UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

LUÍSA BELLUCO GUERRINI

**Efeito do laser de baixa intensidade na regeneração de defeitos
ósseos críticos tratados com osso autógeno e diferentes
biomateriais**

BAURU
2018

LUÍSA BELLUCO GUERRINI

**Efeito do laser de baixa intensidade na regeneração de defeitos
ósseos críticos tratados com osso autógeno e diferentes
biomateriais**

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Reabilitação Oral.

Orientador: Prof^a. Dr^a Ana Lúcia Pompéia Fraga de Almeida

BAURU
2018

Guerrini, Luísa Belluco

Efeito do laser de baixa intensidade na
regeneração de defeitos ósseos críticos tratados
com osso autógeno e diferentes biomateriais / Luísa
Belluco Guerrini. – Bauru, 2018.

107p. : 16 il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de
Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Pompéia
Fraga de Almeida

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a
reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos
fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 017/2016
Data: 12/12/2016

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, meus maiores incentivadores, que me apoiaram e deram muita força para realização de mais um sonho. Sempre tão presentes em minha vida, são meus exemplos de vida. A vocês, mais essa conquista!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por toda força e coragem a mim concedida. Por estar sempre presente e iluminar meus caminhos.

Aos meus pais, que confiaram em mim e sempre me incentivaram para que mais esse sonho se tornasse realidade. A eles minha eterna gratidão, pois eu sei o quanto me ajudaram nos momentos difíceis e o quanto são imprescindíveis na minha vida. Amo vocês.

Aos meus irmãos, meus companheiros, cuja a presença eu carrego em meu coração e pensamentos. Serei sempre grata por todo o carinho, apoio e amizade. Duas razões da minha vida, amo vocês!

Aos meus avós, por todas as orações, incentivo e confiança. Meu carinho e amor por vocês é imensurável.

Agradeço à minha orientadora, Prof^a Dr^a Ana Lúcia Pompéia Fraga de Almeida, que dedicou seu tempo e compartilhou seus conhecimentos e experiências, transmitindo tudo, sempre de forma segura e paciente. Por me permitir desfrutar de tamanha experiência e sabedoria. Grande exemplo de profissional e comprometimento. Obrigada por me acolher nos momentos de dúvidas, por toda atenção e paciência. Me proporcionou realizar este trabalho, a você professora, meu carinho e meu agradecimento. Obrigada por acreditar em mim!

A minha irmã de coração Nicole, minha “Querida”, sempre tão presente desde a especialização e no mestrado. Por todas as experiências vividas e compartilhadas em todos os momentos deste trabalho. Com você dividi dúvidas, angústias, alegrias e sonhos. Obrigada por todas as conversas, conselhos, ajudas, enfim, obrigada por sua amizade. Sou grata ao destino por ter cruzado nossos caminhos. Somos mais que a dupla inseparável do mestrado, somos amigas da vida!

Ao Matthias, meu companheiro, amigo e namorado, com quem dividi tantos momentos. Obrigada por cada palavra de incentivo, amor e carinho.

Ao professor Luis Augusto Esper, grande profissional e excelente professor, obrigada por toda atenção, ajuda e paciência sempre. Pessoa fundamental para a construção e conclusão deste trabalho.

Aos professores José Henrique Rubo e Pedro, pelos ensinamentos transmitidos e convivência nas clínicas, obrigada pelas trocas de conhecimentos durante esses anos.

As minhas fiéis escudeiras Gabriela, Letícia e Jéssica, por todo suporte na minha vida em Bauru. Agradeço nossos encontros, nossas conversas, nossos desabafos. Não consigo imaginar minha vida sem vocês aqui! Amigas, obrigada.

As minhas parceiras, Danielle e Íris, obrigada por todos os momentos vividos em Bauru. A amizade de vocês foi essencial em todos os dias durante essa etapa.

Aos professores do Departamento de Prótese e Periodontia, que contribuíram para minha formação profissional.

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste sonho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Muito obrigada!

*“Todos os nossos sonhos podem se realizar,
se tivermos a coragem de persegui-los.”*

Walt Disney

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do laser de baixa intensidade na regeneração de defeitos ósseos críticos preenchidos com diferentes biomateriais. Foram utilizados 80 ratos machos adultos (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*) e um defeito de tamanho crítico (5 mm) foi criado na calvária de cada animal. Os animais foram divididos em 8 grupos experimentais (n=10): 1) Grupo C (Controle - coágulo sanguíneo), 2) Grupo LB (Laser de baixa intensidade - GaAlAs), 3) Grupo OA (osso autógeno), 4) Grupo OALB (osso autógeno + laser de baixa intensidade), 5) Grupo VB (vidro bioativo - Biogran®), 6) Grupo VBLB (Biogran® + laser de baixa intensidade), 7) Grupo BO (osso bovino - Bio-Oss®) e 8) Grupo BOLB (Bio-Oss® + laser de baixa intensidade). Os animais foram submetidos à eutanásia aos 30 dias pós-operatórios. Foram avaliadas as áreas de osso neoformado (AON) e de partículas remanescentes (APR). Os dados foram submetidos ao teste paramétrico ANOVA, seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). O efeito fotobiomodulador do laser foi demonstrado no presente estudo uma vez que todos os grupos apresentaram maiores quantidades de AON quando comparados com o grupo C ($9,96 \pm 4,49\%$). Ao ser associado aos biomateriais, foi estatisticamente significativo somente quando relacionado ao Bio-Oss® (BOLB $48,57 \pm 28,22$). A menor área de APR foi encontrada nos grupos irradiados pelo laser, com diferença significativa somente no grupo BOLB ($48,57 \pm 28,22$, $p < 0,05$). O laser de baixa intensidade demonstrou melhores resultados na regeneração óssea de defeitos de tamanho críticos, com maior taxa de AON, quando associado ao Bio-Oss®.

Palavras-chaves: Biomateriais. Regeneração óssea. Terapia à laser de baixa intensidade. Autoenxerto.

ABSTRACT

Effect of low intensity laser on the regeneration of critical bone defects treated with autogenous bone and different biomaterials

The purpose of this study was to evaluate the effect of low intensity laser on the regeneration of bone defects filled with different biomaterials. Eighty male rats (*Rattus norvegicus*, albinus, Wistar) were used and a critical size defect (5 mm) was created in the calvaria of each animal. The animals were divided into 8 experimental groups (n = 10): 1) Group C (Control - blood clot), 2) Group LB (Low intensity laser - GaAlAs), 3) Group OA (autogenous bone), 4) OALB group (autogenous bone + low intensity laser), 5) Group VB (bioactive glass - Biogran®), 6) VBLB Group (Biogran® + low intensity laser), 7) BO Group (bovine bone - Bio-Oss®) and 8) BOLB Group (Bio-Oss® + low intensity laser). The animals were submitted to euthanasia after 30 days postoperative. The areas of neoformed bone (AON) and of remaining particles (APR) were evaluated. The data were submitted to the ANOVA parametric test, followed by the Tukey test ($p < 0.05$). The photobiomodulatory effect of the laser was demonstrated in the present study since all groups presented higher amounts of AON when compared to group C ($9.96 \pm 4.49\%$). When associated with biomaterials, it was statistically significant only when related to Bio Oss® (BOLB 48.57 ± 28.22 , $p < 0,05$). The lowest APR area was found in the groups irradiated by the laser, with significant difference only in the BOLB group (48.57 ± 28.22). The low intensity laser showed better results in bone regeneration of critical size defects, with a higher AON rate, when associated with Bio-Oss®.

Key words: Biocompatible Materials. Bone Regeneration. Low-Level Light Therapy. Autologous.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Após tricotomia e antissepsia com PVPI.....	46
Figura 2	- Incisão semilunar e retalho total deslocado em direção posterior.....	46
Figura 3	- Guia cirúrgico em posição para realização do DTC	47
Figura 4	- Marcações em “L” preenchidas com amálgama	48
Figura 5	- Protocolo de aplicação do laser	49
Figura 6	- Processamento das peças. Peças divididas longitudinalmente em dois blocos usando as marcações de amálgama. Realizados cortes seriados longitudinais foram iniciados a partir do centro do defeito cirúrgico original.	50
Figura 7	- Delimitação da área total (AT) do defeito cirúrgico original delineada pela linha amarela. Área de osso neoformado (AON) delineada pelas linhas vermelhas e da área de partículas remanescentes (APR) delineadas pelos desenhos azuis.	51
Figura 8	- Fotomicrografia dos grupos C (Controle), LB (Laser), OA (Osso autógeno), OALB (Osso autógeno + laser), VB (Biogran®), VBLB (Biogran® + laser), BO (Bio Oss®) e BOLB (Bio Oss® + laser). Visão panorâmica dos grupos, é possível visualizar a extensão variada de novo osso entre o grupos tratados e espessuras das calvárias. 4x, HE.	55
Figura 9	- Grupo C. Presença de osteócitos (asterisco) indicando formação de novo osso na extremidade do defeito cirúrgico com fibroblastos (FB) dispostos paralelamente ao redor, indicativo de síntese. Presença de tecido conjuntivo frouxo (40x).	57

Figura 10 - Grupo LB. (A) Extremidade do defeito com formação de novo osso, é possível observar osteócitos na matriz (asterisco) (20x). (B) Região central do defeito cirúrgico, com fibras colágenas e fibroblastos dispostos de forma paralela. (20x).....	58
Figura 11 - Grupo OA. (A) Extremidade do defeito com presença de osso neoformado e osteócitos na matriz (seta) (20x). (B) Região central do defeito cirúrgico, com tecido conjuntivo fibroso ao redor das partículas. É possível observar início de formação de novo osso ao redor da partícula (seta) (20x).....	59
Figura 12 - Grupo OALB. (A) Partícula de osso autógeno, área de início de formação óssea na periferia da partícula (seta) (20x). (B) Neoformação óssea na periferia do defeito em extensão ao centro do defeito cirúrgico (setas) (20x).....	60
Figura 13 - Grupo VB. (A) Visão da extremidade do defeito em íntimo contato com as partículas do vidro (10x) (B) Região central do defeito cirúrgico, com tecido conjuntivo fibroso ao redor das partículas. Partículas de Biogran® com migração de células para seu interior (setas) (20x).	61
Figura 14 - Grupo VBLB. (A) Partículas de Biogran® com migração do tecido conjuntivo para seu interior (40x). (B) Partículas rodeadas por tecido conjuntivo fibroso e neoformação óssea em direção ao interior do defeito cirúrgico (seta) (20x).....	62
Figura 15 - Grupo BO. (A) Região central do defeito cirúrgico com preenchida com partículas rodeadas por tecido conjuntivo o que manteve a espessura da calvária (10x). (B) Região central do defeito cirúrgico, com fibras colágenas ao redor das partículas de Bio Oss® (setas). É possível observar início de atividade de reabsorção da partícula (asterisco) (20x).	63

Figura 16 - Grupo BOLB. (A) Neoformação óssea na extremidade em direção ao centro do defeito cirúrgico (setas). Presença de vasos sanguíneos (V) (20x). (B) Região central do defeito cirúrgico, com tecido conjuntivo fibroso bem organizado ao redor das partículas de Bio Oss® (asterisco) (20x)64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Médias, desvios-padrão (DP), Q25, medianas e Q75 dos valores de área de osso neoformado (AON) em porcentagem (%).	65
Tabela 2	- Comparação dos valores de AON (%) entre o grupo do LB e os demais grupos.	66
Tabela 3	- Comparação dos valores de AON (%) entre os grupos dos materiais de enxertia e seus respectivos grupos com a aplicação do laser	66
Tabela 4	- Médias, desvios-padrão (DP), Q25, medianas e Q75 dos valores de área de partículas remanescentes (APR) em porcentagem (%), dos grupos VB, VBLB, BO e BOLB.	67
Tabela 5	- Comparação dos valores de APR (%) entre os grupos que utilizaram materiais de enxertia e seus respectivos grupos com a aplicação do laser	67

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
AT	Área total
ATP	Adenosina Trifosfato
AON	Área de osso neoformado / Área de novo osso
APR	Área de partículas remanescentes
BO	Osso bovino liofilizado / Bio-Oss
BOLB	Osso bovino liofilizado + Laser de Baixa Intensidade
C	Controle
CaO	Óxido de Cálcio
cm	centrímetro
cm ²	centrímetro quadrado
DTC	Defeito de tamanho crítico
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
g	gramas
GaAs	Arseneto de Gálio
GaAlAs	Arseneto de Gálio e Alumínio
H.E.	Hematoxilina e Eosina
HeNe	Hélio-Neon
J	Joule
Kg	Quilograma
LB	Laser de Baixa Intensidade
Ltda	Limitada
MEC	Matriz extracelular
mg	miligrama
mm	milímetro
mm ²	milímetro quadrado
µm	micrometro
mW	milliwatt
nm	nanômetro
Na ₂ O	Óxido de Sódio

P2O5	Pentóxido de Disfósforo
PRP	Plasma rico em plaquetas
PVPI	Iodopovidona
SiO2	Dióxido de Silício
T.M.	Tricrômico de Masson
VB	Vidro Bioativo
VBLB	Vidro Bioativo + Laser de Baixa Intensidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1 MODELO EXPERIMENTAL.....	23
2.2 TECIDO ÓSSEO E ENXERTO AUTÓGENO	25
2.3 ENXERTO SINTÉTICO - VIDRO BIOATIVO	28
2.4 ENXERTO XENÓGENO - OSSO BOVINO	32
2.5 LASER.....	34
3. PROPOSIÇÃO.....	41
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1 MODELO EXPERIMENTAL.....	45
4.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	45
4.3 PROTOCOLO DE APLICAÇÃO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE	48
4.4 PROCESSAMENTO TECIDUAL	49
4.5 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	50
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
5. RESULTADOS	55
5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA	55
5.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	65
6. DISCUSSÃO.....	71
7. CONCLUSÃO.....	83
REFERÊNCIAS	87
ANEXOS.....	107

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Extensos defeitos ósseos nos rebordos alveolares resultantes de trauma ósseo, ressecção de tumores e anomalias dentárias congênitas representam um problema comum e com grande significância clínica (GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005). Rebordos alveolares com alterações dimensionais dificultam a reabilitação protética (BARBOZA et al., 2002) e devem ser reconstruídos com técnicas regenerativas.

Os enxertos ósseos têm como objetivo facilitar a cicatrização e melhorar a regeneração óssea após um procedimento cirúrgico. Atuam na manutenção e estabilização do coágulo e redução do risco de colapso do tecido mole nos defeitos ósseos (BALDINI; DE SANCTIS; FERRARI, 2011) e têm sido utilizados cada vez mais na terapia regenerativa (OZDEMIR et al., 2013).

Por possuir propriedades osteogênicas, osteocondutoras e osteoindutoras, o osso autógeno (OA) tem sido apontado como o material *gold standard* na cirurgia óssea reconstrutiva (BALDINI; DE SANCTIS; FERRARI, 2011; CALORI et al., 2011; HALLMAN; THOR, 2008; SCHMITT et al., 2013; ALMEIDA et al., 2016) porém para obtê-lo é necessário uma área doadora (MISCH et al., 1992; PROUSSAEFS et al., 2002). Um segundo sítio cirúrgico além de exigir maior habilidade do operador, requer tempo extra, incorre em altos custos e está associado à morbidade (STAVROPOULOS et al., 2015). Infecções e danos a estruturas anatômicas locais (dentes, nervos, músculos, vasos) (BLOKUIS; ARTS, 2011; GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005; HERFORD; DEAN, 2011), e dor no sítio doador (AMERIO et al., 2010; SCHMITT et al., 2013), podem estar associados à sua coleta. Outras desvantagens correlacionadas a esse tipo de enxerto são sua disponibilidade limitada e a reabsorção imprevisível do enxerto (HALLMAN; THOR, 2008).

Apesar de enxertos ósseos autógenos corresponderem ao padrão ouro para o tratamento, os materiais sintéticos ou aloplásticos, com o objetivo de evitar a utilização de osso autógeno, têm sido largamente utilizados devido a sua disponibilidade ilimitada e por não necessitar de cirurgia adicional da área doadora

(TOPAZIAN et al., 1971; NORTON; WILSON, 2002; STAVROPOULOS et al., 2015; ALMEIDA et al., 2016).

Vários substitutos ósseos estão disponíveis para uso clínico, tanto de origem natural como sintética, devido à busca e grande necessidade clínica por materiais de enxertia óssea e técnicas que possam ser alternativas ou substituir o enxerto autógeno (SCHWARTZ et al., 2008; ALMEIDA, et al., 2016).

Um substituto ósseo deve possuir características de biocompatibilidade, ausência de efeitos antigênicos, possibilidade de esterilização associada com propriedades mecânicas, como a capacidade de manutenção do espaço e de fácil manipulação durante as fases cirúrgicas (BALDINI; DE SANCTIS; FERRARI, 2011; ALMEIDA et al., 2016; ZIZZARI et al., 2016). São essencialmente osteocundutores, podendo oferecer propriedades osteoindutoras variáveis (CALORI et al., 2011; GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005), porém não apresentam propriedades osteogênicas (ROGERS; GREENE, 2012).

