UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

MÉRCIA JUSSARA DA SILVA CUNHA

Avaliação da cicatrização de defeitos ósseos criados cirurgicamente em calvárias de ratos e tratados com enxertos de origem bovina (Bio-Oss[®]) associados ao laser de baixa intensidade. Estudo histológico e histométrico

BAURU
2013

MÉRCIA JUSSARA DA SILVA CUNHA

Avaliação da cicatrização de defeitos ósseos criados cirurgicamente em calvárias de ratos e tratados com enxertos de origem bovina (Bio-Oss®) associados ao laser de baixa intensidade. Estudo histológico e histométrico

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em ciências odontológicas aplicadas.

Área de concentração: Reabilitação Oral

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Pompéia Fraga de Almeida

BAURU
2013

Cunha, Mércia Jussara da Silva

C914a Avaliação da cicatrização de defeitos ósseos criados cirurgicamente em calvárias de ratos e tratados com enxertos de origem bovina (Bio-Oss[®]) associados ao laser de baixa intensidade. Estudo histológico e histométrico / Mércia Jussara da Silva Cunha. Bauru, 2012.
109 p. : il. ; 30 cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Pompéia Fraga de Almeida

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

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 018/2010
Data: 07/07/2010

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por estar sempre presente, por toda força e coragem, por ter colocado pessoas tão especiais em meu caminho, por iluminar meus pensamentos e guiar meus sonhos.

“O coração do homem traça o seu caminho, mas o Senhor lhe dirige os passos.” (PV. 16:9)

Ao meu pai José Noberto, que partiu durante esta caminhada, deixando muita saudade em meu coração. Tenho certeza de que está ao lado do Pai Celestial, zelando e intercedendo por mim. Obrigada por todo carinho e incentivo. Obrigada por me ajudar a compreender o tempo de Deus para cada coisa na vida.

À minha mãe Maria José, por conhecer todos os meus defeitos e, mesmo assim, me amar incondicionalmente. Pela paciência que teve em me mostrar a importância do estudo. Por todo incentivo, decisivo na minha formação profissional. Por ser a força que me mantém de pé nos momentos de insegurança.

Ao meu avô José João e à minha avó Luzia, pelo incentivo e, sobretudo, pelas orações durante os momentos mais importantes desta caminhada.

À minha irmã Bianca, por me mostrar que com determinação se vai longe. Por me ensinar a sonhar alto e não me abater com os obstáculos.

Ao meu cunhado Ernane Bastos, pelo incentivo, pelas boas risadas e conversas descontraídas.

À minha sensacional sobrinha Letícia, por me fazer rir feito boba a cada aprendizado. Por encher o meu coração de alegria.

A todos os meus familiares: tios, tias, primos e primas, pela confiança depositada. Obrigada por compreenderem minhas ausências e por me incentivarem sempre.

Ao meu namorado Fernando, pela paciência com que, por muitas vezes, ouviu minhas lamentações nesta reta final, pelo incentivo e pelo carinho, que tornavam mais leves os momentos difíceis.

De maneira especial, agradeço também à Família Miguita, que inúmeras vezes me acolheu, sempre com muito carinho e atenção, tentando amenizar a saudade que sinto estando longe... Muito Obrigada por tudo!

À Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Pompéia Fraga de Almeida, minha orientadora, por descobrir em mim o potencial que nem eu imaginava possuir, por me acolher nos momentos de dúvidas, por lapidar a profissional que sou hoje. A ética, a dedicação e a humildade transmitidas ao longo desses anos de convivência serão ensinamentos que levarei para sempre. Tê-la como orientadora foi um presente de Deus. Obrigada pelo carinho, atenção e paciência.

“Um professor influi para a eternidade; nunca se pode dizer até onde vai sua influência.”

(Henry Brooks Adams)

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro, pela enorme paciência e atenção que sempre teve comigo. Por não desistir de me ensinar prótese, incentivando sempre o olhar crítico. Por me mostrar que eu posso fazer melhor sempre. Por me permitir desfrutar de tamanha experiência e sabedoria. Pelo exemplo de dignidade, simplicidade e humildade. Por confiar em mim e no meu trabalho.

“Se vi mais longe foi por estar de pé sobre ombros de gigantes.” (Isaac Newton)

Ao Prof. Dr. Accácio Lins do Valle, por todos os ensinamentos, essenciais para minha formação pessoal e profissional. Pelo exemplo de simplicidade e humildade. Por todo carinho e amizade. Por tornar meus dias mais leves com suas brincadeiras constantes.

Ao Prof. Dr. Pedro César Garcia de Oliveira e à Profa. Dra. Simone Soares, pelo bom humor e simplicidade, por me mostrar que ser professor é mais que ter conhecimento científico.

Ao Prof. Dr. José Henrique Rubo, pela seriedade com que conduz seus trabalhos, sem que esta atrapalhe o seu jeito atencioso e a maneira afetuosa com que trata as pessoas.

Ao Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti, pelo grande esforço que tem feito pela pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru.

Enfim, a todos os professores do departamento de prótese: Prof. Dr. Carlos dos Reis Pereira de Araújo, Prof. Dr. Gerson Bonfante, Prof^ª. Dr^a. Karin Hermana Neppelenbroek, Prof. Dr. Paulo Martins Ferreira, Prof. Dr. Renato de Freitas, Prof. Dr. Vinícius Carvalho Porto, Prof. Dr. Wellington Cardoso Bonachela, pelos conhecimentos transmitidos, carinho e amizade durante esse tempo.

Ao Prof. Dr. José Roberto Pereira Lauris, não somente pela realização da análise estatística deste trabalho, mas também pela paciência e disponibilidade em me ensinar e tentar fazer com que eu entendesse coisas que antes pareciam impossíveis.

À Prof^ª. Dr^a. Sueli Lobo Devides, por sempre me receber tão bem, por toda amizade, confiança e acima de tudo por todos os conhecimentos transmitidos, meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. José Alberto de Souza Freitas, Tio Gastão, pelo exemplo de solidariedade e trabalho humanizado.

Ao Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti Souza e à Dr^a. Adriana Maria Mariano Silveira e Souza, por permitir que trabalhássemos juntos, por todo conhecimento compartilhado, pelo apoio que nos deu no desenvolvimento deste trabalho. E por intermediar nosso contato com a Faculdade de Medicina-USP de Ribeirão Preto.

Ao Prof. Dr. Eduardo Gomes Seabra, por despertar em mim o interesse pela Periodontia.

Ao Departamento de Histologia da Faculdade de Odontologia-USP de Bauru, por ter aberto as portas e nos ajudado durante processo de captura das imagens contidas neste trabalho.

À Vani Maria Alves, técnica do Laboratório de Histotecnologia do Departamento de Biologia Celular e Molecular de Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina-USP de Ribeirão Preto, pela imensa contribuição no processamento laboratorial. Sua ajuda foi fundamental para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Centro Integrado de Pesquisa (CIP), em especial a Renato Murback, por compartilhar dos nossos sonhos, pelas conversas agradáveis, pelas palavras de incentivo, por toda colaboração e disponibilidade.

Aos queridos funcionários do departamento de prótese, Cleide, Débora, Valquíria, Marcelo e Reivanildo, pelo esforço em me ajudar sempre.

Às funcionárias da clínica de pós-graduação, Cleusa e Hebe, pela convivência, pelo apoio e ajuda de sempre.

Às amigas Mariuza e Sabrina, funcionárias dos Setores de Periodontia e Cirurgia Ortognática do Centrinho, pelas boas conversas, pela torcida, por toda a atenção e forma carinhosa com que sempre me trataram.

Ao adorável Tidi, funcionário do Setor de Manutenção do Centrinho, pela experiência de vida, por toda alegria e serenidade que transmite, pela incansável disponibilidade em me ajudar sempre.

Enfim, a todos os funcionários do Centrinho, pelo tratamento sempre agradável e por fazer dessa instituição um lugar tão lindo. Cada um de vocês teve uma parcela de contribuição na minha formação pessoal e profissional.

A todos os pacientes que atendi ou acompanhei durante essa jornada. A essas pessoas que não fazem idéia do quanto nos ensinam a cada dia com suas histórias, suas vidas, seus corações. É muito bom fazer algo por elas, mas o que elas fazem por nós é ainda melhor.

À toda minha turma de mestrado, Adriana, Aline, André, Denise, Dylton, Joseli, Juliana, Karen, Laís, Letícia, Vinícius, Yuri, agradeço pelo convívio harmonioso, pelas experiências vividas, pelo apoio e incentivo que sempre me deram. Em especial às amigas Laís, Karen e Juliana, pessoas de coração enorme, amigas de todas as horas. Obrigada por se fazerem presentes em tantos momentos importantes desta caminhada, sempre dispostas a ajudar e a me acalmar, por partilharem das minhas dúvidas, me ouvirem e me aconselharem. A amizade de vocês me faz muito bem.

À Isabella Luzia Medeiros, bolsista de iniciação científica, pessoa especial, sempre bem humorada, nunca mediu esforços para ajudar no desenvolvimento deste trabalho.

À amiga Ilana Ramalho, estagiária do departamento de prótese, pela tranquilidade que transmite, pela disponibilidade em ajudar sempre. Talvez, sem perceber, suas palavras me confortaram e me acalmaram quando tudo parecia complicado demais.

Aos colegas do doutorado da área de Reabilitação Oral, Carol, Livia Maria, Livia Aguiar, Luiz, Max Dória, Max Laurent, pelo exemplo de amizade e união, pelos conhecimentos transmitidos, por compartilharem das minhas dúvidas e me ajudarem a superar obstáculos.

Aos amigos Luis Esper e Michyele Sbrana, pelo exemplo de profissionalismo e dedicação científica. Pela incansável ajuda nos procedimentos cirúrgicos, laboratoriais e também na parte científica deste trabalho. Pela disponibilidade, amizade e paciência. Por todos os conhecimentos transmitidos. Nada que eu diga é capaz de traduzir o carinho e a gratidão que tenho por vocês. Obrigada por tudo! Podem contar comigo sempre...

A todos os meus amigos da turma de especialização (Periodontia HRAC/USP 2009-2011), Camiletxi (Camila Camarinha), Pitú (Débora Amgarten), Mari Marquinha (Mariana Monteiro), Paula's Girl (Paula Pessôa), Menino Rander (Rander Macedo), Gabi (Gabriela Natalício), Navoski (Vitor Garcia) pelo exemplo de união, pelos momentos prazerosos de aprendizado, de reflexão e de crescimento. Por partilharem dúvidas, dificuldades, alegrias e, sobretudo, sonhos. Guardarei para sempre os momentos vividos!

À Paula Gabriela Faciola Pessôa de Oliveira, amiga que conquistei desde a prova de seleção para a especialização, companheira fiel nesta caminhada. Obrigada pelo ombro amigo, pelos conselhos e incentivos, mesmo quando partilhávamos das mesmas dúvidas, angústias e medos. Obrigada por não me deixar desanimar e por acreditar que, juntas, poderíamos superar as dificuldades e alcançar os nossos sonhos.

Ao inesquecível "G8": Ana Clara, Cecília, Brunna, Emanuelle, Luciana, Lucila, Polyxena e Sofia, um dos maiores presentes que a Graduação em Odontologia me deixou. Por entender minhas visitas cada vez menos frequentes. É muito bom permanecer ligada a vocês, mesmo que a quilômetros de distância, compartilhando as alegrias, anseios, dúvidas e conquistas. Vocês estão em meu coração!

Aos amigos Serginho (José Sérgio Maia Neto) e Isana Alvares Ferreira, por confiar no meu trabalho, me incentivar e guiar meus primeiros passos na pós-graduação.

À Universidade Federal do Rio Grande do Norte, instituição onde me graduei, a qual sempre levarei em memória. Minha eterna gratidão!

Ao Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais (HRAC/USP), carinhosamente conhecido como “Centrinho”, pelo enorme enriquecimento pessoal e profissional que me propiciou. Passar por essa instituição me fez muito feliz e orgulhosa. Minha eterna gratidão e saudade!

À Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, na pessoa do excelentíssimo diretor Prof. Dr. José Carlos Pereira, pelo apoio institucional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro via auxílio à pesquisa (2010/10538-0) e bolsa de mestrado (2010/ 1317-3).

Por fim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, fizeram parte desta história e contribuíram para a concretização deste sonho.

Muito obrigada!

“Difícilmente esquecemos um período da vida que exigiu de nós um grande sacrifício. Aquilo, na verdade, passou: mas nada restou daquele sofrimento?... Coragem, alegrai-vos! Ficou para vós o santo e puro merecimento. O sacrifício passou, mas os merecimentos estão lá, belos, resplendentes, gloriosos, diante do olhar de Jesus..., para serem transformados, um dia, numa coroa de pedras preciosas. Diga-se o mesmo de cada sacrifício grande ou pequeno que se suporta, todos os dias, a cada hora e minuto.”

Madre Clélia Merloni

RESUMO

O propósito deste estudo foi avaliar, histologicamente, o efeito do laser de baixa intensidade na cicatrização óssea de defeitos de tamanho crítico (DTC- 5mm) criados cirurgicamente em calvárias de ratos, quando associado ou não ao osso bovino inorgânico (Bio-Oss[®]). 60 ratos machos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar) foram divididos em 6 grupos: C (controle), L (Laser de Baixa Intensidade - GaAlAs, 730nm, 100mW, 6J, 210J/cm²), AO (Osso Autógeno), OAL (Osso Autógeno + Laser de Baixa Intensidade), BO (Osso Bovino Inorgânico), BOL (Osso Bovino Inorgânico + Laser de Baixa Intensidade). Os animais foram submetidos à eutanásia após 30 dias. A quantidade de osso neoformado e a área de partícula remanescente dos materiais implantados foram calculadas como porcentagem da área do defeito original. Os dados foram submetidos à análise estatística (Teste de Kruskal - Wallis, Teste de Dunn; $p < 0,05$). Os grupos irradiados com laser de baixa intensidade, L ($47,67\% \pm 8,66\%$), OAL ($39,15\% \pm 16,72\%$) e BOL ($48,57\% \pm 28,22\%$) apresentaram maior área de neoformação óssea que os grupos C ($9,96\% \pm 4,50\%$), OA ($30,98\% \pm 16,59\%$) e BO ($11,36\% \pm 7,89\%$) que não foram irradiados. Além disso, foram significativamente melhores que o Grupo C. Dentro dos limites deste estudo, conclui-se que o laser acelerou o processo de neoformação óssea e de reabsorção das partículas dos materiais de enxertia, podendo ser considerado uma modalidade terapêutica interessante a ser associada com biomateriais em cirurgias ósseas reconstrutivas.

Palavras-chave: Lasers. Transplante ósseo. Ratos.

ABSTRACT

Evaluation of healing of surgically created bone defects in rat calvaria treated with bovine grafts (Bio-Oss®) associated with low level laser. Histological and histometric study

This study histologically evaluated the effect of low level laser on the bone healing of critical size defects (CSD- 5mm) surgically created in rat calvaria, associated or not with inorganic bovine bone (Bio-Oss®). Sixty male rats (*Rattus norvegicus, albinus*, Wistar) were divided in 6 groups: C (control), L (low level laser - GaAlAs, 730nm, 100mW, 6J, 210J/cm²), AO (autogenous bone) OAL (autogenous bone + low level laser), BO (inorganic bovine bone), BOL (inorganic bovine bone + low level laser). The animals were killed after 30 days. The quantity of newly formed bone and area of remaining particles of the implanted materials were calculated as percentages of the original defect area. Data were statistically analyzed (Kruskal – Wallis test, Dunn test; $p < 0.05$). The groups irradiated with low level laser, L ($47.67\% \pm 8.66\%$), OAL ($39.15\% \pm 16.72\%$) and BOL ($48.57\% \pm 28.22\%$) presented greater area of new bone formation than the groups C ($9.96\% \pm 4.50\%$), OA ($30.98\% \pm 16.59\%$) and BO ($11.36\% \pm 7.89\%$), which were not irradiated. Also, they were significantly better than group C. within the limits of this study, it was concluded that the laser accelerated the new bone formation and resorption of particles of graft materials, thus it may be considered an interesting therapeutic option for association with biomaterials in reconstructive bone surgeries.

