.5 - Dados da análise comparativa de correlação de Pearson das amostras do grupo controle	47
Tabela 5.6 - Dados da análise comparativa de correlação de Pearson das amostras do grupo Laser	48
Tabela 5.7- Estatística descritiva dos dados de volume relativo de osso em relação ao volume total nos cortes histológicos.	50
Tabela 5.8 - Teste de Normalidade- Lilliefors (k amostras)	51
Tabela 5.9 - Dados da análise comparativa de correlação de Pearson das amostras do grupo controle	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	bidimensional
3D	tridimensional
ALP	fosfatase alcalina
BIC	contato osso implante
BMCs	células mesenquimais da medula óssea
BMPs	proteína óssea morfogenética
BSP	sialoproteína óssea
BV	volume ósseo
BV/TV	fração volumétrica óssea
CE	endrocondral
CTan	programa de análise óssea CTAnalyser®; SkyScan)
Cox2	ciclo-oxigenase2
DAS	dias após cirurgia
DE	densidade de energia
DO	distração odontogênica
E	energia
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
GaAlAs	Gálio Alumínio Arsênio
Gap	espaço
HeNe	Hélio e Neônio
HOB	osteoblastos humanos
IM	Intra membranosa
J	Jaule
J/cm ²	Jaule por centímetro quadrado
LFT	laserfototerapia
Micro CT	microtomografia computadorizada
μCT	microtomografia computadorizada
m/s	milímetros por segundo
OC	osteocalcina
OPG	osteoprotegerina

OPN	Glicoproteína secretada por osteoblasto
P	potência
RANK	receptor ativador nuclear kappa
RANKL	ligante do receptor ativador nuclear kappa
RT-PCR	transcriptase transversa
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro
ROI	região de interesse
Runx2	gene que ativa a diferenciação osteoblástica
TC	tomografia computadorizada
TGF- β 1	Transforming growth factor beta1-
TNF	Fator nuclear tumoral
TV	volume ósseo total
Tb.Sp	separação de trabéculas
Tb.N	número de trabéculas
Tb.Th	espessura de trabéculas
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

mW	miliwatts
mm	milímetros
%	por cento
®	marca registrada
μm	micrômetro
μm ³	micrômetro cúbico
μCTØ	micro tomografia computadorizada
Ø	diâmetro
p	probabilidade
<	menor
>	maior
≥	maior ou igual
nm	nanômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Tecido Ósseo	17
2.2 Laser	19
2.3 Laser em Culturas de Células - Estudo <i>In Vitro</i>	20
2.4 Laser <i>in vivos</i> e humanos	22
2.5 Laser e enxertos	27
2.6 Reparação Óssea Alveolar-Implantes Imediatos	30
2.7 Microtomografia Computadorizada: MicroCT	32
3 PROPOSIÇÃO	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Aspectos Éticos	35
4.2. Critério de Inclusão	35
4.3. Critério de Exclusão	36
4.4. Materiais Permanentes	37
4.5. Materiais de Consumo	38
4.6. Técnica Cirúrgica	38
4.7. Grupos Experimentais	39
4.8. Laserfototerapia (LFT)	39
4.9. Microtomografia (MicroCT)	40
4.10. Histomorfometria	43
4.11. Análise Estatística	44
5 RESULTADOS	45
5.1 Micro CT	45
5.2 Histologia	50
6 DISCUSSÃO	53
7 CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS	59
ANEXOS	70

1 INTRODUÇÃO

A instalação de implantes em alvéolos frescos, hoje uma realidade, apresenta limitações que podem afetar a osseointegração. Após a extração dental, os critérios clínicos para a adequada inserção de um implante, devem ser observados, como técnica exodôntica, estrutura alveolar, estruturas adjacentes, doença periodontal, lesões periapicais, tamanho do alvéolo e qualidade do osso receptor (Pessoa et al., 2010).

A região de molares é a que apresenta maiores problemas para instalação de implantes dentários imediatos, pois em virtude da discrepância alveolar com a plataforma do implante ocorrem espaços ósseos (*gap*), que mesmo preenchidos com enxertos, podem levar à perda do implante por invaginação de tecido, assim como a pouca altura determinada pela presença do canal mandibular ou do soalho do seio maxilar.

A presença de um grande *gap* propicia a formação de tecido conjuntivo entre a porção coronal do implante e o tecido ósseo circundante (Carlsson et al., 1988; Akimoto et al., 1999). Estudos são relatados na literatura, visando obter resultados ideais num menor intervalo de tempo, com a utilização de enxertos, membranas biológicas (Lazzarra, 1989) e técnicas cirúrgicas específicas, entretanto podem ocorrer processos infecciosos levando ao insucesso do tratamento (Penârrocha et al., 2002).

A laserfototerapia (LFT) é uma das modalidades de tratamento usada para a aceleração desse processo. Esta é objeto de estudo na reparação óssea devido à sua profunda penetração no tecido, atuando na proliferação celular de osteoblastos, na diferenciação celular e aumentando a formação de matriz óssea (Stein et al., 2005).

De acordo com a literatura a LFT acelera o processo de cicatrização, alterando o comportamento celular presentes nos processos reparativos, aumentando a formação vascular, a produção de colágeno, de fibroblastos e de tecido epitelial. A energia liberada nos tecidos produz estimulação e fatores que liberam substâncias, como a histamina, serotonina, bradicinina e ainda ativam a produção de ácido araquidônico, convertendo as prostaglandinas em prostaciclina.

Age aumentando a quantidade de ATP (adenosina trifosfato), acelerando a mitose e melhorando a reparação de tecidos (Rabelo et al., 2006; Bengtson et al., 2010).

Evidências mostram que os efeitos da LFT com laser de GaAlAs na reparação tecidual óssea podem causar a aceleração do processo. Muitos trabalhos foram realizados *in vitro*, em animais e em humanos com LFT para validar seus efeitos na reparação de tecido mole. No entanto, em relação à sua efetividade no tecido ósseo, a maioria dos trabalhos foi realizada *in vitro* ou em animais, com diferentes protocolos de aplicação (Stein et al., 2005; Weber et al., 2006).

Análises histomorfométricas são consideradas padrão ouro para avaliar trabéculas e a arquitetura óssea cortical, fornecendo informações exclusivas sobre a celularidade e índices dinâmicos de remodelação óssea, mas tem limitações no que diz respeito à avaliação da microarquitetura óssea. Seus parâmetros estruturais são derivados da análise estereológica em duas dimensões (2D). Já a microtomografia (microCT) realiza suas análises sob estruturas em três dimensões (3D). A microCT é uma forma miniaturizada de tomografia computadorizada capaz de oferecer dados quantitativos ao adquirir e reconstruir secções transversais virtuais de amostras teciduais. É um método com capacidade de abordagem com alto potencial de reprodução e de caráter não destrutivo (Postinov et al., 2003; Ibrahim et al., 2013). A avaliação do conteúdo mineral pode ser mapeada por meio de reconstrução dos cortes em microCT, mostrando alterações significativas na morfologia do osso (Meleo et al., 2012).

No sentido de obter dados clínicos da ação da LFT na reparação óssea, o esse estudo foi avaliado por meio de microCT e histomorfometria o efeito da LFT na reparação óssea em alvéolos frescos de humanos sem enxertos. Serão utilizados alvéolos, cuja anatomia apresente discrepância elevada (>3mm) entre a parede do alvéolo e a plataforma do implante, impedindo a instalação imediata do implante sem enxertos, o que justificaria a obtenção de fragmentos desse osso no momento da colocação do implante. Acreditamos que o LFT possa, numa reação coadjuvante aos procedimentos cirúrgicos, reduzir o tempo de instalação do implante. Neste sentido contribuiria para diminuição de custos e morbidade, agindo efetivamente na melhoria da qualidade do osso.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Este estudo envolve elementos distintos, sendo assim, este capítulo será didaticamente apresentado em forma de tópicos: tecido ósseo, características e aplicações do laser, microtomografia computadorizada. Os dados foram compilados na literatura disponível no período compreendido entre 1969 e 2014.

2.1 Tecido Ósseo

O osso alveolar é considerado um tecido conjuntivo especializado mineralizado, composto basicamente por 33% de matriz orgânica e 67% de cristais de hidroxiapatita. A matriz orgânica é constituída por colágeno (90% do tipo1), substâncias amorfas (proteoglicanos, glicosaminoglicanos) e células próprias (osteoblastos, osteoclastos e osteócitos).

Os osteoblastos são células derivadas dos pré-osteoblastos, que secretam proteínas colágenas e não colágenas, as proteoglicanas da matriz óssea, as metaloproteinases e citocinas. Estes são responsáveis pela formação do tecido ósseo, os quais sintetizam componentes da matriz orgânica, controlando a sua mineralização. Estão localizados na superfície óssea, onde promovem deposição da matriz podendo se diferenciar em dois tipos celulares: células ósseas de recobrimento e osteócitos.

As células ósseas de recobrimento são células alongadas e recobrem a superfície do tecido ósseo. Já os osteócitos são células possuem formato estrelado estando aprisionados dentro da matriz óssea mineralizada.

A formação do tecido ósseo tem sua origem na diferenciação de células mesenquimais (provenientes da medula óssea e de vasos sanguíneos), mediante estímulos de fatores de crescimento e proteínas morfogenéticas, diferenciando-se em células pré-osteoblásticas, que por sua vez, dão origem aos osteoblastos e osteócitos. Os osteoclastos, assim como os osteoblastos, também são originados a partir da diferenciação de células provenientes da medula óssea (Odgren et al., 2001).

Os osteócitos são verdadeiros mecanosensores que trabalham em conjunto, influenciando na remodelação do tecido ósseo, onde a perfusão dos fluidos dentro dos sistemas de canais pode influenciar na dinâmica da remodelação e neoformação do tecido ósseo (Lanyon, 1993). Embora a remodelação e neoformação óssea estejam ligadas diretamente aos osteoblastos e osteoclastos, a biologia molecular demonstrou a ocorrência de inúmeras alterações na atividade e em níveis de expressão de alguns genes dentro dos osteócitos, durante o processo de remodelação e reparação tecidual. O osso é o único tecido do corpo capaz de se regenerar, permitindo restituição após trauma. Em caso de ruptura ou de enxerto de osso, o osso neoformado, que se segue no processo de remodelação, é idêntico à do pré-existente. Este fenômeno, conhecido como processo de remodelação, permite a renovação óssea de 5-15% por ano sob condições normais. Esse processo é constituído por reabsorção de quantidade de osso pelos osteoclastos, igualmente a formação de matriz óssea pelos osteoblastos, com sua mineralização subsequente (Fernández et al., 2006).

A descoberta e caracterização do sistema RANK (receptor ativador nuclear kappa), RANKL (ligante do receptor ativador nuclear kappa) e OPG (Osteoprotegerina) tem mudado os conceitos relativos ao metabolismo ósseo. RANK é um receptor transmembrana do tipo 1 da família do TNF (fator de necrose tumoral) que está presente em células precursoras de osteoclastos, células dendríticas, fibroblastos e células T. É um peptídeo de 616 aminoácidos que quando ativado pelo RANKL sofre interação com receptores relacionados com o processo de maturação osteoclástica promove a maturação dos osteoclastos pelo aumento da expressão de genes específicos. (Khosla, 2001; Hofbauer, 2006; Andrade et al., 2008; Menezes et al., 2008). Já OPG é um receptor solúvel atuando como antagonista do RANKL (Khosla, 2001) produzido por numerosos tipos celulares, incluindo células imunes, osteoblásticas e endoteliais. É considerado um receptor inibitório para RANKL, pois bloqueia a interação RANK/RANKL, inibindo o estágio terminal de diferenciação osteoclástica e, assim resultando numa diminuição da reabsorção óssea (Hofbauer, 2006).

2.2 Laser

A palavra laser é um acrônimo de Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, ou seja, Amplificação de Luz por Emissão Estimulada de Radiação.

O laser é um equipamento que produz e emite radiação eletromagnética. A irradiação eletromagnética pode ser como um conjunto de ondas (elétricas e magnéticas) cuja velocidade no vácuo é aproximadamente $3 \times 10^8 \text{ m/s}$ (velocidade da luz). As várias formas de radiação, caracterizadas pelo seu comprimento de onda, compõem o espectro eletromagnético. Estudos para reconhecer os efeitos bioestimuladores do laser de baixa potência, assim como, sua influência na aceleração da reparação do tecido ósseo, têm sido relatados na literatura desde 1971 (Garcez et al., 2012). A laserfototerapia (LFT) tem sido sugerida para melhorar a cicatrização do tecido ósseo. Os mecanismos celulares e moleculares envolvidas neste efeito ainda não são claros, mas a proliferação celular e diferenciação do osso tem sido propostos (Saito; Shimizi, 1997; Ozawa et al., 1998; Fujihara et al., 2006; Fukuoka et al., 2011). A LFT acelera o processo de cicatrização, aumentando a formação vascular, a produção de colágeno, de fibroblastos e de histamina (Sawasaki et al., 2009), tecido epitelial tanto *in vivo* (Martins et al., 2012, Wagner et al., 2013), quanto *in vitro* (Pereira et al., 2002; Fujihara et al., 2006; Eduardo et al., 2008; Damante et al., 2009; Pellicoli et al., 2014).

A fototerapia é caracterizada pela sua capacidade de induzir processos fotobiológicos em células. A penetração da luz nos tecidos e o comprimento de onda específico de luz absorvida por fotoceptores são dois dos principais parâmetros a serem considerados na laserfototerapia. No tecido existe uma janela óptica entre 650 a 1200nm conhecido como espectro e também comprimento de onda (Huang et al., 2011).

2.3 Laser em Culturas de Células - Estudo *In Vitro*

Foi possível observar os efeitos da irradiação com laser de baixa potência GaAsAl (830 nm, 500 mW) em vários estágios de cultura de células, na proliferação celular, na formação de nódulos ósseos, na atividade de fosfatase alcalina, e na expressão gênica da osteocalcina. A irradiação com laser nas fases iniciais da cultura estimulou significativamente a proliferação celular inicialmente na atividade da fosfatase alcalina (ALP), e da osteocalcina (OC) numa fase posterior, sugerindo que o laser pode desempenhar dois papéis importantes, tais como, a estimulação da proliferação celular e a estimulação da diferenciação celular (Ozawa et al., 1998).

Quando células derivadas de osso alveolar humano (HOB) foram expostas ao laser de diodo GaAlAs com dosagens de 1,5 e 3J/cm², maior proliferação celular foi observada depois de 96h, quando comparadas com o grupo controle. A síntese de osteocalcina e produção de TGF- β 1 foram maiores sobre as amostras irradiadas com 3J/cm². No entanto, a atividade da fosfatase alcalina não diferiu significativamente entre os grupos. Estes resultados mostraram que, em resposta a LFT, as células cultivadas no material de implante de titânio tinham uma tendência para o aumento da ligação celular, proliferação, diferenciação e produção de TGF- β , indicando *in vitro* a capacidade modulatória da LFT na atividade de células e tecidos que rodeiam o material do implante (Khadra et al., 2005).