Dentre estes materiais utilizados com o intuito de facilitar e/ou promover a regeneração óssea estão o vidro bioativo (VB) e o osso bovino liofilizado (BO).

O VB particulado é um material sintético utilizado como substituto ósseo. Atua formando uma união química com os tecidos circunjacentes (HENCH et al., 1971; HENCH; PASCHALL, 1973) e tem demonstrado propriedades osteoestimulativa e osteocondutora (HENCH, 2006) que acontecem após a implantação e contato das partículas com os fluidos teciduais (SCHEPERS, 1991).

No grupo dos enxertos naturais, o osso bovino desproteínizado (Bio-Oss® - BO) possui um amplo suporte na literatura científica em procedimentos regenerativos (TROMBELLI et al., 2002; ESPOSITO et al., 2006; MARDAS et al., 2010; BALDINI; DE SANCTIS; FERRARI, 2011; SILVESTRI et al., 2011; JAMBHEKAR et al 2015; LUTZ et al., 2015). Foi amplamente pesquisado *in vitro* e *in vivo*, em estudos pré-clínicos em animais e humanos (BALDINI; DE SANCTIS; FERRARI, 2011; HALLMAN; THOR, 2008).

O BO é um derivado de osso bovino, mas todos os seus componentes orgânicos são removidos, mantendo-se apenas a arquitetura natural do osso

(GROSS, 1997). Estudos demonstraram a biocompatibilidade deste material (INDOVINA; BLOCK, 2002; BERGLUNDH; LINDHE, 1997; CARDAROPOLI et al., 2005). Este material mostrou-se excelente para a formação de novo osso, quando colocado em defeitos cirúrgicos criados em crânios de coelho e tíbias de ratos (ISAKSSON, 1992; FUKUTA et al., 1992; CARVALHO et al., 2002).

Há na literatura controvérsias sobre o potencial de reabsorção dos substitutos ósseos. Durante a fase de remodelação óssea, um biomaterial que apresenta pouca ou nenhuma reabsorção, pode comprometer a regeneração óssea devido à sua menor capacidade osteogênica quando comparado ao osso autógeno (ZIZZARI et al., 2016). Com o intuito de melhorar os resultados dos materiais de enxertos ósseos, o laser de baixa intensidade (LB) pode ser associado, proporcionando efeitos positivos no aumento da quantidade de fibras colágenas nos estágios iniciais da cicatrização, como o colágeno tipo I (principal componente da matriz óssea) elemento fundamental na formação de novo osso, acarretando conseqüentemente no maior grau de neoformação óssea em um estágio posterior da cicatrização, além de estimular as células sanguíneas do osso primitivo para a região do enxerto (SOARES et al., 2013; GERBI et al., 2005). O laser também atua no processo inflamatório, acelera a proliferação celular (KHADRA et al., 2005a; KHADRA et al., 2005b) e estimula a proliferação de células mesenquimais e osteoblastos (OZAWA et al., 1998; DORTBUDAK et al., 2000; HAMAJIMA et al., 2003; ABRAMOVITCHI et al., 2005; STEIN et al., 2005; FUJIHARA et al., 2006).

Esses efeitos biológicos benéficos, de caráter analgésico e antiinflamatório (LINS et al., 2010) encorajam seu uso e favorecem a cicatrização óssea.

Ainda não existem parâmetros universalmente aceitos quanto à utilização do laser de baixa intensidade na regeneração óssea, porém, essa terapia vem sendo amplamente utilizada neste processo (PINHEIRO et al., 2006; BARROS, 2008; SILVA, 2007; CATAO, 2004; BOSCO et al., 2016; CUNHA et al., 2014; TORRICELLI et al., 2001; BASHARDOUST TAJALI et al., 2010) e ao considerar a ausência de propriedades osteogênicas, potencial de reabsorção variável e atraso na regeneração tecidual dos biomateriais, a aplicação do laser pode ser uma alternativa associada à materiais de enxertia em busca de melhores resultados clínicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MODELO EXPERIMENTAL

Diferentes regiões anatômicas são utilizadas em pesquisas de regeneração óssea incluindo a tíbia, o rádio, a mandíbula e o crânio. Um defeito craniano, devido à sua origem intramembranosa, se assemelha ao osso mandibular humano (FRAME, 1980).

Defeitos em calvárias são bastante utilizados e adequados para pesquisa de materiais regenerativos pelo fato de que as calvárias possuem uma estrutura na qual é possível criar defeitos uniformes, padronizados e reprodutíveis, o que torna a análise radiográfica ou histológica facilitada. Sua localização anatômica propicia acesso cirúrgico adequado para confecção dos defeitos cirúrgicos; além de permitir o suporte para implantação de biomateriais (GOMES; FERNANDES, 2011). O fato do osso original apresentar-se apenas nas bordas do defeito, dificulta o fechamento total do mesmo, sendo vantajosa a sua utilização no estudo de diferentes biomateriais em regeneração óssea (DONOS et al., 2004). O uso de defeitos ósseos em modelos animais em pesquisas pré-clínicas procura reconhecer e detalhar os processos fisiológicos e com isso, avaliar a biologia e a biomecânica das técnicas estudadas. O'loughlin et al. (2008) ao revisar a frequência do emprego de modelos animais em publicações de periódicos de ortopedia encontrou que 38% dos estudos utilizam ratos, 19% coelhos, 13% camundongos, 11% ovelhas, 9% cães, 4% cabras e 4% outros.

O uso de animais pequenos em estudos, desde que sejam bem conduzidos e totalmente validados são essenciais para o desenvolvimento e conhecimento de novos substitutos ósseos (LE GUEHENNEC et al., 2005). Nas pesquisas biomédicas ratos e coelhos são os animais mais frequentemente utilizados (PELLEGRINI et al., 2009).

Pequenos animais como roedores são mais utilizados em pesquisa frente a animais de grande porte (GOMES; FERNANDES, 2011) uma vez que, roedores são geneticamente semelhantes, apresentam melhor custo benefício, a manipulação e

acomodação dos mesmos são facilitadas e permitem a padronização das condições experimentais (JORDAN, 1971; PELLEGRINI et al., 2009).

A cicatrização óssea em ratos é muito semelhante à cicatrização em humanos (ELSUBEIHI E HEERSCHKE, 2004; DEL FABBRO; BORTOLIN; TASCHIERI, 2011), em relação ao período e sequência de eventos, porém ocorre de forma mais rápida (BODNER et al., 1993; AMLER; JOHNSON; SALMAN, 1960; BOYNE, 1966). Considera-se que 30 dias de vida do animal é compatível a 90 dias de vida em seres humanos (QUINN, 2005), diante disso é possível avaliar os resultados em relação a regeneração óssea nesse período (DE ALMEIDA et al., 2014; CUNHA et al., 2014; MOREIRA et al., 2018; FREITAS et al., 2018).

A ausência de homogeneidade nos protocolos de pesquisas com animais, prejudica a comparação de resultados, dificulta o relato de dados e interfere na reprodutibilidade de estudos futuros (MAREI; MAHMOOD; ALMAS, 2018; DELGADO – RUIZ et al., 2015; VAGJEL, 2014).

Em 2010 foram publicadas diretrizes dos animais em pesquisa - relatórios de experimentos *in vivo* (ARRIVE) com objetivo aperfeiçoar a qualidade da descrição do uso de animais em publicações científicas e com isso aumentar a disponibilidade e utilidade das informações obtidas de todos os animais em todos os experimentos, evitando o uso desnecessário de animais e permitindo uma revisão crítica precisa dos experimentos com animais, facilitando a comparação dos resultados entre diferentes grupos de pesquisa para validar e contextualizar os resultados para promover a pesquisa translacional em benefício dos pacientes (KILKENNY et al., 2010). Descrevendo as informações mínimas que todas as publicações científicas que utilizam animais devem incluir, como número e características específicas dos animais empregados; detalhes de habitação, criação e procedimentos; desenho experimental, métodos estatísticos e analíticos (GULIN; ROCCO; GARCÍA-BOURNISSEN, 2015). O cumprimento das normas do ARRIVE é uma tentativa de diminuir a ausência de homogeneidade.

Seguir o princípio dos “3Rs” do uso de animais em pesquisa científica (Replacement, Reduction and Refinement - Substituição, Redução e Refinamento) pode evitar repetições desnecessárias, facilitar revisões sistemáticas antes de

qualquer novo estudo com animais, e tornar mais simples a comparação e assimilação de dados de diferentes estudos (HOOIJMANS; LEENAARS; RITSKES-HOITINGA, 2010 ; GULIN; ROCCO; GARCÍA-BOURNISSEN, 2015).

Schmitz e Hollinger (1986) apresentaram pela primeira vez o termo “Defeito de Tamanho Crítico” (DTC) o qual era descrito como um defeito que, em ossos e espécies particulares, deveria obter o menor tamanho possível para que o mesmo não regenerasse completamente durante a vida do animal. Devido ao fato de que os estudos pré-clínicos em sua maioria apresentam um tempo de avaliação limite, Gosain et al. (2000) definiram ser um defeito de tamanho crítico aquele que não cicatriza durante o período de duração do estudo. Há divergências de conceitos na literatura sobre qual o tamanho mais adequado de um defeito de calvária para o mesmo ser considerado crítico. Defeitos com 8 mm de diâmetro são considerados críticos para alguns autores (MESSORA et al., 2008; PARK et al., 2009; SCOTTFORD et al., 2011). Outros consideram um defeito com 5mm de diâmetro em calvária de ratos um defeito de tamanho crítico pois não se regenera espontaneamente dentro do tempo do experimento, e causa menos complicações ao animal, visando os princípios dos “3Rs” como anteriormente mencionados (DONOS et al., 2004; FURLANETO et al., 2007; DE ALMEIDA et al., 2014; CUNHA et al., 2014; VAJGEL et al., 2014; MOREIRA et al., 2018; FREITAS et al., 2018).

2.2 TECIDO ÓSSEO E ENXERTO AUTÓGENO

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo altamente especializado composto por células, fibras e matriz óssea. Seus componentes extracelulares são mineralizados, concedendo-lhe resistência e rigidez substanciais, o que permite que o osso cumpra uma importante função dentro do corpo humano, o suporte mecânico para os tecidos moles e proteção aos órgãos vitais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

O tecido ósseo possui como células os osteócitos, osteoblastos (células osteoprogenitoras) e os osteoclastos. Os osteócitos se localizam no interior da matriz óssea e são responsáveis por sua manutenção, sua morte é seguida da reabsorção da matriz ao seu redor. Os osteoblastos sintetizam a parte orgânica da matriz (colágeno tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas) e estão localizados nas

superfícies ósseas. Os osteoblastos que são aprisionados pela matriz orgânica após a produção de matriz extracelular são chamados de osteócitos e são responsáveis por sua manutenção, a apoptose dessa célula é seguida da reabsorção da matriz ao seu redor. Os osteoclastos são derivados de monócitos e são células que participam do processo de remodelação óssea. A matriz óssea é um material extracelular calcificado, é constituído por uma parte orgânica e uma inorgânica (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Diante da sua função no corpo humano, o tecido ósseo necessita apresentar rigidez suficiente para resistir à deformação e ser flexível o suficiente para absorver energia. Essas particularidades são alcançadas uma vez que o osso apresenta sua porção cortical (compacto) e esponjosa (medular) (WEATHERHOLT; FUCHS; WARDEN, 2012).

O osso cortical tem baixa porosidade (os poros microscópicos constituem aproximadamente 10% do volume total de osso cortical) o que concede a este osso grande resistência à compressão, estando mais associado à função mecânica, enquanto o osso esponjoso apresenta alta porosidade em relação ao osso cortical, com poros constituindo 50 a 90% do volume ósseo trabecular relacionado com as funções metabólicas (MARX; GARG, 1998; WEATHERHOLT; FUCHS; WARDEN, 2012).

Casos de grandes defeitos ósseos seja por trauma, doença periodontal, defeitos anatômicos ou congênitos (MARDAS et al., 2008) apresentam-se como um problema clínico desafiador, principalmente quando a capacidade regenerativa fisiológica é excedida (BURG; PORTER; KELLAM, 2000).

A cicatrização local de lesões depende do tipo e da natureza do tecido lesado. O processo de regeneração ocorre quando há restituição de um tecido sem distinção do tecido de origem com o novo tecido, isto é, quando não há cicatriz. Tal processo ocorre somente no fígado e no tecido ósseo (MILORO, 2013).

Diante de defeitos, ocorre uma série de eventos celulares que devem resultar na reposição tecidual. O primeiro desses eventos é o preenchimento do defeito por coágulo sanguíneo, o que é de fundamental importância para o acontecimento das fases seguintes. Em seguida ações integradas de diferentes células em uma

sequencia de fases ocorre: inflamação, migração, diferenciação e proliferação de células osteogênicas, síntese de matriz extracelular (MEC), mineralização da matriz osteóide, maturação e remodelação óssea. Ou seja, o coágulo é progressivamente reabsorvido e substituído por novo tecido ósseo durante a cicatrização (ABREU et al., 2016).

A regeneração óssea alveolar é um processo biológico complexo que desperta interesse e muitas modalidades de tratamentos podem ser usadas para melhorar a cicatrização óssea (OBRADOVIĆ et al., 2009; MARIANO et al., 2010; GARCIA et al., 2013; PENTEADO et al., 2013). A oportunidade de restaurar defeitos ósseos representa um avanço significativo no tratamento de várias condições clínicas (BALDINI; DE SANCTIS; FERRARI, 2011).

A recuperação das estruturas perdidas é almejada com o uso de enxertos ósseos. Idealmente, os substitutos ósseos devem ser gradualmente degradados e substituídos por osso recém formado, o que torna a regeneração óssea um desafio importante na prática clínica. Estima-se que 500.000 procedimentos de enxerto ósseo sejam realizados anualmente nos EUA e mais de 2 milhões em todo o mundo (RENNO, 2013). Ao inserir um material de enxerto (biológico ou sintético) em defeitos ósseos procura-se conseguir um suporte para um novo crescimento ósseo, tanto na superfície como no interior do enxerto. E deseja-se com isso que o enxerto seja reabsorvido de maneira controlada e previsível sendo substituído concomitantemente por novo osso do hospedeiro (MACNEILL et al., 1999).

Entre os materiais para enxertia, o osso autógeno há muito tempo é considerado o material ideal, padrão ouro, em cirurgias reconstrutivas por possuir propriedades osteogênicas, osteoindutivas e osteocondutoras (ALMEIDA et al., 2016; JONASSON, 2017).

A osteogênese é a propriedade relacionada com a capacidade que o enxerto possui de formar novo osso a partir de células viáveis presentes no próprio enxerto. Osteoindução é a presença de substâncias indutoras no enxerto que estimulam células formadoras de osso, podem induzir em células não diferenciadas do hospedeiro uma diferenciação osteoblástica (BRUNSVOLD; MELLONIG, 1993). Osteocondução é a propriedade que o material enxertado deve ter para conduzir as

células, fluidos e vasos sanguíneos, funcionando como uma estrutura em torno da qual ocorre crescimento do tecido ósseo, como um suporte (arcabouço) para a formação óssea (BALDINI; DE SANCTIS; FERRARI, 2011; ALMEIDA et al., 2016).

Segundo Hallman e Thor (2008) o enxerto de osso autógeno pode ser considerado um tecido parcialmente necrótico que, em um período de tempo desconhecido, passa por estágios de reabsorção, para depois atuar como um suporte para a formação de novo osso. Por outro lado, seu manuseio rápido e suave pode permitir a sobrevivência de células e a revitalização do enxerto *in situ*, sendo necessário um suprimento vascular a uma distância de 0,1 mm para que os osteócitos sobrevivam (DAVIES; HOSSEINI, 2000).

O enxerto autógeno pode apresentar-se de forma particulada ou em bloco e dependendo do seu lugar de origem, pode incluir uma característica mais cortical ou medular. Enxertos ósseos esponjosos podem ter uma maior probabilidade de suportar a sobrevivência celular, devido à possibilidade de difusão de nutrientes e revascularização do leito receptor (HALLMAN; THOR, 2008). Embora o osso cortical seja menos rico em osteoblastos, têm grandes propriedades osteocondutoras e fatores de crescimento (MISCH; MISCH-DIETSH, 2008).

Embora seja considerado material ideal, por necessitar de uma segunda área cirúrgica, a qual pode apresenta-se viável ou não, e aumentar a morbidade da cirurgia, a necessidade clínica por materiais alternativos ao osso autógeno esta aumentada e o interesse das empresas no fornecimento de materiais para regeneração óssea é estimulado (RENNO, 2013; FAVERANI et al., 2014). Recentes avanços estão proporcionando acesso a uma diversidade de biomateriais, contudo, o biomaterial ideal para enxertia ainda não foi identificado (ANDERSON, 2016).