Key words: Lasers. Bone Transplantation. Rats.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Média, mediana e desvio-padrão da área de osso neoformado (expressa em porcentagem da área total do defeito) em cada grupo	71
TABELA 2	Média, mediana e desvio-padrão da área de partícula remanescente (expressa em porcentagem da área total do defeito) em cada grupo	72

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

- FIGURA 1 - A) Tricotomia e antisepsia da calvária; (B) Desenho da incisão realizada; (C) Retalho de espessura total descolado; (D) Realização do DTC (5mm) com a broca trefina; (E) Integridade da dura-máter e do encéfalo preservada; (F) Guia cirúrgico para confecção das canaletas em forma de “L”; (G) Canaletas preenchidas com amalgama; (H) DTC preenchido com osso autógeno; (I) DTC preenchido com Bio-Oss[®]; (J) Retalho suturado. 47
- FIGURA 2 - (A) Aparelho de laser utilizado; (B) Desenho esquemático dos pontos de aplicação do laser. 49
- FIGURA 3 - (A) Redução das peças através da orientação das canaletas; (B) Peça reduzida; (C) Identificação das margens do defeito cirúrgico original; (D) Desenho esquemático das peças incluídas em parafina; (E) Desenho esquemático dos cortes seriados longitudinal. 51
- FIGURA 4 - Fotomicrografia de um dos cortes histológicos, 2x. Hematoxilina e Eosina. A Área Total (AT) é delineada pela linha azul e corresponde à área da calvária onde o defeito cirúrgico foi originalmente criado. A altura da Área Total (X) corresponde à espessura do osso original da calota (Y). A Área de Osso Neoformado (AON) está delineada pelas linhas amarelas. A Área de Partícula Remanescente (APR) está delimitada pelas linhas verdes. 53
- FIGURA 5 - Fotomicrografias do grupo-controle. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico, 4x; (B) Centro do defeito preenchido por feixes de fibras colágenas, 40x; (C) Pequena quantidade de tecido ósseo neoformado (asterisco) junto às margens do defeito cirúrgico (linha tracejada), 10x. Hematoxilina e Eosina. 59
- FIGURA 6 - Fotomicrografias do grupo tratado com laser. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico, 4x; (B) Neoformação óssea estendendo-se em direção ao centro do defeito cirúrgico original (esterisco), 10x; (C) Remodelação óssea (seta) na região do osso antigo que foi preservado, 40x. 61
- FIGURA 7 - Fotomicrografias do grupo tratado com osso autógeno. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico, 4x; (B) Tecido ósseo neoformado (asterisco) junto às margens do defeito cirúrgico (linha tracejada) e presença de partículas ósseas do enxerto (setas) 10x; (C) Partícula de osso autógeno (linha tracejada) circundada por tecido ósseo neoformado (asterisco), 40x. 63
-

FIGURA 8 - Fotomicrografias do grupo tratado com osso autógeno e irradiado com laser de baixa intensidade. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico, 4x; (B) Partículas de osso autógeno com neoformação óssea na periferia (setas), 10x; (C) Área de neoformação e remodelação (tracejado) da partícula de osso autógeno (asterisco), 40x.....	65
FIGURA 9 - Fotomicrografias do grupo tratado com Bio-Oss®. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico, 4x; (B) Discreta neoformação óssea (asterisco) junto às margens da lesão (linha tracejada) e partículas de osso bovino (setas), 10x; (C) Osteoclastos na periferia das partículas do enxerto ósseo bovino (setas), 40x.....	67
FIGURA 10 - Fotomicrografias do grupo tratado com Bio-Oss® e irradiado com laser de baixa intensidade. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico, 4x; (B) Partícula de osso bovino com tecido ósseo neoformado em sua periferia (asterisco), 40x; (C) Osteoclasto na periferia da partícula do enxerto ósseo bovino (seta), 40x.	69

- GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Distribuição dos dados da área de osso neoformado para todos os grupos experimentais.....	72
GRÁFICO 2 - Distribuição dos dados da área de partícula remanescente para os grupos que receberam material de enxertia.....	73

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	Tecido ósseo	21
2.2	Enxertos e Substitutos ósseos	25
2.3	Laser	29
2.4	Modelo experimental	34
3	PROPOSIÇÃO.....	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1	Modelo Experimental	45
4.2	Procedimento Cirúrgico.....	45
4.3	Protocolo de Aplicação do Laser de Baixa Intensidade	49
4.4	Processamento tecidual.....	49
4.5	Análise histológica e histométrica	51
4.6	Análise estatística	55
5	RESULTADOS	57
5.1	Análise histológica.....	59
5.2	Análise histométrica e estatística.....	71
6	DISCUSSÃO	75
7	CONCLUSÃO	85
	REFERÊNCIAS.....	89
	ANEXO.....	107

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Grandes defeitos ósseos ou complicações pós-traumáticas podem exigir a utilização de enxerto ósseo para preenchimento total do defeito (CALORI et al., 2011).

O enxerto ósseo é um procedimento cirúrgico comum. Estima-se que cerca de 500.000 enxertos ósseos são realizados anualmente nos Estados Unidos (GEIGER; LI; FRIESS, 2003; GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005) e 2,2 milhões em todo o mundo (CALORI et al., 2011; GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005), a fim de reparar defeitos em ortopedia, neurocirurgia e odontologia (GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005), levando a gastos anuais de bilhões de dólares com esses procedimentos (DUCHEYNE; QIU, 1999).

Dentre os materiais de enxertos utilizados na regeneração óssea, o osso autógeno tem sido considerado o material de enxertia ideal na cirurgia óssea reconstrutiva, por possuir propriedades osteogênicas, osteocondutoras e osteoindutoras (BALDINI; DE SANCTIS; FERRARI, 2011; CALORI et al., 2011; HALLMAN; THOR, 2008; SCHMITT et al., 2012). Apesar de ser o “gold standard” para reconstruções (CALORI et al., 2011; HALLMAN; THOR, 2008; MARDAS; STAVROPOULOS; KARRING, 2008; ROGERS; GREENE, 2012), sua coleta está associada com 8,5 a 20% de complicações, incluindo defeitos estéticos, formação de hematoma (GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005), danos a estruturas anatômicas locais (HERFORD; DEAN, 2011); infecções (BLOKHUIS; ARTS, 2011; GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005; HERFORD; DEAN, 2011); dor no sítio doador (AMERIO et al., 2010; OHAYON, 2011) e reabsorção imprevisível do enxerto (HALLMAN; THOR, 2008; ROGERS; GREENE, 2012).

Por essa razão, vários substitutos ósseos de origem alógena, xenógena e aloplástica estão disponíveis no mercado (MARDAS; STAVROPOULOS; KARRING, 2008), compartilham a vantagem de um fornecimento ilimitado e de não haver necessidade de um sítio doador. No entanto não apresentam propriedades osteogênicas (ROGERS; GREENE, 2012), são essencialmente osteocondutores, podendo oferecer propriedades osteoindutoras variáveis (de alta a nenhuma) (CALORI et al., 2011; GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005).

Com os recentes avanços em biotecnologia, os cirurgiões-dentistas têm seus planos de tratamento facilitados pela grande variedade de materiais de enxertia disponíveis. Entretanto o material considerado perfeito ainda não foi identificado (HALLMAN; THOR, 2008).

O osso bovino inorgânico é o material de enxertia mais pesquisado e amplamente utilizado na odontologia devido à sua semelhança com osso humano (HALLMAN; THOR, 2008). Possui a arquitetura e estrutura mecânica do tecido ósseo, o que não é encontrado em materiais sintéticos (HOEXTER, 2002). Resultados promissores já foram demonstrados com sua utilização em estudos clínicos (ARTZI, 2000) e em animais (TORRES et al., 2008).

É um excelente osteocondutor (HAMMERLE et al., 1998; OHAYON, 2011; TORRES et al., 2008), mas carece de propriedades osteoindutoras, o que incentiva os pesquisadores a encontrar formas de melhorar o seu comportamento “in vivo” (TORRES et al., 2008).

A utilização da terapia com laser de baixa intensidade cria inúmeras condições ambientais que parecem acelerar a cicatrização de defeitos ósseos “in vivo” e “in vitro” (PINHEIRO; GERBI, 2006). Os efeitos relacionados a essa terapia incluem o aumento da vascularização, aumento da atividade osteoblástica, organização de fibras colágenas e mudanças no nível mitocondrial e intracelular de adenosina trifosfato (ATP) (BARBOSA et al., 2012; GARCIA et al., 2012). Tornou-se um método comum e não invasivo para estimular a osteogênese (DA SILVA; CAMILLI, 2006), e acelerar a consolidação de fraturas e a cura de defeitos ósseos (BARBOSA et al., 2012; DA SILVA; CAMILLI, 2006; GARCIA et al., 2012; GUZZARDELLA et al., 2003).

O uso do laser de arseneto de gálio e alumínio (GaAlAs) aumentou consideravelmente nos últimos 10 anos. Esse tipo de laser é conhecido por ter uma alta profundidade de penetração em comparação com outros tipos, o que o torna uma ferramenta clínica eficiente (NISSAN et al., 2006).

A utilização de modelos com defeitos de tamanho crítico em calvária de ratos avalia a influência real do material e/ou técnica a serem testados na regeneração óssea (MESSORA et al., 2008b). São escassos, na literatura, estudos que avaliaram o comportamento dos materiais de enxerto ósseo bovino quando irradiados pelo laser de baixa intensidade em calvárias de ratos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tecido ósseo

O osso é um tecido conjuntivo especializado constituído de células, fibras e substância fundamental. Ao contrário de outros tecidos conjuntivos, os seus componentes extracelulares são mineralizados (matriz óssea), conferindo-lhe força e rigidez substancial (WEATHERHOLT; FUCHS; WARDEN, 2012), é capaz de desempenhar funções de suporte mecânico para os tecidos moles e proteção para órgãos vitais (BAEK; KIM, 2011; COHEN, 2006; WEATHERHOLT; FUCHS; WARDEN, 2012).

A matriz óssea é composta por uma parte orgânica e outra inorgânica. A parte orgânica contém essencialmente fibras colágenas tipo I (88%), além de outras proteínas (10%) como osteocalcina, osteonectina, fosfoproteínas; e 2% de lípidose glicosaminoglicanos. A parte inorgânica é representada predominantemente por depósitos de íons fosfato e cálcio com características da hidroxiapatita com a composição $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Há, também, carbonato, citrato, fluoreto, cloreto, magnésio, sódio, estrôncio, potássio (COHEN, 2006).

Macroscopicamente, há duas formas de osso: cortical (compacto) e esponjoso (medular). No osso cortical, a matriz óssea está organizada em forma de lamelas concêntricas, geralmente ao redor de um canal vascular central, constituindo o sistema de Harvers. Os canais centrais contendo nervos e vasos sanguíneos se comunicam entre si e com a cavidade medular óssea através dos canais de Volkmann. Já o osso esponjoso apresenta uma matriz mais porosa, organizada em trabéculas. Assim, o osso cortical dá resistência e proteção, enquanto que o esponjoso atua nas funções metabólicas. O osso cortical é encontrado nas diáfises de ossos longos e na superfície externa de ossos chatos. O osso esponjoso delimita espaços intertrabeculares, que são preenchidos por medula óssea vermelha, onde há a produção ativa de células sanguíneas a partir de células mesenquimais, ou, com o envelhecimento, por medula óssea amarela, um sítio de reserva de gordura (MARX; GARG, 1998).

Protegendo externamente o osso, existe uma fina camada de tecido conjuntivo com grande potencial osteogênico, denominado perióstio, e um tecido equivalente, o endóstio, que recobre as superfícies internas dos ossos (FROST, 1966).

No interior da matriz óssea há espaços chamados de lacunas, que abrigam células ósseas. Costuma haver uma célula óssea chamada de osteócito em cada lacuna. O osteócito possui numerosos prolongamentos citoplasmáticos contidos em pequenos túneis chamados canalículos, que se estendem das lacunas à matriz mineralizada, atravessando-a (DUDLEY; SPIRO, 1961; ROCHEFORT; PALLU; BENHAMOU, 2010; SCHAFFLER; KENNEDY, 2012). Os canalículos que se estendem a partir das lacunas ligam-se aos canalículos das lacunas vizinhas. Dessa maneira, forma-se uma rede contínua de canalículos e lacunas em toda a massa de tecido mineralizado. Dentro dos canalículos, os prolongamentos dos osteócitos estabelecem contatos através de extensões citoplasmáticas, por onde podem passar pequenas moléculas e íons de um osteócito para o outro (FRANZ-ODENDAAL; HALL; WITTEN, 2006; ROCHEFORT; PALLU; BENHAMOU, 2010).

Os osteócitos são células achatadas que exibem pequena quantidade de retículo endoplasmático rugoso e aparelho de golgi pouco desenvolvido, características que indicam uma diminuição na síntese e secreção de proteínas (FRANZ-ODENDAAL; HALL; WITTEN, 2006; ROCHEFORT; PALLU; BENHAMOU, 2010). Um papel importante dos osteócitos e sua rede de processos celulares é funcionar como sensores de tensão e estresse, sinais muito importantes para a manutenção da estrutura óssea (FRANZ-ODENDAAL; HALL; WITTEN, 2006; SCHAFFLER; KENNEDY, 2012). Outra função dos osteócitos é a capacidade para depositar e reabsorver osso em torno da lacuna em que se encontram alojados, alterando assim a sua forma. Esse processo é chamado de osteólise osteocítica, ocorre com a concomitante liberação de íons cálcio para o plasma, permitindo o aumento dos níveis sanguíneos de cálcio para a manutenção de níveis apropriados (FRANZ-ODENDAAL; HALL; WITTEN, 2006; TETI; ZALLONE, 2009). Osteólise osteocítica pode ser limitada a situações como a lactação, hibernação ou gravidez, que requerem maior mobilização de minerais do esqueleto (FRANZ-ODENDAAL; HALL; WITTEN, 2006).

Esse tipo de célula é derivado da linhagem dos osteoblastos (SCHAFFLER; KENNEDY, 2012). Osteócitos são osteoblastos que ficam enterrados na matriz durante a formação do osso (BOYCE et al., 2012). Embora os mecanismos que levem os osteoblastos a se diferenciarem em osteócitos não sejam completamente compreendidos, sabe-se que aqueles que não fazem essa transição transformam-se em osteoblastos de superfície inativa, chamados de células ósseas de revestimento, ou sofrem morte celular programada (apoptose) (FRANZ-ODENDAAL; HALL; WITTEN, 2006; ROCHEFORT; PALLU; BENHAMOU, 2010; SCHAFFLER; KENNEDY, 2012).

Os osteoblastos são células mononucleares derivadas de células precursoras mesenquimais, responsáveis pela produção da matriz óssea. Sintetizam colágeno tipo I e proteoglicanas (MARUOTTI et al., 2012). Uma vez aprisionados pela matriz óssea mineralizada, passam a ser chamados de osteócitos (FRANZ-ODENDAAL; HALL; WITTEN, 2006).

A característica mais marcante do citoplasma dos osteoblastos é o retículo endoplasmático granular abundante e os ribossomas livres. Isso tem relação com a sua função na produção de colágeno e de proteoglicanas da matriz extracelular. O citoplasma contém numerosas vesículas e mitocôndrias abundantes (DUDLEY; SPIRO, 1961).

Outro tipo de célula encontrado no interior do osso é o osteoclasto. Os osteoclastos são células de origem hematopoiética, criados pela diferenciação de monócitos/macrófagos em células gigantes multinucleadas, por uma variedade de fatores, incluindo citocinas e fatores de crescimento (BOYCE et al., 2012; BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; LUSTBERG; REINBOLT; SHAPIRO, 2012).

A superfície ativa dos osteoclastos, voltada para a matriz óssea, apresenta prolongamentos vilosos irregulares. Circundando essa área com prolongamentos vilosos, existe uma zona citoplasmática, a zona clara, pobre em organelas, porém contendo muitos filamentos de actina. A zona clara é um local de adesão do osteoclasto com a matriz óssea, a qual cria um microambiente fechado, onde tem lugar a reabsorção óssea. Os osteoclastos secretam para dentro desse ambiente fechado, ácido (H^+), collagenase e outras hidrolases que atuam localmente digerindo o osso subjacente. Produtos da degradação (fragmentos de colágeno, cálcio e fosfato solubilizado) são processados dentro do osteoclasto e liberados para a circulação. Frequentemente, nas áreas de reabsorção de tecido ósseo, encontram-se porções dilatadas dos osteoclastos repousando em depressões da matriz escavadas pela atividade dos osteoclastos e conhecidas como lacunas de Howship (BOYCE et al., 2012; BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; DUDLEY; SPIRO, 1961).

Até há pouco tempo, considerou-se que os osteoblastos eram as células dominantes na regulação da remodelação óssea. No entanto, tornou-se cada vez mais evidente que os osteoclastos desempenham papéis importantes na regulação de osteoblastos e de outras células no microambiente ósseo. Por exemplo, fatores de crescimento, incluindo o TGF- β e proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), lançados pelos osteoclastos durante reabsorção,

podem estimular a diferenciação dos osteoblastos e a remodelação óssea (BOYCE et al., 2012).

Ao longo do tempo, o tecido ósseo sofre constante remodelação por meio de reabsorção e deposição de matriz óssea. A remodelação óssea normal é um processo dinâmico entre a reabsorção e a formação do novo osso (LUSTBERG; REINBOLT; SHAPIRO, 2012).

Inúmeras adversidades, tais como envelhecimento, menopausa e tratamento de câncer podem levar a perdas ósseas, aumentando potencialmente os riscos de osteoporose e fraturas ósseas subsequentes (LUSTBERG; REINBOLT; SHAPIRO, 2012). Quando isso ocorre, a resposta inflamatória está intimamente ligada ao processo de cura, que pode ocorrer por meio de regeneração ou reparo (HARRISON, 1991).

A regeneração é a restauração completa da perda tecidual, com reconstituição da estrutura e funções originais. Por outro lado, no reparo, o tecido destruído é substituído por um tecido com alteração na estrutura anatômica e/ou funções originais (HARRISON, 1991).

O tecido ósseo possui a capacidade intrínseca para a regeneração, como parte do processo de cicatrização, tanto em resposta a uma lesão como durante o desenvolvimento do esqueleto, ou remodelação contínua durante toda a vida (DIMITRIOU et al., 2011).

Diante de injúrias, quer sejam fraturas ou defeitos ósseos cirúrgicos, ocorre extravasamento de sangue para o local, formando o coágulo que irá preencher as áreas a serem restauradas, servindo de leito para o processo regenerativo (CRUZ, 2006a).

O passo crucial para a coagulação é a transformação do fibrinogênio em fibrina e a polimerização e ligação dessas moléculas em fios interligados, formando uma “malha” que retém frações de soro e elementos formados, tais como hemácias, granulócitos, linfócitos e monócitos. Isso forma um agregado hidratado geilificado, denominado coágulo de fibrina, que reforça o tampão plaquetário inicial e contém o extravasamento de sangue. Com a progressão da cicatrização, ocorrem proliferação e diferenciação de fibroblastos e células endoteliais (caracterizando o tecido de granulação) e invasão de células osteoprogenitoras, utilizando as trabéculas de fibrina como arcabouço. Células mortas da periferia da lesão e do coágulo liberam enzimas autolíticas, e monócitos em desintegração liberam enzimas proteolíticas. Há infiltração de macrófagos, derivados principalmente dos monócitos do sangue, cuja função principal é a digestão e remoção de detritos celulares e da fibrina coagulada (HARRISON, 1991).

A formação do tecido de granulação inicia-se a partir das regiões periféricas do coágulo sanguíneo e evolui gradativamente para o centro do mesmo, até o momento em que há a total substituição do coágulo por tecido de granulação neoformado, rico em alças vasculares, fibroblastos e células inflamatórias (CRUZ, 2006a).

Após isso, ocorre uma mudança do tecido de granulação para tecido osteoide (matriz óssea não calcificada). Células imaturas do tecido de granulação se diferenciam em osteoblastos e depositam fibras colágenas e proteoglicanas. Essa atividade osteogênica resulta, inicialmente, num tecido denso fibroso eosinófilo, rico em células osteoblásticas, o qual evolui para uma estrutura trabecular imatura denominada calo ósseo, que apresenta estrutura trabecular irregular, fibras colágenas desorganizadas, concentração elevada de osteócito e menor índice de calcificação. Com o processo de remodelação, esse tecido ósseo imaturo é gradualmente reabsorvido e substituído pelo tecido ósseo maduro ou lamelar, onde as fibras colágenas organizam-se em lamelas paralelas umas às outras, tendo-se então um tecido ósseo bem organizado e mineralizado (CRUZ, 2006a). Após a aplicação do estímulo funcional, o processo de remodelação continua seguindo a quantidade e a direção das cargas recebidas (WILDING et al., 1995).

