UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

NICOLE ROSA DE FREITAS

**Avaliação do efeito do laser de baixa intensidade na regeneração
de defeitos ósseos de tamanho crítico preenchidos com osso
autógeno ou xenógeno associados à membrana colágena**

BAURU
2018

NICOLE ROSA DE FREITAS

**Avaliação do efeito do laser de baixa intensidade na regeneração
de defeitos ósseos de tamanho crítico preenchidos com osso
autógeno ou xenógeno associados à membrana colágena**

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia
de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências Odontológicas
Aplicadas, na área de concentração Reabilitação Oral.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Lúcia Pompéia Fraga de
Almeida

BAURU
2018

Freitas, Nicole Rosa de

Avaliação do efeito do laser de baixa intensidade na regeneração de defeitos ósseos de tamanho crítico preenchidos com osso autógeno ou xenógeno associados à membrana colágena / Nicole Rosa de Freitas. Bauru, 2018

99 p. : 18 il. ; 31cm.

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

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: 015/2016

Data: 12/12/2016

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, que sempre me deram suporte para a concretização de mais um sonho, peças fundamentais em toda minha formação acadêmica e pessoal, meus exemplos de caráter, persistência e comprometimento. A vocês, mais essa conquista!

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por me permitir exercer a Odontologia. Por todas as bênçãos concebidas a mim e minha família e pela oportunidade de relizar o sonho de estudar na Faculdade de Odontologia de Bauru.

Aos meus pais, peças fundamentais em toda minha formação acadêmica e pessoal, sem os quais nada disso seria possível. Minha gratidão será infinita e sei que jamais conseguirei recompensá-los. Agradeço por cada palavra de incentivo e força para enfrentar os obstáculos da vida e nunca desistir dos meus sonhos.

À professora Ana Lúcia Pompéia Fraga de Almeida pela oportunidade de mais uma vez fazer parte de sua linha de pesquisa e por todo conhecimento transferido a nós no decorrer desses anos. Mulher guerreira e muito inteligente que conquistou seu espaço pela competência e dedicação em sua trajetória profissional. Minha eterna gratidão pelas portas abertas e por sempre acreditar em mim!

À minha “irmã siamesa”, Luísa, ou melhor, “Querida”, por estar sempre comigo, nas alegrias e tristezas que o mestrado proporciona. Por todas as conversas, risadas, sorvetes da Borelli, pelas tardes incessantes fazendo leituras de lâminas e fotografias, que tantas vezes não deram certo e tiveram de ser repetidas. Obrigada pelo ombro amigo que me ampara sempre! Mais do que duplas inseparáveis de mestrado, amigas da vida!

Ao Denis, meu fiel companheiro, namorado e amigo, ouvinte de tantas lamúrias e medos, mas também de sonhos e conquistas. Obrigada por cada palavra amiga e por sempre tentar fazer-me sentir melhor e mais competente.

À minha prima/amiga/irmã Juliana, por todos os momentos juntas, pelas conversas e planos relacionados à minha carreira e vida pessoal, pelas vezes que me fez sair da dieta e pelos bons momentos no apartamento 92. Obrigada por fazer parte da minha vida!

Ao meu irmão Marcus Vinícius por todo apoio, e por acreditar em mim sempre! Além de toda ajuda e suporte gráfico. Obrigada por me salvar com o Photoshop tantas vezes!

Ao professor Luis Augusto Esper, obrigada pela paciência de sempre e por nos ajudar tantas vezes, pessoa fundamental para a construção deste trabalho.

Ao professor José Henrique Rubo pelo conhecimento transmitido a nós, e pela paciência com que nos ajudava em clínica de maneira humilde e muito didática.

Aos demais professores das Disciplinas de Prótese, obrigada pelas trocas de conhecimentos durante esses anos. Pessoas de muita inteligência e caráter, exímios profissionais.

Aos demais envolvidos, que de alguma maneira fizeram parte desta conquista!

Muito obrigada!

***“O sucesso nasce do querer,
da determinação e persistência em se
chegar a um objetivo. Mesmo não
atingindo o alvo, quem busca e vence
obstáculos, no mínimo fará coisas
admiráveis”.***

José de Alencar

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do laser de baixa intensidade (LBI), na regeneração de defeitos de tamanho críticos preenchidos com osso autógeno ou Bio-Oss® associados à membrana colágena. O estudo foi conduzido em 120 defeitos críticos (5 mm) em calvárias de ratos machos (*Rattus norvegicus, albinus*, Wistar), pesando entre 250 a 300g, divididos em 12 grupos experimentais (n=10): 1) Grupo C (Controle – coágulo sanguíneo); 2) Grupo M (membrana colágena-BioGide®); 3) L (laser de baixa intensidade, GaAlAs, λ 808 nm, 100 mW, 6J, 210 J/cm²); 4) Grupo OA (osso autógeno); 5) Grupo OA/L (osso autógeno + LBI) 6) Grupo OA/M (osso autógeno + membrana colágena); 7) Grupo L/M (LBI + membrana colágena); 8) Grupo OA/L/M (osso autógeno + LBI + membrana colágena); 9) Grupo BO (Bio-Oss®); 10) Grupo BO/M (Bio-Oss® + membrana colágena) 11) Grupo BO/L (Bio-Oss® + LBI); 12) Grupo BO/L/M (Bio-Oss® + LBI + membrana colágena). Aos 30 dias pós-operatórios os animais foram sacrificados e após o processamento tecidual, foram realizadas análises histológica, histométrica e estatística. Os dados foram submetidos ao teste paramétrico ANOVA, seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As variáveis analisadas foram: área de osso neoformado (AON) e área de partículas residuais (APR). Todos os grupos apresentaram maiores quantidades de AON quando comparados ao grupo C ($9,96\% \pm 4,49\%$). Quando o LBI foi associado aos biomateriais apresentou diferença estatística significativa somente no grupo BO/L ($48,57\% \pm 28,22\%$, $p < 0,05$). Menor APR foi encontrada nos grupos irradiados pelo LBI, com diferença estatística significativa para o grupo BO/L ($16,74\% \pm 15,25\%$, $p < 0,05$). O LBI possui efeito positivo na regeneração óssea de DTC, e embora na análise estatística tenha apresentado diferença significativa somente quando aplicado sobre o Bio-Oss®, na análise histomorfométrica foi possível observar formação óssea em extensões variadas nos demais grupos.

Palavras-chave: transplante ósseo, lasers, regeneração

ABSTRACT

Evaluation of the effect of low-level laser therapy on the regeneration of critical size defects filled with autogenous bone or xenogenous bone associated to collagenous membrane

The purpose of the study was to evaluate the effect of low-level laser therapy (LLLT) on guided bone regeneration of critical size defects filled with autogenous bone or Bio- Oss® associated with the collagen membrane. The study was conducted in 120 critical size defects (5mm) in male rats (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar), weighing between 250 and 300g, divided into 12 experimental groups (n = 10): 1) Group C (control – only blood clot); 2) Group M (collagen membrane-BioGide®); 3) Group LLLT (low-level laser therapy, GaAlAs, λ 808 nm, 100 mW, 6J, 210 J/cm²); 4) Group AB (autogenous bone); 5) Group AB/LLLT (autogenous bone + LLLT); 6) Group AB/M (autogenous bone + collagen membrane); 7); Group LLLT/M (LLLT + collagen membrane) 8) Group AB/LLLT/M (autogenous bone + LLLT + collagen membrane); 9) Group BO (Bio-Oss®); 10) Group BO/M (Bio-Oss® + collagen membrane) 11) Group BO/LLLT (Bio-Oss® + LLLT), 12) Group BO/LLLT/M – Bio-Oss® + LLLT + collagen membrane). The animals were killed 30 days postoperatively. After tissue processing, bone regeneration was evaluated by histomorphometric and statistical analysis was performed (Tukey test, $p < 0,05$). The variables analyzed were the area of newly formed bone (NFB) and residual particle area (RPA). All groups presented greater amounts of AON when compared to group C ($9,96\% \pm 4,49\%$). When LBI was associated with biomaterials, it showed a significant statistical difference only in the BO/L group ($48,57\% \pm 28,22\%$, $p < 0,05$). Smaller APR was found in the groups irradiated by LBI, with a significant statistical difference for BO/L group ($16,74\% \pm 15,25\%$, $p < 0,05$). LBI has a positive effect on bone regeneration of DTC, and although in the statistical analysis it presented significant difference only when applied on Bio-Oss®, in the histomorphometric analysis it was possible to observe bone formation in varied extensions in the other groups.

Key-words: bone transplantation, lasers, regeneration

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: A) Antissepsia e tricotomia da calvária; B) retalho semilunar de espessura total rebatido para posterior; C) DTC confeccionado 46
- Figura 2: Marcações em “L” preenchidas com amálgama..... 47
- Figura 3: A) Grupo C; B) Grupo OA; C) Grupo BO; D) Aplicação do LBI (Grupo OA/L); E) Posicionamento da membrana colágena 47
- Figura 4: Esquema de aplicação do LBI em cinco pontos da calvária 48
- Figura 5: Divisão da peça no longo eixo do DTC utilizando a marcação em “L” como referência 50
- Figura 6: Fotomicrografia de um corte histológico (4x – H.E) para esquematização das medições realizadas. AT delimitada pela linha preta correspondente à área da calvária onde o defeito foi cirurgicamente criado. A altura da AT (X) corresponde à espessura do osso original da calvária (Y). A AON foi delimitada pela linha azul e APR pela linha verde 50
- Figura 7: Fotomicrografias do grupo C. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico (4x- H.E); (B) Tecido conjuntivo, fibras colágenas paralelas..... 55
- Figura 8: Fotomicrografias do grupo L. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico (4x- H.E); (B) Formação de osso novo em direção ao centro do defeito, com osteócitos na matriz (seta) (20x); (C) Tecido conjuntivo bem organizado, com fibras colágenas paralelas e fibroblastos dispostos paralelamente ao longo dos feixes das fibras (setas) 56
- Figura 9: Fotomicrografia do grupo OA. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico (4x- H.E); (B) Partícula de osso autógeno (asterisco) com tecido ósseo neoformado em sua periferia (ON) e osteoblastos (setas) em íntimo contato..... 57
-
-

Figura 10:	Fotomicrografias do grupo M. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico (4x- H.E); (B) Membrana ossificada em direção ao defeito cirúrgico (asterisco) e em íntimo contato com a extremidade da calvária original (CO); presença de espaços medulares na região da membrana ossificasa (seta) (20x)	58
Figura 11:	Fotomicrografias do grupo M/L. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico (4x- H.E); (B) Membrana ossificada (asterisco), calvária original (CO) com formação de novo osso em sua periferia (seta) (10x); (C) Espaços medulares (asterisco) e muitos osteócitos (setas) (20x).....	59
Figura 12:	Fotomicrografias do grupo BO. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico (4x- H.E); (B) Osteoclasto na periferia de partícula de osso bovino (seta) (40x)	60
Figura 13:	Fotomicrografia do grupo OA/L. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico (4x- H.E); (B) Formação óssea ao redor da partícula (asterisco) (20x); (C) Osteoclasto na periferia da partícula de osso autógeno (seta) (40x)	61
Figura 14:	Fotomicrografias do grupo OA/M. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico (4x- H.E); (B) Membrana ossificada, presença de osteócitos (setas) e espaços medulares (asterisco) (40x); (C) Partícula residual de osso autógeno (asterisco) com formação de osso novo ao seu redor (seta) (20x)	62
Figura 15:	Fotomicrografias do grupo OA/L/M. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico (4x- H.E); (B) Membrana colágena ossificada (asterisco), calvária original (CO) com osso novo ao redor (seta) (20x); (C) Partícula de osso autógeno (asterisco) com formação de novo osso ao seu redor (seta) (40x)	63

-
-
- Figura 16: Fotomicrografias do grupo BO/L. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico (4x- H.E); (B) Formação de osso novo no interior da partícula de osso bovino (seta) (20x), presença de tecido conjuntivo bem organizado; (C) Formação de osso novo em direção ao centro do defeito (asterisco), presença de matriz osteóide (seta), CO-calvária original (10x) 64
- Figura 17: Fotomicrografias do grupo BO/M. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico (4x- H.E); (B) Osteoclasto na periferia da partícula de osso bovino (seta) (40x); (C) Ossificação da membrana colágena em direção ao centro do defeito (asterisco), CO- calvária original (10x). 65
- Figura 18: Fotomicrografias do grupo BO/L/M. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico (4x- H.E); (B) Formação de osso novo ao redor de partícula de osso bovino (seta), área de novo osso (ON) (40x); (C) Membrana colágena ossificada (asterisco) (20x) 66
-
-

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Médias, desvio-padrão, Q 25, medianas e Q 75 dos valores de AON em porcentagem	67
Tabela 2: Comparação múltipla dos valores de AON em porcentagem entre o grupo L e os demais.....	68
Tabela 3: Comparação múltipla dos valores de AON em porcentagem entre os grupos sem aplicação do LBI e seus respectivos grupos com a aplicação da modalidade terapêutica	68
Tabela 4: Médias, desvio-padrão, Q 25, medianas e Q 75 dos valores de APR em porcentagem	69
Tabela 5: Comparação múltipla dos valores de APR em porcentagem entre os grupos sem aplicação do LBI e seus respectivos grupos com a aplicação da modalidade terapêutica	69

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
GaAIs	Arseneto de Gálio e Alumínio
AON	Área de Osso Neoformado
APR	Área de Partícula Residual
AT	Área Total
BO	Bio-Oss®
C	Controle
cm	centímetro
cm ²	centímetro quadrado
DTC(s)	Defeito(s) de Tamanho(s) Crítico(s)
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
g	gramas
H.E	Hematoxilina e Eosina
J	Joule
kg	Quilograma
LBI	Laser de Baixa Intensidade
Ltda.	Limitada
M	Membrana Colágena
mg	miligrama
ml	mililitro
mm	milímetro
mm ²	milímetro quadrado
µm	micrometro
mW	milliwatt
nm	nanometro
OA	Osso Autógeno
ROG	Regeneração Óssea Guiada
ATP	Adenosina Trifosfato
ALP	Fosfatase Alcalina
COX-2	Ciclo-oxigenase- 2
HeNe	Hélio-Neon

GaAs	Arseneto de Gálio
HA	Hidroxiapatita
PTFE-e	Politetrafluoretileno expandido
RTG	Regeneração Tecidual Guiada
BMP'S	Proteínas Morfogenéticas
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
TGF- β 1	Fator de Crescimento Transformador Beta
TGF- α	Fator de Crescimento Transformador Alfa
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
CO ₂ Nd:Yag	Dióxido de Carbono e Neodímeo Yag
Er:Yag	Érbio Yag

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	Tecido ósseo	21
2.2	Regeneração óssea.....	22
2.2.1	Regeneração tecidual de alvéolos.....	24
2.3	Osso autógeno e seus substitutos.....	25
2.4	Regeneração óssea guiada.....	28
2.5	Laser de baixa intensidade.....	31
2.6	Modelo experimental.....	35
3	PROPOSIÇÃO	41
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1	Modelo Experimental	45
4.2	Procedimento Cirúrgico	46
4.3	Protocolo de Aplicação do Laser de Baixa Intensidade.....	48
4.4	Processamento Tecidual	49
4.5	Análise Histomorfométrica	49
4.6	Análise Estatística.....	50
5	RESULTADOS	55
5.1	Análise histológica	55
5.2	Análise estatística.....	67
6	DISCUSSÃO	73
7	CONCLUSÃO.....	81
	REFERÊNCIAS	85
	ANEXO	99

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Anualmente, em média 2,2 milhões de cirurgias de enxerto ósseo são realizadas ao redor do mundo (GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005) e o osso autógeno ainda é o material de enxertia mais utilizado (HOEXTER, 2002; STRECKBEIN et al., 2013) uma vez que, detém propriedades osteogênicas, osteoindutoras e osteocondutoras (BRUNSVOLD; MELLONIG 1993; HOEXTER, 2002), não apresenta antigenicidade (HOEXTER, 2002), possui estrutura natural de arcabouço e colágeno tipo I, que promove resiliência e revascularização (HOEXTER, 2002). Entretanto, apresenta dentro de suas desvantagens, maior morbidade e taxa de reabsorção descontrolada, o que pode impactar negativamente nos resultados pós-operatórios (HALLMAN; THOR, 2008; BALDINI; DE SANCTIS; FERRARI, 2011).