2.3 MATERIAL ALOPLÁSTICO - VIDRO BIOATIVO

O vidro bioativo foi descoberto em 1969 por Larry L. Hench, um engenheiro especialista em cerâmica, e resultou da busca de um material que formaria uma união com o tecido do hospedeiro, e não um tecido cicatricial ao seu redor. A idéia surgiu em 1967 da conversa com Klinker, coronel do Exército, que havia voltado de

uma missão no Vietnã na qual foram realizadas muitas amputações, uma vez que o corpo rejeitava o material disponível para os cirurgiões. Era necessário então um material que não fosse rejeitado pelo corpo humano. A partir desse momento, o engenheiro iniciou uma pesquisa e com ela apresentou um vidro que ligava-se tão bem ao osso de ratos que não era possível separá-los. Uma nova classe de biomateriais havia sido descoberta por Hench: a cerâmica bioativa (HENCH, 2006). Em seguida, foi estudado pela Universidade da Flórida de 1969 a 1979. A aplicação clínica no campo odontológico teve início em 1980 (KONG et al., 2018) e vem sendo utilizado desde então (RENNO, 2013).

A maioria dos biovidros apresentam como composição básica SiO₂ (Dióxido de Silício), CaO (Óxido de Cálcio), Na₂O (Óxido de Sódio), e P₂O₅ (Pentóxido de Difósforo). Dividida em 45% de SiO₂, 24,5% de CaO, 24,5% Na₂O e 6%P₂O₅ (HENCH, 1998; KONG et al., 2018). Pela presença do componente silício, presente no vidro industrial, foi dada a denominação de cerâmica de vidro (HENCH, 1973), e por ser um material que consegue uma resposta biológica específica, resultando na união entre tecido do hospedeiro e o material, é acompanhado do termo bioativo (HENCH, 1989).

É um biomaterial caracterizado por sua alta capacidade de se ligar aos tecidos do hospedeiro (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; VIVAN et al., 2016). Quando entra em contato com os fluidos corporais passa por um processo de trocas iônicas. (SANTOS et al., 2010; ALMEIDA et al., 2016). Seu mecanismo ação está associado à dissolução do vidro com a liberação de íons de sódio e cálcio, antes da deposição de uma camada de hidroxiapatita em sua superfície. (KONG et al., 2018). Além de formar uma camada gelatinosa rica em sílica em sua superfície a qual também apresentam íons de cálcio e fosforo. Essas camadas são consideradas essenciais para a adesão de fibras colágenas e diferenciação de células osteoprogenitoras na superfície do material (MONTAZERIAN; DUTRA ZANOTTO, 2016; O'FLYNN; STANTON, 2011; STANTON et al., 2009) uma vez que são biologicamente ativas e seus subprodutos degradados de cálcio e de íons de silício estimulavam a proliferação e diferenciação de osteoblastos (VALERIO et al., 2004; HOPPE; GULDAL; BOCCACCINI, 2011; KONG et al., 2018; RENNO, 2013).

Um material é considerado bioativo quando ao ser implantado em um tecido propicia ou induz respostas biológicas que levam à união dos mesmos (ALMEIDA et al., 2016). O vidro bioativo apresenta alto nível bioativo propriedade comprovada em estudos *in vitro* e *in vivo*. (DOS SANTOS PEREIRA et al., 2016; BLOCK; KENT, 1997; VIVAN, 2016).

O vidro bioativo faz parte do grupo dos materiais aloplásticos, é composto basicamente por sílica, e seu tamanho de partícula pode variar de 300-355 µm. É lentamente reabsorvido pelo organismo, pode levar até 24 meses aproximadamente para que o enxerto seja substituído pelo osso neoformado (STAVROPOULOS, 2003; ALMEIDA et al., 2016) fator que deve ser considerado no cálculo do tempo de cicatrização do enxerto (TADJOEDIN et al., 2000; TURUNEN et al., 2004) e planejamento clínico.

Esse biomaterial possui vantagens como baixo custo, quantidade ilimitada, facilidade de manuseio, grânulos uniformes e por ser um material sintético absorvível, apresenta-se livre de riscos de transmissão de doenças. Como desvantagens, apresenta taxa de reabsorção variável e não possui a propriedade de osteoindução (ALMEIDA et al., 2016; MENEZES et al., 2018).

É um material osteocondutor, pois atua como um arcabouço, favorecendo a aderência e proliferação de osteoblastos, para que o reparo e crescimento ósseo sejam obtidos (FROUM et al., 2002; FURUSAWA et al., 1998; LEONETTI et al., 2000; PIATTELLI et al., 2000). Além disso, apresenta uma propriedade particular, a osteoestimulação. Shepers et al., em 1991, observou na porção interna do grânulo do biomaterial crateras que se assemelhavam-se biologicamente a um tecido ósseo, porém não apresentava conexão com o osso da parte externa da partícula. Algumas fissuras se formam na camada rica em sílica pela fratura da camada cálcio e fósforo nas partículas, permitindo que células fagocitárias penetrem e ocorra atividade fagocitária. Células osteoprogenitoras chegam nestas fissuras, uma vez que encontram um ambiente biológico semelhante ao tecido ósseo, e se diferenciam em osteoblastos (SHEPERS et al., 1997; FROUM et al., 2002; FURUSAWA et al., 1998; ALMEIDA et al., 2016). Ou seja, há um aumento da proliferação óssea no interior da partícula da cerâmica de vidro, sem conexão com o osso pré-existente do sítio cirúrgico (KONG et al., 2018).

Um estudo clínico realizado por Tadjoeidin et al. 2000, avaliou a capacidade regenerativa das partículas do vidro bioativo em cirurgias de levantamento do assoalho do seio maxilar. Um total de 10 pacientes edêntulos, que foram submetidos às cirurgias nas quais, aleatoriamente, o lado direito ou esquerdo recebeu uma mistura em proporção de 1:1 de partículas de Biogran® e osso autógeno e o outro lado apenas osso autógeno (grupo controle). Foi obtido o material para análise histomorfométrica em 4, 5, 6 e 16 meses. Os autores chegaram à conclusão que a mistura dos materiais apresentou resultados mais favoráveis em relação ao grupo controle (osso autógenos) desde que pelo menos 6 meses de tempo de cicatrização sejam aguardados.

O uso do vidro bioativo para cirurgia de levantamento de seio maxilar também foi avaliado por Menezes et al. (2018). Os autores propuseram avaliar a formação e manutenção óssea da mistura entre osso autógeno e vidro bioativo ao comparar com os grupos os quais utilizaram apenas osso autógeno nas cirurgias. As análises histomorfométrica e imunohistoquímica foram realizadas após 6 meses, e os autores não obtiveram diferença estatística significativa, ou seja apresenta manutenção do volume, nova formação óssea e atividade osteoclástica do grupo que usou a mistura foi semelhante com o grupo de enxerto de osso autógeno apenas, sugerindo que a combinação entre enxerto ósseo e vidro bioativo pode ser usada com segurança como um substituto ósseo para a elevação do seio maxilar.

Ao avaliar o efeito do plasma rico em plaquetas (PRP) associado ao vidro bioativo ou ao osso bovino inorgânico, Bassi e Carvalho (2011) não obtiveram um efeito significativo no processo de reparo de cavidades ósseas, porém nos grupos que utilizaram o vidro bioativo foi observado grânulos circundados por tecido ósseo neoformado e quando comparado o grupo associado ao PRP, pode-se observar que a associação foi mais efetiva que o grupo isolado. Camarini et al. (2009) ao avaliar também a associação de biomateriais (vidro bioativo e osso bovino) à PRP na formação óssea, concluíram que a associação parece favorecer o processo de reparo ósseo.

Ao comparar o uso do vidro bioativo com o osso bovino desproteínizado na regeneração óssea guiada, Stavropoulos et al. (2003) mostrou que nenhum dos grupos dos dois biomateriais teve grande volume de osso neoformado quando

comparado com o grupo controle, o qual não utilizou nenhum biomaterial, porém, mostrou que mesmo com a formação óssea prejudicada pela implantação desses biomateriais o uso dos mesmos como auxiliares ao processo de regeneração óssea pode ser vantajoso em situações que envolvem o risco de colapso da membrana, pois segundo os autores o uso de substitutos ósseos podem servir como suporte para membrana em casos de regeneração e impedem seu colapso.

Pereira et al. (2017) avaliaram o uso do vidro bioativo (Biogran®), osso autógeno e a associação entre os dois tipos de enxerto (1:1) em cirurgias de levantamento de seio maxilar. No estudo não foi observada diferença na neoformação óssea entre os grupos. Essa semelhança no comportamento histomorfométrico e celular indica que ambos os enxertos permitem a colocação de implantes dentários na região. O uso de Biogran® e sua combinação com enxerto ósseo autógeno na proporção de 1: 1 apresentou resultados semelhantes ao enxerto ósseo autógeno isoladamente, o que torna ambos os tipos de enxerto alternativas para cirurgias de levantamento de seio maxilar.

Moreira et al. (2018) avaliou o efeito do laser na cicatrização de defeitos ósseos críticos com diâmetro de 5mm em calvária de ratos preenchidos com osso autógeno ou vidro bioativo. Os autores observaram que o vidro bioativo, assim como osso autógeno, não foram influenciados pela aplicação do laser não demonstrando aumento na área de neoformação em ambos os grupos.

2.4 MATERIAL XENÓGENO - OSSO BOVINO

O enxerto de osso bovino é classificado como um substituto ósseo xenógeno. É uma hidroxiapatita natural na qual seus componentes orgânicos foram totalmente removidos de forma química. Sem a parte orgânica, a preocupação com reações imunológicas torna-se inexistente (ALMEIDA et al., 2016). A estrutura inorgânica restante fornece uma matriz arquitetônica natural com macroporos de dimensão similar ao osso esponjoso natural (KLINGE et al., 1992) e semelhança morfológica ao osso humano (HALLMAN; THOR, 2008). Por se tratar de um material acelular e desproteínizado é bem aceito pelo organismo humano (ALMEIDA et al., 2016).

O Bio-Oss® é o substituto ósseo de origem bovina mais utilizado (TRAINI et al., 2007; HAMMERLE et al., 1998; STAVROPOULOS et al., 2003; BERGLUNDH; LINDHE 1997; LI; ZHU; HUANG, 2018). A estrutura física dos seus poros possibilita estabilização do coágulo e revascularização, o que favorece a migração de osteoblastos e osteogênese, e torna o material um excelente osteocondutor (RASOULI GHAHROUDI et al., 2014). Mesmo com a ausência de materiais orgânicos, possui cristais de hidroxiapatita e com isso permite a fixação dos osteoblastos e a subsequente deposição de matriz óssea (TAPETY et al., 2004). Apresenta-se como uma excelente fonte de cálcio, fator expressivo para o processo de cicatrização do tecido ósseo (HOEXTER, 2002; ALMEIDA et al., 2016).

Contém macroporos, microporos e espaços intracelulares (3-26 nm) (TAPETY et al., 2004; PEETZ, 1997), que proporcionam ao material uma grande porosidade e uma ampla área de superfície interna (TAPETY et al., 2004). Sua porosidade assemelha-se entre 75% e 80% a do osso humano (ALMEIDA et al., 2016).

A reabsorção das partículas do osso bovino desproteinizado por meio da atividade osteoclástica é um tópico de controverso (HALLMAN; THOR, 2008). Dados divergentes estão presentes na literatura. Há relatos de que as partículas não são reabsorvidas (DIÈS et al., 1996; WENZ; OESCH; HORST, 2001; HURZELER et al., 1997) assim como há relatos de que sinais de reabsorção ao longo do tempo (WALLACE; FROUM; TARNOW, 1996; TADJOEDIN, 2003; HAMMERLE et al., 1998).

Traini et al. (2007) após 9 anos do uso do osso bovino inorgânico em cirurgia de levantamento de seio maxilar, observaram, apesar da presença de partículas, que as mesmas apresentavam-se com crescimento ósseo em contato direto sobre as partículas nas análises histológica e histomorfométrica.

Lindhe et al. (2014) também demonstrou que partículas desse substituto ósseo não são totalmente reabsorvidas ao analisar cavidades de extração após 6 meses que foram enxertadas com osso ósseo bovino desproteinizado. O biomaterial apesar de não reabsorvido, apresentava-se cercado por novo osso e a presença das partículas nos alvéolos pode ser o motivo pelo qual os locais de extração enxertados não sofreram alterações dimensionais. Da mesma forma, Fickl et al. (2008)

demonstrou que ao preencher alvéolos de extração com Bio-Oss Collagen®, a manutenção da dimensão do processo alveolar após 4 meses da extração dentária foi significativamente maior quando comparada com o grupo sem o uso do biomaterial.

Embora tenha sido demonstrado que as partículas desse substituto ósseo não são reabsorvidas completamente, mesmo em longos períodos de tempo, o mesmo tem sido amplamente utilizado com resultados efetivos na formação óssea (VALENTINI et al., 2000; FERREIRA et al., 2009; TETSCH; TETSCH; LYSEK, 2010; NEVINS et al., 2011).

Cunha e colaboradores (2014), também observaram resultados positivos ao associar osso bovino inorgânico (Bio-Oss®) e osso autógeno ao laser de baixa intensidade, dado que, houve maior formação de novo osso nos grupos irradiados quando comparado ao controle e aos demais grupos não irradiados (Osso autógeno e Bio-Oss® isoladamente).

Ao inserir um material de enxerto biológicos ou sintéticos em um defeito ósseo, o objetivo principal é conseguir um suporte para novo crescimento ósseo, tanto na superfície como no interior do enxerto. Além disso, espera-se uma reabsorção controlada e previsível do material do enxerto que leve à sua substituição pelo novo osso hospedeiro (MACNEIL, 1999).

2.5 LASER

Desde os primórdios da civilização, com crenças religiosas e superstições em diferentes culturas, a luz vem sendo utilizada de forma terapêutica. Tornou-se então alvo de dedicação de cientistas renomados a ponto de destinar-se uma área do saber da Física aos estudos luminosos, a Óptica (PINHEIRO, 2010; SUN; TUNÉR, 2004).

Embora Einstein com seu tratado *“Zur Quantum Theorie der Stralung”* tenha realizado o desenvolvimento teórico do laser em 1916, o primeiro laser foi demonstrado em 1960 por Theodore Maiman e, desde então, nas últimas quatro

décadas, o uso do laser vem crescendo vertiginosamente nas mais diversas áreas da Medicina e da Odontologia. A palavra Laser é um acrônimo de “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation” e é traduzida como amplificação da luz por emissão estimulada de radiação (PINHEIRO, 2010; BASHARDOUST TAJALI, 2010).

Os lasers podem ser de alta intensidade, os quais rompem permanentemente os tecidos, ou de baixa intensidade, com o qual ocorre a regulação das funções fisiológicas das células modulando as respostas fisiológicas das mesmas (ROYNESDAL et al., 1993), sendo identificados como lasers cirúrgicos e terapêuticos, respectivamente (SUN; TUNÉR, 2004).

O tecido ósseo tem boa capacidade de regeneração, porém dependendo do tamanho do defeito ou algum estado de doença, essa habilidade pode ser prejudicada ou perdida (WALMSLEY et al., 2016). Devido a esse fato pesquisadores têm buscado encontrar uma terapia que possa melhorar sua capacidade de cicatrização.

A irradiação de tecidos com laser de baixa intensidade produz efeitos fisiológicos a nível celular significativos (BELKIN; SCHWART, 1989) e tornou-se foco na regeneração óssea (FATEN; FAWZY; MIKHAI, 2018). A energia luminosa ao incidir no tecido vivo é absorvida pelos fotorreceptores celulares, os citocromóforos, convertida pelas mitocôndrias em ATP, gerando aumento estimulado na produção de ATP e maior atividade celular. Consequentemente, a atividade celular dos fibroblastos, os quais estão envolvidos na cicatrização de tecidos, é aumentada e possivelmente a síntese de colágeno e angiogênese também. Outra parte da energia incidente é convertida em calor, o que aumenta a micro-circulação local através da vasodilatação (PARKER, 2007). Exercendo efeitos de bioestimulação ou fotobiomodulação nas células (WEBER, 2006).

Em consequência desse fornecimento de energia bioestimuladora direta de luz para as células do corpo, há rápidas proliferações celulares, migração de fibroblastos e decorrente produção de matriz óssea estimulando dessa forma o reparo de defeitos ósseos (SUN; TUNER, 2004).