2.2 Enxertos e Substitutos ósseos

Apesar do potencial regenerativo do tecido ósseo, alguns fatores podem interferir negativamente na sua formação após uma injúria, tais como a falha na proliferação de vasos sanguíneos para o interior do defeito, estabilização inadequada do coágulo e do tecido de granulação (PORTAL-NUNEZ; LOZANO; ESBRIT, 2012). Dessa forma, em defeitos muito grandes (locais onde tais falhas podem ocorrer com maior frequência) faz-se, muitas vezes, necessária a utilização de um enxerto para auxiliar o processo de cicatrização. Além de atuar na estabilização do coágulo, proporciona suporte ao tecido mole, reduzindo o risco de colapso do tecido para o interior do defeito (BALDINI; DE SANCTIS; FERRARI, 2011).

O objetivo principal do enxerto ósseo é substituir o tecido ósseo em sua função biomecânica, mantendo-se integrado e viável biologicamente. Além disso, deseja-se que ele possa ser removido e substituído pelo tecido ósseo vivo (CRUZ, 2006b).

O material de enxerto ósseo pode induzir a formação de osso através da osteogênese, osteoindução e osteocondução (HERFORD; DEAN, 2011; HOEXTER, 2002; OLIVEIRA et al., 2012). Osteogênese é a capacidade de formar novo osso a partir de osteoblastos viáveis presentes no próprio enxerto. Osteoindução, por outro lado, é a presença de substâncias indutoras no enxerto que estimula células mesenquimais do tecido hospedeiro circundante a se diferenciarem em células formadoras de osso. Osteocondução é a propriedade que o material enxertado deve ter para conduzir as células, fluidos e vasos sanguíneos, funcionando como uma estrutura em torno da qual ocorre crescimento do tecido ósseo (BALDINI; DE SANCTIS; FERRARI, 2011; BLOKHUIS; ARTS, 2011; CALORI et al., 2011; GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005; HOEXTER, 2002; OLIVEIRA et al., 2012).

Os materiais empregados para enxerto ósseo podem ser classificados, quanto sua origem, em autógenos, alógenos (homógenos ou homólogo), xenógenos (heterógeno ou heterólogo) e aloplásticos. Enxertos autógenos são derivados do próprio indivíduo, alógenos são obtidos de indivíduos da mesma espécie, enxertos xenógenos são derivados de outra espécie e aloplásticos são substitutos ósseos de origem sintética (HOEXTER, 2002).

O enxerto autógeno tem sido considerado como material de enxertia ideal na cirurgia óssea reconstrutiva, por possuir propriedades osteogênicas, osteoindutoras e osteocondutoras (BALDINI; DE SANCTIS; FERRARI, 2011; CALORI et al., 2011; HALLMAN; THOR, 2008; SCHMITT et al., 2012), não possuir ação antigênica (HOEXTER, 2002), e por ser mais previsível que os enxertos alógenos e xenógenos, especialmente para grandes defeitos (HERFORD; DEAN, 2011).

Os sítios utilizados para coleta podem ser intraorais (ramo ascendente, sínfise e tuberosidade) ou extraorais (crista ilíaca, calvária e tíbia), e sua escolha irá depender do tamanho e da geometria do defeito, da quantidade e qualidade óssea necessária (HERFORD; DEAN, 2011).

No entanto o processo de coleta pode resultar em danos a estruturas anatômicas locais (dentes, nervos, músculos, vasos) (HERFORD; DEAN, 2011); infecções (BLOKHUIS; ARTS, 2011; GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005; HERFORD; DEAN, 2011); reabsorção imprevisível do enxerto (HALLMAN; THOR, 2008; ROGERS; GREENE, 2012); necessidade de um segundo sítio cirúrgico (BALDINI; DE SANCTIS; FERRARI, 2011; CHAVES et al., 2012; OHAYON, 2011; SCHMITT et al., 2012); maior morbidade

(CHAVES et al., 2012; HALLMAN; THOR, 2008; MARDAS; STAVROPOULOS; KARRING, 2008; OHAYON, 2011; SCHMITT et al., 2012); dor no sítio doador (AMERIO et al., 2010; OHAYON, 2011); maior tempo cirúrgico (MARDAS; STAVROPOULOS; KARRING, 2008; SCHMITT et al., 2012) e quantidade limitada de osso disponível (AMERIO et al., 2010; ROGERS; GREENE, 2012), o que pode ser um problema em casos nos quais o volume do defeito é superior ao volume de material de enxerto saudável disponível, condição prevalente na população pediátrica e geriátrica (GEIGER; LI; FRIESS, 2003). Além disso, o custo da coleta pode ser o equivalente ao de substitutos ósseos comercialmente disponíveis (CALORI et al., 2011).

A evolução tecnológica e uma melhor compreensão da biologia e da regeneração óssea (GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005), juntamente às adversidades encontradas com a coleta do osso autógeno (AL RUHAIMI, 2001), têm levado a uma grande necessidade clínica por materiais de enxertia óssea que possam ser alternativos ou substitutos ao enxerto autógeno (AL RUHAIMI, 2001; GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005). Esses são derivados de fontes humanas, animais e sintéticas (AL RUHAIMI, 2001).

Idealmente, um substituto de osso deve possuir características de biocompatibilidade (BALDINI; DE SANCTIS; FERRARI, 2011; GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005; OHAYON, 2011), ausência de efeitos antigênicos, possibilidade de esterilização associada com propriedades mecânicas (BALDINI; DE SANCTIS; FERRARI, 2011), capacidade de manutenção de espaço (BALDINI; DE SANCTIS; FERRARI, 2011; OHAYON, 2011), facilidade de manipulação durante as fases cirúrgicas (BALDINI; DE SANCTIS; FERRARI, 2011; GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005), estabilidade em longo prazo (OHAYON, 2011; SCHMITT et al., 2012), reabsorção (GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005; OHAYON, 2011) e rentabilidade (GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005). Devem possuir, também, propriedades osteoindutoras (GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005; SCHMITT et al., 2012) e osteocondutoras (BALDINI; DE SANCTIS; FERRARI, 2011; GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005).

No entanto a maioria dos substitutos ósseos apresentam essencialmente propriedades osteocondutoras (BALDINI; DE SANCTIS; FERRARI, 2011; GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005). Atuam como material de preenchimento, proporcionando um arcabouço que permite a colonização por células osteogênicas e endoteliais e a

neoformação óssea a médio ou longo prazo (OHAYON, 2011), oferecendo pouca ou nenhuma capacidade de osteoindução (CALORI et al., 2011; GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005).

Um dos substitutos do osso autógeno é o Bio-Oss[®] (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suíça), um xenoenxerto constituído de osso bovino inorgânico (SU-GWAN; HAK-KYUN; SUNG-CHUL, 2001) obtido a partir de dois tipos diferentes de osso, cortical e esponjoso (TADJOEDIN et al., 2003). Encontra-se comercialmente disponível em blocos e em pequenas partículas (EWERS et al., 2004; SU-GWAN; HAK-KYUN; SUNG-CHUL, 2001) de dois tamanhos diferentes (0,25-1 mm e 1-2 mm) (TADJOEDIN et al., 2003).

É um material que tem sido extensivamente estudado (ARAUJO; LINDER; LINDHE, 2011; DE OLIVEIRA et al., 2012; KATO et al., 2012; KHORSAND et al., 2012; VAHABI et al., 2012). Resultados positivos já foram demonstrados em estudos com animais (BERGLUNDH; LINDHE, 1997; HAMMERLE et al., 1998; HURZELER et al., 1997; SANTIS et al., 2011) e com humanos (ARTZI, 2000; ZITZMANN et al., 2001). Na odontologia é amplamente utilizado para levantamento de seio maxilar (HALLMAN et al., 2005; HATANO; SHIMIZU; Ooya, 2004; SCHMITT et al., 2012; VALENTINI; ABENSUR, 1997; VALENTINI et al., 2000); preservação de rebordo alveolar após exodontias (MARDAS; CHADHA; DONOS, 2010; MARDAS et al., 2011); aumento horizontal do rebordo alveolar (HAMMERLE et al., 2008); deiscências ósseas associadas a implantes (HAMMERLE; LANG, 2001) e defeitos ósseos periodontais (CAMELO et al., 1998; STAVROPOULOS; KARRING, 2010).

Apresenta composição química e propriedades físicas semelhantes à porção inorgânica do osso humano (AMERIO et al., 2010; EWERS et al., 2004; HALLMAN; THOR, 2008; NEVINS et al., 2011; OHAYON, 2011; TRAINI et al., 2008). Seus componentes orgânicos são eliminados através de condições controladas de pH e temperatura (OHAYON, 2011; SCHWARTZ et al., 2000; TAPETY et al., 2004), mantendo a estrutura mineral do osso bovino, que é muito próxima à do osso humano (75 a 80% de porosidade) (OHAYON, 2011). Apesar da ausência de componentes orgânicos, a arquitetura mineral semelhante, composta por cristais de hidroxiapatita, facilita a angiogênese, bem como a colonização do enxerto por osteoblastos e a deposição de matriz óssea, o que fornece ao material excelentes propriedades osteocondutoras (OHAYON, 2011; TAPETY et al., 2004; TRAINI et al., 2008; YILDIRIM et al., 2000).

O risco de transmissão de príons associados à doença de Creutzfeldt - Jakob foi mencionado (KIM; NOWZARI; RICH, 2011), a análise de osso bovino inorgânico revelou restos de proteínas (SCHWARTZ et al., 2000). Em contraste, a ausência de proteína foi demonstrada (BENKE; OLAH; MOHLER, 2001), indicando sua segurança no que diz respeito à transmissão de encefalopatia espongiforme bovina para os pacientes (IEZZI et al., 2008; NORTON et al., 2003; WENZ; OESCH; HORST, 2001).

Sua reabsorção é um assunto conflitante na literatura (BALDINI; DE SANCTIS; FERRARI, 2011). Há relatos de que partículas de Bio-Oss[®] no interior de defeitos ósseos falham em reabsorver e permanecem como corpo inerte circundado por osso do hospedeiro (EWERS et al., 2004; IEZZI et al., 2008; TRAINI et al., 2008; TRAINI et al., 2007). Por outro lado, outros autores relataram que após meses de cicatrização, atividade osteoclástica é observada nas partículas e acredita-se que, com o tempo essas partículas remodelam-se e novo osso é formado. Entretanto parece ser um processo lento (BERGLUNDH; LINDHE, 1997); de acordo com Tadjoeidin et al. (2003), a substituição ocorre em uma taxa de cerca de 10% ao ano.

A falta de propriedades osteoindutoras nesse biomaterial encoraja os pesquisadores a encontrar formas de melhorar ainda mais o seu comportamento in vivo (TORRES et al., 2008), já que é um material consagrado pela literatura e bastante utilizado em cirurgias ósseas regenerativas (BERGLUNDH; LINDHE, 1997; CAMELO et al., 1998; HAMMERLE et al., 1998; MARDAS et al., 2011; SCHMITT et al., 2012; VALENTINI; ABENSUR, 1997).

2.3 Laser

A possibilidade de acelerar a cicatrização óssea é um fator importante para a aplicação da fotoengenharia em tecidos vivos. Embora o tecido ósseo apresente boa capacidade regenerativa, seu processo de cicatrização pode ser prejudicado em decorrência de um pobre suprimento sanguíneo, instabilidade mecânica, bem como a presença de tecidos com maior capacidade proliferativa (ABOELSAAD et al., 2009; PINHEIRO; GERBI, 2006). Diante disso, a utilização do laser de baixa intensidade (LB) como alternativa para acelerar a cicatrização em defeitos ósseos maiores tem sido estudada (BIGUETTI et al., 2012; FAVARO-PIPI et al., 2011; SILVA JUNIOR et al., 2002).

A palavra LASER é um acrônimo de “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation” (BASHARDOUST TAJALI et al., 2010; DA SILVA et al., 2010; ELAVARASU; NAVEEN; THANGAVELU, 2012; FERNANDO; HILL; WALKER, 1993; ISHIKAWA et al., 2009; LUCAS et al., 2002), a qual pode ser traduzida por amplificação da luz por emissão estimulada de radiação. Surgiu a partir de pesquisas propostas por Einstein em 1917 (DA SILVA et al., 2010; ELAVARASU; NAVEEN; THANGAVELU, 2012) quando escreveu seu “Zur Quantum Theorie der Strahlung” (a teoria quântica da radiação), que enumerou os conceitos de emissão e absorção, estimulada e espontânea (TAKAC; STOJANOVIC, 1999).

Schawlow e Townes (1958) propuseram uma técnica para a geração de radiação monocromática na região infravermelho do espectro visível, usando vapor alcalino como meio ativo.

Javan (1959) e Sanders (1959) discutiram propostas envolvendo elétrons excitados em sistemas gasosos, e Maiman (1960), operou o primeiro laser usando o rubi como meio ativo (laser de rubi).

Em termos simples, o desenho de um laser é composto por: 1) ressonador, que consiste em um tubo ou cavidade óptica, com um arranjo de espelhos em suas extremidades, que amplificam os efeitos do laser. Um dos espelhos é de reflexão total e o outro de reflexão parcial; 2) meio ativo, composto por substâncias que determinam o comprimento de onda e, portanto, a cor da luz emitida. Elas podem ser gasosas (Nitrogênio, Dióxido de Carbono, Hélio, Neônio), sólidas (Neodímio) ou líquidas (Corantes Orgânicos) e 3) um mecanismo de excitação ou bombeamento, que consiste em uma fonte de energia externa que excita os elétrons do meio ativo. Pode ser uma descarga elétrica, o disparo de um flash e até outro laser (ELAVARASU; NAVEEN; THANGAVELU, 2012; ISHIKAWA et al., 2009; ZARRABI; GROSS, 2011).

Na natureza, os elétrons estão em estado de equilíbrio. Após estímulo por alguma energia externa, eles passam para um estado de excitação. Para voltar ao estado de equilíbrio, eles emitem um fóton, que é uma partícula de energia. Dentro do ressonador, esses fótons se propagam num eixo entre os dois espelhos e deixam a cavidade através do espelho semitransparente na forma de um feixe de luz, o laser (ELAVARASU; NAVEEN; THANGAVELU, 2012; ZARRABI; GROSS, 2011).

O laser é uma excepcional fonte de radiação, com a capacidade de produzir, em bandas espectrais extremamente delgadas, campos eletromagnéticos intensos e correntes, estendendo-se do infravermelho remoto ao ultravioleta. Possui propriedades únicas que o difere da luz comum, como a: monocromaticidade (mesmo comprimento de onda, ou seja, mesma cor), coerência (todas as ondas se encontram numa relação de fase espacial e temporal), e colimação (todos os raios são paralelos uns aos outros e não divergem, mesmo a grandes distâncias) (ELAVARASU; NAVEEN; THANGAVELU, 2012; LUCAS et al., 2002; TAKAC; STOJANOVIC, 1999).

Quando o tecido biológico é irradiado com a luz laser, quatro tipos de interações podem ocorrer: reflexão (parte da luz incidente é refletida e perdida); espalhamento (parte da luz se espalha pelo tecido perdendo a potência), absorção (a luz é absorvida por componentes do tecido como a água, hemoglobina, melanina) ou transmissão (a luz atravessa toda a espessura do tecido) (ELAVARASU; NAVEEN; THANGAVELU, 2012; ISHIKAWA et al., 2009; ZARRABI; GROSS, 2011). O tipo de interação que ocorre vai depender, predominantemente, do comprimento de onda do laser. Radiações que são facilmente absorvidas pelo tecido traduzem-se em menor penetração e menor camada de tecido afetado (ISHIKAWA et al., 2009).

O laser de GaAlAs é conhecido pela alta profundidade de penetração em comparação com outros tipos, o que o torna uma ferramenta clínica eficiente. Tem sido relatado que a penetração elevada no tecido pode ser observada com comprimento de onda entre 820-840 nm (NISSAN et al., 2006).

Na área da saúde, podem ser utilizados lasers de alta intensidade, que rompem ou modificam permanentemente o tecido através do corte, ablação, coagulação e vaporização; e de baixa intensidade, que regula as funções fisiológicas celulares (ROYNESDAL et al., 1993).

Os lasers de baixa intensidade têm sido utilizados para tratamento de ceratose actínica (KIM et al., 2012; KIM; NOWZARI; RICH, 2011; POSTEN et al., 2005), distúrbios temporomandibulares (CONTI, 1997; KOGAWA et al., 2005; SALMOS-BRITO et al., 2013) artrite reumatoide (ALVES et al., 2012), “trigger points”, dor miofascial (BASFORD, 1995), microcirculação comprometida, cicatrização de feridas (OBRADOVIĆ et al., 2012), alívio da dor (ENWEMEKA et al., 2004; KREISLER et al., 2004) e redução do edema (MARKOVIC; TODOROVIC, 2007).

No passado, os termos “fotobioativação” e “bioestimulação” foram frequentemente utilizados com base nos efeitos estimuladores que a irradiação de baixa intensidade pode produzir. No entanto, uma vez identificados efeitos inibitórios, o termo foi substituído por “biomodulação” (LUCAS et al., 2002; ROYNESDAL et al., 1993). Hoje em dia, “bioestimulação” tem sido substituído por uma série de intermutáveis frases descritivas, como laser de baixa intensidade (low intensity), de baixo nível (low level), de baixa potência (low power) (BASFOR, 1995), terapia com laser de baixa intensidade (Low Level Laser Therapy - LLLT) (LUCAS et al., 2002) e lasers “frios” (“cold” lasers) (POSTEN et al., 2005). Todos enfatizando as características não térmicas da abordagem (BASFOR, 1995; POSTEN et al., 2005).

Vários meios ativos são utilizados para criar os lasers de baixa intensidade. Inicialmente as pesquisas utilizaram a luz visível dos lasers de Hélio-Neônio (HeNe; 632,8 nm), Rubi (694 nm), Argônio (488 e 514 nm) e Criptônio (521, 530, 568, e 647 nm). Estudos posteriores utilizaram laser diodos semicondutores, incluindo Gálio Arsênio (GaAs, 904 nm) e Arsênio Gálio e Alumínio (GaAlAs; 820 e 830 nm). Hoje, os dispositivos de HeNe ainda são amplamente utilizados, mas a maioria dos trabalhos são feitos com GaAs e GaAlAs, com comprimentos de onda entre 820 nm e 904nm (BASFOR, 1995; POSTEN et al., 2005).