Outro estudo *in vitro* confirmou que LFT promove a proliferação e maturação dos osteoblastos humanos, irradiadas com laser (He-Ne), (632nm; 10mW). Foi possível constatar a aceleração da diferenciação e proliferação celular, sugerindo, portanto a capacidade efetiva de laser na reparação do osso, em seres humanos (Stein et al., 2005).

Ainda em osteoblastos humanos, irradiados com laser de diodo de 670 nm, potência de 400mw, puderam detectar ligeiro aumento nas células irradiadas com 1J/cm² em comparação com células de controle não tratadas. O aumento da dose de laser de 2J/cm² reduziu a viabilidade celular durante as primeiras 48 h, resultando em persistente baixa da atividade da fosfatase alcalina em comparação com os outros dois grupos. A expressão de osteopontina e colágeno tipo I e ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) diminuiu ao longo do tempo nos controles e nas

células irradiadas com $1\text{J}/\text{cm}^2$, aumentando quando comparado irradiadas com $2\text{J}/\text{cm}^2$ após 72h, sugerindo que a terapia laserfototerapia exerce um efeito bioestimulador sobre os osteoblastos humanos nas primeiras 72h. Mais estudos são necessários para determinar o potencial da laserfototerapia no conceito de tratamento em regeneração óssea (Stein et al., 2008).

In vitro, o efeito da LFT (GaAlAs, 808nm, $4\text{J}/\text{cm}^2$), sobre a proliferação celular óssea em osteoblastos e osteoclastos foi avaliado, por análise microscópica das culturas, bem como por análise quantitativa de RT-PCR de um painel de marcadores, após extração de ácido nucleico. Nestas condições, a proliferação de células mesenquimais, assim como os osteoblastos e osteoclastos foram semelhantes ao grupo controle (Bouvet Gerbettaz et al., 2009).

Ainda *in vitro*, a ação biomoduladora da LFT (GaAlAs, 780 nm), nas células osteoblásticas humanas expostas à $3\text{J}/\text{cm}^2$ DE, nos dias 3 e 7, não influenciou o crescimento da atividade da fosfatase alcalina (ALP) e formação de matriz mineralizada. Análises revelaram um espaço sem células em culturas tratadas com LFT, que foi repovoada com células proliferativas e menos diferenciadas. As expressões gênicas de ALP, OC, sialoproteína do osso (BSP), e BMP-7 também foram maiores em culturas tratadas, enquanto RUNX2, OPN, e osteoprotegerina (OPG) foram menores. Estes resultados indicam que a LFT modula as respostas de células de um modo complexo na diferenciação dos osteoblastos, a qual sugere possíveis benefícios sobre osseointegração, apesar de um efeito deletério transitório imediatamente após a irradiação com laser (Petri et al., 2010).

Nesse estudo, as células tronco mesenquimais da medula óssea (BMSC) foram induzidas a se diferenciarem em neurônios e em osteoblastos, na ausência e na presença da LFT. O Laser (GaAlAs, 810nm), foi aplicado nos dias 1, 3 e 5 durante a diferenciação, com densidades de energia de 3 e $6\text{J}/\text{cm}^2$ para as células induzidas a neurônios, e 2 e $4\text{J}/\text{cm}^2$ para as induzidas a osteoblastos. Houve significativa proliferação de BMSC em todas as densidades de energia, exceto para $6\text{J}/\text{cm}^2$, em comparação com grupos de controle. As densidades de energia de 3 e $6\text{J}/\text{cm}^2$ foram efetivas na diferenciação de BMSC em neurônios. Além disso, a atividade de ALP foi significativamente melhor às BMSCs irradiadas diferenciadas para osteoblastos. Portanto, o efeito de LFT na diferenciação e proliferação de BMSC é dose dependente (Soleimani et al., 2012).

Foi utilizado comprimento de onda infravermelho de 940nm em laserfototerapia *in vitro* sob osteoblastos, durante a proliferação e diferenciação celular. Quando examinados, sugeriram papel importante na estimulação de células osteoblásticas na formação óssea (Jawad et al., 2013)

2.4 Laser *in vivo* e em humanos

Visando acelerar a formação do osso Saito; Shimizu. (1997), estudaram os efeitos da LFT sobre a regeneração óssea em expansão de sutura palatina em ratos. Como conclusão a irradiação com laser de baixa potência, foi mais eficaz na regeneração óssea na fase inicial de expansão, sem registro de efetividade no período posterior e tampouco, na irradiação em dose única, sendo o efeito dose dependente, do tempo e da frequência de irradiação.

Cerqueira et al. (2007) avaliaram as características microscópicas do efeito do laser diodo (GaAlAs-830nm), aplicadas no período de ativação e consolidação de mandíbulas de ovelhas na distração osteogênica (DO). Os parâmetros foram doses de $4\text{J}/\text{cm}^2$ somando 16J por seção, em cinco seções/dias alternados. Os grupos irradiados com laser (GaAlAs) apresentaram maior disposição de trabéculas ósseas mineralizadas em relação ao grupo controle, contudo, no período de ativação foi observada a presença de tecido cartilaginoso, concluindo atuação favorável da LFT quando utilizado no período de consolidação, contrariando a maioria dos resultados.

Avaliando a ação da LFT sobre a porcentagem de osso neoformado também na DO em animais puderam observar maior porcentagem do osso formado no grupo laser (57,89%) do que no grupo controle, evidenciando que GaAlAs infravermelho (830nm, P=40mW) tem um efeito positivo sobre o osso (Kreisner et al., 2010).

Foi observado em um estudo clínico em crianças na expansão rápida de maxila, com laser GaAlAs, infravermelho, potência de 40 mW e densidade de energia de $10\text{J}/\text{cm}^2$, a partir da avaliação da densidade óssea por imagens digitalizadas, a atuação efetiva na abertura da sutura palatina, acelerando o processo de regeneração óssea (Cepera et al., 2012).

Outro estudo avaliando os efeitos da LFT sobre a regeneração óssea na sutura palatina, após a expansão rápida da maxila assistida cirurgicamente, em pacientes com laser de GaAlAs (P100mW, 830nm, Ø0,06cm²), encontrou maior taxa de mineralização no grupo irradiado em relação ao grupo controle (Angeletti et al., 2010).

Desta vez, outro estudo com DO, considerou os efeitos da LFT por meio de análises com microCT, radiografias simples e histomorfometria. Os parâmetros utilizados foram laser diodo GaAlAs, 808nm, 45J de energia. A neoformação óssea foi maior no grupo do laser nas fases iniciais, confirmado também pelas análises de microCT e radiografia simples. Mais estudos clínicos foram sugeridos, desta vez, com outros parâmetros (Kan et al., 2014).

Os resultados de Hübler et al. (2010) com laser de GaAlAs; 830 nm, 40 mW, 10J/cm² mostraram um efeito positivo na percentagem de tecido ósseo recém-formado, na relação da estrutura cristalina, de acordo com as proporções de Ca-e-P.

Os resultados obtidos por Yossef et al. (2008) mostram que o efeito bioestimulador (GaAlAs) diodo laser (809nm,100mW) com doses 1J/cm² e 2J/cm² na movimentação ortodôntica de caninos foi significativamente maior no grupo laser do que o controle, sugerindo que a laserfototerapia, pode acelerar o movimento do dente durante o tratamento ortodôntico, assim como reduzir a dor.

Kazem Shakouri et al. (2010), usando laser (GaAlAs), 780nm, densidade de energia de 4J/cm², 5 min/dia na consolidação de fraturas em coelhos, submetidos a osteotomia de tibia, demonstraram aumento da densidade mineral óssea no grupo laser em relação ao grupo de controle por meio de TC. Os resultados também demonstraram a efetividade do laser na fase inicial, com melhora duvidosa em propriedades biomecânicas.

Os efeitos da reparação com laserfototerapia em alvéolos após a extração do dente foi estudado *in vivo*, e o tecido ósseo analisado por imunohistoquímica, assim como a altura da crista alveolar constatando características diferentes das do processo de cicatrização normal, sugerindo um efeito de promoção da cicatrização óssea favorável com menor perda vertical (Fukuoka et al., 2011).

Baseados em estudos anteriores, sobre o efeito benéfico da LFT diodo GaAlAs, 980nm, na cicatrização do osso alveolar em ratos com doença sistêmica, buscaram investigar os efeitos do tempo de irradiação na cicatrização de alvéolos

pós-extração, avaliando as expressões de genes e proteínas relacionadas com a cicatrização óssea. Os primeiros molares superiores esquerdos e direitos foram extraídos. Após a extração foram irradiados por 0, 1, 2 ou 5 minutos todos os dias por 3 ou 7 dias. A LFT aumentou a expressão de todos os genes testados, Runx2, colágeno do tipo 1, osteocalcina, derivado de plaquetas B do fator de crescimento, e fator de crescimento endotelial vascular, dependente do tempo. Os maiores níveis de expressão dos genes estavam no grupo de 5 minutos após 7 dias. Cinco minutos de irradiação provocou aumentos importantes da expressão de todas as proteínas testadas, após ambos os 3 e 7 dias. O nível de cada uma das proteínas no grupo 4, a expressão foi mais elevada cerca de duas vezes em comparação com o grupo 1 ao fim de 7 dias. A irradiação com laser de 5 min apresentou altas expressões de genes e proteínas relacionadas com a cicatrização óssea (Park; Kang, 2012) concluindo que a laserfototerapia tem efeitos positivos sobre as fases iniciais de reparo ósseo de alvéolos de extração em ratos, relacionada com tempo de irradiação (Park et al., 2013).

Entretanto um estudo clínico, que avaliou o efeito da LFT no processo de cicatrização de feridas e dor, após extração de pré-molares com laser de diodo (GaAlAs) 830nm, $E=5,1J$, $60J/cm^2$ de densidade de energia, no pós imediato, em 48h e 72h pós cirúrgico, não evidenciou diferença estatisticamente significativa em nenhum momento no processo de cicatrização da ferida em ambos os grupos (Paschoal; Santos Pinto, 2012).

Nicolau et al. (2003), utilizando laser GaAlAs de 660nm, vermelho. $10J/cm^2$ com exposição no 2º, 4º, 6º e 8º dia após a cirurgia (DAS), constataram o aumento da atividade nas células ósseas ao redor do local da lesão, especialmente a atividade dos osteoclastos. No entanto, não observaram alterações na arquitetura óssea com índices estruturais normais. Sendo assim a terapia a laser utilizada no período inflamatório, no processo de reparação óssea, aumenta a atividade celular normal (reabsorção e formação).

Metodologia utilizando comprimento de onda muito semelhante, (GaAlAs) 670nm, 15 mW de potência, foi estudado no reparo ósseo em defeitos de fêmures de rato. O grupo teste recebeu irradiação com laser imediatamente após a lesão e foi seguido por tempo diferente em intervalos (24 48 e 72 h). O grupo controle, não recebeu irradiação do laser. Os animais foram sacrificados após 14 dias. Análise

histomorfométrica revelou uma neoformação maior nas áreas irradiadas, concluindo a eficácia do laser na reparação óssea, quando comparado com os resultados do grupo de controle (Merli et al., 2005).

Barbosa et al. (2013), avaliaram o processo de reparação óssea em ratos submetidos a terapia com laser de baixa potência por meio da densitometria óptica, com comprimentos de onda vermelho (660-690nm) e infravermelho (790-830nm). As análises foram realizadas após 7, 14 e 21 dias. A densidade óptica mostrou um aumento significativo do grau de mineralização (nível de cinza) em ambos os grupos tratados com o laser após 7 dias. Após 14 dias, apenas o grupo tratado com terapia de laser no infravermelho apresentou maior densidade óssea. Não foram observadas diferenças entre os grupos após 21 dias. Portanto os resultados sugerem que o efeito positivo da terapia com laser de baixa intensidade na reparação óssea é dependente do tempo e comprimento de onda, diferindo dos resultados onde foi verificado níveis comparáveis de reparação com diferentes comprimentos de onda (Spitler Berns et al., 2014).

Em um estudo guiado por placebo, cego, randomizado, os animais foram divididos aleatoriamente em grupo experimental e controle. O laser GaAlAs, e densidade de energia $23\text{J}/\text{cm}^2$ foi aplicado imediatamente após a cirurgia e durante 6 dias consecutivos. O grupo de controle recebeu a mesma manipulação e tratamento com o laser desligado. Amostras irradiadas continham significativamente mais cálcio, fósforo, e proteínas do que as do grupo controle. Da mesma forma, as análises histológicas divulgaram angiogênese mais acentuada e formação de tecido conjuntivo, com formação óssea mais avançada no grupo experimental (Khadra et al., 2004) concluindo que LFT pode aumentar a formação óssea na fase precoce da reparação (da Silva; Camilli, 2006).

A influência da laserfototerapia (LFT) (GaAlAs, 780nm, 40mW), no reparo ósseo no fêmur de ratas osteopênicas e normais, com implantes de titânio, foi constatada por análise histomorfométrica. A maioria dos grupos irradiados apresentou valores mais elevados do que os grupos não irradiados. O laser melhorou o processo de integração óssea no osso osteopênico e normal, particularmente com base nos seus efeitos na fase inicial da formação do osso (de Vasconcelos et al., 2014).

Durante o processo de movimentação ortodôntica, os autores avaliaram o efeito do laser diodo de 820nm e P=100mW, E-54J na proliferação celular osteoclástica, na atividade dos osteoblastos e na liberação de RANKL/ OPG, não encontrando diferenças entre os grupos controle e irradiados. Já o número de osteoclastos, osteoblastos, células inflamatórias, e a revascularização capilar, assim como a formação de osso, apresentaram aumento significativos. As reações imunohistoquímicas mostraram maior reatividade imunológica RANKL, enquanto na imunorreatividade da OPG, não foram encontradas diferenças entre os grupos (Altan et al., 2012). Entretanto as mudanças no osso alveolar durante a movimentação dentária foram avaliadas observando a densidade mineral com microtomografia sendo detectada a aceleração da velocidade de movimento do dente por estimulação da remodelação óssea alveolar (Youssef et al., 2008; Yoshida et al., 2009).

Analisando o efeito do LFT, DE=16J/cm² no papel da Cox-2 na reparação óssea por meio de análises morfológicas, morfométricas e imunohistoquímica verificaram diferenças significativas na qualidade e quantidade de osso formado entre os grupos após 14 dias. Da mesma forma, a imunoreatividade da Cox-2 foi mais intensa em células ósseas para períodos intermediários avaliados neste grupo, concluindo que a terapia com laser de baixa intensidade é capaz de melhorar o reparo ósseo após 14 dias de cirurgia, em decorrência de um aumento da regulação da Cox-2 em células ósseas (Matsumoto et al., 2009).