Como alternativa ao uso do osso autógeno, os biomateriais vêm sendo amplamente utilizados como substitutos ósseos em alvéolos pós-extração, defeitos ósseos angulares em dentes, levantamento de seio maxilar, bem como na implantodontia (BERGLUNDH; LINDHE 1997; PIATTELLI et al., 1999; ARTZI et al. 2001; YILDIRIM et al., 2000; CARMAGNOLA et al., 2003; NORTON et al., 2003; NEVINS et al., 2011; ARAUJO et al., 2008; SANTIS et al. 2016). Idealmente devem apresentar características de antigenicidade, biocompatibilidade, possibilidade de esterilização, ser capaz de manter espaço, além de fácil manuseio durante o procedimento cirúrgico (POLIMENI et al., 2004; BALDINI; DE SANCTIS; FERRARI, 2011; ALMEIDA et al., 2016).

Os biomateriais podem ser de várias origens sendo o de origem bovina, especialmente o Bio-Oss®, o material com maior evidência científica (HALLMAN; THOR, 2008). Derivado de osso bovino, sua porção orgânica é eliminada durante o processamento laboratorial, a fim de evitar a rejeição após sua implantação no leito receptor. Após este procedimento, o material perde sua capacidade osteoindutora, e passa a deter apenas a característica osteocondutora (HALLMAN; THOR, 2008), contudo mantém a estrutura original do osso (BALDINI; DE SANCTIS; FERRARI, 2011), com macro e microporos similares aos do osso esponjoso humano,

proporcionando um excelente arcabouço para a formação de novo osso (HALLMAN; THOR, 2008).

A utilização de membranas biológicas em regeneração óssea guiada (ROG), proporciona estabilização do material de enxertia nas dependências do defeito ósseo bem como exclui a migração epitelial para seu interior, mantendo espaço para que células osteogênicas do osso hospedeiro repovoem a área do defeito e acelerem o reparo ósseo (BUSER et al., 1990; KITAYAMA et al., 2016).

Ainda há controvérsias na literatura quanto ao potencial de reabsorção desses substitutos. Quando comparado ao osso autógeno, biomateriais com reabsorção escassa ou até mesmo ausente, podem comprometer a osteogênese durante a fase de remodelação (CARMAGNOLA et al., 2003; ARAÚJO et al., 2008; LINDHE et al., 2014; ZIZZARI et al., 2016). Assim, tendo em vista a ausência de propriedades osteogênicas e o potencial de reabsorção descontrolado dos biomateriais utilizados atualmente, além do atraso no reparo, a aplicação de protocolos de laser de baixa intensidade (LBI) vem sendo amplamente pesquisada em estudos “in vitro” (OZAWA et al., 1998; DÖRBUDAK et al., 2000; TORRICELLI et al., 2001) e “in vivo” (SAITO et al., 1997; DELGADO et al., 1997; MAEGAWA et al., 2000; CAPON et al., 2001; PINHEIRO et al., 2009; DE ALMEIDA et al., 2014; CUNHA et al., 2014; MONEA et al., 2015; BOSCO et al., 2016; JONASSON et al., 2017; FREITAS et al., 2018; DE OLIVEIRA et al., 2018; MOREIRA et al., 2018), que relatam efeitos encorajadores na sua utilização para acelerar o reparo de defeitos ósseos, além de atuar no processo inflamatório, e melhorar a microcirculação (IHSAN, 2005).

Ao associar a terapia com LBI ao enxerto ósseo bovino inorgânico, em regeneração óssea guiada (ROG), seus efeitos relacionados com a síntese de colágeno e hidroxiapatita, resultam em uma melhora no reparo ósseo o que ocorre mais lentamente em casos onde somente o enxerto é utilizado (GERBI et al., 2005; LOPES et al., 2005; CUNHA et al., 2014; DE OLIVEIRA et al., 2018).

Apesar de muitos estudos utilizarem o LBI, os resultados ainda são muito incipientes uma vez que não há um consenso quanto ao protocolo a ser utilizado em diferentes materiais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tecido ósseo

O tecido ósseo, é um tecido conjuntivo especializado, principal constituinte do corpo humano e responsável pela proteção dos órgãos, apoio aos músculos, locomoção, alojamento e proteção da medula óssea. Serve como depósito de sais minerais como cálcio, fósforo e magnésio, armazenando-os ou liberando-os de maneira controlada para manter a concentração adequada destes no corpo. É formado por uma matriz óssea calcificada e células como osteócitos, osteoblastos e osteoclastos. Sua homeostasia está relacionada com a atividade equilibrada destas duas últimas células para que haja reabsorção e aposição óssea constantes (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Osteoblastos são células de origem mesenquimal, encontradas na superfície óssea que está sendo formada, compreendendo 4-6% da população celular (CAPULLI; PAONE; RUCCI, 2014), responsáveis pela formação óssea e secreção de componentes orgânicos da matriz como colágeno tipo I, proteoglicanas e glicoproteínas (MACKIE, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; MARUOTTI et al., 2012) e estão envolvidas na regulação dos osteoclastos (MACKIE, 2003). Quando maduras, são células cubóides, apresentam um citoplasma rico em retículo endoplasmático rugoso, complexo de Golgi desenvolvido e vesículas secretoras (MACKIE, 2003; CAPULLI; PAONE; RUCCI, 2014).

A síntese da matriz orgânica pelos osteoblastos ocorre em duas etapas: primeiramente ocorre a deposição da matriz orgânica (deposição de proteínas colágenas - colágeno tipo I; proteínas não colágenas e proteoglicanas) e em sequência sua mineralização, que também ocorre em dois estágios: fase vesicular na qual ocorre a formação de hidroxiapatita dentro das vesículas da matriz e fase fibrilar, que ocorre com a supersaturação de íons de cálcio e fosfato dentro das vesículas da matriz levando à ruptura dessas estruturas e consequentemente espalhamento dos cristais de hidroxiapatita para a matriz circundante (FLORENCIO-SILVA et al., 2015). A porção inorgânica compreende 50% da matriz óssea e os principais íons

constituintes são o cálcio e fosfato, e a orgânica é constituída por 95% de fibras colágenas (colágeno tipo I), proteoglicanas e glicoproteínas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Derivados da linhagem dos osteoblastos, os osteócitos são osteoblastos que durante a osteogênese, ficam aprisionados na matriz óssea. É a célula mais abundante do tecido ósseo compreendendo 95% de suas células (FLORENCIO-SILVA et al., 2015) e atuam como organizadores da remodelação óssea regulando a atividade dos osteoclastos e osteoblastos além de desempenhar importante papel no metabolismo do fosfato e na disponibilidade de cálcio (BONEWALD, 2011).

Os osteoclastos são células que se originam de precursores mononucleados provenientes da medula-óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004), responsáveis pela reabsorção óssea, evento importante para muitos processos que ocorrem no esqueleto, como erupção dentária, crescimento ósseo, reparo de fraturas, e de fundamental importância para a manutenção de cálcio no organismo (VÄÄNÄNEN, 2000). Atuam secretando para o interior da matriz óssea, ácido (H^+), collagenase e outras hidrolases que digerem a matriz óssea e dissolvem os cristais de cálcio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A comunicação entre essas três células é fundamental para a manutenção da saúde óssea. Além disso, o equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea depende da ação de fatores locais e sistêmicos como hormônios e citocinas (FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

2.2 Regeneração óssea

Diante uma injúria tecidual, como fraturas ou até mesmo defeitos criados cirurgicamente, uma série de acontecimentos ocorrem para que haja a regeneração óssea.

A resposta da cicatrização depende do tipo e da natureza do tecido lesado. Quando há restituição por meio de um tecido sem distinção do tecido de origem com

o novo tecido, ou seja, quando não há cicatriz, tem-se o processo de regeneração, que ocorre somente em tecido ósseo e no fígado (MILORO et al., 2013).

Imediatamente após uma injúria tecidual, inicia-se a fase de cicatrização óssea. Há extravasamento de sangue e em seguida ocorre a agregação plaquetária para fechar os vasos rompidos e assim cessar o sangramento, é a denominada fase inflamatória, acompanhada por edema moderado. Citocinas liberadas na lesão produzem sinais quimiotáticos que recrutam neutrófilos e macrófagos, para que realizem a “limpeza” da região, a fim de remover bactérias, tecidos necróticos e componentes degradados da matriz (ZANINI, 1990; MILORO et al., 2013). Após ativados, os macrófagos liberam citocinas e fatores do crescimento (TGF- α , TGF- β 1, PDGF e fator de crescimento semelhante à insulina). Os macrófagos exercem importante função no início da cicatrização pois regulam a remodelação do tecido local, induzindo formação de nova matriz extracelular e modulam a angiogênese e fibroplastia (MILORO et al., 2013).

Em seguida, inicia-se a fase de reparação, na qual um grande número de fibroblastos forma um calo fibroso, com o propósito de estabilizar os fragmentos fraturados. Concomitantemente ao trabalho dos macrófagos em remover coágulo e tecido necrótico, uma nova rede capilar é formada, oriunda das células endoteliais dos vasos rompidos, e das células indiferenciadas, que juntamente com os fibroblastos e osteoblastos, invadem o local da injúria para neoformar um tecido ósseo, através da ossificação intramembranosa que resulta em osso imaturo, formando o calo ósseo que substitui o tecido fibroso (ZANINI, 1990).

O calo ósseo, na fase remodeladora, passa por processos de reabsorção para que a área afetada obtenha as mesmas características que detinha antes da injúria. Nessa fase, graças às atividades osteoblásticas e osteoclásticas, há a remoção do calo ósseo e restabelecimento das estruturas ósseas existentes previamente (ZANINI, 1990).

Em muitos aspectos, a cicatrização de enxertos ósseos é semelhante à cicatrização de fraturas (HALLMAN; THOR, 2008).

2.2.1 Regeneração tecidual de alvéolos

A regeneração do alvéolo após exodontia pode ser descrita em cinco fases: 1ª) formação de coágulo - composto por eritrócitos, plaquetas e leucócitos embebidos em uma rede de fibrina (TROMBELLI et al., 2008) - a partir de células oriundas da circulação imediatamente após a extração dentária com duração de três dias; 2ª) substituição do coágulo por um tecido de granulação (4 a 5 dias); 3ª) substituição do tecido de granulação por tecido conjuntivo (14 a 16 dias); 4ª) calcificação osteóide na base e periferia do alvéolo, onde a partir do 7º dia já pode ser observada essa matriz osteóide imatura e em 6 semanas o alvéolo está praticamente preenchido por osso trabecular; 5ª) fechamento epitelial completo do alvéolo (24 a 35 dias), e preenchimento ósseo completo (16 semanas) com poucas células osteogênicas (CARDOROPOLLI et al., 2003; CHEN et al., 2004).

Concomitante a esses eventos, a espessura óssea é reduzida de 5 a 7 mm, representando metade da espessura inicial do alvéolo e ocorre de 6 a 12 meses após a exodontia, sendo que a maior parte dessa mudança ocorre no 4º mês, com remodelação óssea mais pronunciada na porção vestibular do que palatina/lingual (TROMBELLI et al., 2008). A formação de novo osso dentro do alvéolo ocorre em conjunto à perda da crista óssea alveolar, que sofre redução em altura de 2 a 4,5 mm, entretanto, essa perda maior ocorre com mais frequência em regiões submetidas a múltiplas exodontias (CHEN et al., 2004).

Na tentativa de conter essa perda de volume, estudos demonstram a possibilidade de tratar defeitos ósseos através de técnicas de regeneração tecidual com ou sem substitutos ósseos (NEVINS et al., 1992; LEKOVIC et al., 1997; SCHROPP et al., 2003; DE ALMEIDA et al., 2014; CUNHA et al., 2014; DE OLIVEIRA et al., 2018). O alvéolo tratado com algum tipo de enxerto ósseo e associado a membrana reabsorvível tem redução na reabsorção de 2,19 mm em espessura e 1,72 mm em altura (TROIANO et al., 2017).

2.3 Osso autógeno e seus substitutos

Existem muitas condições nas quais o tecido ósseo não é capaz de se regenerar espontaneamente, como fissura labiopalatina, infecções crônicas e retirada de grandes tumores, nas quais grande quantidade de tecido é removido ou ausente, promovendo um defeito cirúrgico crítico, que não se regenera sem ajuda de materiais para preencher o espaço criado (LITCHE et al., 2011; GONÇALVES et al., 2016).