Todos eles são definidos por uma série de parâmetros que incluem: potência com uma variação de 10 a 90 W (ocasionalmente, algumas centenas) (BASFOR, 1995; OBRADOVIĆ et al., 2012), comprimento de onda compreendido entre 500 e 1100 nm (OBRADOVIĆ et al., 2012); densidade de potência ou irradiância (potência / área) de 10^{-2} a 100 W/cm^2 , tempo total de irradiação de 10 a 3000 segundos, densidade de energia ou fluência (potência x tempo de irradiação / área irradiada) de 10^{-2} a 10^2 J/cm^2 ; e para dispositivos pulsados, taxa de pulsos de 0 (onda contínua) a 5.000 Hz, duração do pulso de 1-500 milissegundos, e intervalo entre os pulsos de 1 a 500 milissegundos (POSTEN et al., 2005).

Uma discussão sobre a terapia com laser, idealmente, deve incluir esses parâmetros, bem como informações sobre a frequência e número de sessões de irradiação, pois eles podem ter influência sobre o resultado do tratamento, e merecem atenção para evitar resultados controversos e conclusões empíricas (PINHEIRO et al., 2009b).

Não existem parâmetros universalmente aceitos para a utilização do laser de baixa intensidade. Diferentes protocolos de irradiação são encontrados, com diferentes materiais de

ativação, comprimentos de onda, dose e número de aplicações, o que dificulta a comparação dos resultados e a escolha dos parâmetros de tratamento (DA SILVA et al., 2010).

Dentre os efeitos relacionados à utilização do laser de baixa intensidade está o aumento da vascularização, organização de fibras colágenas, aumento da atividade osteoblástica (ABOELSAAD et al., 2009; BARBOSA et al., 2012; GARCIA et al., 2012; TRELLES; MAYAYO, 1987), aumento da atividade osteoclástica (NICOLA et al., 2003) e mudanças no nível mitocondrial e intracelular de adenosina trifosfato (ATP) (BARBOSA et al., 2012; GARCIA et al., 2012; PASSARELLA et al., 1984). Além disso, promove efeitos bioenergéticos, bioelétricos, bioquímicos e bioestimulatórios sobre as células. Com o efeito bioenergético, fotorreceptores da cadeia respiratória são ativados, aumentando a produção de ATP necessária para reações interestruturais em ciclos metabólicos, isso consome grandes quantidades de oxigênio, facilitando, assim, os processos de reparo celular. O efeito bioelétrico normaliza o potencial de membrana iônica, vitalizando as funções celulares; e a bioestimulação aumenta a síntese de adenosina trifosfato, promovendo a produção de ácido nucleico, o que acelera a divisão celular (DA SILVA; CAMILLI, 2006).

A terapia com laser de baixa intensidade tornou-se um método comum e não invasivo para estimular a osteogênese (DA SILVA; CAMILLI, 2006) e acelerar a consolidação de fraturas e a cura de defeitos ósseos (BARBOSA et al., 2012; DA SILVA; CAMILLI, 2006; GARCIA et al., 2012; GUZZARDELLA et al., 2003). É incerto se a biomodulação, resultante da ação do laser de baixa intensidade na formação óssea, é decorrente de efeitos em células mesenquimais ou uma estimulação direta de osteoblastos (OBRADOVIC; KESIC; PESEVSKA, 2009). É possível que resultados favoráveis na regeneração óssea em espécimes irradiadas sejam decorrentes de um aumento na liberação de fatores de crescimento, principalmente fatores de crescimento fibroblásticos que atuam em células diferenciadas, aumentando a proliferação celular e secreção de componentes da matriz (OBRADOVIC; KESIC; PESEVSKA, 2009; SIGURDSSON et al., 1995).

A utilização da laserterapia no trans operatório de enxerto ósseo autógeno resultou em neoformação óssea significativa, em termos de qualidade e quantidade, quando comparada à sua utilização apenas no pós-operatório. Esse efeito é ainda mais evidente quando a irradiação é efetuada em ambos os momentos (WEBER et al., 2006).

Em modelo animal, defeitos ósseos tratados com LB apresentaram trabéculas ósseas mais maduras, maior neoformação óssea e um tecido conjuntivo altamente vascularizado, quando comparado ao controle (FAVARO-PIPI et al., 2011).

O laser de baixa intensidade também resultou num efeito biomodulatório positivo sobre a cicatrização de defeitos ósseos enxertados com osso bovino inorgânico (PINHEIRO et al., 2003).

No trabalho de Gerbi et al. (2005), no qual o o LB foi associado ao osso bovino e membrana para ROG, observou-se um efeito positivo nos grupos irradiados, independente da utilização da membrana. No entanto, em nenhum grupo o LB foi testado isoladamente.

Resultados positivos têm sido demonstrados “in vivo” (PRETEL; LIZARELLI; RAMALHO, 2007; SILVA JUNIOR et al., 2002) e “in vitro” (LEONIDA et al., 2013; STEIN et al., 2005). Porém outros trabalhos não encontraram nenhum efeito da terapia com laser de baixa intensidade no reparo de tecidos moles ou mineralizados (ANNEROTH et al., 1988; LUGER et al., 1998). Além disso, diferentes protocolos de irradiação são encontrados e poucos estudos avaliaram o papel do LB associado a substitutos ósseos (GERBI et al., 2005; PINHEIRO et al., 2003; PINHEIRO et al., 2012).

2.4 Modelo experimental

Para estudos em animais, diversos modelos experimentais de regeneração óssea têm sido propostos: em calvárias, com defeitos de diferentes dimensões (ACCORSI-MENDONCA et al., 2011; DEVELIOGLU et al., 2010; FREEMAN; TURNBULL, 1973; MESSORA et al., 2008a; MOKBEL et al., 2012; NAGATA et al., 2010a); em fêmur, tanto em ratos (BROWN et al., 2011), quanto em coelhos (DOMINIAK et al., 2012).

Os modelos experimentais de regeneração óssea exigem a produção de um defeito que permita adequada avaliação do osso neoformado sob as condições de uma determinada terapia. Desse modo, o defeito ósseo deve ser idealmente caracterizado de tal forma que o grupo controle (sem tratamento) não seja capaz de regenerar-se através dos processos naturais ou regenerar apenas menos de 10% da área do defeito (AYBAR ODSTRCIL; TERRITORIALE; MISSANA, 2005).

No tecido ósseo, um defeito que não cura sem intervenção é denominado “defeito de tamanho crítico” (DTC) (SPICER et al., 2012). Pela definição clássica de Schmitz e Hollinger (1986), um defeito de tamanho crítico deve ser do menor tamanho que não permita regeneração completa ao longo do tempo de vida natural do animal (BOSCH; MELSEN; VARGERVIK, 1998; COOPER et al., 2010; SPICER et al., 2012), a menos que algum material, com propriedades osteogênicas, osteocondutoras ou osteoindutoras seja colocado no defeito (BOSCH; MELSEN; VARGERVIK, 1998). Portanto a utilização de um DTC é necessária para avaliar a influência real de qualquer biomaterial na regeneração óssea (MESSORA et al., 2008b).

Um modelo de defeito de calvária tem muitas semelhanças com a região maxilofacial. Embriologicamente, a calvária desenvolve-se a partir de um precursor membranoso e, assim, assemelha-se aos ossos da face, também de origem membranosa. Anatomicamente, a calota craniana é constituída por duas densas placas corticais interpostas por osso esponjoso, semelhante à mandíbula. Fisiologicamente, o osso cortical na calvária se assemelha a uma mandíbula atrofada (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986).

Em modelos de DTC para a regeneração óssea, a geometria do defeito parece exercer papel importante na capacidade regenerativa. Assim, em modelos de defeitos de calvária, a relação entre a profundidade e a largura do defeito é de extrema importância para a sua utilização, pois essa relação afeta o potencial das paredes ósseas adjacentes em preencher a área do defeito com células ósseas e propiciar completo fechamento do defeito. Assim, a geometria rasa de um defeito que não cicatriza espontaneamente é muito complexa não apenas em termos biológicos, mas também por sua relação geométrica (SCHLIEPHAKE et al., 2004).

Uma vez que o modelo mais rigoroso para avaliar a eficácia de um substituto ósseo é o defeito em calvária (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986), este tem sido usado em grande escala, durante os últimos 25 anos, para testar substitutos ósseos e terapias regenerativas (COOPER et al., 2010).

Defeitos de tamanho crítico em calvária foram descritos em quatro espécies (rato, coelho, cachorro e macaco) (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986), variando a idade do animal, localização anatômica e tamanho do defeito (AYBAR ODSTRCIL; TERRITORIALE; MISSANA, 2005), o que dificulta a comparação dos resultados (BOSCH; MELSEN; VARGERVIK, 1998).

A quantidade e a qualidade do osso formado em defeitos ósseos são influenciadas por todos esses fatores, além da estabilidade do defeito, tipo de osso, presença ou ausência de periósteo, e presença da dura-máter (BOSCH; MELSEN; VARGERVIK, 1998).

Dessa forma, um modelo animal utilizado para ensaio de regeneração óssea deve atender certas exigências: 1) o tamanho mínimo do defeito ósseo experimental não deve ser menor do que o defeito ósseo de tamanho crítico para a espécie particular; 2) o modelo deve ser barato; 3) os animais devem estar prontamente disponíveis e ser de fácil manuseio, incluindo o processo de anestesia; 4) o local do defeito deve preferencialmente incluir osso cortical e esponjoso; 5) o defeito ósseo deve ser estável e não permitir mobilidade; 6) o risco de fratura deve ser minimizado; e 7) o modelo animal deve permitir acompanhamento e avaliação da regeneração óssea, radiográfica e histologicamente (BOSCH; MELSEN; VARGERVIK, 1998).

O modelo que utiliza calvária de ratos é adequado em termos de custo, disponibilidade do animal e facilidade da técnica (AYBAR ODSTRCIL; TERRITORIALE; MISSANA, 2005; SPICER et al., 2012).

O diâmetro do defeito utilizado tem variado de 2 a 9mm (ACCORSI-MENDONCA et al., 2011; DEVELIOGLU et al., 2010; FREEMAN; TURNBULL, 1973; GARCIA et al., 2012; MESSORA et al., 2008a; MESSORA et al., 2008b; SCHLIEPHAKE et al., 2004; TOKER et al., 2012) e a quantidade de osso neoformado depende deste tamanho (CACCIAFFESTA et al., 2001). No entanto defeitos ósseos em calvária de ratos com 5mm de diâmetro já são considerados defeitos críticos, pois neles não ocorre cicatrização espontânea (AYBAR ODSTRCIL; TERRITORIALE; MISSANA, 2005; BOSCH; MELSEN; VARGERVIK, 1998; CACCIAFFESTA et al., 2001; DE BRITO BEZERRA et al., 2012; DONOS et al., 2004; FURLANETO et al., 2007; JONES et al., 2007; SCHMITZ; HOLLINGER, 1986).

A utilização de grandes defeitos ósseos pode resultar em: 1) inclusão da sutura sagital no defeito, introduzindo assim o tecido conjuntivo da sutura na avaliação da regeneração óssea; 2) impossibilidade de realização de experimentos com emparelhamento entre o sítio experimental e controle, ou entre dois sítios experimentais; 3) risco elevado de danos ao seio sagital localizado sob a sutura sagital, e, portanto, a possibilidade de dano a esta estrutura anatômica vascular e consequente hemorragia durante a trepanação (BOSCH; MELSEN;

VARGERVIK, 1998) que, por sua vez, pode ter efeito sobre a cicatrização (JONES et al., 2007).

Atualmente, modelos que envolvem análise da regeneração óssea usam, em sua metodologia, microscopia óptica (MARQUEZ MARTINEZ; PINHEIRO; RAMALHO, 2008; PINHEIRO et al., 2009a; PINHEIRO et al., 2009b), morfometria (DA SILVA; CAMILLI, 2006), imuno-histoquímica (BIGUETTI et al., 2012; MATSUMOTO et al., 2009), ou testes biomecânicos (CACCIAFESTA et al., 2001; JONES et al., 2007; KAZEM SHAKOURI et al., 2010; LUGER et al., 1998).

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

O propósito deste estudo foi avaliar, histologicamente, o efeito do laser de baixa intensidade na cicatrização de defeitos de tamanho crítico em calvárias de ratos, preenchidos com Bio-Oss[®].

Hipótese nula:

- O laser não influencia no processo de cicatrização.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Modelo Experimental

Foram utilizados 60 ratos machos (*Rattus norvegicus, albinus*, Wistar), pesando entre 250 e 300g (Universidade de São Paulo – USP, Biotério Central da Faculdade de Odontologia do Campus de Bauru-SP). Os animais foram mantidos em ambiente com ciclo de 12 horas de luz por dia e temperatura entre 22 e 24° C. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da USP – Campus de Bauru (Anexo A). Durante todo o experimento, os animais consumiram ração sólida selecionada e água *ad libitum*.

Os animais foram divididos aleatoriamente em seis grupos experimentais:

1. **Grupo C** – Controle;
2. **Grupo L** – Laser de Baixa Intensidade – Thera Lase DMC® (DMC, Equipamentos Ltda., São Carlos, Brasil);
3. **Grupo OA** – Osso Autógeno;
4. **Grupo OAL** - Osso Autógeno + Laser de Baixa Intensidade;
5. **Grupo BO** - Bio-Oss® (0,25-1mm) (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suíça);
6. **Grupo BOL** – Bio-Oss® (0,25-1mm) + Laser de Baixa Intensidade.

4.2 Procedimento Cirúrgico

Para a realização de todos os procedimentos experimentais, os ratos foram anestesiados por injeção intramuscular de cloridrato de xilazina (Vetbrands, Paulinia, Brasil) (0,02 ml/kg) e cloridrato de ketamina (Vetbrands, Paulinia, Brasil) (0,4 ml/kg). Após tricotomia e antissepsia da parte dorsal do crânio de cada animal, foi realizada a incisão semilunar na calvária e um retalho de espessura total rebatido em direção posterior. Um defeito de tamanho crítico (DTC) de 5mm de diâmetro foi criado com uma trefina em baixa rotação, sob irrigação abundante com solução salina estéril. O defeito incluía uma porção da sutura sagital. A dura-máter foi preservada durante a craniotomia. O segmento ósseo de espessura total (osso parietal) foi removido delicadamente, com uso de um esculpador

discoide cleoide (SSWhite/Duflex, Rio de Janeiro, Brasil), mantendo-se a integridade da dura-máter e do encéfalo (Figura 1).

Com o auxílio de um guia cirúrgico, previamente confeccionado, uma marcação em forma de “L” foi feita, 2mm anterior e outra 2mm posterior às margens do defeito cirúrgico com broca carbide tronco-cônica FG-700 (Microdont Micro Usinagem de Precisão Ltda., São Paulo, Brasil) sob irrigação contínua com solução salina estéril e, posteriormente, preenchidas com amálgama (Figura 1).

O maior eixo de cada “L” localizou-se sobre uma linha imaginária longitudinal craniocaudal que dividia o defeito cirúrgico ao meio. Essas marcações foram úteis para a identificação do meio do defeito cirúrgico original durante o processamento laboratorial e, também, para localizar as suas margens ósseas originais durante a análise histométrica (FURLANETO et al., 2007; GARCIA et al., 2012; MESSORA et al., 2008b; NAGATA et al., 2010a; NAGATA et al., 2010b).

Após a confecção das canaletas, o defeito foi preenchido seguindo o determinado para cada grupo. No Grupo C, o defeito cirúrgico foi preenchido apenas com coágulo sanguíneo. No Grupo L, com coágulo sanguíneo e aplicado o laser de baixa intensidade. No Grupo BO os defeitos foram preenchidos com 0,02g de Bio-Oss[®] e, no Grupo BOL, com a mesma quantidade de Bio-Oss[®] e aplicado o laser de baixa intensidade. No Grupo OA o defeito foi preenchido com osso autógeno removido da calvária (DA SILVA; CAMILLI, 2006) e triturado; e no Grupo OAL, após ser preenchido com osso autógeno, aplicou-se o laser de baixa intensidade (Figura 1).

O retalho foi, então, reposicionado e suturado com fio seda 4-0 (Ethicon, *Johnson & Johnson, São José dos Campos*, Brasil). Cada animal recebeu uma injeção intramuscular de 24.000 unidades de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico* Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge[®] Saúde Animal Ltda., Campinas, Brasil) (Figura 1).

FIGURA 1 - A) Tricotomia e antisepsia da calvária; (B) Desenho da incisão realizada; (C) Retalho de espessura total descolado; (D) Realização do DTC (5mm) com a broca trefina; (E) Integridade da dura-máter e do encéfalo preservada; (F) Guia cirúrgico para confecção das canaletas em forma de “L”; (G) Canaletas preenchidas com amalgama; (H) DTC preenchido com osso autógeno; (I) DTC preenchido com Bio-Oss®; (J) Retalho suturado.

4.3 Protocolo de Aplicação do Laser de Baixa Intensidade

O laser utilizado foi o Thera Lase DMC[®], modo de emissão contínuo, com meio ativo GaAlAs, comprimento de onda de 808nm, potência de 100mW, densidade de energia de 210J/cm² por ponto durante 60s/ponto, em quatro pontos na superfície do defeito cirúrgico criado, de acordo com as posições “do relógio” (12h, 3h, 6h, 9h), além de um ponto central. No Grupo L, a aplicação foi realizada após o preenchimento com coágulo sanguíneo, enquanto que nos grupos que utilizaram material de enxerto (BO e OA) a aplicação foi realizada após preenchimento do defeito com o material. Cada ponto recebeu uma quantidade de energia de 6J, totalizando 30J de energia entregue ao sistema (Figura 2).

FIGURA 2 - (A) Aparelho de laser utilizado; (B) Desenho esquemático dos pontos de aplicação do laser.

4.4 Processamento tecidual

Os animais foram submetidos à eutanásia aos 30 dias pós-operatórios, com 5 mg/ml da associação de cloridrato de quetamina e xilazina. A área do defeito cirúrgico original e os tecidos circunjacentes foram removidos em bloco. As peças foram fixadas em solução de formol neutro a 10%, lavadas em água corrente e descalcificadas em solução de Ácido Etilenodiaminotetracético – EDTA a 18% (Dinâmica[®] Química Contemporânea Ltda., Diadema, Brasil).