Os estudos de Tim et al. (2014) avaliando os efeitos da LFT, na formação óssea, por imunoexpressão de fatores osteogênicos e propriedades biomecânicas em defeito ósseo realizados em animais mostraram por análises histológicas e histomorfométricas, que o grupo tratado não apresentava infiltrado inflamatório, porém um tecido ósseo mais organizado em 15 e 30 dias após a cirurgia com evidências de neoformação óssea. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada na ciclo-oxigenase-2. O gene RUNX-2 foi estatisticamente maior em 45 dias. A imunoexpressão da proteína morfogenética do osso -9 (BMP-9), também foi maior em comparação com GC em 30 dias, não apresentando expressão em 45 dias pós-cirúrgico. Não foi observada diferença no ativador do receptor do fator nuclear kappa-B ligante entre os grupos em todos os períodos avaliados. indicando assim os resultados, que a terapia a laser melhora a cicatrização óssea, acelerando

o desenvolvimento do osso recém-formado e ativando os fatores osteogênicos, não interferindo nas propriedades biomecânicas.

Utilizando um laser de diodo (808 nm, 100mW, 54J) com aplicação contínua, pontual e em contato, verificaram o aumento da atividade osteoclástica, mas o mesmo não foi revelado quanto a atividade osteoblástica, durante as fases iniciais de movimentação. Além disso, a atividade osteoclástica era dependente da dose (Cossetin et al., 2013).

Propondo novo protocolo de terapia com LBI, Marques et al. (2014) compararam em animais, dosagens transcutâneas, iniciadas no transcirúrgico. A histomorfometria mostrou em 15 dias, maior formação óssea em relação ao grupo controle. Aos 7 dias, na parte central do defeito, a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) foi a mesma para todos os grupos. Já a osteocalcina (OC) foi maior no grupo teste, enquanto a osteopontina (OP) foi menor, sugerindo que o laser, diretamente no transoperatório acelera o processo de reparação do osso nas fases iniciais após cirurgia.

Nos estudos de Weber et al. (2006) a irradiação transoperatória com enxertos, também apresentou efetividade positiva.

Embora vários estudos, tenham demonstrado que LFT tem efeitos estimulantes sobre as células ósseas, acelerando o processo de reparação do osso, outros relataram consolidação retardada ou nenhum efeito.

Uma revisão da literatura com vinte e cinco artigos relevantes (13 *in vitro* e 12 estudos com animais) mostrou resultados positivos em onze dos estudos *in vitro* quanto à aceleração da proliferação e diferenciação celular. Todos os estudos em animais mostraram uma melhor cicatrização óssea nos sítios irradiados. Com isso, verificaram a efetividade da LFT na aceleração da cicatrização óssea em locais de extração, fraturas ósseas e distração osteogênica, com diferentes parâmetros (Ebrahimi et al., 2012).

2.5 Laser e Enxertos

Em pacientes com periodontite crônica com defeitos ósseos, empregando metodologia de boca dividida foi realizado enxerto com biovidro ativo, associado

com laserfototerapia (GaAlAs 830nm, com 40 mW, fluência de 4J/cm², densidade de energia de 16J/cm²), revelando após 3 meses, uma diferença estatisticamente significativa entre os locais de laser e grupo controle. No entanto, 6 meses após, nenhuma diferença foi observada, confirmando o efeito do laser na aceleração da cicatrização da ferida óssea periodontal nos estágios iniciais da reparação (AboElsaad et al., 2009).

Criando defeitos ósseos em ratos, AboElsaad et al.(2009) realizaram um estudo experimental em animais, semelhante ao estudo em humanos supra citado, confirmando os achados anteriores.

A LFT (GaAlAs 830nm), no reparo de defeitos de ratos, com enxerto de osso bovino liofilizado, irradiados com 16J/cm², também apresentou evidências histológicas de melhor deposição de fibras colágenas em estágios iniciais de cicatrização, e aumento da quantidade de trabéculas ósseas bem organizadas, no final do período experimental, constatando portanto efeito biomodulador positivo no processo de cicatrização de defeitos ósseos (Gerbi et al., 2005; Marquez Martinez et al., 2008).

O laser associado com as BMPs, substância de indução de osso, também revelou melhores resultados, mas por sua vez, quando usado isoladamente não apresentou diferença (Denadai et al., 2009).

Resultados semelhantes foram adquiridos quando estudado o efeito da laserfototerapia infravermelho na reparação óssea associada com agregado trióxido mineral (MTA) (Pinheiro et al., 2011).

Utilizando a LFT GaAlAs, 808nm, 30mW, 16J/cm², DE total de 64 J/cm² avaliaram o processo de cicatrização intramembranosa e endocondral em enxertos ósseos, concluindo que os efeitos biomoduladores não afetam os processos de cura ou de reabsorção do enxerto ósseo autógeno do CE e IM. (Biguett et al., 2012).

Para avaliar o efeito da LFT sobre enxertos de blocos congelados Valiati et al. (2012), retiraram tecido ósseo de coelhos, e processaram por ultracongelamento, enxertando na calvária de animais, distribuídos em experimental (L) controle (C). A terapia com laser diodo GaAlAs, 830 nm, 16J/cm² por sessão. A dose do tratamento após oito sessões foi de 128J/cm². Os animais foram sacrificados 35 e 70 dias do pós-operatório. Aloenxertos congelados seguido de LFT apresentaram incorporação na interface enxerto-hospedeiro, com remodelação óssea moderada, preenchimento

parcial das lacunas de osteócitos, infiltrado inflamatório menor no período pós-imediato, e deposição de colágeno maior que o grupo controle. A microscopia demonstrou que, o osso do enxerto processado, associado LFT é apropriado como uma alternativa para o tratamento de defeitos ósseos. As associações de células aspiradas da medula e laser demonstraram excelente resultado quando comparado com o grupo não irradiado assim como o grupo sem a associação de ambos (Nagata et al., 2013).

A LFT no volume ósseo (VO) e contato osso implante (BIC) de interface ao redor de implantes inseridos em xenoenxertos e enxertos ósseos autógenos, irradiados ou não, foi avaliada com resultados que sugeriram que seu efeito é eficaz para aumentar a formação óssea, com consequente aumento da interface osso-implante, em ambas às situações (Soares et al., 2014).

O efeito da laserfototerapia de (GaAlAs), 830 nm, 50mW e densidade de energia de $4\text{J}/\text{cm}^2$ em combinação com bisfosfonatos na estrutura óssea osteopênica, foi evidenciado com o aumento significativo do volume de osso trabecular, concluindo que, a terapia com laser associada ao tratamento com bisfosfonato, é o melhor método para reverter a osteopenia vertebral causada pela ovariectomia (Diniz et al., 2009).

A laserfototerapia mostrou efetividade inclusive em enxertos autógenos realizados em animais imunossuprimidos confirmada por análises histológicas. (Garcia et al., 2014).

Uma meta análise avaliou o efeito da terapia a laser na reparação de feridas concluiu que a terapia LFT é uma modalidade eficaz. Também demonstrou que o resultado varia de acordo com parâmetros; como potência, comprimento de onda, perfil do feixe, energia, densidade de energia, número e frequência de aplicações, assim como tempo. Densidade energética parece ser o único parâmetro de tratamento com efeitos de dose-dependentes previsíveis (Woodruff et al., 2004)

2.6 Reparação Óssea Alveolar Implantes Imediatos

A cronologia microscópica da reparação óssea alveolar em seres humanos pós exodontia, foi descrita como uma sequência de eventos iniciada pela formação do coágulo no primeiro dia, proliferação tecidual em nível gengival por volta do 4º dia, substituição do coágulo por tecido de granulação em 7 dias, sendo este substituído por tecido conjuntivo até 20 dias. A fusão epitelial até o espessamento da fibromucosa acontece entre 24 e 35 dias. Após 40 dias, 2/3 do alvéolo apresenta-se preenchido com trabéculas ósseas irregulares, imaturas, o que caracteriza tecido osteóide. Em 64 dias, é possível observar o alvéolo com trabeculado regular e fibras colágenas mais organizadas. Apesar da presença de tecido ósseo maduro, a maturação total do alvéolo acontece em até 6 meses (Amler, 1969).

A evolução da implantodontia apresentou avanços significativos em biomateriais e técnicas clínicas, refletindo na mudança de padrão de conduta das pessoas que buscam reabilitações por meio de implantes dentários.

Os implantes podem ser colocados em diferentes períodos após a extração do dente, conseqüentemente, terminologias são descritas como; colocação imediata (em alvéolos pós extração), colocação precoce com a cicatrização dos tecidos moles (após 4-8 semanas de extração), colocação precoce com cicatrização parcial óssea (após 12 a 16 semanas de extração), e colocação tardia (ao fim de 6 meses ou superior a 6 meses após a extração).

Tem sido proposto que a instalação de implante em alvéolos frescos tem muitas vantagens, sugerindo que este procedimento pode neutralizar a modelagem do tecido que ocorre após a remoção do dente, portanto, preservar as dimensões do rebordo, com benefício estético, menor número de sessões e períodos de tratamento mais curtos (Penãrocha et al., 2002; Vinnakota et al., 2014).

Estudos experimentais, entretanto relatam que a presença de um grande *gap*, espaço entre o implante e o osso ou tecido mole adjacente propicia a formação de tecido conjuntivo entre a porção coronal do implante e o tecido ósseo ao redor (Carlsson et al., 1988).

Em contrapartida, estudos em animais e humanos têm demonstrado que a presença de pequenos espaços, entre implante e osso, são geralmente preenchidos

por osso, com ou sem a utilização de enxertos ou barreiras biológicas (Botticelli et al., 2004).

Akimoto et al. (1999) estudaram a reparação óssea guiada em defeitos ósseos, evidenciando o efeito positivo nos *gaps*, espaço causado pela diferença de tamanho da plataforma do implante com a espessura alveolar, nos implantes imediatos. Os implantes colocados em alvéolos frescos, sem o uso de membranas ou outros materiais regenerativos, com uma lacuna osso-implante de 2 mm ou menos, não diferem no grau de osteointegração daqueles colocados em osso maduro. No entanto espaços maiores podem interferir negativamente na estabilidade deste implante assim como permitir a invaginação de tecido mole. Ainda em relação às discrepâncias de diâmetro, quando espaço alvéolo implante é maior que 5 mm, é aconselhável a realização de regeneração óssea e o cancelamento da instalação do implante, evitando que a maior parte da superfície do implante não tenha contato ósseo (Penãrrocha et al., 2002). A região dos molares e a que mais apresenta limitações, sendo difícil promover espaço osso-implante aceitável.

Embora o mecanismo de ação do laser não esteja totalmente esclarecido, estudos ressaltam sua efetividade como agente biomodulador e acelerador do processo de reparação, portanto sua ação pode ser bastante benéfica, proporcionando um tecido ósseo mais maduro (Paoloantonio et al., 2001).

Baseado na necessidade de um protocolo melhor definido, a fim de permitir comparações mais confiáveis foi avaliada a ação do laser GaAlAs 830nm (Gálio, Alumínio, Arsênio) na região peri implantar de coelhos, evidenciando que doses mais elevadas por sessão obtiveram valores de BIC (contato osso implante) alto no período de 45 dias após a colocação do implante. Doses menores também atribuíram resultados favoráveis, no entanto em menor escala (Gomes et al., 2014).

Entretanto quando estudaram o efeito do laser na estabilidade do implante por análise de frequência de ressonância, em humanos, os autores sugeriram a necessidade da obtenção de melhor compreensão das ocorrências na interface osso-implante (Garcia Morales et al., 2012).

2.7 Microtomografia Computadorizada: Micro CT

A quantificação dos parâmetros da arquitetura do osso trabecular pode ser avaliada por técnicas destrutivas, como a histomorfometria convencional, ou não destrutiva, como a ressonância magnética e a microtomografia por raios X

Inúmeras aplicações clínicas são relatadas na literatura sobre análises de tecido ósseo. A microCT3D é uma forma miniaturizada da TC, que emprega uma fonte pontual de Rx em um projeto de feixe cônico, fazendo imagens tridimensionais, de alta resolução espacial menores de 10 micron pixel, enquanto a TC apresenta tamanhos médios de pixel de 1mm. Micro CT é usado para medir inúmeras variáveis histomorfométrica incluindo volume ósseo (VO), volume total (VT), fração de volume ósseo (VO/VT), espessura trabecular ($Tb.Th$), número trabecular ($Tb.N$), e separação trabecular ($Tb.Sp$) (Odgaard, 1997).

Como nas análises histomorfométricas, permitem a correlação de VO/VT, no entanto, esse processo de avaliação não compromete e nem requer nenhuma preparação especial da amostra, sendo, portanto mais rápido. Para uma correta análise, as amostras não precisam ser alterados ou tratados de qualquer maneira, sendo uma técnica não invasiva e não destrutiva (Feldkamp et al., 1989; Muller et al 1998, Chappard et al., 2005; Meleo et al., 2012; Particelli et al., 2012).

A avaliação das propriedades do osso cortical tornou-se possível uma vez que a resolução espacial do sistema microCT foi melhorada. A microCT pode fornecer uma análise tridimensional (3D), com uma medição de parâmetros que descrevem quantitativamente a microestrutura do osso cortical (Basillais et al., 2007), sendo também adequada para avaliação do osso trabecular (Martín Badosa et al., 2003; Van Dessel et al., 2013).

Entretanto os estudos de Buie et al. (2007), relataram a discrepância das análises utilizando tomografia computadorizada de alta resolução microCT. As discrepâncias foram justificadas pelos autores, por erros sistemáticos, como segmentação qualitativamente incorreta pelo padrão ouro ou ainda pelo viés do operador durante o contorno.

A utilização de medições histomorfométricas tem mostrado resultados discordantes em comparação com os valores obtidos em 3D, acreditando que coeficiente de correlação não é suficiente para estudar o acordo entre as técnicas de

histomorfometria. Os descritores arquitetônicos são influenciados pelos algoritmos usados em 3D (Chappard et al., 2005). Entretanto é mostrada a correlação entre a densidade demográfica óssea e a densidade óssea avaliada por microCT, sugerindo que a tomografia computadorizada por feixe cônico pode avaliar densidade óssea e microestrutura (Monje et al., 2014).

Ressaltam ainda os estudos, a existência de vários sistemas de micro CT, com abordagens distintas para aquisição das imagens necessitando, portanto de terminologias padronizadas assim como relatórios consistentes dos parâmetros relacionados com aquisição e análise dessas imagens (Bouxsein et al., 2010). Porém estudos avaliando a possibilidade de microtomografia como ferramenta para analisar a osseointegração, em amostras do osso circundante em implantes após 3 meses, comparando os resultados com histomorfometria, constataram correlação significativa entre elas (Park et al., 2005).