Por não apresentar antigenicidade (FRETWURST et al., 2015) e proporcionar propriedades de osteogênese, osteoindução e osteocondução, importantíssimas para a regeneração óssea, o osso autógeno ainda é considerado o padrão ouro para enxertia em cirurgias ósseas (LITCHE et al., 2011; SAKKAS et al., 2017).

O enxerto ósseo autógeno é o único que contém potencial de osteogênese, pois mantém as células vitais da área doadora, que se diferenciam em osteoblastos para participar do processo de neoformação óssea. É excelente osteocondutor, pois atua como arcabouço, conduzindo células e vasos sanguíneos para o defeito permitindo a formação de novo osso em sua superfície. Além do potencial osteoindutor, que garante a ele habilidade de estimular células mesenquimais do hospedeiro a se diferenciarem em osteoblastos (LITCHE et al., 2011; ALMEIDA et al., 2016; ZIZZARI et al., 2016), através de fatores do crescimento secretados pelo osso autógeno (JANICKI; SCHMIDMAIER, 2011), como proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de crescimento fibroblástico, fator de crescimento ligado à insulina (I e II), fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento transformador (TGF- β 1 e 2) e ácido retinóico (CYPHER, GROSSMAN, 1996).

Entretanto, sua obtenção ainda é um ponto desfavorável, pois a necessidade de um segundo sítio operatório além de gerar maior morbidade ao paciente, pode estar relacionada com hemorragias, hematomas, infecções e danos a tecidos adjacentes (LITCHE et al., 2011).

Dependendo do tamanho de defeito que se pretende tratar, o osso autógeno pode ser removido de área intra ou extra-oral. Para pequenos defeitos, as

regiões doadoras podem ser a sínfise mandibular, tuberosidade maxilar e área de ramo mandibular. Já para defeitos maiores, que necessitam de maior quantidade de enxerto ósseo, as regiões doadoras mais comuns são a crista ilíaca, calvária e fíbula, embora a tíbia e costelas também possam servir como áreas doadoras (FRETWURST et al., 2015).

Outra desvantagem do osso autógeno é taxa de reabsorção imprevisível (MERTENS et al., 2012), contudo, estudos prévios apresentam resultados satisfatórios que demonstram altas taxas de sobrevivência de implantes instalados em locais enxertados previamente por osso autógeno (AGHALOO; MOY, 2007; SANTIS et al., 2016; SAKKAS et al., 2017).

Diante estes inconvenientes apresentados pelo enxerto ósseo autógeno, a busca por materiais alternativos vem crescendo com o passar dos anos. Segundo Williams (2008), biomaterial é qualquer substância contruída de tal forma que, isoladamente ou como parte de um sistema complexo, é usada para dirigir, por controle de interações com componentes de sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento diagnóstico ou terapêutico, em humanos ou animais.

Para haver a regeneração óssea é fundamental que se tenham três elementos importantes: o primeiro deles, é uma fonte de células que seja capaz de se diferenciar e secretar matriz óssea; bem como fatores de crescimento ou estímulos biofísicos para guiar a regeneração e um arcabouço capaz de suportar a invasão de células da periferia além de ser um substrato para o crescimento e proliferação destas (ZIZZARI et al., 2016).

Assim, o material de enxertia ideal deveria apresentar as três propriedades do osso autógeno: osteoindução, osteocondução e osteogênese, bem como ser biocompatível, passível de esterilização, ser absorvido em tempo hábil para não interferir negativamente na neoformação óssea, ser biomecanicamente estável, além de recriar tridimensionalmente uma estrutura (arcabouço) que seja capaz de suportar células, vasos e tecidos que o colonizem durante a fase de reparo (JANICKI; SCHMIDMAIER 2011; ZIZZARI et al., 2016) e apresentar propriedades químicas e físicas incluindo porosidade, hidrofiliabilidade e topografia superficial adequada (ZIZZARI et al., 2016). Contudo, não há um material de enxertia ideal, que atenda a

todos esses requisitos, assim, é de suma importância avaliar as características do defeito a ser tratado para indicar o biomaterial mais propício para o caso, pois algumas vezes necessitam ser combinados para que um bom resultado seja obtido (JANICKI; SCHMIDMAIER, 2011).

Os biomateriais podem ser classificados de acordo com sua origem biológica em: autógenos, quando o indivíduo doador é da mesma espécie do indivíduo receptor; aloplásticos, substitutos sintéticos e xenógenos, enxertos derivados de outras espécies (HOEXTER et al., 2002), como bovino, ou equinos (ZIZZARI et al., 2016).

O material xenógeno mais estudado na literatura é o enxerto ósseo de origem bovina, com altas taxas de sucesso em levantamento de seio maxilar, aumento ósseo vertical e horizontal, tratamento de alvéolos pós-exodontias e cirurgias periodontais regenerativas (ALMEIDA et al., 2016; SAKKAS et al., 2017).

O Bio-Oss® é atualmente um dos biomateriais mais estudados e com maior evidência científica. Obtido de osso bovino cortical e esponjoso, com 75 a 80% (PIATTELLI et al., 1999) de porosidade, pode ser encontrado em forma de bloco ou particulado com diferentes tamanhos de partículas: pequenas 0,25 mm – 1 mm e grandes de 1 mm a 2 mm (ALMEIDA et al., 2016).

A porção orgânica do material é eliminada para que sejam suprimidas quaisquer reações imunológicas, a fim de evitar a rejeição após sua implantação no leito receptor. Com este processo químico, o material perde sua capacidade osteoindutora, e passa a deter apenas a característica osteocondutora (HALLMAN; THOR, 2008), proporcionando uma matriz natural bem arquitetada e excelente fonte de cálcio (HOEXTER, 2002), contudo mantém a estrutura original do osso (BALDINI; DE SANCTIS; FERRARI, 2011), com macro e microporos similares aos do osso esponjoso humano, proporcionando um excelente arcabouço para a neoformação óssea (HALLMAN; THOR, 2008). A presença de poros é fundamental para que haja a formação óssea, pois eles permitem a migração e proliferação de osteoblastos, células mesenquimais, bem como a vascularização do local, garantindo ao material a característica de osteocondução. Oferece suporte biomecânico na estabilização do coágulo sanguíneo nos estágios iniciais da reparação óssea, além de atuar como

arcabouço nas etapas subsequentes (ALMEIDA et al., 2016). Ademais, a presença destes, acelera a degradação do material, pois propicia melhor contato com os fluidos corpóreos (ZIZZARI et al., 2016).

Outra característica do material é a hidrofília, o que propicia excelente aglutinação das partículas favorecendo a angiogênese na região (ALMEIDA et al., 2016).

Apresenta reabsorção mais lenta sendo considerado como uma vantagem por alguns autores (PIATELLI, 1999; XU et al., 2004; SANTIS et al., 2016), o que ocorre devido a desproteinização, que impede a ação osteoclástica (HALLMAN; THOR, 2008) e também altera a estrutura mineral da hidroxiapatita causando redução da reabsorção do material (ZIZZARI et al., 2016). Embora as partículas de Bio-Oss® sejam reabsorvidas lentamente (com relatos de partículas residuais após 4 anos de estudo), o material proporciona excelentes condições para manter a dimensão do seio maxilar e subsequente instalação de implantes osseointegráveis, com contato direto do material enxertado com o osso novo (PIATELLI et al., 1999). Além disso, permite cirurgias com menor morbidade quando comparado osso autógeno, pois não necessita de um segundo sítio operatório.

2.4 Regeneração óssea guiada

A regeneração tecidual guiada (RTG) é uma técnica utilizada para o tratamento de defeitos periodontais, nos quais uma membrana é posicionada entre a superfície radicular e o periósteo, para impedir a migração de células do epitélio e tecido conjuntivo para o interior do defeito, criando-se um espaço para que células do ligamento periodontal possam produzir nova inserção conjuntiva bem como as células ósseas regenerem o osso perdido (GOTTLOW, 1993).

Obedecendo aos mesmos princípios da RTG, surge a regeneração óssea guiada (ROG) (RETZEPI; DONOS, 2010; ELGALI et al., 2016), na qual uma barreira é interposta entre o osso e o periósteo com a sutura do retalho mucoperiosteal sobre este conjunto isolando o sítio ósseo (DAHLIN, 1991). Tal técnica é utilizada para o tratamento dos defeitos ósseos a fim de propiciar espaço para que apenas células

osteogênicas do osso hospedeiro repovoem a região, evitando que as células do tecido conjuntivo colonizem as dependências do defeito e permitam a regeneração óssea (BUSER et al., 1990; DAHLIN, 1991; DONOS, 2010; KITAYAMA et al., 2016).

Para que haja a neoformação óssea, três fatores são de extrema importância: presença de coágulo sanguíneo, preservação de osteoblastos e contato com tecidos vivos (SOUZA et al., 2001).

Os primeiros estudos a respeito, atribuíam à membrana a função de proteção e preservação do coágulo, e pouco se falava sobre a colonização de células osteoprogenitoras nos espaços que ela proporcionava (DONOS, 2010).

As membranas podem ser utilizadas no tratamento de defeitos críticos de maxila e mandíbula, preservação de alvéolo pós-extração, aumento de largura e altura de rebordo previamente à instalação de implantes e tratamento de defeitos ósseos peri-implantares (DAHLIN; ANDERSSON; LINDE, 1991; RETZEPI; DONO, 2010).

As membranas utilizadas em ROG são produzidas a partir de materiais biocompatíveis e podem ser classificadas em não-absorvíveis ou absorvíveis. As não-absorvíveis mais utilizadas para regeneração periodontal e óssea são as compostas por politetrafluoretileno expandido (PTFE-e), cujos resultados obtidos as consagraram como padrão-ouro em regeneração óssea. Têm como características resistência à degradação enzimática e microbiológica, ausência de reações inflamatórias e de corpo estranho e apresenta módulo de elasticidade semelhante ao tecido ósseo (SOUZA et al., 2001). Outra barreira disponível é a malha de titânio, utilizada para regeneração óssea de grandes defeitos ósseos em altura e espessura. Apresenta rigidez suficiente para impossibilitar o colapso da mesma e manter o arcabouço para o repovoamento de células osteogênicas na região do defeito, favorecendo a regeneração óssea. Além disso, apresenta plasticidade para adequá-la ao defeito, possibilitando imitar ou se aproximar do contorno do rebordo alveolar previamente existente (HER et al., 2012).

Entretanto, as membranas não-absorvíveis apresentam desvantagens inerentes à sua utilização como a necessidade de um segundo tempo cirúrgico para sua remoção, e as possíveis complicações associadas a sua exposição, que podem resultar na contaminação e necessidade de remoção imediata da mesma (para os

casos de PTFE-e) pois diante de uma infecção, o reparo é inviabilizado (ROCCUZZO et al., 2007; HER et al., 2012; POLO et al., 2014; SOUZA et al., 2016). Embora alguns autores relatem que o controle da infecção com antibióticos e agentes químicos locais sejam eficazes (SOUZA et al., 2016).

As membranas absorvíveis foram desenvolvidas a fim de suprir as desvantagens inerentes às não-absorvíveis sendo constituídas de colágeno ou ácido poliático e/ou poliglicólico.

Membranas colágenas podem ser derivadas de origem bovina, suína e ratos, provenientes de vários sítios anatômicos, derme, tendão, pericárdio, fáscia do temporal, entre outros (SOUZA et al., 2016). Apresentam baixa antigenicidade com biocompatibilidade superior aos outros polímeros (LEE et al., 2001), são bioabsorvíveis por ação enzimática, apresentam fácil manipulação e promovem hemostasia. Possuem micro e macroporosidades que permitem a difusão de nutrientes e fluidos, proporciona crescimento celular em sua superfície, e atua efetivamente para que células epiteliais e conjuntivas não migrem para o interior do defeito (SOUZA et al., 2016). Devem ser biocompatíveis, capazes de manter espaço, possuir propriedades oclusivas e prevenir a migração celular, obter integração tecidual, devem ser rígidas o suficiente para que não haja o colapso da mesma e ao mesmo tempo possuir maleabilidade para que se adapte aos defeitos, bem como manter função de barreira por tempo suficiente para que haja formação óssea (HARDWICK; HAYES; FLYNN, 1995; SOUZA et al., 2016).

Membranas de colágeno não apresentam rigidez suficiente para que o arcabouço necessário para a regeneração óssea seja obtido, necessitando associá-las a um material de enxertia óssea que proporcione tal característica, para promover suporte ao tecido e células osteogênicas durante a regeneração óssea (ELGALI et al., 2016; SOUZA et al., 2016).

É bem elucidado na literatura que seu uso traz benefícios à regeneração óssea. Os estudos que comparam grupos com e sem utilização de membranas obtêm resultados positivos quando esta é associada ou não a algum tipo de enxerto ósseo (NEVINS et al., 1992; LEKOVIC et al., 1997; SCHROPP et al., 2003; ZHANG et al., 2008; DIMITRIOU et al., 2012; RAMALINGAM et al., 2016; FREITAS et al., 2018).

Estudo recente de Elgali et al. (2016), avaliou os eventos iniciais do reparo ósseo e as respostas celulares de materiais à base de cálcio fosfato associados à membrana colágena de origem porcina, em defeitos cirúrgicos criados em fêmur de ratos. O grupo tratado com enxerto ósseo bovino ou hidroxiapatita (HA), mostrou que esses substitutos não apresentaram benefícios para a regeneração óssea quando comparados aos grupos tratados somente com a membrana. Além disso, foi observado que a membrana colágena acumulou diferentes fenótipos celulares (monócitos/macrófagos e células osteoprogenitoras) em diferentes períodos do estudo, indicando que a membrana por si só contribui para a ROG.

Além de proporcionar o arcabouço necessário para a regeneração do defeito a utilização da membrana pode evitar a reabsorção do enxerto, além de garantir estabilidade ao material de enxertia (DIMITRIOU et al., 2012), e quando associada ao uso do LBI, pode promover resultados ainda melhores no âmbito da regeneração óssea (FREITAS et al., 2018).

2.5 Laser de baixa intensidade

O tecido ósseo detém grande capacidade regenerativa, porém em condições extremas, nas quais o defeito ou a fratura é muito extensa proporcionando uma deficiência na vascularização ou instabilidade da fratura, o reparo pode se tornar comprometido ou até mesmo não ocorrer (PINHEIRO, GERBI, 2006; LOI et al., 2016). Para estes casos, a bioengenharia tecidual vem estudando técnicas e materiais, como o LBI, para estimular o processo de reparo ósseo (PINHEIRO; GERBI, 2006).