De acordo Pinheiro e Gerbi (2006), o efeito estimulador da irradiação do laser no tecido ósseo é mais eficaz quando aplicado nos estágios iniciais do tratamento, nesse momento a proliferação de fibroblastos, osteoblastos e diferenciação inicial das células mesenquimais é aumentada. Demonstraram também que ao comparar osso irradiado pelo laser com o osso não irradiado, o mesmo teve aumento na deposição de colágeno e neoformação óssea. Os benefícios da irradiação do laser em processos de reparo ósseo foram relatados também em outros estudos (BOSCO, 2016; KULKARNI, et al., 2018; MIKHAIL et al., 2018; ÇIRAK, et al., 2018; FREITAS et al., 2018).

Em uma revisão sistemática, Santinoni et al. (2017) ao avaliarem o efeito da terapia com laser de baixa intensidade na regeneração óssea da região maxilofacial, observaram que além dos seus efeitos antiinflamatórios, analgésicos e sua capacidade de acelerar a cicatrização, houve melhora na qualidade óssea dos defeitos ósseos maxilofaciais no pós operatório, sugerindo esta ser uma terapia promissora, fácil de usar e de custo relativamente baixo.

Bosco et al. (2016) avaliaram o efeito do laser de baixa intensidade e a influência de sua incidência na reabsorção das partículas de enxerto ósseo bovino (Gen Mix Baumer S.A., São Paulo, SP, Brazil) em defeitos criados em calvária de ratos de tamanho crítico de 10 mm e observaram que o laser não mostrou ser capaz de acelerar a reabsorção das partículas do biomaterial, porém houve melhora no processo de formação óssea nos defeitos irradiados preenchidos ou não com osso bovino.

Existem sistemas de laser usados para bioestimulação com diversos meio ativos, os quais incluem laser de diodo de argônio, HeNe, gálio-alumínio, Nd: YAG e o arseneto de gálio-alumínio (GaAlAs) (KANG; CHUNG, 2009). Aparelhos que possuem como meio ativo o GaAs ou GaAlAs, são conhecidos por possuírem alta capacidade de penetração nos tecidos quando comparado com outros tipos de lasers (NISSAN et al., 2006; TORRICELLI, 2001). Cirak et al. (2018) observou maior eficiência de penetração do laser GaAlAs em comparação com o laser HeNe, fornecendo com isso resultados melhores na cicatrização óssea em um período de 30 dias.

O laser com meio ativo GaAlAs também apresentou bons resultados quando aplicado em fêmur de ratos osteopênicos e normais com implantes de titânio. Houve melhora no processo de osseointegração e formação óssea, principalmente na fase inicial da cicatrização (DE VASCONCELLOS et al., 2014).

A associação do laser de baixa intensidade com células tronco na regeneração óssea em coelhos foi avaliada por Fekrazad et al. (2015) que concluíram que apesar da irradiação com laser não levar a um efeito significativo sobre as células tronco, sua aplicação levou a significativa redução na inflamação e mostrou-se eficaz na regeneração óssea.

Em uma revisão sistemática e meta análise de estudos em animais que utilizaram o laser de baixa intensidade na cicatrização de defeitos ósseos Bashardoust Tajali et al. (2010) pôde observar que a terapia a laser de baixa intensidade melhora as propriedades biomecânicas do tecido ósseo no processo de cicatrização, porém a ausência de parâmetros dificulta comparações eficientes com relação à dosimetria empregada.

Dosagens muito baixas podem resultar em nenhum efeito, ao passo que, uma dosagem muito alta pode levar a efeitos inibitórios nas atividades celulares (HAWKINS; ABRAHAMHAM, 2006). Tem sido sugerido que o efeito bioestimulador do laser pode acontecer em células tumorais, no entanto mecanismos fisiológicos ainda não são bem definidos uma vez que diferentes tipos de linhagem celular respondem de maneiras diferentes à aplicação do laser com comprimentos de onda e doses específicas (RENNO et al., 2007). Assim Protocolos de uso do laser precisam ser padronizados para chegar em conclusões mais específicas.

Foi avaliado o efeito terapêutico do laser sobre uma membrana de poliestireno recoberta com norbixina e colágeno na cicatrização óssea de defeitos em calvária de rato. A membrana, apesar de reduzir o infiltrado inflamatório na região do defeito e servir como base para o processo de reparo ósseo, não teve suas propriedades melhoradas quando irradiada pelo laser. Nos grupos irradiados apenas com o laser, apresentaram efeitos positivos no processo de reparo ósseo (ALVES et al., 2018). Pinheiro et al. (2003) também associou o laser ao osso bovino

e membrana para regeneração óssea guiada e observou, independente da utilização da membrana, efeito positivo nos grupos irradiados e associados ao biomaterial.

Os efeitos do uso do laser de baixa intensidade vêm sendo amplamente manifestados no processo de reparo tecidual, tornando-se foco de pesquisas (MIKHAIL, 2018; BOSCO, 2016; DE VASCONCELOS, 2014; BASHARDOUST TAJALI et al., 2010; DE ALMEIDA et al., 2014), porém ainda não existem parâmetros universalmente aceitos quanto à sua utilização.

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito fotobiomodulador do laser de baixa intensidade na regeneração de defeitos ósseos tratados com osso autógeno e diferentes biomateriais.

Hipótese nula: não há diferença no efeito do laser de baixa intensidade na cicatrização de defeitos críticos em calvária de ratos preenchidos com osso autógeno, vidro bioativo (Biogran®) ou osso bovino (Bio-Oss®).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (CEEPA- Proc N° 017/2016) (anexo 1).

4.1 MODELO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 80 ratos machos (*Rattus norvegicus, albinus*, Wistar), com peso entre 250g e 300g (Universidade de São Paulo – USP, do Biotério Central da Faculdade de Odontologia do Campus de Bauru – SP). Os animais foram mantidos em ambiente climatizado, com ciclo de 12 horas de luz por dia e temperatura entre 22 e 24° C. Os animais, durante todo o experimento, consumiram ração sólida selecionada e água *ad libitum* e foram aleatoriamente divididos em oito grupos experimentais (n=10): **1) Grupo C** (Controle - coágulo sanguíneo), **2) Grupo LB** (Laser de baixa intensidade - TheraLase DMC®, São Carlos, SP, Brasil), **3) Grupo OA** (Osso autógeno), **4) Grupo OALB** (Osso autógeno + laser de baixa intensidade), **5) Grupo VB** (Vidro bioativo - Biogran®, Biomet 3i, USA), **6) Grupo VBLB** (Biogran® + laser de baixa intensidade), **7) Grupo BO** (Osso bovino - Bio-Oss® - (0,25-1mm) Geistlich Pharma AG., Wolhusen, Switerland) e **8) Grupo BOLB** (Bio-Oss® +laser de baixa intensidade).

4.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

O procedimento cirúrgico foi realizado por apenas um operador previamente calibrado (DE ALMEIDA et al., 2014). Após a confecção do defeito, o tratamento a ser realizado foi aleatorizado (por sorteio) por um outro membro da equipe. Desta forma, tanto o operador quanto o responsável pela aplicação do LB desconheciam o tratamento a ser realizado no momento da realização do defeito cirúrgico.

Para realizar os procedimentos experimentais, os ratos foram anestesiados por injeção intramuscular de 0,02 ml/kg de xilazina (Vetbrands, Paulínia, Brasil) e 0,4 ml/kg de cloridrato de quetamina (Vetbrands, Paulínia, Brasil). Após tricotomia e antissepsia da parte dorsal do crânio de cada animal, foi realizada incisão semilunar na calvária e deslocado um retalho de espessura total em direção posterior (Figura 1 e 2).

Figura 1. Após tricotomia e antissepsia com PVPI.

Figura 2. Incisão semilunar e retalho total deslocado em direção posterior.

Um defeito de 5 mm de diâmetro (defeito de tamanho crítico) foi criado com uma broca trefina (Neodent, Curitiba, Paraná, Brasil) em baixa rotação, sob irrigação abundante com solução salina estéril com auxílio de um guia cirúrgico confeccionado previamente (Figura 3). Foi preservada a dura-máter durante a remoção do tecido ósseo (osso parietal) mantendo e preservando a integridade do encéfalo (DE ALMEIDA et al., 2014; CUNHA et al., 2014; MOREIRA et al., 2018; FREITAS et al., 2018).

Figura 3. Guia cirúrgico em posição para realização do DTC.

Uma marcação 2 mm anterior e outra 2 mm posterior às margens do defeito cirúrgico, em forma de “L”, foi criada com broca carbide tronco-cônica FG-700 (Microdont Micro Usinagem de Precisão Ltda., São Paulo, Brasil) sob irrigação contínua com solução salina estéril as quais foram preenchidas com amálgama posteriormente (Figura 4). O maior eixo do “L” estava localizado sobre uma linha imaginária longitudinal que dividia o defeito cirúrgico ao meio (ALMEIDA et al., 2014; CUNHA et al., 2014). As marcações foram úteis para a identificação do meio do defeito cirúrgico original durante o processamento laboratorial e, também, para localizar as suas margens ósseas originais durante a análise histométrica (ALMEIDA et al., 2014; CUNHA et al., 2014; MOREIRA et al., 2018; FREITAS et al., 2018).

Figura 4. Marcações em “L” preenchidas com amálgama.

Os defeitos foram então preenchidos com o que foi determinado para cada grupo, o retalho foi reposicionado e suturado com fio de seda 4-0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brasil) e em seguida todos os animais receberam uma injeção intramuscular de 24.000 unidades de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico* Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge® Saúde Animal Ltda., Campinas, SP) e dose intramuscular de 0,3 mg/kg de Cetoprofeno (Laboratório Teuto Brasileiro S.A., Anápolis, Goiás, Brazil) (LIU, RAHAMAN, FU, 2013).

4.3 PROTOCOLO DE APLICAÇÃO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE

O laser Thera Lase DMC® com meio ativo GaAlAs, comprimento de onda de 808nm, potência de 100mW, densidade de energia de 210J/cm² foi aplicado em modo de emissão contínua, em quatro pontos na superfície do defeito cirúrgico criado e um ponto central, totalizando cinco pontos. Cada ponto recebeu uma dose de energia de 6J com tempo de aplicação de 60 segundos por ponto. As aplicações foram realizadas apenas uma vez após a confecção do defeito cirúrgico. No grupo LB, a aplicação foi realizada após o preenchimento com coágulo sanguíneo e a aplicação central foi realizada sobre o coágulo, enquanto nos grupos que receberam enxertos ósseos (osso autógeno, vidro bioativo e osso bovino) a aplicação central foi realizada após preenchimento do defeito com o material.

As aplicações foram realizadas seguindo um protocolo padronizado e os pontos de aplicação foram realizados na superfície do defeito seguindo as posições “do relógio” (12h, 3h, 6h, 9h) além do ponto central (DE ALMEIDA et al., 2014; CUNHA et al., 2014; MOREIRA et al., 2018; FREITAS et al., 2018) (Figura 5).

Figura 5. Protocolo de aplicação do laser.

4.4 PROCESSAMENTO TECIDUAL

Aos 30 dias pós-operatórios, os animais foram submetidos à eutanásia, com 5 mg/ml da associação de cloridrato de quetamina e xilazina. A área do defeito cirúrgico original e os tecidos circunjacentes foram removidos em bloco. As peças foram fixadas em solução de formol neutro a 10%, lavadas em água corrente e descalcificadas em solução de Ácido Etilenodiaminotetracético - EDTA a 18% (Titriplex® III, Merck, EUA). Terminada a descalcificação, cada peça foi dividida longitudinalmente em dois blocos, exatamente ao longo do centro do defeito cirúrgico original, usando-se as marcações de amálgama como referência (maior eixo do “L”), depois cortes transversais foram feitos (menor eixo do “L”) determinando os limites do defeito cirúrgico original (Figura 6). As peças foram, então, processadas e incluídas em parafina (Histosec® pastilhas, Merck, EUA). Cortes seriados longitudinais foram realizados, com 6µm de espessura, iniciados a partir do centro do defeito cirúrgico original. Os cortes foram corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (H.E.) e Tricrômico de Masson (T.M.) para análises com microscopia de luz (DE ALMEIDA et al., 2014; CUNHA et al., 2014).

Figura 6. Processamento das peças. Peças divididas longitudinalmente em dois blocos usando as marcações de amálgama. Realizados cortes seriados longitudinais foram iniciados a partir do centro do defeito cirúrgico original.

4.5 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

As imagens provenientes de quatro cortes histológicos representando a área central do defeito cirúrgico dos oito grupos experimentais foram capturadas com câmara digital SPOT RT3 – 2540 Color Slider 2.0Mp (SPOT ImagingSolutions, Diagnostic Instruments, Inc., Sterling Heights, EUA) acoplada ao microscópio Olympus BX50 (Olympus Corporation, Tóquio, Japão), e salvas no computador.

A análise histomorfométrica foi realizada por meio de imagem no computador, utilizando o “software” ImageLab 2000 (DiraconBio Informática Ltda., Vargem Grande do Sul, SP, Brasil).

Em cada imagem foi delimitada a área a ser analisada, correspondente à região do osso da calvária onde o defeito foi originalmente criado, denominada Área Total (AT). Considerando o comprimento total do espécime de 9mm, foram medidos 2mm a partir de cada extremidade, para determinar os limites do defeito cirúrgico

original (5 mm). Dentro da AT, foram delimitadas as áreas de osso neoformado (AON) e também as áreas de partículas remanescentes dos materiais implantados (APR). A AT foi medida em mm² e representou 100% da área a ser analisada. AON e APR também foram medidas em mm² e calculadas como porcentagens da AT (MESSORA et al., 2008, DE ALMEIDA et al., 2014, CUNHA et al., 2014) (Figura7).

Figura 7. Delimitação da área total (AT) do defeito cirúrgico original delineada pela linha amarela. Área de osso neoformado (AON) delineada pelas linhas vermelhas e da área de partículas remanescentes (APR) delineadas pelos desenhos azuis.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para cada animal, os valores de AON e APR foram representados pela média aritmética dos quatro cortes histológicos mais centrais da calvária. Foram analisadas a normalidade e homocedasticidade dos dados. Todas as variáveis seguiram distribuição normal. Dessa forma, o teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey foram utilizados para identificar as diferenças entre os grupos. O nível de 5% de significância foi adotado, para todos os testes.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Durante o processamento laboratorial foram perdidos um espécime dos grupos C e OA, dois dos grupos VB e OALB e três do grupo VBLB e LB.

5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Não foi observado infiltrado inflamatório significativo no pós-operatório de 30 dias em nenhum dos espécimes. A formação de novo osso ocorreu em extensão variável nos diferentes grupos tratados. O fechamento completo do defeito não foi observado em nenhum dos espécimes (Figura 8).

C

LB

OA

OALB:

VB:

VLB:

BO:

BOLB:

Figura 8 – Fotomicrografia dos grupos C (Controle), LB (Laser), OA (Osso autógeno), OALB (Osso autógeno + laser), VB (Biogran®), VLB (Biogran® + laser), BO (Bio-Oss®) e BOLB (Bio-Oss® + laser). Visão panorâmica dos grupos, é possível visualizar a extensão variada de novo osso entre o grupos tratados e espessuras das calvárias. 4x, HE.

Grupo C: Quase toda extensão do defeito cirúrgico estava ocupada por tecido conjuntivo frouxo, com fibras colágenas paralelas. Foi observado formação de novo osso apenas nas extremidades do defeito original (Figura 9). A espessura da calvária original não foi restabelecida em nenhum espécime.

Figura 9 - Grupo C. Presença de osteócitos (asterisco) indicando formação de novo osso na extremidade do defeito cirúrgico com fibroblastos (FB) dispostos paralelamente ao redor, indicativo de síntese. Presença de tecido conjuntivo frouxo (40x).

Grupo LB: Maior quantidade de neoformação óssea estendendo-se em direção ao centro do defeito cirúrgico foi observada, além da presença de tecido conjuntivo fibroso bem organizado, com fibras colágenas dispostas de forma paralela (Figura 10). Não foi restabelecida a espessura original da calvária em nenhum dos espécimes.

Figura 10 - Grupo LB. (A) Extremidade do defeito com formação de novo osso, é possível observar osteócitos na matriz (asterisco) (20x). (B) Região central do defeito cirúrgico, com fibras colágenas e fibroblastos dispostos de forma paralela. (20x).

Grupo OA: Presença de novo osso se estendendo em direção ao centro do defeito cirúrgico. Na região do defeito cirúrgico foi observada presença de tecido conjuntivo fibroso organizado com fibras colágenas paralelas e poucas partículas de enxerto foram observadas (Figura 11).

A

B

Figura 11 - Grupo OA. (A) Extremidade do defeito com presença de osso neoformado e osteócitos na matriz (seta) (20x). (B) Região central do defeito cirúrgico, com tecido conjuntivo fibroso ao redor das partículas. É possível observar início de formação de novo osso ao redor da partícula (setas) (20x).