3 PROPOSIÇÃO

Geral

O objetivo deste estudo foi o de avaliar o efeito da laserfototerapia na reparação do osso alveolar pós exodontia.

Específico

O objetivo deste estudo foi o de avaliar a morfologia do tecido formado no alvéolo dentário 40 dias após exodontia de molares humanos submetidos ou não à laserfototerapia iniciada no transcirúrgico por meio de microtomografia computadorizada e histomorfometria.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

Os critérios estabelecidos para análise deste estudo estão de acordo com as normas da resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e com o Código de Ética Profissional Odontológico, segundo resolução CFO 179/91. Antes que ocorresse a coleta de dados, esse projeto de pesquisa foi submetido à Plataforma Brasil e aprovado tanto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (Anexo B), quanto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Nove de Julho, instituição coparticipante (Anexo C).

Todos os pacientes envolvidos receberam um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) antes do início do estudo e obedeceram aos critérios de inclusão e exclusão (Anexo A). A seleção dos pacientes e os procedimentos cirúrgicos foram realizados na clínica da Faculdade de Odontologia da Universidade Nove de Julho. Todas as cirurgias foram realizadas pelo mesmo cirurgião.

4.2 Critérios de Inclusão

Foram incluídos no estudo pacientes saudáveis com idade entre 30 a 40 anos de idade, de ambos os gêneros, com pressão arterial sistólica ≤ 140 mmHg e diastólica ≤ 90 mmHg, com frequência cardíaca de 70 batimentos/minuto e temperatura corporal média entre 36-37°C, sem histórico de infecção local nos dentes com indicação de exodontia. Apresentavam primeiros ou segundos molares inferiores com inserção óssea igual ou maior de 11 mm com indicação de remoção cirúrgica por lesão de cárie ou doença periodontal ou fraturas radiculares. Foram considerados ainda os critérios clínicos para a adequada inserção de um implante osseointegrado após a extração dental, como a técnica exodôntica, altura óssea remanescente, número de paredes ósseas do alvéolo, estruturas anatômicas

adjacentes. As exodontias incluídas neste estudo foram simples, ou seja, os dentes extraídos por via alveolar sem a necessidade de odontosecção ou ostectomia e dispensaram o uso de antibioticoterapia profilática ou terapêutica.

4.3 Critérios de Exclusão

Foram excluídos, pacientes gestantes, lactantes, fumantes, e aqueles submetidos à radioterapia na região da cabeça e pescoço ou qualquer tipo de deficiência imunológica, qualquer tipo de infecção aguda (ex: abscesso periodontal), ou ainda doenças metabólicas como diabetes e osteoporose. Também foram excluídos os pacientes que durante a cirurgia apresentaram qualquer tipo de intercorrência e que tivessem que ser submetidos a ostectomias para acesso ao dente, pois nesse caso teríamos um trauma local mais exacerbado o que poderia influenciar na análise dos resultados. Não foram incluídos aqueles que apresentaram qualquer tipo de complicação transcirúrgica (ex: hemorragias, dificuldade operatória, tempo maior que 90 minutos de cirurgia). Isso ocorrendo, foi prescrito o antibiótico pós-operatório e o caso não foi considerado na amostra final do estudo, recebendo atendimento necessário, conforme suas necessidades. Foram excluídos os pacientes onde não foi observada a viabilidade da instalação dos implantes, pois não obedeciam aos parâmetros clínicos, de técnica exodôntica adequada, altura óssea remanescente, permanência das paredes do alvéolo, assim como ausência de supuração.

Os exames clínicos e as cirurgias foram realizados na clínica da Faculdade de Odontologia da Universidade Nove de Julho sempre pelo mesmo cirurgião.

Dos 236 pacientes avaliados, foram selecionados 20 pacientes de ambos os sexos, faixa etária entre 30 a 40 anos com indicação de exodontias dos dentes molares em região de mandíbula, para posterior instalação de implantes dentários que obedeceram os critérios escolhidos.

Todos os pacientes foram submetidos ao exame clínico e exames de imagem por radiografia panorâmica e periapicais. A indicação da exodontia foi por comprometimento periodontal, fraturas radiculares, indicações protéticas,

impossibilidade de tratamento endodôntico ou doença de cárie que impossibilitava sua reconstrução. Não foram selecionados dentes que apresentassem qualquer sinal de infecção aguda ou supuração. (Fig. 4.1)

Figura 4 1 - Radiografias periapicais pré operatórias – Duas das de 20 pacientes:
A - Dente 46 com lesão de furca e lesão periapical
B - Dente 46 com comprometimento por lesão de cárie

4.4 Materiais Permanentes

Instrumental cirúrgico: fórceps n. 17 para molares inferiores, elevadores tipo Seldin reto e curvos, elevador apicais reto, cabo de bisturí Bard Parker n. 03, cureta de Lucas n. 85, pinça anatômica de 14 cm, pinça Backaus de 13,5 cm, descolador de Molt, tesoura reta de Mayo, porta agulha Mayo Hegar de 17 cm, pinça Halstead mosquito curva, seringa carpule, cubas de inox redonda, ponta de aspirador metálico, micro motor com contra ângulo, uma broca cirúrgica de aço do tipo trefina (diâmetro interno de 4 mm, diâmetro externo de 4 mm) e campos cirúrgicos.

- Instrumental para exame clínico: jogo clínico, pinça clínica, espelho, sonda exploradora e curetas
- Infra-estrutura: Clínica da Universidade Nove de Julho

4.5 Materiais de Consumo

- Soro Fisiológico 0,9%, seringa hipodérmica de 20 ml, fio de sutura de Seda 4.0 Ethicon, lâmina de bisturi número 15C, gaze estéril, luva estéril, películas radiográficas, Periogard®.

4.6 Técnica Cirúrgica

Todos os pacientes foram submetidos às seguintes manobras cirúrgicas: antissepsia intra-oral e extra oral com Periogard® e colocação de campos cirúrgicos estéreis.

As exodontias foram realizadas no paciente sob efeito de anestesia local pela técnica de bloqueio pterigomandibular com Mepivacaina 2% com adrenalina 1.100.000. A técnica utilizada para a remoção dos dentes respeitou a técnica cirúrgica para exodontias simples preconizada por (Peterson et al., 2005). Após a remoção do dente, foi realizada a exérese do septo intrarradicular com osteótomo. Em seguida o alvéolo recebeu tratamento por meio de leve curetagem realizada com curetas de Lucas n.85 e irrigação com soro fisiológico estéril. O alvéolo tratado foi então mensurado quanto à profundidade com sonda milimetrada. Em seguida foi fechado com retalho mucoso recobrindo todo o alvéolo, buscando uma reparação por primeira intenção. O retalho foi realizado com lâmina 15C (Suzhou Kyauan Medical-China) por meio de duas incisões relaxantes mesial e distal ao alvéolo sobre o rebordo até fundo de sulco (incisão quadrangular) seguido por divulsão muco peristal realizado com descolador do tipo Molt.

A sutura foi realizada com fio Ethicon 4.0 de seda J&J, (São Paulo, Brasil) com aproximação total das bordas da ferida cirúrgica. Todos os pacientes tiveram seus alvéolos preenchidos apenas por coágulo, onde 10 foram irradiados (grupo laser) e 10 não (grupo controle).

4.7 Grupos Experimentais

De forma randômica os pacientes foram alocados em dois grupos experimentais, a saber:

Laser (n=10)- os pacientes foram submetidos à laserfototerapia conforme descrito abaixo.

Controle (n=10)- os pacientes receberam os mesmos procedimentos que os do grupo laser, porém com laser desligado.

4.8 Laserfototerapia (LFT)

A LFT foi realizada com laser de diodo de GaAlAs (808nm);(MMOptics tipo Twin Flex, São Paulo - Brasil) no modo contínuo. Os parâmetros utilizados foram como se segue: área do feixe de $0,04\text{ cm}^2$, potência de 100mW, densidade de energia de $075,0\text{J/cm}^2$ e energia de 3J. As irradiações foram pontuais e em contato. Cada alvéolo foi irradiado em 5 pontos [2 por vestibular (Figura 4.2), 2 por lingual e 1 por oclusal] durante 30 segundos por ponto, no transcirúrgico, pós imediato, 24h, 48h, 72h, 96h e 7 dias, quando foi realizada a remoção da sutura, e 15 dias.

Figura 4.2 - Fotografia da representação da aplicação vestibular da laserfototerapia

Após 40 dias as amostras do tecido formado no interior dos alvéolos de ambos os grupos foram colhidas utilizando uma broca cirúrgica de aço do tipo trefina (diâmetro interno de 3 mm, diâmetro externo de 4 mm). O local para a remoção do tecido ósseo foi padronizado estabelecendo o ponto médio do espaço edêntulo deixado pela exodontia. A altura das amostras foram padronizadas em 4 mm. As amostras colhidas foram imediatamente fixadas em solução de formalina a 10%. Em seguida os pacientes foram submetidos aos implantes dentários. O material colhido foi posteriormente submetido à análise microtomográfica e em seguida processados para análise histomorfométrica.

4.9 Microtomografia (microCT)

Para as aquisições das imagens no microtomógrafo (SKYSCAN 1176 HIGH RESOLUTION X-RAY MICROTOMOGRAPH *in vivo*, (Kontich, Bélgica); (Figura 4.3) amostras foram transferidas para um tubo tipo Eppendorf envolvidas em algodão embebido em formol a 10%, para que não sofressem desidratação (Figura 4.4). Os tubos foram fixados em um dispositivo de isopor (berço) para que se mantivessem estáveis no interior do aparelho (Figura 4.5), obedecendo aos parâmetros de escaneamento explicitados na Tabela 4.1.

Figura 4.3 - Fotografia do microtomógrafo SKYSCAN 1176 HIGH RESOLUTION X-RAY MICROTOMOGRAPH *in vivo*

Figura 4.4 - Fotografia de amostra acondicionada dentro de em tubo Eppendorf, envolta por algodão embebido em formol a 10%

Figura 4.5 - Fotografia de amostras em berço de isopor no microtomógrafo

Tabela 4.1 - Parâmetros utilizados para obtenção das microtomografias:

Parâmetros de escaneamento	SKY SCAN 1176
FILTRO- AL	0,2
RESOLUÇÃO	9 μ m
VOLTAGEM	40KV
AMPERAGEM	500 μ A
ANGULO ROTAÇÃO	360°
ROTATION STEP	0.30
FRAMES	3

Após o escaneamento as imagens foram reconstruídas. Estes procedimentos de escaneamento e reconstrução de imagens foram realizados por um técnico responsável para a manipulação do aparelho do Departamento de Genética e Biologia do Instituto de Biociências da USP. Os dados foram exportados para o software (CTAnalyser®;SkyScan), (Kontich, Bélgica) para a avaliação das microestruturas trabeculares e a partir da região de interesse (ROI) nas imagens binárias (Figura 4.6) foi fixado o threshold máximo de escala de cinzas em 255 e o mínimo definido em relação à densidade trabecular, baseados nas radiografias não binarizadas de cada amostra. Com o threshold estabelecido, o programa (Adaptative) analisou os dados morfométricos do osso, a saber: número, espessura e separação das trabéculas ósseas, assim como a relação do tecido ósseo com o volume total da amostra (VO/VT). Estes dados puderam também ser utilizados para obter imagens em 3D (Figura 4.7).

Figura 4.6 - Imagem binária de uma das amostras do grupo Laser

Figura 4.7 - Imagem de uma amostra em 3D do grupo Laser

4.10 Histomorfometria

Depois de obtidas as imagens por microCT, as amostras foram processadas para análise histológica. Brevemente, as amostras foram descalcificadas em ácido fórmico, e, a seguir, incluídas em parafina. Os blocos de parafina foram seccionados e os cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (HE) e analisados histomorfometricamente. Utilizando um programa de análise de imagens NIS (Nikon)

(Elements Advanced Reserch), foram avaliadas as áreas relativas ocupadas por trabéculas ósseas em função da área total do campo histológico de 100X (AO/AT).

4.11 Análise estatística

Os dados obtidos pela técnica de microCT, bem como os da análise histomorfométrica foram inicialmente analisados pelo teste de normalidade Lilliefors. Como os dados foram normais, a seguir foram comparados pelo teste t de Student. Os dados dos diferentes parâmetros da microCT foram submetidos à teste de correlação de Pearson. O nível de 5% ($p < 0,05$) foi adotado.

5 RESULTADOS

Os espécimes obtidos 40 dias após os procedimentos cirúrgicos em pacientes irradiados (grupo Laser) ou não (grupo Controle) foram analisados do ponto de vista radiológico por meio de microtomografia (microCT) e, a seguir, do ponto de vista morfológico, em cortes histológicos.

5.1 MicroCT

Os dados obtidos das microCTs das peças cirúrgicas estão apresentados na Tabela 5.1. A porcentagem relativa do volume ósseo (em porcentagem) em relação ao volume total dos espécimes no grupo irradiado foi significativamente maior que no grupo controle (Tabela 5.1 e Figura 5.1). Os demais parâmetros relacionados com a morfologia e a disposição das trabéculas ósseas nos espécimes mostraram resultados similares nos dois grupos experimentais.

Tabela 5.1 - Dados obtidos das peças cirúrgicas analisadas por microCT. (SkySkan 1176 *in vivo*)

Parâmetros	Controle	Laser	P
VO/VT (%)	67,54±1,50	88,55±2,14	<0,0001
Espessura das trabéculas (µm)	272,65±26,63	255,73±47,38	0,35
Número de trabéculas	3,64±0,41	4,23±0,57	0,20
Separação das trabéculas (µm)	96,00±12,49	82,09±9,72	0,17

VO-volume ósseo; VT-volume total

Figura 5.1 -Ilustração gráfica da quantidade relativa de osso (VO; volume ósseo) em função do volume do tecido total (VT: volume total). Barras indicam erro padrão da média. *Significativamente maior que o Controle ($p<0001$)

Os dados do volume relativo de osso formado em função do volume total dos espécimes foram submetidos inicialmente à análise estatística descritiva (Tabela 5.2), seguida por teste de normalidade (Tabela 5.3) e pelo fato, dos dados terem se mostrado normais foram comparados pelo Test t de Student (Tabela 5.4).