A palavra laser é um acrônimo da palavra em inglês “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation”, que significa Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação. Surgiu em 1917 através de estudos realizados por Albert Einstein, através dos princípios de emissão estimulada de radiação, mas foi em 1960 que Theodore Maiman, construiu o primeiro emissor de laser e como meio ativo utilizou um cristal de rubi (SILVA et al., 2010).

Em odontologia, dois tipos de laser podem ser utilizados: os de alta intensidade (CO₂, Nd:YAG e Er:YAG) com poder de ablação e corte (DE PAULA

EDUARDO et al., 2010), e os de baixa intensidade, que tem função analgésica e reparadora. Nesta última categoria, enquadra-se o laser de hélio-neon (HeNe, λ 632.8 nm), arseneto de gálio (GaAs λ 904 nm) e o laser de arseneto de gálio e alumínio (GaAlAs λ 850 $\pm$ 25 nm), este último, com alto poder de penetração (KHADRA et al., 2004).

A terapia com LBI é utilizada em alvéolos pós-extração, fraturas ósseas, tratamento ortodôntico, em disfunções temporomandibulares, pós-operatório de cirurgias e coadjuvante ao tratamento periodontal e terapias com implantes principalmente em pacientes com problemas sistêmicos (PINHEIRO et al., 2003; KATO et al., 2006; PEREIRA et al., 2009; DE PAULA EDUARDO et al., 2010; MONEA et al., 2015; CAVALCANTI et al., 2016), porém ainda não há um consenso sobre o protocolo ideal para a aplicação do laser na regeneração óssea (PINHEIRO et al., 2003, SILVA et al., 2010; BOSCO et al., 2016; SANTINONI et al., 2017).

É uma terapia acessível, não necessita de drogas coadjuvantes para sua aplicação além de não causar danos térmicos aos tecidos irradiados (OLIVEIRA et al., 2014; SELLA et al., 2015) e não promover impacto na saúde geral do paciente (RENNO, 2010).

Apesar de ainda ser um assunto controverso, é bem elucidado na literatura que o efeito do LBI não depende apenas da dosimetria, mas também do tempo e modo de irradiação (DA SILVA, CAMILLI 2006; PINHEIRO; GERBI 2006; BARBOSA et al., 2013, ATEŞ; GÜSLOY, 2017). O efeito positivo do laser na regeneração óssea parece possuir relação com a dose e a potência de saída. Uma dose alta combinada com uma baixa potência ou uma baixa dose coadjuvante a uma alta potência podem produzir bons resultados (ZEIN et al., 2017).

Além de atuar na analgesia e desconforto pós-operatório (KORNMAN; ROBERTSON, 2000), a terapia com laser de baixa intensidade ativa a microcirculação (IHSAN, 2005; PRETEL et al., 2007), que proporciona elevação do nível de oxigênio e nutrição dos tecidos fazendo com que haja uma aceleração metabólica e consequentemente o reparo tecidual (PRETEL et al., 2007). A partir disso, muitos estudos têm demonstrado resultados positivos da terapia com LBI no reparo ósseo (PINHEIRO; GERBI, 2006; DA SILVA; CAMILLI, 2006; BATISTA et al., 2015; MONEA

et al., 2015; SCALIZE et al., 2015; TIM et al., 2015; BOSCO 2016; GONÇALVES, 2016; ZEIN et al., 2017; FREITAS et al., 2018; MOREIRA et al., 2018). O LBI promove uma melhora na vascularização e início precoce da resposta inflamatória, que por sua vez é solucionada mais rapidamente e permite que a fase de proliferação do reparo ósseo inicie mais cedo resultando em uma cicatrização mais acelerada (PRETEL et al., 2007; HUSSEIN et al., 2011; MONEA et al., 2015; BOSCO et al., 2016).

Seu mecanismo de ação é dado através da fotobiomodulação, que é descrita como a capacidade que a luz do laser tem de induzir reações fotoquímicas que modulam o metabolismo celular, através da aplicação de laser vermelho ou próximo ao infra-vermelho com baixas densidades de energia (ATTES; CAN; GUSLOY, 2017). Os resultados positivos da terapia com LBI estão relacionadas à modificação no comportamento celular, com alteração da cadeia respiratória mitocondrial e canais de cálcio, o que pode aumentar a produção de ATP (adenosina trifosfato), síntese colágena e angiogênese (PEREIRA et al., 2002; MARQUES et al., 2004), proporcionando rápidas proliferações e divisões celulares (DA SILVA; CAMILLI, 2006), migração de fibroblastos e produção de matriz óssea (DOĞNA, 2014), promovendo o reparo de defeitos ósseos implantados com biomateriais associados ou não a membranas biológicas (OBRADOVIĆ; KESIĆ; PESEVSKA, 2009; DE ALMEIDA et al., 2014; CUNHA et al., 2014; BOSCO et al., 2016; FREITAS et al., 2018).

A resposta pode estar relacionada com a absorção de um determinado comprimento de onda por algum fotorreceptor desconhecido que tem participação nas reações metabólicas celulares, estimulando porfirinas e citocromas que aumentam a atividade celular, aumentando a concentração de ATP e ALP (fosfatase alcalina) bem como cálcio (PINHEIRO; GERBI 2006; WEBER et al., 2006). Essa absorção do comprimento de onda e excitação das moléculas podem liderar a resposta fotobiológica (PINHEIRO; GERBI, 2006).

Entretanto, ainda não se sabe se a biomodulação do laser na formação óssea é resultado da estimulação de células mesenquimais ou se este provoca uma estimulação direta sobre os osteoblastos (BOSCO et al., 2016). Outra possibilidade é que o laser estimula a liberação de fatores de crescimento fibroblásticos, já presentes no tecido ósseo e atua na diferenciação celular, resultando em aumento de secreção

e proliferação de componentes da matriz (OBRADOVIĆ; KESIĆ; PESEVSKA, 2009; BOSCO et al., 2016), todavia, esse aumento pode estar relacionado com outro efeito importante do LBI que é a estimulação da angiogênese, essencial para que haja a formação óssea, haja vista a produção de fatores do crescimento e outros mediadores angiogênicos influenciarem diretamente na diferenciação de osteoblastos (PINHEIRO; GERBI, 2006).

O LBI aumenta a resposta biológica do tecido ósseo por modular o processo de inflamação e a deposição de tecido ósseo no local da injúria (TIM et al., 2016), estimulando genes que proporcionam o recrutamento precoce de células osteoprogenitoras que estão relacionadas com o reparo ósseo (FÁVARO-PIPI et al., 2011; TIM et al., 2016).

Estudos mostram que o osso irradiado com comprimento de onda infravermelho aumenta a proliferação de osteoblastos, deposição de colágeno e neoformação óssea quando comparado a grupos não irradiados (PINHEIRO; GERBI, 2006; SILVA et al., 2010; SELLA et al., 2015; BOSCO et al., 2016). Entretanto, o estágio em que o LBI é utilizado, pode influenciar na quantidade do osso neoformado sugerindo que o mecanismo acelera o processo de reparo ósseo nos estágios iniciais da cicatrização (OZAWA et al., 1998; KHADRA et al., 2004; WEBER et al., 2006; OBRADOVIĆ; KESIĆ; PESEVSKA, 2009; PRETEL et al., 2007; ALMEIDA et al., 2014; CUNHA et al., 2014; FREITAS et al., 2018), nos quais há maior proliferação celular (PINHEIRO; GERBI, 2006), diferenciação de células mesenquimais (SCALIZE, et al., 2015) e maior atividade de fosfatase alcalina (ALP - marcador da diferenciação osteoblástica) (OZAWA et al., 1998). A ALP estimula a diferenciação e proliferação de células nos estágios iniciais do reparo, proporcionando aumento no número de células diferenciadas que expressam marcadores de diferenciação osteoblástica resultando em formação óssea (OZAWA et al., 1998).

A terapia com LBI (GaAlAs λ 830 nm) pode proporcionar maior deposição de cálcio e proteína insolúvel, proporcionando aceleração da maturação óssea (Khadra et al. 2004), e maior angiogênese e crescimento fibroblástico em grupos irradiados, indicando que o laser aumenta o metabolismo e a mineralização nas fases iniciais do reparo (WEBER, 2002; PINHEIRO; GERBI, 2002).

A eficácia na formação óssea mediante terapia com laser de baixa intensidade pode ser o resultado do aumento significativo na expressão de genes relacionados à inflamação e angiogênese, aumentando a imunoexpressão de COX-2 e VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) durante as fases iniciais do reparo (TIM et al., 2015).

Além de todos os efeitos que o LBI proporciona, ele pode aumentar a expressão de proteínas da matriz óssea, acelerando todas as fases da formação óssea, incluindo a fase inflamatória, com redução do infiltrado inflamatório, aumento no desenvolvimento de perióstio e significativo aumento na formação de matriz trabecular, proporcionando um processo de reparo ósseo mais rápido e organizado, quando comparado a grupos que não foram irradiados, além da deposição precoce de osteocalcina e osteopontina nas bordas do defeito em ratos irradiados pelo laser (SELLA et al., 2015).

Ao associar a terapia com LBI ao enxerto ósseo bovino inorgânico em ROG, seus efeitos relacionados com a síntese de colágeno e hidroxiapatita resultaram em uma melhora no reparo ósseo o que ocorre mais lentamente em casos onde somente o enxerto é utilizado, mostrando o efeito positivo do LBI no processo de reparo (GERBI et al., 2005; LOPES et al., 2005; DE ALMEIDA et al., 2014; CUNHA et al., 2014; GHARROUDI et al., 2014).

2.6 Modelo experimental

Modelos animais são essenciais pois assemelham-se ao organismo humano, proporcionando resultados relevantes que podem auxiliar nas intervenções clínicas diárias (GOMES; FERNANDES, 2011).

Com a ampla utilização de ratos em experimentos, muito se sabe sobre o comportamento biológico, medicações e a dieta a ser utilizada. São animais adequados para o estudo de doenças sistêmicas e terapêutica farmacológica, proporcionando facilidade de manuseio, abrigo e similaridade genética entre indivíduos da mesma espécie, favorecendo os experimentos laboratoriais (PELLEGRINI et al., 2009; VAGJEL et al., 2013).

Além disso, devido a expectativa de vida reduzida, é possível estudar alterações metabólicas relacionadas ao envelhecimento do organismo e processos regenerativos sendo um modelo bastante útil em pesquisa relacionada à técnicas e terapias regenerativas do tecido ósseo (GOMES; FERNANDES, 2011), embora seu uso seja limitado a avaliações durante os estágios iniciais do reparo (VAGJEL et al., 2013).

O defeito ósseo de tamanho crítico (DTC) foi criado como modelo de não-união para pesquisas relacionadas aos biomateriais, com a finalidade de standardizar o defeito, uma vez que, antigamente os estudos realizavam comparações entre os materiais em diferentes tamanhos de defeitos, seguindo critérios dos próprios pesquisadores gerando resultados não confiáveis (COOPER et al., 2010).

Inicialmente, Schmitz e Hollinger (1986), definiram DTCs, como aqueles que não se regeneram espontaneamente durante a vida do animal, entretanto, devido ao tempo de avaliação pós-operatória dos estudos ser menor, Gosain et al. (2000) estabeleceram DTC como aquele que não se regenera espontaneamente durante o tempo do experimento.

DTC em calvárias de ratos apresentam como vantagem a reprodução de defeitos uniformes que são facilmente avaliados radiograficamente e histologicamente, bem como a presença da dura-máter, que além de fornecer suporte para a utilização de biomateriais, sem a necessidade de dispositivos para sua fixação e adequado acesso cirúrgico (GOMES; FERNANDES, 2011; VAGJEL et al., 2013), é fonte primária de células osteogênicas e fatores osteoindutivos que atuam na regeneração (COOPER et al., 2010).

Para criação do DTC, alguns fatores como peso, idade, tamanho, gênero e o sítio a ser criado, devem ser levados em consideração. Animais muito jovens têm processo de reparo mais acelerado, fêmeas têm o efeito do hormônio estrogênio que pode alterar os resultados, o sítio anatômico onde o defeito será realizado deve ser avaliado quanto ao seu grau de mobilidade e carga recebida, além outros fatores que determinam a qualidade e quantidade de novo tecido ósseo formado (GOMES; FERNANDES, 2011).

Na literatura existem relatos de defeitos que variam de 5 a 10 mm de diâmetro, sendo os de 5 a 8 mm os mais utilizados. A maioria dos estudos relatam defeitos bilaterais, nos quais um defeito atua como controle do outro, mostrando isso como uma vantagem dos DTC de 5 mm de diâmetro. Entretanto, dependendo dos materiais utilizados, quando há dois defeitos em um mesmo animal, o material que está sendo testado em um dos defeitos pode interferir nos resultados do outro (como por exemplo o LBI), causando interpretações errôneas. Portanto, levando em consideração o fato de que defeitos menores trazem menos riscos e complicações ao procedimento cirúrgico, além de menos estresse aos animais, esse tipo de DTC (5 mm) tem grande valia para estudos relacionados à regeneração óssea (VAJGEL et al., 2013).

Por apresentarem similaridade embriológica com a região maxilofacial do corpo humano (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986), a utilização de defeitos críticos em calvária de ratos para avaliação do processo de reparo ósseo (COOPER et al., 2010; VAGJEL et al., 2014; DE ALMEIDA et al., 2014; CUNHA et al., 2014; BOSCO et al., 2016; FREITAS et al., 2018; MOREIRA et al., 2018), bem como a influência do material a ser estudado ou da técnica de regeneração tecidual empregada (MESSORA, et al., 2008), é amplamente utilizada.

A regeneração de um defeito na calvária é influenciada não somente pelo tamanho do defeito, mas também pela integridade da dura-máter, haja vista esta ser fonte primária de células osteogênicas e fatores osteoindutivos que atuam na regeneração. Quando a meninge em questão é lesionada, a quantidade de reparo torna-se comprometida (COOPER et al., 2010).