Após descalcificação, cada peça foi dividida longitudinalmente em dois blocos, exatamente ao longo do centro do defeito cirúrgico original, usando-se os maiores eixos de cada marcação de amálgama como referência. Além disso, foram realizados cortes transversais que tangenciaram o menor eixo de ambas as marcações em forma de “L”. Assim tornou-se possível a determinação precisa dos limites do defeito cirúrgico original para a realização da análise histométrica (Figura 3).

As peças foram, então, processadas e incluídas em parafina (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). Foram realizados cortes seriados longitudinais, com 6µm de espessura, iniciados a partir do centro do defeito cirúrgico original. Os cortes foram corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (H.E.) para análises com microscopia de luz (Figura 3).

FIGURA 3 – (A) Redução das peças através da orientação das canaletas; (B) Peça reduzida; (C) Identificação das margens do defeito cirúrgico original; (D) Desenho esquemático das peças incluídas em parafina; (E) Desenho esquemático dos cortes seriados longitudinal.

4.5 Análise histológica e histométrica

As análises histológica e histométrica foram realizadas por um examinador cego aos grupos experimentais e previamente calibrado. Foram selecionados quatro cortes histológicos, representando a área central do defeito cirúrgico original. As imagens dos cortes histológicos foram capturadas através da câmera digital SPOT RT3 - 2540 Color Slider 2.0Mp (SPOT ImagingSolutions, Diagnostic Instruments, Inc., Sterling Heights, EUA)

acoplada ao microscópio Olympus BX50 (Olympus Corporation, Hamburg, Alemanha), com um aumento de 2x e salvas em um computador. Uma imagem digital foi, então, criada pela combinação de três imagens menores, pois não foi possível capturar todo o defeito em uma mesma imagem com o nível de ampliação utilizado. A imagem foi criada com base em estruturas anatômicas de referência (por exemplo, vasos sanguíneos e trabéculas ósseas) em cada um dos cortes histológicos. A análise histométrica foi realizada com o auxílio do “software” ImageLab 2000 (Dracon Bio Informática Ltda., Vargem Grande do Sul, SP, Brasil).

Os seguintes critérios, com base na metodologia proposta por Furlaneto et al. (2007); Messori et al. (2008b); Nagata et al. (2010a); e Garcia et al. (2012), foram seguidos para padronizar a análise histométrica das imagens digitais:

- 1) A Área Total (AT) a ser analisada correspondeu à área total do defeito cirúrgico original. Essa área foi determinada pela identificação das superfícies externa e interna da calvária original e as margens direita e esquerda do defeito cirúrgico. Essas superfícies foram conectadas com linhas desenhadas seguindo suas respectivas curvaturas. Considerando-se o comprimento total do espécime histológico (9mm), foram medidos 2mm a partir da extremidade direita e esquerda do espécime em direção ao centro, a fim de determinar os limites do defeito cirúrgico original (Figura 4).
- 2) A Área de Osso Neoformado (AON) e Áreas de Partículas Remanescentes dos materiais implantados (APR) foram delineadas dentro dos limites da AT (Figura 4).
- 3) A AT foi medida em mm^2 e considerada 100% da área a ser analisada. A AON e APR também foram medidas em mm^2 e calculadas como porcentagens da AT, de acordo com a seguinte fórmula: $\text{AON} (\text{mm}^2) / \text{AT}(\text{mm}^2) \times 100$.

FIGURA 4 – Fotomicrografia de um dos cortes histológicos, 2x. Hematoxilina e Eosina. A Área Total (AT) é delineada pela linha azul e corresponde à área da calvária onde o defeito cirúrgico foi originalmente criado. A altura da Área Total (X) corresponde à espessura do osso original da calota (Y). A Área de Osso Neoformado (AON) está delineada pelas linhas amarelas. A Área de Partícula Remanescente (APR) está delimitada pelas linhas verdes.

4.6 Análise estatística

Para cada animal, os valores de AON e APR foram representados pela média aritmética dos quatro cortes histológicos mais centrais da calvária. Os valores encontrados não passaram nos testes de normalidade e homogeneidade. Dessa forma, foram submetidos ao teste não paramétrico de Teste de Kruskal - Wallis, seguido pelo Teste de Dunn. O nível de significância adotado foi de 5%.

5 **R**ESULTADOS

5 RESULTADOS

Durante o processamento laboratorial, 01 espécime do Grupo C, 03 espécimes do Grupo LB, 01 espécime do Grupo OA e 02 espécimes do Grupo OA+LB foram perdidos.

5.1 Análise histológica

Grupo C (Controle)

No Grupo C, praticamente toda a extensão do defeito cirúrgico estava ocupada por tecido conjuntivo com feixes de fibras colágenas orientadas paralelamente à superfície da ferida. Observou-se, junto às margens do defeito cirúrgico, pequena quantidade de tecido ósseo neoformado (Figura 5). Em nenhum espécime ocorreu regeneração óssea completa do defeito.

FIGURA 5 – Fotomicrografias do grupo-controle. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico, 4x; (B) Centro do defeito preenchido por feixes de fibras colágenas, 40x; (C) Pequena quantidade de tecido ósseo neoformado (asterisco) junto às margens do defeito cirúrgico (linha tracejada), 10x. Hematoxilina e Eosina.

Grupo L (Laser de Baixa Intensidade)

Osso neoformado rodeado por uma matriz osteóide foi observado em alguns espécimes do grupo L. O tecido conjuntivo apresentou-se com feixes de fibras colágenas orientadas paralelamente. Neoformação óssea estendendo-se em direção linear ao centro do defeito original foi observada em dois espécimes (28,5%). Também foi possível observar áreas de remodelação óssea na região de osso antigo, que foi preservado (Figura 6).

FIGURA 6 – Fotomicrografias do grupo tratado com laser. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico, 4x; (B) Neoformação óssea estendendo-se em direção ao centro do defeito cirúrgico original (asterisco), 10x; (C) Remodelação óssea (seta) na região do osso antigo que foi preservado, 40x.

Grupo OA (Osso Autógeno)

O tecido conjuntivo apresentava-se bem organizado no interior do defeito cirúrgico com formação de matriz osteóide e fibroblastos presentes. O osso neoformado estava presente em extensões variáveis nas margens do defeito e em volta das partículas ósseas enxertadas. Em apenas 1 espécime não foram observadas partículas ósseas do enxerto (Figura 7).

FIGURA 7 – Fotomicrografias do grupo tratado com osso autógeno. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico, 4x; (B) Tecido ósseo neoformado (asterisco) junto às margens do defeito cirúrgico (linha tracejada) e presença de partículas ósseas do enxerto (setas) 10x; (C) Partícula de osso autógeno (linha tracejada) circundada por tecido ósseo neoformado (asterisco), 40x.

Grupo OAL (Osso Autógeno + Laser de Baixa Intensidade)

Matriz osteóide foi observada em todos os espécimes do grupo OAL. O osso neoformado estava presente em extensões variáveis. Em três espécimes (37,5%) houve neoformação óssea em direção ao centro do defeito cirúrgico. Partículas ósseas enxertadas também foram observadas. A maioria delas apresentava tecido ósseo neoformado na periferia (Figura 8).

FIGURA 8 - Fotomicrografias do grupo tratado com osso autógeno e irradiado com laser de baixa intensidade. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico, 4x; (B) Partículas de osso autógeno com neoformação óssea na periferia (setas), 10x; (C) Área de neoformação e remodelação (tracejado) da partícula de osso autógeno (asterisco), 40x.

Grupo BO (Bio-Oss®)

No grupo BO foram observadas ausência de infiltrado inflamatório e presença de fibras colágenas orientadas paralelamente. Partículas de osso bovino estavam presentes, muitas delas com osteoclastos na sua periferia. Na maioria dos espécimes ocorreu discreta neoformação óssea nas extremidades do defeito (Figura 9).

FIGURA 9 – Fotomicrografias do grupo tratado com Bio-Oss®. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico, 4x; (B) Discreta neoformação óssea (asterisco) junto às margens da lesão (linha tracejada) e partículas de osso bovino (setas), 10x; (C) Osteoclastos na periferia das partículas do enxerto ósseo bovino (setas), 40x.

Grupo BOL (Bio-Oss® + Laser de Baixa Intensidade)

Em 2 espécimes (20%) houve neoformação óssea estendendo-se em direção ao centro do defeito, com manutenção da espessura original da calvária. Presença de tecido ósseo neoformado e osteoclastos foram observados na periferia das partículas de osso bovino remanescentes. Infiltrado inflamatório não foi observado (Figura 10).

FIGURA 10 – Fotomicrografias do grupo tratado com Bio-Oss® e irradiado com laser de baixa intensidade. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico, 4x; (B) Partícula de osso bovino com tecido ósseo neoformado em sua periferia (asterisco), 40x; (C) Osteoclasto na periferia da partícula do enxerto ósseo bovino (seta), 40x.

5.2 Análise histométrica e estatística

A Tabela 1 mostra a descrição dos valores da AON de todos os grupos, assim como a comparação entre eles. Os grupos irradiados com laser de baixa intensidade apresentaram maior média de AON. Foram observadas correlações estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os grupos BO x BOL; BO x L; BO x OAL; BOL x C; C x L; C x OAL. Entretanto, ao comparar os grupos BO x C; BO x OA; BOL x L; BOL x AO; BOL x OAL; C x OA; L x AO; L x OAL; OA x OAL, não foi observada diferença estatisticamente significativa. A distribuição desses dados pode ser vista na Figura 6.

Tabela 1: Média, mediana e desvio-padrão da área de osso neoformado (expressa em porcentagem da área total do defeito) em cada grupo

Grupo	N	Média	Desvio-Padrão	Q25	Mediana	Q75
C ^a	9,00	9,96	4,50	8,58	9,52	13,33
L ^b	7,00	47,67	8,66	43,96	44,58	55,41
OA ^{a,b}	9,00	30,98	16,59	20,96	25,10	36,24
OAL ^b	8,00	39,15	16,72	26,89	40,41	53,32
BO ^a	10,00	11,36	7,89	6,30	9,49	11,57
BOL ^b	10,00	48,57	28,22	35,76	42,22	74,66

Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo Teste de Dunn para comparação entre grupos.

Grupos com a mesma letra não possuem diferença entre si ($p < 0,05$).

C, controle; L, Laser; AO, osso autógeno; OAL, osso autógeno + laser; BO, Bio-Oss®; BOL, Bio-Oss® + laser.

GRÁFICO 1 – Distribuição dos dados da área de osso neoformado para todos os grupos experimentais.

Na Tabela 2 pode-se observar a descrição dos valores da APR para os grupos que recebem material de enxertia e a comparação entre eles. Os grupos irradiados com laser de baixa intensidade apresentaram menor média de APR. Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos BO x BOL e BO x OAL. No entanto, ao comparar os grupos BO x AO, BOL x AO, BOL x OAL, AO x OAL, não foi observada diferença estatisticamente significativa. A distribuição desses valores pode ser observada na Figura 7.

Tabela 2: Média, mediana e desvio-padrão da área de partícula remanescente (expressa em porcentagem da área total do defeito) em cada grupo

Grupo	N	Média	Desvio-Padrão	Q25	Mediana	Q75
OA ^{a,b}	9,00	9,16	7,10	4,35	7,04	13,46
OAL ^b	8,00	3,66	2,79	1,08	4,04	5,84
BO ^a	10,00	38,73	6,95	35,72	37,71	42,78
BOL ^b	10,00	16,74	15,25	0,00	22,42	28,23

Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo Teste de Dunn para comparação entre grupos.

Grupos com a mesma letra não possuem diferença entre si ($p < 0,05$).

C, controle; L, Laser; AO, osso autógeno; OAL, osso autógeno + laser; BO, Bio-Oss[®]; BOL, Bio-Oss[®] + laser.

GRÁFICO 2 - Distribuição dos dados da área de partícula remanescente para os grupos que receberam material de enxertia.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o efeito do laser de baixa intensidade na cicatrização de defeitos de tamanho crítico em calvárias de ratos.

O modelo que utiliza calvária de ratos é adequado em termos de custo, disponibilidade do animal e facilidade da técnica (AYBAR ODSTRCIL; TERRITORIALE; MISSANA, 2005; SPICER et al., 2012). Ratos são muito mais baratos para comprar e abrigar do que animais maiores, conferindo um benefício econômico imediato (AALAMI et al., 2004).

A calvária desses animais permite um defeito reprodutível, que pode ser gerado de forma rápida e não requer fixação para estabilização, tal como geralmente ocorre com defeitos femorais (SPICER et al., 2012). Além disso, ferramentas de análise sofisticadas, tais como tomografia microcomputadorizada (microCT), estão facilmente disponíveis para avaliar os modelos experimentais em ratos (AALAMI et al., 2004). Esses modelos também permitem avaliação histológica e histométrica (AYBAR ODSTRCIL; TERRITORIALE; MISSANA, 2005). Assim, o defeito em calvária de ratos pode servir como um método rápido e de alto rendimento para a avaliação “in vivo” da regeneração óssea (SPICER et al., 2012).

Apesar de todas essas vantagens do modelo de defeito em calvária de rato, o pequeno tamanho da calvária e a vulnerabilidade da dura-máter subjacente representam um desafio técnico (AALAMI et al., 2004). Técnicas cirúrgicas que empregam trefina para a realização do defeito podem danificar ou destruir a dura-máter subjacente, inibindo possivelmente a regeneração. A literatura tem descrito a dura-máter como importante para o sucesso na cicatrização de defeitos ósseos de calvárias, o que pode estar relacionado com o fato de ela ser fonte primária de células osteogênicas e fatores osteoindutores (COOPER et al., 2010; GOSAIN et al., 2003; GREENWALD et al., 2000). Portanto a cura de um defeito ósseo em calvária pode ser influenciada não só pelo tamanho, mas também pela forma com que esse defeito foi criado. A fim de evitar danos à dura-máter, a trefina pode ser associada a instrumentos, tais como descoladores de periósteo (COOPER et al., 2010). Neste trabalho, a trefina foi associada a um esculpido discoide cleoide, possibilitando a remoção delicada do segmento ósseo, sem danos à dura-máter.

Para avaliar diferenças na capacidade regenerativa, Aalami et al. (2004) criaram defeitos de 3, 4 e 5mm de diâmetro na calvária de ratos jovens (6 dias) e adultos (60 dias).

Após eutanásia, foram feitas avaliação radiográfica e histológica. Diferença significativa na capacidade regenerativa foi observada entre animais jovens e adultos. Todos os três tamanhos de defeito foram considerados críticos no adulto, enquanto que a regeneração foi considerada significativa, independentemente do tamanho do defeito, em ratos juvenis. No modelo utilizado neste trabalho os animais pesavam entre 250 e 300g, peso este atingido em cerca de 60 dias de vida do animal. Dessa forma, o defeito de 5mm criado na calvária desses animais é considerado crítico para a idade. A ausência de fechamento completo do defeito cirúrgico no grupo-controle confirma que o defeito utilizado, foi um DTC, corroborando outros estudos (BOSCH; MELSEN; VARGERVIK, 1998; DE BRITO BEZERRA et al., 2012; FURLANETO et al., 2007; JONES et al., 2007; MARDAS; STAVROPOULOS; KARRING, 2008; NAGATA et al., 2010a; NAGATA et al., 2010b; TOKER et al., 2012).

Em modelos de DTC, para a regeneração óssea, a geometria do defeito ósseo parece exercer papel importante na capacidade regenerativa. Assim, em modelos de defeitos de calvária, a relação entre a profundidade e a largura do defeito afeta o potencial das paredes ósseas adjacentes em preencher a área do defeito com células ósseas e propiciar seu completo fechamento. Assim, a geometria rasa de um defeito que não cicatriza espontaneamente é muito exigente, não apenas em termos biológicos, mas também por sua relação geométrica, uma vez que fornece potencial regenerativo baixo do osso local e, muitas vezes, requer propriedades mecânicas de uma membrana como barreira para evitar o colapso e subsequente deterioração da regeneração óssea no defeito (SCHLIEPHAKE et al., 2004).

Sendo um modelo descrito e consagrado pela literatura como rigoroso para avaliar a eficácia de terapias regenerativas e substitutos ósseos (AYBAR ODSTRCIL; TERRITORIALE; MISSANA, 2005; COOPER et al., 2010; DE BRITO BEZERRA et al., 2012; DONOS et al., 2004; MARDAS; STAVROPOULOS; KARRING, 2008; MESSORA et al., 2008b; NAGATA et al., 2010a; SCHMITZ; HOLLINGER, 1986), o presente estudo utilizou defeitos de tamanho crítico de 5mm de diâmetro em calvárias de ratos para avaliar o efeito do laser de baixa intensidade na cicatrização óssea.

De acordo com Bosch et al. (1998), a utilização de grandes defeitos ósseos resulta em alguns inconvenientes, tais como a inclusão da sutura sagital no defeito ósseo craniano, introduzindo assim o tecido conjuntivo da sutura na avaliação da regeneração óssea. Devido ao tamanho da calvária dos animais utilizados neste trabalho, o defeito experimental não pôde ser feito apenas no osso parietal. Portanto um local que envolvesse a sutura sagital foi

escolhido, a fim de uniformizar o modelo experimental. Qualquer possível efeito da inclusão de tecido conjuntivo da sutura sagital estaria presente em todos os grupos. Modelos experimentais semelhantes, que incluíam a sutura sagital, foram relatados em outros estudos (FURLANETO et al., 2007; GARCIA et al., 2012; MESSORA et al., 2008a; NAGATA et al., 2010a; NAGATA et al., 2010b; SCHLIEPHAKE et al., 2004; SPIN-NETO et al., 2010).

Procedimentos não invasivos que possam interferir positivamente no processo de regeneração de defeitos ósseos, tais como a oxigenação hiperbárica (WEISS et al., 2000), estímulos elétricos (WANG et al., 2003), ultrassom (LYON; LIU; MEIER, 2003), bem como a terapia com laser de baixa intensidade, são de grande relevância clínica (DA SILVA; CAMILLI, 2006). Neste trabalho, defeitos ósseos criados cirurgicamente foram submetidos à terapia com laser de baixa intensidade no espectro de infravermelho em um único momento no transoperatório.