Tabela 5.2 - Estatística descritiva dos dados de volume relativo de osso em relação ao volume total nas imagens de microCT

	Controle	Laser
Tamanho da amostra	10	10
Mínimo	62.32	77.72
Máximo	77.17	98.90
Mediana	66.17	89.63
Média Aritmética	67.53	88.55
Variância	22.30	45.86
Desvio Padrão	4.72	6.77
Erro Padrão	1.49	2.14

Tabela 5.3 - Teste de Normalidade- Lilliefors (k amostras)

	Controle	Laser
Tamanho da amostra =	10	10
Desvio máximo =	0.24	0.13
Valor crítico (0.05) =	0.25	0.25
Valor crítico (0.01) =	0.29	0.29
p(valor)	Ns	Ns

Tabela 5.4 - Resultado da análise estatística comparativa pelo Teste t de amostras independentes

	Controle	Laser
Tamanho =	10	10
Média =	67.53	88.55
Variância =	22.30	45.86
	Homocedasticidade	---
Variância =	34.08	---
t =	-8.05	---
Graus de liberdade =	18	---
p (unilateral) =	< 0.0001	---
p (bilateral) =	< 0.0001	---
Poder (0.05)	1.00	---
Poder (0.01)	1.00	---
Diferença entre as médias =	-21.02	---
IC 95% (Dif. entre médias) =	-26.51 a - 15.54	
IC 99% (Dif. entre médias) =	-28.54 a - 13.51	---

Os parâmetros relacionados com a morfologia e disposição das trabéculas ósseas nos espécimes foram comparados entre si e com os dados de volume ósseo relativo por teste de correlação de Pearson. Foram comparados os dados obtidos de amostras relacionadas, ou seja, da mesma amostra analisada sob o ponto de vista

dos diversos parâmetros. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 5.5 e 5.6 para espécimes do grupo controle e grupo laser, respectivamente.

A correlação de Pearson para espécimes do grupo Controle mostrou não haver correlação linear entre os valores do volume relativo de osso formado em função do volume total (VO/VT) dos espécimes e os valores de todos os outros parâmetros analisados ($p > 0.05$). Todos os demais valores apresentaram correlações significativas entre si ($p < 0.0001$) (Tabela 5.5). A correlação entre espessura das trabéculas (μm) e número de trabéculas, bem entre número das trabéculas (μm) e separação das trabéculas (μm) foi negativa, enquanto que entre espessura de trabéculas e separação das trabéculas (μm) a correlação foi positiva.

Tabela 5.5 - Dados da análise comparativa de correlação de Pearson das amostras do grupo Controle

	Volume VO/VT versus Espessura das trabéculas (μm)	Volume VO/VT versus Número de trabéculas	Volume VO/VT versus Separação das trabéculas (μm)	Espessura das trabéculas (μm) versus Número de trabéculas	Espessura das trabéculas (μm) versus Separação das trabéculas (μm)	Número de trabéculas versus Separação das trabéculas (μm)
n (pares) =	10	10	10	10	10	10
r (Pearson) =	-0.22	0.40	-0.17	-0.89	0.90	-0.85
IC 95% =	-0.75 a 0.47	-0.30 a 0.83	-0.73 a 0.51	-0.98 a -0.62	0.64 a 0.98	-0.97 a -0.49
IC 99% =	-0.84 a 0.63	-0.49 a 0.89	-0.82 a 0.66	-0.98 a -0.45	0.48 a 0.99	-0.98 a -0.29
R ² =	0.0524	0.1666	0.0315	0.8074	0.8199	0.7317
t =	-0.6651	1.2647	-0.5099	-5.7917	6.0345	-4.6708
GL =	8	8	8	8	8	8
(p)=	0.5247	0.2415	0.6239	0.0004	0.0003	0.0016
Poder 0.05 =	0.1508	0.3091	0.1189	0.9871	0.9901	0.9582
Poder 0.01 =	0.0284	0.1170	0.0079	0.9394	0.9503	0.8531

A correlação de Pearson para espécimes do grupo Laser mostrou não haver correlação linear entre os valores de todos os parâmetros analisados, exceto para a comparação entre a espessura das trabéculas (μm) e separação das trabéculas, que apresentaram correlação negativa significativa ($p < 0.01$) (Tabela 5.6).

Tabela 5.6 - Dados da análise comparativa de correlação de Pearson das amostras do grupo Laser

	Volume VO/VT versus Espessura das trabéculas (μm)	Volume VO/VT versus Número de trabéculas	Volume VO/VT versus Separação das trabéculas (μm)	Espessura das trabéculas (μm) versus Número de trabéculas	Espessura das trabéculas (μm) versus Separação das trabéculas (μm)	Número de trabéculas versus Separação das trabéculas (μm)
n (pares) =	10	10	10	10	10	10
r (Pearson) =	-0.32	0.26	0.05	-0.83	-0.04	-0.19
IC 95% =	-0.79 a 0.39	-0.44 a 0.77	-0.60 a 0.66	-0.96 a -0.44	-0.66 a 0.60	-0.74 a 0.49
IC 99% =	-0.86 a 0.57	-0.61 a 0.85	-0.73 a 0.77	-0.98 a -0.23	-0.77 a 0.73	-0.83 a 0.65
R ² =	0.1038	0.0702	0.0026	0.7016	0.0023	0.0397
t =	0.9624	0.7774	0.1458	4.3372	0.1365	0.5750
GL =	8	8	8	8	8	8
(p)=	0.3640	0.4593	0.8877	0.0025	0.8948	0.5811
Poder 0.05 =	0.2230	0.1764	0.0580	0.9412	0.0567	0.1318
Poder 0.01 =	0.0686	0.0431	0.0510	0.8116	0.0529	0.0166

5.2 Histologia

Cortes histológicos de espécimes dos grupos Controle e Laser estão ilustrados na Figura 5.2. Foram comparadas as áreas relativas (em porcentagem) de osso formado (trabéculas ósseas) em função das áreas totais dos espécimes em um campo histológico de 100X. Foi observado que o grupo Laser apresentou área relativa de osso formado significativamente maior que a do grupo controle ($p < 0.001$, Figura 5.3).

Figura 5.2 - Fotomicrografias de cortes histológicos de espécimes dos grupos Laser (A) e Controle (B). Observe que no grupo Laser (A) as trabéculas são finas e bem distribuídas no campo histológico, enquanto no grupo Controle (B), na mesma área, somente uma trabécula espessa aparece de permeio a grande área desprovida de trabéculas (B) (Coloração HE; Aumento original 100X)

Figura 5.3 - Ilustração gráfica da porcentagem de trabéculas ósseas nos cortes histológicos de espécimes dos grupos controle (não irradiado) e laser (irradiado). Barras indicam erro padrão da média. * Significativamente maior que o Controle ($p < 0.001$)

Os dados da histomorfometria foram submetidos à análise estatística descritiva (Tabela 5.7), seguida por teste de normalidade (Tabela 5.8) e pelo fato dos dados terem se mostrado normais foram comparados pelo Test t de Student (Tabela 5.9)

Tabela 5.7 - Estatística descritiva dos dados de área relativa de osso em relação a área total analisada nos cortes histológicos dos grupos Controle e Laser

	Controle	Laser
Tamanho da amostra =	10	10
Mínimo	2.35	28.45
Máximo	43.85	80.49
Mediana	26.61	49.15
Média Aritmética	23.57	48.84
Variância	203.57	291.44
Desvio Padrão	14.26	17.07
Erro Padrão	4.51	5.39

Tabela 5.8 - Teste de Normalidade- Lilliefors (k amostras)

	- 1 - Controle Histo	- 3 - Laser Histo
Tamanho da amostra =	10	10
Desvio máximo =	0.1702	0.1498
Valor crítico (0.05) =	0.2580	0.2580
Valor crítico (0.01) =	0.2940	0.2940
p(valor)	ns	Ns

Tabela 5.9 - Dados da análise estatística pelo teste t de Student

	- 1 -Controle Histo	- 3 -Laser Histo
Tamanho =	10	10
Média =	23.5750	48.8445
Variância =	203.5740	291.4438
	Homocedasticidade	---
Variância =	247.5089	---
t =	-3.5916	---
Graus de liberdade =	18	---
p (unilateral) =	0.0010	---
p (bilateral) =	0.0021	---
Poder (0.05)	0.9742	---
Poder (0.01)	0.8965	---
Diferença entre as médias =	-25.2695	---
IC 95% (Dif. entre médias) =	-40.0516 a - 10.4874	
IC 99% (Dif. entre médias) =	-45.5184 a - 5.0206	---

6 DISCUSSÃO

A implantação precoce de implantes pode preservar a anatomia alveolar, portanto a colocação do implante em alvéolos frescos ajuda na manutenção da estrutura da crista óssea (Landsberg. 1995). Além disso, promove vantagens para o paciente como redução significativa do tempo de tratamento, de procedimentos cirúrgicos, custos e morbidade. As áreas mais comprometidas da cavidade bucal, que necessitam de exodontias, são as regiões dos molares, resultando em perdas ósseas importantes. Para agravar ainda mais esse problema, essas regiões apresentam áreas críticas para a instalação de implantes imediatos em função da sua pouca altura óssea vertical, assim como a espessura alveolar que acarreta grandes espaços (*gaps*) entre o implante e a superfície óssea (Botticelli et al., 2004), contraindicando a instalação imediata desses implantes (Penãrrocha et al., 2002). Para contornar esses problemas, várias modalidades de tratamentos tem sido propostas dando origem a vários estudos, principalmente em reparação tecidual óssea. As técnicas propostas são preenchimento por osso, biomateriais ou barreiras biológicas (regeneração óssea guiada), entretanto esses procedimentos clínicos podem levar a processos infecciosos e consequente falência do implante. Cabe ainda ressaltar a morbidade e a difícil aquisição de tecido para o recobrimento total do enxerto nesses procedimentos (Paolantonio et al., 2001; Botticelli et al., 2004). Mesmo aplicando estes procedimentos clínicos, muitas vezes fica impossível colocar o implante imediatamente, havendo a necessidade de se esperar meses para que a reparação óssea ocorra. Para evitar esta espera nos casos de grandes *gaps*, este trabalho propõe uma modalidade de tratamento coadjuvante, a laserfototerapia (LFT).

A LFT já vem sendo utilizada em reparação óssea em outras situações clínicas (Park; Kang, 2012; Park et al., 2013; Paschoal; Santos Pinto, 2012). Segundo estudos *in vitro* e em animais, a LFT acelera a reparação óssea ou seja, a aplicação da LFT imediatamente após a exodontia, poderia acelerar o processo de formação de osso no alvéolo fresco, podendo antecipar a colocação do implante. Portanto, com o objetivo de testar esta hipótese realizamos este estudo clínico onde a LFT foi aplicada em casos de alvéolos frescos com *gaps* que excedem 4mm. Quarenta dias após a exodontia, quando da colocação do implante, a estrutura do

tecido ósseo formado nos alvéolos irradiados foi comparada àquela de alvéolos não irradiados por meio de microtomografia (microCT) e histomorfometria.

A LFT com laser de GaAIs tem sido indicada como uma modalidade de tratamento para a aceleração da reparação óssea visando obter resultados adequados à colocação de implantes num menor intervalo de tempo. Os mecanismos celulares e moleculares envolvidos neste efeito ainda não foram totalmente esclarecidos, mas aumentos na taxa de proliferação celular (Fujihara et al., 2006), bem como diferenciação do osso tem sido propostos (Fukuoka et al., 2011). A LFT acelera o processo de cicatrização, aumentando a formação vascular, a produção de colágeno, de fibroblastos e de tecido epitelial tanto *in vivo* (Martins et al., 2012, Wagner et al., 2013), quanto *in vitro* (Pereira et al., 2002; Fujihara et al., 2006; Eduardo et al., 2008; Damante et al., 2009; Pellicoli et al., 2014). Acredita-se que energia liberada pela LFT produz estimulação levando à liberação de substâncias, como a histamina (Sawasaki et al., 2009), serotonina e bradicinina podendo ativar a produção de ácido araquidônico, convertendo as prostaglandinas em prostaciclina. Age ainda na formação de ATP, acelerando a mitose e melhorando a reparação de tecidos (Rabelo et al., 2006; Bengtson et al., 2010, Huang et al., 2011).

Essas evidências nos motivaram a acreditar que LFT em alvéolos, nos quais não existe a possibilidade de implante imediato pós exodontias, ou mesmo para evitar procedimentos arriscados e morbidade cirúrgica, poderia ser um procedimento coadjuvante à técnica cirúrgica na reparação tecidual óssea, acelerando o processo de regeneração, e reduzindo o tempo de instalação tardia. De acordo com o esperado, nossos resultados mostraram que o tecido formado nos alvéolos submetidos à LFT apresentou características de reparação mais adiantada, ou seja, foi observado um maior volume ósseo tanto na análise 2D quanto na 3D. A LFT com laser emitindo no comprimento de onda infravermelho foi utilizada no presente estudo com base em resultados que mostraram que a LFT nesse espectro apresenta um poder maior de penetração sobre o tecido ósseo, com resultados positivos nas fases precoces da reparação (Barbosa et al., 2010; Kreisner et al., 2010; Kazem et al., 2010; Pinheiro et al., 2011).

A maioria dos autores concorda que o laser, apresenta resultados mais efetivos nas fases iniciais da reparação, quando da avaliação das expressões de

genes e proteínas relacionadas com a cicatrização óssea (Park et al., 2013, de Vasconcelos et al., 2013). Resultados que apoiam essa teoria foram obtidos também nos estudos *in vivo* (Saito; Shimizu, 1997; Angeletti et al., 2010; Park; Kang, 2012), assim como nos estudos que associaram enxertos autógenos, xenógenos ou biomateriais com LFT (AboElsaad et al., 2009; AboElsaad et al., 2010; Soares et al., 2014). Corroborando com estes achados Matsumoto et al. (2009) também mostraram que a qualidade e quantidade de osso formado, após LFT foram melhores nas fases iniciais (Matsumoto et al., 2009). Adicionalmente, Tim et al. (2014) analisando a imunoexpressão da BMP-9 na reparação óssea pós LFT foi positiva em 30 dias e negativa aos 45 dias do pós-cirúrgico. Estes dados determinaram o tempo de análise do tecido formado no interior de alvéolos pós exodontia na presente investigação em 40 dias.

Além da escolha do comprimento de onda infravermelho, a decisão dos demais protocolos da LFT se baseou na literatura. De fato, os autores são unânimes, com protocolos muito semelhantes em relação aos intervalos de irradiação, adotando irradiação transcutânea pós-cirúrgica. É relatado na literatura intervalos que variam imediatamente após, 24h, 48h, 72h, 96h, até 21 dias. No protocolo com irradiação no transoperatório autores notaram aceleração da reparação óssea na fase inflamatória (Marques et al., 2014), encontrando angiogênese mais acentuada (Khadra et al.; 2004; Weber et al., 2006; Valiati et al., 2012), o que fundamentou nossos intervalos de irradiação.