Grupo OALB: O novo osso estava presente em extensões variáveis. Observou-se poucas partículas remanescentes de enxerto ósseo e tecido conjuntivo fibroso bem organizado ao redor. Não houve manutenção da espessura da calvária.

Figura 12 - Grupo OALB. (A) Partícula de osso autógeno, área de início de formação óssea na periferia da partícula (seta) (20x). (B) Neoformação óssea na periferia do defeito em extensão ao centro do defeito cirúrgico (setas) (20x).

Grupo VB: Foi possível observar presença de tecido conjuntivo organizado com grande quantidade de células ao redor das partículas de vidro além de presença de novo osso apenas nas extremidades do defeito. Nota-se células migrando em direção ao centro das partículas (Figura 13) e a espessura da calvária foi mantida.

A

B

Figura 13 - Grupo VB.(A) Visão da extremidade do defeito em íntimo contato com as partículas do vidro (10x) (B) Região central do defeito cirúrgico, com tecido conjuntivo fibroso ao redor das partículas. Partículas de Biogran® com migração de células para seu interior (setas) (20x).

Grupo VBLB: Foi observado maior tendência de migração do tecido conjuntivo para o interior das partículas do Biogran®. Formação de novo osso em direção ao centro do defeito cirúrgico criado (Figura 14).

A

B

Figura 14 - Grupo VBLB. (A) Partículas de Biogran® com migração do tecido conjuntivo para seu interior (setas) (40x). (B) Partículas rodeadas por tecido conjuntivo fibroso e neoformação óssea em direção ao interior do defeito cirúrgico(seta) (20x).

Grupo BO: Observou-se que o defeito estava preenchido quase totalmente por partículas de Bio-Oss®. Foi encontrado novo osso apenas nas extremidades do defeito. Presença de tecido conjuntivo fibroso, organizado envolvendo as partículas. A espessura original da calvária foi mantida, apesar de pouca quantidade de osso neoformado (Figura 15).

A

B

Figura 15 - Grupo BO. (A) Região central do defeito cirúrgico com preenchida com partículas rodeadas por tecido conjuntivo o que manteve a espessura da calvária (10x). (B) Região central do defeito cirúrgico, com fibras colágenas ao redor das partículas de Bio-Oss® (setas). É possível observar início de atividade de reabsorção da partícula (asterisco) (20x).

Grupo BOLB: Foi observado presença de tecido conjuntivo bem organizado ao redor das partículas de Bio-Oss®, as quais ocupavam parte do defeito original (Figura 16). Ocorreu a formação de osso novo nas extremidades do defeito em extensão ao centro. Em todos os espécimes a espessura da calvária original foi restabelecida.

A

B

Figura 16 - Grupo BOLB. (A) Neoformação óssea na extremidade em direção ao centro do defeito cirúrgico (setas). Presença de vasos sanguíneos (V) (20x). (B) Região central do defeito cirúrgico, com tecido conjuntivo fibroso bem organizado ao redor das partículas de Bio-Oss® (asteriscos) (20x).

5.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística descritiva, com valores das médias e desvios padrão de AON estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Médias, desvios-padrão (DP), Q25, medianas e Q75 dos valores de área de osso neoformado (AON) em porcentagem (%).

Grupos	N	Médias	DP	Q25	Medianas	Q75
C	9	9,96	4,49	6,64	9,52	14,32
LB	7	47,67	8,66	43,96	44,58	55,41
OA	9	30,98	16,59	19,36	25,1	36,83
OALB	8	39,15	16,72	26,89	40,41	53,32
VB	8	24,41	5,69	21,5	25,7	29,06
VBLB	7	28,35	17,58	15,15	25,1	39,85
BO	10	11,36	7,88	6,22	9,49	16,66
BOLB	10	48,57	28,22	22,4	42,22	77,97

O grupo BOLB apresentou maior média de AON ($48,57 \pm 28,22$), seguido dos grupos LB ($47,67 \pm 8,66$) e OALB ($39,15 \pm 16,72$). Ao analisar as médias de AON, é possível observar que os grupos irradiados com laser, apresentaram maiores médias de AON quando comparados com os grupos sem laser. O menor resultado de AON foi apresentado pelo grupo C ($9,96 \pm 4,49$).

As comparações múltiplas de AON entre os grupos e as diferenças estão representadas na Tabela 2 e 3.

A análise comparativa das médias de AON do grupo LB com os demais grupos está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 - Comparação dos valores de AON (%) entre o grupo do LB e os demais grupos.

Grupos	Médias das diferenças	Intervalos de confiança
LB - C	-37,71*	62,14 – 13,28
LB - OA	16,69	-7,73 – 41,12
LB - OALB	8,52	- 16,57 – 33,61
LB - VB	22,52	-1,36 – 46,41
LB - VBLB	19,32	5,76 – 44,41
LB - BO	36,31*	12,42 – 60,20
LB - BOLB	-0,89	-24,78 – 22,99

*Estatisticamente significativo para $p < 0,05$

O laser quando comparado com os demais grupos apresentou diferenças estatísticas significativas das médias de AON apenas quando comparado com o grupo C ($9,96 \pm 4,49\%$) e BOLB ($48,57 \pm 28,22$).

Na Tabela 3 pode ser observada a comparação das médias de AON dos grupos dos enxertos ósseos utilizados e seus respectivos grupos com a aplicação do laser.

Tabela 3 - Comparação dos valores de AON (%) entre os grupos dos materiais de enxertia e seus respectivos grupos com a aplicação do laser

Grupos	Médias das diferenças	Intervalos de confiança
OA - OALB	-8,17	-31,72 – 15,38
VB - VBLB	-3,2	-26,19 – 19,79
BO - BOLB	-37,2*	- 58,88 – 15,53

*Estatisticamente significativo para $p < 0,05$

O uso do laser de baixa intensidade mostrou diferença estatística significativa quando aplicado sobre o Bio-Oss®. Em relação aos outros biomateriais, a melhora não foi significativa.

As áreas de partículas remanescentes (APR) e sua análise estatística dos valores de média de novo osso estão representadas na tabela 4.

Tabela 4- Médias, desvios-padrão (DP), Q25, medianas e Q75 dos valores de área de partículas remanescentes (APR) em porcentagem (%), dos grupos VB, VBLB, BO e BOLB. Os grupos OA e OALB apresentaram partículas remanescentes em apenas 2 espécimes, portanto, não houve possibilidade de realizar o teste estatístico com estes grupos.

Grupos	N	Médias	DP	Q25	Medianas	Q75
VB	8	25,88	5,58	21,45	26,95	29,4
VBLB	7	19,06	10,08	10,5	19,85	27,1
BO	10	38,73	6,95	33,52	37,71	43,17
BOLB	10	16,74	15,25	0	22,42	28,52

*Estatisticamente significativo para $p < 0,05$

O grupo que apresentou maior média de APR foi o grupo BO ($38,73 \pm 6,95$), seguido pelo grupo VB ($25,88 \pm 5,58$). Os grupos associados ao laser apresentaram menores APR quando comparados com os grupos não irradiados.

A comparação de APR entres os grupos dos enxertos ósseos utilizados e seus respectivos grupos com a aplicação do laser esta descrita na tabela 5.

Tabela 5- Comparação dos valores de APR (%) entre os grupos que utilizaram materiais de enxertia e seus respectivos grupos com a aplicação do laser.

Grupos	Médias das diferenças	Intervalos de confiança
VB - VBLB	7,14	- 5,85 – 20,13
BO - BOLB	21,99*	9,73 – 34,24

*Estatisticamente significativo para $p < 0,05$

Foi observado diferença estatística significativa apenas quando comparado o grupo BO com BOLB.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O laser de baixa intensidade foi aplicado como coadjuvante na regeneração de defeitos ósseos tratados com coágulo, Biogran®, osso autógeno e Bio-Oss®, sendo que seu efeito fotobiomodulador foi efetivo somente quando associado ao Bio-Oss®.

Fatores como o modelo animal, localização e tamanho do defeito, dose e protocolo de aplicação do laser interferem diretamente no resultado final de estudos. Nesse estudo foi utilizado o modelo experimental rato, com defeito de tamanho crítico com diâmetro de 5 mm realizado na calvária do animal, o laser de baixa intensidade utilizado possuía meio ativo GaAlAs com uma energia de 6 J por ponto.

O processo de cicatrização óssea em ratos é muito similar à cicatrização em humanos (ELSUBEIH; HEERSCHKE, 2004; DEL FABBRO et al., 2011), em relação ao período e sequência de eventos, porém ocorre de forma mais rápida (BODNER et al., 1993; AMLER; JOHNSON; SALMAN, 1960; BOYNE, 1996). Considera-se que 30 dias de vida do animal é compatível a 90 dias de vida em seres humanos (QUIN, 2005). Sendo assim esse modelo experimental e o período de avaliação de 30 dias fornece condições para estudar eventos regenerativos, com a intensão de estabelecer aplicações translacionais adequadas com relevância clínica, transmitindo assim resultados compatíveis e confiáveis.

Além disso, algumas vantagens podem ser relacionadas aos roedores, como boa relação custo-efetividade quando comparado a outros modelos animais, por se tratarem de animais pequenos são de fácil acomodação e manuseio e permitem a padronização das condições experimentais em indivíduos geneticamente semelhantes (JORDAN, 1971; PELLEGRINI et al., 2009). Os defeitos criados em calvária de ratos apresentam pouca quantidade de osso medular e possuem osso remanescente apenas nas extremidades do defeito, sendo considerados bons locais para testar materiais de regeneração óssea. (DONOS et al., 2004).

Embora o defeito criado em calvária de ratos apresente como desvantagens quantidade limitada de tecidos disponíveis para avaliação e não permita a avaliação

da cicatrização óssea em condições de carga biomecânica/fisiológica (VAJGEL et al., 2014), suas vantagens são mais significativas quando comparadas com as desvantagens.

Uma grande discrepância de diâmetros de defeitos críticos são relatados pela literatura (BRASOLLATTI et al., 2018). Autores consideraram defeitos críticos aqueles com diâmetro variando de 5 mm a 9 mm (DE OLIVEIRA et al., 2018; BOSCO et al., 2016; MARQUES et al., 2015; DE ALMEIDA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2008). Partindo do pressuposto que um defeito de tamanho crítico é definido como aquele que não cicatriza durante o período de duração do estudo (GOSAIN et al., 2000), o defeito de diâmetro de 5 mm é considerado por uma variedade de autores um defeito de tamanho crítico (DE ALMEIDA et al., 2014; FREITAS et al., 2018; CUNHA et al., 2014; VAJGEL et al., 2014; BRASOLLATTI et al., 2018).

Diante de grandes defeitos ósseos, a capacidade regenerativa dos mesmos torna-se comprometida. Vários procedimentos com o intuito de estimular o processo de cicatrização e diminuir a incapacidade funcional do tecido nessas situações estão sendo estudadas, incluindo o uso do laser de baixa intensidade e o uso de biomateriais como substitutos ósseos (FERNANDES, et al., 2013; BRASOLLATTI et al., 2018; DE OLIVEIRA et al., 2018).

Na literatura há diversos trabalhos sobre o uso do laser de baixa intensidade com a finalidade de estimular o reparo ósseo em áreas enxertadas (PINHEIRO et al., 2003; RASOULI GHAHROUDI et al., 2014; MARQUEZ MARTINEZ et al., 2008; PINHEIRO et al., 2009; DE OLIVEIRA et al., 2018). Entre os diversos tipos de lasers, o laser com meio ativo GaAIAs vêm sendo avaliado e utilizado com diferentes comprimentos de onda, doses, protocolos de uso e potência de saída (BOSCO et al., 2016; PINHEIRO; GERBI, 2006; JONASSON et al., 2017; ZEIN et al., 2017) devido ao seu alto poder de penetração nos tecidos quando comparado com os outros tipos de lasers (NISSAN et al., 2006; ÇIRAK et al., 2018; DE OLIVEIRA et al., 2018).

Çirak et al. (2018) ao avaliar os efeitos dos lasers de HeeNe e GaAIAs na consolidação óssea após a extração dentária em ratos, observou que, devida a eficiência de penetração do laser GaAIAs ser maior em comparação com a do laser

HeeNe, ele pode fornecer melhores resultados em um período de 30 dias de cicatrização óssea alveolar com formação óssea organizada mais disseminada na cavidade de extração quando comparado ao HeeNe. Foi aplicado nesse estudo o laser com meio ativo de GaAlAs obtendo resultados favoráveis, acordando com o encontrado por Çirak et al. (2018).

O comprimento de onda de 808nm foi utilizado no presente estudo e está dentro da faixa do infravermelho. Também esta dentro da chamada janela óptica a qual abrange os comprimentos de onda do vermelho e próximo ao infravermelho, a luz uma vez obtida nessa faixa, garante a absorção e o espalhamento da mesma fornecendo assim penetração adequada (SELLA et al., 2015; DE OLIVEIRA et al., 2018) e proporciona até 54% mais penetração do que a luz com comprimento de onda de 980 nm (HUDSON et al., 2013).

Este estudo adotou o protocolo de aplicação do laser utilizado em estudos anteriores do grupo que obteve bons resultados para estimulação da regeneração óssea com dose de 6J por ponto (DE ALMEIDA et al., 2014; CUNHA et al., 2014; FREITAS et al., 2018; MOREIRA et al., 2018). Segundo Brassoltti et al. (2018), o tecido biológico responderá de maneira semelhante quando parâmetros estabelecidos estiverem concentrados dentro de uma janela considerada terapêutica, não sendo necessário o uso de altas doses para acelerar o processo, na maioria dos casos.

A literatura mostra que o uso do laser de baixa intensidade é utilizado em estudos para cicatrização óssea em modelos animais aplicados em diversas sessões de aplicações, e por períodos de tempo variados (WEBER et al., 2006; BARBOS PINHEIRO et al., 2003; GERBI et al., 2005; RASOULI GHAHROUDI et al., 2014; MARQUES et al., 2015). Uma vez que o laser atua nas fases iniciais da cicatrização óssea, momento no qual há proliferação celular mais intensa, assim como a diferenciação das células mesenquimais (PINHEIRO; GERBI, 2006; OZAWA et al., 1998) nosso grupo defende um protocolo com menor quantidade de sessões. O presente estudo, assim como os demais do grupo, usou uma única sessão de irradiação do laser no trans-operatório, e foi observado histologicamente após 30 dias da irradiação um tecido conjuntivo organizado com presença de células com

potencial viável para a neoformação. (DE ALMEIDA et al., 2014; CUNHA et al., 2014; FREITAS et al., 2018; MOREIRA et al., 2018).

Bosco et al. (2016) ao avaliar o efeito do laser de GaAlAs, utilizado no transoperatório, sobre enxerto ósseo bovino no processo de formação óssea em defeitos de tamanho crítico em calvária de rato obteve efeito positivo observando melhora no processo de formação óssea. Marques et al. (2015) também sugeriu que a aplicação diretamente no defeito cirúrgico no período transoperatório estava associada à maior formação óssea. Além disso, a redução no número de células diferenciáveis nos estágios mais tardios da cicatrização, diminui o potencial do laser de baixa intensidade em manter a atividade osteoestimuladora (GERBI; MARQUES; RAMALHO, 2008; OBRADOVIC; KESIC; PESEVSKA, 2009). Logo, a aplicação do laser no período transoperatório torna-se proveitoso e viável clinicamente.

Prado et al. (2018) ao avaliar a formação óssea ao redor de implantes dentários revestidos com fosfato de cálcio isoladamente ou em associação com laserterapia e comparar a bioestimulação das células ósseas observaram que houve um efeito significativo do laser durante os períodos mais curtos de cicatrização, com o aumento na proliferação óssea na interface osso-implante, melhora na fixação osso-implante e neoformação óssea acelerada em implantes submetidos à associação dos tratamentos.

Houve diferença estatística significativa quando comparado a porcentagem de neoformação óssea do grupo do laser com o grupo C, resultado que corrobora aos de Sella et al. (2015) que da mesma forma observou um processo de formação óssea mais precoce e mais organizado nos grupos em que o laser foi aplicado em relação aos que o mesmo não foi aplicado, indicando um processo mais lento e menos organizado.

Perda da arquitetura óssea é observada quando defeitos ósseos são preenchidos apenas com coágulo sanguíneo (PIETROKOVSKY et al., 1967; SCHROPP et al., 2003; FICKL S et al., 2008; DE ALMEIDA et al., 2014; CUNHA et al., 2014). Tal situação é desfavorável visando a manutenção tridimensional dos tecidos em sítios que serão reabilitados com implantes dentários. De acordo com Cardaropoli et al. (2005) as regiões de defeitos ósseos não enxertados abrigam um

volume de tecido ósseo mineralizado, porém imaturo, e com menos medula óssea. No grupo Controle do presente estudo não houve a manutenção da espessura da calvária original e os resultados apresentados de área de novo osso foram os menos satisfatórios.