A calvária é constituída de osso cortical, o que pode colaborar para uma menor regeneração quando comparado ao osso mandibular que possui osso esponjoso em sua estrutura. Além disso, a relação entre profundidade e largura do defeito afeta o potencial das paredes ósseas adjacentes em preencher o defeito com células osteogênicas, caracterizando-o como complexo do ponto de vista biológico e geométrico (SCHLIPHAKE et al., 2004).

Quando comparado a defeitos alveolares, os defeitos em calvária são considerados de difícil regeneração, pois não apresentam paredes ósseas em toda

sua extensão e as células osteoprogenitoras são provenientes apenas da periferia do defeito (SCHENK, 1994). Ademais, o pobre suprimento sanguíneo e a estrutura membranosa do osso impedem a cura espontânea do defeito (DUPOIRIEUX et al., 2001).

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito do laser de baixa intensidade na regeneração de defeitos ósseos de tamanho críticos preenchidos com osso autógeno ou xenógeno associados ou não à membrana colágena.

Hipótese nula: o laser de baixa intensidade não acelera a regeneração de defeitos ósseos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (CEEPA – 015/2016) (Anexo 1).

4.1 Modelo Experimental

A amostra foi composta por 120 ratos machos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar), pesando entre 250 e 300 g do Biotério Central da Faculdade de Odontologia do Campus de Bauru da Universidade de São Paulo.

Os animais foram mantidos em ambiente com ciclo de 12 horas de luz por dia e temperatura entre 22 e 24°C. Durante todo o experimento, os animais receberam ração sólida selecionada e água *ad libitum*. Eles foram aleatoriamente divididos em 12 grupos experimentais (n=10):

- 1) **Grupo C:** Controle – coágulo sanguíneo;
 - 2) **Grupo M:** Membrana Colágena BioGide® (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suíça);
 - 3) **Grupo L:** Laser de Baixa Intensidade (Thera Lase DMC®, DMC Equipamentos Ltda., São Carlos, São Paulo, Brazil);
 - 4) **Grupo L/M:** Laser de Baixa Intensidade + Membrana Colágena;
 - 5) **Grupo OA:** Osso Autógeno;
 - 6) **Grupo OA/L:** Osso Autógeno + Laser de Baixa Intensidade;
 - 7) **Grupo OA/M:** Osso Autógeno + Membrana Colágena;
 - 8) **Grupo AO/L/M:** Osso Autógeno + Laser de Baixa Intensidade + Membrana Colágena;
 - 9) **Grupo BO:** Bio-Oss® (0,25-1mm) (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suíça);
 - 10) **Grupo BO/M:** Bio-Oss® + Membrana Colágena;
 - 11) **Grupo BO/L:** Bio-Oss® + Laser de Baixa Intensidade;
 - 12) **Grupo BO/L/M:** Bio-Oss® + Laser de Baixa Intensidade + Membrana Colágena.
-

4.2 Procedimento Cirúrgico

O procedimento cirúrgico foi realizado por apenas um operador, previamente calibrado em estudo anterior (DE ALMEIDA et al., 2014), cego ao protocolo de tratamento a ser realizado em cada animal, haja vista, isto ter sido executado por outro operador.

Para a realização dos procedimentos cirúrgicos os animais foram previamente anestesiados por injeção intramuscular de xilazina (Vet Brands International Inc., Paulínia, São Paulo, Brasil), (0,02 ml/kg) e cloridrato de quetamina (Vet Brands International Inc., Paulínia, São Paulo, Brasil), (0,4 ml/kg). Após tricotomia e antissepsia da região dorsal do crânio de cada animal, foi realizada uma incisão semilunar na calvária e um retalho de espessura total foi rebatido em direção posterior. Um defeito de tamanho crítico (DTC) de 5 mm de diâmetro foi criado com uma broca trefina em baixa rotação (JJGC Indústria e Comércio de Materiais Dentários S.A., Curitiba, PR, Brasil), sob irrigação abundante de solução salina estéril (Figura 1). Extremo cuidado foi tomado para que a dura-máter cerebral e o encéfalo, não fossem atingidos durante a craniotomia (DE ALMEIDA et al., 2014).

Figura 1: A) Antissepsia e tricotomia da calvária; B) retalho semilunar de espessura total rebatido para posterior; C) DTC confeccionado.

Uma marcação em “L” 2 mm anterior e outra 2 mm posterior às margens do defeito cirúrgico foi realizada com broca carbide tronco-cônica FG-700 (Microdont Micro Usinagem de Precisão Ltda., São Paulo, São Paulo, Brazil) sob irrigação contínua com solução salina estéril e preenchidas com amálgama (Figura 2), permitindo a identificação do meio do defeito cirúrgico original durante o processamento laboratorial bem como a localização de suas margens ósseas originais durante a análise histométrica (DE ALMEIDA et al., 2014; CUNHA et al., 2014).

Figura 2: Marcações em “L” preenchidas com amálgama.

Os grupos receberam seus devidos tratamentos, sendo que, no grupo C o defeito cirúrgico foi preenchido somente com coágulo sanguíneo. No grupo L, o defeito foi preenchido por coágulo, e em seguida irradiado com laser de baixa intensidade. O grupo OA, foi tratado com osso autógeno removido da calota craniana (DA SILVA; CAMILLI, 2006) e triturado. O grupo BO teve o defeito preenchido com o enxerto ósseo bovino (Bio-Oss®). Os grupos tratados com LBI, tiveram o defeito previamente preenchido pelo enxerto ósseo e posterior a isso forram irradiados. O grupo M, foi preenchido por coágulo sanguíneo seguido pelo posicionamento da membrana colágena. Para os grupos que receberam a associação da membrana com o laser de baixa intensidade, primeiramente o enxerto ósseo foi acomodado no defeito, seguido pela irradiação do LBI para então o posicionamento da membrana colágena (Figura 3).

Figura 3: A) Grupo C; B) Grupo OA; C) Grupo BO; D) Aplicação do LBI (Grupo OA/L); E) Posicionamento da membrana colágena.

O retalho foi reposicionado e suturado com fio de seda 4–0 (Johnson & Johnson do Brasil Indústria e Comércio de Produtos para Saúde LTDA, São José dos Campos, São Paulo, Brasil). Uma injeção intramuscular de 24.000 unidades de penicilina G-benzatina (Fort Dodge® Saúde Animal Ltda., Campinas, São Paulo, Brasil) (DE ALMEIDA et al., 2014), e uma dose intramuscular de 0,3 mg/kg de Cetoprofeno (Laboratório Teuto Brasileiro S.A., Anápolis, Goiás, Brazil) (LIU; RAHAMAN; FU, 2012) foram aplicadas em cada animal.

4.3 Protocolo de Aplicação do Laser de Baixa Intensidade

Foi utilizado o laser Thera Lase DMC® com modo de emissão contínuo, meio ativo GaAlAs, com comprimento de onda de 808nm, potência de 100mW, densidade de energia de 210J/cm², 6J por ponto de aplicação única e tempo de irradiação de 60 segundos, em cinco pontos na superfície do defeito cirúrgico criado, de acordo com as posições “do relógio” (12h, 3h, 6h, 9h), além de um ponto central (Figura 5) (DE ALMEIDA et al., 2014; CUNHA et al., 2014).

O ponto central da aplicação do LBI do grupo C foi realizada no centro do coágulo sanguíneo, para os demais grupos, esta foi determinada após o preenchimento com o enxerto ósseo. Para os grupos nos quais a membrana colágena foi utilizada, os defeitos foram previamente irradiados e em seguida a membrana adaptada.

Figura 4: Esquema de aplicação do LBI, em cinco pontos da calvária.

4.4 Processamento Tecidual

Aos 30 dias pós-operatórios, os animais foram sacrificados com 5 mg/ml da associação de cloridrato de quetamina e xilazina. A área do DTC e os tecidos circunjacentes foram removidos em bloco e as peças 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 Millipore Corporation®, EUA). Após descalcificação, as peças foram longitudinalmente divididas em dois blocos, exatamente ao longo do centro do DTC, utilizando as marcações em “L” preenchidas com amálgama como referência (Figura 5). As peças foram processadas, incluídas em parafina e em seguida foram realizados cortes seriados longitudinais, com 6 µm 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 para análises em microscópio de luz.

Figura 5: Divisão da peça no longo eixo do DTC utilizando a marcação em “L” como referência.

4.5 Análise Histomorfométrica

Foram avaliadas as imagens provenientes de quatro cortes histológicos representando a área central do defeito cirúrgico original.

As imagens foram capturadas por uma câmera SPOT RT3 - 2540 Color Slider 2.0 Mp (SPOT ImagingSolutions, Diagnostic Instruments, Inc., Sterling Heights, EUA) acoplada ao microscópio Olympus BX50 (Olympus Corporation, Tóquio, Japão), com aumento de 4x e salvas no computador. Com o aumento utilizado não foi possível capturar a calvária toda em uma mesma imagem, portanto, uma imagem digital foi

criada com a combinação de três imagens menores, com base em estruturas de referência (vasos sanguíneos, trabéculas ósseas, partículas de material enxertado) em cada corte histológico.

A análise histométrica foi realizada por meio de um sistema de avaliação de imagem por computador, utilizando o “software” ImageLab 2000 (Diracon Bio Informática Ltda., Vargem Grande do Sul, São Paulo, Brasil). Seguindo os critérios adotados pela metodologia proposta por De Almeida et al. (2014) e Cunha et al. (2014).

Cada imagem teve a delimitação da área total (AT), correspondente à região do osso da calvária onde o defeito foi originalmente criado, medida em mm², representando 100% da área analisada. Considerando o comprimento total do espécime de 9 mm, foram medidos 2 mm 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 áreas de partículas remanescentes dos materiais implantados (APR) medidas em mm² e calculadas como porcentagens da AT (Figura 6) (DE ALMEIDA et al., 2014; CUNHA et al., 2014; FREITAS et al., 2018; MOREIRA et al., 2018)

Figura 6: Fotomicrografia de um corte histológico (4x – Hematoxilina e Eosina) para esquematização das medições realizadas. AT delimitada pela linha preta correspondente à área da calvária onde o defeito foi cirurgicamente criado. A altura da AT (X) corresponde à espessura do osso original da calvária (Y). A AON foi delimitada pela linha azul e APR delimitada pela linha verde.

4.6 Análise Estatística

Para cada animal os valores de AON e APR, foram representados pela média aritmética dos quatro cortes mais centrais da calvária. Foi utilizado o teste

ANOVA, seguido pelo teste de Tukey para verificar as diferenças entre os grupos. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Durante o processamento laboratorial foram perdidos um espécime do grupo C, OA, BO/M e BO/M/L, dois espécimes dos grupos M e OA/L, três espécimes do grupo L e L/M.

5.1 Análise histológica

Grupo Controle

Todos os espécimes deste grupo apresentaram o DTC ocupado por tecido conjuntivo frouxo e fibras colágenas dispostas paralelamente. Nenhum espécime do grupo C apresentou quantidade significativa de AON. Não houve fechamento do defeito cirúrgico e a espessura original da calvária não foi restabelecida.

Figura 7: Fotomicrografias do grupo C. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico (4x- H.E); (B) Tecido conjuntivo frouxo com fibras colágenas dispostas paralelamente (seta); ON – osso novo (40x).

Grupo Laser de Baixa Intensidade

Presença de formação óssea se estendendo para o centro do defeito, entretanto, sem manutenção da espessura original da calvária, com fibras colágenas bem organizadas e pouco infiltrado inflamatório.

Figura 8: Fotomicrografias do grupo L. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico (4x – T.M); (B) Formação de osso novo em direção ao centro do defeito, com osteócitos na matriz (seta) (20x); (C) Tecido conjuntivo bem organizado com fibras colágenas paralelas e fibroblastos dispostos paralelamente ao longo dos feixes das fibras (setas) (40x)

Grupo Osso Autógeno

Neste grupo observou-se novo osso em extensões variáveis do defeito, com presença de algumas partículas residuais e novo osso formado ao seu redor. O tecido conjuntivo apresentou-se bem organizado, com presença de matriz osteóide e fibroblastos nas dependências do defeito.

Figura 9: Fotomicrografias do grupo OA. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico (4x-H.E.); (B) Partícula de osso autógeno (asterisco) com tecido ósseo neoformado em sua periferia (ON) e osteoblastos (seta) em íntimo contato.

Grupo Membrana Colágena

Presença de tecido conjuntivo bem organizado com fibras colágenas paralelas entre si, formação óssea em direção ao centro do defeito e ossificação em extensões variáveis da membrana com formação óssea acima da mesma e além dos limites do defeito original, contudo não houve manutenção da espessura da calvária.

Figura 10: Fotomicrografias do grupo M. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico (4x – H.E); (B) Membrana ossificada em direção ao defeito cirúrgico (asterisco) e em íntimo contato com a extremidade da calvária original (CO), presença de espaços medulares na região da membrana ossificada (seta) (20x).

Grupo Laser de Baixa intensidade + Membrana Colágena

Presença de extensão variável de tecido ósseo neoformado nas dependências do defeito sem seu total fechamento com ossificação da membrana e formação de tecido ósseo acima desta, frequentemente ultrapassando os limites da calvária original.

Figura 11: Fotomicrografias do grupo M/L. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico (4x – H.E.); (B) Membrana ossificada (asterisco), calvária original (CO) com formação de osso novo em sua periferia (seta) (10x); (C) Espaços medulares (asterisco) e muitos osteócitos (setas) (20X).

Grupo Bio-Oss®

Presença de pequena formação óssea na extremidade do defeito, entretanto com manutenção da espessura da calvária original. Presença de partículas residuais e osteoclastos em íntimo contato com as mesmas.

Figura 12: Fotomicrografias do grupo BO. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico (4x – H.E); (B) Osteoclasto na periferia de partícula de osso bovino (seta) (40x).

Grupo Osso Autógeno + Laser de Baixa Intensidade

Houve formação de tecido ósseo em extensões variáveis, porém sem manutenção da espessura original da calvária e presença de poucas partículas residuais, entretanto, em alguns espécimes, com formação de osso novo ao redor das mesmas.

Figura 13: Fotomicrografias do grupo OA/L. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico (4x – H.E); (B) Formação óssea na ao redor da partícula (asterisco) (20x); (C) Osteoclasto na periferia de partícula de osso autógeno (seta) (40x).

Grupo Osso Autógeno + Membrana Colágena

Neste grupo, como nos demais tratados com a membrana, foi possível observar ossificação bem como formação óssea acima da mesma (Figura 14 A). Partículas residuais de osso autógeno foram encontradas no centro do defeito, porém com matriz osteóide ao seu redor.