Tem sido descrito que os efeitos biomodulatórios do LB dependem do comprimento de onda utilizado, já que componentes tissulares podem influenciar na dispersão da luz (BARBOSA et al., 2012; BASFORD, 1995; PINHEIRO; GERBI, 2006; WEBER et al., 2006). A luz vermelha (632,8nm) penetra 0,5-1,0mm antes de perder 37% de sua intensidade, enquanto os comprimentos de onda infravermelhos penetram 2,0 milímetros antes de perder o mesmo percentual de energia (BASFORD, 1995). A eficácia de ambos os comprimentos de onda sobre o processo de cicatrização óssea pode ter relação com a capacidade em (1) promover proliferação de células endoteliais, neoformação vascular, irrigação sanguínea e nutrição para as células e tecidos locais; (2) estimular a proliferação de fibroblastos, síntese e organização das fibras de colágenas; (3) estimular as células osteoprogenitoras, osteoblastos e osteoclastos, contribuindo para o processo de reparação do osso e (4) o aumento do DNA e RNA síntese, indicado efeitos sobre o crescimento celular e a síntese de proteínas (BARBOSA et al., 2012).

Estudo de Pinheiro et al. (2006) indica que o tecido ósseo irradiado, principalmente, com comprimento de onda no espectro do infravermelho, mostra aumento da proliferação de osteoblastos, deposição de colágeno e neoformação óssea quando comparado com osso não irradiado. Em outro trabalho, Barbosa et al. (2012) observaram que defeitos ósseos submetidos à terapia com laser, no espectro do infravermelho, apresentavam um reparo mais avançado quando comparado aos que receberam tratamento com luz vermelha, sugerindo que o LB no espectro do infravermelho acelera o processo de reparo ósseo. Esses estudos validam

os resultados encontrados neste estudo, os quais mostraram neoformação óssea significativamente maior no grupo irradiado com laser (Grupo L), quando comparada ao grupo não irradiado (Grupo C).

A literatura mostra, ainda, que o efeito da terapia com laser é mais eficaz sobre as fases iniciais da cicatrização (ABOELSAAD et al., 2009; BARBOSA et al., 2012; DA SILVA; CAMILLI, 2006; PINHEIRO et al., 2009a), quando a proliferação celular (fibroblastos e osteoblastos) é mais intensa, assim como a diferenciação das células mesenquimais (PINHEIRO; GERBI, 2006). Diante disso, surgem questionamentos se os efeitos de irradiações em vários momentos durante o período inicial de cicatrização podem oferecer vantagens superiores aos efeitos de uma única irradiação no sítio cirúrgico com densidade de energia ótima, evitando aplicações transcutâneas e manipulação dos tecidos lesados. Alguns trabalhos que realizaram mais de uma sessão de aplicação mostraram um efeito biomodulatório positivo na cicatrização de defeitos ósseos, porém não dispuseram de grupos onde o laser fosse testado isoladamente, o que pode ter mascarado os resultados (GERBI et al., 2005; PINHEIRO et al., 2003; TORRES et al., 2008). Clinicamente, várias seções de irradiações poderiam dificultar a utilização do LB no tratamento.

Garcia et al. (2012) observaram que uma única sessão de irradiação com laser (no momento da cirurgia), associado ou não a bisfosfonatos, foi efetiva para estimular a neoformação óssea em DTC em calvária de ratos ovariectomizados. Eles utilizaram laser de GaAlAs, 660nm, com uma energia de 4 J/ponto. A aplicação do laser foi realizada em apenas uma sessão, em oito pontos distribuídos em volta do defeito, e em um ponto central, totalizando 32J de energia entregue ao sistema. No presente trabalho, o laser utilizado foi de GaAlAs com 790nm. Os animais receberam uma energia de 6J/ponto, em 5 pontos, 4 regularmente distribuídos em volta do defeito, e um ponto central, totalizando uma energia de 30J entregue ao sistema, buscando, dessa forma, uma varredura uniforme da área através da aplicação do laser em pontos equidistantes e uma densidade de energia ótima para uma única irradiação.

Não existem parâmetros universalmente aceitos para a utilização do laser de baixa intensidade. Diferentes protocolos de irradiação são encontrados, com diferentes materiais de ativação, comprimentos de onda e até mesmo dose e número de aplicações, o que dificulta a comparação dos resultados e a escolha dos parâmetros de tratamento (DA SILVA et al., 2010). Seguindo estudos anteriores (GARCIA et al., 2012; PRETEL; LIZARELLI;

RAMALHO, 2007; ROSA et al., 2012), este trabalho teve a intenção de estabelecer diretrizes para um protocolo transcirúrgico imediato envolvendo uma única aplicação do laser, em contato direto com a área da ferida, e confirmar os efeitos benéficos, de uma única sessão de irradiação, para a cicatrização óssea do defeito ósseo, demonstrando que esse tipo de tratamento pode ser viável, além de fácil e rápido.

Os resultados do presente estudo demonstraram que o LB acelerou o processo de neoformação óssea, bem como a reabsorção das partículas de enxerto em todos os grupos irradiados.

Alterações mitocondriais também têm sido sugeridas como sendo responsáveis pelos resultados positivos da terapia a laser. Há relatos de que os efeitos bioenergéticos, bioelétricos e biostimulatórios dessa terapia podem aumentar a produção de ATP, o que facilita os processos de reparo celular. Além disso, conduzem a uma normalização do potencial iônico da membrana celular, revitalizando as funções celulares e promovendo a síntese de ATP sintetase para a produção de ácido nucléico e aceleração da divisão celular (DA SILVA; CAMILLI, 2006; PASSARELLA et al., 1984; YAAKOBI; MALTZ; ORON, 1996).

A melhoria da vascularização, após a laserterapia é um dos mecanismos possíveis para a eficácia clínica desse tratamento (ABOELSAAD et al., 2009; BARBOSA et al., 2012; GARCIA et al., 2012; KHADRA et al., 2004; TRELLES; MAYAYO, 1987; WEBER et al., 2006). Também tem sido relatado que o LB aumenta a atividade osteoblástica (BARBOSA et al., 2012) e osteoclástica (NICOLA et al., 2003), estimula a produção de matriz óssea, a síntese de DNA em cultura de células (ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2012) e a formação de calos ósseos (KAZEM SHAKOURI et al., 2010; OZAWA et al., 1998).

De Souza Merli e colaboradores (2012), avaliando o efeito da laserterapia sobre a remodelação da matriz óssea, demonstraram que o LB promoveu mudanças qualitativas e quantitativas na expressão de sulfato de condroitina, ácido hialurônico, osteonectina e osteocalcina na matriz óssea. Os dados apontaram que o a irradiação com laser acelera a dinâmica da matriz óssea, alterando a expressão de componentes da matriz extracelular e aumentando a área de osso neoformado, o que diminui o período de tempo envolvido na cicatrização óssea.

Outra explicação para o reparo ósseo acelerado, observado neste estudo, nos grupos irradiados com LB, é a de que células mesenquimais indiferenciadas podem ser biomoduladas

positivamente para se tornarem osteoblastos e evoluírem para osteócitos mais rapidamente. Sabe-se que o potencial osteogênico das células mesenquimais depende, além dos fatores genéticos, de fatores indutores locais e sistêmicos. A laserterapia poderia atuar com tal fator indutor (ABOELSAAD et al., 2009; PINHEIRO; GERBI, 2006).

Abramovitch-Gottlib et al. (2005) sugeriram que o LB tem efeito biostimulatório sobre a conversão de células mesenquimais indiferenciadas em células formadoras de osso e na indução da ossificação em cultura de células.

Quando se avaliou, neste estudo, a área de osso neoformado, os resultados encontrados para os grupos irradiados com LB (Grupo L) foram similares aos do grupo enxertado com osso autógeno (Grupo OA) e aos do grupo enxertado com osso autógeno e irradiados com LB (Grupo OAL). Isso poderia sugerir que somente a aplicação do laser já seria benéfica na regeneração óssea, com esse protocolo de aplicação. Por outro lado, a associação do LB ao OA mostrou resultados superiores quando comparado ao tratamento somente com OA. Assim, a associação do LB ao OA poderia ser sugerida como vantajosa para acelerar a proliferação das células e aumentar o volume ósseo neoformado e, assim, ajudar a integração do enxerto na área receptora, corroborando os achados de Weber et al. (2006) e Da Silva e Camilli (2006). Apesar de não terem sido encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os Grupos OA e OAL, a análise histológica revelou, no Grupo OAL, espécimes com neoformação óssea em direção ao centro do defeito cirúrgico. Dessa forma, a irradiação com laser de baixa intensidade pode ser recomendável como uma modalidade de tratamento adicional na regeneração de defeitos ósseos extensos, já que se trata de um método comum e não invasivo para estimular a osteogênese (DA SILVA; CAMILLI, 2006), e acelerar a consolidação de fraturas e a cura de defeitos ósseos (BARBOSA et al., 2012; DA SILVA; CAMILLI, 2006; GARCIA et al., 2012; GUZZARDELLA et al., 2003).

O osso autógeno foi escolhido como um dos materiais de enxerto neste trabalho, por ser considerado padrão-ouro em cirurgias ósseas reconstrutivas (CALORI et al., 2011; HALLMAN; THOR, 2008; MARDAS; STAVROPOULOS; KARRING, 2008; ROGERS; GREENE, 2012; SCHMITT et al., 2012), por apresentar propriedades osteogênicas, osteoindutoras e osteocondutoras (BALDINI; DE SANCTIS; FERRARI, 2011; CALORI et al., 2011; HALLMAN; THOR, 2008; SCHMITT et al., 2012). No entanto, seu processo de coleta pode resultar em danos a estruturas anatômicas locais (dentes, nervos, músculos, vasos) (HERFORD; DEAN, 2011); reabsorção imprevisível do enxerto (HALLMAN; THOR, 2008;

ROGERS; GREENE, 2012); necessidade de um segundo sítio cirúrgico (BALDINI; DE SANCTIS; FERRARI, 2011; CHAVES et al., 2012; OHAYON, 2011; SCHMITT et al., 2012); maior morbidade (CHAVES et al., 2012; HALLMAN; THOR, 2008; MARDAS; STAVROPOULOS; KARRING, 2008; OHAYON, 2011; SCHMITT et al., 2012); maior tempo cirúrgico (MARDAS; STAVROPOULOS; KARRING, 2008; SCHMITT et al., 2012) e quantidade limitada de osso disponível (AMERIO et al., 2010; ROGERS; GREENE, 2012), o que pode ser um problema em casos nos quais o volume do defeito é superior ao volume de material de enxerto saudável disponível, condição prevalente na população pediátrica e geriátrica (GEIGER; LI; FRIESS, 2003).

O fato de os grupos BO e BOL terem promovido resultados semelhantes ao Grupo OA sugere que esta pode ser uma modalidade terapêutica efetiva no tratamento de defeitos ósseos. A eficácia do Bio-Oss[®] já foi comprovada em animais (BASHARA et al., 2012; BERGLUNDH; LINDHE, 1997; HURZELER et al., 1997; JENSEN et al., 2012; TORRES et al., 2008) e em estudos clínicos (CAMELO et al., 2001; CAMELO et al., 1998; EWERS et al., 2004). É um material amplamente utilizado na Odontologia (MARDAS; CHADHA; DONOS, 2010; NEVINS et al., 2011; RIACHI et al., 2012) devido à sua composição química e propriedades físicas semelhantes à porção inorgânica do osso humano (AMERIO et al., 2010; EWERS et al., 2004; HALLMAN; THOR, 2008; NEVINS et al., 2011; OHAYON, 2011; TRAINI et al., 2008). Seus componentes orgânicos são eliminados através de condições controladas de pH e temperatura (OHAYON, 2011). O processo de desproteinização elimina sua capacidade osteoindutora (HALLMAN; THOR, 2008), no entanto a arquitetura óssea é mantida (OHAYON, 2011). Apesar da ausência de componentes orgânicos, os cristais de hidroxiapatita permitem a colonização por osteoblastos e a deposição de matriz óssea (TAPETY et al., 2004), o que fornece ao material excelentes propriedades osteocondutoras (HALLMAN; THOR, 2008; OHAYON, 2011; TORRES et al., 2008; TRAINI et al., 2008; YILDIRIM et al., 2000). A laserterapia poderia atuar como fator indutor (ABOELSAAD et al., 2009; PINHEIRO; GERBI, 2006).

A reabsorção das partículas de Bio-Oss[®] ainda é um assunto conflitante na literatura (BALDINI; DE SANCTIS; FERRARI, 2011). Há relatos de que partículas no interior de defeitos ósseos falham em reabsorver e permanecem como corpo inerte circundado por osso do hospedeiro (EWERS et al., 2004; IEZZI et al., 2008; TRAINI et al., 2008; TRAINI et al., 2007). Por outro lado, outros autores relataram que, após meses de cicatrização, atividade osteoclástica é observada nas partículas e acredita-se que, com o tempo, essas partículas

remodelam-se e novo osso é formado. Entretanto parece ser um processo lento (BERGLUNDH; LINDHE, 1997). Esses relatos validam os resultados deste estudo, os quais mostraram presença de partículas de Bio-Oss® em quase todos os espécimes, algumas delas com atividade osteoclástica e tecido ósseo neoformado em sua periferia.

Acredita-se que o laser tenha acelerado o processo de neoformação óssea e reabsorção dessas partículas, uma vez que o grupo tratado com Bio-Oss® e irradiado com laser (grupo BOL) apresentou diferença estatisticamente significativa na AON e APR quando comparado ao grupo que recebeu apenas enxerto ósseo bovino (grupo BO). Isso pode ter ocorrido devido ao fato de o laser melhorar a vascularização (ABOELSAAD et al., 2009; BARBOSA et al., 2012; GARCIA et al., 2012; KHADRA et al., 2004; TRELLES; MAYAYO, 1987; WEBER et al., 2006), aumentar a atividade osteoclástica (NICOLA et al., 2003) e osteoblástica (BARBOSA et al., 2012), estimular a produção de matriz óssea (ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2012), além de poder agir como fator osteoindutor (ABOELSAAD et al., 2009; PINHEIRO; GERBI, 2006).

Apesar de não ter sido observada diferença estatisticamente significativa na AON e APR entre os grupos OA e OAL, acredita-se que o laser também foi capaz de acelerar o processo de remodelação óssea quando o enxerto autógeno foi utilizado, já que a análise histológica revelou que, no grupo irradiado, houve espécimes com neoformação óssea em direção ao centro do defeito cirúrgico, e a maioria das partículas de enxertos apresentavam osso neoformado na periferia.

No presente estudo, o fato de todos os grupos irradiados com LB terem promovido resultados superiores ao Grupo C e aos grupos que receberam enxerto isoladamente, sugere que essa modalidade terapêutica pode ser efetiva na cicatrização de defeitos ósseos, principalmente quando associada a um material de preenchimento.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Com base na metodologia empregada e no que foi discutido anteriormente, podemos concluir que o laser acelerou o processo de neoformação óssea e de reabsorção das partículas dos materiais de enxertia, e dessa forma, a hipótese nula foi rejeitada.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Aalami OO, Nacamuli RP, Lenton KA, Cowan CM, Fang TD, Fong KD, et al. Applications of a Mouse Model of Calvarial Healing: Differences in Regenerative Abilities of Juveniles and Adults. *Plastic and reconstructive surgery*. 2004 Sep 1;114(3):713-20.

AboElsaad NS, Soory M, Gadalla LM, Ragab LI, Dunne S, Zalata KR, et al. Effect of Soft Laser and Bioactive Glass on Bone Regeneration in the Treatment of Infra-Bony Defects (a Clinical Study). *Lasers in medical science*. 2009 May;24(3):387-95.

Abramovitch-Gottlib L, Gross T, Naveh D, Geresh S, Rosenwaks S, Bar I, et al. Low Level Laser Irradiation Stimulates Osteogenic Phenotype of Mesenchymal Stem Cells Seeded on a Three-Dimensional Biomatrix. *Lasers in medical science*. 2005 Dec;20(3-4):138-46.

Accorsi-Mendonca T, Zambuzzi WF, Bramante CM, Cestari TM, Taga R, Sader M, et al. Biological Monitoring of a Xenomaterial for Grafting: An Evaluation in Critical-Size Calvarial Defects. *Journal of materials science Materials in medicine*. 2011 Apr;22(4):997-1004.

Al Ruhaimi KA. Bone Graft Substitutes: A Comparative Qualitative Histologic Review of Current Osteoconductive Grafting Materials. *The International journal of oral & maxillofacial implants*. 2001 Jan-Feb;16(1):105-14.

AlGhamdi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-Level Laser Therapy: A Useful Technique for Enhancing the Proliferation of Various Cultured Cells. *Lasers in medical science*. 2012 Jan;27(1):237-49.

Alves AC, de Carvalho PD, Parente M, Xavier M, Frigo L, Aimbire F, et al. Low-Level Laser Therapy in Different Stages of Rheumatoid Arthritis: A Histological Study. *Lasers in medical science*. 2012 Apr 27;

Amerio P, Vianale G, Reale M, Muraro R, Tulli A, Piattelli A. The Effect of Deproteinized Bovine Bone on Osteoblast Growth Factors and Proinflammatory Cytokine Production. *Clinical oral implants research*. 2010 Jun;21(6):650-5.

Anneroth G, Hall G, Ryden H, Zetterqvist L. The Effect of Low-Energy Infra-Red Laser Radiation on Wound Healing in Rats. *The British journal of oral & maxillofacial surgery*. 1988 Feb;26(1):12-7.

Araujo MG, Linder E, Lindhe J. Bio-Oss Collagen in the Buccal Gap at Immediate Implants: A 6-Month Study in the Dog. *Clinical oral implants research*. 2011 Jan;22(1):1-8.

Artzi Z. Coronal Ridge Augmentation in the Absence of Bilateral Bony Plates around a Pathologically Denuded Implant Surface. *The International journal of periodontics & restorative dentistry*. 2000 Apr;20(2):191-7.

Aybar Odstreil A, Territoriale E, Missana L. An Experimental Model in Calvaria to Evaluate Bone Therapies. *Acta odontologica latinoamericana : AOL*. 2005 18(2):63-7.

Baek WY, Kim JE. Transcriptional Regulation of Bone Formation. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2011 3(126-35).

Baldini N, De Sanctis M, Ferrari M. Deproteinized Bovine Bone in Periodontal and Implant Surgery. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*. 2011 Jan;27(1):61-70.

Barbosa D, de Souza RA, Xavier M, da Silva FF, Arisawa EA, Villaverde AG. Effects of Low-Level Laser Therapy (LlLt) on Bone Repair in Rats: Optical Densitometry Analysis. *Lasers in medical science*. 2012 Jun 6;

Basford JR. Low Intensity Laser Therapy: Still Not an Established Clinical Tool. *Lasers in surgery and medicine*. 1995 16(4):331-42.