A regeneração de defeitos ósseos muitas vezes requer a utilização de enxertos ósseos (GARCÍA-GARETA; COATHUP; BLUNN, 2015; RASOULI GHAHROUDI et al., 2014). Neste estudo, o enxerto de osso autógeno foi utilizado por ser considerado *gold standard*, devido as suas propriedades biológicas favoráveis, sendo utilizado como controle positivo. Foi observada área de novo osso superior ao grupo controle e uma quantidade de partícula não significativa. A pouca quantidade de partículas presentes pode ser devida a dificuldade em padronizar o tamanho das partículas de osso autógeno associada à taxa de reabsorção não controlada do enxerto ósseo (HALMAN; THOR, 2008).

A associação do laser ao osso autógeno, com o intuito de acelerar a formação de novo osso antes que as partículas fossem reabsorvidas, não foi efetiva e o grupo OALB não apresentou área de novo osso significativamente maior em comparação com o seu uso de forma isolada. A capacidade osteocondutora do material pode ser afetada pela forma como é coletado (HALMAN; THOR, 2008) e a não obtenção da distância de 0,1mm do suprimento sanguíneo (DAVIES; HOSSEINI, 2000) podem ter auxiliado nos resultados não positivos com o uso do laser. O laser pode também ter acelerado as propriedades das partículas enxertadas e favorecido a reabsorção das mesmas.

Este enxerto ósseo apresenta algumas desvantagens como a reabsorção incontrolada, possível infecções e disponibilidade limitada ao segundo sítio cirúrgico associada à maior morbidade e maior tempo cirúrgico (HALMAN; THOR, 2008; BLOKHUIS; ARTS, 2011; SCHMITT et al., 2013). Na tentativa de suprir essas desvantagens, biomateriais são estudados e necessários, porém a busca por um material que consiga se adequar ao desempenho do autoenxerto ainda continua (GARCIA GARETA; COATHUP; BLUNN, 2015).

Com o intuito de preservar o tecido ósseo, o uso de um enxerto ósseo em um defeito oferece estabilidade ao coágulo e, assim, evita redução do seu volume e

invaginações (CARDAROPOLI et al., 2005). Os biomateriais quando não são reabsorvidos, ocupam o espaço do novo osso, por isso são conhecidos por induzir menos formação de tecido ósseo nas áreas enxertadas do que em áreas não enxertadas e embora esses biomateriais apresentem desfechos clínicos favoráveis, sua capacidade biológica de formação óssea somente via osteocondução diminui a formação de tecido ósseo vital quando comparado com o uso de enxertos ósseos autógenos (CARDAROPOLI et al., 2005; DANESH-SANI et al., 2016). De Oliveira et al. (2018) demonstraram que áreas enxertadas (Bio-Oss® e Straumann®/Bone Ceramic) apresentaram grandes quantidades de tecido mineralizado, o que pode indicar que o uso de biomateriais osteocondutores é clinicamente importante para manutenção da morfologia e função adequada dos ossos, não apenas para formação de tecido ósseo em si. O presente estudo corroborou aos achados dos estudos citados pois foram mantidas as espessuras das calvárias nos espécimes em que os biomateriais foram empregados, visando uma qualidade óssea viável para alguma futura reabilitação.

Hallman, Lundgren e Sennerby (2001) a partir de biópsias retiradas 6 meses e 3 anos após cirurgias de levantamento do assoalho do seio maxilar com uma mistura de Bio-Oss® (80%), osso autógeno (20%) e cola de fibrina, observaram histologicamente que osso ao redor e em contato com as partículas de Bio-Oss® após 6 meses era principalmente tecido ósseo imaturo, o qual foi substituído com o tempo por osso lamelar maduro preenchendo o espaço entre as partículas, isso foi observado nos espécimes de 3 anos. Na análise histológica do presente estudo, foi possível observar grande quantidade de partículas nos grupos enxertados com Bio-Oss®, porém as mesmas estão associadas a manutenção da espessura da calvária. A pouca área de novo osso no grupo BO deve-se ao fato do atraso no processo de cicatrização quando utiliza-se o material (ARAÚJO et al., 2008; ARAÚJO; LINDHE, 2009; ARAÚJO; LILJENBERG; LINDHE, 2010).

A associação do laser aos diferentes substitutos ósseos com o intuito de otimizar o reparo ósseo tem mostrado melhorar o desempenho destes materiais na formação de novo osso (PINHEIRO, GERBI 2006; BOSCO et al., 2016; DE OLIVEIRA et al., 2018).

Foi observado no estudo que ao se associar o laser de baixa intensidade ao Bio-Oss®, a quantidade de partículas remanescentes foi estatisticamente diminuída, porém, as mesmas estavam cercadas de tecido conjuntivo bem organizado, podendo este ser um ambiente propício para futuro início de formação óssea entre elas. Juntamente com a presença das partículas foi possível observar a manutenção na espessura da calvária. Corroborando aos resultados encontrados, Lindhe et al. (2014) também observou partículas do substituto ósseo não reabsorvidas em cavidades de extração, porém as mesmas apresentavam-se cercadas por novo osso e a presença dessas partículas nos alvéolos segundo o autor, pode ser o motivo pelo qual os locais de extração enxertados não sofreram alterações dimensionais.

O grupo de Bio-Oss® associado ao laser foi o grupo que demonstrou maior formação óssea no estudo. Essa associação ao apresentar maior área de novo osso significativa em relação ao uso de forma isolada do material de enxertia, indica que o laser aumentou o potencial osteocondutor do biomaterial além de manter o volume da espessura da calvária no período analisado. Esses achados também puderam ser observados em outros estudos pré-clínicos (TORRES et al., 2008; RASOULI GHAHROUDI et al., 2014; MARQUEZ MARTINEZ; PINHEIRO; RAMALHO, 2008; DE OLIVEIRA et al., 2018). O laser, portanto, foi efetivo na regeneração óssea quando associado ao Bio-Oss®.

O outro biomaterial avaliado no estudo foi o Biogran®. Devido a formação de uma carapaça de cálcio e fosfato ao redor da partícula do vidro, o mesmo apresenta-se como um ótimo material de aumento e de preenchimento ósseo (FURUSAWA et al., 1998); quando inserido em defeitos cirurgicamente preparados possui capacidade de manter espessuras de estruturas ósseas (SCULEAN et al 2002; MOREIRA et al., 2018). Foi observado no presente estudo que a espessura da calvária foi mantida nos grupos tratados com Biogran®. Porém, a associação do laser de baixa intensidade ao vidro bioativo não promoveu aumento significativo na formação óssea corroborando aos achados de Moreira et al (2018) no qual a irradiação com laser também não potencializou a neoformação óssea sobre o Biogran® no período avaliado.

Também foi observada no presente estudo uma tendência de migração do tecido conjuntivo para o interior das partículas do Biogran®. Os resultados sugerem que mais estudos precisam ser realizados levando em consideração as características do Biogran®. Há diversos períodos de pós-operatórios que apresentam partículas do vidro de 2 a 24 meses (WHEELER et al., 1998; CORDIOLI et al., 2001; SCHEPERS; DUCHEYNE, 1997), o que mostra que o vidro bioativo é lentamente degradável, o tempo de 30 dias pode ser pouco para avaliação dos resultados nos grupos com o Biogran® ou como a dose do laser aplicada pode influenciar na obtenção de um melhor desempenho do material, talvez o vidro apresente melhor desempenho se aplicado com outro protocolo de laser. O que sugere que mais pesquisas em relação ao biomaterial e sua associação ao laser de baixa intensidade.

Bassi e Carvalho (2011) ao comparar osso bovino inorgânico (Bio-Oss®) com vidro bioativo (Biogran®; Orthovita, Implant Innovations), observaram que o osso bovino alcançou maior formação de osso novo. O grupo de vidro bioativo exibiu uma maior quantidade de tecido não mineralizado e uma menor quantidade de tecido conjuntivo fibroso quando comparado ao osso bovino. Foi proposto pelos autores que este tecido não mineralizado tenha o potencial de sofrer maturação. Embora o grupo de osso bovino exiba numericamente maior formação óssea, o grupo do vidro bioativo possui maior potencial a formação óssea, apesar da necessidade de um tempo maior para isso segundo eles. No mesmo estudo a associação de ambos os biomateriais ao PRP não obtiveram efeito significativo na regeneração óssea.

Santos (2010) também relatou o uso de diferentes biomaterias no processo de regeneração óssea, comparou após exodontia em cães o comportamento do vidro bioativo (Biogran®, Orthovita, Palm Beach Gardens, Flórida, EUA), hidroxiapatita sintética (OsteoGen®, Impladent Ltd., Holliswood, NY, EUA) e osso bovino mineral (HA natural; Bio-Oss®, Osteohealth Company, Shirley, NY, EUA). Foi observado um comportamento semelhante dos biomateriais na análise histológica. Porém, o osso bovino mineral apresentou maior número de partículas recobertas com tecido ósseo quando comparado ao vidro bioativo e à hidroxiapatita sintética. Nenhum dos biomateriais testados foi completamente reabsorvido, mas mostrou diferentes taxas de reabsorção, provavelmente devido a diferenças na composição

química e nas formas físicas. Sugerindo a necessidade de mais estudos para definir o biomaterial ideal para regeneração óssea.

Ao analisar os grupos dos enxertos ósseos utilizados no estudo e seus respectivos grupos com a aplicação do laser pode-se observar que, embora não estatisticamente significativo para todos os grupos, os de associação com o laser apresentaram áreas de novo osso maior que nos grupos em que o laser não foi aplicado, e os grupos tratados com laser apresentaram menor quantidade de partículas em relação aos grupos não irradiados. Esses resultados podem ser explicados devido ao fato do laser atuar na proliferação e diferenciação de células osteogênicas e aumentar a microcirculação local, o que favorece maior migração de células, melhor oxigenação e melhor nutrição para a região tratada (SOARES et al., 2013; GERBI et al., 2005; KHADRA et al., 2005a).

Há na literatura uma grande discrepância tanto nos critérios utilizados do laser de baixa intensidade no tratamento de reparo ósseo de defeitos críticos quanto no tamanho desses defeitos ósseos a serem tratados. Apesar da ausência de parâmetros empregados, o resultado positivo dos estudos dificulta a discussão dos efeitos da terapia e a escolha do protocolo mais adequado para alcançar os efeitos terapêuticos desejados (BRASOLLATTI et al., 2018) para cada tipo de biomaterial.

O laser mostrou-se eficaz no aumento da proliferação e viabilidade celular podendo contribuir significativamente na formação e na regeneração tecidual, confirmando assim seus efeitos benéficos. Pode ser uma ferramenta terapêutica útil e promissora para a prática regenerativa e para o tratamento da cicatrização óssea na prática clínica. Além de ser um recurso não invasivo e não destrutivo capaz de promover estímulos fotobiológicos específicos no ambiente da lesão.

Muitos substitutos ósseos têm sido propostos para a regeneração óssea, e pesquisadores têm focado nas interações que ocorrem entre os materiais de enxertia e o tecido hospedeiro. O uso de enxertos ósseos não se limita apenas utilizar um biomaterial para preencher o espaço, mas também para permitir a regeneração estrutural e funcional dos tecidos semelhantes aos perdidos (ZIZZARI et al., 2016).

Dessa forma, verificar qual biomaterial apresenta melhor resultado diante da associação a uma certa dose de laser proporciona segurança para escolher melhores protocolos clínicos e obtenção de êxito no tratamento.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Com base na metodologia empregada e nos resultados apresentados, concluímos que o laser de baixa intensidade influenciou a formação óssea de defeitos ósseos preenchidos com Bio-Oss®. Tornando a hipótese nula parcialmente aceita, uma vez que o laser não influenciou o osso autógeno e o Biogran®.

REFERÊNCIAS

REFERENCIAS

Abramovitch-Gottlieb L, Gross T, Naveh D, Geresh S, Rosenwaks S, Bar I, et al. Low level laser irradiation stimulates osteogenic phenotype of mesenchymal stem cells seeded on a three-dimensional biomatrix. *Lasers Med Sci.* 2005;20(3-4):138-46.

Abreu FAM, Couto Filho PJC, Mardegan FEC, Freitas BA Cosso MG, Shibli JA, Zenóbio EG. In: In: Shibli JA, Zenóbio EG, Jayme SJ, Souza SLS. *Regeneração Tecidual: o que realmente sabemos?* 1st Ed. São Paulo: VM Cultural; 2016. p. 29-39.

Almeida ALPF, Gonçalves ES, Esper LA, Tunes FSM, Alves PHM. Biomateriais – substitutos ósseos. In: In: Shibli JA, Zenóbio EG, Jayme SJ, Souza SLS. *Regeneração Tecidual: o que realmente sabemos?* 1st Ed. São Paulo: VM Cultural; 2016. p. 57-73.

Alves AMM, de Miranda Fortaleza LM, Filho ALMM, Ferreira DCL, da Costa CLS, Viana VGF, et al. Evaluation of bone repair after application of a norbixin membrane scaffold with and without laser photobiomodulation (λ 780 nm). *Lasers Med Sci.* 2018;33(7):1493-1504.

Amerio P, Vianale G, Reale M, Muraro R, Tulli A, Piattelli A. The effect of deproteinized bovine bone on osteoblast growth factors and proinflammatory cytokine production. *Clin Oral Implants Res.* 2010; 21(6):650-5.

Amler MH, Johnson PL, Salman I. Histological and histochemical investigation of human alveolar socket healing in undisturbed extraction wounds. *J Am Dent Assoc.* 1960; 61:32-44.

Anderson JM. Future challenges in the in vitro and in vivo evaluation of biomaterial biocompatibility. *Regen Biomater.* 2016;3(2):73-7.

Araujo M, Linder E, Wennström J, Lindhe J. The influence of Bio-Oss Collagen on healing of an extraction socket: an experimental study in the dog. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2008; 28:123–35.

Araújo MG, Liljenberg B, Lindhe J. Dynamics of Bio-Oss Collagen incorporation in fresh extraction wounds: an experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21(1):55-64.

Araújo MG, Lindhe J. Ridge preservation with the use of Bio-Oss collagen: A 6-month study in the dog. *Clin Oral Implants Res.* 2009; 20(5):433-440.

Baldini N, De Sanctis M, Ferrari M. Deproteinized bovine bone in periodontal and implant surgery. *Dental Materials.* 2011; 27(61):70-2011.

Barbos Pinheiro AL, Limeira Júnior Fde A, Márquez Gerbi ME, Pedreira Ramalho LM, Marzola C, Carneiro Ponzi EA, et al. Effect of 830-nm laser light on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone and decalcified cortical osseous membrane. *J Clin Laser Med Surg.* 2003;21(6):383-8.

Barboza EP, de Souza RO, Caúla AL, Neto LG, Caúla Fde O, Duarte ME. Bone regeneration of localized chronic alveolar defects utilizing cell binding peptide associated with anorganic bovine-derived bone mineral: a clinical and histological study. *J Periodontol.* 2002;73(10):1153-9.

Barros FC, Antunes AS, Figueredo CMS, Fisher RG. Laser de baixa intensidade na cicatrização periodontal. *R. Ci. méd. biol.* 2008; 7(1): 85-89.

Bashardoust Tajali S, Macdermid JC, Houghton P, Grewal R. Effects of low Power laser irradiation on bone healing in animals: a meta analysis. *J Orthop Surg Res.* 2010..

Bassi AP, Carvalho PS. Repair of bone cavities in dog's mandible filled with inorganic bovine bone and bioactive glass associated with platelet rich plasma. *Braz Dent J.* 2011; 22(1):14-20.

Belkin M, Schwartz M. New biological phenomena associated with laser radiation. *Health Phys.* 1989;56(5):687-90.

Berglundh T, Lindhe J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res.* 1997;8(2):117-24.

Block MS, Kent JN. Sinus augmentation for dental implants: the use of autogenous bone. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997;55(11):1281-6.

Blokhuis TJ, Arts JJ. Bioactive and Osteoinductive Bone Graft Substitutes: Definitions, Facts and Myths. *Injury.* 2011;42(2): 26-9.

Bodner L, Kaffe I, Littner MM, Cohen J. Extraction site healing in rats. A radiologic densitometric study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1993;75(3):367-72.

Bosco AF, Faleiros PL, Carmona LR, Garcia VG, Theodoro LH, de Araujo NJ, Nagata MJ, de Almeida JM. Effects of low-level laser therapy on bone healing of critical-size defects treated with bovine bone graft. *J Photochem Photobiol B*. 2016; 163:303-10.

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003;423(6937):337-42.

Boyne PJ. Osseous repair of the postextraction alveolus in man. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1966; 21(6):805-13.

Brassolatti P, de Andrade ALM, Bossini PS, Orth DL, Duarte FO, Dos Anjos Souza AB, et al. Photobiomodulation on critical bone defects of rat calvaria: a systematic review. *Lasers Med Sci*. 2018; 33(9):1841-1848.