Estudos para avaliar a efetividade da LFT na reparação tecidual óssea baseiam-se nas análises histomorfométricas, consideradas padrão ouro para avaliar trabéculas e arquitetura óssea cortical, assim como a relação de volume de osso formado e volume total do tecido (VO/VT) fornecendo informações exclusivas sobre a celularidade e índices dinâmicos de remodelação óssea (Postinov et al., 2003).

Adicionalmente, a microCT também é aceita como uma modalidade padrão ouro na avaliação microestrutura trabecular. A avaliação do conteúdo mineral pode ser mapeada por meio de reconstrução dos cortes em microCT, mostrando alterações significativas na morfologia do osso (Meleo et al., 2012). Como nas análises histomorfométricas, a microCT também permite a mensuração da VO/VT, e, pelo fato de seu processo de avaliação não requerer nenhuma preparação especial da amostra, essa mensuração pode ser mais rápida (Feldkamp et al., 1989;

Chappard et al.; 2005; Meleo et al., 2012; Particelli et al., 2012).

Utilizando das duas análises (e.g. microCT e histomorfometria) foi possível observar que o VO/VT dos espécimes irradiados foi significativamente maior que aquela do grupo controle. Este resultado está corroborado por trabalho recente da literatura (Park et al., 2013). Assim sendo, estes achados mostraram que a formação de tecido ósseo no interior dos alvéolos foi maior nos pacientes que receberam irradiação. Portanto, a LFT foi capaz de adiantar a reparação óssea e, assim poderia ter criado condições para a implantação precoce de implantes nos pacientes irradiados em relação aos não irradiados.

Apesar da VO/VT não ter apresentado correlação linear com as demais parâmetros analisados nas microCTs, tais como número, espessura e separação de trabéculas em ambos os grupos estudados, as correlações entre estes parâmetros forneceram dados interessantes para o entendimento do efeito da LFT sobre o tecido. O grupo controle mostrou correlação negativa significativa entre número e espessura, bem como entre número e separação entre trabéculas, enquanto que entre espessura e separação das trabéculas a correlação foi positiva. Por outro lado, o grupo submetido à LFT mostrou correlação negativa entre número e espessura das trabéculas. Assim sendo, para justificar um VO/VT maior para o grupo laser que para o grupo controle, deveria haver um número grande de trabéculas de pequena espessura no grupo laser, enquanto as trabéculas do grupo controle deveriam ser espessas, bem separadas e em número pequeno. De fato, os cortes histológicos do presente estudo mostraram esta disposição, que já havia sido observada em outros trabalhos na literatura (Gerbi et al., 2005; Marquez Martinez et al., 2008; Tim et al., 2014).

Assim sendo, havendo uma grande quantidade de pequenas trabéculas no alvéolo em 40 dias após a exodontia, já haveria condições teciduais apropriadas para favorecer uma osseointegração de implantes no alvéolo irradiado, enquanto que as grandes áreas desprovidas de trabéculas no grupo controle poderiam favorecer uma fibrose entre o implante e o osso, contraindicando a colocação de implantes neste momento. No entanto, estas considerações foram inferidas a partir de correlações entre os parâmetros analisados nas microCTs. De fato, não foi possível comprovar estatisticamente que o número de trabéculas ósseas foi maior no grupo laser em comparação ao grupo controle. Porém, isto pode ter sido devido à

amostra que foi de apenas 10 casos por grupo. Acreditamos que aumentando esta amostra poderemos verificar esta diferença. De qualquer forma, o volume do osso foi maior no laser, o que suporta a observação da maior velocidade da reparação que ocorreu no alvéolo submetido à LFT.

Em suma, o protocolo de LFT proposto e empregado no presente estudo mostrou resultados positivos na reparação do tecido ósseo formado no interior de alvéolos 40 dias após a exodontia de molares. Os achados histológicos e microtomográficos apontam para a formação de um tecido, que já aos 40 dias após a exodontia apresenta condições que propiciam a colocação de implantes dentários. Adicionalmente, o uso da LFT evitaria a necessidade de procedimentos clínicos adicionais no momento da exodontia, tais como a regeneração óssea guiada ou outros, prevenindo processos infecciosos, morbidade, bem como a difícil aquisição de tecido para o recobrimento total do enxerto nesses procedimentos. Vale ressaltar que foram colocados implantes nestes pacientes de ambos os grupos, o que justificou a remoção do tecido analisado. Assim sendo, o acompanhamento clínico destes pacientes poderá corroborar ou não as nossas inferências, bem como, o aumento da amostra poderá fornecer dados estatísticos confirmando a maior quantidade de trabéculas obtidas em resposta à LFT.

Sendo assim, acreditamos que a LFT pode ser uma terapia coadjuvante no processo de reparação óssea em alvéolos frescos, onde não existe a possibilidade imediata da instalação dos implantes ou que necessitem de enxertos.

7 CONCLUSÃO

A laserfototerapia nos parâmetros propostos e utilizados neste estudo foi capaz de acelerar a reparação óssea, no interior de alvéolos de molares, que foi preenchido por um tecido com maior volume relativo de osso em comparação ao dos alvéolos controle, 40 dias após a exodontia.

REFERÊNCIAS¹

- AboElsaad NS, Soory M, Gadalla LM, Ragab LI, Dunne S, Zalata KR, Louca C. Effect of soft laser and bioactive glass on bone regeneration in the treatment of infra-bony defects (a clinical study). *Lasers Med Sci.* 2009a May;24(3):387-95.
- AboElsaad NS, Soory M, Gadalla LM, Ragab LI, Dunne S, Zalata KR, Louca C. Effect of soft laser and bioactive glass on bone regeneration in the treatment of infra-bony defects (an experimental study). *Lasers Med Sci.* 2009a Jul;24(4):527-33.
- Altan BA, Sokucu O, Ozkut MM, Inan S. Metrical and histological investigation of the effects of low-level laser therapy on orthodontic tooth movement. *Lasers Med Sci.* 2012 Jan; 27(1):131-40.
- Amler MH. The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1969 Mar;27(3):309-18.
- Andrade F R.; et al. Expression of bone resorption regulators (RANK, RANKL, and OPG) in odontogenic tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Radiol Endod.* 2008 106(4): 548-55.
- Angeletti P, Pereira MD, Gomes HC, Hino CT, Ferreira LM. Effect of low-level laser therapy (GaAlAs) on bone regeneration in midpalatal anterior suture after surgically assisted rapid maxillary expansion. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010 Mar;109(3): 38-46.
- Akimoto K, Becker W, Donath K, Becker BE, Sanchez R. Formation of bone around titanium implants placed into zero wall defects: pilot project using reinforced e-PTFE membrane and autogenous bone grafts. *Clin Implant Dent Relat Res* 1999;(1):98-104.
- Barbosa D, de Souza RA, Xavier M, da Silva FF, Arisawa EA, Villaverde AG. Effects of low-level laser therapy (LLLT) on bone repair in rats: optical densitometry analysis. *Lasers Med Sci.* 2013 Feb;28(2):651-6.

*De acordo com Estilo Vancouver.

Basillais A, Bensamoun S, Chappard C, et al. Three-dimensional characterization of cortical bone microstructure by microcomputed tomography: validation with ultrasonic and microscopic measurements. *J Orthop Sci.* 2007 Mar;12(2):141-8. Epub 2007 Mar 30.

Bengtson AL, Bengtson NG, Bengtson CR, Mendes FM, Pinheiro SR. Histological and radiographic evaluation of the muscle tissue of rats after implantation of bone morphogenetic protein (rhBMP-2) in a scaffold of inorganic bone and after stimulation with low-power laser light. *Indian J Dent Res.* 2010 Jul-Sep;21(3):420-4.

Bigueti CC, Filho EJ, de Andrade Holgado L, Caviquiolli G, Moreschi E, Matsumoto MA. Effect of low level laser therapy on intramembranous and endochondral autogenous bone grafts healing. *Microsc Res Tech.* 2012 Sep;75(9): 1237-44.

Botticelli D, Berglundh T, Lindhe J. Hard tissue alterations following immediate implant placement in extraction sites. *J Clin Periodontol.* 2004 Oct; 31(10): 820-8.

Bouvet-Gerbettaz S, Merigo E, Rocca JP, Carle GF, Rochet N. Effects of low-level laser therapy on proliferation and differentiation of murine bone marrow cells into osteoblasts and osteoclasts. *Lasers Surg Med.* 2009 Apr;41(4):291-7.

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 Jul;25(7):1468-86.

Buie HR, Campbell GM, Klinck RJ, MacNeil JA, Boyd SK. Automatic segmentation of cortical and trabecular compartments based on a dual threshold technique for in vivo micro-CT bone analysis. *Bone.* 2007 Oct;41(4):505-15. Epub 2007 Jul 18.

Carlsson L, Rostlund T, Albrektsson B, et al. Implant fixation improved by close fit. Cylindrical implant-bone interface studied in rabbits. *Acta Orthop Scand* 59: 272-5,

Cepera F, Torres FC, Scanavini MA, Paranhos LR, Capelozza Filho L, Cardoso MA, Siqueira DC, Siqueira DF. Effect of a low-level laser on bone regeneration after rapid maxillary expansion. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2012 Apr;141(4):444-50.

Cerqueira A, Silveira RL, Oliveira MG, Sant'ana Filho M, Heitz C. Bone tissue microscopic findings related to the use of diode laser (830 nm) in ovine mandible submitted to distraction osteogenesis. *Acta Cir Bras.* 2007 Mar-Apr;22(2):92-7.

Chappard D, Retaillieu-Gaborit N, Legrand E, Baslé MF, Audran M. Comparison insight bone measurements by histomorphometry and microCT. *J Bone Miner Res.* 2005 Jul;20(7):1177-84.

Cossetin E, Janson G, de Carvalho MG, de Carvalho RA, Henriques JF, Garib D. Influence of low-level laser on bone remodeling during induced tooth movement in rats. *Angle Orthod.* 2013 Nov;83(6):1015-21.

Damante CA, De Michelli G, Myagi SP, Feist IS, Marques MM. Effect of laser phototherapy on the release of fibroblast growth factors by human gingival fibroblasts. *Laser Med Sci.* 2009 Nov;24(6):885-91

Da silva RV, CamilliJA. Repair of bone defects treated with autogenous bone graft and low-power laser. *J Craniofac Surg.* 2006 Mar, 17 (2):297–301

Denadai AS, de Carvalho Pde T, dos Reis FA, Belchior AC, Pereira DM, Dourado DM, Silva IS, de Oliveira LV. Morphometric and histological analysis of low-power laser influence on bone morphogenetic protein in bone defects repair. *Lasers Med Sci.* 2009 Sep;24(5):689-95.

de Vasconcellos LM, Barbara MA, Deco CP, Junqueira JC, do Prado RF, Anbinder AL, de Vasconcellos LG, Cairo CA, Carvalho YR. Healing of normal and osteopenic bone with titanium implant and low-level laser therapy (GaAlAs): a histomorphometric study in rats. *Lasers Med Sci.* 2014 Mar;29(2):575-80.

Diniz JS, Nicolau RA, de Melo Ocarino N, do Carmo Magalhães F, de Oliveira Pereira RD, Serakides R. Effect of low-power gallium-aluminum-arsenium laser therapy (830 nm) in combination with bisphosphonate treatment on osteopenic bone structure: an experimental animal study. *Lasers Med Sci.* 2009 May;24(3):347-52.

Ebrahimi T, Moslemi N, Rokn A, Heidari M, Nokhbatolfoghahale H, Fekrazad R. The influence of low intensity laser therapy on bone healing. *J Dental* 2012 Dec;9(4) 238-48.

Eduardo Fde P, Bueno DF, de Freitas PM, Marques MM, Passos-Bueno MR, Eduardo Cde P, Zatz M. Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: a preliminary study. *Lasers Surg Med.* 2008 Aug;40(6):433-8.

Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, Jenson G, Kleerekoper M. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res.* 1989 Feb; 4 (1): 3-11

Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil, Alobera-Gracia MA, del-Canto-Pingarrón M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006 Jan 1;11(1):E47-51.

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.)

Fukuoka H, Daigo Y, Enoki N, Taniguchi K, Sato H. Influence of carbon dioxide laser irradiation on the healing process of extraction sockets. *Acta Odontol Scand*. 2011 Jan;69(1):33-40.

Garcez, AS, Ribeiro MS, Nunez SC. *Laser de baixa potência: princípios básicos e aplicações clínicas na odontologia* Rio de Janeiro: Elsevier; 2012.

Garcia VG, Sahyon AS, Longo M, Fernandes LA, Gualberto Junior EC, Novaes VC, Ervolino E, de Almeida JM, Theodoro LH. Effect of LLLT on autogenous bone grafts in the repair of critical size defects in the calvaria of immunosuppressed rats. *J Craniomaxillofac Surg*. 2014 Feb 25.

García-Morales JM, Tortamano-Neto P, Todescan FF, de Andrade JC Jr, Marotti J, Zezell DM, Silva RV, Camilli JA. Stability of dental implants after irradiation with an 830-nm low-level laser: a double-blind randomized clinical study. *Lasers Med Sci*. 2012 Jul;27(4):703-11

Gomes FV, Mayer L, Massotti FP, Baraldi CE, Ponzoni D, Webber JB, Oliveira MG. Low-level laser therapy improves peri-implant bone formation: resonance frequency, electron microscopy, and stereology findings in a rabbit model. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014 Oct 2.

Gerbi ME, Pinheiro AL, Marzola C, Limeira Júnior Fde A, Ramalho LM, Ponzi EA, Soares AO, Carvalho LC, Lima HV, Gonçalves TO. Assessment of bone repair associated with the use of organic bovine bone and membrane irradiated at 830 nm. *Photomed Laser Surg*. 2005 Aug;23(4):382-8.

Hofbauer LC. Pathophysiology of ligand (RANKL) and osteoprotegerin OPG. *Ann Endocrinol* . 2006 Apr; 67(2): 139-41

Hübler R, Blando E, Gaião L, Kreisner PE, Post LK, Xavier CB, de Oliveira MG. Effects of low-level laser therapy on bone formed after distraction osteogenesis. *Lasers Med Sci*. 2010 Mar;25(2):213-9.

Huang YY, Sharma SK, Carroll J, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. *Dose Response*. 2011;9(4):602-18.

Ibrahim N, Parsa A, Hassan B, van der Stelt P, Wismeijer D. Diagnostic imaging of trabecular bone microstructure for oral implants: a literature review. *Dentomaxillofac Radiol*. 2013 42(3)

Jawad MM, Husein A, Azlina A, Alam MK, Hassan R, Shaari R. Effect of 940 nm low-level laser therapy on osteogenesis in vitro. 2013;42(3): J Biomed Opt. 2013 Dec;18(12).