Figura 14: Fotomicrografias do grupo OA/M. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico (4x- H.E.). (B) Membrana ossificada, presença de osteócitos (setas) e espaços medulares (asterisco)(40x); (C) Partícula residual de osso autógeno (asterisco) com formação de osso novo ao seu redor (seta) (20x).

Grupo Osso Autógeno + Laser de Baixa Intensidade + Membrana Colágena

Neste grupo apesar de ser observado presença de partículas residuais com matriz osteóide ao seu redor, a quantidade de AON encontrada foi limitada. A membrana apresentou-se ossificada em vários espécimes com formação de osso novo além dos limites da calvária original, embora não tenha proporcionado manutenção de espessura da mesma.

Figura 15: Fotomicrografias do grupo OA/L/M. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico (4x- H.E). (B) Membrana colágena ossificada (asterisco), calvária original (CO) com osso novo ao redor (seta) (20x); (C) Partícula de osso autógeno (asterisco) com formação de osso novo ao seu redor (seta) (40x).

Grupo Bio-Oss® + Laser de Baixa Intensidade

Formação de novo osso nas extremidades do defeito, presença de osteoclastos ao redor das partículas, tecido conjuntivo organizado bem como manutenção da espessura da calvária original.

Figura 16: Fotomicrografias do grupo BO/L. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico (4x – H.E.); (B) Formação de osso novo no interior da partícula de osso bovino (seta) (20x), presença de tecido conjuntivo bem organizado; (C) Formação de osso novo em direção ao centro de defeito (asterisco), presença de matriz osteóide (seta); CO- calvária original (10x).

Grupo Bio-Oss® + Membrana Colágena

Manutenção da espessura original da calvária com ossificação da membrana em direção ao centro do defeito, presença de partículas residuais e tecido conjuntivo bem organizado.

Figura 17: Fotomicrografias do grupo BO/M. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico (4x- H.E); (B) Osteoclasto na periferia da partícula de osso bovino (seta) (40x); (C) Ossificação da membrana colágena em direção ao defeito (asterisco); CO- calvária original (10x).

Grupo Bio-Oss® + Laser de Baixa Intensidade + Membrana Colágena

Manutenção da espessura da calvária com ossificação da membrana acima dos limites da mesma, presença de formação de osso novo ao redor de partículas em alguns espécimes, tecido conjuntivo bem organizado, com fibras colágenas paralelas entre si.

Figura 18: Fotomicrografias do grupo BO/L/M. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico (4x-H.E); (B) Formação de osso novo ao redor de partícula de osso bovino (seta), área de novo osso (ON) (40x); (C) Membrana colágena ossificada (asterisco) (20x).

5.2 Análise estatística

Inicialmente foi proposto que cada grupo incluísse 10 animais. Após algumas perdas e aplicação do teste estatístico verificou-se força do teste de 99,8% mesmo com o número mínimo de 7 animais.

A Tabela 1 mostra análise descritiva de AON de todos os grupos. Os grupos irradiados por LBI, apresentaram as maiores médias de AON quando comparados com aqueles cujo laser não foi utilizado. O grupo L/M, foi o que obteve melhor resultado de AON ($65,76\% \pm 7,62\%$), ao passo que, a menor quantidade foi obtida no grupo controle ($9,96\% \pm 4,49\%$).

Tabela 1- Médias, desvios-padrão, Q25, medianas e Q75 dos valores de AON em porcentagem.

Grupos	N	Médias	Desvio-Padrão	Q25	Medianas	Q75
C	9	9,96	4,49	6,64	9,52	1,43
L	7	47,67	8,66	43,96	44,58	55,41
OA	9	30,98	16,59	19,36	25,1	36,83
OA/L	8	39,15	16,72	25,96	40,41	53,36
OA/M	9	27,3	13,83	19,24	22,72	37,73
OA/L/M	10	34,1	7,68	26	35,82	41,84
M	8	47,43	15,73	35,32	39,26	66
L/M	7	65,76	7,62	60,61	64,09	74,53
BO	10	11,36	7,88	6,26	6,26	14,11
BO/M	9	21,98	10,7	15,78	19,93	25,97
BO/L	10	48,57	28,22	29,08	42,22	76,31
BO/L/M	9	20,46	13,69	9,96	15,5	30,64

A Tabela 2 mostra a comparação múltipla dos valores de AON em porcentagem do grupo L em comparação com os demais grupos.

Tabela 2: Comparação múltipla dos valores de AON em porcentagem entre o grupo L e os demais.

Grupos	Diferenças entre as médias	Intervalos de confiança
L x C	-37,71*	-61,9 a -13,52
L x OA	16,69	-7,497 a 40,88
L x M	0,23	-24,6 a 25,08
L x BO	36,31*	12,66 a 59,96
L x L/M	-18,08	- 43,74 a 07,57
L x OA/M	20,37	-38,2 a 44,55
L x BO/M	25,69*	1,49 a 49,88

* Estatisticamente significativo para $p < 0,05$ (Teste de Tukey).

Ao comprar o grupo L com os demais, a AON apresentou diferenças estatísticas significantes com os grupos C ($9,96\% \pm 4,49\%$), BO ($11,36\% \pm 7,88\%$), BO/M ($21,98\% \pm 10,7\%$) e BO/L/M ($20,46\% \pm 13,69\%$) (Tabela 2).

Quando os grupos OA, BO e M foram comparados com seus respectivos grupos associados à aplicação do LBI, apenas BO x BO/L apresentaram diferença estatística significativa ($11,36\% \pm 7,88\%$ e $48,54\% \pm 28,22\%$ respectivamente) (Tabela 3).

Tabela 3: Comparação múltipla dos valores de AON em porcentagem entre os grupos sem aplicação do LBI e seus respectivos grupos com a aplicação da modalidade terapêutica.

Grupos	Diferença entre as médias	Intervalos de confiança
OA x OA/L	-8,17	-31,49 a 15,15
BO x BO/L	-37,2*	-58,67 a -15,74
M x L/M	-18,32	-43,16 a 6,51
BO/M x BO/M/L	1,52	-21,1 a 24,15
OA/M x OA/M/L	-6,79	-28,85 a 15,26

* Estatisticamente significativo para $p < 0,05$ (Teste de Tukey).

A Tabela 4 mostra análise descritiva de APR dos grupos. Os grupos OA e OA/L, apresentaram partículas remanescentes em apenas 2 espécimes, portanto, não houve possibilidade de realizar o teste estatístico com estes grupos.

Tabela 4- Médias, desvios-padrão, Q25, medianas e Q75 dos valores de APR em porcentagem.

Grupo	N	Média	Desvio-padrão	Q25	Mediana	Q75
BO	10	38,73	6,95	33,52	37,71	43,17
BO/L	10	16,74	15,25	0	22,42	28,52
BO/M	9	32,33	6,25	29,7	29,7	37,74
BO/L/M	10	24,21	6,01	17,28	17,28	28,71
OA/M	9	14,93	8,92	5,21	5,21	23,12
OA/L/M	10	14,76	6,58	9,55	09,55	18,85

Os grupos irradiados com LBI obtiveram melhores resultados com relação à APR, embora com diferença estatística significativa apenas para o grupo BO/L (16,74% $\pm$ 15,25%) quando comparado ao grupo BO (38,73% $\pm$ 6,95%) (Tabela 5).

Tabela 5: Comparação múltipla dos valores de APR em porcentagem entre os grupos sem aplicação do LBI e seus respectivos grupos com a aplicação da modalidade terapêutica.

Grupos	Média das diferenças	Intervalos de confiança
BO x BO/L	21,99*	10,08 a 33,89
OA/M x OA/L/M	0,17	-12,06 a 12,41
BO/M x BO/M/L	8,11	-4,12 a 20,35

* Estatisticamente significativo para $p < 0,05$ (Teste de Tukey).

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou os efeitos do LBI (GaAlAs, λ 808 nm), em defeitos de tamanho crítico (DTC) em calvárias de ratos, associado ao uso de osso autógeno ou Bio-oss® e membrana colágena e obteve resultados satisfatórios com a utilização da terapia.

Atualmente, um dos grandes desafios da odontologia é a manutenção óssea alveolar após a perda dentária visando a reabilitação protética da região com implantes. Entretanto, cirurgias ósseas reconstrutivas demandam tempo para regenerar o que é dependente do material utilizado. Assim, coadjuvante às terapias de enxertia óssea, o LBI vem sendo estudado no intuito de acelerar o reparo ósseo abreviando o tempo do tratamento do paciente.

Muitos estudos têm sido realizados em ratos por proporcionar facilidade de manuseio, abrigo e similaridade genética entre indivíduos da mesma espécie, favorecendo os experimentos laboratoriais (PELLEGRINI et al., 2009; VAGJEL et al., 2013). Há controvérsias na literatura acerca do diâmetro do defeito para que ele possa ser considerado um DTC. Apenas 1,6% dos estudos mostram completa formação óssea para os defeitos de 5 mm de diâmetro o que o classifica como sendo um defeito de tamanho crítico (VAJGEL et al., 2013). Corroborando com nossos resultados, pois nenhum espécime do grupo controle apresentou fechamento completo do defeito cirúrgico no tempo do experimento.

Embora os defeitos de 5 mm de diâmetro apresentem a vantagem de permitir a realização de dois defeitos por calvária, permitindo grupo controle e teste no mesmo animal, a fim de diminuir a quantidade de animais necessários para o estudo, a utilização de biomateriais bem como a terapia com LBI poderia interferir nos resultados pela proximidade dos defeitos utilizados (VAJGEL et al., 2013) e pelo efeito sistêmico do laser (TUNER'R; HODE, 1998; KARU; KOGAWA; SANTOS, 2006). Assim, para diminuir o risco de possíveis vies, optou-se por realizar um único defeito na calvária de cada animal, utilizando diferentes animais como teste e controle.

Estudos anteriores do nosso grupo, obtiveram resultados satisfatórios com o período de avaliação de 30 dias (ALMEIDA et al., 2014; CUNHA et al., 2014; FREITAS et al., 2018; MOREIRA et al., 2018). Partindo do pressuposto de que 30 dias de vida do animal equivalem a 90 dias do humano (QUIN, 2005), que a regeneração óssea em ratos inicia-se aproximadamente aos 6 dias (WEBER et al., 2006) e que o laser atua nas fases iniciais do reparo (OZAWA et al., 1998; KHADRA et al., 2004; WEBER et al., 2006; OBRADOVIĆ; KESIĆ; PESEVSKA, 2009; PRETEL et al., 2007; ALMEIDA et al., 2014; CUNHA et al., 2014, GONÇALVES et al., 2016; FREITAS et al., 2018; DE OLIVEIRA et al., 2018) a eutanásia dos animais posterior a esse período não teria influência nos resultados obtidos, pois aos 30 dias seu efeito já pode ser observado.

Na literatura há diversos trabalhos avaliando a efetividade do laser de baixa intensidade com diferentes tipos de laser incluindo o GaAlAs, com diferentes comprimentos de onda, doses, potência de saída e protocolos de tratamento (GRAVELLO-FREITAS et al., 2003; PINHEIRO; GERBI, 2006; DA SILVA et al., 2010; SCALIZE et al., 2015; BOSCO et al., 2016; JONASSON et al., 2017; ZEIN et al., 2017; DE OLIVEIRA et al., 2018). A utilização desse laser está em crescimento constante devido seu alto poder de penetração em comparação com os demais (KHADRA et al., 2004; DE OLIVEIRA et al., 2018).

A absorção e dissipação da luz são obtidas em níveis entre o vermelho e próximo ao infravermelho, assim, o comprimento de onda de 808 nm, utilizado no presente estudo, tem maior poder de penetração para o interior dos tecidos, e está dentro da faixa do infravermelho (SELLA et al., 2015; DE OLIVEIRA et al., 2018), proporcionando uma penetração 54% mais profunda que o λ 980 nm (HUDSON et al., 2013).

A dose de $6\text{J}/\text{cm}^2$ utilizada no presente estudo em uma única sessão obteve bons resultados em estudos anteriores (ALMEIDA et al., 2014; CUNHA et al., 2014; SBRANA et al., 2015; FREITAS et al., 2018; MOREIRA et al., 2018).

Partindo disso, nosso grupo defende que uma aplicação no transopertório, com quantidade de energia ideal, aplicada nas bordas do defeito cirúrgico e sobre o enxerto ósseo é suficiente para observar os reais efeitos do laser, e embora a literatura

traga diversos estudos cujas aplicações foram realizadas repetidamente (WEBER et al., 2006; PINHEIRO et al., 2009; GONÇALVES et al., 2016; JONASSON et al., 2017; MONEA et al., 2017; DE OLIVEIRA et al., 2018), já existem relatos de resultados positivos da terapia com uma única aplicação transopertória (ALMEIDA et al., 2014; CUNHA et al., 2014; BOSCO et al., 2016; FREITAS et al., 2018; MOREIRA et al., 2018). A fim de transpor nossos experimentos para a prática clínica, uma única aplicação durante o procedimento cirúrgico facilitaria a utilização dessa terapia uma vez que, repetidas sessões de laser poderiam inviabilizar o tratamento para o paciente levando em consideração a necessidade várias visitas ao consultório odontológico.

Os grupos que receberam a aplicação do LBI apresentaram melhores resultados de (AON) quando comparados aos grupos nos quais a terapia não foi realizada, corroborando com outros estudos (KHADRA et al., 2004; WEBER et al., 2006; PINHEIRO et al., 2008; ALMEIDA et al., 2014; CUNHA et al., 2014; FREITAS et al., 2018; DE OLIVEIRA et al., 2018). Esse resultado pode ser explicado pelo fato do laser atuar a nível celular, promovendo melhor angiogênese, proliferação e diferenciação de células osteogênicas, além de aumentar o fluxo sanguíneo, proporcionando melhor oxigenação e nutrição para o defeito ósseo acarretando em melhores resultados durante a fase inicial do reparo (KHADRA et al., 2004; TORRES et al., 2005; PINHEIRO, GERBI 2006), muito provavelmente pelo fato do LBI modular genes angiogênicos e inflamatórios durante essa fase inicial (TIM et al., 2015).