Brunsvold MA, Mellonig JT. Bone grafts and periodontal regeneration. *Periodontol* 2000. 1993;(1):80-91.

Burg KJ, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2000; 21(23):2347-59.

Calori GM, Mazza E, Colombo M, Ripamonti C. The use of bone-graft substitutes in large bone defects: any specific needs? *Injury*. 2011;42:56-63.

Camarini ET, Zanoni JN, Leite PC, Boos FB. Use of biomaterials with or without platelet-rich plasma in postextraction sites: a microscopic study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009;24(3):432-8.

Cardaropoli G, Araújo M, Hayacibara R, Sukekava F, Lindhe J. Healing of extraction sockets and surgically produced - augmented and non-augmented - defects in the alveolar ridge. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol*. 2005; 32(5):435-40.

Carvalho PSP, et al. Análise histológica do Bio-Oss® e Biogran® em tibia de ratos. *BCI*. 2002; 9 (34): 117-123.

Catao MHCV. Os beneficios do laser de baixa intensidade na clinica odontologica na estomatologia. *Rev Bras Patol Oral*. 2004; 3(4): 214-218.

Çırak E, Özyurt A, Peker T, Ömeroğlu S, Güngör MN. Comparative evaluation of various low-level laser therapies on bone healing following tooth extraction: An experimental animal study. *J Craniomaxillofac Surg*. 2018;46(7):1147-1152.

Cordioli G, Mazzocco C, Schepers E, Brugnolo E, Majzoub Z. Maxillary sinus floor augmentation using bioactive glass granules and autogenous bone with simultaneous implant placement. Clinical and histological findings. Clin Oral Implants Res. 2001;12(3):270-8.

Cunha MJ, Esper LA, Sbrana MC, de Oliveira PG, do Valle AL, de Almeida AL. Effect of low-level laser on bone defects treated with bovine or autogenous bone grafts: in vivo study in rat calvaria. Biomed Res Int. 2014.

Danesh-Sani SA, Wallace SS, Movahed A, El Chaar ES, Cho SC, Khouly I, et al. Maxillary Sinus Grafting With Biphasic Bone Ceramic or Autogenous Bone: Clinical, Histologic, and Histomorphometric Results From a Randomized Controlled Clinical Trial. Implant Dent. 2016; 25(5):588-93.

Davies JE, Hosseini MM. Histodynamics of endosseous wound healing. In Davies JE editor. Bone Engineering. Toronto, Canada: em squarated. 2000; 1-14.

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

de Oliveira GJPL, Aroni MAT, Medeiros MC, Marcantonio E Jr, Marcantonio RAC. Effect of low-level laser therapy on the healing of sites grafted with coagulum, deproteinized bovine bone, and biphasic ceramic made of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate. In vivo study in rats. Lasers Surg Med. 2018.

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

Del Fabbro M, Bortolin M, Taschieri S. Is autologous platelet concentrate beneficial for post-extraction socket healing? A systematic review. Int J Oral Maxillofac Surg. 2011;40(9):891-900.

Delgado-Ruiz RA, Calvo-Guirado JL, Romanos GE. Critical size defects for bone regeneration experiments in rabbit calvariae: systematic review and quality evaluation using ARRIVE guidelines. Clin Oral Implants Res. 2015;26(8):915-930.

Diès F, Etienne D, Abboud NB, Ouhayoun JP. Bone regeneration in extraction sites after immediate placement of an e-PTFE membrane with or without a biomaterial. A report on 12 consecutive cases. Clin Oral Implants Res. 1996;7(3):277-85.

Donos N, Lang NP, Karoussis IK, Bosshardt D, Tonetti M, Kostopoulos L Effect of GBR in combination with deproteinized bovine bone mineral and/or enamel matrix proteins on the healing of critical-size defects. *Clinical Oral Implants Research* 2004;15 (1):101–111.

Dortbudak O, Haas R, Mallath G. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. *Clin Oral Implants Res.* 2000; 11 (6): 540-545.

Dos Santos Pereira R, Boos FB, Gorla LF, Garcia IR Jr, Okamoto R, Hochuli-Vieira E. Maxillary Sinus Elevation Surgery with ChronOS and Autogenous Bone Graft: Analysis of Histometric and Volumetric Changes. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2016;36(6):885-892.

Elsubeihi ES, Heersche JN. Quantitative assessment of post-extraction healing and alveolar ridge remodelling of the mandible in female rats. *Arch Oral Biol.* 2004; 49(5):401-12.

Esposito M, Grusovin MG, Whortington HV, Coulthard P. Interventions for replacing missing teeth: bone augmentation techniques for dental implant treatment. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006; 25(1).

Faverani LP, Ramalho-Ferreira G, dos Santos PH, Rocha EP, Garcia Júnior IR, Pastori CM, et al. Surgical techniques for maxillary bone grafting - literature review. *Rev Col Bras Cir.* 2014;41(1):61-7.

Fekrazad R, Sadeghi Ghuchani M, Eslaminejad MB, Taghiyar L, Kalhori KA, Pedram MS, et al. The effects of combined low level laser therapy and mesenchymal stem cells on bone regeneration in rabbit calvarial defects. *J Photochem Photobiol B.* 2015;151:180-5.

Fernandes KR, Ribeiro DA, Rodrigues NC, Tim C, Santos AA, Parizotto NA, de Araujo HS, Driusso P, Rennó AC. Effects of low-level laser therapy on the expression of osteogenic genes related in the initial stages of bone defects in rats. *J Biomed Opt.* 2013;18(3).

Ferreira CE, Novaes AB, Haraszthy VI, Bittencourt M, Martinelli CB, Luczyszyn SM. A clinical study of 406 sinus augmentations with 100% anorganic bovine bone. *J Periodontol.* 2009; 80(12):1920-7.

Fickl S, Zuhr O, Wachtel H, Bolz W, Huerzeler M. Tissue alterations after tooth extraction with and without surgical trauma: a volumetric study in the beagle dog. *J Clin Periodontol.* 2008;35(4):356-63.

Frame JW. A convenient animal model for testing bone substitute materials. *J Oral Surg.* 1980;38(3):176-80.

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

Froum S, Cho SC, Rosenberg E, Rohrer M, Tarnow D. Histological comparison of healing extraction sockets implanted with bioactive glass or demineralized freeze-dried bone allograft: a pilot study. *J Periodontol.* 2002;73(1):94-102.

Fujihara NA, Hiraki KR, Marques MM. Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. *Lasers Surg Med.* 2006; 38 (4): 332-336.

Fukuta K, Har-Shai Y, Collares MV, Lichten JB, Jackson IT. Comparison of inorganic bovine bone mineral particles with porous hydroxyapatite granules and cranial bone dust in the reconstruction of full-thickness skull defect. *J Craniofac Surg.* 1992;3(1):25-9.

Furlaneto FA, Nagata MJ, Fucini SE, Deliberador TM, Okamoto T, Messoria MR. Bone healing in critical-size defects treated with bioactive glass/calcium sulfate: a histologic and histometric study in rat calvaria. *Clin Oral Implants Res.* 2007;18(3):311-8.

Furusawa T, Mizunuma K, Yamashita S, Takahashi T. Investigation of early bone formation using resorbable bioactive glass in the rat mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1998; 13(5):672-6.

Garcia VG, da Conceição JM, Fernandes LA, de Almeida JM, Nagata MJ, Bosco AF, et al. Effects of LLLT in combination with bisphosphonate on bone healing in critical size defects: a histological and histometric study in rat calvaria. *Lasers Med Sci.* 2013;28(2):407-14.

García-Gareta E, Coathup MJ, Blunn GW. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. *Bone.* 2015;81:112-121.

Gerbi ME, Marques AM, Ramalho LM, Ponzi EA, Carvalho CM, Santos Rde C, et al. Infrared laser light further improves bone healing when associated with bone morphogenetic proteins: an in vivo study in a rodent model. *Photomed Laser Surg.* 2008;26(1):55-60

Gerbi MEMM, Pinheiro ALB, Marzola C, Limeira Jr FA, Ramalho LMP, Ponzi EAC, et al. Assessment of bone repair associated with the use of organic bovine bone and membrane irradiated at 830 nm. *Photomed Laser Surg* 2005; 23:382-388.

Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*. 2005; 36(3): 20-27.

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

Gosain AK, Song L, Yu P, Mehrara BJ, Maeda CY, Gold LI, et al. Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF-beta isoforms. *Plast Reconstr Surg*. 2000; 106(2):360-71.

Gross JS. Bone grafting materials for dental applications: a practical guide. *Compendium Contin Educ Dent*. 1997; 18(10):1013–8.

Gulin JE, Rocco DM, García-Bournissen F. Quality of Reporting and Adherence to ARRIVE Guidelines in Animal Studies for Chagas Disease Preclinical Drug Research: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(11).

Hallman M, Lundgren S, Sennerby L. Histologic analysis of clinical biopsies taken 6 months and 3 years after maxillary sinus floor augmentation with 80% bovine hydroxyapatite and 20% autogenous bone mixed with fibrin glue. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2001;3 (2):87-96.

Hallman M, Thor A. Bone substitutes and growth factors as an alternative/complement to autogenous bone for grafting in implant dentistry. *Periodontol* 2000. 2008; 47:172-92.

Hamajima S, Hiratsuka K, Kiyama-Kishikawa M, Tagawa T, Kawahara M, Ohta M, et al. Effect of low-level laser irradiation on osteoglycin gene expression in osteoblasts. *Lasers Med Sci*. 2003;18(2):78-82.

Hämmerle CH, Chiantella GC, Karring T, Lang NP. The effect of a deproteinized bovine bone mineral on bone regeneration around titanium dental implants. *Clin Oral Implants Res*. 1998;9(3):151-62.

Hawkins D, Abrahamse H. Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblasts. *Photomed Laser Surg*. 2006;24(6):705-14.

Hench LL, Paschall HA. Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle. *J Biomed Mater*. 1973; 7(3): 25-42.

Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, Greenlee. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J of Biomedical Materials Research*. 1971;2: 117-141.

Hench LL. Bioceramics and the origin of life. *J Biomed Mater Res*. 1989;23(7):685-703.

Hench LL. The story of Bioglass. *J Mater Sci Mater Med*. 2006; 17(11):967-78.

Herford AS, Dean JS. Complications in bone grafting. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2011; 23(3):433-42.

Hoexter DL. Bone regeneration graft materials. *J Oral Implantol*. 2002; 28(6):290-4.

Hooijmans CR, Leenaars M, Ritskes-Hoitinga M. A gold standard publication checklist to improve the quality of animal studies, to fully integrate the Three Rs, and to make systematic reviews more feasible. *Altern Lab Anim*. 2010;38(2):167-82.

Hoppe A, Güldal NS, Boccaccini AR. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials*. 2011;32(11):2757-74.

Hudson DE, Hudson DO, Wininger JM, Richardson BD. Penetration of laser light at 808 and 980 nm in bovine tissue samples. *Photomed Laser Surg*. 2013;31(4):163-8.

Hürzeler MB, Quiñones CR, Kirsch A, Gloker C, Schüpbach P, Strub JR, et al. Maxillary sinus augmentation using different grafting materials and dental implants in monkeys. Part I. Evaluation of anorganic bovine-derived bone matrix. *Clin Oral Implants Res*. 1997;8(6):476-86.

Indovina A Jr, Block MS. Comparison of 3 bone substitutes in canine extraction sites. *J Oral Maxillofac Surg*. 2002; 60(1):53-8.

Isaksson, S. Aspects of bone healing and bone substitute incorporation. An experimental study in rabbit skull bone defects. *Swed Dent J Suppl*. 1992; 84: 1-46.

Jambhekar S, Kernen F, Bidra AS. Clinical and histologic outcomes of socket grafting after flapless tooth extraction: A systematic review of randomized controlled clinical trials. *J Prosthet Dent*. 2015; 113(5):371-82.

Jonasson TH, Zancan R, de Oliveira Azevedo L, Fonseca AC, Silva MCD, Giovanini AF, et al. Effects of low-level laser therapy and platelet concentrate on bone repair:

Histological, histomorphometric, immunohistochemical, and radiographic study. *J Craniomaxillofac Surg.* 2017;45(11):1846-1853.

Jordan, HV. Rodent model systems in periodontal disease research. *J Dent Res.* 1971; 50 (2): 236–242.

Junqueira LCU, Carneiro J. Tecido Ósseo. In Junqueira LCU, Carneiro J. *Histologia Básica.* 13 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, c2017. p. 134-154.

Kang KL, Chung JH. Effect of low-energy laser irradiation on healing of extraction sockets in ovariectomized Rats. *Tissue Engineering Regenerative Medicine* 2009;6:1310–20.

Khadra M, Kasem N, Lyngstadaas SP, Haanaes HR, Mustafa K. Laser therapy accelerates initial attachment and subsequent behaviour of human oral fibroblasts cultured on titanium implant material. A scanning electron microscope and histomorphometric analysis. *Clin Oral Implants Res.* 2005(b); 16(2):168-75.

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(a);26(17):3503-9.

Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2010;8(6):

Klinge B, Alberius P, Isaksson S, Jönsson J. Osseous response to implanted natural bone mineral and synthetic hydroxylapatite ceramic in the repair of experimental skull bone defects. *J Oral Maxillofac Surg.* 1992;50(3):241-9.

Kong CH, Steffi C, Shi Z, Wang W. Development of mesoporous bioactive glass nanoparticles and its use in bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2018;106(8):2878-2887.

Kulkarni S, Meer M, George R. Efficacy of photobiomodulation on accelerating bone healing after tooth extraction: a systematic review. *Lasers Med Sci.* 2018; 11.

Le Guehennec L, Goyenvallée E, Aguado E, Houchmand-Cuny M, Enkel B, Pilet P, et al. Small-animal models for testing macroporous ceramic bone substitutes. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2005;72(1):69-78.

Leonetti JA, Rambo HM, Thronsdon RR. Osteotome sinus elevation and implant placement with narrow size bioactive glass. *Implant Dent.* 2000; 9 (2): 177-182.

Li P, Zhu H, Huang D. Autogenous DDM versus Bio-Oss granules in GBR for immediate implantation in periodontal postextraction sites: A prospective clinical study. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2018.

Liu X, Rahaman MN, Fu Q. Bone regeneration in strong porous bioactive glass (13-93) scaffolds with an oriented microstructure implanted in rat calvarial defects. *Acta Biomater.* 2013;9(1):4889-98.

Lindhe J, Cecchinato D, Donati M, Tomasi C, Liljenberg B. Ridge preservation with the use of deproteinized bovine bone mineral. *Clin Oral Implants Res.* 2014; 25(7):786-90.

Lins RDA., Dantas EM, Lucena KCR, Catão MHCV, Granville-Garcia AF, Neto LGC. Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo An Bras Dermatol. 2010; 85(6): 849-855.

Lutz R, Berger-Fink S, Stockmann P, Neukam FW, Schlegel KA. Sinus floor augmentation with autogenous bone vs. a bovine-derived xenograft - a 5-year retrospective study. *Clin Oral Implants Res.* 2015; 26(6):644-8.

MacNeill SR, Cobb CM, Rapley JW, Glaros AG, Spencer P. In vivo comparison of synthetic osseous graft materials. A preliminary study. *J Clin Periodontol.* 1999;26(4):239-45.

Mardas N, Chadha V, Donos N. Alveolar ridge preservation with guided bone regeneration and a synthetic bone substitute or a bovine-derived xenograft: a randomized, controlled clinical trial. *Clin Oral Impl Res.* 2010;21(7):688–698.

Mardas N, Stavropoulos A, Karring T. Calvarial bone regeneration by a combination of natural anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix coupled with a synthetic cell-binding peptide (PepGen): an experimental study in rats. *Clin Oral Implants Res.* 2008;19(10):1010-5.

Marei HF, Mahmood K, Almas K. Critical Size Defects for Bone Regeneration Experiments in the Dog Mandible: A Systematic Review. *Implant Dent.* 2018;27(1):135-141.

Mariano R, Messori M, de Moraes A, Nagata M, Furlaneto F, Avelino C, et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and

histometric study in the calvaria of diabetic rat. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;109(1):72-8.

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.* 2015;30(4):1225-30.

Márquez Martínez 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;23(3):313-7.

Marx RE, Garg AK. Bone structure, metabolism, and physiology: its impact on dental implantology. *Implant Dent.* 1998;7(4):267-76.

Menezes JD, Pereira RDS, Bonardi JP, Griza GL, Okamoto R, Hochuli-Vieira E. Bioactive glass added to autogenous bone graft in maxillary sinus augmentation: a prospective histomorphometric, immunohistochemical, and bone graft resorption assessment. *J Appl Oral Sci.* 2018.

Messora MR. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma activated by two different methods. A histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodontal Res.* 2008; 43(6): 723-9.