Bashara H, Wohlfahrt JC, Polyzois I, Lyngstadaas SP, Renvert S, Claffey N. The Effect of Permanent Grafting Materials on the Preservation of the Buccal Bone Plate after Tooth Extraction: An Experimental Study in the Dog. *Clinical oral implants research*. 2012 Aug;23(8):911-7.

Bashardoust Tajali S, Macdermid JC, Houghton P, Grewal R. Effects of Low Power Laser Irradiation on Bone Healing in Animals: A Meta-Analysis. *Journal of orthopaedic surgery and research*. 2010 5(1).

Benke D, Olah A, Mohler H. Protein-Chemical Analysis of Bio-Oss Bone Substitute and Evidence on Its Carbonate Content. *Biomaterials*. 2001 May;22(9):1005-12.

Berglundh T, Lindhe J. Healing around Implants Placed in Bone Defects Treated with Bio-Oss. An Experimental Study in the Dog. *Clinical oral implants research*. 1997 Apr;8(2):117-24.

Bigueti CC, Filho EJ, de Andrade Holgado L, Caviquioli G, Moreschi E, Comparin E, et al. Effect of Low-Level Laser Therapy on Intramembranous and Endochondral Autogenous Bone Grafts Healing. *Microscopy research and technique*. 2012 Sep;75(9):1237-44.

Blokhuis TJ, Arts JJ. Bioactive and Osteoinductive Bone Graft Substitutes: Definitions, Facts and Myths. *Injury*. 2011 Sep;42 Suppl 2(S26-9).

Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the Critical-Size Bone Defect in Testing Bone-Regenerating Materials. *The Journal of craniofacial surgery*. 1998 Jul;9(4):310-6.

Boyce BF, Rosenberg E, de Papp AE, Duong le T. The Osteoclast, Bone Remodelling and Treatment of Metabolic Bone Disease. *European journal of clinical investigation*. 2012 Dec;42(12):1332-41.

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast Differentiation and Activation. *Nature*. 2003 May 15;423(6937):337-42.

Brown KV, Li B, Guda T, Perrien DS, Guelcher SA, Wenke JC. Improving Bone Formation in a Rat Femur Segmental Defect by Controlling Bone Morphogenetic Protein-2 Release. *Tissue engineering Part A*. 2011 Jul;17(13-14):1735-46.

Cacciafesta V, Dalstra M, Bosch C, Melsen B, Andreassen TT. Growth Hormone Treatment Promotes Guided Bone Regeneration in Rat Calvarial Defects. *European journal of orthodontics*. 2001 Dec;23(6):733-40.

Calori G, Mazza E, Colombo M, Ripamonti C. The Use of Bone-Graft Substitutes in Large Bone Defects: Any Specific Needs? *Injury*. 2011 42(S56-S63).

Camelo M, Nevins ML, Lynch SE, Schenk RK, Simion M, Nevins M. Periodontal Regeneration with an Autogenous Bone-Bio-Oss Composite Graft and a Bio-Gide Membrane. *The International journal of periodontics & restorative dentistry*. 2001 Apr;21(2):109-19.

Camelo M, Nevins ML, Schenk RK, Simion M, Rasperini G, Lynch SE, et al. Clinical, Radiographic, and Histologic Evaluation of Human Periodontal Defects Treated with Bio-Oss and Bio-Gide. *The International journal of periodontics & restorative dentistry*. 1998 Aug;18(4):321-31.

Chaves MD, de Souza Nunes LS, de Oliveira RV, Holgado LA, Filho HN, Matsumoto MA, et al. Bovine Hydroxyapatite (Bio-Oss((R))) Induces Osteocalcin, Rank-L and Osteoprotegerin Expression in Sinus Lift of Rabbits. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*. 2012 Dec;40(8):e315-20.

Cohen MM, Jr. The New Bone Biology: Pathologic, Molecular, and Clinical Correlates. *American journal of medical genetics Part A*. 2006 Dec 1;140(23):2646-706.

Conti PC. Low Level Laser Therapy in the Treatment of Temporomandibular Disorders (Tmd): A Double-Blind Pilot Study. *Cranio : the journal of craniomandibular practice*. 1997 Apr;15(2):144-9.

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. *Plastic and reconstructive surgery*. 2010 Jun;125(6):1685-92.

Cruz M. Fases da regeneração óssea. In: Cruz M. *Regeneração guiada tecidual*. São Paulo: Ed. Santos; 2006a. p. 75-85.

Cruz M. Impedimentos à regeneração óssea. In: Cruz M. *Regeneração guiada tecidual*. São Paulo: Ed. Santos; 2006b. p. 87-94.

da Silva JP, da Silva MA, Almeida AP, Lombardi Junior I, Matos AP. Laser Therapy in the Tissue Repair Process: A Literature Review. *Photomedicine and laser surgery*. 2010 Feb;28(1):17-21.

da Silva RV, Camilli JA. Repair of Bone Defects Treated with Autogenous Bone Graft and Low-Power Laser. *The Journal of craniofacial surgery*. 2006 Mar;17(2):297-301.

de Brito Bezerra B, Mendes Brazao MA, de Campos ML, Casati MZ, Sallum EA, Sallum AW. Association of Hyaluronic Acid with a Collagen Scaffold May Improve Bone Healing in Critical-Size Bone Defects. *Clinical oral implants research*. 2012 Aug;23(8):938-42.

de Oliveira ESM, Pelegri AA, Alves Pinheiro da Silva A, Manhaes Junior LR, de Mello EOR, Gaiba Franca S, et al. Xenograft Enriched with Autologous Bone Marrow in Inlay Reconstructions: A Tomographic and Histomorphometric Study in Rabbit Calvaria. *International journal of biomaterials*. 2012 2012(170520).

de Souza Merli LA, de Medeiros VP, Toma L, Reginato RD, Katchburian E, Nader HB, et al. The Low Level Laser Therapy Effect on the Remodeling of Bone Extracellular Matrix. *Photochemistry and photobiology*. 2012 Sep-Oct;88(5):1293-301.

Develioglu H, Saraydin S, Kartal U, Taner L. Evaluation of the Long-Term Results of Rat Cranial Bone Repair Using a Particular Xenograft. *The Journal of oral implantology*. 2010 36(3):167-73.

Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone Regeneration: Current Concepts and Future Directions. *BMC medicine*. 2011 9(66).

Dominiak M, Lysiak-Drwal K, Solski L, Zywicka B, Rybak Z, Gedrange T. Evaluation of Healing Processes of Intraosseous Defects with and without Guided Bone Regeneration and Platelet Rich Plasma. An Animal Study. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger* : official organ of the Anatomische Gesellschaft. 2012 Nov;194(6):549-55.

Donos N, Lang NP, Karoussis IK, Bosshardt D, Tonetti M, Kostopoulos L. Effect of Gbr in Combination with Deproteinized Bovine Bone Mineral and/or Enamel Matrix Proteins on the Healing of Critical-Size Defects. *Clinical oral implants research*. 2004 Feb;15(1):101-11.

Ducheyne P, Qiu Q. Bioactive Ceramics: The Effect of Surface Reactivity on Bone Formation and Bone Cell Function. *Biomaterials*. 1999 Dec;20(23-24):2287-303.

Dudley HR, Spiro D. The Fine Structure of Bone Cells. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*. 1961 Dec 1;11(3):627-49.

Elavarasu S, Naveen D, Thangavelu A. Lasers in Periodontics. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*. 2012 Aug;4(Suppl 2):S260-3.

Enwemeka CS, Parker JC, Dowdy DS, Harkness EE, Sanford LE, Woodruff LD. The Efficacy of Low-Power Lasers in Tissue Repair and Pain Control: A Meta-Analysis Study. *Photomedicine and laser surgery*. 2004 Aug;22(4):323-9.

Ewers R, Goriwoda W, Schopper C, Moser D, Spassova E. Histologic Findings at Augmented Bone Areas Supplied with Two Different Bone Substitute Materials Combined with Sinus Floor Lifting. *Clinical oral implants research*. 2004 15(1):96-100.

Favaro-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. *Photomedicine and laser surgery*. 2011 May;29(5):311-7.

Fernando S, Hill CM, Walker R. A Randomised Double Blind Comparative Study of Low Level Laser Therapy Following Surgical Extraction of Lower Third Molar Teeth. *The British journal of oral & maxillofacial surgery*. 1993 Jun;31(3):170-2.

Franz-Odendaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried Alive: How Osteoblasts Become Osteocytes. *Developmental dynamics* : an official publication of the American Association of Anatomists. 2006 Jan;235(1):176-90.

Freeman E, Turnbull RS. The Value of Osseous Coagulum as a Graft Material. *Journal of periodontal research*. 1973 8(4):229-36.

Frost HM. Bone Dynamics in Metabolic Bone Disease. The Journal of bone and joint surgery American volume. 1966 Sep;48(6):1192-203.

Furlaneto FA, Nagata MJ, Fucini SE, Deliberador TM, Okamoto T, Messoria MR. Bone Healing in Critical-Size Defects Treated with Bioactive Glass/Calcium Sulfate: A Histologic and Histometric Study in Rat Calvaria. Clinical oral implants research. 2007 Jun;18(3):311-8.

Garcia VG, da Conceicao JM, Fernandes LA, de Almeida JM, Nagata MJ, Bosco AF, et al. Effects of Lllt in Combination with Bisphosphonate on Bone Healing in Critical Size Defects: A Histological and Histometric Study in Rat Calvaria. Lasers in medical science. 2012 Feb 28;

Geiger M, Li RH, Friess W. Collagen Sponges for Bone Regeneration with Rhbmp-2. Advanced drug delivery reviews. 2003 Nov 28;55(12):1613-29.

Gerbi ME, Pinheiro AL, Marzola C, Limeira Junior Fde A, Ramalho LM, Ponzi EA, et al. Assessment of Bone Repair Associated with the Use of Organic Bovine Bone and Membrane Irradiated at 830 Nm. Photomedicine and laser surgery. 2005 Aug;23(4):382-8.

Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone Substitutes: An Update. Injury. 2005 Nov;36 Suppl 3(S20-7.

Gosain AK, Santoro TD, Song LS, Capel CC, Sudhakar PV, Matloub HS. Osteogenesis in Calvarial Defects: Contribution of the Dura, the Pericranium, and the Surrounding Bone in Adult Versus Infant Animals. Plastic and reconstructive surgery. 2003 Aug;112(2):515-27.

Greenwald JA, Mehrara BJ, Spector JA, Fagenholz PJ, Saadeh PB, Steinbrech DS, et al. Immature Versus Mature Dura Mater: Ii. Differential Expression of Genes Important to Calvarial Reossification. Plastic and reconstructive surgery. 2000 Sep;106(3):630-8; discussion 9.

Guzzardella GA, Torricelli P, Nicoli-Aldini N, Giardino R. Osseointegration of Endosseous Ceramic Implants after Postoperative Low-Power Laser Stimulation: An in Vivo Comparative Study. Clinical oral implants research. 2003 Apr;14(2):226-32.

Hallman M, Sennerby L, Zetterqvist L, Lundgren S. A 3-Year Prospective Follow-up Study of Implant-Supported Fixed Prostheses in Patients Subjected to Maxillary Sinus Floor Augmentation with a 80:20 Mixture of Deproteinized Bovine Bone and Autogenous Bone Clinical, Radiographic and Resonance Frequency Analysis. International journal of oral and maxillofacial surgery. 2005 May;34(3):273-80.

Hallman M, Thor A. Bone Substitutes and Growth Factors as an Alternative/Complement to Autogenous Bone for Grafting in Implant Dentistry. Periodontology 2000. 2008 47(172-92.

Hammerle CH, Chiantella GC, Karring T, Lang NP. The Effect of a Deproteinized Bovine Bone Mineral on Bone Regeneration around Titanium Dental Implants. *Clinical oral implants research*. 1998 Jun;9(3):151-62.

Hammerle CH, Jung RE, Yaman D, Lang NP. Ridge Augmentation by Applying Bioresorbable Membranes and Deproteinized Bovine Bone Mineral: A Report of Twelve Consecutive Cases. *Clinical oral implants research*. 2008 Jan;19(1):19-25.

Hammerle CH, Lang NP. Single Stage Surgery Combining Transmucosal Implant Placement with Guided Bone Regeneration and Bioresorbable Materials. *Clinical oral implants research*. 2001 Feb;12(1):9-18.

Harrison JW. Healing of Surgical Wounds in Oral Mucoperiosteal Tissues. *Journal of endodontics*. 1991 Aug;17(8):401-8.

Hatano N, Shimizu Y, Ooya K. A Clinical Long-Term Radiographic Evaluation of Graft Height Changes after Maxillary Sinus Floor Augmentation with a 2:1 Autogenous Bone/Xenograft Mixture and Simultaneous Placement of Dental Implants. *Clinical oral implants research*. 2004 Jun;15(3):339-45.

Herford AS, Dean JS. Complications in Bone Grafting. *Oral and maxillofacial surgery clinics of North America*. 2011 Aug;23(3):433-42.

Hoexter DL. Bone Regeneration Graft Materials. *The Journal of oral implantology*. 2002 28(6):290-4.

Hurzeler MB, Quinones CR, Kirsch A, Schupbach P, Krausse A, Strub JR, et al. Maxillary Sinus Augmentation Using Different Grafting Materials and Dental Implants in Monkeys. Part Iii. Evaluation of Autogenous Bone Combined with Porous Hydroxyapatite. *Clinical oral implants research*. 1997 Oct;8(5):401-11.

Iezzi G, Scarano A, Mangano C, Cirotti B, Piattelli A. Histologic Results from a Human Implant Retrieved Due to Fracture 5 Years after Insertion in a Sinus Augmented with Anorganic Bovine Bone. *Journal of periodontology*. 2008 Jan;79(1):192-8.

Ishikawa I, Aoki A, Takasaki AA, Mizutani K, Sasaki KM, Izumi Y. Application of Lasers in Periodontics: True Innovation or Myth? *Periodontology 2000*. 2009 50(90-126.

Javan A. Possibility of Production of Negative Temperature in Gas Discharges. *Physical Review Letters*. 1959 3(2):87-9.

Jensen T, Schou S, Gundersen HJ, Forman JL, Terheyden H, Holmstrup P. Bone-to-Implant Contact after Maxillary Sinus Floor Augmentation with Bio-Oss and Autogenous Bone in Different Ratios in Mini Pigs. *Clinical oral implants research*. 2012 Apr 24;

Jones L, Thomsen JS, Mosekilde L, Bosch C, Melsen B. Biomechanical Evaluation of Rat Skull Defects, 1, 3, and 6 Months after Implantation with Osteopromotive Substances. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*. 2007 Dec;35(8):350-7.

Kato E, Lemler J, Sakurai K, Yamada M. Biodegradation Property of Beta-Tricalcium Phosphate-Collagen Composite in Accordance with Bone Formation: A Comparative Study with Bio-Oss Collagen(R) in a Rat Critical-Size Defect Model. *Clinical implant dentistry and related research*. 2012 Jul 18;

Kazem Shakouri S, Soleimanpour J, Salekzamani Y, Oskuie MR. Effect of Low-Level Laser Therapy on the Fracture Healing Process. *Lasers in medical science*. 2010 Jan;25(1):73-7.

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 surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2004 Jun;97(6):693-700.

Khorsand A, Rasouli Ghahroudi AA, Motahhari P, Rezaei Rad M, Soleimani Shayesteh Y. Histological Evaluation of Accell Connexus((R)) and Bio-Oss((R)) on Quality and Rate of Bone Healing: A Single Blind Experimental Study on Rabbit's Calvarium. *J Dent (Tehran)*. 2012 Spring;9(2):116-27.

Kim BS, Kim JY, Song CH, Kim HY, Lee WJ, Lee SJ, et al. Light-Emitting Diode Laser Versus Pulsed Dye Laser-Assisted Photodynamic Therapy in the Treatment of Actinic Keratosis and Bowen's Disease. *Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al]*. 2012 Jan;38(1):151-3.

Kim Y, Nowzari H, Rich SK. Risk of Prion Disease Transmission through Bovine-Derived Bone Substitutes: A Systematic Review. *Clinical implant dentistry and related research*. 2011 Dec 15;

Kogawa EM, Kato MT, Santos CN, Conti PC. Evaluation of the Efficacy of Low-Level Laser Therapy (Lllt) and the Microelectric Neurostimulation (Mens) in the Treatment of Myogenic Temporomandibular Disorders: A Randomized Clinical Trial. *Journal of applied oral science : revista FOB*. 2005 Sep;13(3):280-5.

Kreisler MB, Haj HA, Noroozi N, Willershausen B. Efficacy of Low Level Laser Therapy in Reducing Postoperative Pain after Endodontic Surgery-- a Randomized Double Blind Clinical Study. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2004 Jan;33(1):38-41.

Leonida A, Paiusco A, Rossi G, Carini F, Baldoni M, Caccianiga G. Effects of Low-Level Laser Irradiation on Proliferation and Osteoblastic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells Seeded on a Three-Dimensional Biomatrix: In Vitro Pilot Study. *Lasers in medical science*. 2013 Jan;28(1):125-32.

Lucas C, Criens-Poublon LJ, Cockrell CT, de Haan RJ. Wound Healing in Cell Studies and Animal Model Experiments by Low Level Laser Therapy; Were Clinical Studies Justified? A Systematic Review. *Lasers in medical science*. 2002 17(2):110-34.

Luger EJ, Rochkind S, Wollman Y, Kogan G, Dekel S. Effect of Low-Power Laser Irradiation on the Mechanical Properties of Bone Fracture Healing in Rats. *Lasers in surgery and medicine*. 1998 22(2):97-102.

Lustberg MB, Reinbolt RE, Shapiro CL. Bone Health in Adult Cancer Survivorship. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012 Oct 20;30(30):3665-74.

Lyon R, Liu XC, Meier J. The Effects of Therapeutic Vs. High-Intensity Ultrasound on the Rabbit Growth Plate. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2003 Sep;21(5):865-71.

Maiman TH. Stimulated Optical Radiation in Ruby. 1960

Mardas N, Chadha V, Donos N. Alveolar Ridge Preservation with Guided Bone Regeneration and a Synthetic Bone Substitute or a Bovine-Derived Xenograft: A Randomized, Controlled Clinical Trial. *Clinical oral implants research*. 2010 Jul;21(7):688-98.