Quando o LBI foi comparado aos demais grupos, foi possível observar diferença estatística significativa quando comparado ao grupo C, BO e BO/M. O grupo C foi o que apresentou os piores resultados de AON corroborando com estudos anteriores (ALMEIDA et al., 2014; CUNHA et al., 2014, FREITAS et al., 2018; MOREIRA et al., 2018; DE OLIVEIRA et al., 2018), seguido pelo grupo BO e BO/M, o que sugere que o uso de biomaterial é mais importante para manter a morfologia local do que para formar osso (DE OLIVEIRA et al., 2018).

Nos grupos irradiados com LBI, foi possível observar melhor organização e maior quantidade de fibras colágenas com presença de fibroblastos paralelas a estas sugerindo o efeito bioestimulatório do laser (BOSCO et al. 2016). As fibras colágenas são precursoras da matriz extracelular e servem de arcabouço para a deposição de íons no processo de mineralização óssea (TORRES et al., 2005; BOSCO et al., 2016).

A manutenção da arquitetura óssea em espessura e altura é essencial para a reabilitação com implantes dentários. É de suma importância que estes sejam instalados em tecido ósseo com espessura suficiente para seu correto posicionamento, bem como para suportar o tecido mole periimplantar (CHAPPUIS; ARAÚJO; BUSER, 2017) permitindo a confecção de próteses sobre implante que devolvam função e estética ao paciente. Após a exodontia pode haver redução em torno de 50% do rebordo residual nos primeiros 12 meses (SCHROPP et al., 2003), o que sugere o preenchimento do alvéolo com algum biomaterial para minimizar essa perda.

Ao comparar o grupo OA com o grupo OA/L, não houve diferença estatística entre eles. O osso autógeno até os dias atuais é considerado padrão ouro em cirurgias ósseas reconstrutivas (SAKKAS et al., 2017) devido suas características ideais de osteogênese, osteoindução e osteocondução (BUSSE et al., 1990; BRUNSVOLD; MELLONIG 1993; HOEXTER, 2002; LITCHE et al., 2011; SAKKAS et al., 2017). Contudo, devido à taxa de reabsorção descontrolada, o intuito de associar o LBI a ele foi acelerar a neoformação óssea para que esta ocorresse antes da reabsorção das partículas do enxerto. Entretanto, sobre este material o LBI não foi efetivo, apesar de na análise histológica ser possível observar formação de novo osso em direção ao centro do defeito, bem como presença de matriz osteóide ao redor das partículas remanescentes em alguns espécimes, mostrando que o LBI pode induzir a osteogênese, melhorar a vascularização e auxiliar na integração do material enxertado com o leito receptor (DA SILVA; CAMILLI, 2006; WEBER, 2006; GONÇALVES et al., 2017). O tamanho das partículas, o método de coleta e o manuseio do enxerto podem ter afetado a capacidade osteocondutora (HALLMAN; THOR, 2008) do material. Uma das dificuldades intrínsecas à utilização de enxerto autógeno é a obtenção de partículas com tamanhos padronizados e a distância necessária entre a partícula e o suprimento sanguíneo de 0,1 mm para a sobrevivência de osteócitos (DAVIES; HOSSEINI, 2000; HALLMAN; THOR, 2008), pode ter sido comprometida e ao associar com o LBI, este não proporcionou diferenças estatísticas significativas.

Somente nos grupos tratados com Bio-Oss® houve a manutenção da espessura original da calvária. A literatura mostra que técnicas de preservação de rebordo alveolar têm sido bem-sucedidas para manter altura e espessura quando

comparado à extração isolada (BARONE et al., 2012). Os grânulos do enxerto ósseo bovino sofrem reabsorção lenta, e ao invés de serem reabsorvidos e entrar no processo fisiológico de reabsorção óssea, estes permanecem rodeados por osso recém-formado (PIATELLI et al., 1999; TETÈ et al., 2007; ZIZZARI et al., 2016), oferecendo arcabouço para a formação óssea, mantendo os tecidos em posição e impedindo a reabsorção óssea do defeito, validando os achados deste estudo que mostra a presença de partículas de Bio-Oss® em todos os espécimes, algumas vezes rodeadas por matriz osteóide, outras por osteoclastos. Essa reabsorção mais lenta ocorre devido ao tratamento químico realizado para desproteínizar o osso, o que modifica a estrutura mineral da hidroxiapatita óssea (ZIZZARI et al., 2016).

Ao associar BO com LBI, a terapia proporcionou melhor reparo com diferenças estatísticas significativas ao comparar os grupos BO x BO/L. Isso se dá pelos efeitos relacionados com a síntese de colágeno e hidroxiapatita, o que ocorre mais lentamente quando o enxerto bovino é utilizado isoladamente, o que corrobora com os resultados de Torres et al. (2005), Cunha et al., (2014) e Bosco et al. (2016), evidenciando uma otimização dos resultados obtidos com este substituto ósseo quando o LBI é utilizado concomitantemente a ele, pois o LBI aumenta o potencial osteocondutor do biomaterial e mantém o volume ósseo até o fim da análise (DE OLIVEIRA et al., 2018).

A membrana colágena é utilizada em ROG, com a finalidade proporcionar espaço para que as células osteogênicas do osso hospedeiro repovoem a região, evitando que as células do tecido conjuntivo migrem para as dependências do defeito e comprometam a regeneração óssea (BUSER et al. 1990; DAHLIN, 1991; DONOS, 2010; KITAYAMA et al., 2016), além de sua utilização proporcionar maior estabilidade do material de enxertia nas dependências do defeito (DIMITRIOU et al., 2012).

Quando os grupos M e M/L foram comparados entre si, não houve diferença estatística significativa, embora na análise descritiva tenham apresentado os melhores resultados com relação a quantidade de novo osso formado corroborando com os resultados de Freitas et al. (2018). Isso pode ser explicado a partir dos achados de Elgali et al. (2016), no qual foi observado a presença de diferentes fenótipos celulares na região da membrana em diferentes períodos do estudo, com grande prevalência de células osteoprogenitoras e macrófagos/monócitos que

migraram para o interior da membrana, indicando que ao invés da membrana atuar como uma barreira, ela possui propriedades que proporcionam migração, adesão e diferenciação celular. Independente da presença ou ausência de substitutos ósseos, essas células osteoprogenitoras são rapidamente recrutadas para a área do defeito, embora a presença e o tipo de material utilizado possam atrasar esse recrutamento. Isso pode explicar o fato de que o grupo tratado somente com a membrana colágena ou associação desta com LBI apresentaram melhores resultados quando comparados àqueles onde ela foi utilizada em conjunto com o osso autógeno ou osso bovino.

Nos grupos tratados com membrana colágena (OA/M; OA/L/M; BO/M; BO/L/M), foi observado área de ossificação nas regiões abaixo, acima e no interior da membrana, corroborando com o estudo de Freitas et al. (2018), entretanto, a AON observada além da delimitação da AT não foi considerada no estudo devido a metodologia empregada, não resultando em diferenças estatísticas significativas quando esses grupos foram comparados entre si (BO/M x BO/L/M e OA/M x OA/L/M). Esses resultados podem ser justificados pelo potencial de ossificação e calcificação das matrizes de colágeno quando colocadas próximo ao tecido ósseo, onde a densidade do osso adjacente pode sugerir um aumento na ossificação da membrana e na formação de osso aos seus arredores (ZUBERY; NIR; GOLDLUST, 2008).

O presente estudo também avaliou a área de partículas remanescentes (APR), a fim de verificar a possibilidade do laser acelerar a reabsorção das mesmas. Os grupos que não foram irradiados pelo LBI, ou seja, BO e BO/M, obtiveram maiores quantidades de partículas ósseas residuais e os grupos BO/L e BO/L/M obtiveram quantidades significativamente menores de APR, entretanto, diferente dos achados de Bosco et al. (2016), os grupos irradiados pelo LBI apresentaram redução na quantidade de partículas residuais encontradas no defeito, o que pode ser explicado pelas ações do laser em estimular a atividade osteoclástica (NICOLA et al., 2003).

O presente estudo mostra os efeitos positivos do LBI sobre o reparo ósseo, entretanto são necessárias técnicas de imunohistoquímica para mostrar os marcadores ósseos que estão presentes em cada fase do reparo nos grupos irradiados ou não.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Diante os resultados expostos e dentro das limitações do estudo, pode-se concluir que o LBI possui efeito positivo na regeneração óssea de DTC, e embora na análise estatística tenha apresentado diferença significativa somente quando aplicado sobre o Bio-Oss®, na análise histomorfométrica foi possível observar formação óssea em extensões variadas nos demais grupos.

A hipótese nula foi rejeitada.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Aghaloo TL, Moy PK. Which hard tissue augmentation techniques are the most successful in furnishing bony support for implant placement? *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2007;22 Suppl:49-70.

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.

De Almeida ALPF, 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.

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.

Artzi Z, Tal H, Dayan D. Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets: 2. Histochemical observations at 9 months. *J Periodontol*. 2001;72(2):152-9.

Ates GB, Can AA, Gülsoy M. Investigation of photobiomodulation potentiality by 635 and 809 nm lasers on human osteoblasts. *Lasers Med Sci*. 2017;32:591-599.

Barbosa D, de Souza RA, Xavier M, da Silva FF, Arisawa EAL, Villaverde AGJB. Effects of low-level laser therapy (LLLT) on bone repair in rats: optical densitometry analysis. *Laser Med Sci*. 2013;28: 651-656.

Baldini N, De Sanctis M, Ferrari M. Deproteinized bovine bone in periodontal and implant surgery. *Dent Mater*. 2011;27(1):61-70.

Barone A, Ricci M, Tonelli P, Santini S, Covani U. Tissue changes of extraction sockets in humans: a comparison of spontaneous healing vs. ridge preservation with secondary soft tissue healing. *Clin Oral Implants Res*. 2013;24(11):1231-7.

Batista JD, Sargentini-Neto S, Dechichi P, Rocha FS, Pagnoncelli RM. Low-level laser therapy repair: is there any effect outside the irradiated field? *Lasers Med Sci*. 2015;30(5):1569-74.

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.

Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res.* 2011;26(2):229-238.

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.

Brito JHM, Pádua MJ. Regeneração e reparação dos tecidos. In: Zanini AS. *Cirurgia e traumatologia bucomaxilofacial.* 1 st ed. Rio de Janeiro: Revinter; 1990. p.1-6.

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

Buser D, Brägger U, Lang NP, Nyman S. Regeneration and enlargement of jaw bone using guided tissue regeneration. *Clin Oral Implants Res.* 1990;1(1):22-32.

Capon A, Souil E, Gauthier B, Sumian C, Bachelet M, Buys B, et al. Laser assisted skin closure (LASC) by using a 815-nm diode-laser system accelerates and improves wound healing. *Lasers Surg Med.* 2001;28(2):168-75.

Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2014;1(561):3-12.

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;32:435-440.

Cavalcanti MF, Silva UH, Leal-Junior EC, Lopes-Martins RA, Marcos RL, Pallotta RC et al. Comparative study of the physiotherapeutic and drug protocol and low-level laser irradiation in the treatment of pain associated with temporomandibular dysfunction. *Photomed Laser Surg.* 2016;34(12):652-656.

Carmagnola D, Adriaens P, Berglundh T. Healing of human extraction sockets filled with Bio-Oss. *Clin Oral Implants Res.* 2003;14(2):137-43.

Chappuis V, Araújo MG, Buser D. Clinical relevance of dimensional bone and soft tissue alterations post-extraction in esthetic sites. *Periodontol* 2000. 2017;73(1):73-83.

Chen ST, Wilson TG Jr, Hämmerle CH. Immediate or early placement of implants following tooth extraction: review of biologic basis, clinical procedures, and outcomes. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004;19 Suppl:12-25.

Cooper GM, Mooney MP, Gosain AK, Campbell PG, Losee JE, Huard J. Testing the critical size in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-size defect. *Plast Reconstr Surg*. 2010;125(6):1685-92.

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; 2014:104230. doi: 10.1155/2014/104230.

Cypher TJ, Grossman JP. Biological Principles of Bone Graft Healing. *J Foot Ankle Surg*. 1996; 35(5):413-417.

Davies JE, Hosseini MM. Histodynamics of endosseous wound healing. In: Davies JE editor. *Bone Engineering*. Toronto, Canada: em squared incorporated. 2000; 1–14.

Delgado V, Ortiz P. Determination of the energy fluence of diagnostic x-ray beams from field measurements of attenuation curves. *Med Phys*. 1997; 24 (7):1089-95.

Dimitriou R, Mataliotakis GI, Calori GM, Giannoudis PV. The role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large bone defects: current experimental and clinical evidence. *BMC Med*. 2012;26;10:81.

Doğna GE, Demir T, Orbak R. Effect of Low-Level Laser on Guided Tissue Regeneration Performed with Equine Bone and Membrane in the Treatment of Intrabony Defects: A Clinical Study. *Photomed. laser surg*. 2014; 32(4):226–231.

Dörtbudak O, Haas R, Mallath-Pokorny G. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. *Clin Oral Implants Res*. 2000;11(6):540-5.

Dupoirieux L, Pourquier D, Picot MC, Neves M. Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2001;30(1):58-62.

Elgali I, Turri A, Xia W, Norlindh B, Johansson A, Dahlin C, et al. Guided bone regeneration using resorbable membrane and different bone substitutes: Early histological and molecular events. *Acta Biomater*. 2016;29:409-423.

Fávaro-Pipi E, Ribeiro DA, Ribeiro JU, Bossini P, Oliveira P, Parizotto NA, et al. Low-level laser therapy induces differential expression of osteogenic genes during bone repair in rats. *Photomed. Laser Surg.* 2011;29(5):311-317.

Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:421746. doi: 10.1155/2015/421746.

Freitas NR, Guerrini LB, Esper LA, Sbrana MC, Dalben GS, Soares S, et al. Evaluation of photobiomodulation therapy associated with guided bone regeneration in critical size defects. In vivo study. *J Appl Oral Sci.* 2018;26:e20170244. doi: 10.1590/1678-7757-2017-0244.

Fretwurst T, Gad LM, Nelson K, Schmelzeisen R. Dentoalveolar reconstruction: modern approaches. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2015 ;23(4):316-22.

Gerbi ME, Pinheiro AL, Marzola C, Limeira Júnior FA, Ramalho LM, Ponzi EA, 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(4):382-8.

Giannoudis PV, Faour O, Goff T, Kanakaris N, Dimitriou R. Masquelet technique for the treatment of bone defects: tips-tricks and future directions. *Injury.* 2011;42(6):591-8.