Kan B, Tasar F, Korkusuz P, Ersoy O, et al. Histomorphometrical and radiological comparison of low-level laser therapy effects on distraction osteogenesis: experimental study. *Lasers Med Sci*. 2014 Jan;29(1):213-20.

Kazem Shakouri S, Soleimanpour J, Salekzamani Y, Oskuie MR. Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process. *Lasers Med Sci*. 2010 Jan;25(1):73-

Khadra M, Kasem N, Haanaes HR, Ellingsen JE, Lyngstadaas SP. Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004 Jun;97(6):693-70

Khadra M, Lyngstadaas SP, Haanaes HR, Mustafa K. Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. *Biomaterials*. 2005 Jun;26(17):3503-9.

Khosla S. Minireview: The OPG/RANKL/RANK System. *Endocrinol*, 2001 Dec; 142(12):5050-5.

Kreisner PE, Blaya DS, Gaião L, Maciel-Santos ME, Etges A, Santana-Filho M, de Oliveira MG. Histological evaluation of the effect of low-level laser on distraction osteogenesis in rabbit mandibles. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010 Jul 1;15(4): 8.

Landsberg CJ. Complete flap coverage in augmentation procedures around dental implants using the everted crestal flap. *Pract Periodontics Aesthet Dent* 1995;7(2):13-22

Lanyon LE. Osteocytes strain detection, bone modeling and remodeling *Calcified Tissue International*. 1993. 53: 5102-6.

Lazzarra RJ. Immediate implant placement into extraction sites: Surgical and restorative advantages. *Int J Periodont Rest Dent* 1989;9:333-43.

Marques L, Holgado LA, Francischone LA, Ximenez JP, Okamoto R, Kinoshita A. New LLLT protocol to speed up the bone healing process-histometric and immunohistochemical analysis in rat calvarial bone defect. *Lasers Med Sci*. 2014 Apr 23.

Márquez Matinez ME, Pinheiro AL, Ramalho LM. Effect of IR laser photobiomodulation on the repair of bone defects grafted with organic bovine bone. *Lasers Med Sci*. 2008 Jul;23(3):313-7. Epub 2007 Sep 20.

Martín-Badosa E, Amblard D, Nuzzo S, et al. Excised bone structures in mice: imaging at three-dimensional synchrotron radiation micro CT. *Radiology* 2003 Dec;229(3):921-8.

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

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

Meleo D, Bedini R, Pecci R, Mangione F, Pacifici L. Microtomographic and morphometric characterization of a bioceramic bone substitute in dental implantology. *Ann Ist Super Sanita*. 2012;48(1):59-64.

Merli LA, Santos MT, Genovese WJ, Faloppa F. Effect of low-intensity laser irradiation on the process of bone repair. *Photomed Laser Surg*. 2005 Apr;23(2):2125.

Menezes R.; et al. Differential Patterns of Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand/Osteoprotegerin Expression in Human Radicular Granulomas: Possible Association with Progressive or Stable Nature of the Lesions. *JOE*. 2008;34(8): 932-8.

Monje A, Monje F, González-García R, Galindo-Moreno P, Rodriguez-Salvanes F, Wang HL. Comparison between microcomputed tomography and cone-beam computed tomography radiologic bone to assess atrophic posterior maxilla density and microarchitecture. *Clin Oral Implants Res.* 2014 Jun;25(6):723-8.

Muller R, Van Campenhout H, Van Damme B, Van Der Perre G, et al. Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone*. 1998 Jul;23(1):59-66.

Nagata MJ, Santinoni CS, Pola NM, de Campos N, Messori MR, Bomfim SR, Ervolino E, Fucini SE, Faleiros PL, Garcia VG, Bosco AF. Bone marrow aspirate combined with low-level laser therapy: a new therapeutic approach to enhance bone healing. *J Photochem Photobiol B.* 2013 Apr 5;121:6-14.

Nicolau RA, Jorgetti V, Rigau J, Pacheco MT, dos reis LM, Zangaro RA. Effect of low power GaAlAs (660nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. *Lasers Med Sci.* 2003; 18(2): 89-94

Odgaard A. Three-dimensional methods for quantification of cancellous bone architecture. *Bone*. 1997 Apr;20(4):315-28.

Odgren PR, Kim N, van Wesenbeeck L, Mason Savas A, Safadi FF, Popoff SN, Lengner C, van Hul W, Chol Y, Marks SC Jr. Evidence that rat osteopetrotic mutation toothless (ti) is not in the TNFS11 (TRANCE, RANKL, ODF, OPGL). *Int J dev Biol.* 2001 Dec; 45(8) 853-9.

Ozawa Y, Shimizu N, Kariya G, Abiko Y. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *Bone* 1998 Apr;22(4):347-54.

Paolantonio M, Dolci M, Scarano A, d'Archivio D, di Placido G, Tumini V, Piatelli A. Immediate implantation in fresh sockets. A controlled clinical and histological study in man. *J Periodontol.* 2001 Nov;72(11):1560-71

Park JB, Ahn SJ, Kang YG, Kim EC, Heo JS, Kang KL. Effects of increased low-level diode laser irradiation time on extraction socket healing in rats. *Lasers Med Sci.* 2013 Aug 9.

Park JJ, Kang KL. Effect of 980-nm GaAlAs diode laser irradiation on healing of extraction sockets in streptozotocin-induced diabetic rats: a pilot study. *Lasers Med Sci.* 2012 Jan;27(1):223-30.

Park YS, Yi KY, Lee IS, Jung YC. Correlation between microtomography and histomorphometry for assessment of implant osseointegration. *Clin Oral Implants Res.* 2005 Apr;16(2):156-60.

Particelli F, Mecozzi L, Beraudi A, Montesi M, Baruffaldi F, Viceconti M. A comparison between micro-CT and histology for the evaluation of cortical bone: effect of polymethylmethacrylate embedding on structural parameters. *J Microsc.* 2012 Mar;245(3):302-10.

Paschoal MA, Santos-Pinto. Therapeutic effects of low-level laser therapy after premolar extraction in adolescents: a randomized double-blind clinical trial. *Photomed Laser Surg.* 2012 Sep;30(9):559-64.

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 Feb;19(2):

Penãrocha M, Uribe R, Balaguer J. Immediate implante after extraction. A review of current situation. *Med Oral.* 2002 May-Jul;9(3): 234-42

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.

Pessoa RS, Muraru L, Júnior EM, Vaz LG, Sloten JV, Duyck J, Jaecques SV. Influence of implant connection type on the biomechanical environment of immediately placed implants - CT-based nonlinear, three-dimensional finite element analysis. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2010 Sep;12(3):219-34.

Peterson LJ, Ellis E, Hupp JR, Tucker MR. *Cirurgia Oral Maxilofacial Contemporânea* 4ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.

Petri AD, Teixeira LN, Crippa GE, Beloti MM, de Oliveira PT, Rosa AL. Effects of low-level laser therapy on human osteoblastic cells grown on titanium. *Braz Dent J.* 2010;21(6):491-8.

Pinheiro AL, Soares LG, Aciole GT, Correia NA, Barbosa AF, Ramalho LM, Dos Santos. Light microscopic description of the effects of laser phototherapy on bonedefects grafted with mineral trioxide aggregate, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration in a rodent model. *J Biomed Mater Res A*. 2011 Aug;98(2):212-21.

Pellicoli 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 Feb;19(2):

Postinov AA, Vinogradov AV, Van Dyck D, Savelliev SV, De Clerck NM. Quantitative analysis of bone mineral content by x-ray microtomography. *Physiol Meas*. 2003 Feb;24 (1) 165-78

Rabelo SB, Villaverde AB, Nicolau R, Salgado MC, Melo Mda S, Pacheco MT. Comparison between wound healing in induced diabetic and nondiabetic rats after low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg*. 2006;Aug 24(4): 474-9

Saito S, Shimizu N. Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1997 May;111(5):525-32.

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.

Spitler R, Berns MW. Comparison of laser and diode sources for acceleration of in vitro wound healing by low-level light therapy. *J Biomed Opt*. 2014 Mar;19(3):38001

Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg*. 2005 Apr;23(2):161-6.

Stein E, Koehn J, Sutter W, Wendtlandt G, Wanschitz F, Thurnher D, Baghestanian M, Turhani D. Initial effects of low-level laser therapy on growth and differentiation of human osteoblast-like cells. *Wien Klin Wochenschr*. 2008;120(3-4):112-7.

Soares LG, Magalhães EB, Magalhães CA, Ferreira CF, Marques AM, Pinheiro AL. New bone formation around implants inserted on autologous and xenografts irradiated or not with IR laser light: a histomorphometric study in rabbits. *Braz Dent J*. 2014; (3):218-23.

Soleimani M, Abbasnia E, Fathi M, Sahraei H, Fathi Y, Kaka G. The effects of low-level laser irradiation on differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells into neurons and osteoblasts--an in vitro study. *Lasers Med Sci*. 2012 Mar;27(2):423-30.

Tim CR, Pinto KN, Rossi BR, Fernandes K, Matsumoto MA, Parizotto NA, Rennó AC. Low-level laser therapy enhances the expression of osteogenic factors during bone repair in rats. *Lasers Med Sci*. 2014 Jan;29(1):147-56.

Valiati R, Paes JV, de Moraes AN, Gava A, Agostini M, Masiero AV, de Oliveira MG, Pagnoncelli RM. Effect of low-level laser therapy on incorporation of block allografts. *Int J Med Sci*. 2012;9(10):853-61.

Van Dessel J, Huang Y, Depypere M, Rubira-Bullen I, Maes F, Jacobs R. A comparative evaluation of cone beam CT and micro-CT on trabecular bone structures in the human mandible. *J N Dentomaxillofac Radiol*. 2013;42(8).

Vinnakota DN, Akula SR, Krishna Reddy VV, Sankar VV. A staged approach of implant placement in immediate extraction sockets for preservation of peri-implant soft and hard tissue. *J Indian Soc Periodontol*. 2014 Mar;18(2):267-71.

Weber JB, Pinheiro AL, de Oliveira MG, Oliveira FA, Ramalho LM. Laser therapy improves healing of bone defects submitted to autologous bone graft. *Photomed Laser Surg*. 2006 Feb;24(1):38-44.

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):128002doi: 10.1117/1.JBO.18.12.128002.),

Woodruff LD, Bounkeo JM, Brannon WM, Dawes KS, Barham CD, Waddell DL, Enwemeka CS. The efficacy of laser therapy in wound repair: a meta-analysis of the literature. *Photomed Laser Surg*. 2004 Jun;22(3):241-7.

Yoshida T1, Yamaguchi M, Utsunomiya T, Kato M, Arai Y, Kaneda T, Yamamoto H, Kasai. Low-energy laser irradiation accelerates the velocity of tooth movement via stimulation of the alveolar bone remodeling. *Orthod Craniofac Res*. 2009 Nov;12(4):289-98.

Youssef M, Ashkar S, Hamade E, Gutknecht N, Lampert F, Mir M. The effect of low-level laser therapy during orthodontic movement: a preliminary study. *Lasers Med Sci*. 2008 Jan;23(1):27-33. Epub 2007 Mar 15.

ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Nome do Voluntário: _____
Endereço _____
Telefone para contato: _____ Cidade: _____ CEP: _____
E-mail: _____

As Informações contidas neste prontuário foram fornecidas pela pesquisadora Marcia Maria Altavista Romão, objetivando firmar acordo escrito mediante o qual, o voluntário da pesquisa autoriza sua participação com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos e riscos a que se submeterá, com a capacidade de livre escolha e sem qualquer coação.

Título do Trabalho Experimental: Análise microtomográfica e histológica do efeito do laser de baixa potência na reparação óssea em alvéolos pós exodontias: estudo clínico.

1-Pesquisadora: Marcia Maria Altavista Romão- Profissão: Cirurgião Dentista CROSP 26263

Dr. Cesar Angelo Lascala- Profissão: Cirurgião Dentista CROSP 27352

2-Instituições Envolvidas no Projeto:

Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP)

Co participante: Faculdade de Odontologia da Universidade Nove de Julho

Comitê de Ética em Pesquisa: Faculdade de Odontologia FOUSP (Av. Lineu Prestes 2227, 05508-000 São Paulo, telefone 30917960 ou pelo e-mail cepfo@usp.br).

3-Local do estudo e pesquisa: Todos os procedimentos serão realizados na Clínica da faculdade de Odontologia da Universidade Nove de Julho localizada na rua Vergueiro nº 249 Liberdade SP-SP

4-Informações: Você terá garantia que receberá respostas a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida quanto aos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com pesquisa. Também os pesquisadores assumem o compromisso de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo, ainda que esta possa mudar a sua vontade de continuar participando. Você só poderá participar da pesquisa de forma voluntária, se possuir um dente indicado para extração porque não tem condições de tratamento por restaurações, e que o local da extração tenha condições adequadas para receber um implante dentário.

5- Objetivo: O objetivo deste estudo é avaliar o efeito do tratamento com laser de baixa intensidade, que é uma luz com potencial de estimular os tecidos humanos, quanto a aceleração na cicatrização e na formação do osso em alvéolos .

6-Justificativa: A pesquisa é importante para sabermos se o uso da luz laser após extração pode melhorar ou não o processo de cicatrização óssea e diminuir o tempo de espera para a colocação de implante dentário.

7-Procedimentos da Fase Experimental: Após a autorização e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, você será examinado e fará duas radiografias, uma panorâmica extra bucal e uma intrabucal do dente comprometido. Essas radiografias serão para confirmar a necessidade da remoção do dente e a possibilidade do implante. Você fará a cirurgia para a retirada do dente e em seguida receberá o tratamento com a luz laser (grupo teste) ou não (grupo controle). Caso você receba o tratamento com a luz laser o primeiro tratamento será assim que terminar a cirurgia e também 1, 2, 3 e 7 dias após a extração, quando então, os pontos serão removidos e 15 dias. Portanto você poderá fazer parte de um dos grupos, o que vai receber luz laser e o outro que não vai. Caso você não receba a aplicação da luz laser haverá a necessidade de retornar apenas após 7 dias para a remoção de sutura e controle pós operatório. Após 40 dias desses procedimentos você passará novamente por uma cirurgia para a colocação do pino do implante. Neste momento será removido um fragmento de osso de 4mm(amostra), que não prejudicará de forma alguma a sua reparação, e tampouco a colocação do seu implante. Essa amostra sofrerá análises e será colocada em um líquido que conserva o material (formol 10%) e após será analisada por microtomografia e em microscópio.

8-Desconforto ou Riscos Esperados: Todo procedimento cirúrgico pode provocar dor e desconforto comumente causado pela inflamação causada pela retirada do dente.

Como em qualquer cirurgia, você será orientado a tomar remédios se ocorrerem dores e inchaço. Você ainda poderá entrar em contato com o pesquisador/cirurgião que lhe dará toda assistência necessária.