Mikhail FF, El-Din M, Ibrahim T, Zekry K, Nemat A, Nasry S. Effect of Laser Therapy on the Osseointegration of Immediately Loaded Dental Implants in Patients under Vitamin C, Omega-3 and Calcium Therapy. *Open Access Maced J Med Sci.* 2018; 6(8):1468-1474.

Miloro M, *Princípios de Cirurgia Bucomaxilofacial de Peterson.* 2ed. São Paulo: Santos; 2013.

Misch CE, Misch-Dietsh F. Considerações Fundamentais Sobre Enxerto Ósseo e Materiais para Enxerto Ósseo. In: Misch CE. *Implantes Dentais: Contemporâneos.* 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, c2008, p 839-869.

Misch CM, Misch CE, Resnik RR, Ismail YH. Reconstruction of maxillary alveolar defects with mandibular symphysis grafts for dental implants: a preliminary procedural report. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1992;7(3):360-6.

Montazerian M, Dutra Zanotto E. History and trends of bioactive glass-ceramics. *J Biomed Mater Res A.* 2016;104(5):1231-49.

Moreira GS, Machado Alves PH, Esper LA, Sbrana MC, da Silva Dalben G, Neppelenbroek KH, et al. Effect of Low-Level Laser on the Healing of Bone Defects Filled with Autogenous Bone or Bioactive Glass: In Vivo Study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2018; 33(1):169-174.

Nevins M, Camelo M, De Angelis N, Hanratty JJ, Khang WG, Kwon JJ, et al. The clinical and histologic efficacy of xenograft granules for maxillary sinus floor augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2011; 31(3):227-35.

Nissan J, Assif D, Gross MD, Yaffe A, Binderman I. Effect of low intensity laser irradiation on surgically created bony defects in rats. *J Oral Rehabil*. 2006;33(8):619-924.

Norton M.R, Wilson J. Dental implants placed in extraction sites implanted with bioactive glass: human histology and clinical outcome. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2002; 17(2): 249-257.

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

O'Flynn KP, Stanton KT. Optimisation of the enamelling of an apatite-mullite glass-ceramic coating on Ti6Al4V. *J Mater Sci Mater Med*. 2011;22(9):2035-44.

Oliveira PC, Meireles GC, dos Santos NR, de Carvalho CM, de Souza AP, dos Santos JN, et al. The use of light photobiomodulation on the treatment of second-degree burns: a histological study of a rodent model. *Photomed Laser Surg*. 2008; 26(4):289-99.

O'Loughlin PF, Morr S, Bogunovic L, Kim AD, Park B, Lane JM. Selection and development of preclinical models in fracture-healing research. *J Bone Joint Surg Am*. 2008;90(1):79-84.

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

Ozdemir H, Ezirganli S, Isa Kara M, Mihmanli A, Baris E. Effects of platelet rich fibrin alone used with rigid titanium barrier. *Arch Oral Biol*. 2013;58(5):537-44.

Park JW, Jang JH, Bae SR, An CH, Suh JY. Bone formation with various bone graft substitutes in critical-sized rat calvarial defect. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20(4):372-8.

Parker S. Low-level laser use in dentistry. *Br Dent J.* 2007;202(3):131-8

Peetz, M. Characterisation of xenogeneic bone material. In: Boyne PJ. *Osseous reconstruction of the maxilla and mandible: surgical techniques using titanium mesh and bone mineral*, Chicago: Quintessence; c1997. p. 87–100.

Pellegrini G, Seol YJ, Gruber R, Giannobile WV. Pre-clinical models for oral and periodontal reconstructive therapies. *J Dent Res* 2009; 88 (12):1065–1076.

Penteado LA, Colombo CE, Penteado RA, Assis AO, Gurgel BC. Evaluation of bioactive glass and platelet-rich plasma for bone healing in rabbit calvarial defects. *J Oral Sci.* 2013;55(3):225-32.

Pereira RDS, Menezes JD, Bonardi JP, Griza GL, Okamoto R, Hochuli-Vieira E. Histomorphometric and immunohistochemical assessment of RUNX2 and VEGF of Biogran™ and autogenous bone graft in human maxillary sinus bone augmentation: A prospective and randomized study. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2017;19(5):867-875.

Piattelli A, Scarano A, Piattelli M, Coraggio F, Matarasso S. Bone regeneration using Bioglass: an experimental study in rabbit tibia. *J Oral Implantol.* 2000; 26(4):257-61.

Pietrokovski J, Massler M. Ridge remodeling after tooth extraction in rats. *J Dent Res.* 1967;46(1):222-31.

Pinheiro AL, Gerbi ME. Photoengineering of bone repair processes. *Photomed Laser Surg.* 2006;24(2):169-78.

Pinheiro AL, Limeira Júnior Fde A, Gerbi ME, Ramalho LM, Marzola C, Ponzi EA. Effect of low level laser therapy on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone. *Braz Dent J.* 2003; 14(3):177-81.

Pinheiro AL, Martinez Gerbi ME, de Assis Limeira F Jr, Carneiro Ponzi EA, Marques AM, Carvalho CM, de Carneiro Santos R, Oliveira PC, Nóia M, Ramalho LM. Bone repair following bone grafting hydroxyapatite guided bone regeneration and infra-red laser photobiomodulation: a histological study in a rodent model. *Lasers Med Sci.* 2009;24(2):234-40.

Pinheiro AL. Evolução Histórica e Uso do Laser na Odontologia. In: Pinheiro AL, Brugnera Júnior A, Zanin FAA. *Aplicação do Laser na Odontologia.* 1 ed. São Paulo: Santos, 2010.p.1-22.

Prado RFD, Ankha MDVEA, Bueno DAG, Santos ELS, Tini ÍRP, Ramos CJ, Spalding M, Vasconcellos LGO, Vasconcellos LMR. CaP Coating and Low Level Laser Therapy to Stimulate Early Bone Formation and Improve Fixation of Rough Threaded Implants. *Implant Dent*. 2018;27(6):660-666.

Proussaefs P, Lozada J, Kleinman A, Rohrer MD. The use of ramus autogenous block grafts for vertical alveolar ridge augmentation and implant placement: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2002;17(2):238-48.

Quinn R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition*. 2005; 21(6): 775-7.

Rasouli Ghahroudi AA, Rokn AR, Kalhori KA, Khorsand A, Pournabi A, Pinheiro AL, et al. Effect of low-level laser therapy irradiation and Bio-Oss graft material on the osteogenesis process in rabbit calvarium defects: a double blind experimental study. *Lasers Med Sci*. 2014;29(3):925-32.

Renno AC, Bossini PS, Crovace MC, Rodrigues AC, Zanotto ED, Parizotto NA. Characterization and in vivo biological performance of biosilicate. *Biomed Res Int*. 2013;2013.

Renno AC, McDonnell PA, Parizotto NA, Laakso EL. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro. *Photomed Laser Surg*. 2007; 25(4):275-80.

Rogers GF, Greene AK. Autogenous Bone Graft: Basic Science and Clinical Implications. *J of Craniofacial Sugery*. 2012; 23(1): 323-7.

Røynesdal AK, Björnland T, Barkvoll P, Haanaes HR. The effect of soft-laser application on postoperative pain and swelling. A double-blind, crossover study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1993; 22(4):242-5.

Santinoni CD, Oliveira HF, Batista VE, Lemos CA, Verri FR. Influence of low-level laser therapy on the healing of human bone maxillofacial defects: A systematic review. *J Photochem Photobiol B*. 2017;169:83-89.

Santos FA, Pochapski MT, Martins MC, Zenóbio EG, Spolidoro LC, Marcantonio E Jr. Comparison of biomaterial implants in the dental socket: histological analysis in dogs. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2010;12(1):18-25.

Schepers E, de Clercq M, Ducheyne P, Kempeneers R. Bioactive glass particulate material as a filler for bone lesions. *J Oral Rehabil*. 1991;18(5):439-52.

Schepers EJ, Ducheyne P. Bioactive glass particles of narrow size range for the treatment of oral bone defects: a 1-24 month experiment with several materials and particle sizes and size ranges. *J Oral Rehabil.* 1997; 24(3):171-81.

Schmitt CM, Doering H, Schmidt T, Lutz R, Neukam FW, Schlegel KA. Histological results after maxillary sinus augmentation with Straumann® BoneCeramic, Bio-Oss®, Puros®, and autologous bone. A randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24(5):576-85.

Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res.* 1986;(205):299-308.

Schropp L, Wenzel A, Kostopoulos L, Karring T. Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: a clinical and radiographic 12-month prospective study. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2003; 23(4):313-23.

Schwartz Z, Doukarsky-Marx T, Nasatzky E, Goultchin J, Ranly DM, Greenspan DC, et al. Differential effects of bone graft substitutes on regeneration of bone marrow. *Clinical Oral Implant Res* 2008; 19:1233-1245.

Scotchford CA, Shahtaheri M, Chen PS, Evans M, Parsons AJ, Aitchison GA, Efeoglu C, Burke JL, Vikram A, Fisher SE, Rudd CD. Repair of calvarial defects in rats by prefabricated, degradable, long fibre composite implants. *J Biomed Mater Res A.* 2011;96(1):230-8.

Sculean A, Barbé G, Chiantella GC, Arweiler NB, Berakdar M, Brex M. Clinical evaluation of an enamel matrix protein derivative combined with a bioactive glass for the treatment of intrabony periodontal defects in humans. *J Periodontol.* 2002; 73(4):401-8.

Sella VR, do Bomfim FR, Machado PC, da Silva Morsoleto MJ, Chohfi M, Plapler H. Effect of low-level laser therapy on bone repair: a randomized controlled experimental study. *Lasers Med Sci.* 2015;30(3):1061-8.

Silva EM, Gomes SP, Ulbrich LM, Giovanni AF. Avaliação histológica da laserterapia de baixa intensidade na cicatrizacao de tecidos epitelial, conjuntivo e ósseo: estudo experimental em ratos. *RevSul-Bras Odontol.* 2007; 4: 29-35.

Silvestri M, Rasperini G, Milani S. 120 infrabony defects treated with regenerative therapy: a long- term results. *J Periodontol.* 2011; 82(5):668–675.

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*. 2013; 24(3):218-23.

Stanton KT, O'Flynn KP, Nakahara S, Vanhumbecck JF, Delucca JM, Hooghan B. Study of the interfacial reactions between a bioactive apatite-mullite glass-ceramic coating and titanium substrates using high angle annular dark Field transmission electron microscopy. *J Mater Sci Mater Med*. 2009; 20(4):851-7.

Stavropoulos A, Kostopoulos L, Nyengaard JR, Karring T. Deproteinized bovine bone (Bio-Oss) and bioactive glass (Biogran) arrest bone formation when used as an adjunct to guided tissue regeneration (GTR): an experimental study in the rat. *J Clin Periodontol*. 2003; 30(7):636-43.

Stavropoulos A, Sculean A, Bosshardt DD, Buser D, Klinge B. Pre-clinical in vivo models for the screening of bone biomaterials for oral/craniofacial indications: focus on small-animal models. *Periodontol 2000*. 2015; 68(1):55-65.

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; 23(2):161-6.

Sun G, Tunér J. Low-level laser therapy in dentistry. *Dent Clin North Am*. 2004; 48(4):1061-76.

Tadjoedin ES, de Lange GL, Bronckers AL, Lyaruu DM, Burger EH. Deproteinized cancellous bovine bone (Bio-Oss) as bone substitute for sinus floor elevation. A retrospective, histomorphometrical study of five cases. *J Clin Periodontol*. 2003;30(3):261-70.

Tadjoedin ES, de Lange GL, Holzmann PJ, Kulper L, Burger EH. Histological observations on biopsies harvested following sinus floor elevation using a bioactive glass material of narrow size range. *Clin Oral Implants Res*. 2000;11(4):334-44.

Tapety FI, Amizuka N, Uoshima K, Nomura S, Maeda T. A histological evaluation of the involvement of Bio-Oss in osteoblastic differentiation and matrix synthesis. *Clin Oral Implants Res*. 2004;15(3):315-24.

Tetsch J, Tetsch P, Lysek DA. Long-term results after lateral and osteotome technique sinus floor elevation: a retrospective analysis of 2190 implants over a time period of 15 years. *Clin Oral Implants Res*. 2010; 21(5):497-503.

Topazian RG, Hammer WB, Boucher LJ, Hulbert SF. Use of alloplastics for ridge augmentation. *J Oral Surg*. 1971; 29(11):792-8.

Torres CS, dos Santos JN, Monteiro JS, Amorim PG, Pinheiro AL. Does the use of laser photobiomodulation, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration improve the outcome of autologous bone grafts? An in vivo study in a rodent model. *Photomed Laser Surg.* 2008;26(4):371-7.

Torricelli P, Giavaresi G, Fini M, Guzzardella GA, Morrone G, Carpi A, et al. Laser biostimulation of cartilage: in vitro evaluation. *Biomed Pharmacother.* 2001; 55(2):117-20.

Traini T, Valentini P, Iezzi G, Piattelli A. A histologic and histomorphometric evaluation of anorganic bovine bone retrieved 9 years after a sinus augmentation procedure. *J Periodontol.* 2007;78(5):955-61.

Trombelli L, Heitz-Mayfield LJ, Needleman I, Moles D, Scabbia A. A systematic review of graft materials and biological agents for periodontal intraosseous defects. *J Clin Periodontol.* 2002; 29 (3):117-35.

Turunen T, Peltola J, Yli-Urpo A, Happonen RP. Bioactive glass granules as a bone adjunctive material in maxillary sinus floor augmentation. *Clin Oral Implants Res.* 2004;15(2):135-41.

Vajgel A, Mardas N, Farias BC, Petrie A, Cimões R, Donos N. A systematic review on the critical size defect model. *Clin Oral Implants Res.* 2014;25(8):879-93.

Valentini P, Abensur D, Wenz B, Peetz M, Schenk R. Sinus grafting with porous bone mineral (Bio-Oss) for implant placement: a 5-year study on 15 patients. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2000;20(3):245-53.

Valerio P, Pereira MM, Goes AM, Leite MF. The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. *Biomaterials.* 2004;25(15):2941-8.

Vivan RR, Mecca CE, Bigueti CC, Rennó AC, Okamoto R, Cavenago BC, et al. Experimental maxillary sinus augmentation using a highly bioactive glass ceramic. *J Mater Sci Mater Med.* 2016;27(2):41.

Wallace SS, Froum SJ, Tarnow DP. Histologic evaluation of a sinus elevation procedure: a clinical report. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1996;16(1):46-51.

Walmsley GG, Ransom RC, Zielins ER, Leavitt T, Flacco JS, Hu MS, et al. Stem Cells in Bone Regeneration. *Stem Cell Rev.* 2016; 12(5):524-529.

Weatherholt AM, Fuchs RK, Warden SJ. Specialized connective tissue: bone, the structural framework of the upper extremity. *J Hand Ther.* 2012; 25(2):123-31.

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;24(1):38-44.

Wenz B, Oesch B, Horst M. Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. *Biomaterials.* 2001; 22(12):1599-606.

Zein R, Selting W, Benedicenti S. Effect of Low-Level Laser Therapy on Bone Regeneration During Osseointegration and Bone Graft. *Photomed Laser Surg.* 2017;35(12):649-658.

Zizzari VL, Zara S, Tetè G, Vinci R, Gherlone E, Cataldi A. Biologic and clinical aspects of integration of different bone substitutes in oral surgery: a literature review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2016; 122(4):392-402.

ANEXO

ANEXO

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

**Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em
Animais**

CEEPA-Proc. Nº 017/2016

Bauru, 12 de dezembro de 2016.

Senhora Professora,

Informamos que a proposta intitulada ***Efeito do laser de baixa intensidade na regeneração de defeitos ósseos críticos tratados com osso autógeno e diferentes biomateriais***, registrada sob **CEEPA-Proc. Nº 017/2016**, o qual utilizará cortes histológicos provenientes de amostras coletadas de animais de estudos previamente aprovados por esta CEEPA, sob protocolos CEEPA-Proc. Nº 018/2010 (relatório final aprovado em 18.11.2016) e CEEPA-Proc. Nº 037/2013 (relatório final aprovado em 09/12/2016), tendo Vossa Senhoria como Pesquisador Responsável, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi analisada e considerada APROVADA a sua execução nas dependências da FOB-USP, *ad referendum* desta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais (CEEPA).

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização:	Dezembro/2016 a Outubro/2017
Espécie/linhagem/raça:	Rattus norvegicus / Wistar
Nº de animais:	Não se aplica (cortes histológicos)
Peso/Idade	Não se aplica
Sexo:	Não se aplica
Origem:	Biotério de criação da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP

Esta CEEPA solicita que ao final da pesquisa seja enviado um Relatório com os resultados obtidos para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,

Profª Drª Ana Paula Campanelli
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Profa. Dra. Ana Lúcia Pompéia Fraga de Almeida
Docente do Departamento de Prótese e Periodontia