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

Gosain AK, Song L, Yu P, Mehrara B.J, Maeda CY, Gold LI, et al. Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF-beta isoforms. *Plastic and Reconstructive Surg.* 2000;106:360–371.

Gottlow J. Guided tissue regeneration using bioresorbable and non-resorbable devices: initial healing and long-term results. *J Periodontol.* 1993; 64(11 Suppl):1157-1165.

Garavello-Freitas I, Baranauskas V, Joazeiro PP, Padovani CR, Dal Pai-Silva M, da Cruz-Höfling MA. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. *J Photochem Photobiol B.* 2003;70(2):81-9.

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.

Hardwick R, Hayes BK, Flynn C. Devices for dentoalveolar regeneration: an up-to-date literature review. *J Periodontol*. 1995;66(6):495-505.

Her S, Kang T, Fien MJ. Titanium mesh as an alternative to a membrane for ridge augmentation. *J Oral Maxillofac Surg*. 2012;70(4):803-10.

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

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.

Ihsan, FR. Low-Level laser therapy accelerates collateral circulation and enhances microcirculation. *Photomed Laser Surg*. 2005;23(3):289-94.

Janicki P, Schmidmaier G. What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. *Injury*. 2011;42(Suppl 2):77-81.

Junqueira LCU, Carneiro J. Tecido Ósseo. In: Junqueira LCU, Carneiro J. *Histologia Básica*. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p. 132-148.

Karu TI. A suitable model for wound healing: How many times are we to stumble over the same block? *Lasers Surg Med* 1999;25:283.

Kato MT, Kogawa EM, Santos CN, PCR. Aplicação de TENS e laser de baixa frequência no tratamento das disfunções temporomandibulares. *J. Appl. Oral Sci*. 2006;14(2):130-135.

Khadra M, Kasem N, Haanaes HR, Ellingsen JE, Lyngstadaas SP. Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004;97(6):693-700.

Kitayama S, Wong LO, Ma L, Hao J, Kasugai S, Lang NP, et al. Regeneration of rabbit calvarial defects using biphasic calcium phosphate and a strontium hydroxyapatite-containing collagen membrane. *Clin Oral Implants Res*. 2016; 27(12):206-214.

Kornman KS, Robertson PB. Fundamental principles affecting the outcomes of therapy for osseous lesions. *Periodontol* 2000. 2000;22:22-43.

Lee CH, Singla A, Lee Y. Biomedical applications of collagen. *Int J Pharm.* 200;19;221(1 Suppl 2):1-22.

Lekovic V, Kenney EB, Weinlaender M, Han T, Klokkevold P, Nedic M, et al. A bone regenerative approach to alveolar ridge maintenance following tooth extraction. Report of 10 cases. *J Periodontol.* 1997;68(6):563–570.

Lichte P, Pape HC, Pufe T, Kobbe P, Fischer H. Scaffolds for bone healing: concepts, materials and evidence. *Injury.* 2012;42(2):569-73.

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.

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.

Loi F, Córdova LA, Pajarinen J, Lin TH, Yao Z, Goodman SB. Inflammation, fracture and bone repair. *Bone.* 2016; 86:119-30.

Lopes CB, Pinheiro AL, Sathaiah S, Duarte J, Cristinamartins M. Infrared laser light reduces loading time of dental implants: a Raman spectroscopic study. *Photomed Laser Surg.* 2005;23(1):27-31.

Mackie EJ. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35(9):1301-5.

Maegawa Y, Itoh T, Hosokawa T, Yaegashi K, Nishi M. Effects of near infrared low-level laser irradiation on microcirculation. *Lasers surg. med.* 2000;27(5):427-437.

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

Mertens C, Decker C, Seeberger R, Hoffmann J, Sander A, Freier K. Early bone resorption after vertical bone augmentation - a comparison of calvarial and iliac grafts. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24(7):820-5.

Messora MR, Nagata MJ, Dornelles RC, Bomfim SR, Furlaneto FA, de Melo LG, et al. 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.

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.

Maruotti N, Corrado A, Neve A, Cantatore FP. Bisphosphonates: effects on osteoblast. *Eur J Clin Pharmacol.* 2012; 68(7):1013-8. doi: 10.1007/s00228-012-1216-7.

Murray G, Holden R, Roachlau W. Experimental and clinical study of new growth of bone in a cavity. *American Journal of Surgery.* 1957; 93(3):385-7.

Nevins R, Mellonig JT. Enhancement of the damaged edentulous ridge to receive dental implants: a combination of allograft and the Gore-Tex membrane. *Int J Periodontics Restor Dent.* 1992;12(2):96-111.

Nevins M, Camelo M, De Angelis N, Hanratty JJ, Kwon JJ, Rasperini G, Rocchietta I, Schupbach P, Kim DM. The clinical and histologic efficacy of xenograft granules for maxillary sinus floor augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2011; 31:227-235.

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

Norton MR, Odell EW, Thompson ID, Cook RJ. Efficacy of bovine bone mineral for alveolar augmentation: a human histologic study. *Clin Oral Implants Res.* 2003 Dec;14(6):775-83.

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.

Oliveira AM, Castro-Silva II, Fernandes GVO, Melo BR, Alves ATNN, Silva Júnior A. Effectiveness and acceleration of bone repair in critical-sized rat calvarial defects using low-level laser therapy. *Lasers Surg Med.* 2014; 46(1): 61-67.

de Oliveira Gonçalves JB, Buchaim DV, de Souza Bueno CR, Pomini KT, Barraviera B, Júnior RSF, et al. Effects of low-level laser therapy on autogenous bone graft

stabilized with a new heterologous fibrin sealant. J Photochem Photobiol B. 2016;162:663-668.

Ozawa Y, Shimizu N, Kariya G, Abiko Y. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell cultures in rat calvarial cells. Bone. 1998;22(4):347-354.

de Paula Eduardo C, de Freitas PM, Esteves-Oliveira M, Aranha AC, Ramalho KM, Simões A, et al. Laser phototherapy in the treatment of periodontal disease. A review. Lasers Med Sci. 2010;25(6):781-92.

Pellegrini G, Seol YJ, Gruber R, Giannobile WV. Pre-clinical models for oral and periodontal reconstructive therapies. J Dent Res. 2009 ;88(12):1065-76.

Pereira CL, Sallum EA, Nociti Jr HF, Moreira RWF. The effect of low-intensity laser therapy on bone healing around titanium implants: a histometric study in rabbits Int J Oral Maxillofac Implants. 2009;24(1):47-51.

Pereira NA, Eduardo C de P, Matson E, Marques MM, et al. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. Lasers surg. med. 2002;31(4):263–267.

Piattelli M, Favero GA, Scarano A, Orsini G, Piattelli A. Bone Reactions to Anorganic Bovine Bone (Bio-Oss) Used in Sinus Augmentation Procedures: A Histologic Long-Term Report of 20 Cases in Humans. Int J Oral Maxillofac Implants. 1999;14(6):835-40.

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

Pinheiro AL, Gerbi MME, de Assis Limeira F Jr, Ponzi EAC, Marques AMC, Carvalho CM et al. 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.

Pretel H, Lizarelli RF, Ramalho LT. Effect of low-level laser therapy on bone repair: histological study in rats. Lasers Surg Med. 2007;39(10):788-96.

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

Ramalingam S, Al-Rasheed A, ArRejaie A, Nooh N, Al-Kindi M, Al-Hezaimi K. Guided bone regeneration in standardized calvarial defects using beta-tricalcium phosphate and collagen membrane: a real-time in vivo micro-computed tomographic experiment in rats. *Odontology*. 2016;104(2):199-210.

Rasia-dal Polo M, Poli PP, Rancitelli D, Beretta M, Maiorana C. Alveolar ridge reconstruction with titanium meshes: A systematic review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2014;19(6):639-46.

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 A, McDonnell P, Crovace M, Zannoto ED, Laakso L. Effect of 830 nm laser phototherapy on osteoblasts grown in vitro on Biosilicate scaffolds. *Photomed Laser Surg*. v.28, n. 1, p. 131-3, Feb. 2010.

Retzepi M, Donos N. Guided Bone Regeneration: biological principle and therapeutic applications. *Clin Oral Implants Res*. 2010;21(6):567-76.

Roccuzzo M, Ramieri G, Bunino M, Berrone S. Autogenous bone graft alone or associated with titanium mesh for vertical alveolar ridge augmentation: a controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res*. 2007;18(3):286-94.

Saito S, Shimizu N. Stimulatory effects of AAQ low power irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1997;111(5):525-532.

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.

De Santis E, Lang NP, Ferreira S, Rangel Garcia I Jr, Caneva M, Botticelli D. Healing at implants installed concurrently to maxillary sinus floor elevation with Bio-Oss® or autologous bone grafts. A histo-morphometric study in rabbits. *Clin Oral Implants Res*. 2017;28(5):503-511.

Sakkas A, Wilde F, Heufelder M, Winter K, Schramm A. Autogenous bone grafts in oral implantology-is it still a "gold standard"? A consecutive review of 279 patients with 456 clinical procedures. *Int J Implant Dent*. 2017;3(1):23.

Sbrana MC. Avaliação de diferentes protocolos de aplicação de laser de baixa intensidade associado ou não ao osso bovino inorgânico (Bio-Oss®) na cicatrização de defeitos ósseos criados cirurgicamente em calvárias de ratos. Estudo histológico e histométrico [tese]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2015.

Schenk RK, Buser DB, Hardwick WR, Dahlin C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. *Int J of Oral & Maxillofac Implants*. 1994;9:13-29.

Schielephake H, Tavassol F, Gelinsky M, Dard M, Sewing A, Pompe W. Use of a mineralized collagen membrane to enhance repair of calvarial defects in rats. *Clin Oral Implant Res*. 2004; 15:112-118.

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.

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*. v. 30, n. 3, p. 1061-8, Apr. 2015.

Shetty V, Bertolami CN. Cicatrização de lesões. In: Miloro M, Ghali GE, Larsen PE, Waite PD. *Princípios de Cirurgia Bucomaxilofacial de Peterson*. 1 st ed. São Paulo: Santos, 2013. p. 3-6.

da Silva JP, da Silva MA, Almeida AP, Lombardi Junior I, Matos AP. Laser therapy in the tissue repair process: a literature review. *Photomed Laser Surg*. 2010;28(1):17-21.

da Silva, RV, CAMILLI JA. Repair of bone defects treated with autogenous bone graft and low-power laser. *J craniofac surg*. 2006;17(2):297-301.

Souza SLS, Reino DM, Costa LFA, Muglia VA, Silveira e Souza AMM. Biomateriais usados em implantodontia. In: Fabio Valverde Rodrigues Bastos Neto (Org.). *Implantologia: ciência e prática*. Maringá: Dental Press 2001. p. 303-37.

Souza SLS, Furlaneto FAP, Martins SHL, Mantovani RV, Costa LFA, Souza MAS. Membranas para ROG: uma revisão crítica. In: Shibli JA, Zenóbio EG, Jayme SJ, Souza SLS. *Regeneração Tecidual: o que realmente sabemos?* 1st ed. São Paulo: VM Cultural; 2016. p. 75-110.

Streckbein P, Jäckel S, Malik CY, Obert M, Kähling C, Wilbrand JF, Zahner D, et al. Reconstruction of critical size mandibular defects in immunoincompetent rats with human adipose-derived stromal cells. *J Cranio-maxillo-fac Surg*. 2013; 41(6):496–503.

Tetè S, Zara S, Vinci R, Zizzari V, Di Tore U, Mastrangelo F, et al. Vascular endothelial growth factor and e-nitric oxide synthase-mediated regenerative response occurring upon autologous and heterologous bone grafts. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2009;22(4):1105-16.

Tim CR, Bossini PS, Kido HW, Malavazi I, von Zeska Kress MR, Carazzolle MF, et al. Effects of low level laser therapy on inflammatory and angiogenic gene expression during the process of bone healing: A micrarray analysis. *J Photochem Photobiol B*. 2016;154:8-15.

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

Troiano G, Zhurakivska K, Lo Muzio L, Laino L, Cicciù M, Lo Russo L. Combination of bone graft and resorbable membrane for alveolar ridge preservation: a systematic review, meta-analysis and trial sequential analysis. *J Periodontol*. 2017;12:1-17.

Trombelli L, Farina R, Marzola A, Bozzi L, Liljenberg B, Lindhe J. Modeling and remodeling of human extraction sockets. *J Clin Periodontol*. 2008;35 (7):630-9.

Tune'r J, Hode L. It's all in the parameters: A critical analysis of some well-known negative studies on low-level laser therapy. *J Clin Laser Med Surg* 1998;16(5):245–248.

Väänänen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM. The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci*. v. 113, n. 3, p. 377-81, Feb. 2000.

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*. v. 25, n.8, p. 879-93, Aug. 2014.

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.

Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*. 2008;29 (20):2941-53.

Yildirim M, Spiekermann H, Biesterfeld S, Edelhoff D. Maxillary sinus augmentation using xenogenic bone substitute material Bio-Oss in combination with venous blood. A histologic and histomorphometric study in humans. Clin Oral Implants Res. 2000; 11(3):217-29.

Zhang X, Awad HA, O'Keefe RJ, Guldberg RE, Schwarz EM. A perspective: engineering periosteum for structural bone graft healing. Clin Orthop Relat Res. 2008;466(8):1777-87.

Zizzari VL, Zara S, Tetè G, Vinci R, Gherlone E, Cataldi A. Biological 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.

Zubery Y, Nir E, Goldlust A. Ossification of a collagen membrane cross-linked by sugar: a human case series. J Periodontol. 2008;79(6):1101-7.

ANEXO

ANEXO I

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

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

CEEPA-Proc. Nº 015/2016

Bauru, 12 de dezembro de 2016.

Senhora Professora,

Informamos que a proposta intitulada **Avaliação do efeito do laser de baixa intensidade na regeneração de defeitos ósseos de tamanho crítico preenchidos com osso autógeno ou Bio-Oss® associados à membrana colágena**, registrada sob CEEPA-Proc. Nº 015/2016, o qual utilizará cortes histológicos provenientes de amostras coletadas de animais de estudos previamente aprovados por esta CEEPA, sob protocolos CEEPA-Proc. Nº 004/2011 (relatório final aprovado em 18.11.2016) e CEEPA-Proc. Nº 038/2013 (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:	Setembro/2016 a Setembro/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