Mardas N, D'Aiuto F, Mezzomo L, Arzoumanidi M, Donos N. Radiographic Alveolar Bone Changes Following Ridge Preservation with Two Different Biomaterials. *Clinical oral implants research*. 2011 Apr;22(4):416-23.

Mardas N, Stavropoulos A, Karring T. Calvarial Bone Regeneration by a Combination of Natural Anorganic Bovine-Derived Hydroxyapatite Matrix Coupled with a Synthetic Cell-Binding Peptide (Pepgen): An Experimental Study in Rats. *Clinical oral implants research*. 2008 Oct;19(10):1010-5.

Markovic A, Todorovic L. Effectiveness of Dexamethasone and Low-Power Laser in Minimizing Oedema after Third Molar Surgery: A Clinical Trial. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2007 Mar;36(3):226-9.

Marquez Martinez ME, Pinheiro AL, Ramalho LM. Effect of Ir Laser Photobiomodulation on the Repair of Bone Defects Grafted with Organic Bovine Bone. *Lasers in medical science*. 2008 Jul;23(3):313-7.

Maruotti N, Corrado A, Neve A, Cantatore FP. Bisphosphonates: Effects on Osteoblast. *European journal of clinical pharmacology*. 2012 Jul;68(7):1013-8.

Marx RE, Garg AK. Bone Structure, Metabolism, and Physiology: Its Impact on Dental Implantology. *Implant dentistry*. 1998 7(4):267-76.

Matsumoto MA, Ferino RV, Monteleone GF, Ribeiro DA. Low-Level Laser Therapy Modulates Cyclo-Oxygenase-2 Expression During Bone Repair in Rats. *Lasers in medical science*. 2009 Mar;24(2):195-201.

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. *Journal of periodontal research*. 2008a Dec;43(6):723-9.

Messora MR, Nagata MJ, Mariano RC, Dornelles RC, Bomfim SR, Fucini SE, et al. Bone Healing in Critical-Size Defects Treated with Platelet-Rich Plasma: A Histologic and Histometric Study in Rat Calvaria. *Journal of periodontal research*. 2008b Apr;43(2):217-23.

Mokbel N, Naaman N, Nohra J, Badawi N. Healing Patterns of Critical Size Bony Defects in Rats after Grafting with Bone Substitutes Soaked in Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2: Histological and Histometric Evaluation. *The British journal of oral & maxillofacial surgery*. 2012 Aug 31;

Nagata MJ, Furlaneto FA, Moretti AJ, Bouquot JE, Ahn CW, Messora MR, et al. Bone Healing in Critical-Size Defects Treated with New Bioactive Glass/Calcium Sulfate: A Histologic and Histometric Study in Rat Calvaria. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials*. 2010a Nov;95(2):269-75.

Nagata MJ, Messora M, Pola N, Campos N, Vieira R, Esper LA, et al. Influence of the Ratio of Particulate Autogenous Bone Graft/Platelet-Rich Plasma on Bone Healing in Critical-Size Defects: A Histologic and Histometric Study in Rat Calvaria. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2010b Apr;28(4):468-73.

Nevins M, Camelo M, De Angelis N, Hanratty JJ, Khang WG, Kwon JJ, et al. The Clinical and Histologic Efficacy of Xenograft Granules for Maxillary Sinus Floor Augmentation. *The International journal of periodontics & restorative dentistry*. 2011 Jun;31(3):227-35.

Nicola RA, Jorgetti V, Rigau J, Pacheco MT, dos Reis LM, Zangaro RA. Effect of Low-Power Gaalax Laser (660 Nm) on Bone Structure and Cell Activity: An Experimental Animal Study. *Lasers in medical science*. 2003 18(2):89-94.

Nissan J, Assif D, Gross MD, Yaffe A, Binderman I. Effect of Low Intensity Laser Irradiation on Surgically Created Bony Defects in Rats. *Journal of oral rehabilitation*. 2006 Aug;33(8):619-924.

Norton MR, Odell EW, Thompson ID, Cook RJ. Efficacy of Bovine Bone Mineral for Alveolar Augmentation: A Human Histologic Study. *Clinical oral implants research*. 2003 Dec;14(6):775-83.

Obradović R, Kesić L, Mihailović D, Jovanović G, Antić S, Brkić Z. Low-Level Lasers as an Adjunct in Periodontal Therapy in Patients with Diabetes Mellitus. *Diabetes Technology & Therapeutics*. 2012 14(9):799-803.

Obradovic RR, Kesic LG, Pesevska S. Influence of Low-Level Laser Therapy on Biomaterial Osseointegration: A Mini-Review. *Lasers in medical science*. 2009 May;24(3):447-51.

Ohayon L. Ridge Enlargement Using Deproteinized Bovine Bone and a Bioresorbable Collagen Membrane: A Tomodensitometric, Histologic, and Histomorphometric Analysis. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*. 2011 31(3):237.

Oliveira R, El Hage M, Carrel JP, Lombardi T, Bernard JP. Rehabilitation of the Edentulous Posterior Maxilla after Sinus Floor Elevation Using Deproteinized Bovine Bone: A 9-Year Clinical Study. *Implant dentistry*. 2012 Oct;21(5):422-6.

Ozawa Y, Shimizu N, Kariya G, Abiko Y. Low-Energy Laser Irradiation Stimulates Bone Nodule Formation at Early Stages of Cell Culture in Rat Calvarial Cells. *Bone*. 1998 Apr;22(4):347-54.

Passarella S, Casamassima E, Molinari S, Pastore D, Quagliariello E, Catalano IM, et al. Increase of Proton Electrochemical Potential and Atp Synthesis in Rat Liver Mitochondria Irradiated in Vitro by Helium-Neon Laser. *FEBS letters*. 1984 Sep 17;175(1):95-9.

Pinheiro AL, Gerbi ME. Photoengineering of Bone Repair Processes. *Photomedicine and laser surgery*. 2006 Apr;24(2):169-78.

Pinheiro AL, Limeira Junior Fde A, Gerbi ME, Ramalho LM, Marzola C, Ponzi EA. Effect of Low Level Laser Therapy on the Repair of Bone Defects Grafted with Inorganic Bovine Bone. *Brazilian dental journal*. 2003 14(3):177-81.

Pinheiro AL, Martinez Gerbi ME, de Assis Limeira F, Jr., Carneiro Ponzi EA, Marques AM, 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 in medical science*. 2009a Mar;24(2):234-40.

Pinheiro AL, Meireles GC, Carvalho CM, Ramalho LM, dos Santos JN. Biomodulative Effects of Visible and Ir Laser Light on the Healing of Cutaneous Wounds of Nourished and Undernourished Wistar Rats. *Photomedicine and laser surgery*. 2009b Dec;27(6):947-57.

Pinheiro ALB, Soares LGP, Barbosa AFS, Ramalho LMP, dos Santos JN. Does Led Phototherapy Influence the Repair of Bone Defects Grafted with Mta, Bone Morphogenetic Proteins, and Guided Bone Regeneration? A Description of the Repair Process on Rodents. *Lasers in medical science*. 2012 1-12.

Portal-Nunez S, Lozano D, Esbrit P. Role of Angiogenesis on Bone Formation. *Histology and histopathology*. 2012 May;27(5):559-66.

Posten W, Wrone DA, Dover JS, Arndt KA, Silapunt S, Alam M. Low-Level Laser Therapy for Wound Healing: Mechanism and Efficacy. *Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al]*. 2005 Mar;31(3):334-40.

Pretel H, Lizarelli RF, Ramalho LT. Effect of Low-Level Laser Therapy on Bone Repair: Histological Study in Rats. *Lasers in surgery and medicine*. 2007 Dec;39(10):788-96.

Riachi F, Naaman N, Tabarani C, Aboelsaad N, Aboushelib MN, Berberi A, et al. Influence of Material Properties on Rate of Resorption of Two Bone Graft Materials after Sinus Lift Using Radiographic Assessment. *International journal of dentistry*. 2012 2012(737262).

Rochefort GY, Pallu S, Benhamou CL. Osteocyte: The Unrecognized Side of Bone Tissue. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2010 Sep;21(9):1457-69.

Rogers GF, Greene AK. Autogenous Bone Graft: Basic Science and Clinical Implications. *The Journal of craniofacial surgery*. 2012 Jan;23(1):323-7.

Rosa AP, de Sousa LG, Regalo SC, Issa JP, Barbosa AP, Pitol DL, et al. Effects of the Combination of Low-Level Laser Irradiation and Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 in Bone Repair. *Lasers in medical science*. 2012 Sep;27(5):971-7.

Roynesdal AK, Bjornland T, Barkvoll P, Haanaes HR. The Effect of Soft-Laser Application on Postoperative Pain and Swelling. A Double-Blind, Crossover Study. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 1993 Aug;22(4):242-5.

Salmos-Brito JA, de Menezes RF, Teixeira CE, Gonzaga RK, Rodrigues BH, Braz R, et al. Evaluation of Low-Level Laser Therapy in Patients with Acute and Chronic Temporomandibular Disorders. *Lasers in medical science*. 2013 Jan;28(1):57-64.

Sanders J. Optical Maser Design. *Physical Review Letters*. 1959 3(2):86-7.

Santis ED, Botticelli D, Pantani F, Pereira FP, Beolchini M, Lang NP. Bone Regeneration at Implants Placed into Extraction Sockets of Maxillary Incisors in Dogs. *Clinical oral implants research*. 2011 22(4):430-7.

Schaffler MB, Kennedy OD. Osteocyte Signaling in Bone. *Current osteoporosis reports*. 2012 Jun;10(2):118-25.

Schawlow AL, Townes CH. Infrared and Optical Masers. *Physical Review*. 1958 112(6):1940.

Schliephake 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. *Clinical oral implants research*. 2004 15(1):112-8.

Schmitt CM, Doering H, Schmidt T, Lutz R, Neukam FW, Schlegel KA. Histological Results after Maxillary Sinus Augmentation with Straumann(R) Boneceramic, Bio-Oss(R), Puros(R), and Autologous Bone. A Randomized Controlled Clinical Trial. *Clinical oral implants research*. 2012 Feb 13;

Schmitz JP, Hollinger JO. The Critical Size Defect as an Experimental Model for Craniomandibulofacial Nonunions. *Clinical orthopaedics and related research*. 1986 Apr;205):299-308.

Schwartz Z, Weesner T, van Dijk S, Cochran DL, Mellonig JT, Lohmann CH, et al. Ability of Deproteinized Cancellous Bovine Bone to Induce New Bone Formation. *Journal of periodontology*. 2000 Aug;71(8):1258-69.

Sigurdsson TJ, Lee MB, Kubota K, Turek TJ, Wozney JM, Wikesjo UM. Periodontal Repair in Dogs: Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 Significantly Enhances Periodontal Regeneration. *Journal of periodontology*. 1995 Feb;66(2):131-8.

Silva Junior AN, Pinheiro AL, Oliveira MG, Weismann R, Ramalho LM, Nicolau RA. Computerized Morphometric Assessment of the Effect of Low-Level Laser Therapy on Bone Repair: An Experimental Animal Study. *Journal of clinical laser medicine & surgery*. 2002 Apr;20(2):83-7.

Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of Bone Regeneration Using the Rat Critical Size Calvarial Defect. *Nature protocols*. 2012 Oct;7(10):1918-29.

Spin-Neto R, de Freitas RM, Pavone C, Cardoso MB, Campana-Filho SP, Marcantonio RA, et al. Histological Evaluation of Chitosan-Based Biomaterials Used for the Correction of Critical Size Defects in Rat's Calvaria. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2010 Apr;93(1):107-14.

Stavropoulos A, Karring T. Guided Tissue Regeneration Combined with a Deproteinized Bovine Bone Mineral (Bio-Oss) in the Treatment of Intrabony Periodontal Defects: 6-Year Results from a Randomized-Controlled Clinical Trial. *Journal of clinical periodontology*. 2010 Feb;37(2):200-10.

Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low-Level Laser Irradiation Promotes Proliferation and Differentiation of Human Osteoblasts in Vitro. *Photomedicine and laser surgery*. 2005 Apr;23(2):161-6.

Su-Gwan K, Hak-Kyun K, Sung-Chul L. Combined Implantation of Particulate Dentine, Plaster of Paris, and a Bone Xenograft (Bio-Oss) for Bone Regeneration in Rats. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*. 2001 Oct;29(5):282-8.

Tadjoedin ES, de Lange GL, Bronckers AL, Lyaruu DM, Burger EH. Deproteinized Cancellous Bovine Bone (Bio-Oss) as Bone Substitute for Sinus Floor Elevation. A Retrospective, Histomorphometrical Study of Five Cases. *Journal of clinical periodontology*. 2003 Mar;30(3):261-70.

Takac S, Stojanovic S. [Characteristics of Laser Light]. *Medicinski preglod*. 1999 Jan-Feb;52(1-2):29-34.

Tapety FI, Amizuka N, Uoshima K, Nomura S, Maeda T. A Histological Evaluation of the Involvement of Bio-Oss® in Osteoblastic Differentiation and Matrix Synthesis. *Clinical oral implants research*. 2004 15(3):315-24.

Teti A, Zallone A. Do Osteocytes Contribute to Bone Mineral Homeostasis? Osteocytic Osteolysis Revisited. *Bone*. 2009 44(1):11-6.

Toker H, Ozdemir H, Ozer H, Eren K. Alendronate Enhances Osseous Healing in a Rat Calvarial Defect Model. *Archives of oral biology*. 2012 Nov;57(11):1545-50.

Torres J, Tamimi FM, Tresguerres IF, Alkhraisat MH, Khraisat A, Lopez-Cabarcos E, et al. Effect of Solely Applied Platelet-Rich Plasma on Osseous Regeneration Compared to Bio-Oss: A Morphometric and Densitometric Study on Rabbit Calvaria. *Clinical implant dentistry and related research*. 2008 May;10(2):106-12.

Traini T, Degidi M, Sammons R, Stanley P, Piattelli A. Histologic and Elemental Microanalytical Study of Anorganic Bovine Bone Substitution Following Sinus Floor Augmentation in Humans. *Journal of periodontology*. 2008 Jul;79(7):1232-40.

Traini T, Valentini P, Iezzi G, Piattelli A. A Histologic and Histomorphometric Evaluation of Anorganic Bovine Bone Retrieved 9 Years after a Sinus Augmentation Procedure. *Journal of periodontology*. 2007 May;78(5):955-61.

Trelles MA, Mayayo E. Bone Fracture Consolidates Faster with Low-Power Laser. *Lasers in surgery and medicine*. 1987 7(1):36-45.

Vahabi S, Amirizadeh N, Shokrgozar M, Mofeed R, Mashhadi A, Aghaloo M, et al. A Comparison between the Efficacy of Bio-Oss, Hydroxyapatite Tricalcium Phosphate and Combination of Mesenchymal Stem Cells in Inducing Bone Regeneration. *Chang Gung medical journal*. 2012 35(1):28.

Valentini P, Abensur D. Maxillary Sinus Floor Elevation for Implant Placement with Demineralized Freeze-Dried Bone and Bovine Bone (Bio-Oss): A Clinical Study of 20 Patients. *The International journal of periodontics & restorative dentistry*. 1997 Jun;17(3):232-41.

Valentini P, Abensur D, Wenz B, Peetz M, Schenk R. Sinus Grafting with Porous Bone Mineral (Bio-Oss) for Implant Placement: A 5-Year Study on 15 Patients. *The International journal of periodontics & restorative dentistry*. 2000 Jun;20(3):245-53.

Wang CJ, Wang FS, Yang KD, Weng LH, Hsu CC, Huang CS, et al. Shock Wave Therapy Induces Neovascularization at the Tendon-Bone Junction. A Study in Rabbits. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2003 Nov;21(6):984-9.

Weatherholt AM, Fuchs RK, Warden SJ. Specialized Connective Tissue: Bone, the Structural Framework of the Upper Extremity. *Journal of hand therapy : official journal of the American Society of Hand Therapists*. 2012 Apr-Jun;25(2):123-31; quiz 32.

Weber JBB, Pinheiro ALB, Oliveira MG, Oliveira FAM, Ramalho LMP. Laser Therapy Improves Healing of Bone Defects Submitted to Autologus Bone Graft. *Photomedicine and laser surgery*. 2006 24(1):38-44.

Weiss DD, Stevens DM, Yan JG, Lynch KL, Warnock GR, Matloub HS. Hyperbaric Oxygen: A Means of Decreasing Ischemic Epiphyseal Damage in a Pediatric Rabbit Model. *The Journal of hand surgery*. 2000 Jan;25(1):159-65.

Wenz B, Oesch B, Horst M. Analysis of the Risk of Transmitting Bovine Spongiform Encephalopathy through Bone Grafts Derived from Bovine Bone. *Biomaterials*. 2001 22(12):1599-606.

Wilding R, Slabbert J, Kathree H, Owen C, Crombie K, Delport P. The Use of Fractal Analysis to Reveal Remodelling in Human Alveolar Bone Following the Placement of Dental Implants. *Archives of oral biology*. 1995 40(1):61-72.

Yaakobi T, Maltz L, Oron U. Promotion of Bone Repair in the Cortical Bone of the Tibia in Rats by Low Energy Laser (He-Ne) Irradiation. *Calcified tissue international*. 1996 Oct;59(4):297-300.

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. *Clinical oral implants research*. 2000 Jun;11(3):217-29.

Zarrabi A, Gross AJ. The Evolution of Lasers in Urology. *Therapeutic advances in urology*. 2011 Apr;3(2):81-9.

Zitzmann NU, Scharer P, Marinello CP, Schupbach P, Berglundh T. Alveolar Ridge Augmentation with Bio-Oss: A Histologic Study in Humans. *The International journal of periodontics & restorative dentistry*. 2001 Jun;21(3):288-95.

ANEXO

ANEXO A - Aprovação da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Fone: (14)3235-8356
e-mail: mferrari@fob.usp.br

CEEPA-Proc. Nº 018/2010

Bauru, 7 de julho de 2010.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **“Avaliação da cicatrização de defeitos ósseos criados cirurgicamente em calvárias de ratos tratados com enxerto de origem bovina (Bio-Oss) associados ao laser de baixa instensidade. Estudo histológico e histométrico”**, de autoria de Mércia Jussara da Silva Cunha, foi enviado ao relator para avaliação.

O parecer do Relator **aprovando** o projeto foi aceito em reunião desta Comissão realizada no dia **6 de julho de 2010**, considerando não haver impedimentos éticos:

Solicitamos que ao final da pesquisa seja enviado, para avaliação desta Comissão, 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,

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

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