A aplicação da luz laser sobre o local da extração dentária poderá levar a um leve aquecimento local não causando nenhum problema para você, pois serão obedecidos todos os parâmetros de segurança de utilização recomendados pelo fabricante do aparelho, assim como o uso de óculos de proteção, tempo e doses.

9-Benefícios:

Você pode não ter benefícios diretos com a pesquisa, mas terá garantida a remoção dos dentes comprometidos que o levará a uma condição bucal mais saudável, e, além disso, ter a possibilidade de colocar implante e posteriormente a prótese sem custos.

Além disso, o estudo pode trazer informações valiosas sobre a cicatrização do tecido ósseo, além de ajudar a verificar a eficácia de um método para aumentar a possibilidade do sucesso em implantes.

10- Reutilização dos dados ou material biológico:

()NÃO autorizo a utilização de dados ou do osso retirado para outra pesquisa. O material fica armazenado no laboratório que será feito a pesquisa

()SIM autorizo a utilização de dados ou do osso retirado em outra pesquisa

()NÃO quero ser consultado da utilização dos meus dados ou do osso retirado em outra pesquisa, desde que a nova pesquisa seja aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa

()SIM quero ser consultado da utilização dos meus dados ou osso retirado da em outra pesquisa desde que a nova pesquisa seja aprovada pelo Comitê de Ética em pesquisa

11-Tempo Você terá que comparecer a 5 sessões consecutivas na primeira etapa da pesquisa, sendo 1 para a remoção do dente e primeira aplicação do laser, 3 consecutivas para as outras aplicações do laser. A 5ª sessão coincidirá com a remoção dos pontos. Após 40 dias você será chamado para realizar a nova cirurgia para a instalação do pino do implante e retirado o fragmento do osso (amostras). Também deverá retornar 7 dias após para controle e remoção da sutura (pontos). Após 3 meses você será chamado para realizar a colocação da prótese que pode necessitar de 3 a 5 sessões.

12-Métodos Alternativos Existentes: Você poderá ter seu dente removido e não ter aplicação da luz laser e pode ter seu tratamento protético feito pontes fixas ou pontes móveis sem implantes quando indicadas.

13-Retirada do Consentimento: Você tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que ocorra qualquer prejuízo ao seu tratamento na instituição.

14-Garantia do Sigilo: Os pesquisadores asseguram a sua privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa, e você não será identificado em nenhum momento, mesmo quando os resultados desta pesquisa forem divulgados em qualquer forma.

15-Formas de Ressarcimento das Despesas decorrentes da Participação na Pesquisa: Todos os procedimentos, assim como os materiais utilizados exames, medicamentos serão por conta do projeto de pesquisa, não acarretando em nenhuma despesa para você. A instalação da prótese e o custo desta etapa que deve ocorrer a partir de 3 meses da colocação do pino, será de responsabilidade do pesquisador, não gerando custos a você.

16- Local da Pesquisa: A pesquisa será desenvolvida na Clínica Odontológica da Universidade Nove de Julho, localizada a rua Vergueiro 249 São Paulo – Liberdade SP, e faz parte de um trabalho de pós graduação da Faculdade de Odontologia da USP

Telefones dos Pesquisadores para Contato:, Márcia Maria Altavista Romão- (0xx11 39658258) . César Angelo Lascale- cel:(0xx11 99267-2085)

17- Endereço do Comitê de Ética em Pesquisa: “Se houver dúvidas sobre a ética da pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia FOU SP (Av. Lineu Prestes 2227, 05508-000 São Paulo, telefone 30917960 ou pelo e-mail cepfo@usp.br)”.

18-Anuência após os esclarecimento: Após ter sido informado e ter minhas dúvidas suficientemente esclarecidas pelo pesquisador **concordo** em participar de forma voluntária desta pesquisa. Declaro ainda que recebo uma cópia desse termo para minha guarda.

Não assine este termo se ainda tiver alguma dúvida a respeito.

São Paulo, de de 2014.

Nome do voluntário _____

Assinatura: _____

Nome do Pesquisador

Marcia Maria Altavista Romão CRO 26263

Assinatura do pesquisador _____

1ª via: Instituição

2ª via: Voluntário

ANEXO B – Parecer consubstanciado do CEP - USP

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Análise microtomográfica e histológica do efeito do laser de baixa potência na reparação óssea em alvéolos pós exodontias: estudo clínico

Pesquisador: Marcia Maria Altavista Romão

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 30689314.4.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 697.576

Data da Relatoria: 25/06/2014

Apresentação do Projeto:

A proposta do estudo pretende selecionar 20 pacientes hígidos de ambos os sexos, que tenham indicação de exodontias de dentes inferiores permanentes e que realizarão implantes dentários. Estes 20 pacientes serão divididos em dois grupos (n=10) um deles receberá logo após a exodontia a irradiação da região por laser de baixa potência (LLLT)

GaAlAs 830nm (Spot Size 0,04) no pós operatório imediato, 24 horas, 48 horas, e após 7 dias. Cada alvéolo receberá a aplicação de laser em 5 pontos, sendo 1 na região oclusal, 2 vestibulares e 2 linguais (DE=75J/cm² 30 s/ P=100mw. Os 10 restantes serão o grupo controle e portanto não receberão a radiação com laser. Após 50 dias, amostras ósseas em ambos os grupos controle e teste serão colhidas, utilizando uma broca cirúrgica de aço do tipo trefina (Diâmetro interno de 3 mm, diâmetro externo de 4 mm). As amostras de tecido ósseo serão objeto de avaliação microtomográfica e histológica comparativa.

Objetivo da Pesquisa:

Verificar se o laser de baixa potência GAAlAs pode interferir na reparação óssea alveolar de forma a acelerar o processo de reparo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios foram adequados na proposta e no TCLE conforme orientações e sugestões

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 697.576

emitidas no parecer anterior.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A proposta da pesquisa foi adequada sob o ponto de vista ético.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos obrigatórios (TCLE, Carta de autorização) foram apresentados e estão adequados.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais semestrais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências e as inadequações foram atendidas, o Protocolo está adequado sob o ponto de vista ético.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 25 de Junho de 2014

Assinado por:

Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

ANEXO C – Parecer consubstanciado do CEP - UNINOVE

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise microtomográfica e histológica do efeito do laser de baixa potência na reparação óssea em alvéolos pós exodontias: estudo clínico

Pesquisador: Marcia Maria Altavista Romão

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 30689314.4.3001.5511

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 738.363

Data da Relatoria: 04/08/2014

Apresentação do Projeto:**Resumo:**

Os defeitos ósseos localizados ou generalizados dos processos alveolares representam um fator determinante na reabilitação da cavidade oral.

Cada vez mais estudos buscam técnicas para melhores resultados, sejam na qualidade do osso formado, seja no tempo que esse processo possa

ocorrer. Muito se tem feito na reparação óssea por meio de enxertos heterógenos, alógenos, assim como os aloplásticos, vislumbrando o maior

ganho da estrutura óssea vertical ou horizontal com menor morbidade para a instalação de implantes dentários. Sabe-se que as fontes biofísicas,

uma delas, a terapia a laser de baixa potência (LLLT) apresentam efeitos bioestimuladores e, por esta razão, tem-se utilizado em uma variedade de

lesões teciduais, com resultados satisfatórios, considerando a melhoria da reparação desses tecidos (Barushka et al, 1995; Bossini et al, 2010;

Matsumoto et al, 2009). Fraturas ósseas e defeitos também apresentaram capacidade de reparação significativa quando associados a essa fonte (A.

da Silva e Camilli, 2006; Kazem Shakouri et al, 2010; Pinheiro et al, 2010), devido a sua ação

Endereço: VERGUEIRO nº 235/249

Bairro: LIBERDADE

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3385-9197

CEP: 01.504-001

E-mail: comitedeetica@uninove.br

UNIVERSIDADE NOVE DE
JULHO - UNINOVE

Continuação do Parecer: 738.363

biomoduladora na osteoblastogênese e osteoclastogênese (Aihara et al, 2006), estimulando a sua aplicação em estudos de reconstrução óssea, (Marquez Martinez et al, 2008; Pinheiro et al, 2003). Estudos conduzidos em defeitos criados em mandíbulas de animais, por meio de análises histomorfométrica, que receberam LLLT GaAIs revelam um aumento na proliferação de fibroblastos e na quantidade de tecido osteóide, sugerindo aceleração no processo de ossificação e aumento na densidade mineral óssea quando comparados com o grupo controle não irradiado. (Kawasaki K., Shimizu N. 2000). Muitos trabalhos afirmando ou mesmo sugerem o efeito positivo do laser na reparação óssea utilizando diferentes materiais e métodos de avaliação são relatados na literatura, entretanto existem dúvidas, pois diversos protocolos de aplicação têm sido descritos, com vários materiais ativadores, com diferentes comprimentos de onda, potências, frequências, densidades de energia e, com diversos números de irradiações necessitando de mais estudos para estabelecer protocolos específicos e mais adequados. Tendo em vista que a reparação alveolar pós exodontias ocorre entre 2 e 4 meses, e que por volta de 40 dias temos a formação de osso com estrutura ainda elementar, e sendo cada vez maior a busca por modalidades de tratamento que encurtem o tempo de espera por parte do paciente para sua reabilitação, o objetivo deste estudo será avaliar o efeito da terapia bioestimuladora com laser de baixa potência (LLLT) na reparação óssea pós exodontia em alvéolos por meio de análises por microtomografia computadorizada (micro CT) e histomorfométrica. (Meleo D, et al 2012). Serão selecionados 20 pacientes de ambos os sexos, faixa etária entre 30 a 40 anos com indicação de exodontia de molares em região mandíbula, constatada por radiografia e exame clínico. Após a exodontia, será realizada leve curetagem do alvéolo, irrigação com soro fisiológico 0,9% e por meio de sonda milimetrada, a mensuração da espessura, profundidade, assim como a quantidade das paredes, para certificar a viabilidade do implante. Dos alvéolos metade (10 pacientes) receberão tratamento com laser de baixa potência (LLLT) GaAIs 808nm no pós operatório imediato, 24 horas, 48 horas, 72 horas 7 dias após (grupo teste), sendo que os outros 10 pacientes não serão

Endereço: VERGUEIRO nº 235/249

Bairro: LIBERDADE

UF: SP

Telefone: (11)3385-9197

Município: SAO PAULO

CEP: 01.504-001

E-mail: comitedeetica@uninove.br

UNIVERSIDADE NOVE DE
JULHO - UNINOVE

Continuação do Parecer: 738.363

irradiados(grupo controle). Cada alvéolo receberá a aplicação de laser em 5 pontos, sendo 1 na região oclusal, 2 vestibulares e 2 linguais($DE=75J/cm^2$ 30 s/ $P=100mw$). Após 40 dias, amostras ósseas em ambos os grupos controle e teste serão colhidas, utilizando uma broca cirúrgica de aço do tipo trefina de diâmetro interno de 3mm, e externo de 4. As amostras colhidas serão acondicionadas num tubo eppendorf 25mm com formol a 10% para as aquisições das imagens pela SKYSCAN 1176 HIGH-RESOLUTION IN VIVO X - RAY MICROTOMOGRAPHY. Na micro-CT análise, serão observadas a superfície e as características estruturais do tecido ósseo em relação a densidade, e tamanho e quantidade das trabéculas ósseas do grupo controle comparado com as amostras do grupo teste. Após o exame por meio da micro CT as amostras serão enviadas para testes histológicos. As amostras serão então descalcificadas, incluídas em parafina e coradas hematoxilina eosina (HE) e analisadas histomorfometricamente. Palavras – chaves: Histologia - lasers - microtomografia por Raio-X – osso-regeneração óssea -

Objetivo da Pesquisa:

Hipótese:

A efetividade do laser de baixa potência GaAlAs na aceleração do processo de reparação óssea no período após 40 dias da exodontia

Objetivo Primário:

Avaliar o efeito do laser de baixa potência na reparação óssea em alvéolos pós exodontias de molares inferiores em 20 pacientes, com faixa etária entre 30 e 40, de ambos os gêneros, por meio de análises microtomográficas e histomorfométricas.

Objetivo Secundário:

Estudar o método de análises ósseas por meio da microtomografia, comparando com a histomorfometria

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Todo procedimento cirúrgico pode provocar dor e desconforto comumente gerado pela inflamação causada pela retirada do dente. Como em qualquer cirurgia, o paciente voluntário será orientado a tomar remédios se ocorrerem dores e

Endereço: VERGUEIRO nº 235/249

Bairro: LIBERDADE

UF: SP

Telefone: (11)3385-9197

Município: SAO PAULO

CEP: 01.504-001

E-mail: comitedeetica@uninove.br

UNIVERSIDADE NOVE DE
JULHO - UNINOVE

Continuação do Parecer: 738.363

inchaço. Poderá entrar em contato com o pesquisador/cirurgião que lhe dará toda assistência necessária. A aplicação da luz laser sobre o local da extração dentária poderá levar a um leve aquecimento local, não causando nenhum problema para o paciente, pois serão obedecidos todos os parâmetros de segurança de utilização recomendados pelo fabricante do aparelho, assim como o uso de óculos de proteção, tempo e doses.

Benefícios:

O paciente voluntário poderá não ter benefícios diretos com a pesquisa, mas terá garantida a remoção dos dentes comprometidos que o levará a uma condição bucal mais saudável, e além disso terá a possibilidade de colocar implante e posteriormente a prótese sem custos. Além disso o estudo pode trazer informações valiosas sobre a cicatrização do tecido ósseo, além de ajudar a verificar a eficácia de um método para aumentar a possibilidade do sucesso em implantes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante já que existem dúvidas, pois diversos protocolos de aplicação têm sido descritos, com vários materiais ativadores, com diferentes comprimentos de onda, potências, frequências, densidades de energia e, com diversos números de irradiações. Muitos trabalhos foram realizados in vitro, in vivo e em humanos com terapia a laser para validar seus efeitos na reparação de tecido mole. Afim de esclarecer o protocolo mais eficaz o projeto torna-se muito interessante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram observados e preenchidos, TCLE, Folha de rosto e carta de autorização da instituição onde será realizada a pesquisa.

Recomendações:

Nenhuma recomendação

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Trabalho aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: VERGUEIRO nº 235/249

Bairro: LIBERDADE

CEP: 01.504-001

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3385-9197

E-mail: comitedeetica@uninove.br

UNIVERSIDADE NOVE DE
JULHO - UNINOVE

Continuação do Parecer: 738.363

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 04 de Agosto de 2014

Assinado por:
Stella Regina Zamuner
(Coordenador)

Endereço: VERGUEIRO nº 235/249

Bairro: LIBERDADE

CEP: 01.504-001

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3385-9197

E-mail: comitedeetica@uninove.br